

UCH-FC
Biotecnología
R177
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

PAPEL DE LA VIA NOTCH EN LA ACTIVACION DE LINFOCITOS T

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

por

Héctor Andrés Ramírez Venegas

Julio, 2012
Santiago - Chile

Director de Seminario de Título: Dra. María Rosa Bono



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Héctor Andrés Ramírez Venegas**

“PAPEL DE LA VIA NOTCH EN LA ACTIVACION DE LINFOCITOS T”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. María Rosa Bono Merino
Directora Seminario de Título

Handwritten signature in blue ink over a dashed line.

Comisión de Evaluación

Dr. Alvaro Glavic Maurer
Presidente Comisión

Handwritten signature in blue ink over a dashed line.

Dr. Alejandro Roth Metcalfe
Evaluador

Handwritten signature in blue ink over a dashed line.



Santiago de Chile, julio de 2012



*A mis padres y hermanos,
los primeros que creyeron en mi.*

*A tu memoria Claudita,
Donde quiera que estés
Tu recuerdo nos acompaña*

BIOGRAFIA



Nací hace ya casi 27 años, en Punta Arenas, una de las ciudades más australes del mundo. Soy el mayor de tres hermanos, los cuales, junto con mis padres, son mi mayor tesoro. De pequeño fui curioso, obsesivo con los temas que me gustaban. Los deportes, la música, fueron construyendo una forma de ver la vida y enfrentarla. Posteriormente los amigos, antes y durante la Universidad, marcaron muchas de mis experiencias y viajes.

Hoy en día continúo con nuevas inquietudes el camino que comencé en esta facultad. Algunos amigos han partido, los mejores siguen ahí. Y yo también, viviendo el día a día entre mi familia, el laboratorio, la natación, el ciclismo, el montañismo, la música y las personas que más quiero. No ha sido sencillo conciliar todos los espacios, sin embargo disfruto cada uno de los momentos que me toca vivir.

AGRADECIMIENTOS

Hay muchas personas importantes en el camino que he recorrido hasta llegar a este punto. Toda historia tiene un comienzo, y en mi caso el inicio de esta historia se remonta varios años atrás en mi vida, quizás cuando recién empezaba a leer. Mis primeras palabras de gratitud van hacia mis padres, quienes con su esfuerzo y abnegación me han abierto muchas puertas a las cuales he podido acceder. Gracias por su amor, su apoyo, paciencia y por las palabras de aliento cuando las cosas se pusieron cuesta arriba.

En segundo lugar quiero agradecer a mis hermanos, quienes fueron dejados de lado muchas veces durante la Universidad, pero que a pesar de todo, siempre estuvieron ahí para hacerme reír, compartir, o simplemente perder el tiempo. Gracias Cris y Vicente, sin ustedes mi vida sería muy diferente a como es.

En tercer lugar agradezco a mis amigos y amigas por su incondicional apoyo no sólo durante la realización de esta tesis, sino que en todos los momentos y viajes compartidos. Gracias Gonzalo, Mary, Carlitos, Freeman, Efra, Daniel, Kata, Esteban, Diego... gracias a los grandes amigos que hice en mi paso por la carrera, gracias Gato, Juanpi, Felipe, Nacho, Perucete, Gaby, Ulises. Gracias por estar ahí, por nuestras noches de estudio y demencia, y por su lealtad. Son unos buenos tipos.

En cuarto lugar, agradezco a la gente del laboratorio, que estuvo ahí para discutir mis ideas, para enseñarme, o a veces también para retarme cuando fue necesario. Gracias Leo por ayudarme en mis comienzos, por tu alegría y buena onda a

toda prueba, y sobre todo, por ser el oído amigo siempre dispuesto a escuchar. Gracias Daniela por haberme guiado de cerca durante todo el camino, aprendí mucho de ti, y agradezco tu paciencia también. Sin duda sin tu ayuda, esta historia habría sido muy distinta. Gracias por haber contribuido a mi formación, mi gratitud, admiración y buenos deseos para ti.

Finalmente agradezco a mi tutora María Rosa, y a Mario por su apoyo, la confianza y las lecciones que me entregaron reunión a reunión. Mucho de lo que soy ahora lo debo a la mano de ustedes, que supieron ser firmes y críticos cuando fue necesario, pero siempre entregando su apoyo y guía en todo momento. Gracias María Rosa por tu innegable vocación docente. Espero responder a la altura de la confianza que depositaron en mí.

Probablemente hay mucha gente que debería incluir en esta lista. Mis tías, mis profesores, amigos que pasaron y se fueron. Personas que ya no caminan entre nosotros. Gracias a todos ustedes que están, o estuvieron ahí conmigo. Gracias por haber sido, o ser aún parte de mi vida.

Santiago, Julio del 2012.

INDICE DE CONTENIDO

Agradecimientos	iv
Indice de Contenido	vi
Indice de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
I. Introducción	1
1.1 Células Dendríticas y activación de los Linfocitos T	1
1.2 Células Dendríticas y la respuesta citotóxica	2
1.3 Células Dendríticas y polarización de la respuesta inmune	4
1.4 La vía Notch	6
1.5 Implicancias de la vía Notch en el desarrollo y activación de Linfocitos T	8
II. Hipótesis	12
III. Objetivos	12
3.1 Objetivo General	12
3.2 Objetivos Específicos	12
IV. Materiales y Métodos	13
4.1 Modelos Animales	13

4.2 Reactivos y Anticuerpos	13
4.3 Aislamiento de Células Dendríticas de bazo	14
4.4 Aislamiento de Linfocitos T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ y cocultivo linfocitos T y Células Dendríticas	15
4.5 Ensayo de proliferación	16
4.6 Transferencia adoptiva	16
4.7 Citometría de flujo y marcaje intracelular	17
V. Resultados	
5.1 Notch es expresado por subpoblaciones celulares en Timo y Bazo	18
5.2 La expresión de Notch se induce durante la activación de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	22
5.3 El bloqueo farmacológico de la vía Notch no afecta de forma significativa la proliferación de LT CD4 ⁺ y CD8 ⁺ durante la activación <i>in vitro</i>	25
5.4 La vía Notch modula la producción de citoquinas en Linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺	27
5.5 Notch2 se expresa en linfocitos T CD4 ⁺ activados <i>in vivo</i>	32
VI. Discusión	34
VII. Conclusiones	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>“Expresión de Notch en Precursores de Linfocitos T en Timo”</i>	20
Figura 2. <i>“Expresión de Notch en Linfocitos T de Bazo”</i>	21
Figura 3. <i>“Expresión de receptores Notch en la superficie de LT CD4⁺ en función del tiempo de activación”</i>	23
Figura 4. <i>“Expresión de receptores Notch en la superficie de LT CD8⁺ en función del tiempo de activación”</i>	24
Figura 5. <i>“El bloqueo farmacológico de Notch no afecta la proliferación de LT CD4⁺ y CD8⁺”</i>	26
Figura 6. <i>“El bloqueo farmacológico de la vía Notch reduce la producción de IFN-γ en LT CD4⁺”</i>	29
Figura 7. <i>“El bloqueo farmacológico de la vía Notch inhibe la producción de IL-10 en LT CD4⁺”</i>	29
Figura 8. <i>“El bloqueo farmacológico de la vía Notch inhibe la producción de IFN-γ en LT CD8⁺”</i>	30

Figura 9. *“El bloqueo farmacológico de la vía Notch reduce la secreción de citoquinas en LT CD8⁺”*

31

Figura 10. *“La expresión de Notch2 se induce durante la activación in vivo de LT CD4⁺”*

33

LISTA DE ABREVIATURAS

CD: Cluster de Diferenciación

CFA: *Complete Freund's adjuvant*, adyuvante completo de Freund.

CFSE: Succinimidil éster de carboxifluoresceína

DAPT: N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicina t-butil éster

DC: Célula Dendrítica

DN: Doble negativo

DP: Doble positivo

FBS: *Fetal Bovine Serum*, suero fetal bovino

ICD: *Intra Cellular Domain*, Dominio Intracelular

IFN- γ : Interferon gama

IL: Interleuquina

LB: Linfocito B

LPS: Lipopolisacárido

LT: Linfocito T

MHC-I: Complejo principal de histocompatibilidad de clase I

MHC-II: Complejo principal de histocompatibilidad de clase II

OVA: ovalbúmina

PAMP: *Pathogen Associated Molecular Pattern*, patrón molecular asociado a patógenos.

PMA: *Phorbol-12-myristate-13-acetate*, forbol-12-miristato-13-acetato

TCR: *T Cell Receptor*, receptor de células T

Th1: T helper 1

Th2: T helper 2

TLR: *Toll Like Receptor*, receptor tipo Toll

RESUMEN

Las células dendríticas determinan las características de la respuesta inmune generada contra patógenos al estimular la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en distintos linajes celulares que poseen distintas propiedades. De esta forma, los linfocitos T CD4⁺ se pueden diferenciar en linfocitos Th1, Th2, Th17 o linfocitos T reguladores, en un proceso denominado polarización de la respuesta inmune.

Las citoquinas producidas por las células dendríticas u otras células del microambiente linfoide son determinantes en la diferenciación de los linfocitos T. Particularmente la respuesta celular Th1 se desarrolla *in vitro* de forma eficiente en presencia de IL-12, mientras que la respuesta de tipo humoral Th2 se desarrolla en presencia de IL-4. Sin embargo, estudios *in vivo* han demostrado que la polarización hacia fenotipos Th1 o Th2 ocurre incluso en ausencia de componentes de la vía de señalización de IL-12 e IL-4, respectivamente, demostrando que estas citoquinas no son las únicas señales responsables del proceso de polarización, y sugiriendo la existencia de otros mecanismos no canónicos capaces de instruir la diferenciación de linfocitos T CD4⁺.

En este contexto, se ha propuesto que la familia de receptores Notch, inicialmente descritos en *Drosophila melanogaster*, podrían tener una función instructiva en el proceso de polarización de la respuesta inmune. En mamíferos, la familia Notch se compone de 4 receptores de transmembrana (Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4), y dos familias de ligandos, los de tipo Delta (Delta1, Delta3, Delta4) y los de

tipo Jagged (jagged1, Jagged2), los cuales están involucrados en una amplia variedad de procesos de diferenciación celular.

La vía Notch ha sido asociada a varios procesos llevados a cabo por el sistema inmune. Entre ellos la linfopoyésis, la elección de linaje entre linfocitos T y linfocitos B, y la polarización de linfocitos T CD4⁺ hacia un fenotipo Th1 y Th2.

En el presente trabajo se estudió el papel que cumple la vía Notch en la función efectora de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Nuestros resultados demuestran que Notch2 alcanza su máximo de expresión en la superficie celular a las 48 horas de activación, en LT CD4⁺ y LT CD8⁺. Además, estudios in vitro, realizados mediante la inhibición de la actividad gamma secretasa, sugieren que la vía Notch regula la producción de citoquinas en LT CD4⁺ y CD8⁺ activados, lo cual nos permite concluir que la vía Notch está involucrada en la polarización y función efectora de LT CD4⁺ y CD8⁺.

ABSTRACT

Dendritic Cells determine the hallmarks of the immune response against pathogens by stimulating the differentiation of CD4⁺ T lymphocytes into different cell lineages which have different effector properties. In this way, CD4⁺ T lymphocytes can differentiate into Th1, Th2, Th17 or regulatory T cells, in a process called immune response polarization.

The cytokines produced by dendritic cells or by other cells from the lymphoid microenvironment, determine the differentiation of T cells. Particularly, the cellular Th1 response develops efficiently *in vitro* in the presence of IL-12, whereas the humoral Th2 response develops efficiently in the presence of IL-4. However, *in vivo* studies have demonstrated that the polarization towards Th1 or Th2 phenotypes can occur even in the absence of components of the IL-12 and IL-4 signaling pathway, respectively, demonstrating that these cytokines are not the only signaling molecules involved in the polarization process, and suggesting the existence of non canonical mechanisms able to drive the differentiation of CD4⁺ T lymphocytes.

In this framework, it has been proposed that the Notch receptor family, initially described in *Drosophila melanogaster*, could have an instructive function in the immune response polarization process. In mammals, the Notch family is composed by four heterodimerical transmembrane receptors (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), and two ligands families: Delta-like ligands (Delta1, Delta3, Delta4) and Jagged-like ligands (Jagged1, Jagged2), which are involved in a wide array of cell differentiation processes.

The Notch signaling pathway has been associated to many processes achieved by the immune system. Among them the lymphopoiesis, the cell fate determination between T lymphocytes and B lymphocytes, the cell fate determination between CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and the CD4⁺ T lymphocytes polarization towards Th1 and Th2 phenotypes.

In the present work we studied the role of Notch signaling pathway in the effector function of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Our results demonstrate that Notch2 reaches its maximum expression after 48 hours of activation, both in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. By an *in vitro* approach, inhibiting the gamma secretase activity, we show that Notch regulates cytokine production in activated CD4⁺ and activated CD8⁺ T lymphocytes, allowing us to conclude that the Notch signaling pathway is probably involved in the polarization and effector function of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes.

I. INTRODUCCION

La inmunidad se refiere a la capacidad de algunos seres vivos de desarrollar respuestas de defensa contra organismos patógenos o células propias anormales. Dependiendo de la naturaleza del patógeno, el sistema inmune puede adoptar diversas estrategias para su eliminación, en un mecanismo guiado por las células dendríticas (DC), las que actúan iniciando y modificando la respuesta de los linfocitos T (LT) lo cual determina el tipo de respuesta efectora contra el patógeno (Kalinski, P. y Moser, M., 2005, Kapsenberg, M. L., 2003). La naturaleza de este proceso y sus implicancias se describen a continuación.

1.1 Células Dendríticas y activación de los LT

Las células dendríticas son una población celular altamente heterogénea (Shortman, K. y Liu, Y. J., 2002) que se genera a partir de precursores presentes en la médula ósea. Se postula que las células precursoras circulantes entran en los tejidos periféricos como células dendríticas inmaduras, en donde pueden capturar antígenos (como por ejemplo, productos microbianos). Posteriormente las células dendríticas cargadas con antígenos, migran a los órganos linfoides, donde, después de madurar, son capaces de activar a linfocitos T reactivos específicos (Bell, D. y col., 1999). El reconocimiento de los organismos patógenos está mediado por receptores codificados de forma germinal, denominados PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*, receptores de reconocimiento de patrones) (Janeway, C. A., Jr., 1989). Estos receptores reconocen patrones moleculares ampliamente conservados entre distintos grupos de organismos patógenos, denominados PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, patrones

moleculares asociados a patógenos) (Janeway, C. A., Jr. y Medzhitov, R., 2002). Una de las familias más grandes de estos receptores son los receptores de tipo Toll (TLR, *Toll Like Receptor*), cuyo primer miembro fue descrito inicialmente en *Drosophila melanogaster* por Christiane Nüsslein-Volhard en 1985 (Anderson, K. V. y col., 1985a, Anderson, K. V. y col., 1985b), mientras que su función en el sistema inmune fue caracterizada por el grupo de Jules Hoffmann 10 años más tarde (Lemaitre, B. y col., 1996). La unión de un ligando a un TLR inicia la activación de la DC, la cual secreta citoquinas, y contribuye a la respuesta inmune innata local. La estimulación a través de los TLR estimula el programa de maduración de la DC, transformándola en una potente célula presentadora de antígenos, capaz de iniciar respuestas específicas al interactuar con LT CD4⁺ vírgenes. La maduración de la DC induce la expresión *de novo* de moléculas de MHC-II (Complejo Principal de Histocompatibilidad, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) las cuales pueden ser cargadas con péptidos derivados de los patógenos; además se producen cambios en la expresión de moléculas coestimuladoras, como CD80 y CD86, las cuales son determinantes para la activación de los LT (Banchereau, J. y col., 2000). El fenotipo de los linfocitos T efectores, dependerá de las señales que encuentren en su microambiente (Janeway, C. A., Jr. y Medzhitov, R., 2002).

1.2 Células Dendríticas y la respuesta citotóxica.

La activación de un LT CD8⁺ está cuidadosamente regulada, debido a sus propiedades efectoras potencialmente deletéreas contra el organismo (Parish, I. A. y Kaech, S. M., 2009). Para su activación, un LT CD8⁺ debe reconocer un péptido en el contexto de una molécula MHC-I, las cuales son expresadas por todas las células del

organismo y presentan péptidos propios o extraños. Sin embargo, para generar una respuesta inmune efectiva, se requiere la presencia de moléculas coestimuladoras en la superficie de la DC, las cuales son inducidas durante el proceso de maduración de la célula dendrítica; de otra forma, se induce tolerancia periférica, lo cual en último término puede finalizar en delección o anergia del linfocito T (Parish, I. A. y Kaech, S. M., 2009). Los LT CD8⁺ efectores pueden destruir rápidamente las células blanco mediante la exocitosis de vesículas que contienen granzimas y perforina. Son también capaces de secretar citoquinas antivirales, como IFN- γ y TNF- α , al ser estimulados a través de su TCR (Williams, M. A. y Bevan, M. J., 2006).

Otro tipo de señales clave en la estimulación de los LT CD8⁺ son las citoquinas inflamatorias derivadas de la respuesta inmune. Particularmente, la IL-12 y los interferones de tipo I (IFN α/β) son capaces de promover la expansión y diferenciación de LT citotóxicos *in vitro* (Mescher, M. F. y col., 2006) e *in vivo* (Cousens, L. P. y col., 1999, Thompson, L. J. y col., 2006), en parte a través de la producción de IFN- γ (Mescher, M. F. y col., 2006, Nguyen, K. B. y col., 2002). No obstante, se ha demostrado que la expansión y diferenciación *in vitro* de LT citotóxicos puede ocurrir en presencia de sólo IL-12 (Cui, W. y col., 2009, Pearce, E. L. y Shen, H., 2007), o sólo IFN α/β (Cousens, L. P. y col., 1999, Kolumam, G. A. y col., 2005), descartando que la secreción conjunta de estas citoquinas sea necesaria para la inducción de la respuesta citotóxica.

Adicionalmente, se ha descrito que la producción de granzima B es regulada por los factores de transcripción RBP-J y CREB1, involucrados en la vía de señalización Notch (Maekawa, Y. y col., 2008). Sin embargo, el rol de la vía Notch en la función de los LT CD8⁺ continúa siendo un objeto de estudio actualmente.

1.3 Células dendríticas y polarización de la respuesta inmune.

La activación de un LT CD4⁺ está determinada por tres señales que son proporcionadas por la DC madura. La primera señal activadora resulta de la interacción entre el receptor del LT CD4⁺ (TCR, *T Cell Receptor*) y la molécula MHC-II presente en la DC, cargada con un péptido derivado del patógeno. El inicio de la respuesta inmune mediada por LT CD4⁺ requiere adicionalmente de segundas señales dependientes de la interacción de moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de la DC con receptores en la superficie del LT (Cunningham, A. J. y Lafferty, K. J., 1977) y citoquinas secretadas selectivamente por la DC u otras células del microambiente linfoide, de acuerdo a las características del patógeno (Kalinski, P. y col., 1999). Dependiendo de las señales recibidas, un LT CD4⁺ puede adquirir un fenotipo denominado T helper 1 (Th1), caracterizado por la secreción de altos niveles de IFN- γ y linfotóxina- α , citoquinas esenciales en la inducción de respuestas celulares contra patógenos intracelulares como virus, ciertas bacterias, micobacterias y protozoos (Abbas, A. K. y col., 1996), o un fenotipo denominado T helper 2 (Th2), caracterizado por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, citoquinas importantes en la defensa contra parásitos helmínticos (Abbas, A. K. y col., 1996). Recientemente, se ha identificado una nueva población de linfocitos T helper denominados linfocitos Th17. Estos linfocitos se diferencian en presencia de IL-6 y TGF- β , y se caracterizan por la presencia del factor de transcripción ROR γ t y la secreción de IL-17, la cual estimula el reclutamiento de granulocitos y promueve la eliminación de bacterias extracelulares (Weaver, C. T. y col., 2007). Por último, se ha descrito una población de linfocitos T encargados de mantener la tolerancia a autoantígenos, los LT reguladores, especializados en la supresión de la respuesta inmune (Von Boehmer, H., 2005).

La alta eficiencia con la cual se generan LT Th1 o Th2 *in vitro* en presencia de IL-12 e IL-4, respectivamente, ha generado la noción que estas citoquinas son las principales inductoras de estos fenotipos, sin embargo, muchas de las respuestas Th1 y Th2 *in vivo* son parcial o completamente independientes de estas citoquinas. En modelos knock-out para IL-12, o los componentes de su receptor, la respuestas Th1 se reducen, pero no se inhiben por completo (Brombacher, F. y col., 1999, Kaplan, M. H. y col., 1998, Magram, J. y col., 1996, Mullen, A. C. y col., 2001), esto ha permitido argumentar que la IL-12 es una citoquina que más bien selecciona células que ya se han diferenciado a un fenotipo Th1, y aumenta su función efectora (Kaplan, M. H. y col., 1998, Mullen, A. C. y col., 2001). Algunas respuestas de tipo Th1 son completamente independientes de IL-12, como las observadas en el modelo de diabetes en ratones no obesos (Trembleau, S. y col., 1999), y en respuestas a ciertos virus, como el de la coriomeningitis linfocítica, y el virus de la hepatitis murina (Oxenius, A. y col., 1999, Schijns, V. E. y col., 1998).

En el caso de respuestas de tipo Th2, se ha mostrado que estas se reducen en ausencia del receptor para IL-4 (Shimoda, K. y col., 1996, Takeda, K. y col., 1996). Asimismo, la generación de respuestas Th2 *in vivo* sería independiente de IL-4 (Jankovic, D. y col., 2000, Shimoda, K. y col., 1996). Por otra parte, los números absolutos de LT Th2 generados en presencia de parásitos helmínticos son similares en ratones silvestres y en ratones knock-out para STAT6, un factor de transcripción esencial para respuestas de tipo Th2 (Finkelman, F. D. y col., 2000, Jankovic, D. y col., 2002, Jankovic, D. y col., 2000, King, S. B. y col., 2008, Voehringer, D. y col., 2006).

Esta evidencia sugiere que existen otros factores que pueden instruir la diferenciación de los LT CD4⁺, regulando así su función efectora.

Investigaciones recientes realizadas por distintos grupos apoyan la idea que la vía Notch podría aportar las señales necesarias para la diferenciación de los LT, tanto a nivel central durante la maduración intratímica, como en la periferia durante la activación frente a patógenos (Amsen, D. y col., 2007, Cho, O. H. y col., 2009, Dallman, M. J. y col., 2005, Fang, T. C. y col., 2007, Mckenzie, G. J. y col., 2003, Tsukumo, S. y Yasutomo, K., 2004).

1.4 La vía Notch

Notch es una familia de receptores de transmembrana que regulan varios aspectos de la diferenciación celular en organismos pluricelulares (Lai, E. C., 2004). Los cuatro receptores Notch descritos en mamíferos contienen dominios estructurales conservados (Lubman, O. Y. y col., 2004). El dominio extracelular consiste de 29-36 repeticiones en tándem de estructura tipo EGF (*Epidermal Growth Factor*, factor de crecimiento epidermal), las cuales pueden unir ligandos de tipo DSL (Delta-Serrate-Lag2), y tres repeticiones LIN12/Notch, las cuales impiden la señalización independiente de unión de un ligando. Por otra parte, el dominio intracelular de Notch (ICD, del inglés *Intracellular Domain*, Notch intracelular) contiene dominios encargados de mediar transducción de señales y activación transcripcional. Estos dominios incluyen un dominio RAM y repeticiones de ankirina, los cuales interactúan con proteínas efectoras río abajo de la cascada de señalización, secuencias de localización

nuclear, y un dominio PEST C-terminal, que regula la estabilidad de la proteína (Lubman, O. Y. y col., 2004).

Después de su síntesis, los receptores Notch sufren un corte catalizado por una proteasa tipo furina en el sitio denominado S1, adyacente a la subunidad de transmembrana (Selkoe, D. y Kopan, R., 2003). Este corte permite la asociación no covalente entre el dominio extracelular, y el dominio transmembrana, creando un receptor heterodimérico. La unión de un ligando (existen al menos cinco ligandos: Jagged1, Jagged2, Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4) al dominio extracelular gatilla dos eventos adicionales de corte proteolítico. El primero ocurre cerca al dominio de transmembrana, en el sitio S2, y es dependiente de actividad metaloproteásica. El segundo corte ocurre dentro del dominio transmembrana, en el sitio S3, en un proceso catalizado por un complejo multiproteico, denominado γ -secretasa, que contiene las proteínas presenilina, nicastrina, APH-1 y PEN-2 (Fortini, M. E., 2002). Los inhibidores de la actividad γ -secretasa, como DAPT, o la pérdida de la función nicastrina o presenilina previene la señalización vía Notch (Wolfe, M. S., 2001).

Una vez liberado de la membrana plasmática, el ICN se transloca al núcleo, donde se asocia con el factor de transcripción RBP-J (*Recombination-signal-Binding Protein for immunoglobulin- κ J region*, Proteína de unión a la señal de recombinación para la región J de inmunoglobulina κ) (también conocido como CBF-1, CSL) y el coactivador Mastermind-like 1 (MAML1) (Bray, S. J., 2006). El complejo trimolecular recluta además a otros coactivadores, incluyendo algunas enzimas capaces de modificar la cromatina, con el fin de activar la transcripción de los genes blanco de la vía (Artavanis-Tsakonas, S. y col., 1999).

1.5 Implicancias de la vía Notch en el desarrollo y activación de LT.

Sin duda, la relación más documentada entre Notch y los LT es a nivel linfopoyético. Estudios de pérdida y ganancia de función han mostrado un rol importante de la vía Notch en la especificación de linaje T o B en la linfopoyesis. La delección de los genes codificantes para Notch1 (*Notch1*) o para RBP-J (*Rbpsuh*) en médula ósea de ratones adultos, resulta en un bloqueo del desarrollo de precursores de LT y en diferenciación ectópica de linfocitos B (LB) inmaduros en el timo (Han, H. y col., 2002, Macdonald, H. R. y col., 2001, Radtke, F. y col., 1999, Wilson, A. y col., 2001). Por otra parte, al expresar Notch1 de forma constitutiva en la médula ósea mediante vectores retrovirales, se suprime el desarrollo de precursores de LB y se induce el desarrollo de LT inmaduros en la médula ósea (Pui, J. C. y col., 1999).

Otra función estudiada es a nivel de la elección del TCR, donde se ha demostrado que linfocitos presentes en el timo de ratones *Notch1*^{+/-} se diferencian en LT $\gamma\delta$ de forma más eficiente que linfocitos provenientes del timo de ratones *Notch1*^{+/+} (Washburn, T. y col., 1997). Adicionalmente ratones que carecen el ligando Jagged2 poseen menos LT $\gamma\delta$ (Jiang, R. y col., 1998), lo cual sugiere una posible función de Notch en la elección de linaje $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$.

Una de las funciones más controversiales atribuidas a la vía Notch es la capacidad de influenciar la elección de fenotipo Th1 o Th2 en LT CD4⁺. Esto ocurriría mediante la expresión de distintos ligandos de Notch en las DC los cuales interactuarían con receptores Notch en la superficie del LT. Algunas evidencias sobre este punto son que estímulos promotores de respuestas Th1 como LPS y CpG, inducen la expresión de ligandos tipo Delta en DCs. Estudios de ganancia de función

demuestran que la estimulación con proteínas de fusión DLL-Fc induce respuestas tipo Th1 tanto *in vitro* (Elyaman, W. y col., 2007) como *in vivo* (Elyaman, W. y col., 2007, Maekawa, Y. y col., 2003, Okamoto, M. y col., 2008). La deficiencia de la proteína adaptadora MyD88 inhibe la inducción de proteínas de tipo Delta en DCs e impide la polarización hacia Th1, de forma tanto dependiente como independiente de IL-12 (Amsen, D. y col., 2004, Jankovic, D. y col., 2002, Rudd, B. D. y col., 2007, Sun, J. y col., 2008). Adicionalmente se ha mostrado que la expresión de DLL1 o DLL4 por células presentadoras de antígeno artificiales, o DCs derivadas de médula ósea, promueve la diferenciación hacia Th1 (Amsen, D. y col., 2004, Skokos, D. y Nussenzweig, M. C., 2007, Sun, J. y col., 2008). En otros estudios, varios grupos han mostrado que la expresión del fragmento intracelular de Notch1 o Notch3 en LT CD4⁺ inducen la diferenciación hacia Th1 (Amsen, D. y col., 2007, Maekawa, Y. y col., 2003, Minter, L. M. y col., 2005). *In vivo*, el pretratamiento con inhibidores del complejo γ -secretasa antes de la inducción de EAE (encefalitis autoinmune experimental, modelo murino de esclerosis múltiple mediado por células Th1) tiene un efecto protector frente a los síntomas de la enfermedad, y menos infiltración de linfocitos demielinizantes in la médula espinal, respecto al control que no recibió pretratamiento (Minter, L. M. y col., 2005).

Estudios en ratones mutantes condicionales para RBP-J, han demostrado que la señalización dependiente de RBP-J promueve la proliferación de LT en presencia de células presentadoras de antígeno, promoviendo un fenotipo Th2, e inhibiendo la polarización hacia Th1 (Amsen, D. y col., 2004, Tanigaki, K. y col., 2004). Se ha reportado la existencia de secuencias de unión a RBP-J, denominada CNS2, en el *enhancer* 3' del promotor de IL-4, lo cual indica que la regulación de la expresión de IL-

4 por Notch puede influenciar la polarización de LT CD4⁺. Adicionalmente, se ha mostrado que las respuestas Th2 son inhibidas en ausencia de Notch1 y Notch2 (aunque no se observa efecto en ausencia de cada uno por separado) (Amsen, D. y col., 2007). Sin embargo, aunque Notch se requiere para el desarrollo de respuestas Th2 contra antígenos derivados de parásitos, LT deficientes para Notch1, Notch2, presenilina 1, presenilina 2 o RBP-J, se diferencian normalmente en células Th2 *in vitro*, en presencia de alta concentración de IL-4 (Amsen, D. y col., 2007, Ong, C. T. y col., 2008, Tu, L. y col., 2005). Esta discrepancia en los resultados, es decir, el hecho de que el exceso de IL-4 sea capaz de restaurar la diferenciación hacia Th2 en ausencia de Notch, o componentes de su vía, ha sido motivo de controversia en relación al rol de Notch en respuestas Th2. En relación a los ligandos de Notch asociados a respuestas Th2, existe evidencia indicando que la expresión de proteínas tipo Jagged induce diferenciación hacia un fenotipo Th2. Bajo estímulos de tipo Th2, incluyendo productos microbianos como SEA (*Schistosima mansoni* egg, huevos de *Schistosima mansoni*), toxina de *Vibrio cholerae*, alérgenos o mediadores proinflamatorios (como prostaglandina E2), se observa la inducción de la expresión de ligandos de tipo Jagged en DCs (Amsen, D. y col., 2004, Krawczyk, C. M. y col., 2008, Krishnamoorthy, N. y col., 2008).

Varios investigadores han estudiado el rol de la vía Notch en la proliferación de los LT, sin embargo los resultados son contradictorios. Se han reportado efectos tanto inhibitorios como positivos de la vía Notch sobre la proliferación de los LT (Tsukumo, S. y Yasutomo, K., 2004), lo cual se cree que guarda relación con las distintas aproximaciones experimentales utilizadas en los trabajos.

La amplia variedad de resultados obtenidos por distintos grupos, hace difícil alcanzar un consenso y consistencia en cuanto a la función de Notch en el desarrollo y activación de los LT aún cuando no hay duda acerca de su importancia. En este seminario de título nos abocamos al estudio de la función de la vía Notch en la activación de los LT en la periferia y a nivel de la maduración en el timo. Para ello aprovechamos la existencia de anticuerpos contra los receptores Notch, los cuales mediante experimentos de citometría de flujo nos permitieron correlacionar la participación de estas moléculas en procesos relacionados con la maduración y activación de los LT.

II. HIPOTESIS

La vía Notch participa en la activación y función efectora de los linfocitos T.

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la función de la vía Notch durante la activación y función efectora de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estudiar la expresión de receptores Notch en Bazo y Timo.
- Estudiar la expresión de receptores Notch durante la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ *in vitro*.
- Determinar el papel de la vía Notch en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ *in vitro*.
- Determinar el papel de la vía Notch en la producción de citoquinas en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ *in vitro*.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 MODELOS ANIMALES

Para la obtención de células dendríticas se usaron ratones C57BL/6 (Haplotipo H-2^b). Los linfocitos T CD4⁺ con un TCR reactivo contra el péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉, y los linfocitos T CD8⁺ con un TCR reactivo contra el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄, ambos en el contexto MHC de haplotipo H-2^b, se obtuvieron a partir de ratones OT-II y OT-I respectivamente (Jackson Laboratory). Todos los experimentos se realizaron usando ratones de 8-12 semanas de edad. Los ratones se albergaron en condiciones libres de patógenos en el bioterio de la Fundación Ciencia para la Vida, y su utilización fue realizada de acuerdo a las regulaciones institucionales y éticas de la Fundación Ciencia para la Vida, y el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

4.2 REACTIVOS Y ANTICUERPOS

Los siguientes anticuerpos fueron adquiridos de BD Biosciences (San Jose, CA): anti-CD4 APC (clon RM4-5), anti-CD4 FITC (clon RM4-5), anti-CD8 FITC (clon Ly-2), anti-CD25 APC (clon 7D4), anti-Vα2 PE (clon B20.1), anti-Vβ5 FITC (clon MR9-4), anti-IL-4 PE (clon 11B11), anti-IFN-γ FITC (clon XMG1.2), anti-IL-17 PE (clon TC11-18H10), anti-IL-10 APC (clon JES5-16E3), anti-CD11c APC (clon HL3), anti-IA^b FITC (clon 25-9-17), anti-CD16/CD32 (FcBlock) (clon 2.4G2).

Los anticuerpos anti-Notch2 PE (clon HMN2-35), anti-Notch3 PE (clon HMN3-133), anti-Notch4 PE (clon HMN4-14) y su control de isotipo Armenian hámster IgG PE (clon HT4888) fueron adquiridos de BioLegend (San Diego, CA).

Para los experimentos de inhibición de la vía Notch, se usó un inhibidor farmacológico de la actividad γ -secretasa, DAPT (inhibidor IX 565770, Calbiochem, San Diego, CA).

Otros reactivos usados en este trabajo son CFSE (Molecular Probes, Eugene, OR), Ionomicina (Sigma) y PMA (Sigma).

4.3 AISLAMIENTO DE DC DE BAZO

Se ha reportado que en ratones tratados con la citoquina FLT3-L, aumenta de manera significativa el número de DC funcionales (Maraskovsky, E. y col., 1997). De acuerdo a esto, para la obtención de DC se utilizaron ratones C57BL/6 inyectados con células de melanoma murino (B16) transfectadas con el gen codificante para FLT3-L (facilitadas por el Dr. Hidde Plough, Harvard Medical School, Boston, EEUU) (Shi, G. P. y col., 1999).

Brevemente, se inyectaron en forma subcutánea $25 \cdot 10^6$ células B16-FLT3-L por ratón, en 300 μ L de PBS. Luego de 2 semanas, el ratón se sacrificó y se disecó el bazo, el cual fue disgregado primero mecánicamente, y luego enzimáticamente con 1 mg/ml de Colagenasa D (Roche) y 20 μ g/ml de DNAsa (Roche) por 45 min. a 37 °C. Posteriormente las células fueron filtradas en una malla de 90 μ m, los eritrocitos se lisaron usando un buffer de lisis hipotónico de Cloruro de Amonio (NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 10 mM, Na_2EDTA 0.1 mM, pH 7.2-7.4). Las DC fueron aisladas de la

suspensión celular mediante selección positiva inmunomagnética usando microbeads anti-CD11c (N418) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

4.4 AISLAMIENTO DE LT CD4⁺, LT CD8⁺ Y COCULTIVO CON DC.

Los LT CD4⁺ del bazo de ratones OT-II y los LT CD8⁺ del bazo de ratones OT-I, se aislaron usando microbeads anti-CD4 (L3T4) y anti-CD8 (Ly-2), respectivamente (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los LT CD4⁺ se cocultivaron por 4 días con DC en proporción 5:1 ($0.2 \cdot 10^6$ LT, $0.04 \cdot 10^6$ DC) en placas P-96 de fondo redondo (Orange Scientific, Bélgica) en presencia de $5 \mu\text{M}$ de péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ (New England Peptide, Gardner, MA). Los LT CD8⁺ se cocultivaron por 4 días con DC en proporción 5:1 ($0.2 \cdot 10^6$ LT, $0.04 \cdot 10^6$ DC) en placas P-96 de fondo redondo (Orange Scientific, Bélgica) en presencia de 2 nM de péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (New England Peptide, Gardner, MA). Para estudiar la función de la vía Notch, se agregó DAPT a una concentración final de $5 \mu\text{M}$.

En algunos casos, se usaron LT previamente marcados con CFSE, para evaluar proliferación.

Todos los cocultivos se realizaron en medio IMDM suplementado con 10%(v/v) de FBS (Gibco) y 2-mercaptoetanol $55 \mu\text{M}$ (Gibco), a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 5% CO_2 .

4.5 ENSAYO DE DILUCION DE CFSE

Para estudiar la proliferación de los LT activados, se utilizaron LT marcados con CFSE. Para ello, LT CD4⁺ o CD8⁺ fueron resuspendidos a $10 \cdot 10^6$ cel/ml en PBS (Gibco) con CFSE a una concentración final de 5 μ M. Las células se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad, con agitación, por 10 minutos, al cabo de los cuales, el marcaje fue detenido por la adición de un volumen equivalente de FBS descomplementado. Las células finalmente se contaron y se ajustaron a la concentración adecuada para realizar los cocultivos. Luego de 72 h, la proliferación se estudió por citometría de flujo.

4.6 TRANSFERENCIA ADOPTIVA

Se aislaron LT CD4⁺ del bazo de ratones OT-II, los cuales fueron marcados con CFSE 10 μ M como se describe anteriormente, y luego inyectados por vía intravenosa, en la vena caudal de un ratón receptor C57BL/6. Después de 24 horas, el ratón receptor fue inmunizado con 1 mg de proteína OVA (Sigma- Aldrich) en CFA y 3 días después, el animal se sacrificó y se extrajeron los nódulos linfáticos periféricos (PLN). Para la obtención de células a partir de PLN, los órganos fueron disgregados mecánicamente, y luego filtrados con una malla de 90 μ m. Los eritrocitos se lisaron usando un buffer de lisis hipotónico, como se describe anteriormente, y las células recuperadas fueron marcadas para citometría de flujo con el protocolo ya descrito.

4.7 CITOMETRIA DE FLUJO Y MARCAJE INTRACELULAR

Para los ensayos de citometría de flujo, las células se incubaron por 20 minutos a 4 °C con los anticuerpos diluidos en medio RPMI suplementado con 2%(v/v) FBS. Posteriormente se resuspendieron en PBS suplementado con 2%(v/v) FBS a una concentración final de $1 \cdot 10^6$ cel/ml para la adquisición de los datos.

Para determinar la producción de citoquinas, los LT fueron recuperados de los cocultivos y reactivados con PMA (0.25 μ M) más Ionomicina (1 μ g/mL) en presencia de 1 μ l de Golgi Plug (BD Biosciences), en medio RPMI suplementado con 10%(v/v) de FBS, por 4 h. Posteriormente, las células se fijaron y permeabilizaron usando el kit Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) y se marcaron intracelularmente con anticuerpos contra IFN- γ , IL-4, IL-17 e IL-10.

Alternativamente, para estudiar citoquinas secretadas al medio de cultivo, los sobrenadantes fueron colectados y guardados a -80 °C hasta su análisis, el cual se realizó mediante el ensayo CBA (Cytometric Bead Array) (BD Biosciences) siguiendo el protocolo del fabricante.

4.8 ANALISIS ESTADISTICO

Los análisis estadísticos fueron realizados mediante ANOVA de una vía con test de Bonferroni de comparación múltiple, o mediante una prueba t no apareada de dos colas usando GraphPad Prism versión 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California). Para comparar curvas de distribución, se analizaron los datos mediante ANOVA de dos vías, usando el mismo software.

V. RESULTADOS

5.1 Notch es expresado por subpoblaciones celulares en Timo y Bazo.

Uno de los roles más estudiados de Notch en relación al sistema inmune, es su importancia en la linfopoyesis. Esta vía ha sido implicada en los procesos de diferenciación de linfocitos T, B y linfocitos T $\gamma\delta$ (Tanigaki, K. y Honjo, T., 2007). Muchos estudios, particularmente aquellos destinados a estudiar la expresión de Notch en subpoblaciones del timo, se han realizado mediante análisis de expresión del mRNA de estas proteínas, principalmente por la carencia previa de anticuerpos contra Notch, disponibles actualmente. Esta evidencia previa nos llevó a preguntarnos si efectivamente Notch se expresa en precursores de linfocitos T en el timo, analizando directamente la expresión de los receptores en la superficie de los timocitos.

Al analizar mediante citometría de flujo la expresión de Notch 2, Notch 3 y Notch 4 en el timo observamos que sólo Notch3, se expresa en timocitos (Figura 1C), particularmente en la población CD4⁻ CD8⁻ (DN, dobles negativos).

Como se mencionó en la introducción, la vía Notch se ha propuesto como responsable del mecanismo de elección de correceptor en linfocitos T, sin embargo esta afirmación ha sido objeto de controversia. En un intento de aportar nuevas evidencias sobre esta hipótesis, se estudió la expresión de CD44 y CD25 en la población doble negativa. El uso de estos marcadores ha sido ampliamente descrito para identificar progenitores intratímicos, ya que la población doble negativa es heterogénea, comprendiendo células en diversos estadios de desarrollo (Ceredig, R. y

Rolink, T., 2002). De este estudio se pudo comprobar que las células DN, además de expresar Notch3, tienen alta expresión de CD25 y expresión intermedia de CD44 (Figura 1A, centro), lo que permitió determinar que corresponden a un estado DN2 o DN3, caracterizado por expresión de CD44 en forma intermedia, y alta expresión de CD25 (Ceredig, R. y Rolink, T., 2002). Este resultado es importante, ya que durante la etapa DN3 ocurre la recombinación de los genes del TCR, para su posterior expresión en la superficie, lo cual es un requisito para la progresión a etapas posteriores del desarrollo linfocitario (Fehling, H. J. y col., 1995, Malissen, M. y col., 1995). De acuerdo a este resultado, la vía Notch podría estar efectivamente involucrada en la elección de TCR durante la transición a la etapa DN3.

De forma consistente con nuestras observaciones, los timocitos DN expresan de forma muy baja CD3, lo cual sugiere que la vía Notch está activa antes de la formación de un TCR maduro (Figura 1B, histograma verde). Por el contrario, los timocitos CD4⁺ (histograma amarillo) y CD8⁺ (histograma violeta) expresan CD3, por encontrarse en un estado de maduración más avanzado. No se detectó expresión de CD3 en timocitos DP (histograma azul).

En bazo, la expresión basal de Notch resultó muy baja en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Figura 2). Este resultado inesperado dificulta un modelo para entender un posible rol de Notch en la función de linfocitos T maduros, sin embargo nos motivó a considerar la posibilidad de que la expresión de Notch dependiese de la activación, lo cual se analiza en el siguiente punto.

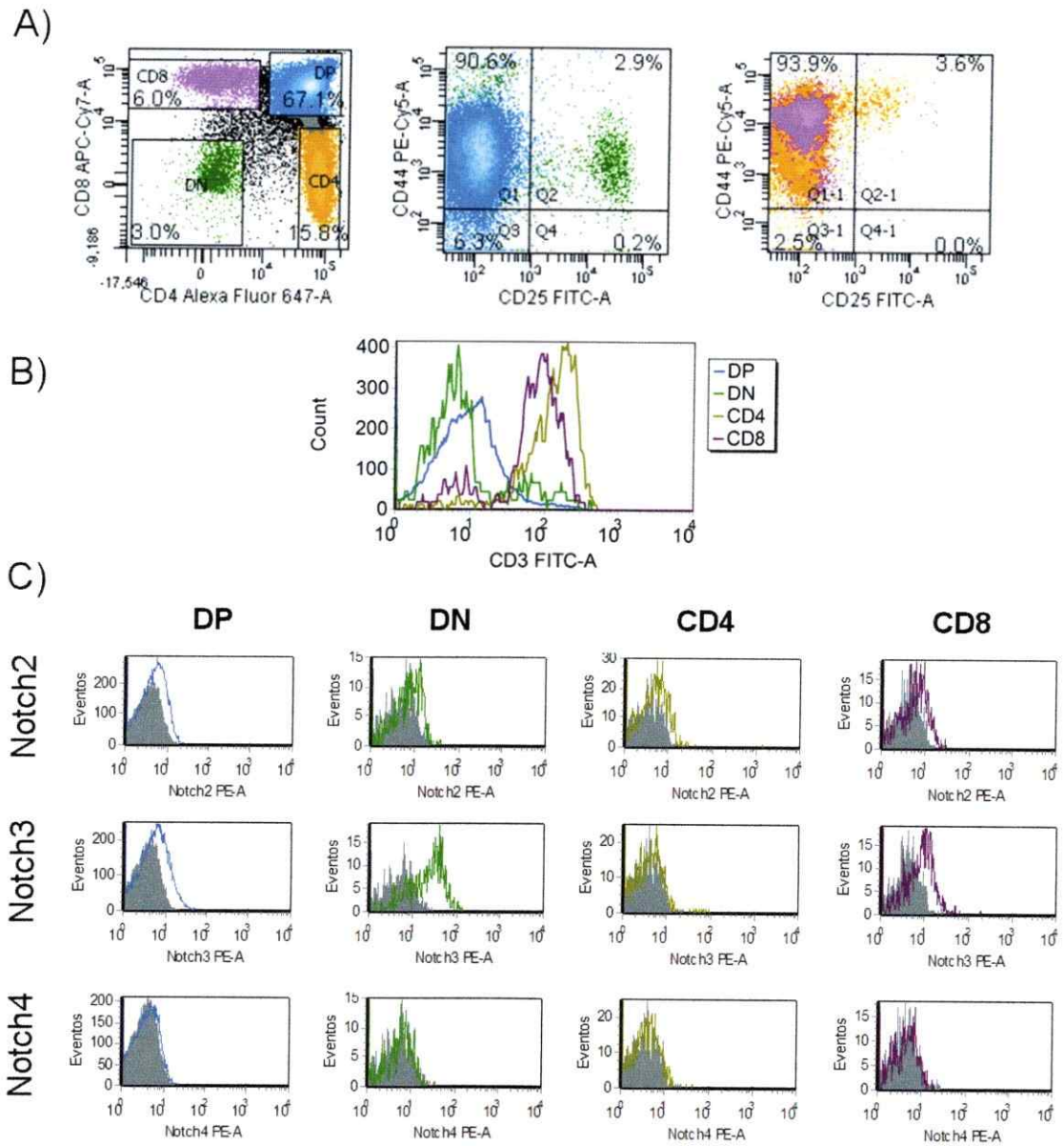


Figura 1: Expresión de Notch en Precursores de Linfocitos T en Timo. Linfocitos obtenidos del timo, en distintos estadios de maduración fueron marcados y analizados por citometría de flujo. **A) Izquierda:** De acuerdo a la expresión de CD4 y CD8, se pueden definir 4 subpoblaciones principales DP, DN, CD4⁺ y CD8⁺. **Centro:** Expresión de CD44 y CD25 en timocitos DP y DN. **Derecha:** Expresión de CD44 y CD25 en timocitos CD4⁺ y CD8⁺. **B)** Expresión de CD3 en las subpoblaciones del timo definidas en A). **C)** Expresión de Notch2, Notch3 y Notch4 en las subpoblaciones del timo definidas en A).

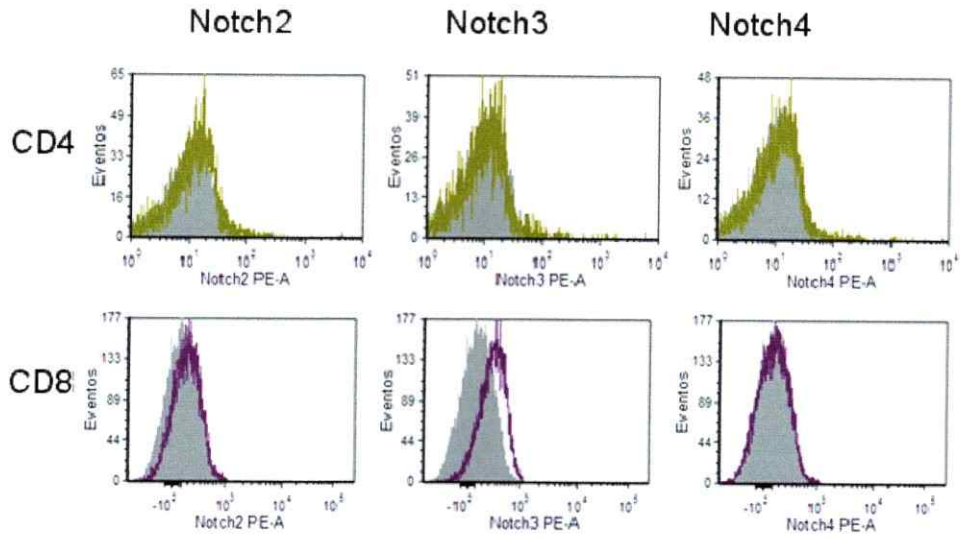


Figura 2: Expresión de Notch en Linfocitos T de Bazo. Linfocitos T obtenidos del timo fueron marcados con anticuerpos específicos para Notch2, Notch3 y Notch4, y se analizó su expresión en poblaciones CD4⁺ y CD8⁺.

5.2 La expresión de Notch se induce durante la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

Como se muestra anteriormente, no se pudo detectar expresión constitutiva de Notch en LT CD4⁺ o LT CD8⁺ aislados del bazo (Figura 2). Por lo tanto, a continuación se determinó si durante la activación de LT aislados del bazo, se induce la expresión de Notch.

Se encontró que la expresión de Notch2 se induce durante la activación tanto en LT CD4⁺ (Figura 3) como en CD8⁺ (Figura 4), alcanzando su máxima expresión en superficie, a las 48 horas de activación. En LT CD8⁺ la cinética de expresión es más rápida que en LT CD4⁺. Esto último podría deberse en parte, a la activación más rápida de LT CD8⁺.

A diferencia de lo observado para Notch2, Notch 3 y Notch 4 no se inducen durante la activación, lo cual sugiere que estos receptores no tienen una función relevante durante la activación y polarización de LT.

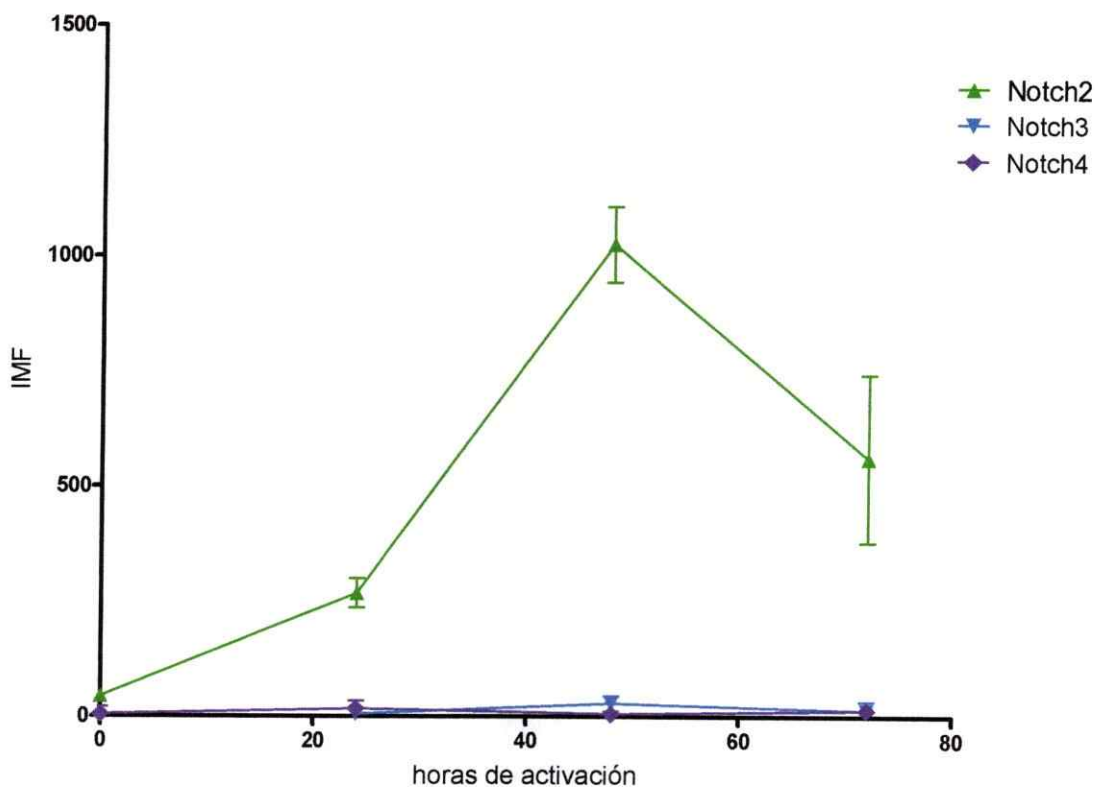


Figura 3: Expresión de receptores Notch en la superficie de LT CD4⁺ en función del tiempo de activación. LT CD4⁺ aislados del bazo de ratones OT-II fueron cocultivados con células dendríticas en presencia de péptido OVA, como se describe en sección Materiales y Métodos. La expresión de los distintos receptores Notch se analizó por citometría de flujo, luego de 24, 48 y 72 horas de activación. La figura muestra la intensidad media de fluorescencia para cada receptor en una gate CD4⁺, en función del tiempo de activación, restando la intensidad media de fluorescencia del control de isotipo, para descartar resultados obtenidos por aumento de autofluorescencia de las células, como consecuencia de la activación. Los resultados representan un total de 3 experimentos independientes.

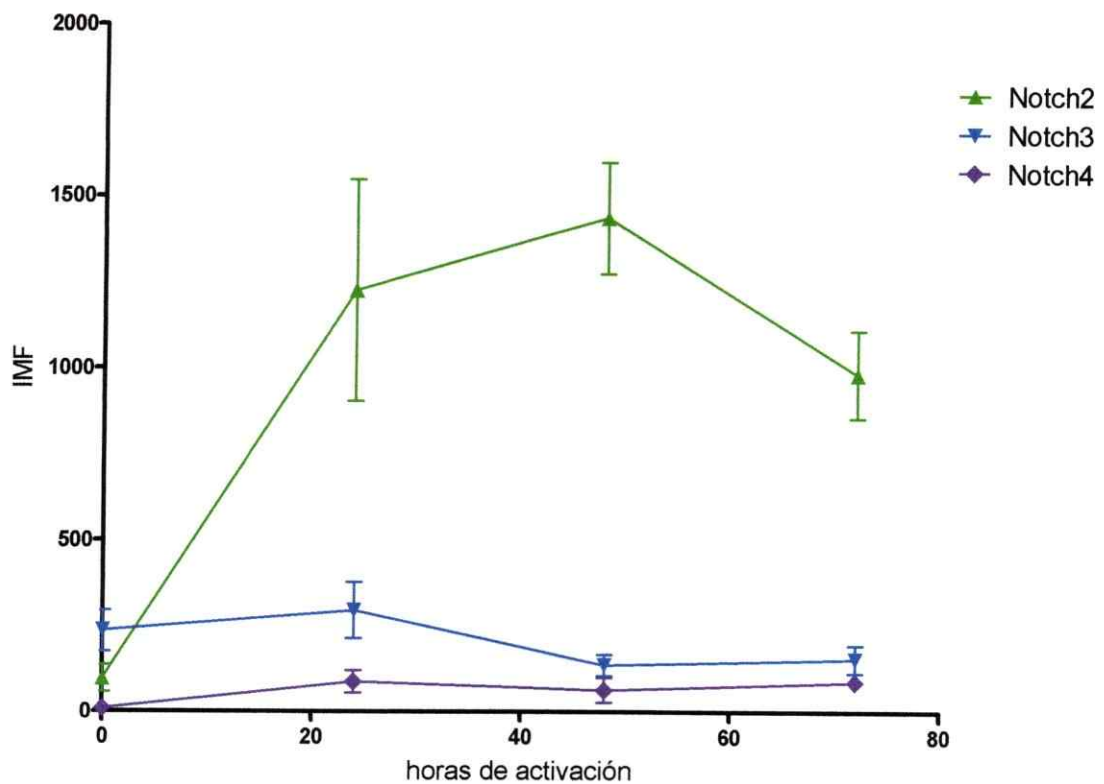


Figura 4: Expresión de receptores Notch en la superficie de LT CD8⁺ en función del tiempo de activación. LT CD8⁺ aislados del bazo de ratones OT-I fueron cocultivados con células dendríticas en presencia de péptido OVA, como se describe en sección Materiales y Métodos. La expresión de los distintos receptores Notch se analizó por citometría de flujo, luego de 24, 48 y 72 horas de activación. La figura muestra la intensidad media de fluorescencia para cada receptor en una gate CD8⁺, en función del tiempo de activación, restando la intensidad media de fluorescencia del control de isotipo, para descartar resultados obtenidos por aumento de autofluorescencia de las células, como consecuencia de la activación. Los resultados representan un total de 3 experimentos independientes.

5.3 El bloqueo farmacológico de la vía Notch no afecta de forma significativa la proliferación de LT CD4⁺ y CD8⁺ durante la activación *in vitro*.

Para estudiar más profundamente el papel de la vía Notch en la activación de los LT, se bloqueó farmacológicamente la actividad γ -secretasa necesaria para esta vía y se determinó la capacidad de proliferación de los LT luego de ser activados *in vitro* con DC en presencia del péptido específico. Se observa que luego de 96 horas de cocultivo, tanto LT CD4⁺ como LT CD8⁺ experimentan un leve retraso en la proliferación (Figura 5A), cuando el cultivo se realizó en presencia de DAPT, inhibidor farmacológico de la actividad γ -secretasa, en comparación a células tratadas con el control de vehículo (DMSO). Si bien el efecto es leve, fue reproducible en tres experimentos independientes.

Sin embargo, al analizar más detenidamente los datos, comparando la curva de distribución de las células en los distintos ciclos de división (5B, 5C), se concluye que el tratamiento con DAPT no induce diferencias significativas en la distribución de la población en los distintos ciclos. Dicho de otra forma, no hay una diferencia estadísticamente significativa en la forma en la cual la población se distribuye dentro de los distintos ciclos de proliferación, lo cual es un reflejo de que la capacidad proliferativa de los linfocitos no se ve afectada por el tratamiento con DAPT.

Finalmente, de los datos experimentales obtenidos, es posible concluir que el bloqueo de la actividad γ -secretasa no tiene un efecto significativo sobre la proliferación de los linfocitos T activados *in vitro*.

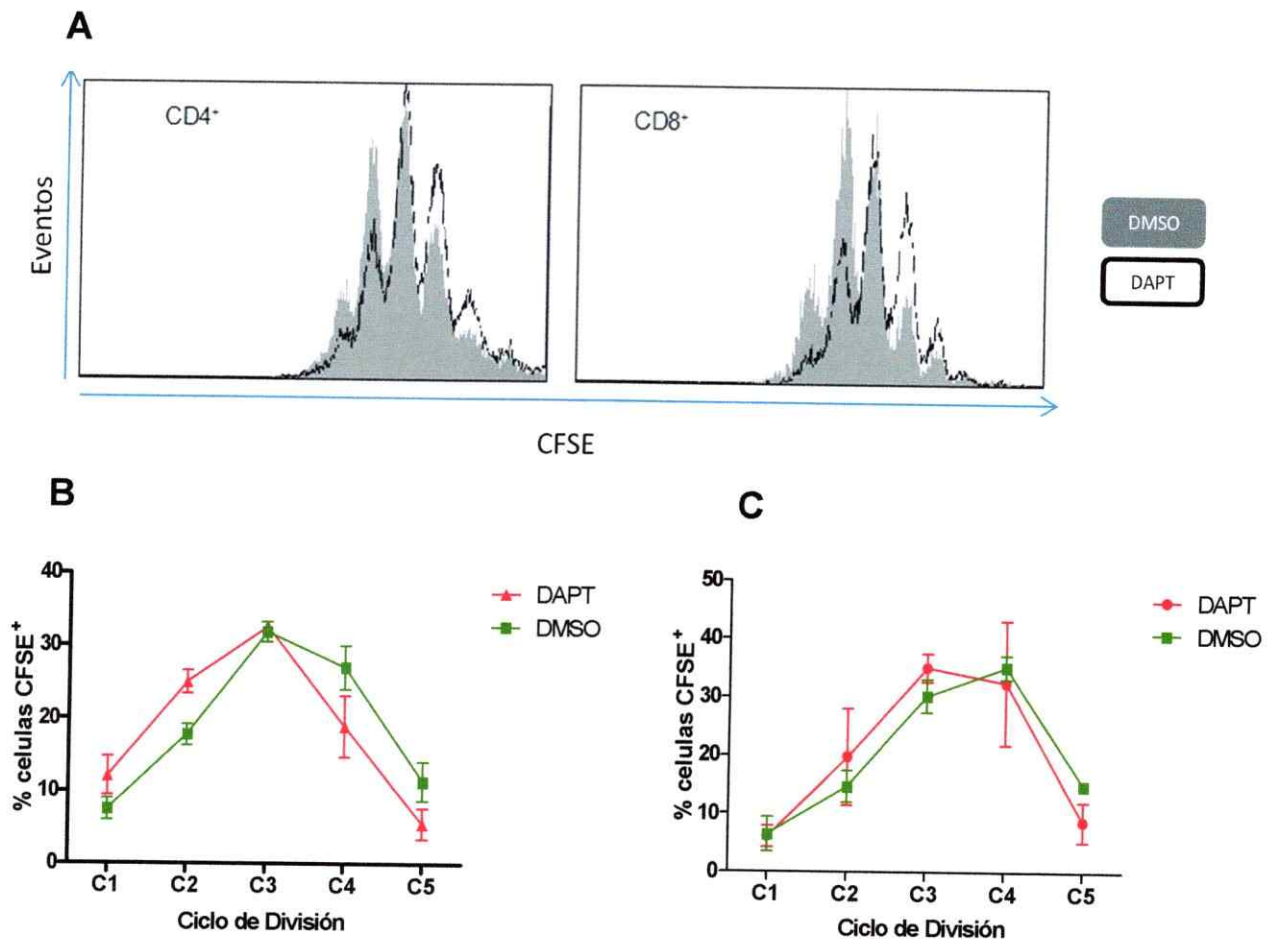


Figura 5: El bloqueo farmacológico de Notch no afecta la proliferación de LT CD4⁺ y CD8⁺. LT CD4⁺ y CD8⁺ purificados del bazo de ratones OT-II y OT-I respectivamente, se cocultivaron con DC en presencia del péptido OVA por 96 horas, como se detalla en sección Materiales y Métodos. Se analizó mediante citometría de flujo la proliferación en gates CD4⁺ o CD8⁺, por ensayo de dilución de CFSE. A) En gris, se observa la proliferación en gates CD4⁺ o CD8⁺, por el solvente (DMSO), en negro se muestra la proliferación del grupo tratado con el inhibidor γ -secretasa). Se muestra un experimento representativo de un total de 3 experimentos independientes, tanto para LT CD4⁺ como para LT CD8⁺. B) Distribución de LT CD4⁺ en los distintos ciclos de división. (n=3). C) Distribución de LT CD8⁺ en los distintos ciclos de división (n=3). En B) y C) las distribuciones se compararon mediante ANOVA de 2 vías, encontrándose que las curvas no son significativamente diferentes.

5.4 La vía Notch modula la producción de citoquinas en LT CD4⁺ y CD8⁺.

Para caracterizar el papel modulador de Notch sobre la función efectora de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, se bloqueó la actividad γ -secretasa necesaria para la señalización vía Notch con el inhibidor farmacológico DAPT durante la activación.

En los LT CD4⁺, se observó que al bloquear farmacológicamente la actividad γ -secretasa con DAPT, se reduce de forma significativa el porcentaje de células productoras de IFN- γ ($p < 0.001$) e IL-10 ($p < 0.05$) (Figura 6, Figura 7).

Este resultado es coherente con la cinética de expresión de Notch en LT CD4⁺ activados, los que expresan principalmente Notch2 de forma dependiente de la activación, lo cual sugiere que este receptor tiene una función relevante durante el proceso. Se estudió también la producción de IL-4 e IL-17 marcando intracelularmente las células con anticuerpos específicos contra estas citoquinas, sin embargo los porcentajes de células marcadas fueron muy bajos, probablemente debido a la acción inhibitoria del IFN- γ secretado, sobre la polarización hacia fenotipos de tipo Th2 o Th17.

En LT CD8⁺, se observó que al bloquear farmacológicamente la vía Notch con DAPT, se reduce el porcentaje de células productoras de IFN- γ (Figura 8) ($n=3$), sin embargo la cantidad de células recuperadas de los cocultivos fue baja, probablemente debido a la actividad citotóxica de los LT CD8⁺. Por tanto, analizamos los sobrenadantes de los cocultivos de LT CD8⁺ en distintos tiempos de activación. Al analizar los sobrenadantes de estos cocultivos, (Figura 9), se pudo observar que en

presencia de DAPT, se reduce la secreción de IL-17 e IFN- γ de forma significativa al medio de cultivo, a las 72 y 48 horas de cocultivo, respectivamente (n=4).

En conjunto, estos resultados sugieren que Notch regula la producción de citoquinas durante la activación de LT CD4⁺ y CD8⁺. Tomando en cuenta el resultado anterior, esto sugiere que proliferación y producción de citoquinas, a pesar que son procesos que ocurren de forma simultánea durante la activación, son regulados por diferentes mecanismos. Notch estaría actuando específicamente sobre la producción de citoquinas sin afectar la proliferación celular.

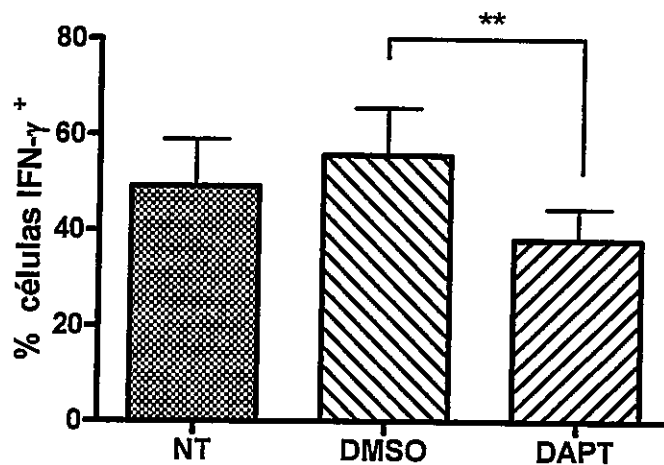


Figura 6. El bloqueo farmacológico de la vía Notch reduce la producción de IFN- γ en LT CD4. LT CD4⁺ purificados del bazo de ratones OT-II se cocultivaron con DC en presencia del péptido OVA por 96 horas. Luego se recuperaron, reactivaron por 4 horas con PMA y Ionomicina en presencia de Brefeldina A, y fueron fijados y permeabilizados para marcaje intracelular de IFN- γ , y análisis por citometría de flujo. Se muestran resultados de 3 experimentos independientes (** = $p < 0.001$).

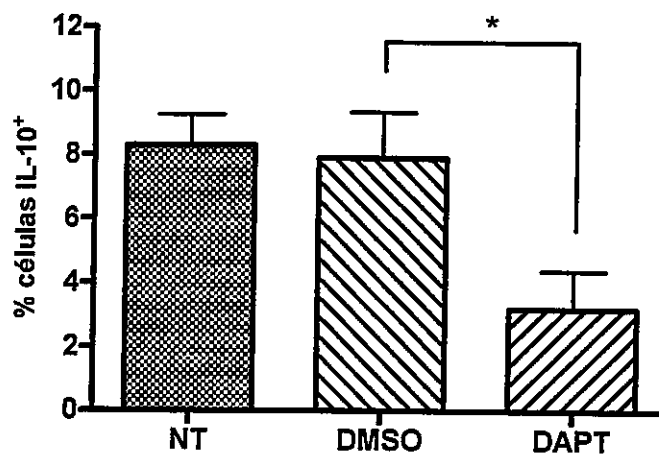


Figura 7. El bloqueo farmacológico de la vía Notch reduce la producción de IL-10 en LT CD4. LT CD4⁺ purificados del bazo de ratones OT-II se cocultivaron con DC en presencia del péptido OVA por 96 horas. Luego se recuperaron, reactivaron por 4 horas con PMA y Ionomicina en presencia de Brefeldina A, y fueron fijados y permeabilizados para marcaje intracelular de IL-10, y análisis por citometría de flujo. Se muestran resultados de 3 experimentos independientes (* = $p < 0.05$).

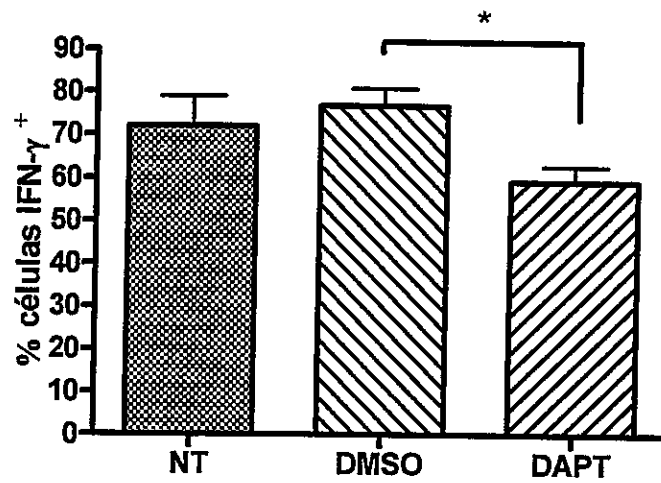


Figura 8. El bloqueo farmacológico de la vía Notch reduce la producción de IFN- γ en LT CD8. LT CD8⁺ purificados del bazo de ratones OT-I se cocultivaron con DC en presencia del péptido OVA por 96 horas. Luego se recuperaron, reactivaron por 4 horas con PMA y Ionomicina en presencia de Brefeldina A, y fueron fijados y permeabilizados para marcaje intracelular de IFN- γ , y análisis por citometría de flujo. Para DMSO y DAPT se muestran resultados de 3 experimentos independientes (* = $p < 0.05$).

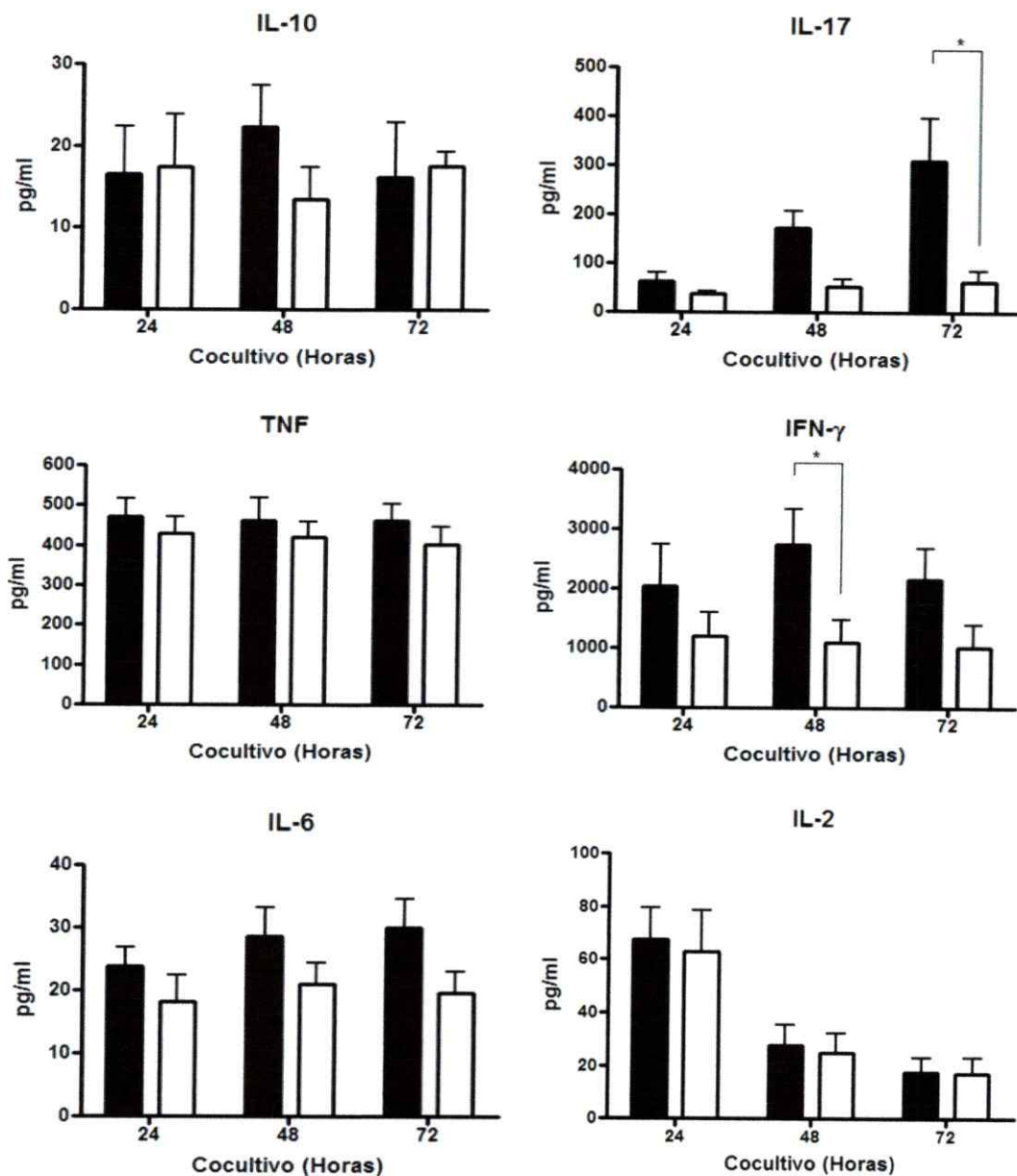


Figura 9. El bloqueo farmacológico de la vía Notch reduce la secreción de citoquinas en LT CD8⁺. LT CD8⁺ purificados del bazo de ratones OT-I, en presencia del péptido OVA se cocultivaron con DC por 24, 48 o 72 horas en presencia (barras blancas) o ausencia (barras negras) del inhibidor de la γ -secretasa DAPT. Luego se determinó la cantidad de IL-10, IL-17, IL-6, IL-2, TNF- α e IFN- γ secretadas al medio, usando el ensayo CBA (Cytometric Bead Array). Se muestran resultados de 4 experimentos independientes (* = $p < 0.05$).

5.5 Notch2 se expresa en linfocitos T CD4+ activados *in vivo*.

Dado que la evidencia *in vitro* sugiere fuertemente un rol regulador de Notch de la activación de linfocitos T, se estudió la expresión de Notch2 en células activadas *in vivo*. Para ello, se realizó transferencia adoptiva de LT CD4⁺ provenientes del bazo de un ratón OT-II, a un receptor C57BL/6, el cual fue inmunizado 24 horas después con la proteína OVA. Como muestra la Figura 10, las células transferidas fueron capaces de proliferar dentro del ratón receptor, lo cual da cuenta de su activación.

Adicionalmente, se estudió la expresión de Notch en la población transferida adoptivamente, y de acuerdo a los experimentos *in vitro*, se pudo observar que en una reacción inmune *in vivo*, se induce la expresión de Notch2 en LT CD4⁺, en ciclos tardíos de división. Este resultado apoya la hipótesis de que Notch podría estar participando en la activación de los linfocitos T *in vivo*.

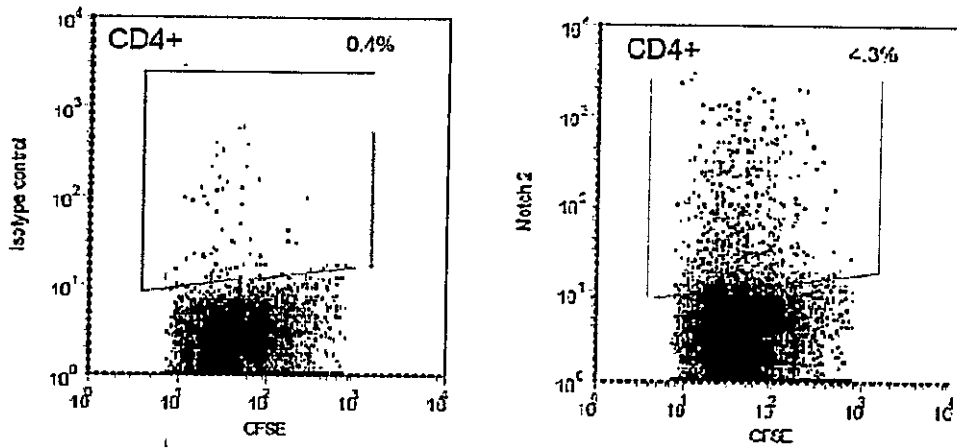


Figura 10. La expresión de Notch2 se induce durante la activación in vivo de LT CD4⁺. LT CD4⁺ purificados el bazo de ratones OT-II marcados con CFSE, fueron transferidos a un receptor C57BL/6. Después de 24 h, el ratón receptor fue inmunizado con 1 mg de OVA. 3 días después, el receptor fue sacrificado, y se recuperaron las células de PLN, analizándose por citometría de flujo la expresión de Notch2 en la población marcada con CFSE. Se muestra un resultado representativo de un total de 2 experimentos.

VI. DISCUSION

La vía Notch regula una amplia variedad de procesos de diferenciación en organismos pluricelulares (Lai, E. C., 2004) los cuales incluyen el desarrollo neuronal (Gaiano, N. y Fishell, G., 2002), angiogénesis (Liu, Z. J. y col., 2003) y el desarrollo de tejido óseo (Nobta, M. y col., 2005). Asimismo, se ha descrito que fallas en la regulación de la vía Notch, tienen como consecuencia el desarrollo de enfermedades como cáncer y leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL, *T-cell acute lymphoblastic leukemia*) (Sharma, V. M. y col., 2007).

En relación al sistema inmunológico, hay evidencia que soporta un papel relevante para la vía Notch en la linfopoyesis. Radtke y colaboradores demostraron por primera vez en 1999 que la inactivación de Notch1 en un modelo murino prevenía el correcto desarrollo de linfocitos T (Radtke, F. y col., 1999). Desde ese entonces, se ha acumulado evidencia que soporta esta noción, sin embargo, la evidencia experimental se ha visto perjudicada por la carencia de anticuerpos específicos contra los distintos receptores. A nivel de mRNA, se ha mostrado la expresión de los 4 receptores de la familia Notch en timo de ratón (Saito, T. y col., 2003), sin embargo los resultados no han sido concordantes entre distintos grupos.

Dado que, en la actualidad existen anticuerpos específicos contra los diversos receptores Notch, en este trabajo mostramos la expresión de miembros de la familia Notch a nivel de proteína en distintas subpoblaciones de timocitos.

Es así como determinamos que Notch3 se expresa en timocitos DN (dobles negativos, CD4⁻CD8⁻), los cuales corresponden a células en el estadio DN2 o DN3, en base a la expresión de CD25, CD44 y CD3. Para determinar exactamente en cuál de los dos estadios se expresa Notch3, se necesitaría determinar la expresión de CD117 (también conocido como c-kit, marcador de células troncales hematopoyéticas), ya que se ha descrito una mayor expresión de este marcador en el estadio DN2 (Ceredig, R. y Rolink, T., 2002). De forma consistente con este hallazgo, se ha mostrado que la inducción de la expresión del fragmento intracelular de Notch3 bajo el promotor Lck en un modelo murino, induce un aumento en el número de timocitos DN, y una incapacidad de regular negativamente la expresión de CD25 en estadios más avanzados del desarrollo (Bellavia, D. y col., 2000). Esto refuerza la idea que la transición del estado DN a otros estados más avanzados del desarrollo linfocitario son dependientes de la actividad de Notch3. Este resultado concuerda con lo descrito en la literatura, ya que se ha descrito que durante la etapa DN3 ocurre la recombinación de los genes del TCR, para su posterior expresión en la superficie, lo cual es un requisito para la progresión a etapas posteriores del desarrollo linfocitario (Fehling, H. J. y col., 1995, Malissen, M. y col., 1995).

Posteriormente se estudió la expresión de Notch en LT extraídos del bazo. Estas células son timocitos que completaron su proceso de maduración tímica para luego migrar al bazo. Contrariamente a lo que se esperaba, no se detectó una expresión importante de Notch en estas células, que pudiese sugerir una función relevante para esta familia de receptores en la función de los LT maduros. A continuación nos preguntamos si la expresión de Notch pudiese inducirse durante la activación de los linfocitos T. Efectivamente demostramos *in vitro* que durante la

activación antígeno específica se induce la expresión de Notch2, tanto en LT CD4⁺ como en LT CD8⁺. Además la expresión de Notch2 se demostró *in vivo* mediante transferencia adoptiva de LT CD4⁺ en ratones inmunizados con el péptido específico. Estos resultados sugieren que la función de Notch podría ser relevante para la regulación de la activación de los linfocitos T.

A continuación, estudiamos el papel de la vía Notch en la activación de linfocitos T aislados del bazo. Aunque, como se mencionó anteriormente, se acepta que las células que abandonan el timo y migran hacia otros órganos linfoides son maduras, aún así requieren de otras señales para su diferenciación en células efectoras. Dentro de estas señales, se encuentran señales de activación mediadas por el TCR, y otras señales coestimuladoras proporcionadas por el microambiente. Entre estas señales, se ha propuesto que Notch podría tener un rol importante (Maillard, I. y col., 2005).

Se ha descrito que Notch tendría un rol importante en la regulación de la diferenciación hacia un fenotipo Th1. En este contexto, al bloquear la actividad γ -secretasa, se observó una disminución en la producción de IFN- γ en LT-CD4⁺. Los datos de expresión de Notch en LT CD4⁺ durante la activación sugieren fuertemente que Notch2 podría modular la producción de esta citoquina, aunque no se puede descartar un efecto inespecífico debido a la pérdida de función de alguna otra proteína dependiente de actividad γ -secretasa. Se ha descrito que en presencia de inhibidores de la γ -secretasa, se disminuye la expresión de *Tbx21* (gen que codifica para T-bet) 48 h después de cultivo bajo condiciones polarizantes hacia Th1 (Minter, L. M. y col., 2005). De forma consistente, hemos observado que LT CD4⁺ en cocultivo con DC,

alcanzan un máximo de expresión de Notch2 a las 48 h. De acuerdo a nuestros datos, la pérdida de función de Notch tiene un impacto crítico en la producción de citoquinas a las 48 h. El uso futuro de inhibidores específicos de la actividad de Notch2, o el uso de otra técnica como iRNA, permitirá dilucidar un posible rol de Notch2 en la polarización hacia un fenotipo Th1.

La actividad de Notch resultó también ser importante para la producción de IL-10. Anastasi y colaboradores mostraron que ratones que sobreexpresan Notch3, secretan mayores cantidades de IL-10 y son resistentes a la inducción de diabetes autoinmune experimental (Anastasi, E. y col., 2003). De forma consistente con lo anterior, al realizar los cocultivos de LT CD4⁺ con DC en presencia del inhibidor de la actividad γ -secretasa, se observó una importante reducción en la producción de esta citoquina, sin embargo no se pudo detectar expresión de Notch3 en LT CD4⁺.

Interesantemente encontramos que el bloqueo de la actividad γ -secretasa inhibe la producción de IL-6 e IL-17, citoquinas importantes en la polarización de LT CD4⁺ hacia un fenotipo Th17 (Harrington, L. E. y col., 2005). Este nuevo hallazgo refuerza la idea de que Notch es una molécula fuertemente involucrada en los fenómenos de polarización de la respuesta inmune.

Al igual que en LT CD4⁺, en LT CD8⁺ se observó una disminución en la producción de IFN- γ , al bloquear farmacológicamente la actividad γ -secretasa. Palaga y colaboradores habían mostrado con un inhibidor diferente, efectos similares en LT CD8⁺, sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, no encontraron ningún efecto sobre LT CD4⁺ (Palaga, T. y col., 2003). Además el análisis de los sobrenadantes de

los cocultivos de los LT CD8⁺ con las DC muestran una reducción importante en la producción de IL-17 e IFN- γ en LT CD8⁺, lo cual sugiere que la actividad γ -secretasa es necesaria para la secreción de citoquinas efectoras en ambas poblaciones de linfocitos T.

La cinética de expresión de Notch sugiere que los programas de expresión génica durante la activación, son similares entre LT CD4⁺ y CD8⁺, lo cual sugiere un mecanismo común de regulación de la activación en linfocitos T, donde Notch2 podría ejercer una función relevante.

Sería interesante hacer estudios de pérdida de función para Notch2 y evaluar su impacto en la polarización de LT CD4⁺ y activación de LT CD8⁺. Es importante destacar que de acuerdo a nuestros resultados, Notch no regula todos los aspectos involucrados en la respuesta efectora. Es así como demostramos que la vía Notch no estaría involucrada en la proliferación de LT activados. Esto sugiere fuertemente que Notch regula la fase de producción de citoquinas tanto en LT CD4⁺ como en LT CD8⁺, sin afectar directamente su capacidad proliferativa.

Es importante recalcar que estos estudios se han hecho en sistemas *in vitro*. Lamentablemente el uso de inhibidores farmacológicos hace difícil el estudio del efecto de Notch en la función inmunológica *in vivo*, ya que existen otras proteínas que dependen de la actividad γ -secretasa, como ErbB4 (Lee, H. J. y col., 2002) y la proteína precursora amiloide (Kimberly, W. T. y col., 2003). El uso de mutantes condicionales podría aportar información relevante sobre la función de Notch en la activación y/o polarización de LT *in vivo*. Esto permitiría obtener nueva información que

apoye el modelo, en el cual, señales entregadas por la DC bajo la forma de ligandos de Notch, son capaces de modular y determinar la activación y diferenciación de los LT en células efectoras.

VII. CONCLUSIONES

- Notch3 es expresado por timocitos en estado DN2 o DN3, mientras que Notch2 es expresado por LT CD4⁺ y CD8⁺ activados.
- El bloqueo farmacológico de Notch no afecta la proliferación de LT CD4⁺ y LT CD8⁺.
- Notch podría modular la producción de citoquinas (IFN- γ , IL-10, IL-17) en LT CD4⁺ activados. Este efecto podría estar mediado por Notch2.
- Notch podría modular la producción de citoquinas (IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-17) en LT CD8⁺ activados. Este efecto podría estar mediado por Notch2.
- Notch2 se expresa en LT CD4⁺ durante la activación *in vivo*.
- Notch2 puede ser un nuevo receptor que regula la producción de citoquinas en LT activados.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K. y col. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
- Amsen, D. y col. (2007). Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27: 89-99.
- Amsen, D. y col. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117: 515-526.
- Anastasi, E. y col. (2003). Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes. *J Immunol* 171: 4504-4511.
- Anderson, K. V. y col. (1985a). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42: 791-798.
- Anderson, K. V. y col. (1985b). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42: 779-789.
- Artavanis-Tsakonas, S. y col. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776.
- Banchereau, J. y col. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Bell, D. y col. (1999). Dendritic cells. *Adv Immunol* 72: 255-324.
- Bellavia, D. y col. (2000). Constitutive activation of NF-kappaB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch3 transgenic mice. *EMBO J* 19: 3337-3348.
- Benson, R. A. y col. (2005). Notch1 co-localizes with CD4 on activated T cells and Notch signaling is required for IL-10 production. *Eur J Immunol* 35: 859-869.

- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 678-689.
- Brombacher, F. y col. (1999). IL-12 is dispensable for innate and adaptive immunity against low doses of *Listeria monocytogenes*. *Int Immunol* 11: 325-332.
- Ceredig, R. y Rolink, T. (2002). A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* 2: 888-897.
- Cousens, L. P. y col. (1999). Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* 189: 1315-1328.
- Cui, W. y col. (2009). Effects of Signal 3 during CD8 T cell priming: Bystander production of IL-12 enhances effector T cell expansion but promotes terminal differentiation. *Vaccine* 27: 2177-2187.
- Cunningham, A. J. y Lafferty, K. J. (1977). A simple conservative explanation of the H-2 restriction of interactions between lymphocytes. *Scand J Immunol* 6: 1-6.
- Cho, O. H. y col. (2009). Notch regulates cytolytic effector function in CD8+ T cells. *J Immunol* 182: 3380-3389.
- Dallman, M. J. y col. (2005). Notch: control of lymphocyte differentiation in the periphery. *Curr Opin Immunol* 17: 259-266.
- Elyaman, W. y col. (2007). JAGGED1 and delta1 differentially regulate the outcome of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179: 5990-5998.
- Fang, T. C. y col. (2007). Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 27: 100-110.
- Fehling, H. J. y col. (1995). Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* 375: 795-798.
- Finkelman, F. D. y col. (2000). Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 164: 2303-2310.

- Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 673-684.
- Gaiano, N. y Fishell, G. (2002). The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu Rev Neurosci* 25: 471-490.
- Han, H. y col. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* 14: 637-645.
- Hansson, G. K. y Edfeldt, K. (2005). Toll to be paid at the gateway to the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1085-1087.
- Harrington, L. E. y col. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13.
- Janeway, C. A., Jr. y Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20: 197-216.
- Jankovic, D. y col. (2002). In the absence of IL-12, CD4(+) T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10(-/-) setting. *Immunity* 16: 429-439.
- Jankovic, D. y col. (2000). Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 164: 3047-3055.
- Jiang, R. y col. (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice. *Genes Dev* 12: 1046-1057.
- Kalinski, P. y col. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20: 561-567.

- Kalinski, P. y Moser, M. (2005). Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat Rev Immunol* 5: 251-260.
- Kaplan, M. H. y col. (1998). A signal transducer and activator of transcription (Stat)4-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J Exp Med* 188: 1191-1196.
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3: 984-993.
- Kimberly, W. T. y col. (2003). Notch and the amyloid precursor protein are cleaved by similar gamma-secretase(s). *Biochemistry* 42: 137-144.
- King, S. B. y col. (2008). Accumulation of effector CD4 T cells during type 2 immune responses is negatively regulated by Stat6. *J Immunol* 180: 754-763.
- Kolumam, G. A. y col. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* 202: 637-650.
- Krawczyk, C. M. y col. (2008). Th2 differentiation is unaffected by Jagged2 expression on dendritic cells. *J Immunol* 180: 7931-7937.
- Krishnamoorthy, N. y col. (2008). Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat Med* 14: 565-573.
- Lai, E. C. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131: 965-973.
- Lee, H. J. y col. (2002). Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J Biol Chem* 277: 6318-6323.
- Lemaitre, B. y col. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86: 973-983

- Liu, Z. J. y col. (2003). Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 23: 14-25.
- Lubman, O. Y. y col. (2004). Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol Cell* 13: 619-626.
- MacDonald, H. R. y col. (2001). Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice. *Trends Immunol* 22: 155-160.
- Maekawa, Y. y col. (2008). Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* 9: 1140-1147.
- Maekawa, Y. y col. (2003). Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity* 19: 549-559.
- Magram, J. y col. (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4: 471-481.
- Maillard, I. y col. (2005). Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* 23: 945-974.
- Malissen, M. y col. (1995). Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene. *EMBO J* 14: 4641-4653.
- Maraskovsky, E. y col. (1997). Dramatic numerical increase of functionally mature dendritic cells in FLT3 ligand-treated mice. *Adv Exp Med Biol* 417: 33-40.
- McKenzie, G. J. y col. (2003). Notch signalling in the regulation of peripheral T-cell function. *Semin Cell Dev Biol* 14: 127-134.
- Mescher, M. F. y col. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211: 81-92.
- Minter, L. M. y col. (2005). Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat Immunol* 6: 680-688.

- Mullen, A. C. y col. (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292: 1907-1910.
- Nguyen, K. B. y col. (2002). Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 297: 2063-2066.
- Nobta, M. y col. (2005). Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling. *J Biol Chem* 280: 15842-15848.
- Okamoto, M. y col. (2008). Essential role of Notch signaling in effector memory CD8+ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Exp Med* 205: 1087-1097.
- Ong, C. T. y col. (2008). Notch and presenilin regulate cellular expansion and cytokine secretion but cannot instruct Th1/Th2 fate acquisition. *PLoS One* 3: e2823.
- Oxenius, A. y col. (1999). IL-12 is not required for induction of type 1 cytokine responses in viral infections. *J Immunol* 162: 965-973.
- Palaga, T. y col. (2003). TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J Immunol* 171: 3019-3024.
- Parish, I. A. y Kaech, S. M. (2009). Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 21: 291-297.
- Pearce, E. L. y Shen, H. (2007). Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12. *J Immunol* 179: 2074-2081.
- Pui, J. C. y col. (1999). Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11: 299-308.
- Radtke, F. y col. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10: 547-558.

Rudd, B. D. y col. (2007). MyD88-mediated instructive signals in dendritic cells regulate pulmonary immune responses during respiratory virus infection. *J Immunol* 178: 5820-5827.

Saito, T. y col. (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18: 675-685.

Schijns, V. E. y col. (1998). Mice lacking IL-12 develop polarized Th1 cells during viral infection. *J Immunol* 160: 3958-3964.

Selkoe, D. y Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26: 565-597.

Sharma, V. M. y col. (2007). The Notch1/c-Myc pathway in T cell leukemia. *Cell Cycle* 6: 927-930.

Shi, G. P. y col. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10: 197-206.

Shimoda, K. y col. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380: 630-633.

Shortman, K. y Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2: 151-161.

Skokos, D. y Nussenzweig, M. C. (2007). CD8⁺ DCs induce IL-12-independent Th1 differentiation through Delta 4 Notch-like ligand in response to bacterial LPS. *J Exp Med* 204: 1525-1531.

Sun, J. y col. (2008). Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4. *J Immunol* 180: 1655-1661.

Takeda, K. y col. (1996). Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380: 627-630.

Tanigaki, K. y Honjo, T. (2007). Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol* 8: 451-456.

- Tanigaki, K. y col. (2004). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* 20: 611-622.
- Thompson, L. J. y col. (2006). Innate inflammatory signals induced by various pathogens differentially dictate the IFN-I dependence of CD8 T cells for clonal expansion and memory formation. *J Immunol* 177: 1746-1754.
- Trembleau, S. y col. (1999). Pancreas-infiltrating Th1 cells and diabetes develop in IL-12-deficient nonobese diabetic mice. *J Immunol* 163: 2960-2968.
- Tsukumo, S. y Yasutomo, K. (2004). Notch governing mature T cell differentiation. *J Immunol* 173: 7109-7113.
- Tu, L. y col. (2005). Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* 202: 1037-1042.
- Voehringer, D. y col. (2006). Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med* 203: 1435-1446.
- von Boehmer, H. (2005). Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6: 338-344.
- Washburn, T. y col. (1997). Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* 88: 833-843.
- Weaver, C. T. y col. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 25: 821-852.
- Wilson, A. y col. (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* 194: 1003-1012.
- Williams, M. A. y Bevan, M. J. (2006). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25: 171-192.

Wolfe, M. S. (2001). gamma-Secretase inhibitors as molecular probes of presenilin function. *J Mol Neurosci* 17: 199-204.