

UCH-FC  
DOC-BMCN  
S 255  
C.A



# **La Vía Notch en la Polarización de la Respuesta Inmune**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular,  
Celular y Neurociencias**

**Facultad de Ciencias  
por**

**DANIELA MACARENA SAUMA MAHALUF**



**Director de Tesis**

**Dra. María Rosa Bono Merino**

**Co-Director de Tesis**

**Dr. Mario Rosemblatt Silber**

**Diciembre, 2008**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

**Daniela Macarena Sauma Mahaluf**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 1 de Diciembre de 2008.

Director de Tesis  
Dra. María Rosa Bono

Handwritten signature of Dra. María Rosa Bono in blue ink, written over a horizontal line.

Co-Director de Tesis  
Dr. Mario Rosemblatt

Handwritten signature of Dr. Mario Rosemblatt in blue ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Miguel Allende

Handwritten signature of Dr. Miguel Allende in blue ink, written over a horizontal line.

Dra. María Inés Becker

Handwritten signature of Dra. María Inés Becker in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Javier Puente

Handwritten signature of Dr. Javier Puente in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Arturo Ferreira

Handwritten signature of Dr. Arturo Ferreira in black ink, written over a horizontal line.



## AUTOBIOGRAFIA



Nací un 20 de Agosto de 1976 en la ciudad de Santiago. Estudié en el *Santiago College*, donde descubrí que debía dedicarme a la ciencia. En 1995 decidí estudiar Bioquímica y entré a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Motivada por el estudio del sistema inmune y sin saber lo que el futuro me depararía, el año 2001 entré al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la misma

universidad para realizar mi tesis de pregrado en el estudio del efecto de los inmunosupresores sobre las células dendríticas. Perpleja por la complejidad del sistema inmune y dispuesta a dilucidar sus secretos, decidí entrar al programa de Doctorado en Ciencias de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para continuar mi trabajo de postgrado en el estudio de estas células. Hoy, tras 5 años, les presento mi epopeya.

Agradezco el fundamental apoyo financiero de:

Beca CONICYT para estudios de doctorado

Beca CONICYT para el término de tesis doctoral

Beca CONICYT para la realización de tesis doctoral

Beca CONICYT para estadías cortas en el extranjero

Beca L'Oreal *For Women in Science*

Proyectos FONDECYT Regulares 1060834 y 1060253

Instituto Milenio de Biología Fundamental y Aplicada (MIFAB)

Programa de Financiamiento Basal para Centros Científicos y Tecnológicos de Excelencia



## AGRADECIMIENTOS

Como suele ocurrir cuando se tiene la instancia de agradecer tras mirar el largo camino recorrido, la cantidad de personas que quisiera nombrar alcanzaría para hacer una segunda tesis, por lo que me voy a limitar a unos pocos, sabiendo que al resto los llevo en el corazón esperando darle las gracias personalmente.

Mis agradecimientos a todas las personas que hicieron posible esta tesis, principalmente a María Rosa y Mario. Gracias por todo el apoyo, oportunidades, consejos, enseñanzas y por permitir equivocarme y desarrollarme como científico.

A mis queridísimos padres y hermanos, quienes con dedicación y cariño han hecho de mí la persona que soy hoy. Gracias por todo el apoyo, especialmente en los tiempos de largas noches de estudios.

Infinitas gracias al amor de mi vida, Paulo. Gracias por caminar siempre a mi lado, por tu apoyo, ayuda, amor, compañía y comprensión.

No puedo dejar de agradecer a mis amigos y compañeros de laboratorio. Especialmente a Leo, quien desde el primer día y sin excepción me ha recibido con una gran sonrisa. Gracias por toda tu paciencia, por todo lo que me has enseñado y por las jugosas historias que siempre han alegrado las largas jornadas de arduo trabajo. A mi querido amigo Raúl, quién siempre recuerdo con cariño en la distancia. A mis queridas amigas y compinches, Carolina y Paz, quienes siempre han estado dispuestas a entregar una mano cuando más lo he necesitado. A mis compañeros y ex compañeros de laboratorio, Valeska, Jaime, Jenny, Fernando, Fabiola, Jocelyn, Gonzalo, Alejandra, Paula Escobar, Paula Michea, Pablo Vargas, Pablo Espejo, Cinthia, Paola, Valerie, Andrés, Pamela y Eva. Muchas gracias por todo lo que me han enseñado y por hacer del laboratorio un lugar de memorables momentos.

Finalmente quisiera agradecer a mis queridos amigos y familia, Arita, Panchi, Vale, Tere, Karim, Chitsi y Frodo (el orden de aparición no necesariamente refleja el orden de preferencias). Muchas gracias por acompañarme en este camino a veces tortuoso pero gratificante.





## INDICE DE CONTENIDOS

|  |     |
|--|-----|
| AGRADECIMIENTOS.....   | ii  |
| INDICE DE CONTENIDOS.....  | iv  |
| INDICE DE FIGURAS.....   | vii |
| ABREVIATURAS.....  | ix  |
| RESUMEN.....   | xii |
| ABSTRACT.....  | xv  |
| INTRODUCCION.....  | 1   |
| La polarización de la respuesta inmune.....  | 1   |
| Las células dendríticas.....   | 2   |
| Generación de respuestas Th1 y Th2.....  | 3   |
| Existencia de mecanismos independientes de IL-12 e IL-4 en la generación de<br>respuestas Th1 y Th2..... | 5   |
| La vía Notch.....  | 6   |
| La vía Notch en la linfopoyesis.....   | 10  |
| La vía Notch en la polarización de la respuesta inmune.....  | 12  |
| Regulación de la polarización de la respuesta inmune por linfocitos B y T.....                           | 16  |
| HIPOTESIS.....   | 19  |
| OBJETIVO GENERAL.....  | 19  |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS.....   | 20  |
| MATERIALES Y METODOS.....  | 21  |
| Ratones.....   | 21  |
| Anticuerpos.....   | 22  |
| Citometría de flujo y detección de citoquinas intracelulares.....  | 23  |
| Generación de células dendríticas de médula ósea.....  | 25  |
| Activación de células dendríticas de médula ósea.....  | 26  |

|  |           |
|--|-----------|
| Extracción de RNA y RT-PCR.....  | 26        |
| PCR en tiempo real.....  | 27        |
| ELISA de captura para las citoquinas IL-10 e IL-12.....  | 28        |
| Purificación de células dendríticas de bazo.....   | 29        |
| Purificación de linfocitos B y T.....  | 30        |
| Generación de linfocitos T helper.....   | 30        |
| Co-cultivo de linfocitos B con células dendríticas de médula ósea.....   | 31        |
| Co-cultivo de linfocitos helper con células dendríticas de médula ósea.....  | 33        |
| Co-cultivo de células dendríticas de bazo con linfocitos T.....  | 34        |
| Marcaje con CFSE.....  | 35        |
| Análisis estadístico.....  | 36        |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>37</b> |
| Estudio de la vía Notch en el sistema inmune.....  | 37        |
| La expresión de DLL4 y Jagged 2 por células dendríticas se correlaciona con<br>respuestas Th1 y Th2 respectivamente.....   | 37        |
| Los linfocitos T CD8+ y no los CD4+ expresan Notch 1 en su superficie.....   | 42        |
| La vía Notch es importante en la proliferación y producción de IFN- $\gamma$ por los<br>linfocitos T CD8+.....   | 44        |
| Las células dendríticas expresan Notch 1 pero esta vía no está involucrada en la<br>diferenciación, activación ni producción de citoquinas por estas células.....      | 48        |
| Evaluación del efecto de linfocitos B y T en la expresión de Jagged y Delta-like<br>por células dendríticas y su efecto en la polarización de la respuesta inmune..... | 53        |
| Los linfocitos B favorecen levemente las respuestas Th1.....   | 53        |
| Los linfocitos B inducen la expresión de casi todos los ligandos de Notch en<br>células dendríticas.....   | 57        |
| Los linfocitos Th1 y Th2 potencian la generación de respuestas Th1 y Th2<br>respectivamente.....   | 60        |



|   |           |
|---|-----------|
| Los linfocitos T helper aumentan los marcadores de activación en las células dendríticas e inducen la expresión de todos los ligandos de Notch..... | 65        |
| Las citoquinas IL-4, IL-12 e IFN- $\gamma$ tienen distintos efectos sobre los ligandos de Notch en las células dendríticas.....                     | 67        |
| <b>DISCUSION.....</b>   | <b>71</b> |
| Estudio de los componentes de la vía Notch en células del sistema inmune.....   | 72        |
| Papel de la IL-4 en la expresión de Notch y sus ligandos en las células dendríticas.....  | 78        |
| Los linfocitos B y la polarización de la respuesta inmune.....  | 79        |
| Los linfocitos T CD4+ en la polarización de la respuesta inmune.....  | 82        |
| Papel de citoquinas en la expresión de los ligandos de Notch.....   | 84        |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>89</b> |
| <b>MODELO PROPUESTO.....</b>  | <b>91</b> |
| <b>REFERENCIAS.....</b>   | <b>92</b> |







## INDICE DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1.  | Papel de la vía Notch en la polarización de la respuesta inmune.....   | 15 |
| Figura 2.  | Los ligandos de Notch presentan una cinética de expresión con un máximo entre las 6 y 12 horas post activación.....                              | 39 |
| Figura 3.  | DLL4 se induce en células dendríticas tratadas con estímulos Th1 mientras que Jagged 2 se induce con estímulos Th2.....                          | 41 |
| Figura 4.  | Timocitos y linfocitos T CD8+ maduros expresan Notch 1 en su superficie.....   | 43 |
| Figura 5.  | La señalización a través de Notch es importante para la producción de citoquinas por los linfocitos T CD8+ y CD4+....                            | 45 |
| Figura 6.  | El inhibidor de la vía Notch provoca un retraso en la proliferación de los linfocitos T CD8+ activados con células dendríticas.....              | 47 |
| Figura 7.  | La IL-4 bloquea la vía Notch en células dendríticas.....   | 50 |
| Figura 8.  | La inhibición de la vía Notch no afecta la expresión de marcadores de activación ni la producción de citoquinas por las células dendríticas..... | 52 |
| Figura 9.  | Los linfocitos B aumentan levemente la expresión de CD86 y la producción de IL-12 por las células dendríticas.....                               | 54 |
| Figura 10. | Los linfocitos B favorecen levemente las respuestas de tipo Th1.....   | 56 |

Figura 11. Los linfocitos B inducen la expresión de todos los ligandos de Notch excepto Jagged 1 en las células dendríticas.....59

Figura 12. Generación de linfocitos Th1 y Th2.....62

Figura 13. Células dendríticas precondicionadas con linfocitos Th1 favorecen respuestas Th1 mientras que aquellas precondicionadas con linfocitos Th2 favorecen respuestas Th2.....64

Figura 14. Los linfocitos T helper inducen marcadores de activación y los ligandos de Notch en células dendríticas.....66

Figura 15. La IL-4 induce la expresión de Jagged 2.....69

Figura 16. IFN- $\gamma$  induce la maduración de las células dendríticas pero no afecta la expresión de los ligandos de Notch.....70

Figura 17. Modelo propuesto.....90



## ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| 2-ME:   | <i>2-mercapto-ethanol</i>  |
| BCR:    | Receptor del linfocito B   |
| BMDCs:  | Células dendríticas derivadas de médula ósea                                 |
| CD:     | <i>Cluster of differentiation</i>  |
| CFSE:   | <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>                                 |
| CpG:    | Dinucleótidos de citidina fosfato guanosina                                  |
| CT:     | Toxina del cólera  |
| DAPT:   | <i>N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester</i> |
| DC:     | Célula dendrítica  |
| DSL:    | Delta-serrate-Lag2   |
| DLL:    | <i>Delta-like</i>  |
| DMSO:   | Dimetilsulfóxido   |
| EDTA:   | Acido etilendiaminotetraacético  |
| EGF:    | Factor de crecimiento epidermal  |
| ELISA:  | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>                                     |
| FACS:   | <i>Fluorescent activated cell sorting</i>                                    |
| FCS:    | <i>Forward scatter</i>   |
| FITC:   | <i>Fluorescein iso thyo-cyanate</i>  |
| GM-CSF: | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos                  |
| HES:    | <i>Hairy/Enhancer of split homologue</i>                                     |
| IFN:    | Interferón   |
| IL:     | Interleuquina  |

|         |   |
|---------|---|
| IMDM:   | <i>Iscove's modified Dulbecco's media</i>           |
| IMF:    | Intensidad media de fluorescencia                   |
| LB:     | Linfocito B   |
| LPS:    | Lipopolisacárido                                    |
| LT:     | Linfocito T   |
| MAML:   | <i>Mastermind-like proteins</i>                     |
| MHC:    | Complejo principal de histocompatibilidad           |
| mRNA:   | Acido ribonucleico mensajero                        |
| NA/LE:  | <i>No azide/Low endotoxin</i>                       |
| NK:     | <i>Natural killer</i>                               |
| OVA:    | Ovoalbúmina   |
| PBS:    | <i>Phosphate saline buffer</i>                      |
| PCR:    | Reacción en cadena de la polimerasa                 |
| PE:     | <i>Phycoerythrin</i>                                |
| PEST:   | Prolina/Acido Glutámico/Serina/Treonina             |
| PE-Cy5: | <i>Phycoerythrin cyanine 5</i>                      |
| PGE2:   | Prostaglandina E2                                   |
| PMA:    | <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>              |
| RAM:    | <i>RBP-j association motif</i>                      |
| RT:     | Transcripción reversa                               |
| SEA:    | <i>Schistosoma mansoni egg antigen</i>              |
| SFB:    | Suero fetal bovino                                  |
| SSC:    | <i>Side scatter</i>                                 |
| STAT:   | <i>Signal transducer activator of transcription</i> |

TCR: Receptor del linfocito T  
Th1: *T helper 1*  
Th2: *T helper 2*  
Th17: *T helper 17*  
TMB: *Tetramethylbenzidine*  
TNF: Factor de necrosis tumoral

## RESUMEN

Las células dendríticas juegan un papel primordial en la polarización Th1/Th2 de la respuesta inmune, puesto que estas células son capaces de integrar y decodificar las señales provenientes del patógeno a través de sus receptores de reconocimiento de patrones conservados. La secreción de IL-12 por las células dendríticas constituye un factor esencial en la generación de linfocitos Th1. Por el contrario, se postula que la generación de respuestas Th2 ocurre en ausencia de IL-12 o debido a la presencia de IL-4 durante la activación de linfocitos T. Sin embargo, se ha descrito la existencia de mecanismos independientes de estas citoquinas en la generación de respuestas Th1 y Th2. Por otro lado y más recientemente, se ha vinculado a la vía de señalización Notch, en la polarización de la respuesta inmune. Estas investigaciones proponen un rol a la expresión de los ligandos de Notch, Delta-like y Jagged por células dendríticas en la generación de respuestas tipo Th1 y Th2 respectivamente.

Además de las señales que las células dendríticas obtienen directamente del patógeno, éstas también serían capaces de responder frente a señales que derivan de otras células del sistema inmune. Las evidencias indican que linfocitos T, B y células NK afectan la polarización de la respuesta inmune mediante un efecto directo sobre la célula dendrítica.

En base a estos antecedentes, en este trabajo se planteó la hipótesis que los linfocitos B y linfocitos T modulan la expresión de Jagged y Delta-like

en las células dendríticas y de esta manera influyen en la polarización de la respuesta inmune.

Nuestros estudios de la expresión de los ligandos de Notch en las células del sistema inmune demostraron que Delta-like 4 se expresa en células dendríticas tratadas con estímulos Th1 mientras que Jagged 2 se expresa en células dendríticas tratadas con estímulos Th2. Dentro de las citoquinas estudiadas, sólo IL-4 (una citoquina Th2) potenció la expresión de Jagged 2, lo cual refuerza la idea de que este ligando está involucrado en respuestas Th2. A pesar de estos antecedentes, no se logró detectar Notch 1 en la superficie de los linfocitos T CD4+, incluso después de ser activados. Sorpresivamente, Notch 1 sí se expresa en la superficie de linfocitos T CD8+ y reveló ser un regulador de la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  por estas células. Aún cuando se detectó un porcentaje de células dendríticas que expresan Notch 1, esta vía no parece estar relacionada con la expresión de marcadores de activación ni en la producción de citoquinas por estas células.

Al analizar el efecto de los linfocitos B en la polarización de la respuesta inmune, se determinó que sólo ejercen un efecto discreto, favoreciendo las respuestas Th1. Luego de la interacción con linfocitos B las células dendríticas aumentaron la expresión de Delta-like 1 y Jagged 2, ligandos asociados con respuestas Th1 y Th2 respectivamente.

De acuerdo con datos de la literatura, nuestros resultados indican que los linfocitos Th1 favorecen la generación de respuestas Th1 y los linfocitos Th2 favorecen la generación de respuestas Th2. Sin embargo, tanto

linfocitos Th1 como Th2 indujeron fuertemente la expresión de Delta-like 4 en DCs. La inducción de Delta-like 4 probablemente se debe a la interacción CD40/CD40L durante el contacto entre la célula dendrítica y el linfocito T. A pesar de lo esperado, no observamos una inducción preferencial de Jagged 2 en células dendríticas activadas con linfocitos Th2 ni de Delta-like 4 en células dendríticas activadas con linfocitos Th1. Estos datos sugieren que si bien Jagged 2 y Delta-like 4 poseen un rol en la polarización Th1/Th2, la inducción de estos ligandos en células dendríticas no es parte del mecanismo utilizado por los linfocitos para modular la respuesta inmune.



## ABSTRACT

Dendritic cells play a key role on T cell polarization, due to their ability to integrate and decode signals derived from the pathogen through their conserved pattern recognition receptors. IL-12 secretion by dendritic cells is the main factor driving Th1 polarization. On the other hand, it has been postulated that Th2 responses arise when T cells are activated in the absence of IL-12 or in the presence of IL-4. However, IL-12 and IL-4 independent polarization mechanisms have also been suggested. Recently, Notch signaling pathway has been involved on T cell polarization. There is evidence supporting the role of Delta-like and Jagged expression by dendritic cells in Th1 and Th2 responses respectively.

In addition to the signals that the dendritic cells obtain directly from the pathogen, they are also able to respond to signals derived from other cells of the immune system. There is enough evidence suggesting that B cells, T cells and NK cells bias the polarization of the immune response through their direct interaction with dendritic cells.

Based on these findings, it is possible to suggest that B cells and T cells have an effect on the polarization of the immune response through the regulation of Notch ligands' expression on dendritic cells.

The analysis of Notch ligand expression on different cells of the immune system showed that Delta-like 4 and Jagged 2 are expressed on dendritic cells following activation with Th1 and Th2 promoting stimuli. Moreover, only IL-4, a Th2 hallmark cytokine induced Jagged 2 expression

on dendritic cells, a fact that reinforces the idea that this ligand is involved on Th2 responses. In spite of previous studies, Notch 1 was not detected on CD4+ T cells, even after these cells were activated. Surprisingly, Notch 1 was detected on CD8+ T cells and we showed that this pathway is involved on proliferation and IFN- $\gamma$  production by these cells. Notch 1 was also detected on a population of dendritic cells, however the inhibition of the Notch pathway did not have an effect on activation markers nor cytokine secretion by dendritic cells.

When analyzing the effect of B cells on T cell polarization, we observed that these cells only exert a discrete effect, favoring Th1 responses. After the interaction with B cells, dendritic cells mainly upregulate Delta-like 1 and Jagged 2 expression, ligands associated with Th1 and Th2 responses respectively.

In agreement with previous evidence, our data indicates that Th1 lymphocytes favor Th1 responses while Th2 cells favor Th2 responses. Both, Th1 and Th2 cells strongly upregulated Delta-like 4 expression on dendritic cells. This upregulation is probably due to CD40/CD40L interaction during T cell and dendritic cell contact. In contrast with what was expected, there was no preferential upregulation of Jagged 2 on dendritic cells activated by Th2 cells nor Delta-like 4 on dendritic cells activated by Th1 cells. These data suggest that although Jagged 2 and Delta-like 4 may be involved on T cell polarization, the induction of these ligands on dendritic cells is not one of the mechanisms used by lymphocytes to modulate the immune response.

## INTRODUCCION

### La polarización de la respuesta inmune

El sistema inmune se caracteriza por tener la capacidad de combatir y eliminar una gran variedad de patógenos. La efectividad de la respuesta inmune depende de la activación de mecanismos apropiados para cada tipo de patógeno al cual el organismo ha sido expuesto. La activación de los diferentes mecanismos de defensa se conoce como la polarización de la respuesta inmune e involucra la participación de un subtipo de linfocitos T (LT) denominados LT CD4+ (Kalinski et al. 1999).

Los LT CD4+ son participantes esenciales durante la respuesta inmune adaptativa, puesto que son los encargados de seleccionar y coordinar al resto de las células efectoras durante el transcurso de una respuesta inmune. Una vez que ha reconocido el antígeno presentado en una molécula de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), el LT CD4+ comienza un programa de diferenciación. Este proceso depende de las citoquinas presentes durante el reconocimiento antigénico, pudiendo el LT CD4+ diferenciarse en al menos tres linajes diferentes; linfocito T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2) o T helper 17 (Th17) (Murphy and Reiner 2002; Kaiko et al. 2008). Los linfocitos Th1 se caracterizan por secretar citoquinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y linfoxina, las cuales son esenciales en erradicar patógenos intracelulares. Los linfocitos Th2 por otra parte producen IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, citoquinas que poseen un rol crucial en la producción y cambio de clase

de anticuerpos y en la eliminación de patógenos extracelulares. Los linfocitos Th17 principalmente secretan IL-17 y poseen un rol en procesos inflamatorios y en la activación de neutrófilos en el combate de bacterias extracelulares (Murphy and Reiner 2002; Szabo et al. 2003; Kaiko et al. 2008).

Es tal la importancia de la selección del mecanismo apropiado durante la eliminación del patógeno, que algunas cepas de ratones que se caracterizan por favorecer respuestas Th2 (Balb/c) son ineficientes en erradicar un patógeno intracelular como *Leishmania major*, el cual es erradicado fácilmente por cepas que favorecen respuestas Th1 (C57BL/6) (Reiner and Locksley 1995).

### **Las células dendríticas**

Las células dendríticas (DCs) son consideradas los centinelas del sistema inmune, puesto que se encuentran en la periferia y en los sitios de entrada de los patógenos como piel y mucosas. En la periferia, las DCs se encuentran en un estado inmaduro y se caracterizan por ser altamente fagocíticas y pobres presentadoras de antígenos, siendo capaces de distinguir una gran variedad de microorganismos debido a que poseen receptores que reconocen patrones moleculares conservados característicos de patógenos. Luego del reconocimiento del patógeno, las DCs inician un programa de maduración y migración hacia el órgano linfoide drenante, donde pueden presentar los antígenos derivados del patógeno en el

contexto de moléculas de MHC de clase I y II de manera de activar LT CD8+ y CD4+ específicos para el antígeno. Al momento de llegar al órgano linfoides secundario, las DCs se han transformado en excelentes presentadoras de antígenos, debido a que presentan una alta expresión de moléculas co-estimuladoras y poseen la capacidad de secretar grandes cantidades de citoquinas (Banchereau and Steinman 1998; Mellman and Steinman 2001).

A diferencia de otras células presentadoras de antígeno del sistema inmune como los linfocitos B (LB) y macrófagos, las DCs son las únicas células capaces de activar LT vírgenes, característica que les ha valido la denominación de células presentadoras de antígenos profesionales (Banchereau and Steinman 1998; Mellman and Steinman 2001).

Además de participar activamente en el inicio de la respuesta inmune adaptativa, las DCs participan en procesos de la inmunidad innata, al producir grandes cantidades de citoquinas como IL-12 e interferones de tipo I y II luego de la interacción con el patógeno (Mellman and Steinman 2001).

### **Generación de respuestas Th1 y Th2**

Las citoquinas presentes durante la activación del LT CD4+, constituyen el factor determinante en la generación de respuestas Th1 y Th2. De esta manera, cuando un LT CD4+ virgen es activado en presencia de IL-12, inicia un programa de diferenciación que culmina con la generación de un linfocito Th1 (Ho and Glimcher 2002). Este programa de diferenciación es activado a través de la cascada de señalización IL-12/STAT4 y se

caracteriza por estar regulado por el factor de transcripción T-bet (Jacobson et al. 1995; Szabo et al. 2000). T-bet a su vez permite inducir la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-12 e induce la transcripción del locus que codifica para IFN- $\gamma$ , citoquina clave en las respuestas Th1 (Murphy and Reiner 2002). Por el contrario, si durante la activación el LT ha sido expuesto a IL-4, éste se diferenciará en un linfocito Th2 (Hsieh et al. 1992). En este caso, la diferenciación es activada por la cascada de señalización IL-4/STAT6 y los factores de transcripción involucrados son miembros de la familia NFAT, c-MAF y GATA3 (Kaplan et al. 1996; Zheng and Flavell 1997). GATA3 por su parte, regula la expresión de una serie de citoquinas características de fenotipos Th2 (Ho and Glimcher 2002; Murphy and Reiner 2002).

Numerosos estudios han demostrado que las DCs juegan un papel importante en la polarización de la respuesta inmune, puesto que estas células son capaces de integrar y decodificar las señales provenientes del patógeno, de los tejidos y de otras células del sistema inmune de manera de iniciar una respuesta inmune efectiva (Kalinski et al. 1999). Sin duda, el mecanismo más importante en la determinación de las citoquinas producidas por las DCs y por lo tanto en el tipo de respuesta Th1/Th2 generada, tiene que ver con la naturaleza del patógeno. Existen varios reportes en la literatura que indican que la generación de respuestas Th1 ó Th2 por DCs depende en gran parte del patógeno o de algún componente de éste al cual ha sido expuesta. De esta forma, compuestos derivados de patógenos como Zymosan (glicano derivado de la pared celular de levaduras), SEA (antígeno

soluble de huevo de *Schistosoma mansoni*) o toxina del cólera son eficientes en la generación de respuestas Th2, mientras que el LPS (lipopolisacárido) y CpG (DNA bacteriano) predominantemente inducen respuestas Th1 (Huang et al. 2001; de Jong et al. 2002; Manickasingham et al. 2003).

La generación de respuestas Th1 y Th2 es un proceso bastante complejo, puesto que se ha descrito la existencia de más de un mecanismo determinante en la polarización de la respuesta inmune, entre los cuales se encuentran la duración de la interacción del receptor de linfocitos T (TCR) con el complejo MHC-péptido (Iezzi et al. 1999; Rogers and Croft 1999), el nivel de expresión de moléculas co-estimuladoras (Rulifson et al. 1997) e incluso el origen de las DCs (Maldonado-Lopez et al. 1999).

### **Existencia de mecanismos independientes de IL-12 e IL-4 en la generación de respuestas Th1 y Th2**

Las DCs producen grandes cantidades de IL-12 cuando son activadas con patógenos intracelulares o algunos de sus componentes, lo cual da cuenta del rol de estas células en la generación de respuestas Th1 (Sher and Reis e Sousa 1998). Sin embargo, no existen evidencias que indiquen que las DCs producen IL-4. Los grandes productores de IL-4 son precisamente los linfocitos Th2, por lo cual se ha propuesto que la fuente de IL-4 necesaria para la generación de linfocitos Th2 podría venir de ellos mismos (Amsen et al. 2004). Esto explicaría el *feedback* positivo en este tipo

de respuestas, pero aún así queda por resolver cómo son iniciadas las respuestas Th2.

Habiéndose descrito que IL-4 es esencial en la generación de respuestas Th2, varios reportes sugieren que las respuestas Th2 pueden ocurrir de manera independiente de esta citoquina. Por ejemplo, se ha descrito que al ser infectados con parásitos, tanto ratones *knockout* para STAT6 como ratones que carecen de la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-4 son capaces de generar respuestas Th2 (Noben-Trauth et al. 1997; Finkelman et al. 2000).

La capacidad de generar respuestas Th2 pareciera entonces estar asociada a la misma DC, puesto que células tratadas con componentes de parásitos, toxina del cólera o Prostaglandina E2 (PGE2) inducen respuestas Th2 de manera independiente de IL-4 (de Jong et al. 2002). Esto sugiere que aún existen factores desconocidos involucrados en la generación de las respuestas Th2.

También se han descrito mecanismos independientes de IL-12 en la inducción de respuestas Th1, luego que un grupo de investigación demostró que es posible generar respuestas Th1 en ratones *knockout* para IL-12 (Jankovic et al. 2002).

### **La vía Notch**

La vía Notch fue inicialmente descrita en *Drosophila melanogaster*, donde moscas haploinsuficientes exhiben cortes o muescas en sus alas



(Maillard et al. 2005). Hoy en día se sabe que Notch regula diversos aspectos de la diferenciación celular en organismos multicelulares. En el embrión, controla los procesos de inhibición lateral, especificación lateral y formación de bordes. Estos procesos dependen de factores como la dosis, contexto y temporalidad en la activación de la vía (Hoyne 2003). La mayoría de los aspectos de Notch en invertebrados son recapitulados en mamíferos, donde esta vía cumple diversas funciones en el desarrollo normal como también en enfermedades (Maillard et al. 2005).

Las diversas funciones de Notch son mediadas a través de una vía de señalización conservada en la cual los receptores de transmembrana Notch sufren de proteólisis regulada y traslocación del segmento citoplasmático al núcleo donde activan la transcripción de varios genes. Existen 4 receptores Notch en mamíferos (Notch 1-4) los cuales poseen diversos dominios conservados. La fracción extracelular de Notch consiste en 29 a 36 secuencias de tipo EGF que se unen a sus ligandos a través del dominio DSL (Delta-Serrate-Lag2). En la porción extracelular, los receptores Notch poseen además un dominio llamado LIN12/Notch que previene la señalización independiente del ligando. La porción intracelular de Notch contiene dominios que median la transducción de señales y que incluyen dominios tipo RAM y Ankirina que le permiten interactuar con otras proteínas. La porción intracelular además contiene secuencias de localización nuclear y un dominio PEST que regula la estabilidad de la proteína (Lai 2004).

La unión de Notch con sus ligandos inicia dos eventos de corte que permiten la liberación de la porción intracelular de Notch. El primer corte es dependiente de metaloproteasas y ocurre extracelularmente. El segundo corte ocurre en el dominio de membrana y es mediado por un complejo multiprotéico que contiene actividad  $\gamma$ -secretasa. Los inhibidores de la actividad  $\gamma$ -secretasa o la pérdida de alguna de las proteínas del complejo previenen la señalización a través de Notch (Wolfe 2001; Fortini 2002).

Luego del segundo corte, el dominio intracelular de Notch viaja al núcleo donde se une al factor de transcripción CSL/RBP-j. En ausencia de la porción intracelular de Notch, CSL/RBP-j recluta correpresores e inhibe la transcripción génica. Cuando el dominio intracelular de Notch se une a CSL/RBP-j, se acopla a proteínas de tipo MAML (*Mastermind-like proteins*) que reclutan activadores transcripcionales como p300, formando un gran complejo molecular que favorece la transcripción de varios genes (Fryer et al. 2002). Los blancos de Notch más estudiados incluyen los represores transcripcionales de la familia de Hes (*Hairy/Enhancer of Split Homologue*). Sin embargo, recientemente se ha descrito que Notch también regula la expresión de proteínas esenciales en la activación y diferenciación de los LT como NF- $\kappa$ B, T-bet, IFN- $\gamma$ , CNS2 (*enhancer* de IL-4) y GATA3 (Fang et al. 2007; Osborne and Minter 2007).

En *Drosophila melanogaster* existe sólo un receptor Notch y dos ligandos posibles; Serrate y Delta mientras que en mamíferos existen dos ligandos de tipo Serrate llamados Jagged (Jagged 1 y 2) y tres ligandos tipo Delta denominados Delta-like (DLL1, 3 y 4). Todos estos ligandos también

son proteínas de transmembrana con dominios extracelulares que poseen repetidos de tipo EGF y un dominio N-terminal DSL con el cual interactúan con Notch. Los dominios intracelulares son muy poco conservados pero poseen funciones importantes (Maillard et al. 2005).

Se ha propuesto que la vía Notch tendría un papel importante durante el desarrollo linfocitario y en procesos de diferenciación y activación de LT y LB periféricos (Maillard et al. 2005). El análisis de la expresión de los componentes de la vía Notch en células del sistema inmune reveló que los LT CD4+ vírgenes expresan el RNA mensajero de Notch 1 y Notch 2 (Hoyne et al. 2000; Amsen et al. 2004) y que los niveles de mRNA de todos los receptores Notch aumentan luego de la activación antigénica (Adler et al. 2003). Por otra parte, el estudio de la expresión de los ligandos de Notch en células presentadoras de antígeno demostró que las DCs de bazo expresan DLL1, DLL4 y Jagged 2 (Yamaguchi et al. 2002). Otros investigadores demostraron la expresión de los RNA mensajeros de Jagged 1 y Jagged 2 pero no de DLL1 ni DLL4 en DCs derivadas de médula ósea (Amsen et al. 2004).

Un estudio reciente ha investigado más profundamente la localización de Notch y sus ligandos durante la interacción entre la DC y el LT. Este reporte demuestra que Notch y sus ligandos se localizan tanto en la membrana celular del LT como de la DC, lo cual genera la interrogante sobre cuáles son los mecanismos que evitan la interacción de Notch con sus ligandos en una misma célula. Los datos indican que durante la interacción del LT con la DC, Notch se localiza en la zona central de sinápsis

inmunológica en el LT, mientras que en la DC, Notch se ubica en zonas más periféricas de la sinápsis. Además, los datos demuestran que durante la formación de la sinápsis inmunológica, tanto los LT como las DCs reflejan la activación de esta vía. Esto demuestra la existencia de una conversación cruzada entre las DCs y los LT mediante la vía Notch (Luty et al. 2007).

### **La vía Notch en la linfopoyesis**

La vía Notch ha sido ampliamente estudiada en el proceso de desarrollo linfocitario. En ausencia de Notch 1, los precursores linfocitarios que entran al timo se transforman en LB al no lograr iniciar un programa de diferenciación hacia LT (Radtko et al. 1999). Asimismo se ha descrito que ratones deficientes en CSL/RBP-j poseen un número elevado de LB en el timo (Han et al. 2002). En experimentos complementarios se demostró que la expresión forzada de una forma activa de Notch 1 en precursores de médula ósea favorece el desarrollo de LT a expensas de los LB (Pui et al. 1999).

Adicionalmente, algunos estudios han revelado un rol primordial de Notch en la decisión de la selección del tipo TCR (*T cell receptor*)  $\alpha\beta/\gamma\delta$  por el LT. Experimentos con ratones condicionales *knockout* para CSL/RBP-j demostraron un aumento en el porcentaje de células T  $\gamma\delta$  en el timo (Tanigaki et al. 2004). Por otra parte, ratones que poseen progenitores de médula ósea deficientes para Notch demostraron una reducción importante

en el porcentaje de células T  $\alpha\beta$  en el timo (Washburn et al. 1997). Todos estos datos sugieren un rol importante de Notch en la generación de LT  $\alpha\beta$ .

El papel de Notch en la determinación de los linajes de LT CD4+ y CD8+ genera mayor controversia. Estudios de ganancia de función revelan que ratones que expresan la forma activa de Notch 1 poseen una preferencia en la generación de LT CD8+ (Robey et al. 1996; Fowlkes and Robey 2002). Sin embargo, otro reporte en ratones condicionales deficientes en la expresión de Notch 1 demuestra que no existen diferencias en las proporciones de LT CD4+ y CD8+ encontrados (Wolfer et al. 2001). Sin duda se requieren de más estudios para descartar o confirmar el rol de Notch durante la elección del correceptor CD4 ó CD8 por el LT.

Recientemente se ha propuesto que la vía Notch participaría en el proceso de la activación linfocitaria. En esta línea, se demostró que durante la activación, los LT CD4+ aumentan la expresión de los cuatro receptores Notch (Hoyne et al. 2000; Amsen et al. 2004). Más aún, el bloqueo de la vía Notch mediante la utilización de inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa redujo la proliferación y expresión de CD25, IL-2 e IFN- $\gamma$  en LT activados (Adler et al. 2003; Palaga et al. 2003). Otro estudio en donde se utilizaron los diferentes ligandos de Notch de manera soluble, demostró que los ligandos ejercen diferentes efectos sobre la activación de los LT. Sólo DLL4 indujo la activación y proliferación del LT y la activación de los factores de transcripción NF-AT, AP-1 y NF- $\kappa$ B, mientras Jagged 1 y DLL1 inhibieron la activación, proliferación y secreción de citoquinas por el LT (Eagar et al. 2004; Rutz et al. 2005). Un aspecto importante a considerar en estos

experimentos es la dosis de ligandos empleada puesto que en muchos casos no se logra imitar los niveles fisiológicos de activación de la vía Notch. Teniendo en cuenta esto, se demostró que los LT pueden ser activados o inhibidos dependiendo de la dosis de DLL1 utilizada para activar la vía Notch (Maekawa et al. 2003). Sin duda, las diferencias en las dosis de los ligandos de Notch utilizados podrían explicar los resultados dispares encontrados por diferentes grupos de investigación.

### **La vía Notch en la polarización de la respuesta inmune**

Existen evidencias que dan cuenta del papel de la vía Notch en la generación de respuestas Th2. A diferencia de lo que ocurre en linfocitos derivados de ratones deficientes en Notch 1, en donde no se observa un efecto de este receptor en la polarización de la respuesta inmune (Tacchini-Cottier et al. 2004), LT derivados de ratones deficientes en CSL/RBP-j y que por lo tanto no pueden señalizar a través de ningún receptor Notch, producen mayores cantidades de IFN- $\gamma$  y menores cantidades de IL-4, lo cual sugiere un rol de esta vía en la generación de respuestas Th2 (Amsen et al. 2004; Tanigaki et al. 2004). Esta discrepancia se podría deber a una cierta redundancia por parte de los diferentes receptores Notch en la polarización de la respuesta inmune.

La participación de la vía Notch en la generación de respuestas Th2 ha sido corroborada en estudios en donde se utilizaron ratones que presentan un dominante negativo de MAML y que por lo tanto no pueden

señalizar a través de ningún receptor Notch. Estos ratones no son capaces de generar respuestas Th2 ni de montar una respuesta funcional ante helmintos (Tu et al. 2005). En este mismo modelo, otro trabajo demostró que la expresión de GATA3, el regulador maestro de respuestas Th2, se ve disminuido en estos ratones mientras que la expresión retroviral de una forma activa de Notch 1 en LT induce la expresión de GATA3 (Fang et al. 2007).

Otros estudios sugieren un papel de la vía Notch en la generación de respuestas Th1. La expresión transgénica de un antisentido para Notch 1 y la utilización de un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa redujo la capacidad de generar respuestas Th1 mientras que dejó intacta la capacidad de generar respuestas Th2. Por otra parte, la expresión de Tbx21, un factor de transcripción implicado en la generación de respuestas Th1 se ve disminuido en presencia del inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa (Maekawa et al. 2003; Minter et al. 2005).

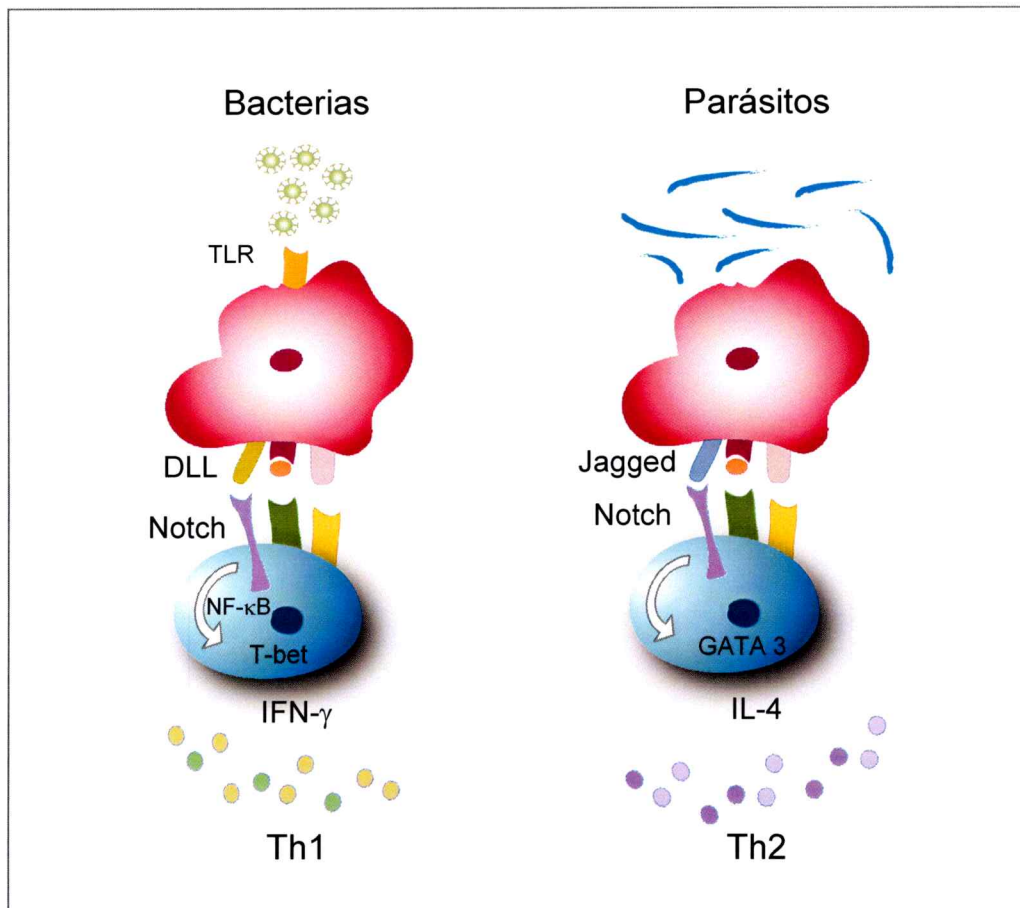
El rol de la vía Notch en la generación de respuestas Th1 está probablemente mediado por la activación de NF- $\kappa$ B. Algunos estudios demostraron que la inactivación de la vía Notch, mediante la utilización de un antisentido para Notch 1, redujo la actividad de NF- $\kappa$ B tanto en precursores hematopoyéticos como en LT periféricos, presentando en estos últimos además una reducción en la producción de IFN- $\gamma$  (Cheng et al. 2001; Palaga et al. 2003) .

Todos estos datos sugieren que la activación de Notch induce a su vez la activación de NF- $\kappa$ B, factor que dirige la expresión de genes

asociados a respuestas Th1 como aquellos que codifican para T-bet e IFN- $\gamma$ . En contraste, el rol de Notch en la regulación de las respuestas Th2 es probablemente mediado a través de la vía canónica MAML-RBP-j (Osborne and Minter 2007).

Debido a la importancia de las DCs en la polarización de la respuesta inmune, numerosos estudios han tratado de determinar cómo estas células regulan la expresión de los ligandos de Notch. Se ha demostrado que la expresión de los ligandos de Notch en DCs depende del estímulo al cual han sido expuestas (Figura 1). Es así como las DCs activadas con estímulos que generan respuestas Th1 como LPS presentan una mayor expresión de DLL4 mientras que DCs activadas con estímulos Th2 como toxina del cólera o PGE2 presentan una mayor expresión de Jagged 1 y Jagged 2. Más aún, DCs que expresan Jagged 1 son capaces de inducir respuestas Th2 incluso en ausencia de la señalización a través del receptor para IL-4 (Amsen et al. 2004). Si bien la expresión de Jagged 2 por DCs genera un aumento de las respuestas Th2 *in vitro*, algunos estudios parecen demostrar que este ligando no tiene mayor relevancia en la generación de respuestas Th2 *in vivo* (Krawczyk et al. 2008; Worsley et al. 2008).





**Figura 1. Papel de la vía Notch en la polarización de la respuesta inmune.** Los estímulos derivados de diferentes tipos de patógenos inducen la expresión de los ligandos de Notch en las células dendríticas. Estos ligandos interactúan con Notch en el linfocito T para inducir su diferenciación en células Th1 ó Th2. La interacción de Jagged con Notch gatilla la activación de GATA3 y la producción de IL-4 por el linfocito T. Por el contrario, la interacción de Delta-like (DLL) con Notch induce la activación de T-bet y la producción de IFN- $\gamma$  por el linfocito T. Figura adaptada de Maillard et al., 2005.

## Regulación de la polarización de la respuesta inmune por linfocitos

### B y T

La capacidad de las DCs de migrar desde la periferia al órgano linfoide secundario en respuesta a los patógenos permite la entrega de información a los LT sobre la identidad molecular y la patogenicidad del invasor. Sin embargo, para generar respuestas polarizadas efectivas contra el patógeno, la DC debe integrar además la información derivada del tejido afectado y de otras células del sistema inmune (Kalinski and Moser 2005).

Datos en la literatura sugieren que los linfocitos citotóxicos (LT CD8+ y células NK) favorecen las respuestas Th1. Los LT CD8+ son capaces de inducir la maduración y potenciar la producción de IL-12 por las DCs, probablemente a través de la producción de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF (Ruedl et al. 1999; Mailliard et al. 2002; Thomas et al. 2002). En acuerdo con los datos anteriores, estudios de depleción *in vivo* de LT CD8+ indican que en ausencia de LT CD8+, se reducen las respuestas Th1 protectoras contra *Leishmania major* (Gurunathan et al. 2000). Al igual que los LT CD8+, las células NK son grandes productores de IFN- $\gamma$  y TNF, citoquinas que son las responsables de potenciar la producción de IL-12 por las DCs. Por esta razón, también se ha postulado que las células NK afectarían la polarización, favoreciendo al igual que los LT CD8+, la generación de respuestas Th1. Un estudio demostró que luego de la interacción de células NK con DCs, estas últimas adquieren mayor capacidad para secretar IL-12 y favorecen la diferenciación de LT CD4+ en linfocitos Th1 (Mailliard et al. 2003). Además,

la depleción de las células NK en un modelo *in vivo* demostró una reducción en el porcentaje de células Th1 producidas, lo cual sugiere la participación de las células NK en la generación de este tipo de respuestas (Martin-Fontecha et al. 2004).

Se conoce de la existencia de una comunicación cruzada entre la DC y el LB. Algunas funciones del LB como la diferenciación, cambio de isotipo y producción de anticuerpos están reguladas por las DCs (Dubois et al. 1997; Litinskiy et al. 2002). Recientemente se ha demostrado que la DC es capaz de intercambiar antígenos con los LB y de esta forma activar señales de calcio y cambios en la motilidad del linfocito (Qi et al. 2006). Además, un estudio en ratones que carecen de LB ( $\mu$ MT) demostró que en ausencia de éstos, las DCs secretan mayores cantidades IL-12 y por lo tanto favorecen la producción de respuestas Th1. El fenómeno observado en estos ratones, se explicaría por una deficiencia en la producción de IL-10, una citoquina que reduce la producción de IL-12 (Moulin et al. 2000; Bayry et al. 2005). Todo esto sugiere una interacción bi-direccional entre la DC y el LB donde la producción de IL-12 por la DC gatillaría la producción de IL-6 e IL-10 por el LB y de esta forma se daría paso a la generación de respuestas Th2 (Skok et al. 1999). De manera similar y apoyando el posible rol de los LB en la generación de respuestas Th2, se ha reportado que pacientes que presentan agamaglobulinemia y que carecen de LB circulantes, poseen una predisposición a generar respuestas de tipo Th1 (Amedei et al. 2001).

Cabe destacar que existen evidencias que indican que los LT CD4+ también cumplen un rol en la polarización de la respuesta inmune. La

eliminación de los LT CD4+ y CD8+ provoca un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias por los componentes del sistema inmune innato, lo cual demuestra que normalmente los LT regulan la producción de citoquinas por DCs, macrófagos y células NK (Kim et al. 2007). Existen al menos dos reportes en los cuales se demuestra que LT polarizados son capaces de favorecer el mismo tipo de respuesta en una suerte de *feedback* positivo. En ambos trabajos se demuestra que este efecto ocurre sólo cuando los LT polarizados y los LT vírgenes interactúan con la misma DC. Esto sugiere que las DCs actúan como mensajeros entre estas dos poblaciones de LT y descarta que el efecto descrito se deba a una interacción directa entre linfocitos (Creusot et al. 2003; Alpan et al. 2004).

La integración de los antecedentes descritos y en especial aquellos que sugieren un rol de la vía Notch en la polarización de la respuesta inmune, conjuntamente con los datos que implican tanto a linfocitos B como a linfocitos T en esta polarización, nos ha llevado a plantear la posibilidad que los linfocitos B y T afectan la polarización mediante la regulación de la expresión de los ligandos de Notch en las DCs.

## **HIPOTESIS**

Datos de la literatura muestran que la vía Notch juega un papel en la polarización de la respuesta inmune. Por otro lado existen evidencias que señalan que los linfocitos B y linfocitos T también influirían en el tipo de respuesta Th1/Th2 generada. En base a esta información, postulamos la hipótesis:

Los linfocitos B y T modulan la expresión de Jagged y Delta-like en células dendríticas y de esta manera ejercen un efecto sobre la polarización de la respuesta inmune.

Alternativamente postulamos:

Los mecanismos a través de los cuales los linfocitos B y T favorecen las respuestas polarizadas no tienen relación con la vía Notch.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de las células del sistema inmune adaptativo sobre las células dendríticas y su consecuencia en la polarización de la respuesta inmune.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estudiar la expresión de los componentes de la vía Notch en las células implicadas en la polarización de la respuesta inmune como células dendríticas y linfocitos T.
2. Determinar el efecto de linfocitos B y T sobre la polarización de la respuesta inmune.
3. Determinar el efecto de linfocitos B y T en la expresión de Jagged y Delta-like en las células dendríticas.
4. Caracterizar los factores solubles involucrados en la modulación del fenotipo de la célula dendrítica por los linfocitos B y T.

## MATERIALES Y METODOS

### Ratones

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de ratones; Balb/c (haplotipo H-2<sup>d</sup>), C57BL/6 (haplotipo H-2<sup>b</sup>) y el *knockout* para la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4 (*il4ra -/-*) en un background Balb/c (haplotipo H-2<sup>d</sup>). Además se utilizaron los siguientes ratones transgénicos para el TCR; ratones OT-I cuyos LT CD8<sup>+</sup> reconocen un péptido de ovoalbúmina (OVA<sub>257-264</sub>) en un contexto de MHC-I H2-K<sup>b</sup>, ratones OT-II cuyos LT CD4<sup>+</sup> reconocen un péptido de ovoalbúmina (OVA<sub>323-339</sub>) presentado en el contexto de la molécula MHC-II I-A<sup>b</sup> y ratones DO11.10 cuyos LT CD4<sup>+</sup> reconocen un péptido de ovoalbúmina (OVA<sub>323-339</sub>) presentado en el contexto de la molécula MHC-II I-A<sup>d</sup>.

Todas las cepas de ratones se adquirieron en The Jackson Laboratory (Bay Harbor, USA) y se albergaron en condiciones libres de patógenos en el bioterio de la Fundación Ciencia para la Vida (Santiago). Todo el trabajo con los animales se realizó de acuerdo a las normas institucionales de la Fundación Ciencia Para la Vida y de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

## Anticuerpos

Para la caracterización del fenotipo de los LT, LB y de las DCs por citometría de flujo, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales de BD Biosciences; CD11c PE (clon HL3), CD11c FITC (clon HL3), CD86 FITC (clon GL1), I-A<sup>b</sup> FITC (clon 25-9-17), I-A<sup>d</sup> FITC (clon AMS-32.1), CD80 FITC (clon 16-10A1), CD4 PE-Cy5 (clon RM 4-5), CD4 FITC (clon RM 4-5), B220 PE-Cy5 (clon RA 3-6B2), CD8 $\alpha$  FITC (clon 53-6.7), CD8 $\alpha$  PE-Cy5 (clon 53-6.7), V $\alpha$ 2 TCR PE (clon B20.1), V $\beta$ 5.1, 5.2 TCR FITC (clon MR9-4), CD62L PE (clon MEL-14), CD69 PE (clon H1.2F3), IFN- $\gamma$  PE (clon XMG1.2), IFN- $\gamma$  FITC (clon XMG1.2), IL-4 PE (clon 11B11), IL-12 PE (clon C15.6) y CD16/32 (clon 2.4G2). Los siguientes anticuerpos fueron comprados en e-Bioscience; DO11.10 TCR FITC (clon KJ1-26), CD11c PE-Cy5 (clon N418). Los anticuerpos contra Notch 1 PE (clon mN1A) y su control de isotipo IgG1 PE (MCA928PE) fueron comprados en AbD Serotec.

En las activaciones policlonales de los LT se utilizaron los siguientes anticuerpos BD Biosciences; CD3 (clon 145-2C11), CD28 NA/LE (clon 37.51), IL-4 NA/LE (clon 11B11) e IFN- $\gamma$  NA/LE (clon XMG1.2).

En la activación de DCs se utilizó el anticuerpo CD40 NA/LE (clon 3/23) de BD Biosciences.

En los experimentos diseñados para detectar Jagged y Delta-like por citometría de flujo en células dendríticas, se utilizaron los siguientes anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology; Delta (clon T-20) y Jagged (clon



C-20) y los siguientes anticuerpos de R&D Systems; DLL4 biotinilado (BAF1389) y Jagged 2 (AF1726).

Para los experimentos de bloqueo de la interacción de Notch y sus ligandos se utilizó un anticuerpo anti-Notch 1 (Labvision, clon A6) que ha sido descrito previamente como bloqueador de esta vía (Ostroukhova et al. 2006; Asano et al. 2008).

### **Citometría de flujo y detección de citoquinas intracelulares**

Para la detección de moléculas de superficie, las células se incubaron con las correspondientes combinaciones de los anticuerpos diluidos en PBS+2% de SFB durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron una vez con PBS+2% de SFB y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml en PBS+2% de SFB para luego ser evaluadas en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences). Los análisis de los datos se hicieron utilizando el software CellQuest (BD Biosciences). En algunos casos, los receptores Fc de las células fueron previamente bloqueados con el anticuerpo CD16/32 (Fc Block) por 15 minutos a 4°C previo a el marcaje de superficie.

Para la detección de citoquinas intracelulares en LT, las células se centrifugaron a 500 x g por 7 minutos y resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI+10% SFB. Luego, se activaron por 4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con una concentración final de 0,25 µM de PMA (Sigma) y 1 µg/ml de ionomicina (Sigma) en presencia de 1 µl de brefeldina A (GolgiPlug, BD Biosciences).

Posteriormente las células se lavaron y se realizó el marcaje de superficie para CD4 ó CD8 según el protocolo anteriormente descrito. A continuación las células se fijaron y permeabilizaron con 200  $\mu$ l de Cytofix/Cytoperm (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C, se centrifugaron a 650 x g por 7 minutos y se incubaron por 30 minutos a 4°C con los anticuerpos anti-IL-4 PE y anti-IFN- $\gamma$  FITC diluidos en 50  $\mu$ l de Permash Buffer (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences). Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700  $\mu$ l de Permash Buffer y se resuspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml en PBS+2% SFB para ser analizadas por citometría de flujo.

Para la detección de IL-12 intracelular en DCs, las células se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI+10% SFB y se activaron por 4 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con 100 ng/ml de LPS (*Salmonella typhosa*, Sigma) en presencia de 0,7  $\mu$ l de monensina (GolgiStop, BD Biosciences). Posteriormente se realizó el marcaje de superficie para CD11c y luego las células se fijaron y permeabilizaron con 200  $\mu$ l de Cytofix/Cytoperm (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C, se centrifugaron a 650 x g por 7 minutos y se incubaron por 30 minutos a 4°C con el anticuerpo anti-IL-12 PE diluido en 50  $\mu$ l de Permash Buffer (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences). Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700  $\mu$ l de Permash Buffer y se resuspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml en PBS+2% SFB para ser analizadas por citometría de flujo.

## **Generación de células dendríticas de médula ósea**

La tibia y el fémur de los diferentes ratones se esterilizaron y cortaron en ambos extremos. Los huesos se perfundieron con 10 ml de RPMI sin suero y las médulas se disgregaron por agitación vigorosa para obtener una suspensión celular en la cual se encuentran los precursores de DCs. Posteriormente, los glóbulos rojos se lisaron en 1 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15M,  $\text{KHCO}_3$  10mM y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1mM, pH 7,2-7,4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las células se resuspendieron a  $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI + 10% SFB + 10ng/ml GM-CSF +/- 1 ng/ml IL-4 y se cultivaron durante 6 días en una placa de 24 pozos en un volumen de 1 ml de medio. En algunos casos, las DCs se diferenciaron en presencia de DAPT  $5 \mu\text{M}$  (Calbiochem) o DMSO como control. En los días 2 y 4 del cultivo se realizó un cambio de medio, reemplazando 750  $\mu\text{l}$  del medio por 1 ml de medio fresco con las concentraciones de citoquinas originales. Al día 6 de cultivo las células se recuperaron por pipeteo, se lavaron una vez con PBS + 2mM EDTA + 5% SFB (T-MACS) y se incubaron durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$  en agitación con 30  $\mu\text{l}$  de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec) por cada  $1 \times 10^8$  de células totales en 300  $\mu\text{l}$  de T-MACS. En seguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de T-MACS, se resuspendieron a  $1 \times 10^8$  células/ml en T-MACS y se seleccionaron positivamente usando un magneto (VarioMACS, Miltenyi Biotec) y columnas LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Se colectó la fracción positiva la cual

contiene las DCs. La pureza de la preparación se verificó mediante la expresión de CD11c por citometría de flujo y siempre fue mayor a un 90% de células positivas para CD11c.

### **Activación de las células dendríticas de médula ósea**

Las células dendríticas de médula ósea (BMDCs) purificadas se cultivaron a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml en 250  $\mu$ l del medio de diferenciación fresco en una placa de 24 pozos, en presencia de alguno de los siguientes estímulos; 100 ng/ml de LPS (*Salmonella typhosa*, Sigma), 10  $\mu$ g/ml de CpG (ODN 1680, InvivoGen), 1  $\mu$ g/ml de toxina del cólera (Sigma), 1  $\mu$ M de PGE2 (Sigma) ó 10  $\mu$ g/ml de anti-CD40 (BD Biosciences) durante 6, 12 ó 24 horas. En algunos casos las células se activaron con CpG en presencia de 10 ng/ml de IL-12 (R&D Systems). Al cabo de la incubación, las células se recolectaron para la extracción de RNA y los sobrenadantes de los cultivos se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de IL-12 e IL-10 secretada mediante un ELISA de captura.

### **Extracción de RNA y RT-PCR**

Para la extracción de RNA a partir de BMDC activadas, se utilizaron los siguientes kits; RNEasy Mini Kit (Qiagen) y RNase free DNase set (Qiagen) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Posteriormente se utilizó 1  $\mu$ g de RNA para realizar la transcripción reversa con el kit

Superscript 1st Strand system for RT-PCR (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. La calidad del cDNA obtenido se analizó mediante un PCR para  $\beta$ -actina. Para esto se utilizó 1  $\mu$ l de cDNA, 2  $\mu$ l de la mezcla de primers sense y antisense (S/AS) para  $\beta$ -actina (50  $\mu$ M) y 22  $\mu$ l de Platinum PCR Supermix (Invitrogen). Los primers utilizados (Invitrogen) fueron los siguientes;  $\beta$ -actina (sense: 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3'-antisense 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3').

### **PCR en tiempo Real**

Los cDNAs de las muestras de DCs fueron analizados por PCR en tiempo real para determinar la expresión de Notch 1, Jagged 1, Jagged 2, DLL4, DLL1 y Hes 1. Para esto, se realizaron reacciones de PCR con 1  $\mu$ l de los cDNA, 0,2-1  $\mu$ l de la mezcla de primers S/AS (10-50  $\mu$ M) y 12,5  $\mu$ l del master mix 2X (PCR Master Mix RT2 Real-Time SYBR Green/Rox, Superarray) en un volumen total de 25  $\mu$ l en placas de 96 pozos para PCR (Stratagene). Las muestras se analizaron con un termociclador MX3000 (Stratagene) y el programa MXPro (Stratagene). Para Jagged 2 se utilizaron primers comerciales (RT2 PCR Primer Set for Mouse Jag 2, Superarray). El resto de los primers fueron sintetizados por Invitrogen y las secuencias se detallan a continuación; Notch 1 (sense: 5'-CAG CTT GCA CAA CCA GAC AGA C -3'-antisense 5'-ACG GAG TAC GGC CCA TGT T-3'), Jagged 1 (sense: 5'-TCT CTG ACC CCT GCC ATA AC-3'-antisense 5'-ATC GAT GTT TGT GGA ACA CG-3'), DLL4 (sense: 5'-GCA CCA ACT CCT TCG TCG TC-

3'-antisense 5'-GTT TCC TGG CGA AGT CTC TG-3'), DLL1 (sense: 5'-ACC TCG GGA TGA CGC CTT TG-3'-antisense 5'-ACT CCC CTG GTT TGT CAC AG-3'), Hes 1 (sense: 5'-CCG GCA TTC CAA GCT AGA G-3'-antisense 5'-TCA CCT CGT TCA TGC ACT CG -3') HPRT (sense: 5'-CTC CTC AGA CCG CTT TTT GC-3'-antisense 5'-TAA CCT GGT TCA TCA TCG CTA ATC-3').

Como gen endógeno se utilizó HPRT y el cálculo de la expresión relativa se realizó en base al método  $\Delta\Delta Ct$ . Para ello se asumió una eficiencia del 100% (en base a los resultados de las eficiencias obtenidas para cada partidor) y utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Cambio en la expresión} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Donde,

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{Experimental})} - \Delta Ct_{(\text{Control})}$$

$$\Delta Ct_{(\text{Experimental})} = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen de expresión constitutiva}}$$

$$\Delta Ct_{(\text{Control})} = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen de expresión constitutiva}}$$

### **ELISA de captura para las citoquinas IL-10 e IL-12**

Para la determinación de IL-10 e IL-12 se utilizaron los siguientes kits; mouse IL-10 ELISA Set y Mouse IL-12 ELISA Set (BD Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Todos los ELISA se desarrollaron

usando el kit TMB Substrate Reagent Set (BD Biosciences), la reacción se detuvo usando 50µl H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1M y las placas se leyeron a 450nm usando un lector de placas de ELISA.

### **Purificación de las células dendríticas de bazo**

El bazo de los diferentes ratones se disgregó mecánicamente y se resuspendió en 5 ml de IMDM + 10% FCS tibio. Los tejidos se digirieron en presencia de 1 mg/ml de colagenasa D (Roche) y 20 µg/ml de DNAsa I (Sigma), durante 45 minutos a 37°C en agitación. Posteriormente, la suspensión celular se pasó a través de un tamiz metálico de 90 µm y los glóbulos rojos se lisaron en 1 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl 0,15M, KHCO<sub>3</sub> 10mM y Na<sub>2</sub>EDTA 0,1mM, pH 7,2-7,4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron una vez con 10 ml de PBS + 5% SFB + 2mM EDTA (T-MACS) y se incubaron durante 20 minutos a 4°C en agitación con 50 µl de MACS anti-CD11c de ratón (clon N418) (Miltenyi Biotec) por cada 1x10<sup>8</sup> de células totales en 300 µl de T-MACS. En seguida, las células se lavaron una vez con 10 ml de T-MACS, se resuspendieron a 1x10<sup>8</sup> células/ml en T-MACS y se seleccionaron positivamente usando un magneto (VarioMACS, Miltenyi Biotec) y columnas LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Se colectó la fracción positiva la cual contiene las DCs. La pureza de la preparación se verificó mediante la expresión de CD11c por citometría de flujo.

## **Purificación de linfocitos B y T**

Los LB y LT se extrajeron a partir del bazo de diferentes ratones mediante selección inmunomagnética. Para esto, el bazo se perfundió con 10 ml de RPMI + 10% SFB y las células se centrifugaron a 500 x g por 7 minutos. Los glóbulos rojos se lisaron con 2 ml de una solución hipotónica de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,15M,  $\text{KHCO}_3$  10mM y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1mM, pH 7,2-7,4) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con T-MACS y se centrifugaron a 500 x g por 7 minutos. Los LB se aislaron utilizando un kit de selección negativa (B cell isolation Kit, Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante, los LT  $\text{CD4}^+$  se aislaron por selección positiva utilizando 7,5  $\mu\text{l}$  de MACS anti- $\text{CD4}$  ( $\text{CD4}$  L3T4 microbeads, Miltenyi Biotec) por cada  $1 \times 10^7$  células y los LT  $\text{CD8}^+$  se aislaron mediante selección positiva con 10  $\mu\text{l}$  de MACS anti- $\text{CD8}$  ( $\text{CD8a}$  Ly-2 microbeads, Miltenyi Biotec) por cada  $1 \times 10^7$  células. En todos los casos, al cabo de las incubaciones, las células se lavaron con T-MACS y se seleccionaron utilizando un magneto (VarioMACS) y columnas LS de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). La pureza de las preparaciones se verificó mediante citometría de flujo y siempre fue mayor de un 85%.

## **Generación de linfocitos T helper**

Para la generación de los linfocitos  $\text{Th1}$  y  $\text{Th2}$ , se utilizó un protocolo previamente descrito con algunas modificaciones (Grogan et al. 2001; Minter



et al. 2005). Linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratones OT-II se purificaron a partir del bazo por selección inmunomagnética, se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/ml en medio de co-cultivo (IMDM+10% SFB+ 50  $\mu$ M 2ME) y se incubaron con 1  $\mu$ g/ml de un anticuerpo anti-CD28 (BD Biosciences) en placas de 24 pozos (Corning Incorporated) previamente recubiertas con 1  $\mu$ g/ml de un anticuerpo anti-CD3 (BD Biosciences). En la generación de linfocitos Th1, se agregaron 10 ng/ml de IL-12 (R&D Systems) y 10  $\mu$ g/ml de un anticuerpo anti-IL-4 (BD Biosciences). Para la diferenciación de linfocitos Th2, las células se incubaron con 20 ng/ml de IL-4 (BD Biosciences) y con 10  $\mu$ g/ml de un anticuerpo anti- IFN- $\gamma$  (BD Biosciences). Al tercer día de incubación, y con el fin de detener la activación policlonal, los linfocitos se traspasaron a pozos nuevos que no estaban recubiertos con anti-CD3 y se les agregó 1 ml de medio fresco sin citoquinas ni anticuerpos. El fenotipo resultante de los linfocitos se analizó por citometría de flujo al día 5 en base a la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4.

### **Co-cultivo de linfocitos B con células dendríticas de médula ósea**

Las BMDCs de ratones C57BL/6 se aislaron de acuerdo al protocolo de obtención de DCs a partir de médula ósea. Los LB se purificaron a partir del bazo de ratones C57BL/6 utilizando un kit de selección negativa de LB (Miltenyi Biotec). En algunos casos, los LB se activaron previamente por 24 horas mediante la incubación con 100 ng/ml de LPS (*Salmonella typhosa*, Sigma). Al día siguiente, las células se lavaron 2 veces con medio fresco

para remover el exceso de LPS y se incubaron con las DCs. Las DCs ( $1 \times 10^6$  células/pozo) y los LB ( $1 \times 10^6$  células/pozo) se co-cultivaron en una placa de 24 pozos (Corning Incorporated) en 2 ml de medio de co-cultivo. En algunos casos, se varió la proporción de DCs y LB, pero siempre se mantuvo constante el número total de células por pozo ( $2 \times 10^6$  células). Al cabo de 24 horas de co-cultivo, las DCs se analizaron por citometría de flujo o se aislaron mediante la utilización de MACS anti-CD11c (Miltenyi Biotec) para la cuantificación de la expresión de los ligandos de Notch por PCR en tiempo real. La pureza de la preparación de DCs fue verificada cada vez por citometría de flujo y así se determinó que el porcentaje de LB contaminantes no superó al 2% de las células totales.

En algunos casos, se realizaron cultivos triples, en donde BMDCs de ratones Balb/c se pulsaron por 3 horas con una concentración de  $5 \mu\text{M}$  del péptido específico OVA<sub>323-339</sub> (H2N-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH, New England Peptide), se lavaron 2 veces de manera de retirar el exceso de péptido y se cultivaron con LT CD4<sup>+</sup> de ratones DO11.10 en presencia de diferentes proporciones de LB. La proporción de DCs y LT siempre fue de 1:5 ( $2,4 \times 10^6$  células totales/pozo). Al cabo de 5 días de cultivo, se analizó el fenotipo de los LT generados en base a la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 por citometría de flujo.

## **Co-cultivo de linfocitos T helper con células dendríticas de médula ósea**

Para analizar el efecto de los LT helper sobre la DC, LT CD4+ de ratones OT-II previamente diferenciados en linfocitos Th1 ó Th2 se co-cultivaron con BMDCs de ratones C57BL/6 en presencia del péptido específico. Para esto, los linfocitos Th1 y Th2 recién diferenciados se lavaron 2 veces con medio y se resuspendieron en medio de co-cultivo fresco. Por otra parte, las BMDCs se aislaron mediante selección inmunomagnética en base a la expresión de CD11c. Los linfocitos ( $1 \times 10^6$  células/pozo) se co-cultivaron con las BMDCs ( $1 \times 10^6$  células/pozo) en pozos de P24 (Corning Incorporated) en un volumen final de 2 ml por pozo y en presencia del péptido específico OVA<sub>323-339</sub> (H2N-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH, New England Peptide) a una concentración final de 5  $\mu$ M. Al cabo de 24 horas de co-cultivo, las BMDCs se analizaron por citometría de flujo para determinar marcadores de activación o se aislaron mediante una segunda purificación inmunomagnética con MACS anti-CD11c para determinar la expresión de Jagged 2 y DLL4 por PCR en tiempo real. La pureza de la preparación de BMDCs purificadas fue verificada cada vez por citometría de flujo y de esta forma se determinó que el porcentaje de LT contaminantes no superó al 2% de las células totales.

Para determinar si los LT helper preconditionan a la DC para inducir respuestas Th1 ó Th2, las BMDCs co-cultivadas por 24 horas con linfocitos Th1 ó Th2 se aislaron con MACS anti-CD11c y se utilizaron para activar LT

CD4+ vírgenes de ratones OT-II. En este segundo co-cultivo, se mantuvo la concentración de 5  $\mu$ M del péptido OVA<sub>323-339</sub> pero la proporción de BMDCs y LT fue de 1:5 ( $2,4 \times 10^6$  células totales/pozo). Al cabo de 5 días de co-cultivo, el fenotipo de los LT resultantes se analizó por citometría de flujo para determinar los porcentajes de células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-4.

### **Co-cultivo de células dendríticas de bazo con linfocitos T**

Para determinar la contribución de la vía Notch en la activación, proliferación y producción de citoquinas por los LT CD4+ y CD8+, se realizaron co-cultivos de DCs de bazo de ratones C57BL/6 con LT CD4+ de ratones OT-II y LT CD8+ de ratones OT-I en presencia de DAPT (Calbiochem), el inhibidor de la vía Notch. También se analizó el efecto específico del bloqueo de la interacción de Notch 1 con sus ligandos mediante la utilización de un anticuerpo (MS-1339, Labvision) que reconoce la proteína Notch 1 en la región de unión con sus ligandos.

Los LT se purificaron por selección inmunomagnética en base a CD4 y CD8, se marcaron con CFSE (Molecular Probes) y se cultivaron con DCs previamente purificadas a partir de ratones C57BL/6. En estos experimentos, los co-cultivos de DCs con linfocitos OT-II se realizaron en presencia de 5  $\mu$ M de OVA<sub>323-339</sub>. En el caso de los co-cultivos de DCs con linfocitos OT-I, se utilizó una concentración final de 2 nM del péptido de OVA<sub>257-264</sub> (H2N-SIINFEKL-OH, New England Peptide). Ambos tipos de co-cultivos se realizaron en placas de 96 pozos de fondo redondo (Orange Scientific) y se

utilizó una proporción de DCs y LT de 1:5 ( $0,24 \times 10^6$  células totales/pozo) con una concentración final de DAPT de  $5 \mu\text{M}$ . En los experimentos de bloqueo de la vía Notch mediante la utilización de un anticuerpo, las células se preincubaron por 30 minutos con el anticuerpo anti-Notch 1 a una concentración de  $50 \mu\text{g/ml}$  previo a la adición del péptido específico. Al cabo de 4-5 días de co-cultivo, los LT se analizaron por citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores de activación, producción de citoquinas y ciclos de división celular mediante dilución de la marca de CFSE.

### **Marcaje con CFSE**

Para evaluar la proliferación de LT CD4+ y LT CD8+ frente a DCs en presencia DAPT o el anticuerpo bloqueador de la interacción de Notch con sus ligandos, los linfocitos se marcaron con CFSE (Molecular Probes) previo al co-cultivo. Para eso, los linfocitos se lavaron 2 veces con PBS de manera de eliminar restos de SFB y se resuspendieron en 1 ml de PBS por cada  $1 \times 10^7$  células en presencia de CFSE  $5 \mu\text{M}$ . Las células se agitaron en vortex por 10 segundos y luego se incubaron por 10 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. Al cabo de la incubación, se les agregó 1 volumen de SFB por las paredes del tubo y se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se les agregó 10 ml de medio de cultivo con suero, se centrifugaron a  $500 \times g$  por 7 minutos y se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/ml en medio de co-cultivo.

## **Análisis estadístico**

Los datos son presentados como la media  $\pm$  desviación estándar (SD). Los datos se analizaron usando un test de ANOVA pareado (con test de comparación múltiple de Bonferroni) o mediante el test de student. Para los análisis estadísticos y confección de los gráficos se utilizó el software GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc.).

## RESULTADOS

### Estudio de la vía Notch en el sistema inmune

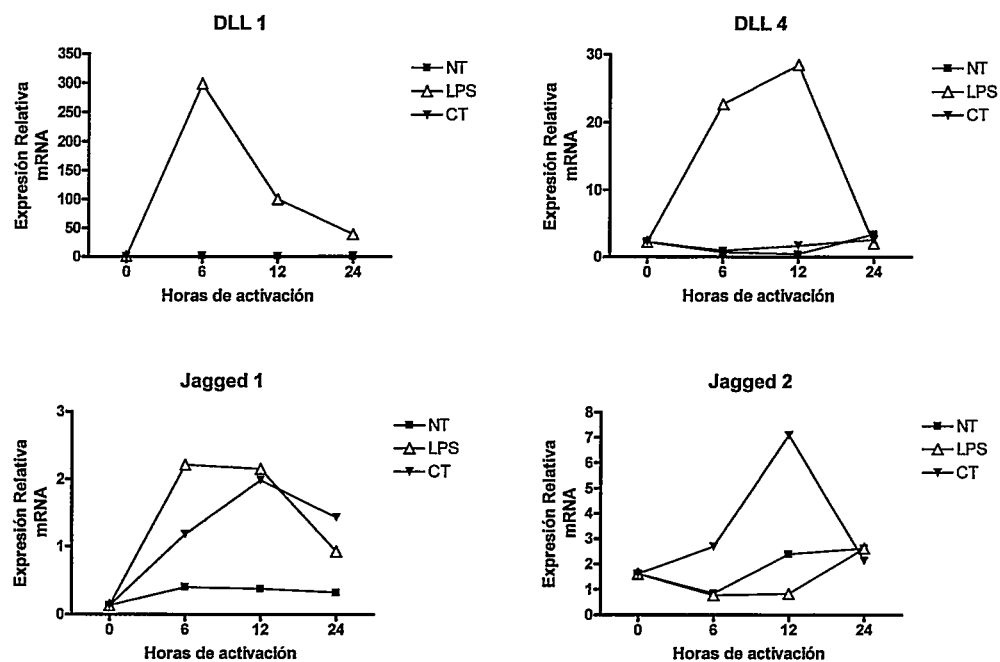
#### La expresión de DLL4 y Jagged 2 por células dendríticas se correlaciona con respuestas Th1 y Th2 respectivamente

Si bien la vía Notch ha sido ampliamente estudiada en el proceso de la hematopoyesis y linfopoyesis, existe controversia en cuanto a la real contribución de esta vía durante procesos más tardíos como la generación de LT reguladores y la generación de respuestas Th1 y Th2 (Maillard et al. 2005). Por esta razón, parte de este trabajo se concentró en determinar el rol de Jagged y Delta-like en la polarización de la respuesta inmune. Los esfuerzos iniciales se enfocaron en encontrar anticuerpos comerciales capaces de reconocer específicamente los ligandos de Notch de manera de ser utilizados en experimentos de citometría de flujo. Sin embargo, se determinó que todos los anticuerpos analizados anti-Delta-like y anti-Jagged no fueron útiles en el reconocimiento de los ligandos de Notch por citometría de flujo. Por esta razón, la expresión de los ligandos de Notch en DCs se analizó a nivel de RNA mensajero mediante PCR en tiempo real.

Para determinar el *peak* de expresión de los ligandos de Notch en DCs, se evaluó la cinética de expresión de éstos en BMDCs tratadas con agentes microbianos y factores tisulares que poseen la capacidad de producir DCs inductoras de respuestas Th1 ó Th2. Se utilizó LPS como

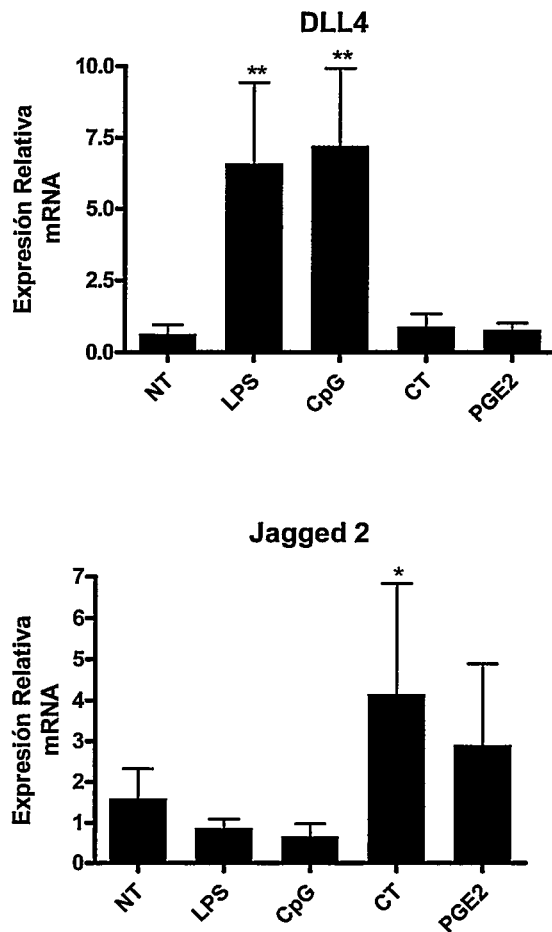
agente inductor de respuestas Th1 y la toxina del cólera como inductor de respuestas Th2 (Kapsenberg, 2003). Como se observa en la figura 2, el máximo de inducción de los mRNA para los ligandos de Notch: DLL1, DLL4, Jagged 1 y Jagged 2 en las BMDCs ocurre en todos los casos entre las 6 y 12 horas luego de la activación. Por esta razón, todos los experimentos posteriores se analizaron en esta ventana temporal.





**Figura 2. Los ligandos de Notch presentan una cinética de expresión con un máximo entre las 6 y 12 horas post activación. Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron activadas con LPS y toxina del cólera (CT) por diferentes tiempos. La expresión de DLL1, DLL4, Jagged 1 y Jagged 2 fue analizada mediante PCR en tiempo real y se comparó con células no tratadas (NT) (n=1).**

Normalmente se asocia a los ligandos de tipo Jagged con respuestas Th2 y a los ligandos tipo Delta con respuestas Th1. En acuerdo con la literatura, se observó que Jagged 2 se induce bajo un estímulo Th2 como toxina del cólera (CT). Por otro lado, si bien Jagged 1 también se indujo bajo estímulos Th2, respondió además frente a estímulos Th1 (Figura 2). Asimismo, los datos de la figura 2 indican que ambos ligandos de tipo Delta efectivamente se inducen bajo estímulos Th1. De manera de verificar estos resultados iniciales, se analizó cómo se comportan Jagged 2 y DLL4 frente a otros estímulos Th1 y Th2. De esta forma, se analizó la respuesta de las BMDCs frente a CpG como estímulo Th1 y PGE2 como estímulo Th2. Como se observa en la figura 3, CpG, al igual que LPS, induce la expresión de DLL4. Si bien PGE2 indujo la expresión de Jagged 2, esta inducción no fue estadísticamente significativa como en el caso de la toxina del cólera. Todo esto sugiere que la expresión de DLL4 por BMDCs está relacionada con la generación de respuestas Th1 mientras que la expresión de Jagged 2, con respuestas Th2.

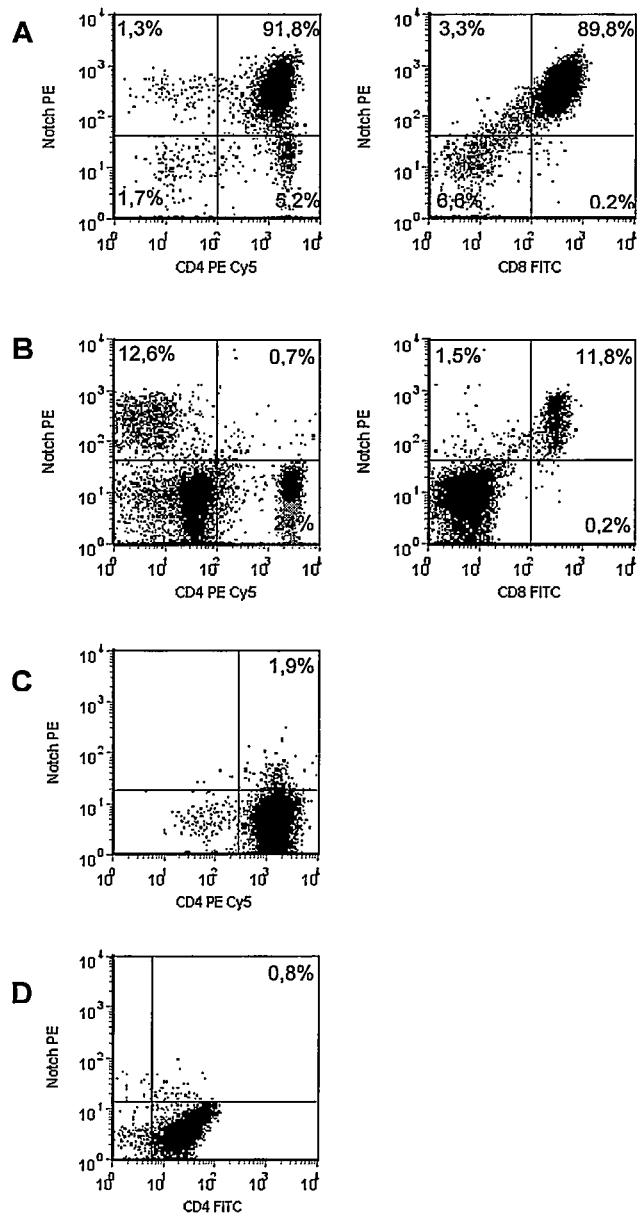


**Figura 3. DLL4 se induce en células dendríticas tratadas con estímulos Th1 mientras que Jagged 2 se induce con estímulos Th2.** Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron activadas por 6 horas con los diferentes estímulos. La expresión de DLL4 y Jagged 2 se cuantificó mediante PCR en tiempo real (n=5). Los datos fueron analizados con el test de Anova y el post-test de Bonferroni. (Los datos se presentan como la media +/- desviación estándar, \*p<0.05, \*\*p<0.01). NT: no tratadas, CT: toxina del cólera, PGE2: Prostaglandina E2.

## **Los linfocitos T CD8+ y no los CD4+ expresan Notch 1 en su superficie**

Durante la hematopoyesis en la médula ósea, los linfocitos requieren de las señales provenientes de su receptor Notch para comenzar su diferenciación hacia LT. Este proceso finaliza en el timo, donde los LT además reciben señales que determinarán el subtipo de linfocito a generarse, ya sea LT regulador, LT CD4+ o CD8+ (Rothenberg et al. 2008). El análisis de la expresión de Notch 1 en timocitos mediante citometría de flujo mostró una alta expresión de este receptor en la gran mayoría de las células. Sin embargo, al analizar la expresión de Notch 1 en linfocitos maduros presentes en el bazo, se observó que sólo los LT CD8+ expresan altos niveles de este receptor. La expresión de Notch 1 en LT CD8+ no se restringió a alguna subpoblación de LT, sino que la totalidad de los LT CD8+ presentó este receptor (Figura 4).

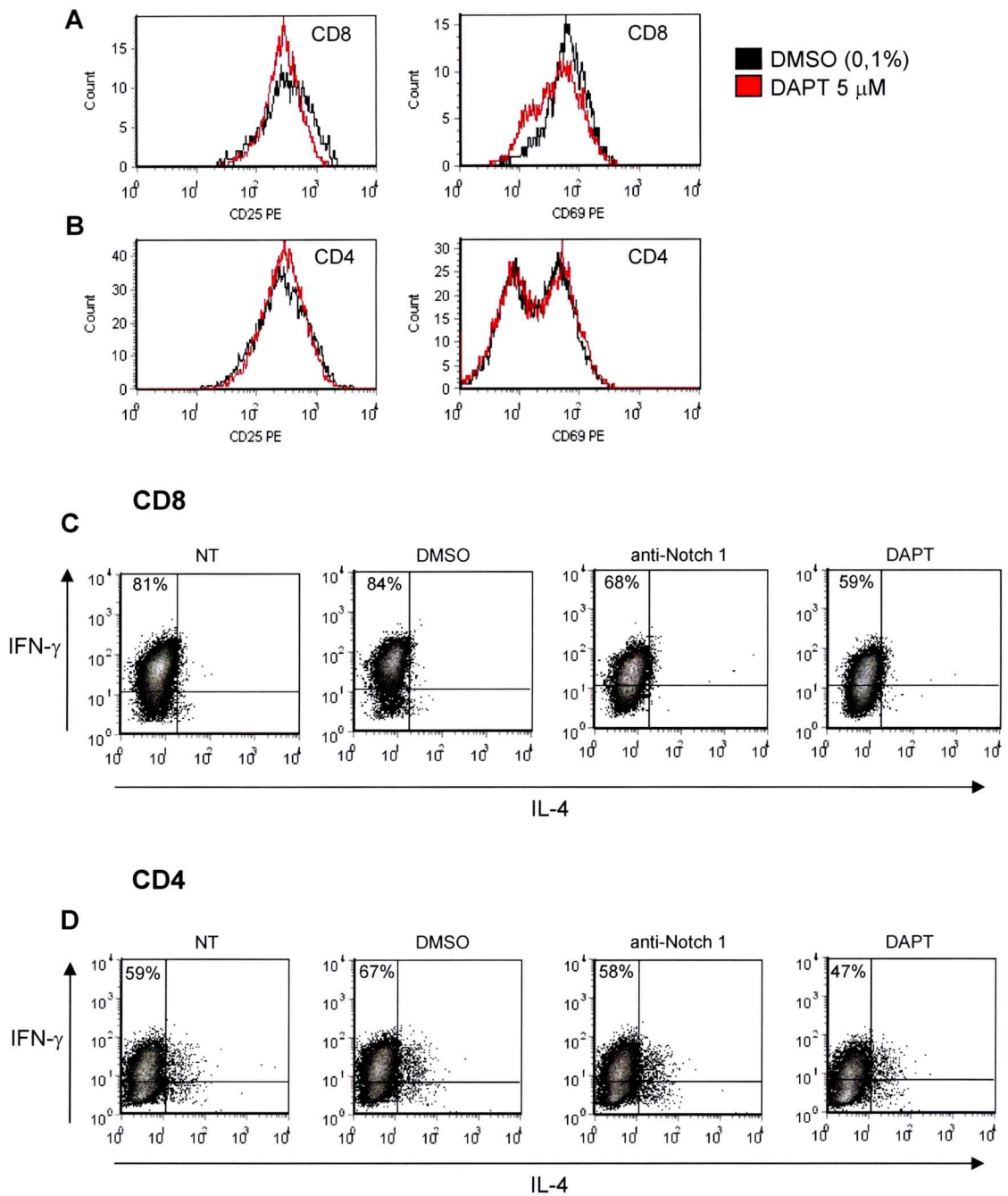
A pesar de las evidencias en la literatura que indican que el mRNA de Notch 1 se induce en LT activados (Adler et al. 2003), no se logró detectar un aumento en la expresión de Notch 1 en LT activados policlonalmente o en presencia de DCs por 4 días, aún cuando los LT se encontraban en un estado activado en base a la expresión de CD25 (no mostrado). Tampoco se detectó la expresión de Notch 1 en linfocitos activados por 24 y 48 horas (datos no mostrados).



**Figura 4. Timocitos y linfocitos T CD8+ maduros expresan Notch 1 en su superficie.** Células extraídas del timo (A) y bazo (B) de ratones Balb/c fueron analizadas por citometría de flujo para verificar la expresión de Notch 1. Linfocitos T CD4+ de ratones DO11.10 se activaron policlonalmente (C) o mediante el co-cultivo con células dendríticas (D) para luego analizar la expresión de Notch 1 por citometría de flujo. Los números en cada figura representan el porcentaje de células en cada cuadrante. Resultado representativo de 3 experimentos independientes.

## **La vía Notch es importante en la proliferación y producción de IFN- $\gamma$ por los linfocitos T CD8+**

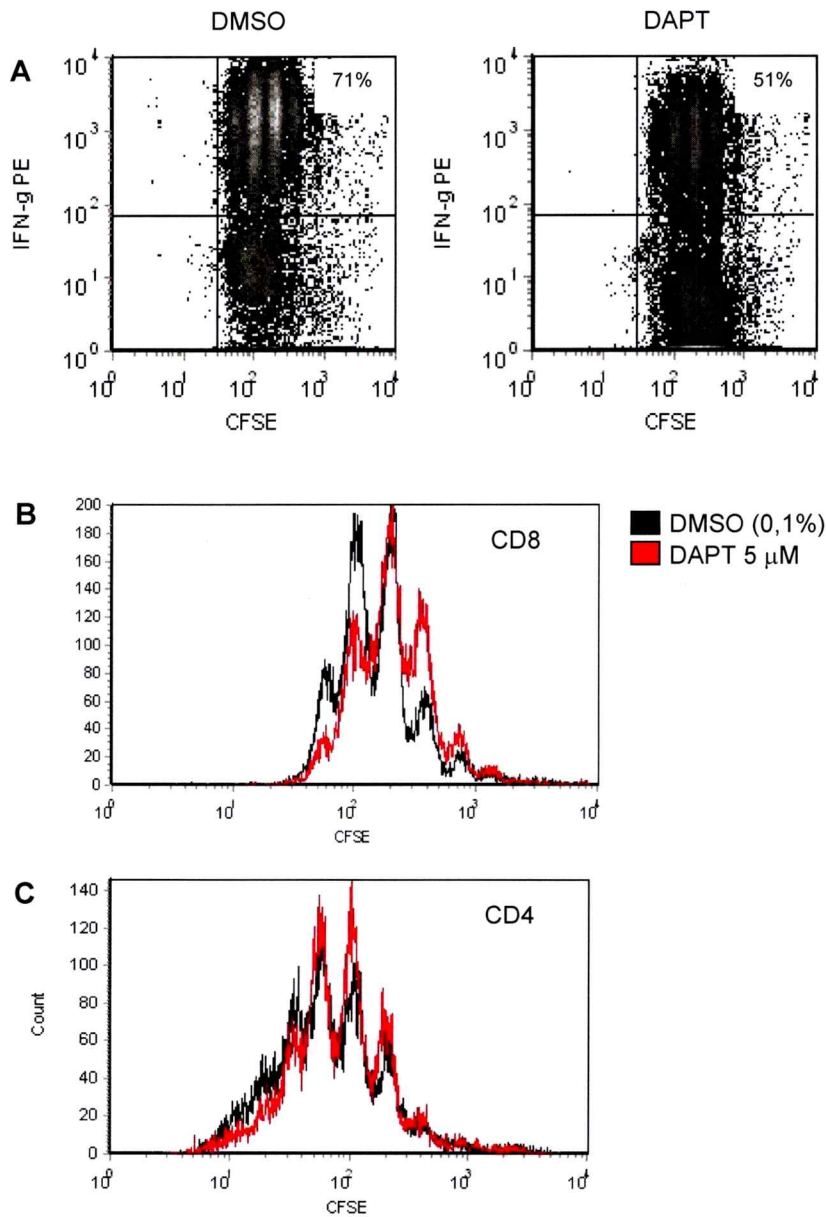
Las grandes diferencias observadas en cuanto a la expresión de Notch 1 en LT CD4+ y CD8+ sugiere una distinta participación de la vía Notch en la activación de estos dos subtipos de LT. Para demostrar esto, se analizaron marcadores de activación, proliferación y producción de citoquinas en LT CD4+ y CD8+ en presencia de DAPT, un inhibidor de la vía Notch que impide el corte proteolítico de Notch por la  $\gamma$ -secretasa. Como se aprecia en la figura 5 A y B, la presencia de DAPT en los co-cultivos de LT CD4+ ó CD8+ con DCs de bazo no afectó la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 en los LT. Sin embargo, al inhibir la vía Notch, ya sea con DAPT o con un anticuerpo que bloquea la interacción de Notch 1 con sus ligandos, los LT CD8+ redujeron la producción de IFN- $\gamma$  a diferencia de los LT CD4+ que sólo fueron afectados por el tratamiento con DAPT (Figura 5 C y D).



**Figura 5. La señalización a través de Notch es importante para la producción de citoquinas por los linfocitos T CD8+ y CD4+.** Linfocitos T CD8+ de bazo de ratones OT-I (A y C) y linfocitos T CD4+ de bazo de ratones OT-II (B y D) se cultivaron con células dendríticas de bazo de ratones C57BL/6 en presencia del respectivo péptido específico. Al cabo de 4 días de cultivo se determinó la expresión de CD25, CD69, y la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 en los linfocitos T. Los números al interior de cada gráfico representan el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$ . Resultados representativos de 2 experimentos independientes.

Al analizar la tasa de proliferación de los LT CD4+ y CD8+ incubados en presencia de DAPT, se observó un retraso en la proliferación sólo en el caso de los LT CD8+ (Figura 6). Sin embargo, cuando LT CD8+ fueron activados policlonalmente en presencia de DAPT, no se observaron diferencias en la tasa de proliferación en comparación con el control con DMSO (dato no mostrado). Todo esto sugiere que los LT CD8+ expresan Notch 1 en su superficie y requieren de la señalización a través de este receptor para su proliferación y producción de citoquinas. Además sugieren la participación de otros receptores Notch (como Notch 2, 3 y/o 4) en la producción de IFN- $\gamma$  por los LT CD4+.





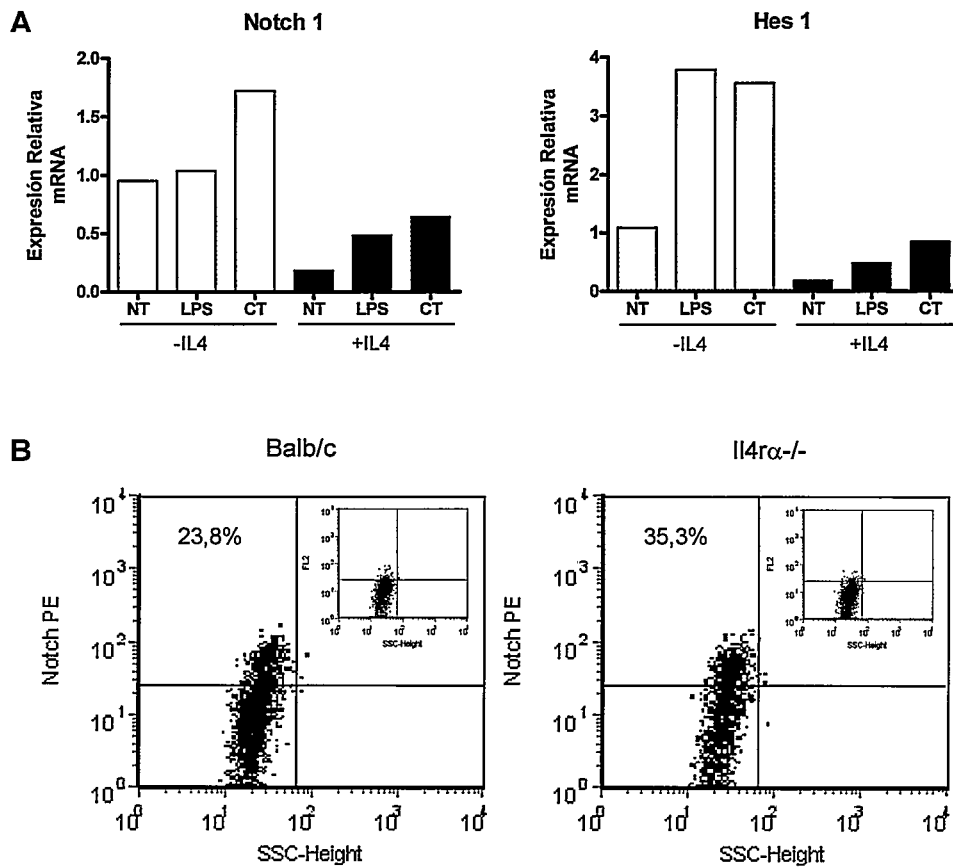
**Figura 6. El inhibidor de la vía Notch provoca un retraso en la proliferación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados con células dendríticas.** Linfocitos OT-I (A y B) y OT-II (C) marcados con CFSE se cultivaron con células dendríticas de bazo de ratones C57BL/6 en presencia del péptido específico respectivo. Los linfocitos T se analizaron por citometría de flujo para determinar ciclos de división celular por dilución de CFSE y producción de IFN- $\gamma$ . Resultado representativo de 2 experimentos independientes.

**Las células dendríticas expresan Notch 1 pero esta vía no está involucrada en la diferenciación, activación ni producción de citoquinas por estas células**

Existen evidencias en la literatura que indican que Notch cumple un rol importante en la diferenciación y activación de los LT (Maillard et al. 2005) razón por la cual esta vía ha sido ampliamente estudiada en estas células. Por otra parte, debido a la importancia de la interacción entre el LT y la DC, la mayoría de los estudios de la vía Notch en DCs se han limitado al análisis de la expresión de los ligandos de Notch, Jagged y Delta-like. Sorprendentemente, durante los análisis iniciales de la expresión de los ligandos de Notch en BMDCs activadas, también detectamos la expresión de Notch 1 a nivel de mRNA en estas células (Figura 7A).

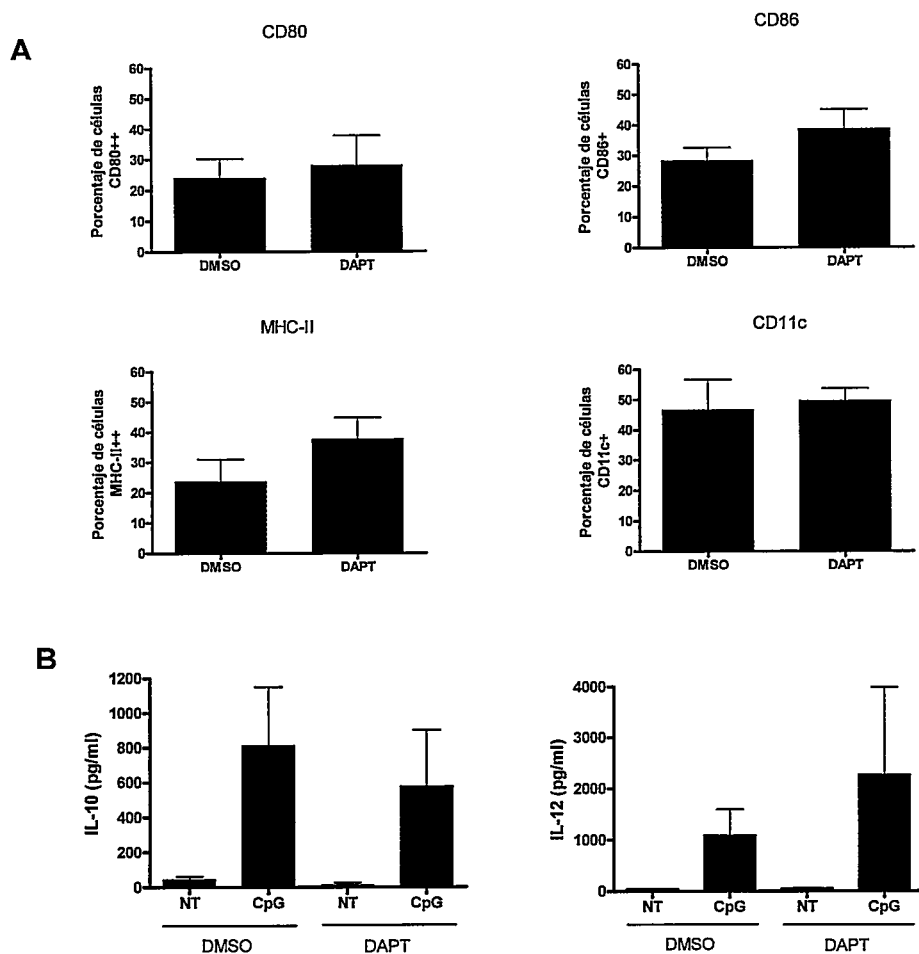
La IL-4 es una citoquina importante en varios aspectos fenotípicos y funcionales en las DCs. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que esta citoquina induce la expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas de MHC-II en DCs. Además, nosotros y otros investigadores hemos demostrado que la IL-4 favorece la producción de IL-12 por las DCs al inhibir la producción de IL-10 por estas células (Sauma et al. 2004; Yao et al. 2005). En base a estos antecedentes, estudiamos la expresión de Notch en DCs tratadas con IL-4. Como se observa en la figura 7A, la presencia de IL-4 durante la diferenciación y activación de las DCs reduce los niveles de mRNA para Notch 1. De acuerdo con lo anterior, la expresión de un gen blanco de Notch, *hes 1* que normalmente se utiliza

como reportero de la actividad de esta vía, demostró ser menor en BMDCs diferenciadas en presencia de IL-4 (Figura 7A), lo cual sugiere que esta vía se encuentra apagada en estas DCs. A pesar de los datos de PCR en tiempo real, no se detectó Notch 1 en la superficie de estas células por citometría de flujo, sin embargo en DCs de bazo se detectó alrededor de un 20% de DCs que expresan este receptor (Figura 7B). DCs derivadas de ratones que no expresan la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4 presentaron un porcentaje levemente mayor en cuanto a la expresión de Notch 1 (Figura 7B). Todo esto nos lleva a sugerir un rol regulatorio de IL-4 no sólo sobre marcadores de activación y producción de citoquinas por las DCs, sino que además en la expresión de Notch 1.



**Figura 7. La IL-4 bloquea la vía Notch en células dendríticas.** Células dendríticas generadas a partir de médula ósea se analizaron por PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de Notch 1 y Hes 1 (A) (n=1). Células dendríticas purificadas a partir de bazo ratones Balb/c o de ratones *knockout* para la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4 se analizaron por citometría de flujo para detectar Notch 1 en la superficie (B). Los números al interior de cada gráfico representa el porcentaje de células positivas para Notch 1 con respecto al control de autofluorescencia (inserto). Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

Con el fin de analizar el rol que cumpliría la vía Notch en las DCs, estas células se diferenciaron en presencia de DAPT o en presencia de DMSO como control. El porcentaje de BMDCs generadas al cabo de 6 días en presencia de DAPT no fue diferente al control (Figura 8A). Esto sugiere que la vía Notch no sería necesaria durante la diferenciación de DCs a partir de precursores de médula ósea. Por otra parte, las BMDCs diferenciadas en presencia de DAPT presentaron un leve aumento en la expresión de algunos marcadores de activación como CD86 y MHC-II (Figura 8A) y un leve aumento en la secreción de IL-12 y reducción en la producción de IL-10 (Figura 8B), sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Todo lo anterior sugiere que la vía Notch no sería importante en la expresión de los marcadores de activación ni en la producción de citoquinas por las DCs.

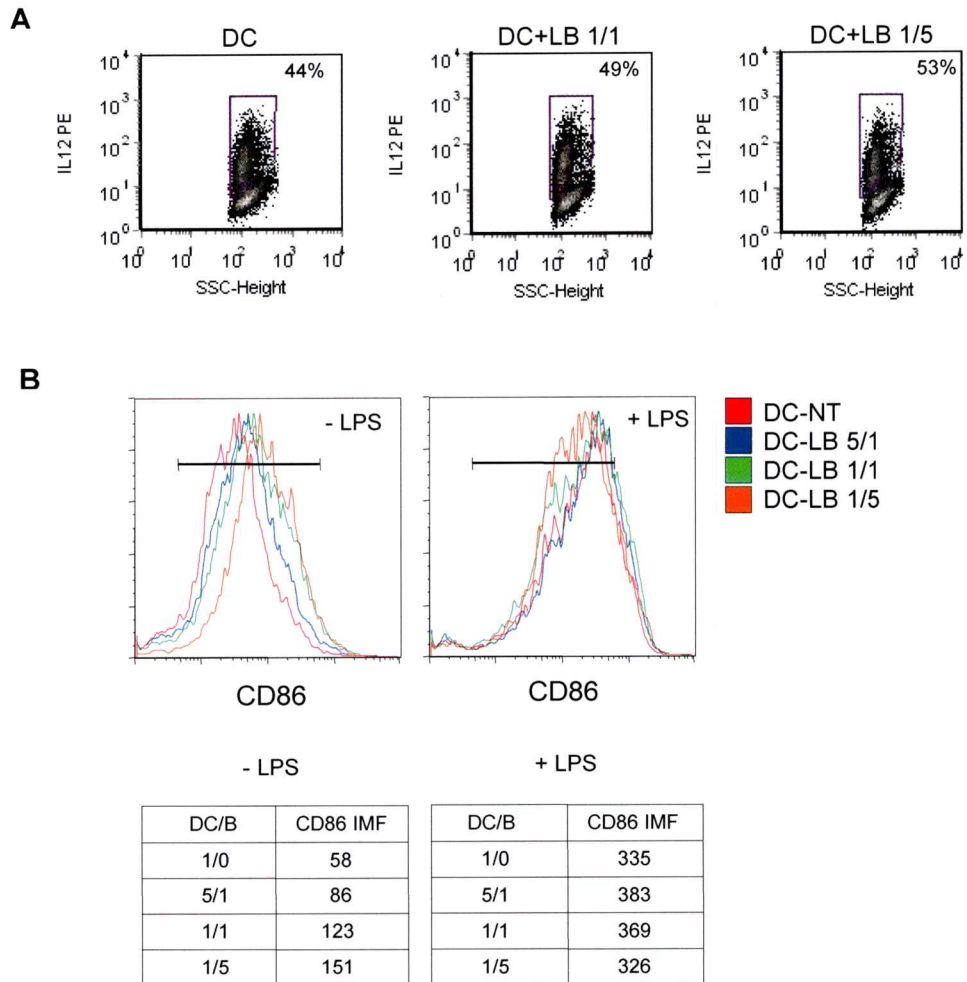


**Figura 8. La inhibición de la vía Notch no afecta la expresión de marcadores de activación ni la producción de citoquinas por las células dendríticas.** Células dendríticas generadas a partir de médula ósea en presencia de DAPT (5  $\mu$ M) o DMSO como control se analizaron por citometría de flujo para detectar la expresión de marcadores de activación (A) y por ELISA para detectar la secreción de citoquinas (B) (n=3). Los datos se analizaron mediante el test de student (no encontrándose diferencias significativas) y se presentan como la media +/- desviación estándar.

## **Evaluación del efecto de linfocitos B y T en la expresión de Jagged y Delta-like por células dendríticas y su efecto en la polarización de la respuesta inmune**

### **Los linfocitos B favorecen levemente las respuestas Th1**

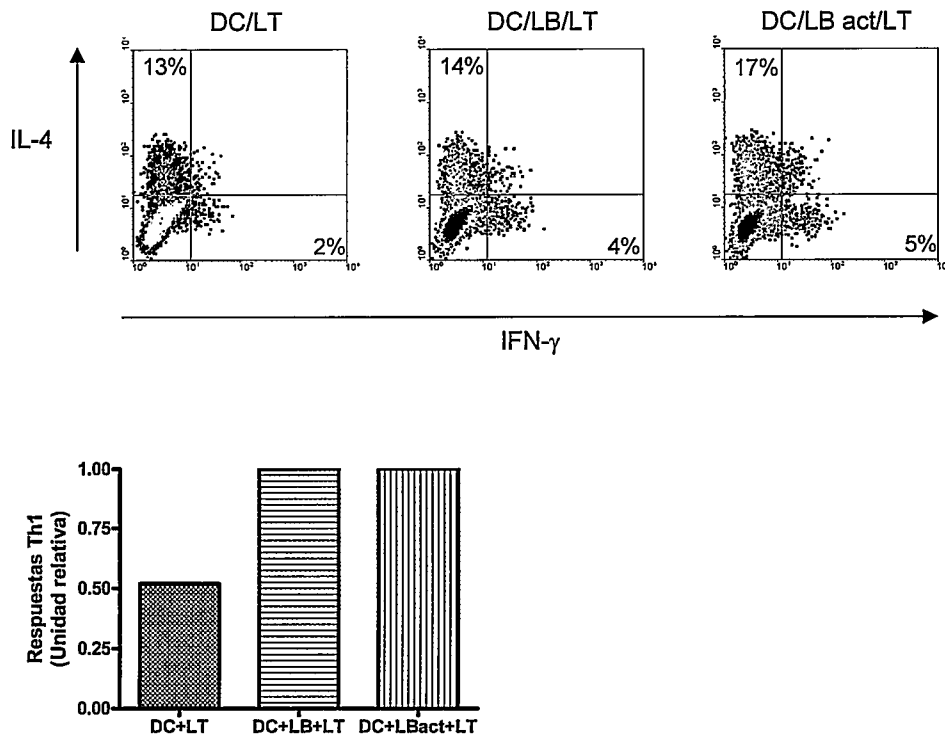
Existen evidencias en la literatura que indican que los LB juegan un rol importante en la generación de respuestas Th2 (Moser and Murphy 2000; Moulin et al. 2000). Estos reportes demuestran que ratones que carecen de LB ( $\mu$ MT) presentan DCs que secretan mayores cantidades IL-12 y por lo tanto favorecen la producción de respuestas Th1. El fenómeno observado en estos ratones, se explicaría por una deficiencia en la producción de IL-10, una citoquina que reduce la producción de IL-12 (Moulin et al. 2000; Bayry et al. 2005). Todo esto sugiere una interacción bi-direccional entre la DC y el LB donde la producción de IL-12 por la DC estaría regulada por el LB. Estos antecedentes nos llevaron a sugerir que los LB podrían favorecer la generación de respuestas Th2 mediante señales que modificarían el fenotipo de la DC y la expresión de los ligandos de Notch. A diferencia de los datos de la literatura, el análisis inicial del papel que juegan los LB en la polarización de la respuesta inmune demostró que sólo ejercen un efecto discreto, favoreciendo un leve aumento en CD86, un marcador de activación y en la producción de IL-12 por las BMDCs luego de un co-cultivo por 24 horas (Figura 9).



**Figura 9. Los linfocitos B aumentan levemente la expresión de CD86 y la producción de IL-12 por las células dendríticas.** El co-cultivo de linfocitos B con células dendríticas induce un leve aumento en la producción de IL-12 (A) y en la expresión de CD86 (B) por células dendríticas. En la tabla se muestran los valores de la intensidad media de fluorescencia para CD86 para cada una de las diferentes proporciones de células dendríticas y linfocitos B estudiadas. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.



Al analizar el efecto directo de los LB en la activación y producción de citoquinas por los LT, demostramos que si bien parecen tener una menor capacidad que las BMDCs en inducir marcadores de activación en los LT, claramente favorecen la producción de IFN- $\gamma$  (dato no mostrado). Por esta razón, se diseñó un experimento de cultivo triple de BMDCs, LB y LT, donde las BMDCs fueron pulsadas previamente con el péptido específico OVA<sub>323-339</sub> de manera de que estas células sean las únicas que actúen como presentadoras de antígeno. De esta forma, se demostró que luego del co-cultivo triple se indujo un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  por los LT, favoreciendo respuestas Th1 (Figura 10). Si bien no se puede descartar que los LB hayan interactuado directamente con los LT como células presentadoras de antígeno, los experimentos de la interacción de la DC con el LB, revelan que los LB tienen un efecto sobre la BMDC favoreciendo la producción de IL-12, citoquina importante en la producción de IFN- $\gamma$  por el LT (Figura 10).



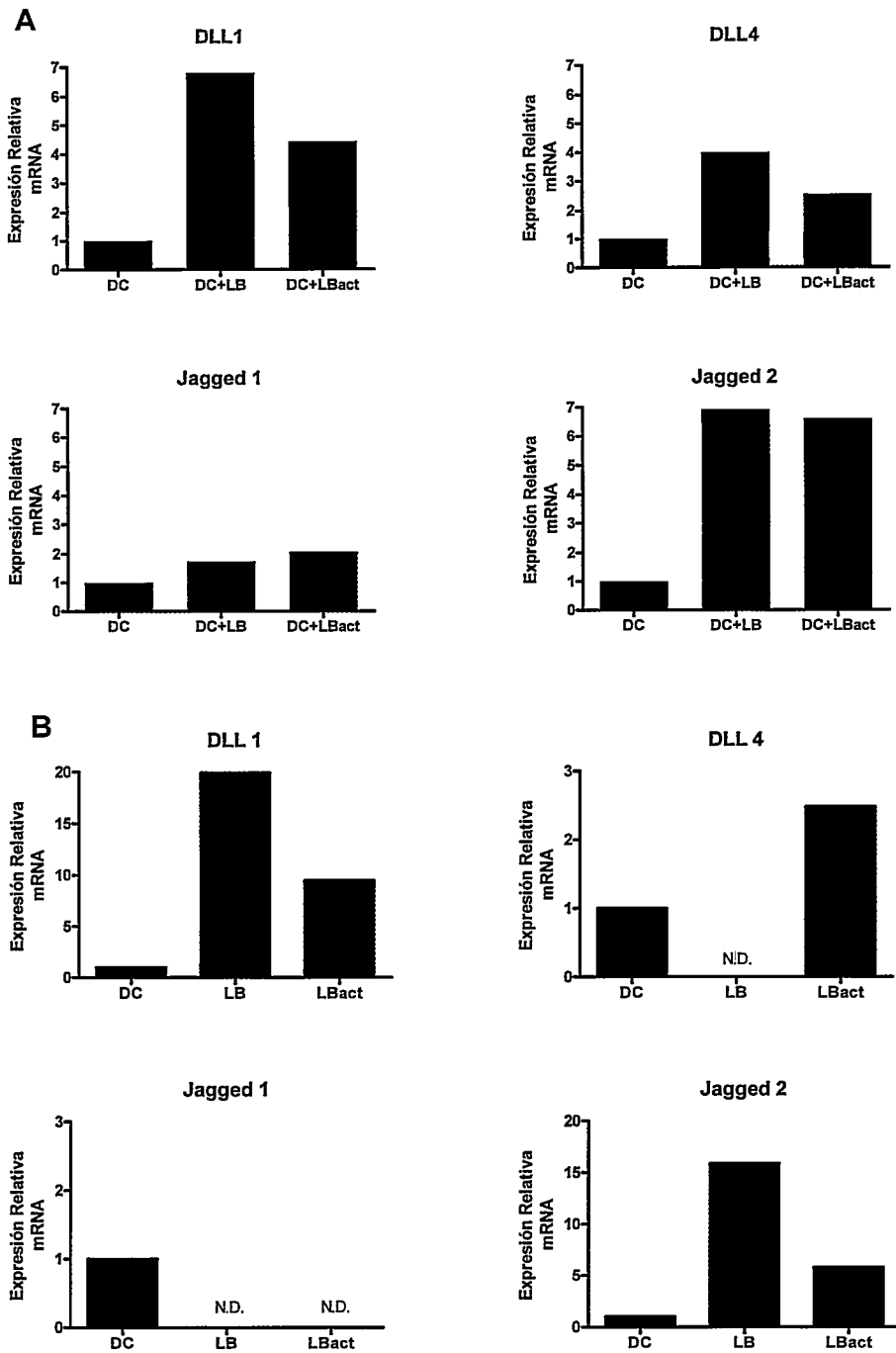
**Figura 10. Los linfocitos B favorecen levemente las respuestas de tipo Th1.** La presencia de linfocitos B durante el co-cultivo de células dendríticas con linfocitos T vírgenes favorece la producción de IFN- $\gamma$  (n=1). Los números al interior de cada gráfico representan los porcentajes de células productoras de IL-4 ó IFN- $\gamma$ .

## **Los linfocitos B inducen la expresión de casi todos los ligandos de Notch en células dendríticas**

Debido al rol que cumplirían los ligandos de Notch en la polarización de la respuesta inmune, se estudió la expresión de los mRNA de estos receptores en BMDCs luego de la interacción con LB. Luego del co-cultivo de BMDCs con LB, las BMDCs se aislaron utilizando separación inmunomagnética. De esta forma, se obtuvo una preparación celular con un 99% de BMDCs basado en la expresión de CD11c (no mostrado). En base a los resultados presentados anteriormente y que sugieren que los LB favorecen respuestas Th1, se esperaba observar un aumento en la expresión de los ligandos de tipo Delta-like en BMDCs tratadas con LB. Sin embargo, al analizar la expresión de los mRNA para los ligandos de Notch en BMDCs, se observa que todos los ligandos excepto Jagged 1 se inducen luego de la interacción con LB (Figura 11). La mayor inducción ocurre para Jagged 2 y DLL1. Cabe destacar que en BMDCs tratadas con LB, la expresión de los ligandos asociados a respuestas Th1 y Th2 como DLL4 y Jagged 2 es bastante semejante.

El análisis de la expresión de los ligandos de Notch en LB no activados, reveló que estas células no presentan niveles basales detectables de los mRNA para DLL4 ni Jagged 1. Sin embargo, en estas condiciones poseen 10 veces más Jagged 2 y DLL1 que las BMDCs. Interesantemente, al activar los LB con LPS, se induce la expresión de DLL4 y se reduce

Jagged 2 de manera semejante a lo que ocurre al activar BMDCs con estímulos Th1.



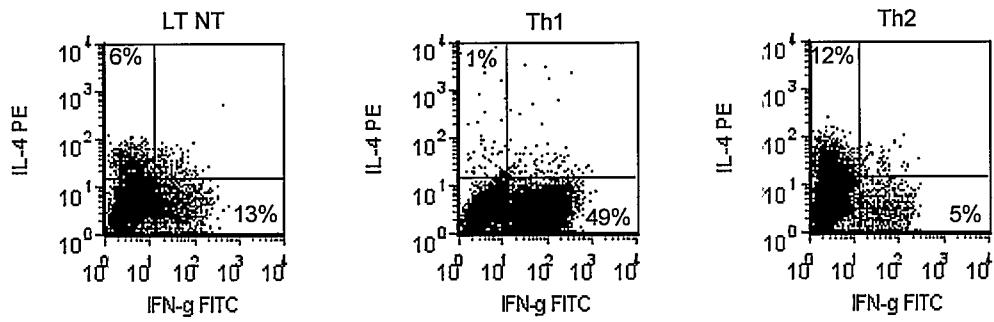
**Figura 11. Los linfocitos B inducen la expresión de todos los ligandos de Notch excepto Jagged 1 en las células dendríticas. (A)** Células dendríticas se cultivaron con linfocitos B por 24 horas, se purificaron y luego se analizó la expresión de los ligandos de Notch por PCR en tiempo real. **(B)** Expresión de los ligandos de Notch en LB activados por 24 horas con LPS (n=1). N.D.= no detectado.

## **Los linfocitos Th1 y Th2 potencian la generación de respuestas Th1 y Th2 respectivamente**

Existen reportes en la literatura que dan cuenta de un papel de los LT CD4+ en la polarización de la respuesta inmune. Se ha demostrado que los LT polarizados son capaces de favorecer el mismo tipo de respuesta en un *feedback* positivo en el cual las DCs actúan como mensajeros entre los LT vírgenes y los efectores (Creusot et al. 2003; Alpan et al. 2004). Estos datos nos permiten sugerir que los linfocitos Th1 y Th2 podrían inducir la expresión de DLL4 y Jagged 2 en DCs respectivamente, de manera de favorecer las respuestas del mismo tipo. De manera de evaluar si los linfocitos Th1 y Th2 modifican la expresión de los ligandos de Notch en las DCs se generaron células polarizadas y posteriormente se evaluó la capacidad de estas células de potenciar el mismo tipo de respuesta.

Para generar linfocitos Th1 y Th2, LT CD4+ purificados inmunomagnéticamente se activaron policlonalmente en presencia de citoquinas y anticuerpos bloqueadores de citoquinas según pequeñas modificaciones a protocolos previamente descritos (Grogan et al. 2001; Minter et al. 2005). Como se observa en la figura 12, este proceso de diferenciación fue exitoso, puesto que se logró obtener una gran proporción de células productoras de IFN- $\gamma$  utilizando el protocolo para la generación de linfocitos Th1 y un número considerable de células productoras de IL-4 en el caso de la diferenciación hacia linfocitos Th2. Sin embargo, en comparación al gran porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$ , por lo general se

obtuvieron porcentajes menores de células productoras de IL-4 en condiciones Th2. Este resultado puede ser explicado por el tipo de ratón transgénico utilizado en este tipo de experimentos (OT-II), el cual posee un *background* genético (C57BL/6) que podría favorecer respuestas Th1.

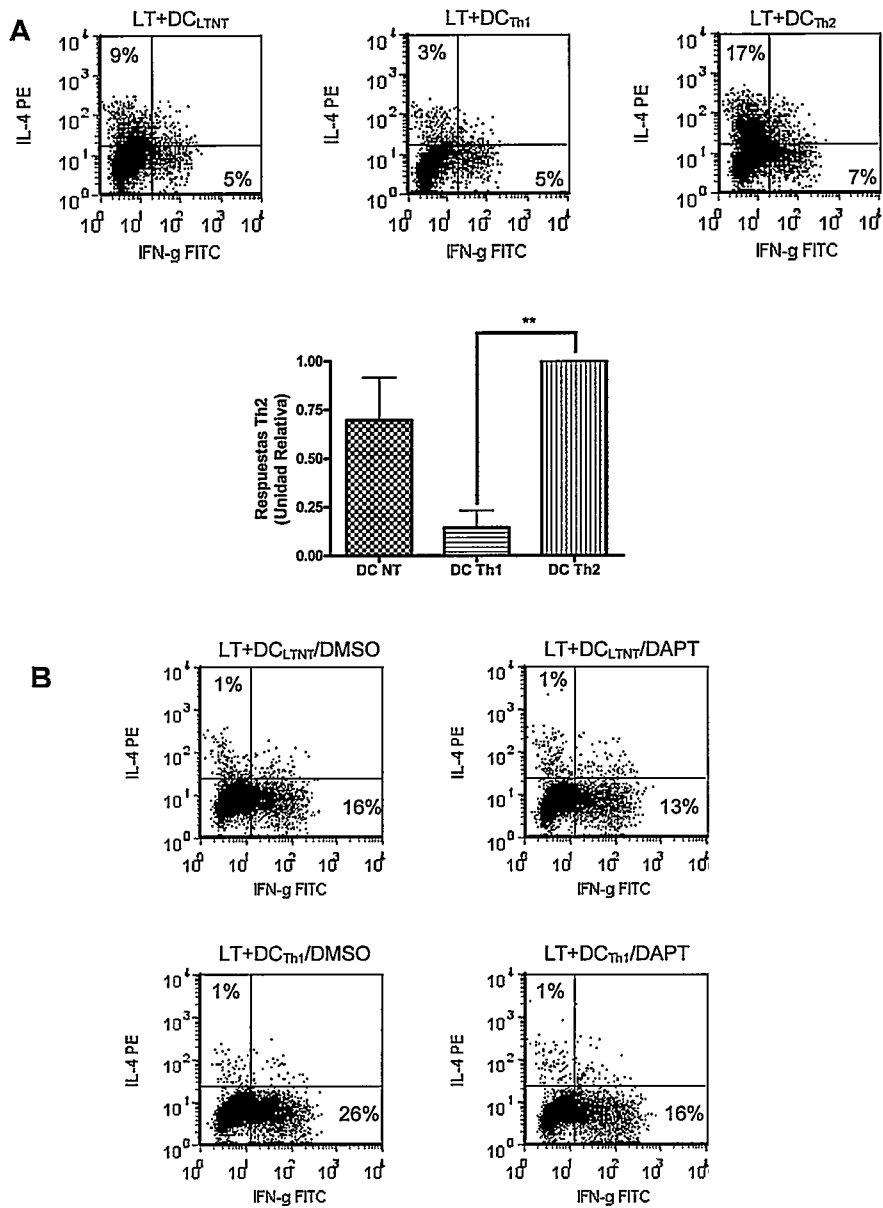


**Figura 12. Generación de linfocitos Th1 y Th2.** Linfocitos T se diferenciaron en células Th1 y Th2 y se verificó su fenotipo en base a la producción de IL-4 e IFN- $\gamma$ . Los números al interior de cada gráfico representan los porcentajes de células productoras de IL-4 e IFN- $\gamma$ . Resultado representativo de 5 experimentos independientes.



Para comprobar la existencia de un *feedback* positivo en las respuestas polarizadas, BMDCs se cultivaron con linfocitos Th1 y Th2, las BMDCs se purificaron y se utilizaron para presentar antígenos a LT vírgenes, luego de lo cual se analizó el fenotipo de los LT generados. Los datos obtenidos demuestran que las BMDCs previamente cultivadas con linfocitos Th1 favorecen la producción de respuestas Th1 en LT vírgenes. De manera contraria, BMDCs que se cultivaron con linfocitos Th2 favorecen respuestas Th2 (Figura 13). Este efecto se debe al acondicionamiento de la DC por el LT helper y no a un efecto directo del LT helper sobre el LT virgen, debido a que el porcentaje de LT helper contaminantes en los co-cultivos de BMDCs con LT vírgenes fue menos de un 1%. El acondicionamiento de la DC por el LT helper podría estar relacionado con la expresión de los ligandos de Notch en la BMDC luego de la interacción con el LT.

Cuando BMDCs acondicionadas con linfocitos Th1 se incubaron con LT vírgenes en presencia de DAPT, se redujo a la mitad el porcentaje de los linfocitos productores de IFN- $\gamma$  al cabo de 5 días de co-cultivo (Figura 13B). Esto sugiere que la vía Notch estaría participando en la generación de respuestas Th1 en estas condiciones.

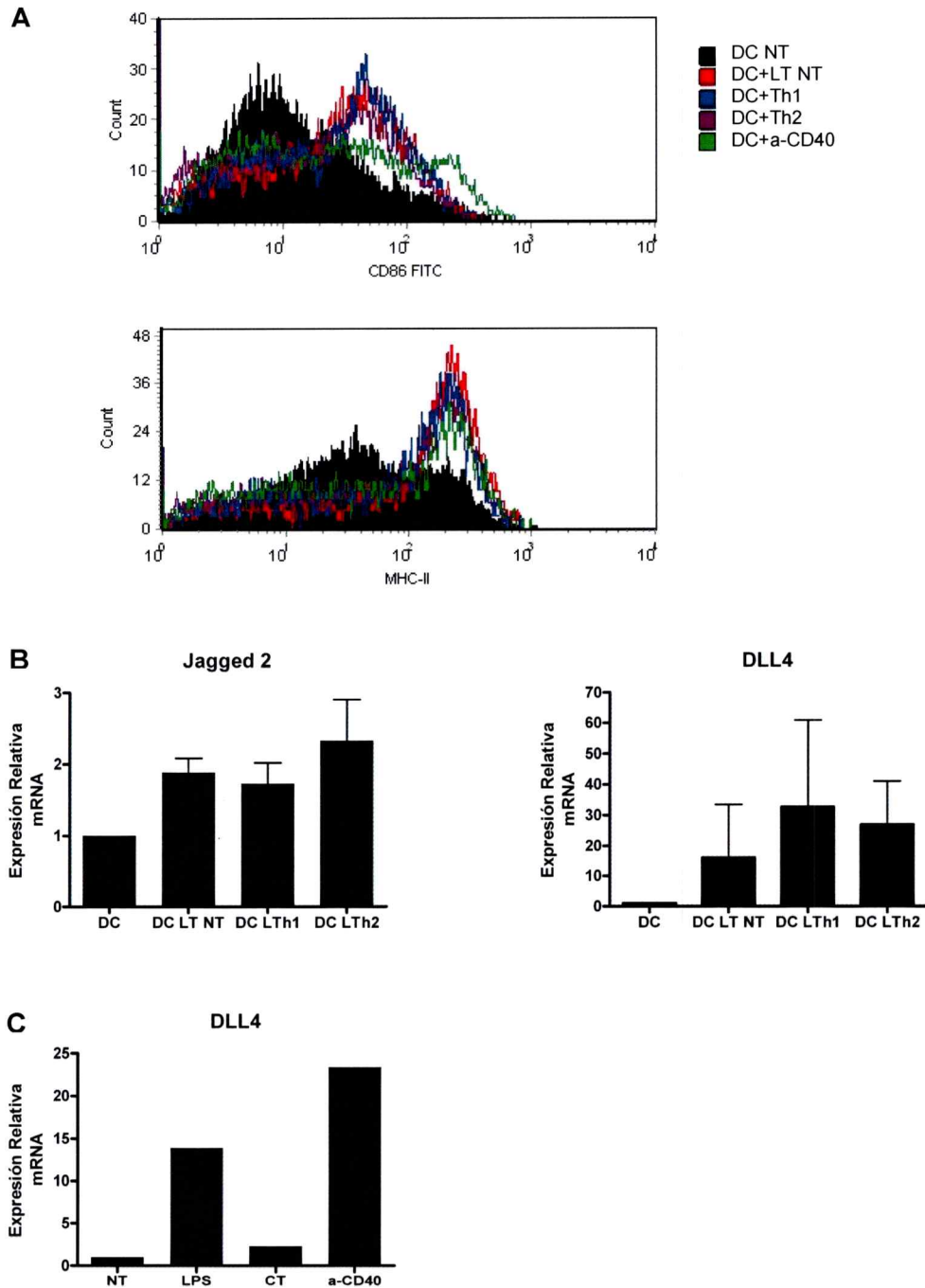


**Figura 13. Células dendríticas precondicionadas con linfocitos Th1 favorecen respuestas Th1 mientras que aquellas precondicionadas con linfocitos Th2 favorecen respuestas Th2. (A)** Linfocitos T diferenciados en Th1 o Th2 se co-cultivaron con células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 por 24 horas. Luego, las células dendríticas se purificaron y cultivaron con linfocitos T vírgenes. En la figura se muestra el porcentaje de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  e IL-4 luego de ser cultivados con las células dendríticas precondicionadas. Los resultados representan 3 experimentos independientes. **(B)** Durante el co-cultivo de células dendríticas precondicionadas con linfocitos T vírgenes se agregó DAPT y la generación de respuestas polarizadas se analizó mediante citometría de flujo (n=1).

## **Los linfocitos T helper aumentan los marcadores de activación en las células dendríticas e inducen la expresión de todos los ligandos de Notch**

Luego del co-cultivo por 24 horas de BMDCs con LT CD4+, ya sea no diferenciado, Th1 ó Th2, se observó un aumento en la expresión de marcadores de activación en las BMDCs, especialmente en el caso de MHC-II y CD86 (Figura 14A). La expresión de MHC-II y de CD86 luego del co-cultivo con LT fue comparable a la expresión de estos marcadores en BMDCs activadas con un anticuerpo anti-CD40 que al activar la señalización a través de CD40 en la DC, imita la interacción con el LT.

Aunque debido a la gran variabilidad entre experimentos no se logró una significancia estadística de los datos, los resultados muestran que BMDCs tratadas con linfocitos Th2 poseen una tendencia a expresar mayores niveles del mRNA de Jagged 2, mientras que aquellas tratadas con linfocitos Th1 expresan mayores niveles de DLL4 (Figura 14B). Sin embargo, los experimentos presentados permiten concluir que luego de la interacción del LT con la BMDC, esta última aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras así como la expresión del ligando de Notch, DLL4. Cuando las BMDCs son incubadas por 6 horas con anti-CD40, se observa una gran inducción de la expresión de DLL4. Por esta razón, probablemente la interacción CD40/CD40L contribuye en gran medida en la expresión de DLL4 en por BMDCs activadas con LT (Figura 14C).



**Figura 14. Los linfocitos T helper inducen marcadores de activación y los ligandos de Notch en células dendríticas.** Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 se cultivaron con linfocitos Th1 o Th2 por 24 horas y se analizó la expresión de CD86, MHC-II (A) y la expresión de Jagged 2 y DLL4 por PCR en tiempo real (B). Los resultados representan 3 experimentos independientes. En (C) se muestran los resultados del PCR en tiempo real de células dendríticas activadas por 6 horas con a-CD40, LPS o toxina del cólera (n=1).

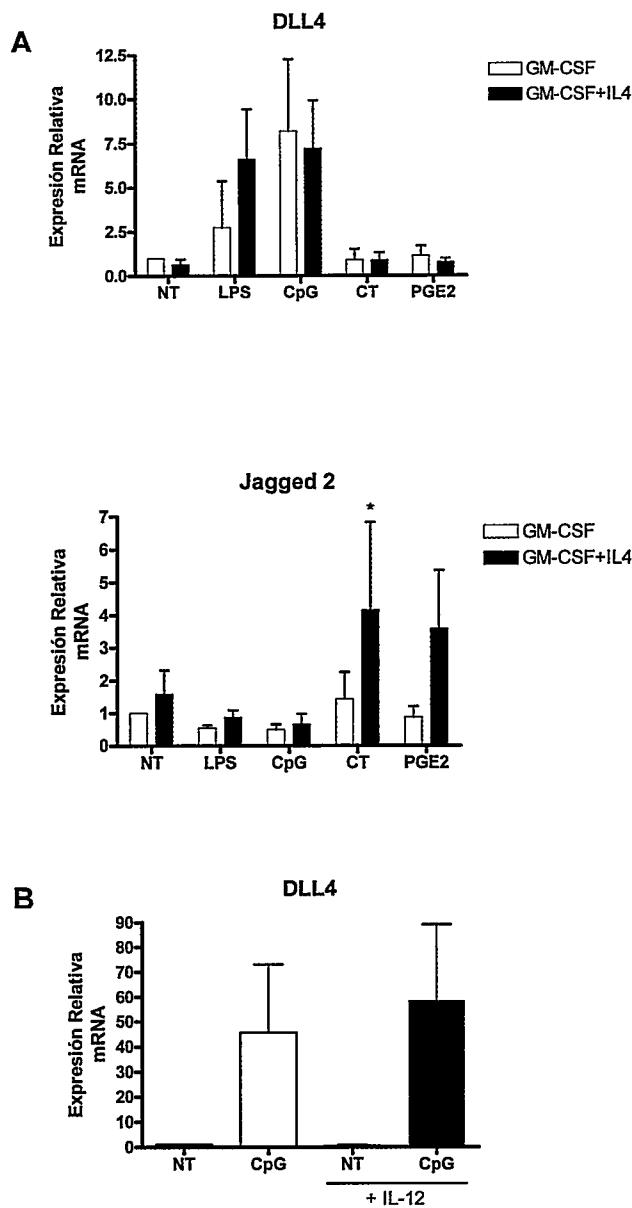
## **Las citoquinas IL-4, IL-12 e IFN- $\gamma$ tienen distintos efectos sobre los ligandos de Notch en las células dendríticas**

Sin duda, durante la interacción de la DC con el linfocito, se secretan citoquinas que podrían modificar el fenotipo de las DCs. Datos anteriores indican que la IL-4 aumenta la expresión de moléculas co-estimuladoras en DCs y favorece la secreción de IL-12 al mismo tiempo que bloquea la secreción de IL-10 (Sauma et al). Por otro lado, se ha descrito que IFN- $\gamma$  es una citoquina que induce la expresión de MHC-II en varios tipos celulares y la producción de IL-12 y marcadores de activación en DCs (Steimle et al. 1994; Vieira et al. 2000; Asselin-Paturel et al. 2005). Por esta razón, se analizó si estas citoquinas también poseen un rol en la regulación de la expresión de los ligandos de Notch. BMDCs diferenciadas y activadas en presencia de IL-4 presentaron mayores niveles de expresión de los mRNA para Jagged 2 cuando fueron activadas con toxina del cólera (Figura 15A). Las BMDCs activadas y diferenciadas en presencia de IL-4 presentaron un aumento en la expresión de DLL4 cuando fueron activadas con LPS, sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

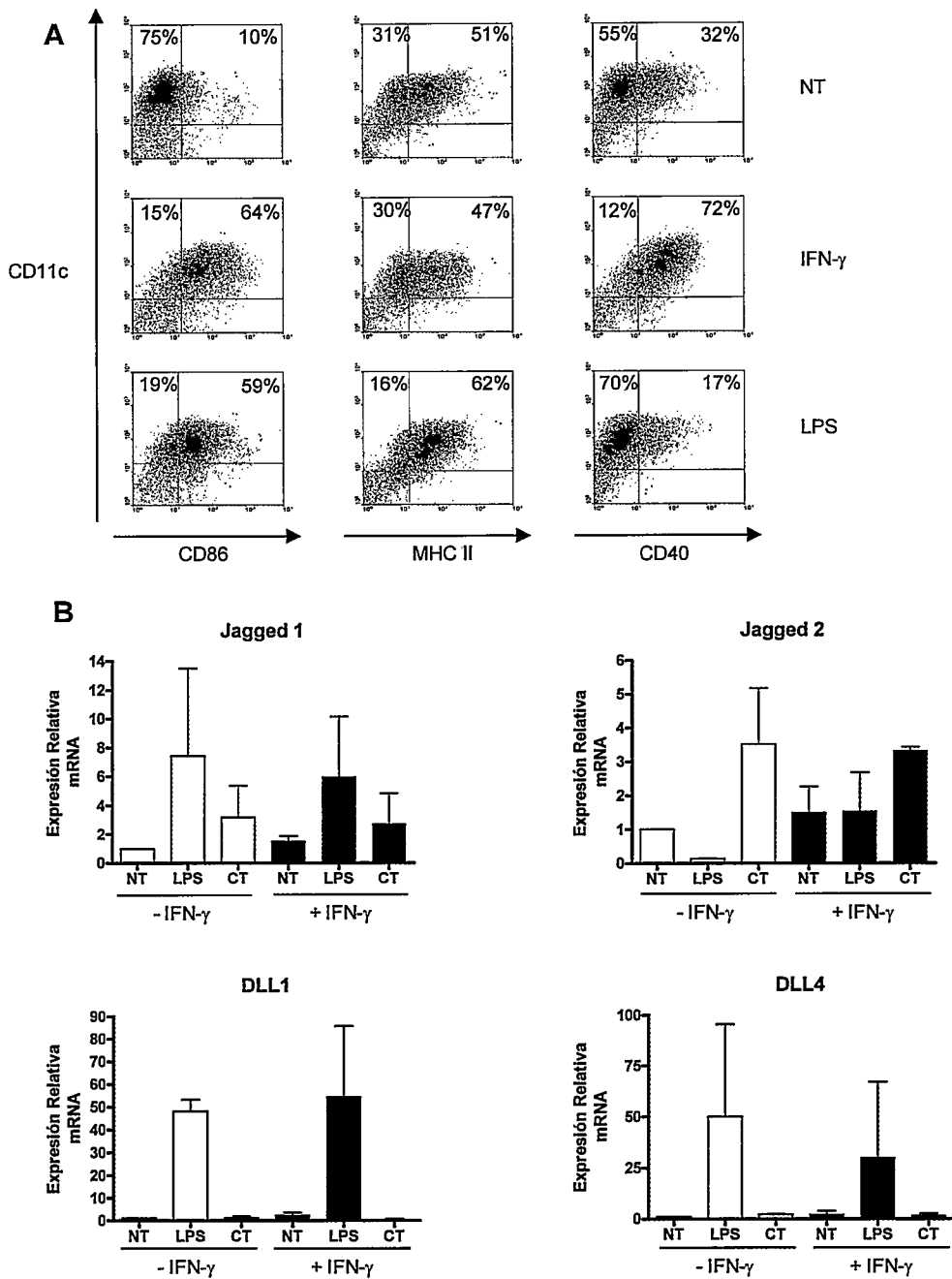
Cuando BMDCs se activaron en presencia de PD98059, un inhibidor de la vía ERK que favorece la producción de IL-12 por estas células (Puig-Kroger et al. 2001), se encontró un aumento en la expresión de DLL4 (dato no mostrado). Este dato en conjunto con los resultados obtenidos con IL-4 sugieren la posibilidad que esta citoquina podría estar ejerciendo su efecto sobre los ligandos de Notch de manera indirecta, es decir, mediante la

producción de IL-12. BMDCs generadas en ausencia de IL-4 fueron activadas en presencia de IL-12 y se analizó la expresión de DLL4. Como se observa en la figura 14B, IL-12 no afecta la expresión de DLL4. Este resultado permite deducir que la inducción de DLL4 por IL-4 no es un efecto mediado por la IL-12.

Por otra parte, la adición de IFN- $\gamma$  indujo la maduración de las BMDCs, lo que se refleja en el aumento en la expresión de CD40, CD86 y MHC-II, aún en ausencia de otros estímulos (Figura 16A). Sin embargo, esta citoquina no indujo un aumento en la expresión de los ligandos de Notch en BMDCs (Figura 16B). A partir de estos experimentos se puede concluir que dentro de las citoquinas estudiadas, sólo IL-4 induce la expresión de Jagged 2.



**Figura 15. Interleuquina-4 induce la expresión de Jagged 2.** (A) Células dendríticas de ratones C57BL/6 se diferenciaron y activaron por 6 horas en presencia y ausencia de IL-4. La expresión de Jagged 2 y DLL4 en estas células se determinó mediante PCR en tiempo real. (B) Expresión de DLL4 en BMDC activadas por 6 horas en presencia de IL-12. Los resultados en (A) se analizaron mediante el test de ANOVA con el post test de Bonferroni y en (B) con el test de student. (Los datos se presentan como la media +/- desviación estándar, \* $p < 0.05$ ).



**Figura 16. IFN- $\gamma$  induce la maduración de las células dendríticas pero no afecta la expresión de los ligandos de Notch.** Células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 se activaron con IFN- $\gamma$  o LPS por 24 horas para ser analizadas por citometría de flujo (A) o por 6 horas para analizar la expresión de los ligandos de Notch por PCR en tiempo real (B). Los números en la figura A representan los porcentajes de células en cada cuadrante. Los resultados representan 2 experimentos independientes.



## DISCUSION

La vía Notch, descrita inicialmente en procesos de diferenciación celular en *Drosophila melanogaster*, ha sido implicada también en etapas cruciales del desarrollo del sistema inmune, como por ejemplo durante la hematopoyesis y linfopoyesis (Maillard et al. 2005), en el desarrollo de LT desde progenitores hematopoyéticos (Pui et al. 1999) y en la selección de las cadenas  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$  del receptor del LT (Tanigaki et al. 2004). Otros datos indican que Notch también juega un rol en múltiples aspectos durante el desarrollo de la respuesta inmune como lo son la activación de los LT (Adler et al. 2003; Eagar et al. 2004) y en la diferenciación de LT CD4+ durante la polarización Th1/Th2 (Maekawa et al. 2003; Amsen et al. 2004; Tu et al. 2005; Fang et al. 2007). Estudios recientes sugieren que la expresión de los ligandos de Notch en DCs estaría regulada por estímulos inductores de respuestas Th1 y Th2 (Amsen et al. 2004), lo cual abre la posibilidad que estos ligandos cumplan un rol importante en la polarización de la respuesta inmune.

La correcta polarización de la respuesta inmune es un proceso esencial en la erradicación de los patógenos. En este proceso, las citoquinas como IL-12 e IL-4 cumplen una función importante permitiendo el desarrollo de linfocitos Th1 y Th2 respectivamente (Hsieh et al. 1992; Ho and Glimcher 2002). Aún cuando estas citoquinas poseen un rol determinante en la generación de respuestas Th1 y Th2, algunas evidencias indican que existen mecanismos independientes de estas citoquinas en la generación de

respuestas polarizadas (Noben-Trauth et al. 1997; Finkelman et al. 2000; Jankovic et al. 2002) .

Las DCs son las células encargadas de integrar y decodificar las señales provenientes del patógeno, del tejido dañado y de otras células del sistema inmune de manera de favorecer el desarrollo de la respuesta inmune más efectiva (Kalinski et al. 1999; Kapsenberg 2003; Kalinski and Moser 2005). Se ha descrito un papel de los LB en la generación de respuestas Th2 (Moulin et al. 2000; Amedei et al. 2001) mientras que linfocitos citotóxicos como LT CD8+ y las células NK favorecerían respuestas Th1 (Gurunathan et al. 2000; Mailliard et al, 2002; Mailliard et al. 2003; Martin-Fontecha et al. 2004). Finalmente, se ha descrito que mediante la interacción con la DC, los linfocitos Th1 y Th2 favorecerían la expansión de linfocitos con el mismo fenotipo (Creusot et al. 2003; Alpan et al. 2004).

En base a estos antecedentes, planteamos que los LB y LT podrían afectar la polarización Th1/Th2 mediante la modulación de la expresión de los ligandos de Notch en DCs.

### **Estudio de los componentes de la vía Notch en células del sistema inmune**

La primera parte de este trabajo se centró en el estudio de la vía Notch en el sistema inmune. El estudio de la expresión de los ligandos a nivel de proteína ha sido dificultado por la falta de anticuerpos específicos contra cada ligando. De hecho, el análisis de varios anticuerpos comerciales

demonstró que éstos no podrían ser utilizados para experimentos de citometría de flujo debido a que reconocían otras proteínas inespecíficamente. A pesar de no poder confirmar la expresión de los ligandos de Notch a nivel de proteína en DCs, mediante el análisis de los RNA mensajeros, demostramos que las DCs expresan la mayoría de los ligandos a nivel basal y que esta expresión es inducida bajo estímulos que normalmente provocan la activación de las DCs. Además determinamos que los estímulos que promueven respuestas Th1 inducen la expresión de DLL4 y DLL1 mientras que estímulos que promueven respuestas Th2 inducen la expresión de Jagged 2 en DCs derivadas de médula ósea (Figuras 2 y 3). Esto sugiere un papel de los ligandos de Notch en la generación de respuestas polarizadas. A diferencia de Jagged 2 que se induce bajo estímulos Th2 solamente, Jagged 1 se induce con ambos tipos de estímulos por lo cual no puede ser fácilmente asociado a algún tipo de respuesta.

La función de Notch y sus ligandos en la activación del LT y polarización de la respuesta inmune, requiere necesariamente que Notch esté presente en la superficie del linfocito al menos durante la interacción con la DC. Salvo un trabajo donde la expresión de Notch 1 en LT CD4+ es visible sólo luego de la activación policlinal (Palaga et al. 2003), la mayoría de los estudios indican que la proteína Notch 1 en LT puede ser visualizada incluso antes de la activación del linfocito (Benson et al. 2005; Rutz et al. 2005; Luty et al. 2007). En contraste con los datos de la literatura, en este trabajo no logramos detectar la proteína en la superficie celular de LT CD4+ no activados, a pesar de contar con un buen anticuerpo contra Notch 1

(Figura 4). Esta discrepancia con respecto a los resultados obtenidos a través del estudio de la proteína por western blot puede ser explicada por la utilización de diferentes anticuerpos anti-Notch 1 o quizás reflejen dos localizaciones distintas de la proteína; una intracelular y otra asociada a la membrana.

Aún cuando demostramos que las DCs expresan los ligandos de Notch, al menos a nivel de mRNA, éstas no fueron capaces de inducir la expresión de Notch 1 en LT CD4+. Más aún, la activación policlonal tampoco logró inducir la expresión de este receptor en LT (Figura 4). Se requieren estudios posteriores para descartar que Notch 1 tenga una cinética de expresión muy temprana y/o transitoria durante la activación.

El timo es un órgano linfoide primario donde se espera la presencia de células comprometidas en el linaje de LT, y por lo tanto se espera que posean una vía Notch activa (Pui et al. 1999; Anderson et al. 2001). De acuerdo con lo anterior, demostramos que timocitos doble positivos CD4+CD8+ presentan una alta expresión de Notch 1 (Figura 4). De manera complementaria, al estudiar la expresión de Notch 1 en LB, determinamos que estas células no presentan este receptor (dato no mostrado). Este resultado no sólo confirma la efectividad del anticuerpo anti-Notch 1 utilizado sino que además refuerza la idea del timo como un lugar donde están ocurriendo fenómenos asociados con la vía Notch.

Al estudiar la expresión de Notch 1 en los linfocitos maduros en circulación, en particular en el bazo, descubrimos que sólo los LT CD8+ presentaron este receptor (Figura 4). Debido a la diferencia en la expresión

de Notch 1 en los LT CD4+ y CD8+, los datos presentados apoyan la idea que Notch 1 podría estar involucrado en el proceso de selección del coreceptor CD4 y CD8 durante la maduración del LT (Robey et al. 1996; Fowlkes and Robey 2002). Es posible especular que los LT CD8+, a diferencia de los LT CD4+, se generan mediante una constante activación de la vía Notch en el timo.

El hecho que los LT CD8+ presenten Notch de manera constitutiva da cuenta de un inesperado posible rol de Notch en estos linfocitos. Al bloquear la vía Notch en LT CD8+ activados con DCs mediante la utilización del inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa o el anticuerpo bloqueador anti-Notch 1, demostramos que esta vía está implicada al menos en la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos. Sin embargo, cuando los LT CD8+ fueron activados policlonalmente en presencia del inhibidor de la vía Notch, no observamos diferencias en la producción de citoquinas ni en la proliferación (Figura 5 y 6). Esto sugiere que durante la interacción con la DC, el LT CD8+ recibe las señales a través de Notch 1 que le permiten proliferar y secretar IFN- $\gamma$ .

Los datos utilizando el anticuerpo bloqueador anti-Notch 1 confirman que este receptor no está presente o no tiene participación en la producción de citoquinas ni en la proliferación de los LT CD4+. Sin embargo, los resultados utilizando el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa indican que la vía Notch está implicada en la producción de IFN- $\gamma$  por estas células (Figura 5). Este resultado apoya la participación de los componentes de la vía Notch en la generación de respuestas Th1. Por otra parte, las diferencias observadas en

cuanto a la producción de IFN- $\gamma$  en LT CD4+ tratados con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa versus aquellos tratados con el anticuerpo anti-Notch 1 sugieren que los LT CD4+ presentan otros receptores Notch, que son susceptibles al inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa pero que no son bloqueados con el anticuerpo anti-Notch 1. Sin duda se requiere de estudios posteriores que verifiquen la expresión de otros receptores Notch, como Notch 2, 3 y 4 en los LT CD4+.

Debido a que demostramos que un porcentaje de DCs también presenta Notch 1 (Figura 7), no se puede descartar que el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa afecte de alguna forma la funcionalidad de la DC durante los cultivos con LT CD8+. Sin embargo, el análisis de la producción de citoquinas y expresión de moléculas co-estimuladoras en DCs tratadas con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa demostró que el bloqueo de la vía Notch no tiene efecto en estos aspectos en la DC (Figura 8).

Se postula que Notch y sus ligandos se encuentran tanto en células presentadoras como en LT. Recientemente se ha demostrado que en el LT Notch 1 se localiza en la zona central de la sinápsis inmunológica durante la interacción con la DC mientras que en la DC, Notch 1 se localiza en zonas más periféricas de la sinápsis (Luty et al. 2007). Esto indica que durante la formación de la sinápsis inmunológica, existe una conversación cruzada entre las DCs y los LT a través de la vía Notch. Este reporte además demuestra que la vía Notch puede ser activada en la DC mediante la interacción con sus ligandos expresados en el LT.

La vía STAT3 ha sido descrita como clave en la transducción de señales inducida por la familia de citoquinas de IL-6 e IL-10 entre otras

(Schindler et al. 2007) y además posee un papel importante en la inducción de señales de sobrevida en el LT (Takeda et al. 1998; Atreya et al. 2000). Recientemente se ha demostrado una convergencia de la vía STAT3 con la vía Notch, en donde Hes interactúa con STAT3 induciendo su fosforilación y activación (Kamakura et al. 2004). Por otra parte, se ha demostrado que luego de la interacción de la DC con el LT, existe un aumento en la forma fosforilada de STAT3 en la DC (Luty et al. 2007). Todos estos antecedentes sugieren que Notch favorecería la sobrevida de la DC durante la sinápsis inmunológica mediante la activación de la vía STAT3 en DCs. Teniendo en cuenta estos antecedentes, podríamos especular que la presencia del inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa durante los co-cultivos entre DCs y LT CD8+ realizados en el presente trabajo, no sólo afectaría al LT sino que además podría afectar la sobrevida de la DC (Figura 5 y 6). Se sabe que se requiere de un largo contacto e intercambio de señales de activación durante la interacción DC/LT para inducir una apropiada activación del LT (Huppa and Davis 2003). Una acelerada muerte programada de las DCs y por lo tanto una ineficiente sinápsis inmunológica podría explicar el retraso en la proliferación y producción de citoquinas por los LT CD8+ activados con DCs en presencia del inhibidor de la vía Notch.

El análisis de PCR en tiempo real de la expresión de Notch 1 en DCs derivadas de médula ósea demostró que estas células expresan niveles basales de este receptor. Luego de la activación de las DCs, ya sea con LPS o toxina del cólera, se observa un aumento en la expresión de Hes 1, un blanco de Notch, lo cual indicaría que esta vía está siendo activada en DCs

(Figura 7). Esto sugiere que la vía Notch en DCs está siendo activada en ausencia de una interacción de Notch con sus ligandos. Esto podría deberse a una interacción entre la vía Notch y NF- $\kappa$ B, en donde la activación de una de estas vías favorece la activación de la otra (Osborne and Minter 2007).

### **Papel de la IL-4 en la expresión de Notch y sus ligandos en las células dendríticas**

La IL-4 es una citoquina clave en la generación de linfocitos Th2, sin embargo, se ha descrito que en las DCs, esta citoquina favorece la expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de IL-12 (Dillon et al. 1997; Sauma et al. 2004). Los datos aquí presentados muestran que la presencia de IL-4 durante la diferenciación y activación de las DCs reduce tanto la expresión de los mRNA de Notch 1 como de Hes 1 (Figura 7). Al mismo tiempo, IL-4 aumentó la expresión de Jagged 2 en DCs (Figura 15). Esto permite sugerir que existe un balance en la expresión de Notch y sus ligandos dentro de una misma célula, donde un receptor como Notch inhibe la expresión de sus ligandos, fenómeno ya descrito en otros modelos como *Caenorhabditis elegans* (Wilkinson et al. 1994; Lai 2004).

A pesar de los resultados anteriores, no logramos detectar Notch 1 por citometría de flujo en DCs derivadas de médula ósea. Sin embargo en bazo se detectó cerca de un 20% de DCs que expresan este receptor en su superficie (Figura 7). Este resultado concuerda parcialmente con un reporte que indica que todas las DCs de bazo expresan Notch1 en su superficie



(Asano et al. 2008). Las diferencias encontradas pueden deberse a la utilización de anticuerpos diferentes contra Notch. Sin duda queda por dilucidar si la expresión de Notch 1 está restringida a un subtipo de DC y de ser así, sería interesante determinar la función que cumpliría este receptor en esa subpoblación.

De acuerdo con el posible rol de IL-4 en la expresión de Notch, DCs derivadas de ratones que no presentan la cadena  $\alpha$  del receptor para IL-4, presentan un leve aumento en la expresión de Notch (Figura 7). Uno podría suponer que IL-4 podría tener un rol contrario en el LT, aumentando la expresión de Notch. Sin embargo, al estudiar el efecto de IL-4 sobre el LT, se determinó que esta citoquina no induce la expresión de Notch en estas células (datos no mostrados).

### **Los linfocitos B y la polarización de la respuesta inmune**

Se postula que los LB podrían afectar la polarización de la respuesta inmune al favorecer el desarrollo de respuestas tipo Th2 (Moulin et al. 2000; Bayry et al. 2005). Sin embargo, los resultados aquí presentados demuestran que los LB ejercen un efecto muy discreto en la polarización de la respuesta inmune, favoreciendo levemente la producción de IFN- $\gamma$  por los LT. Este resultado concuerda con nuestros experimentos que indican que los LB inducen ligeramente la producción de IL-12 por la DC, citoquina importante en la producción de IFN- $\gamma$  por el LT (Figuras 9 y datos no mostrados).

De manera de analizar el efecto de LB directamente sobre los LT, realizamos co-cultivos de LT vírgenes con LB como células presentadoras de antígeno en presencia del péptido específico. De esta forma, se obtuvieron niveles menores de activación en los LT en comparación a los niveles obtenidos al utilizar DCs. Esto podría ser explicado por los menores niveles de expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 con respecto a las DCs (datos no mostrados). Esto concuerda con los conocidos atributos de las DCs (en comparación con otras células presentadoras de antígenos menos eficientes), que han permitido clasificarlas como las células presentadoras de antígenos profesionales (Banchereau and Steinman 1998). Al analizar la producción de IL-4 e IFN- $\gamma$  obtenidos luego del co-cultivo de LB con LT, se obtuvieron mayores niveles de células productoras de IFN- $\gamma$  que al utilizar DCs como células presentadoras. Esto demuestra que los LB directamente y sin mediar las DCs, favorecen la producción de respuestas Th1. Sin duda es posible esperar que la respuesta sea totalmente diferente en condiciones más fisiológicas donde el LB debe reconocer el antígeno a través de su BCR (Receptor del linfocito B), endocitar la partícula, procesarla y luego presentarla en el contexto de moléculas MHC, funciones que no cumple eficientemente el LB. Sin embargo, fisiológicamente puede ocurrir que la DC transfiera directamente el péptido antigénico a LB vecinos en el lugar de activación y que de esta manera los LB determinen el tipo de respuesta inmune que se produce.

De manera de corroborar el resultado anterior, diseñamos un experimento de cultivo triple en donde la activación del LT virgen por la DC

previamente pulsada con el péptido específico, ocurre en presencia del LB. Al realizar estos experimentos, se obtuvieron mayores niveles de producción de IFN- $\gamma$  por los LT al cabo de 5 días en comparación con los co-cultivos realizados en ausencia de LB (Figura 10). Este resultado confirmó los resultados anteriores que indican que los LB favorecen la generación de respuestas Th1. Si bien no se puede descartar que los LB hayan actuado como células presentadoras de antígeno, favoreciendo directamente la producción de IFN- $\gamma$  por los LT, nuestros resultados sugieren también un efecto del LB sobre la DC, al inducir levemente la expresión de CD86 y la producción de IL-12 por éstas.

Al analizar el efecto de los LB sobre la expresión de los ligandos de Notch en DCs a nivel de mRNA, demostramos que los linfocitos provocaron un aumento moderado de la expresión de todos los ligandos de Notch siendo mayor en el caso de DLL1 y Jagged 2 (Figura 11). La inducción de los ligandos de Notch en DCs tratadas con LB no se debe a contaminación de LB en las preparaciones de DCs, puesto que sólo se detectó un porcentaje marginal de células CD19+ en las preparaciones luego de la purificación. De todas formas, demostramos que luego de la interacción de la DC con el LB o el LT, el balance de la expresión DLL4 y Jagged 2 en DCs es diferente. En el caso de la interacción de la DC con el LB, predomina la inducción de Jagged 2 (que se induce casi 2 veces más que DLL4) mientras que luego de la interacción con el LT, predomina la inducción de DLL4 (donde el aumento en la expresión de DLL4 fue alrededor de 10 veces mayor que el de Jagged 2, figura 14).

Si consideramos que los LB son células presentadoras de antígeno, resulta interesante estudiar la expresión de los ligandos de Notch en estas células. Nuestros resultados demostraron que en comparación con las DCs sin activar, los LB expresan mayores niveles del mRNA para Jagged 2 y no presentan niveles detectables del mRNA de DLL4. Interesantemente, al activar los LB con LPS, se induce la expresión de DLL4 y se reduce Jagged 2 (Figura 11) de manera semejante a lo que ocurre al activar BMDCs con estímulos Th1, lo cual sugiere que la inducción diferencial de los ligandos de Notch es un mecanismo generalizado entre las células presentadoras de antígeno.

#### **Los linfocitos T CD4+ en la polarización de la respuesta inmune**

En acuerdo con otros estudios anteriores (Creusot et al. 2003; Alpan et al. 2004), en este trabajo demostramos que el cultivo de DCs con células Th1 generó DCs con mayor capacidad de inducir linfocitos Th1. Por el contrario, el cultivo de células Th2 con DCs, indujo DCs con mayor capacidad de generar respuestas Th2 (Figura 13). Si se considera que DLL4 está involucrado en las respuestas Th1 y Jagged 2 en las respuestas Th2, es de esperar que las DCs cultivadas con linfocitos Th1 y Th2 presenten una mayor expresión de DLL4 y Jagged 2 respectivamente. El cultivo de DCs con todos los tipos de linfocitos T CD4+ estudiados (ya sea LT no diferenciados, Th1 ó Th2) indujo en DCs la expresión de DLL4. Si bien se encontró una tendencia en donde la mayor inducción de DLL4 ocurre en

DCs tratadas con linfocitos Th1, esta diferencia no logró ser estadísticamente significativa. Por otra parte, la expresión de Jagged 2 en DCs luego del cultivo con LT se indujo sólo hasta 2 veces y de manera similar, independientemente del tipo LT (Figura 14).

A diferencia de lo que ocurrió luego de la interacción con el LB, todos los subtipos de LT CD4<sup>+</sup> (LT no diferenciado, Th1 y Th2) indujeron altos niveles de DLL4 en la DC y una inducción muy pequeña para Jagged 2. Esto podría deberse a las diferencias en la expresión de CD40L por LT y LB. Los LT expresan CD40L de manera constitutiva, lo cual les permite entregar ayuda a los LB para la producción de anticuerpos. Por otra parte, los LB y otras células presentadoras de antígeno presentan CD40, el receptor de CD40L (Grewal and Flavell 1998). Más aún, en experimentos de activación de DCs con un anticuerpo anti-CD40, el cual imita la interacción de CD40 con CD40L, se observa una inducción de DLL4, a niveles comparables con los niveles obtenidos luego de la interacción con LT (Figura 14). Esto sugiere que el aumento de DLL4 en DCs luego de la interacción con LT, se debe al menos en gran parte a la interacción CD40/CD40L observada durante el contacto entre estas células.

Los resultados presentados indican que DLL4 se induce en DCs luego de la interacción con el LT de manera similar a como ocurre cuando las DCs son activadas con un anticuerpo anti-CD40. Además, al igual que otras moléculas de co-estimulación como CD80, CD86 y CD40, DLL4 se induce luego de la activación de la DC con LPS y CpG y no así cuando las DCs son activadas con toxina del cólera o PGE2. Más aún, datos de la literatura

afirman que la activación de la vía Notch mediante la utilización de DLL4 soluble potencia la activación y proliferación de LT activados policlonalmente, a diferencia de los otros ligandos de Notch como DLL1, Jagged 1 y Jagged 2 que reducen la proliferación y el nivel de activación de los LT (Rutz et al. 2005). Todos estos datos demuestran que DLL4 se comporta mejor como molécula de co-estimulación que como molécula involucrada en la polarización de la respuesta inmune. Sin duda, antes de afirmar que DLL4 es una molécula de co-estimulación, se requiere de posteriores experimentos que confirmen la expresión de DLL4 a nivel de proteína en la superficie de las DCs. A diferencia de DLL4, el mRNA de Jagged 2 en DCs no se induce en gran medida luego de la interacción con todos los subtipos de LT, sino que sólo se induce bajo estímulos de tipo Th2 (Figura 14), por lo cual sigue siendo un buen candidato para ser una molécula involucrada en la polarización de la respuesta inmune.

### **Papel de citoquinas en la expresión de los ligandos de Notch**

Debido a la importancia de las citoquinas en la polarización de la respuesta inmune, estudiamos si éstas podrían modificar la expresión de Jagged 2 y DLL4 en DCs. Si bien IL-4 ha sido descrita como una citoquina importante en la polarización Th2, al inducir GATA-3 en LT (Murphy and Reiner 2002), existen reportes en la literatura y datos generados en nuestro laboratorio en experimentos realizados *in vitro* que indican que IL-4 ejerce un efecto contrario sobre la DC, al favorecer la producción de IL-12, citoquina

fundamental en la inducción de respuestas Th1 (Hochrein et al. 2000). Sin embargo, la producción de IL-12 por las DCs se ve limitada a los casos donde las células han sido activadas con estímulos Th1 como LPS o CpG. Estímulos como PGE2 o toxina del cólera no inducen la producción de IL-12 por las DCs. Más aún, cuando las DCs son activadas con LPS u otros factores solubles en presencia de toxina del cólera o PGE2, se produce una reducción en la producción de IL-12 y un aumento en la producción de IL-10 por las DCs (datos no mostrados) (Braun et al. 1999).

Jagged 2 se induce en DCs sólo cuando éstas han sido activadas con estímulos Th2. En estos casos, la adición de IL-4 durante la diferenciación y activación de las DCs potenció la expresión de esta molécula. Por otra parte, la activación de la DC con un estímulo Th1 indujo la expresión de DLL4, aunque la expresión de este ligando de Notch no se vio afectado por la presencia de IL-4 (Figura 15). Esto sugiere que la IL-4, como citoquina Th2, potencia la expresión de los ligandos de Notch involucrados a su vez en respuestas Th2. En base a estos datos, se puede sugerir un rol importante de la IL-4 en la flexibilidad de la respuesta inmune, al potenciar respuestas Th2 cuando la DC está expuesta a estímulos Th2 y al permitir una mayor producción de IL-12 cuando la DC ha sido expuesta a un patógeno intracelular durante el transcurso de una respuesta Th2. Esta estrategia le permitiría al sistema inmune contrarrestar una respuesta Th2 en ejecución cuando se requiere de una respuesta Th1 posterior.

Otra citoquina importante en la polarización de la respuesta inmune es IFN- $\gamma$ , la cual es clave en respuestas Th1 puesto que induce la expresión de

la cadena  $\beta 2$  del receptor para IL-12 en LT y favorece la producción de IL-12 por macrófagos (Szabo et al. 1997; Murphy and Reiner 2002; Trinchieri 2003). Nuestros datos indican que si bien IFN- $\gamma$  indujo la expresión de varios marcadores de activación en DCs como CD86, CD40 y MHC-II, la presencia de IFN- $\gamma$  durante la activación de la DC en presencia un estímulo Th1 como el LPS, no provocó un aumento en la expresión de DLL4 (Figura 16). Esto demuestra que IFN- $\gamma$  no ejerce efecto sobre la expresión de los ligandos de Notch en DCs.

Cuando las DCs se activaron en presencia de PD98059, un inhibidor de la vía ERK que favorece la producción de IL-12 (Puig-Kroger et al. 2001), se encontró un aumento en la expresión de DLL4 (dato no mostrado). Además, la inducción de DLL4 ocurre precisamente en los casos donde hay un aumento en la producción de IL-12 por la DC, como lo es cuando son activadas con LPS o CpG. Estos datos sugieren la posibilidad que la IL-12, a través de un efecto autocrino podría estar induciendo la expresión de DLL4. Sin embargo, al analizar la expresión de DLL4 en presencia de IL-12, se demostró que esta citoquina no afecta la expresión de este ligando de Notch (Figura 15), por lo cual se puede concluir que la IL-12 no está involucrada en la inducción de DLL4 en DCs.

En resumen, a pesar del controversial papel de la vía Notch en la polarización de la respuesta inmune, este trabajo demostró una nueva participación de Notch 1 en la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  por los LT CD8+. Sin duda, este descubrimiento abre una nueva interrogante sobre la posibilidad que Notch 1 esté involucrado en el proceso de selección del



correceptor CD8 y en otras funciones asociadas a los LT CD8+, como lo es la citotoxicidad. Asimismo, demostramos la expresión de Notch 1 en una población de células dendríticas, pero queda aún por dilucidar cuál subpoblación es la que expresa este receptor y el rol que tendría en estas células.

En este trabajo además descartamos un rol de Notch 1 en la polarización de la respuesta inmune, debido a que este receptor no se expresa en los LT CD4+. Sin embargo, la inhibición de la vía Notch utilizando un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa demostró la participación de otros receptores Notch en la generación de respuestas Th1.

Los resultados también permiten sugerir que si bien la expresión de Jagged 2 por DCs está relacionada con la generación de respuestas Th2, el papel que cumpliría DLL4 en la polarización Th1 permanece aún en cuestión. Más aún, los datos obtenidos con DLL4 abogan por un rol de esta molécula como molécula co-estimuladora en contraste al rol propuesto en la generación de respuestas Th1.

En síntesis, en esta tesis doctoral se propuso que los linfocitos B y T modulan la expresión de Jagged y Delta-like en células dendríticas y de esta manera ejercen un efecto sobre la polarización de la respuesta inmune. Los resultados muestran que si bien los ligandos de Notch, Delta-like 4 y Jagged 2 son inducidos en las DCs luego de la interacción con los LB y los LT, esto no se correlaciona con la polarización de la respuesta inmune. Esto indica que los datos confirman la hipótesis alternativa.

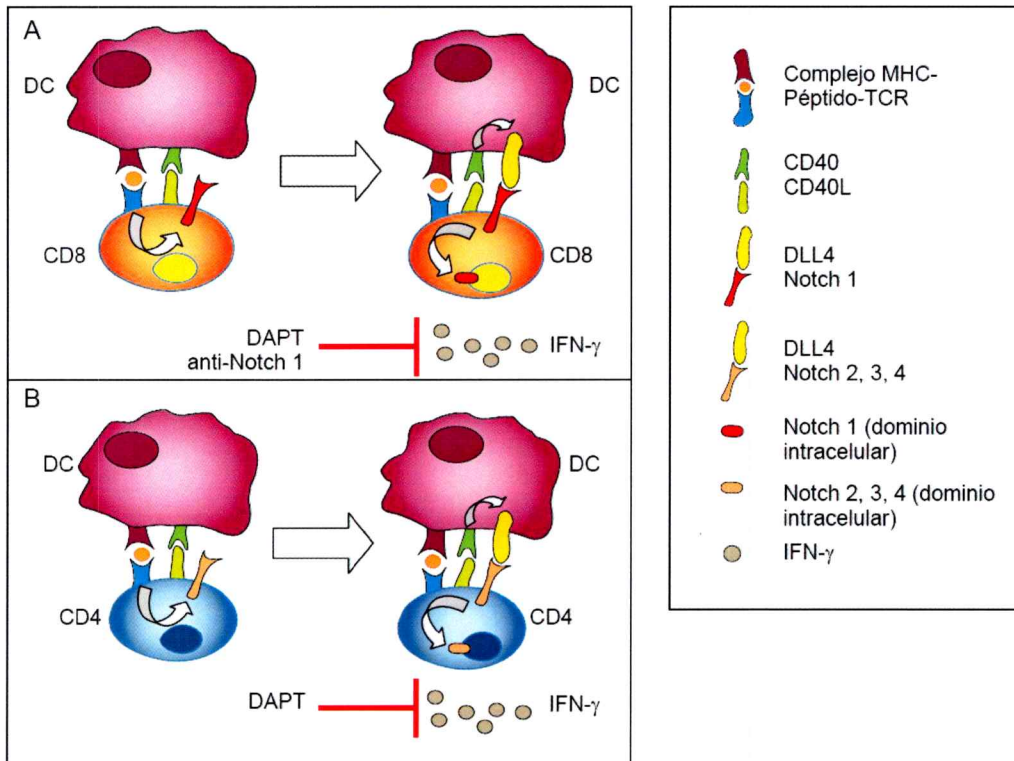
Los resultados que indican una participación de los linfocitos T en la inducción de DLL4 en DCs han generado un manuscrito que se encuentra enviado a publicación (*Delta-like 4 is induced on dendritic cells following interaction with T helper cells*. Daniela Sauma, Pablo Espejo, Mario Roseblatt y María Rosa Bono).

## CONCLUSIONES

1. La expresión de DLL4 y Jagged 2 es inducida por estímulos Th1 y Th2 respectivamente. La expresión de Jagged 2 es inducida además por IL-4, lo cual apoya la idea que este ligando de Notch esté involucrado en respuestas Th2.
2. Los linfocitos T CD4+ no expresan Notch 1 en su superficie, sin embargo la vía Notch cumple un rol en la producción de IFN- $\gamma$  y generación de respuestas Th1. Esto sugiere la participación de otros receptores Notch en la producción de IFN- $\gamma$  por los LT CD4+.
3. Los linfocitos T CD8+ expresan Notch 1 en su superficie. Este receptor es importante en la proliferación y producción de IFN- $\gamma$  por linfocitos T CD8+ activados.
4. Una población de células dendríticas de bazo expresa Notch 1 en su superficie, sin embargo la vía Notch no modula la expresión de moléculas de co-estimulación ni la producción de citoquinas por estas células.

5. Los linfocitos B tienen un efecto discreto en la polarización de la respuesta inmune, favoreciendo levemente respuestas de tipo Th1. Por otra parte, los linfocitos Th1 y Th2 favorecen la generación de respuestas Th1 y Th2 respectivamente en un fenómeno mediado por la célula dendrítica.
  
6. DLL4 y Jagged 2 se inducen en células dendríticas luego de la interacción con linfocitos B y T, sin embargo no se logró establecer una relación entre la expresión de DLL4 y Jagged 2 por las células dendríticas y la generación de respuestas Th1 y Th2.
  
7. La inducción de DLL4 en células dendríticas observada luego del cultivo con linfocitos T se debe probablemente a fenómenos asociados a la interacción entre CD40 y CD40L.

## MODELO PROPUESTO



**Figura 17. Modelo de la interacción de Notch con sus ligandos en la activación del LT CD4+ y CD8+.** (A) Durante la interacción de la DC con el LT CD8+, la unión de CD40 con su ligando (CD40L) induce la expresión de DLL4 en la DC. DLL4 interactuaría con su ligando Notch 1, induciendo la proliferación y producción de IFN- $\gamma$ . Esta proliferación y producción de citoquinas por el LT CD8+ es inhibida por DAPT o por el anticuerpo anti-Notch 1. (B) Los LT CD4+ no expresan Notch 1, sin embargo otros receptores Notch (Notch 2, 3 y/o 4) estarían involucrados en la interacción con DLL4, lo cual induce la producción de IFN- $\gamma$  por los LT, favoreciendo así la generación de respuestas Th1. Debido a la ausencia de Notch 1, los LT CD4+ son sensibles a DAPT pero no al anticuerpo anti-Notch 1. Algunas moléculas de co-estimulación han sido omitidas para facilitar la comprensión del modelo.

## REFERENCIAS

Adler, S. H., E. Chiffoleau, et al. 2003. Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *J Immunol* 171(6): 2896-903.

Alpan, O., E. Bachelder, et al. 2004. 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat Immunol* 5(6): 615-22.

Amedei, A., C. Romagnani, et al. 2001. Preferential Th1 profile of T helper cell responses in X-linked (Bruton's) agammaglobulinemia. *Eur J Immunol* 31(6): 1927-34.

Amsen, D., J. M. Blander, et al. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117(4): 515-26.

Anderson, G., J. Pongracz, et al. 2001. Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur J Immunol* 31(11): 3349-54.

Asano, N., T. Watanabe, et al. 2008. Notch1 signaling and regulatory T cell function. *J Immunol* 180(5): 2796-804.

Asselin-Paturel, C., G. Brizard, et al. 2005. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* 201(7): 1157-67.

Atreya, R., J. Mudter, et al. 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6(5): 583-8.

Banchereau, J. and R. M. Steinman 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673): 245-52.

Bayry, J., S. Lacroix-Desmazes, et al. 2005. Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes. *J Immunol* 175(1): 15-20.

Benson, R. A., K. Adamson, et al. 2005. Notch1 co-localizes with CD4 on activated T cells and Notch signaling is required for IL-10 production. *Eur J Immunol* 35(3): 859-69.

Braun, M. C., J. He, et al. 1999. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta1 and beta2 chain expression. *J Exp Med* 189(3): 541-52.

Creusot, R. J., J. S. Biswas, et al. 2003. Instruction of naive CD4+ T cells by polarized CD4+ T cells within dendritic cell clusters. *Eur J Immunol* 33(6): 1686-96.

Cheng, P., A. Zlobin, et al. 2001. Notch-1 regulates NF-kappaB activity in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 167(8): 4458-67.

de Jong, E. C., P. L. Vieira, et al. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* 168(4): 1704-9.

Dillon, S. M., D. N. Hart, et al. 1997. Priming to mycobacterial antigen in vivo using antigen-pulsed antigen presenting cells generated in vitro is influenced by the dose and presence of IL-4 in APC cultures. *Scand J Immunol* 46(1): 1-9.

Dubois, B., B. Vanbervliet, et al. 1997. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* 185(5): 941-51.

Eagar, T. N., Q. Tang, et al. 2004. Notch 1 signaling regulates peripheral T cell activation. *Immunity* 20(4): 407-15.

Fang, T. C., Y. Yashiro-Ohtani, et al. 2007. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 27(1): 100-10.

Finkelman, F. D., S. C. Morris, et al. 2000. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 164(5): 2303-10.

Fortini, M. E. 2002. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 673-84.

Fowlkes, B. J. and E. A. Robey 2002. A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development. *J Immunol* 169(4): 1817-21.

Fryer, C. J., E. Lamar, et al. 2002. Mastermind mediates chromatin-specific transcription and turnover of the Notch enhancer complex. *Genes Dev* 16(11): 1397-411.

Grewal, I. S. and R. A. Flavell 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16: 111-35.

Grogan, J. L., M. Mohrs, et al. 2001. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 14(3): 205-15.

Gurunathan, S., L. Stobie, et al. 2000. Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J Immunol* 165(2): 915-24.

Han, H., K. Tanigaki, et al. 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(6): 637-45.

Ho, I. C. and L. H. Glimcher 2002. Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 109 Suppl: S109-20.

Hochrein, H., M. O'Keeffe, et al. 2000. Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* 192(6): 823-33.

Hoyne, G. F. 2003. Notch signaling in the immune system. *J Leukoc Biol* 74(6): 971-81.

Hoyne, G. F., I. Le Roux, et al. 2000. Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells. *Int Immunol* 12(2): 177-85.

Hsieh, C. S., A. B. Heimberger, et al. 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 6065-9.

Huang, Q., D. Liu, et al. 2001. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* 294(5543): 870-5.

Huppa, J. B. and M. M. Davis 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 3(12): 973-83.

Iezzi, G., E. Scotet, et al. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29(12): 4092-101.

Jacobson, N. G., S. J. Szabo, et al. 1995. Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* 181(5): 1755-62.

Jankovic, D., M. C. Kullberg, et al. 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(3): 429-39.

Kaiko, G. E., J. C. Horvat, et al. 2008. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123(3): 326-38.



Kalinski, P., C. M. Hilkens, et al. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20(12): 561-7.

Kalinski, P. and M. Moser 2005. Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat Rev Immunol* 5(3): 251-60.

Kamakura, S., K. Oishi, et al. 2004. Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* 6(6): 547-54.

Kaplan, M. H., U. Schindler, et al. 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4(3): 313-9.

Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3(12): 984-93.

Kim, K. D., J. Zhao, et al. 2007. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat Med* 13(10): 1248-52.

Krawczyk, C. M., J. Sun, et al. 2008. Th2 differentiation is unaffected by Jagged2 expression on dendritic cells. *J Immunol* 180(12): 7931-7.

Lai, E. C. 2004. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development* 131(5): 965-73.

Litinskiy, M. B., B. Nardelli, et al. 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 3(9): 822-9.

Luty, W. H., D. Rodeberg, et al. 2007. Antiparallel segregation of notch components in the immunological synapse directs reciprocal signaling in allogeneic Th:DC conjugates. *J Immunol* 179(2): 819-29.

Maekawa, Y., S. Tsukumo, et al. 2003. Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells. *Immunity* 19(4): 549-59.

Maillard, I., T. Fang, et al. 2005. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol* 23: 945-74.

Mailliard, R. B., S. Egawa, et al. 2002. Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+ T cells: helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses. *J Exp Med* 195(4): 473-83.

Mailliard, R. B., Y. I. Son, et al. 2003. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 171(5): 2366-73.

Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, et al. 1999. CD8alpha+ and CD8alpha-subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189(3): 587-92.

Manickasingham, S. P., A. D. Edwards, et al. 2003. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur J Immunol* 33(1): 101-7.

Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, et al. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5(12): 1260-5.

Mellman, I. and R. M. Steinman 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106(3): 255-8.

Minter, L. M., D. M. Turley, et al. 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(7): 680-8.

Moser, M. and K. M. Murphy 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1(3): 199-205.

Moulin, V., F. Andris, et al. 2000. B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J Exp Med* 192(4): 475-82.

Murphy, K. M. and S. L. Reiner 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2(12): 933-44.

Noben-Trauth, N., L. D. Shultz, et al. 1997. An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4+ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 10838-43.

Osborne, B. A. and L. M. Minter 2007. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* 7(1): 64-75.

Ostroukhova, M., Z. Qi, et al. 2006. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J Clin Invest* 116(4): 996-1004.

Palaga, T., L. Miele, et al. 2003. TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-gamma production in peripheral T cells. *J Immunol* 171(6): 3019-24.

Pui, J. C., D. Allman, et al. 1999. Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11(3): 299-308.

Puig-Kroger, A., M. Relloso, et al. 2001. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 98(7): 2175-82.

Qi, H., J. G. Egen, et al. 2006. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312(5780): 1672-6.

Radtke, F., A. Wilson, et al. 1999. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* 10(5): 547-58.

Reiner, S. L. and R. M. Locksley 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13: 151-77.

Robey, E., D. Chang, et al. 1996. An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages. *Cell* 87(3): 483-92.

Rogers, P. R. and M. Croft 1999. Peptide dose, affinity, and time of differentiation can contribute to the Th1/Th2 cytokine balance. *J Immunol* 163(3): 1205-13.

Rothenberg, E. V., J. E. Moore, et al. 2008. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 8(1): 9-21.

Ruedl, C., M. Kopf, et al. 1999. CD8(+) T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 189(12): 1875-84.

Rulifson, I. C., A. I. Sperling, et al. 1997. CD28 costimulation promotes the production of Th2 cytokines. *J Immunol* 158(2): 658-65.

Rutz, S., B. Mordmuller, et al. 2005. Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells. *Eur J Immunol* 35(8): 2443-51.

Sauma, D., P. Michea, et al. 2004. Interleukin-4 selectively inhibits interleukin-2 secretion by lipopolysaccharide-activated dendritic cells. *Scand J Immunol* 59(2): 183-9.

Schindler, C., D. E. Levy, et al. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 282(28): 20059-63.

Sher, A. and C. Reis e Sousa 1998. Ignition of the type 1 response to intracellular infection by dendritic cell-derived interleukin-12. *Eur Cytokine Netw* 9(3 Suppl): 65-8.

Skok, J., J. Poudrier, et al. 1999. Dendritic cell-derived IL-12 promotes B cell induction of Th2 differentiation: a feedback regulation of Th1 development. *J Immunol* 163(8): 4284-91.

Steimle, V., C. A. Siegrist, et al. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265(5168): 106-9.

Szabo, S. J., A. S. Dighe, et al. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185(5): 817-24.

Szabo, S. J., S. T. Kim, et al. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100(6): 655-69.

Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. 2003. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 21: 713-58.

Tacchini-Cottier, F., C. Allenbach, et al. 2004. Notch1 expression on T cells is not required for CD4+ T helper differentiation. *Eur J Immunol* 34(6): 1588-96.

Takeda, K., T. Kaisho, et al. 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* 161(9): 4652-60.

Tanigaki, K., M. Tsuji, et al. 2004. Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* 20(5): 611-22.

Thomas, M. J., A. Noble, et al. 2002. CD8 T cells inhibit IgE via dendritic cell IL-12 induction that promotes Th1 T cell counter-regulation. *J Immunol* 168(1): 216-23.

Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3(2): 133-46.

Tu, L., T. C. Fang, et al. 2005. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* 202(8): 1037-42.

Vieira, P. L., E. C. de Jong, et al. 2000. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 164(9): 4507-12.

Washburn, T., E. Schweighoffer, et al. 1997. Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* 88(6): 833-43.

Wilkinson, H. A., K. Fitzgerald, et al. 1994. Reciprocal changes in expression of the receptor lin-12 and its ligand lag-2 prior to commitment in a *C. elegans* cell fate decision. *Cell* 79(7): 1187-98.

Wolfe, M. S. 2001. gamma-Secretase inhibitors as molecular probes of presenilin function. *J Mol Neurosci* 17(2): 199-204.

Wolfer, A., T. Bakker, et al. 2001. Inactivation of Notch 1 in immature thymocytes does not perturb CD4 or CD8T cell development. *Nat Immunol* 2(3): 235-41.

Worsley, A. G., S. LeibundGut-Landmann, et al. 2008. Dendritic cell expression of the Notch ligand jagged2 is not essential for Th2 response induction in vivo. *Eur J Immunol* 38(4): 1043-9.

Yamaguchi, E., S. Chiba, et al. 2002. Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice. *Immunol Lett* 81(1): 59-64.

Yao, Y., W. Li, et al. 2005. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *J Exp Med* 201(12): 1899-903.

Zheng, W. and R. A. Flavell 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89(4): 587-96.