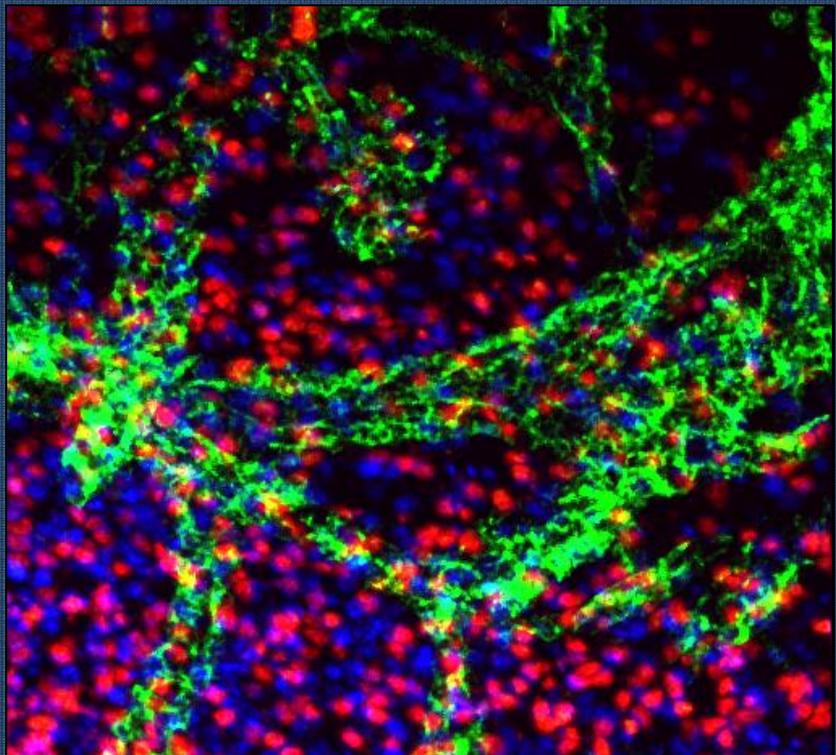




DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

PAPEL DE CD69 EN LOS MECANISMOS DE
LA RESPUESTA INMUNE INFLAMATORIA



Amalia Lamana Domínguez
Madrid, 2009





DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**PAPEL DE CD69 EN LOS MECANISMOS DE LA RESPUESTA
INMUNE INFLAMATORIA**

Memoria presentada por la licenciada en Biología:

Amalia Lamana Domínguez

para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Este trabajo se realizó en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario de la Princesa, bajo la dirección del Dr. Francisco Sánchez-Madrid, Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid.

Francisco Sánchez-Madrid, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA: Que Amalia Lamana Domínguez, licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis Doctoral con el título:

“Papel de CD69 en los mecanismos de la respuesta inmune inflamatoria.”

Revisado este trabajo, el que suscribe considera el trabajo realizado satisfactorio y autoriza su presentación para ser juzgado.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid a 5 de Abril de 2009.

Fdo. Francisco Sánchez-Madrid

A Jaime.

A mi madre.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a Paco Sánchez-Madrid, por haberme dado la oportunidad de aprender en su laboratorio y por su esfuerzo, dedicación y optimismo en todos los proyectos en los que hemos trabajado.

También agradezco profundamente a todas las personas que han ayudado a que este trabajo salga adelante, con su experiencia, apoyo y amistad: Hortensia, Gloria, Manolo y David. También a todos mis compañeros de grupo, especialmente a los que comparten mí día a día en el laboratorio del Hospital de la Princesa: Mónica G., Belén, Román, Esteban, Ana, Isabel, Ursa, Carmen y Noa. También a mis compañeros de “mi segundo laboratorio” en el CNIC, especialmente a Marta R., por su amistad y paciencia, a María M., por todos los buenos consejos y a Olga, por su apoyo. También a Fran, Mónica S., Cristina y Emilio, que consiguen crear buen ambiente en todo momento y a Pilar, Mymo y Juan, de los que siempre hay algo que aprender.

Y muy especialmente a Javi, Arantxa, Giulia, Mónica F., Marta B. y Manu, que han compartido conmigo cada día y se han convertido en grandes amigos.

También a todas las personas con las que he tenido la suerte de colaborar durante estos años y que me han aportado otros puntos de vista: a Isidoro y el laboratorio de reuma, a todo el grupo de Manolo Ortiz de Landazuri, especialmente a todos mis amigos de la facultad con los que me he reencontrado, a todos los compañeros del grupo de Cecilia, y a los de la novena, y a Jens y Silvia, del Theodor Kocher Institute de Berna, que hicieron de mi estancia una gran experiencia.

Mi más grande agradecimiento a mi familia, ya que sin ellos no habría llegado hasta aquí, y que siempre me han ayudado y apoyado en cada decisión.

RESUMEN

CD69 es una proteína transmembrana homodimérica que se expresa transitoriamente tras activación *in vitro* y que se detecta *in vivo* en poblaciones minoritarias de linfocitos T y B en órganos linfoides de individuos sanos. Además, CD69 se expresa persistentemente en infiltrados leucocitarios de diferentes enfermedades crónicas. En este sentido, se ha observado que ratones deficientes en CD69 (CD69^{-/-}) muestran una exacerbación de la respuesta inmune a artritis inducida por colágeno (AIC), lo que sugiere que esta molécula actúa como modulador negativo de la respuesta inmune. Por este motivo, uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido el estudio de CD69 como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades mediadas por el sistema inmune. Para este estudio se han analizado los efectos en el desarrollo de la AIC de dos anticuerpos anti-CD69, observándose que uno de ellos provoca un incremento en la respuesta inflamatoria de la AIC, modulando negativamente la expresión de CD69 en la membrana, mientras que el otro tiene un claro efecto beneficioso cuando se administra en etapas tempranas o intermedias de la AIC, principalmente mediado por la depleción parcial de las células CD69⁺ proinflamatorias.

El efecto de CD69 en artritis es diferente si se elimina la fase de respuesta de las células T utilizando un modelo de artritis inducida por anticuerpos anti-CII (AIAC) mediado por neutrófilos. Tanto en el modelo de AIAC como en otros modelos de respuesta inflamatoria aguda, se ha demostrado que CD69 no tiene un papel significativo, observándose que el reclutamiento de neutrófilos no está afectado en ratones CD69^{-/-}.

Con el fin de poder aclarar el mecanismo por el cual CD69 está realizando su función moduladora en el sistema inmune, decidimos estudiar la respuesta inmune inflamatoria de los ratones CD69^{-/-} en un modelo de hipersensibilidad por contacto (HSC). En este modelo experimental también se observó una exacerbación de la respuesta inflamatoria en los ratones CD69^{-/-}, con mayor producción de citoquinas proinflamatorias en el tejido inflamado y un aumento en la proporción de los linfocitos T IL17⁺ generados en el ganglio. Por otra parte, el estudio de la fase de sensibilización de la HSC, ha permitido observar que CD69 modula la migración de las células dendríticas (DCs), al menos mediante la regulación de la expresión en membrana del receptor de esfingosina 1 fosfato 1 (S1P₁), provocando un aumento en la migración de DCs en los ratones CD69^{-/-} con respecto a los ratones control tanto *in vivo* como *in vitro*.

Todas estas observaciones corroboran el papel de CD69 como modulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria y sugieren que este mecanismo de regulación implica el control de la migración de las DCs al ganglio y los procesos de diferenciación de los linfocitos T para adquirir sus funciones efectoras.

SUMMARY

CD69 is a homodimeric leukocyte transmembrane protein that is transiently expressed *in vitro* upon cell activation and is detected *in vivo* on small subsets of T and B cells in peripheral lymphoid tissues from healthy subjects. Also, CD69 is persistently expressed in leukocyte infiltrates of various chronic inflammatory diseases. In this regard, it has been observed that CD69 deficient mice (CD69^{-/-}) develop an exacerbated form of collagen-induced arthritis (CIA), suggesting that this receptor exerts a negative regulatory action during the immune response. One of the aims of this thesis addresses the potential strategies of CD69 targeting in chronic inflammatory diseases. We used two different anti-CD69 monoclonal antibodies (mAbs) to study their effects on CIA and described that mAb anti-CD69 2.2 led to an exacerbation of the disease, correlated with down-modulation of CD69 from the cell surface. In contrast, treatment with the anti-CD69 mAb 2.3 was effective in ameliorating CIA when administered in the early or intermediate phases of the disease, as this antibody causes partial depletion of proinflammatory CD69⁺ cells *in vivo*.

However, the effect of CD69 in arthritis is different when the role of T cells is absent. Using a granulocyte-mediated acute arthritis model induced by antibodies anti-CII (CAIA, CII antibody-induced arthritis) we demonstrated that CD69 does not play any significant role neither in CAIA nor in other neutrophil-recruitment models.

To elucidate the mechanism by which CD69 acts as modulator in the immune system, we decided to study the immune response of CD69^{-/-} mice in a model of contact hypersensitivity (CHS). In this experimental model we observed an exacerbation of the immune response in the CD69^{-/-} mice, where the expression of pro-inflammatory cytokines was increased in inflamed tissue, with an increase in the specific T cell response comprised by IL-17-producing T cells. On the other hand, when we studied the sensitization phase of CHS, we observed a significant increase in FITC⁺ dendritic cells (DCs) that had reached the lymph nodes in CD69^{-/-} mice compared to control mice, suggesting that CD69 is also involved in the modulation of DC migration, probably by the regulation of sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P₁) membrane expression on DCs.

All these data underscore the role of CD69 as a negative regulator of the immune inflammatory response and suggest that this mechanism involves the control of the DCs migration to the lymph node and the differentiation mechanisms of the T lymphocytes to acquire their effector functions.

ÍNDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	4
ABREVIATURAS UTILIZADAS	8
INTRODUCCIÓN	
1. La respuesta inmune adaptativa	9
2. Regulación de la diferenciación de los linfocitos T	11
3. La familia de las Lectinas tipo C	13
4. El complejo génico NK	14
5. Estructura de CD69	15
6. Expresión <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de CD69	15
7. Señalización <i>in vitro</i> de CD69	18
8. Estudio del papel funcional de CD69 en modelos <i>in vivo</i>	19
9. Efecto de CD69 en la migración celular	24
10. Modelo de hipersensibilidad por contacto	27
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	32
RESULTADOS	
1. Estudio de CD69 como diana terapéutica en artritis	43
2. Papel de CD69 en inflamación aguda mediada por neutrófilos	52
3. Papel de CD69 en hipersensibilidad por contacto	59
4. Caracterización de las poblaciones de DCs en el ratón CD69 ^{-/-} . Papel de CD69 en la migración de DC	66

DISCUSIÓN

1. CD69 actúa como molécula moduladora de la respuesta inmune *in vivo* 82
2. Estudio de CD69 como diana terapéutica en artritis 82
3. Papel de CD69 en inflamación aguda mediada por neutrófilos 85
4. Papel dual de CD69: Efecto sobre la diferenciación de linfocitos T en la respuesta inmune y sobre la migración celular 87

CONCLUSIONES 97

BIBLIOGRAFÍA 99

ANEXOS

- I. Publicaciones obtenidas durante el desarrollo de la tesis 118
- II. Artículos relacionados con el tema de la tesis 119

Abreviaturas utilizadas

Algunas de las abreviaturas corresponden a definiciones en inglés y se han mantenido para conservar la nomenclatura estándar.

AIC: Artritis Inducida por Colágeno	mAb: Anticuerpo Monoclonal (-es)
AIAC: Artritis Inducida por Anticuerpos anti-Colágeno	MAE: Miocarditis Autoinmune Experimental
APC: Antigen Presenting Cell	MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein 1
apoE^{-/-}: Ratones deficientes en apoE	MHC: Major Histocompatibility Complex
CCL: Chemokine (C-C motif) ligand	NK: Linfocitos “Natural Killer”
CCR7: Chemokine (C-C motif) receptor 7	NKD: NK receptor domain
CD69^{-/-}: Ratones deficientes en CD69	Ox: Oxazolona
CFA: Complete Freund’s Adjuvant	PHA: Phytohemagglutinin
CII: Colágeno de tipo II	PKC: Proteína Kinasa C
ConA: Concanavalina A	PNAd: Peripheral Lymph Node Addressin
CRD: Carbohydrate Recognition Domain	PMA: Phorbol Mirystate Acetate
CTLD: C-Type Lectin Domain	RANTES: Regulated on Activation, T cell Expressed and Secreted
DC: Dendritic Cell	RORγt: Retinoic Acid-Related Orphan Receptor gamma t
dDC : Dermal Dendritic Cell	s.c.: Administración subcutánea
DNFB : 2,4-dinitro-1-fluorobenceno	S1P₁: Sphingosine-1-phosphate receptor 1
DP : Timocitos Dobles Positivos	SP: Timocitos Simples Positivos
EAE : Encefalitis Autoinmune Experimental	TCR: T Cell Receptor
Flt3-L: Fms-like Tyrosine kinase Ligand	TGF: Transforming Growth Factor
GFP: Green Fluorescent Protein	Th: Linfocitos T helper
GM-CSF: Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor	TLR: Toll-like Receptor
HSC: Hipersensibilidad por contacto	TNF: Tumor Necrosis Factor
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1	Treg: Linfocito T regulador
IFN-γ: Interferón <i>gamma</i>	VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule
IL: Interleuquina	WB: Western Blot
Ig : Inmunoglobulina	
i.p.: Administración intraperitoneal	
kDa: kiloDalton	
LC: Langerhans Cell	
LPS: Lipopolisacárido	

INTRODUCCIÓN

1. La respuesta inmune adaptativa.

El eje de la respuesta inmune adaptativa reside en los linfocitos. Los linfocitos B proporcionan defensa por medio de la secreción de anticuerpos. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos realizan su función defensiva eliminando las células que producen antígenos extraños, como las células infectadas por virus y otros microorganismos intracelulares. Por el contrario, los linfocitos T CD4⁺ colaboradores (Th, **T helper**) proporcionan una importante conexión entre la inmunidad específica y los mecanismos efectores de la inmunidad natural, promoviendo la proliferación y diferenciación de otros linfocitos y activando y reclutando células de la respuesta inmune innata.

Atendiendo a estudios funcionales específicos de antígeno *in vivo*, los clones de linfocitos T CD4⁺ se clasificaron hace dos décadas en dos subpoblaciones, Th1 y Th2, definidos por secretar un patrón único de citoquinas y por sus funciones efectoras (Tada et al., 1978; Swierkosz et al., 1979). Actualmente las subpoblaciones Th1 y Th2 están muy bien caracterizadas, conociéndose los factores que influyen en su diferenciación, las citoquinas que producen y sus funciones en la respuesta a patógenos, tumores y autoantígenos (Mosmann and Coffman, 1989; Reiner, 2007). Sin embargo, recientemente, una amplia variedad de descubrimientos han sugerido que el espectro del repertorio inmune podría no deberse a un simple destino binario adoptado por las células T CD4⁺ (Dong, 2006; Weaver et al., 2006). Estas hipótesis han culminado con el descubrimiento de una nueva subpoblación T CD4⁺, las células Th17, que se caracterizan por producir un patrón de citoquinas entre las que se encuentran interleuquina (IL)-17A, IL-17F e IL-22 y por expresar el receptor nuclear huérfano relacionado con el ácido retinoico γ t (ROR γ t, **R**etinoic **A**cic-**R**elated **O**rphan **R**eceptor gamma t), que parece ser específico de esta estirpe celular (Ivanov et al., 2006). En cuanto a la función de esta nueva subpoblación, evidencias recientes indican que las células Th17 muestran un efecto patogénico en muchas enfermedades autoinmunes y en reacciones de hipersensibilidad (Reiner, 2007). De hecho, muchas patologías previamente explicadas por la activación de los linfocitos Th1 o Th2 ahora parecen estar relacionadas, al menos en parte, con las células Th17. Así, se ha descrito la implicación de los linfocitos Th17 en artritis inducida por colágeno (AIC) (Nakae et al., 2003), en encefalitis autoinmune experimental (EAE) (Komiyama et al., 2006), en miocarditis autoinmune experimental (MAE) (Rangachari et al., 2006) y en hipersensibilidad por contacto (HSC) (He et al., 2006), entre otras enfermedades inflamatorias autoinmunes.

<i>Tipo</i>	<i>Función</i>	<i>Expresión de citoquinas</i>	<i>Factores de transcripción</i>
<i>Th1</i>	Otorgan protección contra bacterias intracelulares y ciertos virus mediante la activación de macrófagos y a través de la actividad citolítica de linfocitos T CD8 ⁺ y de los linfocitos citocidas naturales (NK, Natural Killer).	IL-2 IFNγ Linfotoxina α	STAT-1 STAT-4 T-Bet
<i>Th2</i>	Activan a los eosinófilos y participan en la defensa contra infecciones por helmintos. Además, tienen un papel fundamental en la regulación de la actividad de los linfocitos B y, por tanto, en las respuestas inmunes específicas mediadas por anticuerpos.	IL-4 IL-5 IL-9 IL-13	STAT-6 GATA-3
<i>Th17</i>	Implicados en la respuesta inmune contra bacterias extracelulares y algunos hongos y en autoinmunidad.	IL-17A, IL-17F IL-22 IL-21	RORγT RORα STAT-3

Tabla 1. Principales poblaciones efectoras de linfocitos T CD4⁺.

Por otro lado, los linfocitos T CD4⁺ también pueden diferenciarse hacia células capaces de regular y suprimir la propia respuesta T. Se han identificado varias subpoblaciones de linfocitos con propiedades reguladoras (Treg). La población mejor caracterizada corresponde a las células Treg naturales CD4⁺CD25⁺ que expresan el factor de transcripción FoxP3 y se generan en el timo (Sakaguchi et al., 1995; Sakaguchi, 2005).

Otro tipo de células T CD4⁺ reguladoras se generan en la periferia a partir de factores inductores y reciben el nombre de células Treg adaptativas. Entre ellas se encuentran las Tr1, que se diferencian a partir de linfocitos T CD4⁺CD25⁻ vírgenes tras una estimulación antigénica en condiciones de coestimulación limitantes, a partir de células dendríticas inmaduras, o en presencia de IL-10 (Roncarolo et al., 2006; Roncarolo y Battaglia, 2007). Además, muchos tratamientos *in vitro* e *in vivo* permiten generar células T supresoras, como la administración oral de antígenos, que induce células reguladoras Th3 (MacDonald, 1998).

2. Regulación de la diferenciación de los linfocitos T

Para activarse y diferenciarse, los linfocitos T vírgenes requieren de las señales proporcionadas por las células presentadoras de antígeno (APC, Antigen-Presenting Cell), principalmente por las células dendríticas (DC, Dendritic Cell), lo que hace de éstas un eslabón clave entre la inmunidad innata y la adquirida. Las DCs se localizan en la piel, las mucosas y los órganos linfoides secundarios y son cruciales para iniciar respuestas específicas contra patógenos o células anormales (acción inmunogénica), y también para prevenir la reacción contra lo propio y contra antígenos exógenos inofensivos (acción tolerogénica) (Banchereau et al., 2000). Cuando las DCs entran en contacto con un patógeno, procesan sus antígenos y viajan por los vasos linfáticos hacia los órganos linfoides secundarios, donde presentan al linfocito T un epítipo en la superficie de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex), de clase I para linfocitos CD8⁺ o de clase II para linfocitos CD4⁺.

2.1 Señales que dirigen la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺.

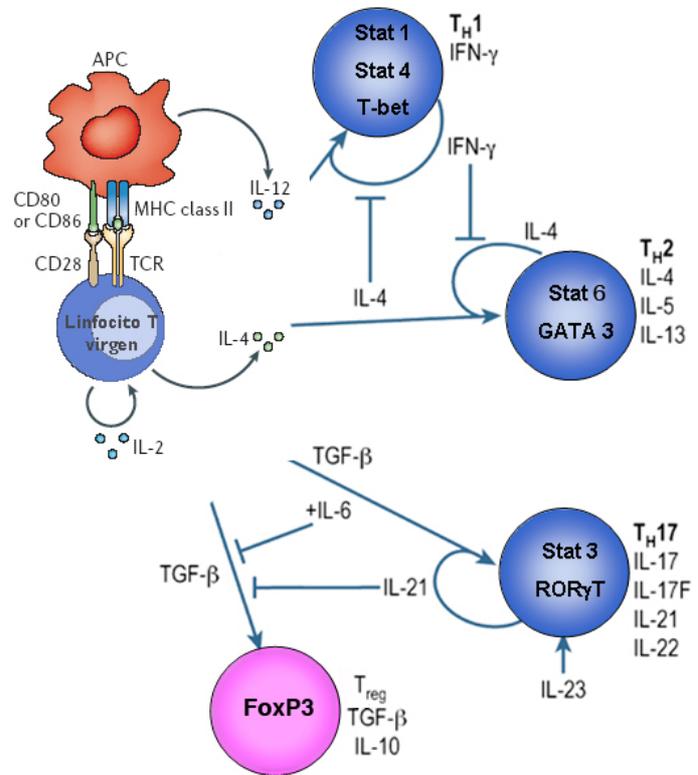
Las DCs envían a los linfocitos T varias señales de forma secuencial (Banchereau and Steinman, 1998). Después de establecerse contactos de exploración entre el linfocito T y la DC, se produce la presentación de moléculas de MHC cargadas con epítopos antigénicos a los receptores de la célula T (TCR, T Cell Receptor), cuya interacción inicia la formación de un contacto duradero y especializado entre la DC y el linfocito T, llamado sinapsis inmunológica (Montoya et al., 2002). La segunda señal está mediada por moléculas de señalización coestimuladoras o coinhibidoras, según dirijan al linfocito a activarse o impidan su activación frente al antígeno presentado. La tercera señal establece, en el caso de los linfocitos T CD4⁺, si el linfocito se diferenciará hacia Th1, Th2, Th17 o Treg. Las señales más críticas que inducen esta polarización funcional en los linfocitos T CD4⁺ son las citoquinas (Murphy y Reiner, 2002; Dong, 2006; Weaver et al., 2006). La acción de las citoquinas en la estimulación y maduración de los linfocitos T puede dirigir la inducción o represión de factores de transcripción específicos de linaje o de factores de crecimiento selectivos de una subpoblación. Las citoquinas también son los principales mensajeros secretados por células T CD4⁺ maduras para mediar su acción sobre otras células durante la respuesta inmune.

Las principales citoquinas que guían la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ son: la IL-12 para Th1, la IL-4 para Th2, y el TGF- β (Transforming Growth Factor beta)

para Th17 y Treg. Está bien descrito en ratón que en presencia de TGF- β , la diferenciación hacia Th17 es favorecida por la IL-6, mientras que su ausencia favorece la diferenciación a Treg (Awasthi y Kuchroo, 2009).

Fig 1. Diferenciación de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺.

La activación de las DCs está mediada por la interacción con moléculas de la superficie de los microorganismos a través de receptores de reconocimiento expresados en su superficie. Las señales transmitidas a partir de estos receptores dirigen a la DC a un fenotipo capaz de mediar el desarrollo de los linajes Th1, Th2, Th17 o Treg durante la presentación antigénica a los linfocitos T vírgenes. En este proceso es determinante el balance de citoquinas producidas en el ganglio.



2.2 Moléculas reguladoras negativas:

Aparte de las citoquinas, otras moléculas tienen un papel importante en la regulación de la generación de células efectoras. Como hemos explicado, los linfocitos T reciben señales coestimuladoras de las células APCs que pueden ser positivas o negativas. Las primeras señales coestimuladoras positivas que reciben los linfocitos T vírgenes están mediadas a través del receptor CD28, mientras que la señalización a través de CTLA-4 tiene un efecto negativo en la activación. Tanto CD28 como CTLA-4 interactúan con el mismo tipo de ligandos, B7-1 (también conocido como CD80) y B7-2 (CD86), expresados en las APCs. Las moléculas coinhibidoras de la familia CD28 son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis y la tolerancia de los linfocitos T, de hecho la señalización a través de CTLA-4 se ha implicado en la inducción de tolerancia periférica de los linfocitos T *in vivo* (Pérez et al., 1997). Otros miembros de la familia CD28-B7 también presentan un efecto inhibitorio, como PD-1, que se une a los ligandos relacionados con B7 PD-L1 y PD-L2 (Ishida et al., 1992) y el recientemente caracterizado BTLA (Watanabe et al., 2003).

3. La familia de las Lectinas tipo C

Las lectinas tipo C son una amplia familia de proteínas caracterizadas estructuralmente por un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD, Carbohydrate Recognition Domain) dependiente de la unión de Ca^{2+} . Las interacciones proteína-carbohidrato tienen múltiples funciones en el sistema inmune. Algunas proteínas de esta familia se han implicado en endocitosis y degradación de glicoproteínas, así como en la respuesta inmune innata, por reconocer residuos de azúcares que se expresan sólo en la membrana de bacterias, parásitos y hongos (por ejemplo, manosa, fucosa o N-acetil-glucosamina) (Drickamer and Taylor, 1993).

La diversificación que se ha producido en este grupo de proteínas a lo largo de la evolución, ha dado lugar a la pérdida de esta capacidad de unir Ca^{2+} y carbohidratos (Weis et al., 1998; Llera et al., 2001). La mayor parte de estas proteínas difiere de las lectinas originales en dos aspectos: primero, que son generalmente heterodiméricas, con dos cadenas homólogas en cuanto al CRD; y segundo, que estas proteínas interactúan con ligandos proteicos más que con carbohidratos, al contrario de lo que ocurre en las verdaderas lectinas.

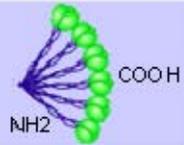
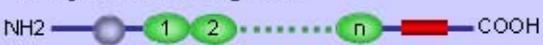
Grupos de Lectinas tipo C		Funciones biológicas / Estructura
Lectinas solubles	Lecticanos	Proteoglicanos de la matriz extracelular. NH ₂  COOH
	Colectinas <ul style="list-style-type: none"> Proteína de unión a manosa sérica (MBP). Surfactantes de pulmón. Conglutinina de suero bovino. 	Mecanismos de defensa innata.  COOH NH ₂
Lectinas tipo-C transmembrana	Selectinas	Implicadas en las interacciones adhesivas entre el leucocito y el endotelio vascular. NH ₂  COOH
	Proteínas transmembrana tipo II <ul style="list-style-type: none"> Receptor de asialoglicoproteína de hepatocitos. Lectina específica de macrófagos de galactosa/N-acetilgalactosamina. Receptores de células NKs. 	Algunas de ellas están implicadas en los procesos de captación de antígenos relacionados con las rutas endocíticas. Otras traducen señales tras los contactos célula-célula. NH ₂  COOH
	Proteínas transmembrana tipo I <ul style="list-style-type: none"> Receptor de manosa de macrófagos. DEC-205. 	Están implicadas en los mecanismos moleculares de captación de antígenos. NH ₂  COOH

Tabla 2. Familia de las lectinas tipo C animales.

CD69 pertenece a la subfamilia de las proteínas transmembrana de tipo II cuyo dominio de reconocimiento de carbohidratos (CTLD, C-Type Lectin-like Domain) se ha separado a lo largo de la evolución del original y recibe el nombre de NKD (NK Domain) por estar presente en muchos receptores específicos de células NKs (Natural Killer) (Weis et al., 1998). Este dominio ha perdido su capacidad para unir Ca^{+2} y posiblemente carbohidratos (Weis et al., 1998; Llera et al., 2001). El ligando natural de CD69 aún no se conoce, lo que dificulta el estudio de la función fisiológica de este receptor, aunque la estructura tridimensional de CD69 predice la unión a un ligando de tipo proteico (Llera et al., 2001). El hecho de expresarse en células NKs sugiere que podría desempeñar un papel importante en la inmunidad natural, aunque la expresión de CD69 no se restringe a estas células sino que se expresa ampliamente en otros tipos celulares derivados de la médula ósea (Testi et al., 1994).

4. El complejo génico NK

El gen de CD69 se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 de ratón y en el cromosoma 12 humano (López-Cabrera et al., 1993; Ziegler et al., 1994). Se encuentra dentro de la región denominada “complejo génico NK”, que comprende varios genes de la familia de las lectinas tipo C específicas para células NKs (Fig. 2). Por ejemplo, los receptores NK de la familia Ly49, responsables del reconocimiento de las moléculas H-2 de clase I se agrupan en esta región del cromosoma 6 de ratón. CD94 y NKG2, receptores que heterodimerizan en la membrana de las células NKs y son importantes transductores de señales, también se localizan en el complejo génico NK del cromosoma 12 humano y sus correspondientes ortólogos en el cromosoma 6 de ratón.

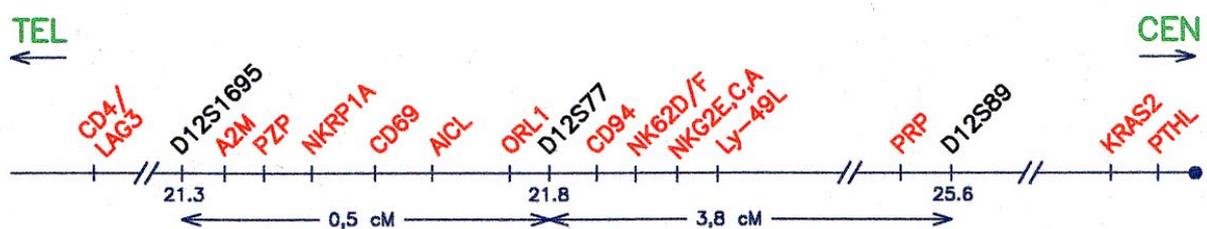


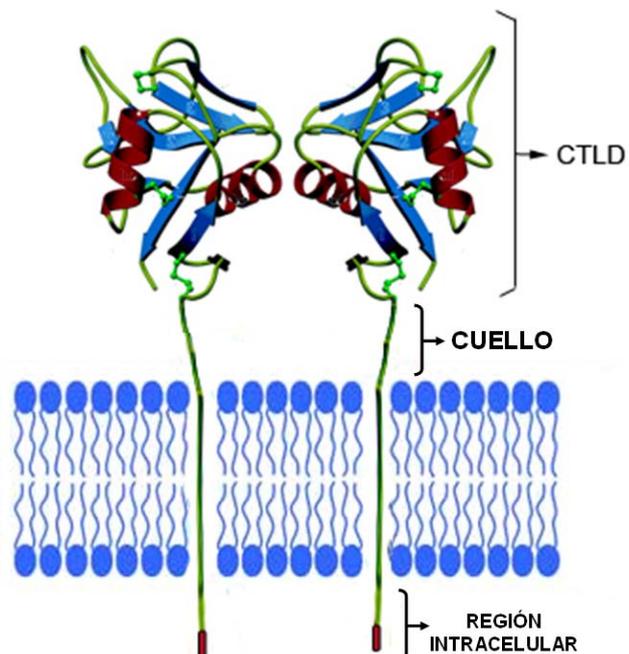
Figura 2. El gen de CD69 se localiza en el complejo génico NK. El complejo génico NK codifica muchas proteínas presentes en las células NKs, como los receptores CD94 o los de la familia NKG2 y se encuentra localizado en el cromosoma 12 humano y en el cromosoma 6 de ratón (TEL, telómero; CEN, centrómero, cM, CentiMorgan).

5. Estructura de CD69.

CD69 es una proteína transmembrana tipo II con un dominio CTLD que no une Ca^{2+} , enlazado por una región cuello a una corta región citoplásmica N-terminal, fosforilada constitutivamente en residuos de serina (Lanier et al., 1988; Testi et al., 1988). La caracterización bioquímica de esta molécula demostró que se trata de una glicoproteína homodimérica de aproximadamente 60 kDa, formada por dos cadenas polipeptídicas idénticas con distinta glicosilación (de 33 a 27 kDa), que se encuentran unidas por puentes disulfuro (Sánchez-Mateos y Sánchez-Madrid, 1991).

Figura 3. Estructura de CD69.

CD69 es una proteína homodimérica que pertenece a la familia de las lectinas tipo C y comparte la estructura general del CTLD con otras lectinas, como CD94. Este dominio CTLD ha perdido la capacidad de unir Ca^{2+} y carbohidratos que poseen otras lectinas tipo C como la proteína de unión a manosa (MBPA) y está unido al resto de la estructura por una región denominada CUELLO. Su porción citoplásmica es corta y se encuentra constitutivamente fosforilada en residuos de serina.



6. Expresión *in vitro* e *in vivo* de CD69.

CD69 se describió inicialmente como una molécula que se inducía tempranamente tras la activación linfocitaria (Corte et al., 1981), ya que se expresa tras activación en todas las células derivadas de la médula ósea excepto en eritrocitos. En ausencia de ligando, los principales estudios *in vitro* para estudiar la función de CD69 se basaron en el uso de anticuerpos monoclonales contra la molécula. El primer anticuerpo monoclonal (mAb) obtenido frente a CD69 (MLR3) fue descrito por Corte *et al.*, en 1981 (Corte et al., 1981), seguido de otros como EA1 (Hara et al., 1986), Leu23 (Lanier et al., 1988) y AIM (Cebrián et al., 1989). La rápida expresión de la proteína en membrana (entre 2 y 4 horas tras la activación) (López-Cabrera et al., 1993) sitúan a CD69 dentro del grupo de genes tempranos inducidos durante la activación linfocitaria.

6.1 Expresión tras activación *in vitro* y síntesis *de novo*:

La expresión de la molécula de CD69 durante la activación del linfocito T requiere su síntesis *de novo* (Cebrián et al., 1988), que puede ser inducida *in vitro* por una gran variedad de estímulos como el tratamiento con mAb frente a CD3/TCR o a CD2, agentes activadores de la proteína quinasa C (PKC, **Protein Kinase C**) como los ésteres de forbol, o el tratamiento con lectinas mitogénicas como la fitohemaglutinina (PHA, **Phytohemagglutinin**) (Hara et al., 1986; Cebrián et al., 1988). También se ha descrito la inducción de CD69 en linfocitos T CD4⁺ de manera independiente de antígeno mediante combinaciones de citoquinas como la IL-2, el factor de necrosis tumoral (TNF, **Tumor Necrosis Factor**) y la IL-6 (Unutmaz et al., 1994). La citoquina IL-15 aumenta la expresión de CD69 en células T y en células NKs (Kanegane y Tosato, 1996; McInnes et al., 1997). En respuesta a los estímulos *in vitro* la expresión en membrana varía entre las 24 y 48 h (Cebrián et al., 1988).

En cuanto al mecanismo molecular, la mayoría de los estímulos descritos para la inducción de la expresión de CD69 implican la activación de PKC (Cebrián et al., 1988). De manera parcialmente independiente a esta vía se ha descrito la implicación de las proteínas Ras (D'Ambrosio et al., 1994) y su efector Raf-1 (Taylor-Fishwick y Siegel, 1995) en la inducción de CD69 dependiente de TCR-CD3.

6.2 Regulación de la expresión del gen de CD69:

El análisis de la secuencia 5' flanqueante al gen de CD69 reveló la presencia de un elemento TATA potencial 30 bases arriba del sitio de inicio de la transcripción y varias secuencias de unión putativas para factores de transcripción inducibles (NK-κB, Egr-1, AP-1) que mediarían de esta manera la expresión regulada de este gen (López-Cabrera et al., 1995). Así, la modulación del promotor de CD69 por citoquinas proinflamatorias como TNF depende de la transactivación por NK-κB (López-Cabrera et al., 1995).

Otros estímulos como los ésteres de forbol o la estimulación por la vía del TCR inducen múltiples factores de transcripción como las familias AP-1, EGR y ATF/CREB, que actúan en cis para regular el promotor de CD69 (Castellanos et al., 1997; Castellanos et al., 2002).

6.3 Expresión de CD69 *in vivo*:

CD69 se detecta *in vivo* en algunos subtipos de linfocitos T y B en tejidos linfoides periféricos (Sánchez-Mateos et al., 1989). Se expresa intensa y persistentemente en

infiltrados leucocitarios de diversas enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide y hepatitis viral crónica (Laffón et al., 1991; García-Monzón et al., 1990), así como en los leucocitos involucrados en la respuesta alérgica (Hartnell et al., 1993). También se expresa, en los leucocitos responsables del rechazo de trasplantes (Mampaso et al., 1993), en linfocitos que infiltran tumores (Coventry et al., 1996), en células inmunitarias en las lesiones ateroscleróticas (Caspar-Bauguil et al., 1998) y durante infecciones persistentes (Zajac et al., 1998).

En el caso de los leucocitos que se encuentran en los infiltrados de varias enfermedades inflamatorias crónicas, la expresión de CD69 podría estar inducida, al menos parcialmente, por citoquinas proinflamatorias (Kanegane y Tosato, 1996; McInnes et al., 1997). En relación a las células T que han migrado a sitios de inflamación crónica, la expresión de CD69 y CD45RO se halla aumentada, pero presentan una débil expresión de la molécula de activación CD25 (Cush y Lipsky, 1988; Laffón et al., 1991; Afeltra et al., 1993; Sancho et al., 1999). El fenotipo de estas células T se puede explicar por su migración selectiva desde la sangre periférica durante la recirculación de estas células, durante su reclutamiento o una vez las células están en los tejidos inflamados (Pietschmann et al., 1992; Galea et al., 1994; Iannone et al., 1994; Brezinschek et al., 1995). En este sentido, se ha descrito que la mayoría de linfocitos T presentes en la sinovial reumatoide son reclutados y activados de manera inespecífica y antígeno independiente (Panayi et al., 1992; Sancho et al., 1999).

En tejidos normales, CD69 está presente en células B del manto de los ganglios linfáticos y en células CD4⁺ de los centros germinales (Sánchez-Mateos et al., 1989). Además, se ha detectado su expresión en un pequeño grupo de timocitos medulares (Sánchez-Mateos et al., 1989), plaquetas (Testi et al., 1990), neutrófilos (Gavioli et al., 1992), eosinófilos (Nishikawa et al., 1992), basófilos (Escribano et al., 1997), células de Langerhans (Bieber et al., 1992) y monocitos periféricos (De Maria et al., 1994).

La expresión de CD69 por los timocitos que pasan la selección positiva se asocia con el proceso de activación que ocurre durante el desarrollo tímico (Swat et al., 1993; Barthlott et al., 1997). Se ha relacionado la expresión de CD69 en el timo con el proceso de selección positiva, ya que sólo tras el proceso de selección positiva las señales generadas por el receptor de la célula T son capaces de inducir la expresión de CD69 (Swat et al., 1993). Debido a este patrón de expresión restringido en timocitos, se ha propuesto que CD69 puede desempeñar una función importante en los estadios tardíos del desarrollo tímico (Swat et al., 1993).

Por otro lado, también se ha detectado en tejidos linfoides periféricos y en infiltrados inflamatorios una subpoblación de células $CD4^+ CD69^+$ en un modelo de lupus de ratón que son anérgicas, incapaces de sintetizar citoquinas proinflamatorias y que inhiben la síntesis de citoquinas por parte de las células $CD4^+ CD69^-$ (Ishikawa et al., 1998), apuntando hacia una función reguladora de CD69 en la respuesta inmune. Recientemente se ha caracterizado una nueva subpoblación de linfocitos T reguladores $CD69^+CD4^+CD25^-$ inducida en respuesta a tumores, que no expresan el factor de transcripción Foxp3 y que expresan TGF- β 1 unido a membrana, que son capaces de mediar la supresión de la proliferación de linfocitos T (Han et al., 2009). Además, las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lupus muestran un incremento en la expresión de CD69 (Portales-Pérez et al., 1997), siendo débil su respuesta *in vitro* a diferentes estímulos. Asimismo, las células T de líquido sinovial humano de pacientes con artritis reumatoide manifiestan una baja capacidad de respuesta que correlaciona con la expresión de CD69 (Hernández-García et al., 1996). Por lo tanto, algunos linfocitos T que expresan CD69 parecen poseer las dos principales características de las células T reguladoras: comportamiento anérgico y efectos reguladores.

7. Señalización *in vitro* de CD69.

El estudio de la señalización *in vitro* utilizando anticuerpos frente a este receptor ha demostrado su capacidad para actuar como un receptor transmisor de señales en diferentes tipos celulares. En linfocitos T se observa una elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Nakamura et al., 1989; Sancho et al., 2000). También se ha descrito la asociación de CD69 con una proteína G (Risso et al., 1991; Sancho et al., 2000) que podría actuar en su señalización intracelular. En presencia de dosis submitogénicas de ésteres de forbol como el PMA (Phorbol Myristate Acetate), el tratamiento con mAb anti-CD69 promueve la expresión de IL-2 y su receptor, lo que lleva a una respuesta proliferativa (Cebrián et al., 1988; Testi et al., 1989), sugiriendo un papel activador de esta molécula en células T. Sin embargo, aunque la mayoría de resultados *in vitro* sugieren una función estimuladora sobre la respuesta inmune, en otros modelos celulares la proliferación de células T en respuesta a anti-CD3, IL-1 o células accesorias se inhibe por la adición de mAb anti-CD69 (Cosulich et al., 1987), comportamiento que no sería esperable en un receptor puramente activador.

Por otra parte, también se ha descrito que CD69 es capaz de inducir actividad citotóxica en células NKs y en células T activadas (Moretta et al., 1991). En este contexto, la señalización a través de CD69 dirige la degranulación celular en una línea celular de leucemia basofílica RBL transfectada establemente con CD69 y este evento está regulado por la quinasa ERK de la familia de las MAPK quinasas (Zingoni et al., 2000). Además la señalización simultánea de CD69 y CD94/NKG2-A suprime la degranulación mediada por CD69 a través de la inhibición de la activación de ERK en células RBL e inhibe la citotoxicidad en células NKs (Zingoni et al., 2000). Por otro lado, en un modelo de tumores, la activación de ERK dependiente de la señalización a través de CD69 lleva a los linfocitos T reguladores $CD69^+CD4^+CD25^-$, recientemente descritos, a expresar TGF- β 1 de membrana, que media la supresión de la proliferación de las células T (Han et al., 2009). Concretamente, en este estudio se ha demostrado que la señalización de CD69 prolonga la activación de ERK en las células $CD69^+CD4^+CD25^-$, lo que correlaciona con el mantenimiento de una alta expresión de TGF- β 1 en membrana. Además, un inhibidor de ERK reduce la expresión en membrana de TGF- β 1 en estas mismas células tratadas con anti-CD69 (Han et al., 2009). Por tanto, aunque CD69 ha sido generalmente estudiado como un marcador de activación, los estudios más recientes muestran que esta molécula parece tener una función reguladora negativa de la respuesta inmune.

8. Estudio del papel funcional de CD69 en modelos *in vivo*.

Para investigar la relevancia fisiológica de CD69 se generaron ratones deficientes en CD69 ($CD69^{-/-}$) (Lauzurica et al., 2000). Después de su caracterización fenotípica se estudió la respuesta inmune de estos ratones en distintos modelos *in vivo*. Estos modelos se eligieron inicialmente por el patrón de expresión de la molécula. En este sentido, como ya se ha mencionado, CD69 se expresa persistentemente en infiltrados leucocitarios de diferentes enfermedades crónicas.

8.1. Caracterización de los ratones deficientes en CD69.

El análisis fenotípico de los ratones $CD69^{-/-}$ reveló que son normales en el desarrollo de células hematopoyéticas y tampoco muestran defectos significativos en cuanto a las subpoblaciones de células T en timo y en la periferia (Lauzurica et al., 2000). Además, estudios de selección negativa y positiva de timocitos utilizando ratones transgénicos para el TCR, demostraron que estos procesos no están alterados en los ratones $CD69^{-/-}$.

(Lauzurica et al., 2000). Las células NKs y los linfocitos T CD8⁺CD69^{-/-} muestran la misma actividad citotóxica que los de fenotipo salvaje. Sólo el desarrollo de células B parece estar afectado en ausencia de CD69, encontrándose las células pre-B B220^{hi} inmunoglobulina (Ig)M^{neg} de la médula ósea aumentadas en los ratones CD69^{-/-}. Además, la falta de CD69 dirige un ligero incremento en IgG2a y en las respuestas IgM a la inmunización con antígenos T dependientes y T independientes (Lauzurica et al., 2000). Sin embargo, los linfocitos de los ratones CD69^{-/-} muestran una respuesta proliferativa normal de células T y B a diferentes estímulos (Lauzurica et al., 2000). Estas observaciones sugieren que CD69 podría estar implicado en el desarrollo de células B.

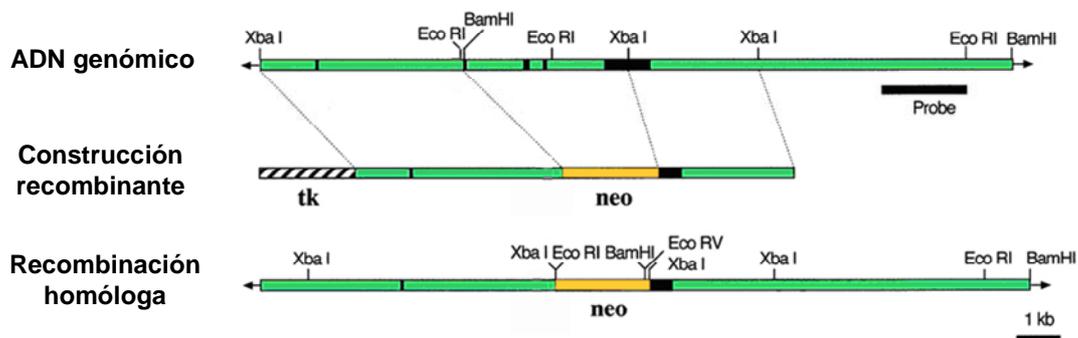


Fig 4. Inactivación del gen de CD69 por recombinação homóloga. Para bloquear la expresión de CD69 por recombinação homóloga en células madre embrionarias, se construyó un vector donde se reemplazó un fragmento de ADN genómico de 4 Kb que contiene los exones 2, 3, 4 y la región transcrita del exón 5 con una región que contenía el cADN que codifica la resistencia a Neomicina. En el esquema se representan los mapas de restricción parciales del locus de CD69 en el ADN genómico de ratón, la construcción que se recombina y el mapa final tras la recombinação homóloga.

8.2 Modelo de rechazo de tumores:

La respuesta inmune contra tumores implica la acción combinada de mecanismos humorales y celulares, en los cuales macrófagos, linfocitos T citotóxicos y células NKs tienen un papel central (Smyth et al., 1998; Screpanti et al., 2001). Está descrito que la respuesta inmune a células tumorales MHC clase I^{neg} RMA-S (una línea celular de linfoma) está mediada por células NKs, mientras que la respuesta a células RMA que expresan MHC clase I está mediada por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Smyth et al., 1998; Smyth et al., 2000).

En este modelo se ha observado que la deficiencia de CD69 promueve un aumento en la respuesta antitumoral dependiente de células NKs que da lugar a un incremento en

el rechazo de las células tumorales RMA-S (Esplugues et al., 2003). Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos no parecen estar implicados en este aumento de la respuesta antitumoral, ya que no se observaron diferencias significativas en la protección contra células tumorales RMA entre los ratones normales y los CD69^{-/-} (Esplugues et al., 2003). Esta potente respuesta antitumoral observada en los ratones CD69^{-/-} correlacionaba con la disminución de la producción de TGF- β y con el aumento de las citoquinas proinflamatorias y de MCP-1 (**M**onocyte **C**hemotactic **P**rotein-1) en el sitio de crecimiento del tumor, y estaba asociada con el aumento en el reclutamiento de células linfoides efectoras y con la disminución de la apoptosis. Además, el bloqueo de TGF- β *in vivo* en ratones normales aumentaba la respuesta antitumoral y la señalización a través de CD69 inducía la producción de TGF- β *in vitro*. Al mismo tiempo, la modulación negativa de la expresión de CD69 en ratones normales mediada por un mAb anti-CD69, produjo un incremento de la respuesta antitumoral que reproducía el fenotipo observado en los ratones CD69^{-/-} (Esplugues et al., 2003).

8.3 Modelo de artritis inducida por colágeno:

Para explorar el papel de CD69 en un modelo de artritis crónica autoinmune, se compararon la incidencia y severidad de la enfermedad en el modelo de AIC. Este modelo está ampliamente aceptado como modelo experimental de enfermedad inflamatoria de la articulación, particularmente de la artritis reumatoide, y provoca un tipo de artritis autoinmune mediada por células T que se induce por la inyección de colágeno de tipo II (CII) exógeno. Se caracteriza por un fuerte infiltrado en la articulación, proliferación de las células sinoviales (formación de pannus) y destrucción de cartilago y hueso, como ocurre en la artritis reumatoide.

En este modelo están implicadas diferentes citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α) y quimioquinas y en esta respuesta inmune tienen un papel fundamental los linfocitos T CD4⁺ específicos contra CII que se generan en los ganglios linfáticos drenantes. En este sentido, la AIC se ha considerado durante mucho tiempo un modelo mediado por células Th1 específicas contra el CII, sin embargo, el IFN- γ (**I**nterferón ***gamma***), la principal citoquina de la respuesta Th1, parece tener un papel protector de la AIC (Manoury-Schwartz et al., 1997; Vermeire et al., 1997). Por el contrario, se ha sugerido que otras citoquinas inflamatorias producidas por linfocitos CD4⁺, como el TNF- α y el GM-CSF (**G**ranulocyte **m**acrophage **c**olony-**s**timulating **f**actor), pueden tener un papel fundamental en el desarrollo de la AIC (Campbell et al., 2001; Cook et

al., 2001) y estudios más recientes implican a la IL-17 como una de las principales citoquinas responsables de su desarrollo (Nakae et al., 2003). Además, se ha descrito que los linfocitos T CD4⁺ que producen IL-17 pueden coexpresar TNF- α y GM-CSF, pero no citoquinas Th1 o Th2 (Infante-Duarte et al., 2000).

Para producir la AIC se realizó una inmunización intradérmica de CII y adyuvante de Freund (CFA, Complete Freund's Adjuvant) en ratones de la cepa B6, en los que este protocolo induce una artritis moderada (Campbell et al., 2000). En este modelo se observó que los ratones CD69^{-/-} desarrollan una forma exacerbada de AIC, presentando un aumento en la gravedad e incidencia de la enfermedad, comparado con los ratones control (Sancho et al., 2003).

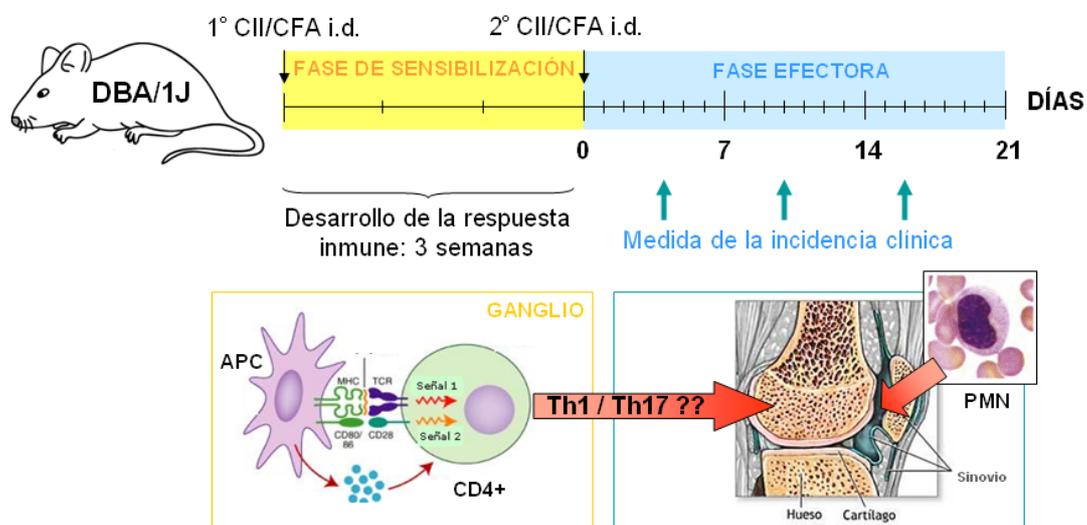


Fig. 5. Esquema del desarrollo de la AIC. El protocolo de inducción de la respuesta consiste en la inyección i.p. de CII con CFA para provocar la respuesta inmune en el ganglio linfático drenante, donde se presenta el antígeno y se genera una respuesta T y B específica contra el CII. Tras la reestimulación con CII+CFA se provoca la migración de los linfocitos efectores a la articulación, generando una respuesta inflamatoria que reproduce los síntomas clínicos de la artritis reumatoide.

El análisis de la respuesta inmune generada contra el CII reveló un aumento de la respuesta de células B y T en los ratones CD69^{-/-}, así como un aumento en la inflamación de las articulaciones y en la producción local de muchos mediadores inflamatorios. Sin embargo, este incremento estaba asociado con la disminución de la producción de TGF- β en el tejido inflamado. Dado que el TGF- β protege en modelos de AIC (Kuruvilla et al., 1991), estos resultados sugerían que la deficiencia en la producción de TGF- β 1 podía originar el incremento en la respuesta inflamatoria observada en los ratones CD69^{-/-} a través de la elevación de la producción de IL-1 β y diversas quimioquinas. Esta hipótesis se corroboró en experimentos de bloqueo del

TGF- β a nivel local mediante la administración de un anticuerpo bloqueante. Este bloqueo indujo un aumento significativo en la inflamación de las extremidades de los ratones control sometidos a AIC, sin embargo, no incrementó la inflamación en los ratones CD69^{-/-}. En conclusión, estos resultados sugieren que CD69 tiene un papel regulador negativo en la respuesta inmune a través de la producción de TGF- β .

Por este motivo, uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido el estudio de CD69 como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades mediadas por el sistema inmune, especialmente la artritis. Para ello se han estudiado los efectos en el desarrollo de la AIC de dos mAbs anti-CD69 generados en los ratones CD69^{-/-}.

8.5 Papel de CD69 en la respuesta inflamatoria asociada a la aterosclerosis.

CD69 se expresa persistentemente en células inmunitarias de las lesiones ateroscleróticas (Caspar-Bauguil et al., 1998) y recientemente se ha descrito que está inducido en una subpoblación de linfocitos T en ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE^{-/-}) (Khallou-Laschet et al., 2006). Este dato unido a los resultados previos que apuntaban a CD69 como modulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria (Esplugues et al., 2003; Sancho et al., 2003), originó la hipótesis de que alterando la función de CD69 se podría afectar el desarrollo de la aterosclerosis. Por este motivo, se estudió el curso de esta enfermedad en ratones apoE^{-/-} y en ratones deficientes en apoE y CD69 (apoE^{-/-}CD69^{-/-}) sometidos a una dieta que induce aterosclerosis (Gómez et al., 2009). Los resultados revelaron que los niveles de colesterol en plasma no estaban afectados por la ausencia de CD69 (Gómez et al., 2009). A pesar de que la manipulación genética produjo un aumento en la producción de IFN- γ e IL-10 en linfocitos T activados, los ratones apoE^{-/-} y apoE^{-/-}CD69^{-/-} alimentados con una dieta control y con una dieta rica en grasas, exhibían placas de ateroma del mismo tamaño y composición cuando se analizaron en distintas etapas de la enfermedad (Gómez et al., 2009). Tampoco se observaron diferencias en este modelo cuando se trató a los ratones apoE^{-/-} con mAb anti-CD69 *in vivo* (Gómez et al., 2009). Al contrario de lo observado en los trabajos anteriores, en el modelo de aterosclerosis desarrollado en ratones apoE^{-/-} la ausencia de CD69 no parece tener un papel funcional significativo.

8.4 Papel de CD69 en modelos de inflamación aguda.

El desarrollo y la progresión de las enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por el sistema inmune dependen de la infiltración persistente de células mononucleares

en los tejidos afectados (Cush y Lipsky, 1988). Además, los neutrófilos son mediadores importantes de los modelos de artritis en ratón.

La artritis inducida por anticuerpos anti-colágeno (AIAC) es un modelo mediado por granulocitos e independiente de los mecanismos reguladores dirigidos por las células T y B (Kagari et al., 2002) que se ha utilizado para investigar los mecanismos moleculares implicados en la fase efectora de la artritis. Utilizando este modelo experimental, Murata y col. han descrito que ratones deficientes en CD69 mostraban una menor severidad a este tipo de artritis (Murata et al., 2003). Como hemos visto, la AIC es un modelo experimental de artritis reumatoide en el cual los anticuerpos generados contra el CII son críticos para la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, en la AIAC los anticuerpos anti-CII son administrados exógenamente y junto con endotoxina, lo que provoca una respuesta inflamatoria aguda exacerbada.

Atendiendo a los datos descritos en este modelo, se podría hipotetizar que mientras TGF- β presenta un efecto predominantemente inhibitorio en células T y B (Gorelik y Flavell, 2001; Murata et al., 2003), esta citoquina puede actuar como agente activador y quimiotáctico de las células polimorfonucleares (Gorelik et al., 2002), que son las principales mediadoras de la AIAC. No obstante, también podría ocurrir que la reducción en la síntesis de TGF- β atenuara la respuesta inflamatoria. Para aclarar si CD69 tiene un papel sobre los neutrófilos en la fase efectora de la AIAC, así como en otros modelos de inflamación aguda mediada por neutrófilos, otro de los objetivos de esta tesis fue estudiar el papel de CD69 en este contexto.

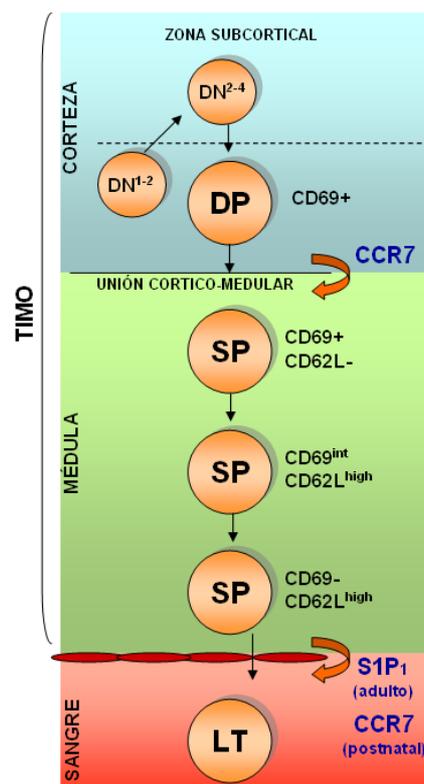
9. Efecto de CD69 en la migración celular.

Otros estudios *in vivo* han sugerido un importante papel de CD69 en migración celular. Los primeros trabajos realizados se hicieron en timo, ya que los timocitos inmaduros CD4⁺CD8⁺ dobles positivos (DP) que están sufriendo la selección positiva o negativa, expresan transitoriamente CD69. Estudios con ratones transgénicos que expresaban constitutivamente CD69 en todas las etapas del desarrollo de las células T mostraron que la sobreexpresión de CD69 provoca una acumulación de timocitos simples positivos (SP) maduros y funcionales en la médula del timo, lo que sugiere que debe haber un defecto en su migración hacia los órganos linfoides periféricos (Feng et al., 2002). Además, esta acumulación de linfocitos CD4⁺ SP y CD8⁺ SP en el timo se ha confirmado en otro trabajo, en el que se generaron ratones transgénicos de CD69 por un proceso independiente del anterior obteniendo los mismos resultados (Nakayama et al.,

2002). Por otra parte, también se ha observado que estos ratones transgénicos que expresaban constitutivamente CD69 no presentaban ninguna alteración en el desarrollo de los timocitos (Feng et al., 2002). En este sentido, los ratones CD69^{-/-} no muestran ningún defecto en los procesos de selección tímica, ni en las poblaciones de linfocitos T (Lauzurica et al., 2000), lo que sugiere que CD69 no parece desempeñar un papel crítico en la maduración de timocitos. Los mecanismos de selección en el timo están ampliamente estudiados, sin embargo, recientemente ha cobrado importancia el estudio de los mecanismos de regulación de la maduración tímica y de la liberación de células T maduras a la sangre. En este contexto, se ha descrito que la salida de timocitos de la médula del timo esta inhibida por agonistas del receptor de esfingosina 1 fosfato 1 (S1P₁) (Rosen et al., 2003).

El S1P₁ es un receptor acoplado a la proteína G α i que se expresa en altos niveles en los timocitos SP y en los linfocitos naïve y que tiene un papel básico en la salida del timo en ratones adultos (Matloubian et al., 2004). Por el contrario, en ratones recién nacidos las interacciones CCL19 (Chemokine (C-C motif) ligand 19) y CCR7 (chemokine (C-C motif) receptor 7) se han descrito como las principales mediadoras del proceso (Ueno et al., 2002). S1P₁ es también un mediador esencial de la salida de linfocitos de los órganos linfoides secundarios hacia los vasos linfáticos eferentes (Mandala et al., 2002; Matloubian et al., 2004), lo que le convierte en un receptor fundamental en los procesos de recirculación de los linfocitos.

Figura 6. Esquema de los distintos estadios de maduración de los timocitos hasta su salida del ganglio. Los distintos eventos de la maduración de timocitos requieren la localización de los mismos en los sitios específicos del timo. Las células DP expresan CD69 tras el proceso de selección positiva e incrementan la expresión de CCR7, lo que permite su migración de la corteza a la médula. Ya en la médula, la expresión de CD69 va decayendo en el tiempo en paralelo con el proceso de maduración de los timocitos y con el aumento de expresión en membrana S1P₁, que finalmente permite la salida de los linfocitos del timo en respuesta al estímulo quimiotáctico de S1P.



Otros estudios han relacionado a CD69 con el receptor de S1P₁ al observar que la inhibición de la salida del timo de los timocitos maduros, mediada por un agonista selectivo del receptor de S1P₁, correlacionaba con la modulación en la expresión de CD69 en la membrana (Alfonso et al., 2006). Posteriormente se ha observado que los linfocitos CD69^{-/-} no inhiben su capacidad de respuesta a S1P₁ después de ser tratados con IFN- α/β , una potente señal de inducción de CD69, como ocurre en los linfocitos control, y que son pobremente retenidos en los órganos linfoides secundarios tras el tratamiento con ácido policitídilico (PolyI:C), un ARN de doble cadena mimético que provoca el rápido descenso del número de linfocitos en sangre y linfa por inhibición de su salida de los órganos linfoides secundarios (Shiow et al., 2006).

El mecanismo propuesto para explicar este fenómeno sugiere que CD69 estaría regulando la expresión en membrana de S1P₁ en linfocitos, ya que en experimentos de coexpresión se ha observado que CD69 inhibe la función quimiotáctica de S1P mediante la modulación negativa de S1P₁ en membrana (Shiow et al., 2006). Además también se ha sugerido que CD69 y S1P₁ deben estar asociados formando un complejo, ya que en un ensayo *in vitro* la señalización a través de S1P₁ provocó la activación del receptor quimérico CD69-CD3 ζ en células transfectantes estables de NFAT acoplado a la proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein). Por otro lado, CD69 coimmunoprecipitó con S1P₁ pero no con un receptor de la misma familia, el S1P₃ (Shiow et al., 2006).

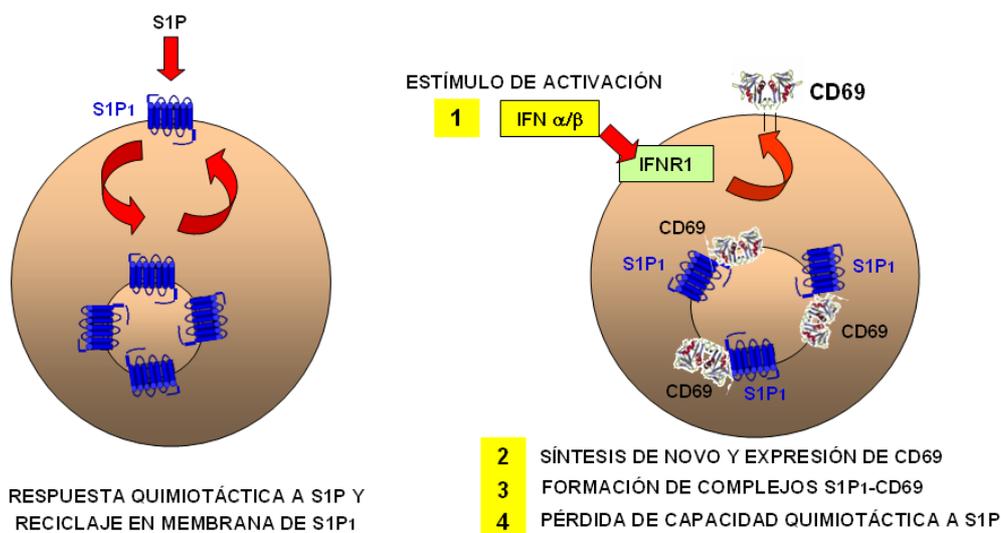


Figura 7. CD69 forma un complejo con S1P₁ y regula negativamente su expresión en membrana. El mecanismo que proponen Shiow y col. consiste en la exclusión mutua de la membrana de CD69 y S1P₁. El tratamiento con IFN α/β provoca la rápida expresión de CD69 en membrana, y este proceso promueve la internalización de S1P₁ y la retención del linfocito en ganglio.

10. Modelo de hipersensibilidad por contacto.

A pesar de que los datos *in vivo* indican que CD69 actúa como un modulador importante de las respuestas inflamatorias, el mecanismo por el cual está implicado en la regulación de los procesos inflamatorios aún no se ha descrito y además queda por explorar un posible efecto de CD69 en la diferenciación de las células T cuando se establece la respuesta inmune. Tampoco se ha estudiado la contribución de CD69 como regulador de la migración a través de la modulación de la expresión en membrana de SIP₁ en los modelos estudiados hasta ahora. Con el fin de poder analizar todos estos puntos, en este trabajo se decidió estudiar la respuesta de los ratones CD69^{-/-} en la hipersensibilidad por contacto (HSC). La ventaja de utilizar este modelo es que permite analizar la respuesta inmune en dos fases claramente diferenciadas, una de sensibilización y otra de resolución. La HSC se engloba dentro de las hipersensibilidades de tipo retardado y es una respuesta inmune mediada por células T. La inducción de la HSC comienza con la exposición a alérgenos activos (haptenos) en la epidermis. Los haptenos no son capaces de estimular por sí solos una respuesta inmune adaptativa y por eso es necesaria su asociación estable con las proteínas de la superficie de las células de la piel.

Las células de Langerhans (LC) así como las células dendríticas dermales (dDC) transportan el antígeno desde la piel hasta los ganglios linfáticos donde es presentado a las células T (Kripke et al., 1990; Macatonia et al., 1987). La epidermis es una fuente rica de citoquinas, algunas de ellas se expresan constitutivamente mientras que otras necesitan del estímulo apropiado para ser inducidas. Las citoquinas liberadas en la epidermis que representan un papel más relevante en la movilización de las LCs y las dDCs son el TNF- α , la IL-1 β y la IL-18 (Jakob et al., 2001). Cuando estas células presentadoras llegan al ganglio linfático que drena la piel afectada, generan una respuesta T específica de hapteno con generación de linfocitos T memoria. Durante bastante tiempo se ha pensado que la HSC era un modelo principalmente mediado por linfocitos T citotóxicos Th1 productores de IFN- γ , sin embargo recientemente se ha demostrado un nuevo mecanismo, implicando la generación de células CD8⁺ productoras de IL-17 (Th17) (He et al., 2006).

Cuando la piel es tratada de nuevo con la sustancia irritante se desencadena la fase de resolución, que se caracteriza por la rápida infiltración y activación de los linfocitos T específicos generados en el ganglio, así como de neutrófilos y macrófagos en la zona

de la piel expuesta y por la consiguiente inflamación cutánea. Esta fase se inicia con la producción de citoquinas por parte de los queratinocitos en respuesta al irritante, como el TNF- α . Estas citoquinas inducen la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, como E-selectina, ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1) y VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1), promoviendo el reclutamiento de células T de memoria específicas de hapteno a la piel.

Los modelos más utilizados para generar hipersensibilidad por contacto en ratón consisten en la aplicación tópica de 2,4-dinitro-1-fluorobenceno (DNFB) o de oxazolona (Ox) tras la sensibilización previa con la misma sustancia, lo que desencadena la reacción de hipersensibilidad. La magnitud de la respuesta se suele determinar midiendo el engrosamiento producido en la piel.

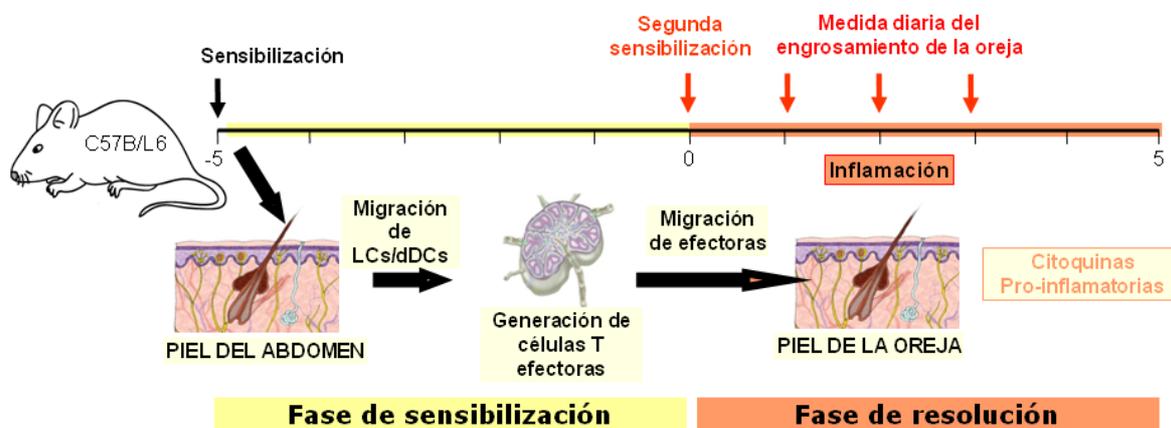


Fig. 8. Esquema del modelo de HSC utilizando Ox. *Fase de sensibilización:* el protocolo de inducción de la respuesta consiste en la sensibilización de la piel del abdomen con Ox, lo que provoca la modificación de algunas proteínas de la superficie de las células de la epidermis. Las LCs y dDCs presentes en la epidermis y la dermis respectivamente migran hacia el ganglio linfático que drena la zona y presentan el antígeno generando una respuesta T hapteno específica con generación de linfocitos T memoria. *Fase de resolución:* la estimulación secundaria de la piel en la oreja con Ox provoca la migración de los linfocitos T efectoras generados en el ganglio, provocando una respuesta inflamatoria que cursa con enrojecimiento e hinchazón de la oreja.

OBJETIVOS

En este trabajo de investigación se han analizado distintos aspectos funcionales del receptor inducible durante la activación leucocitaria CD69. El abordaje experimental se ha centrado en los siguientes apartados:

Estudiar el posible papel de CD69 como diana terapéutica:

- Caracterizar *in vitro* el efecto de dos anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD69 generados en ratón, el mAb 2.2 y el mAb 2.3.
- Analizar los efectos de los mAb anti-CD69 *in vivo*.
- Estudiar el desarrollo de la artritis inducida por colágeno tras el tratamiento con los mAb anti-CD69.

Estudiar el papel funcional de CD69 en modelos de inflamación aguda mediada por neutrófilos.

- Caracterizar la artritis inducida por anticuerpos anti-colágeno II en ratones deficientes en CD69 (CD69^{-/-}).
- Estudiar la posible implicación de CD69 en el reclutamiento de neutrófilos en respuesta a estímulos inflamatorios en otros modelos *in vivo*.

Analizar la respuesta inmune de los ratones CD69^{-/-} en un modelo de hipersensibilidad por contacto.

- Caracterizar la respuesta inflamatoria y la respuesta T efectora en los ganglios linfáticos de los ratones CD69^{-/-} tratados con oxazolona.
- Estudiar la fase de sensibilización de la hipersensibilidad por contacto utilizando un modelo de migración de células dendríticas (DCs) *in vivo* desde la piel hasta los ganglios linfáticos drenantes.
- Caracterizar la expresión y función de las principales subpoblaciones de DCs en los ratones CD69^{-/-}.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones:

Los ratones deficientes en CD69 (CD69^{-/-}) se mantienen en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid bajo condiciones libres de patógenos. Para la producción de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD69 se utilizaron ratones CD69^{-/-} en el fondo genético de BALB/c (más de 12 generaciones cruzadas entre sí). Todos los experimentos relacionados con el modelo de artritis inducida por colágeno se han realizado en ratones DBA/1j que fueron comprados a Charles River (Barcelona, España). Para el modelo de AIAC se utilizaron grupos de hembras de fondo genético de BALB/c de 7–8 semanas CD69^{-/-} y controles normales. Por último, para el resto de modelos utilizados y para la generación de células dendríticas (DCs) diferenciadas a partir de precursores de médula ósea se han utilizado ratones C57BL/6 de 7–8 semanas CD69^{-/-} y controles normales. Todos los procedimientos que implican a estos animales y sus cuidados se han llevado a cabo de acuerdo con las directrices institucionales que están en conformidad con las leyes y políticas internacionales de ética animal.

2. Células primarias de ratón:

Las células de ratón se obtuvieron de los órganos linfoides por disgregación mecánica y se cultivaron en RPMI 1640 (con GlutaMAX I, 25 mM HEPES) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), 10% de suero fetal bovino descomplementado (FBS) (Invitrogen) y 50 μ M β -mercaptoetanol (Invitrogen). La purificación de subpoblaciones celulares del bazo y tejido sinovial se realizó empleando microesferas magnéticas capaces de unirse a anticuerpos específicos biotinilados (BD-Pharmingen, San Diego, CA) con los que se realizó la selección positiva de las poblaciones que rindió con una pureza superior al 98% en un separador AUTOMACS (Miltenyi Biotec, Gladbach, Alemania).

2.1. DCs diferenciadas *in vitro* a partir de precursores de la médula ósea:

Se obtuvieron precursores de la médula ósea de huesos largos de las extremidades posteriores de los ratones y se cultivaron en RPMI 1640 con 10% FBS, 50 μ M β -mercaptoetanol y 100 ng/ml de la citoquina Flt3-Ligando (Flt3-L, Fms-like Tyrosine kinase Ligand) (Peprotech, Londres, UK). Los cultivos de Flt3-L derivados de médula ósea generan dos tipos de subpoblaciones de DCs CD11c⁺, que pueden definirse por sus niveles de expresión de B220 o CD11b (Brawand et al., 2002; Gilliet et al., 2002). Las

CD11c⁺ B220⁺ CD11b⁻ corresponden a las DCs plasmacitoides (pDC), mientras que las CD11c⁺ B220⁻ CD11b⁺ son equivalentes a las DCs convencionales (cDC). Estas subpoblaciones se aislan en base a su expresión diferencial de B220 y CD11b utilizando el separador AUTOMACS. Su maduración fue inducida con CpG oligodeoxinucleotido (ODN)-1826: TCCATGACGTTCTGACGTT (24 h, 6 µg/ml), ligando del receptor tipo Toll 9 (TLR-9, Toll-like Receptor 9), o con lipopolisacárido bacteriano (LPS) (serotipo de *E. coli* O111:B4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) (24 h, 1 µg/ml), ligando del TLR-4.

2.2. DCs aisladas *ex vivo* de los órganos linfoides:

Para aislar las DCs CD11c⁺ residentes en el bazo o el timo, se disgregaron mecánicamente los órganos, y se digirieron con colagenasa A (0.5 mg/ml; Roche Diagnostics GmbH, Alemania) y DNasa I (40 µg/ml; Boehringer Mannheim, Alemania) en RPMI 1640 suplementado con 5% FBS, durante 10 min a 37°C en agitación continua. Los fragmentos digeridos se filtraron y las suspensiones celulares se lavaron dos veces en PBS suplementado con 5% FBS, 5 mM EDTA y 5 µg/ml DNasa I. Posteriormente, las suspensiones celulares se resuspendieron en solución isosmótica Optiprep (Nyegaard Diagnostic, Oslo, Noruega) (pH 7.2, densidad 1.061 g/cm³) y se centrifugaron a 1700 rpm durante 10 min a 4°C para enriquecer la población inicial en DCs.

La maduración *in vivo* de las DCs se indujo mediante la inyección i.v. de 25 µg de LPS de *E. coli* (Sigma-Aldrich) o 5 µg de CpG-ODN-1826. El análisis de los marcadores de maduración por citometría de flujo se realizó 9 días después.

2.3. Subpoblaciones de DCs obtenidas de la piel:

En este trabajo se han utilizado dDCs y LCs extraídas de la dermis y la epidermis respectivamente. Para ello, se obtuvieron muestras de piel de la oreja de ratones CD69^{-/-} y ratones de fenotipo salvaje, se lavaron en etanol al 70% y en PBS durante 5 min y posteriormente se separó mecánicamente la parte ventral y dorsal de la oreja. Las dos capas obtenidas se incubaron en una solución de Tripsina 0.5% (Tripsina de páncreas porcino, Sigma-Aldrich) en PBS 3% FBS, durante 45-60 min a 37°C en agitación. Después de esta incubación se lavaron las muestras con PBS 3% FBS y se separó mecánicamente la epidermis de la dermis. Para extraer las dDCs y las LCs del tejido, se cultivaron por separado en placas de p24 (Costar, Sigma-Aldrich) la dermis y la

epidermis, en medio RPMI 1640, 10% FBS, 50 μ M β -mercaptoetanol, GM-CSF recombinante 100 ng/ml (ImmunoTools GmbH, Alemania) y se mantuvieron durante 18 h a 37°C. Posteriormente se recuperaron las células del sobrenadante y se analizaron por citometría de flujo.

3. Técnicas generales:

3.1. Análisis por PCR semicuantitativa a tiempo real:

Las muestras de tejido se homogeneizaron con un Polytron (Kineamtica, Littau, Switzerland), y el ARN total se aisló utilizando Ultraspec ARN reagent (Biotechx, Houston, Texas). Para sintetizar ADNc se utilizaron 2 μ g de ARN tratado con DNaseI y la enzima ImPromII RT (Roche Diagnostics Ltd, Lewes, UK). La PCR semicuantitativa a tiempo real se realizó en un termociclador Lightcycler (Roche) utilizando oligonucleótidos (oligos) específicos para las diferentes citoquinas, que generan productos de unas 200 pb de longitud. El resultado para cada citoquina se normalizó a los niveles de expresión de GAPDH, que fue medido en paralelo en cada muestra. Las secuencias de los oligos utilizados son las siguientes:

Oligos	Secuencia 5' - 3' Forward	Secuencia 5' - 3' Reverse
GAPDH	TGGGTGTGAACCACGAA	ACAGCTTTCCAGAGGG
TGF-β	CCGAAGCGGACTACTAT	GTAACGCCAGGAATTGT
IL-1β	TCACGCAGGCAGTATC	GTCGTTGCTTCGTTCT
IL-6	GCGACTTCCATCCAGTTGCC	TTCTGCAAGTGCATCATCG
MCP-1	CACCAGCAAGATGATCC	ATAAAGTTGTAGGTTCTGATCTC
IL-17A	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC	GGGTCTTCATTGCGGTGG
IL-4	TAGTTGTCATCCTGCTCTT	CTACGAGTAATCCATTTGC
TNF-α	GCAAGCTTCGCTCTTCTGTCTAC TGAACTTCGG	GCTCTAGAATGAGATAGCAAATCG CGTGACGG
IFN-γ	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA

3.2. Citometría de flujo:

Las células se incubaron con una mezcla de mAb anti-CD16/CD32 (BD-PharMingen) para bloquear los receptores de Fc. Posteriormente se tiñeron durante 30 min en hielo con anticuerpos conjugados a ficoeritrina (PE), isotiocianato de

fluoresceína (FITC) o alofocianina (APC) o con anticuerpos biotinilados seguidos de estreptavidina conjugada a PE, APC o PerCP (PerCP, Peridinin-chlorophyll-protein Complex) (todos de BD-PharMingen). Finalmente las células se lavaron y se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA). En los ensayos se han adquirido >10.000 eventos por condición y se han analizado utilizando el programa CellQuestPro de BD.

Los anticuerpos que se han utilizado para citometría de flujo son todos de BD-PharMingen y se enumeran a continuación (molécula y clon): CD3 (145-2C11), CD4 (L3T4), CD8 (53-6.7), CD69 (H1.2F3), CD25 (7D4), B220/CD45R (RA3-6B2), CD11b (M1/70), CXCR4 (CD184), CD11c (HL3), MHC II (I-A/I-E, 2G9), CD86 (GL1), CD80 (B7-1, 16-10A1), CD40 (3/23).

Para los experimentos de tinción intracelular de citoquinas, las células fueron lavadas extensivamente con PBS y estimuladas durante 4 h con 50 ng/ml de PMA y con 750 ng/ml ionomicina más brefeldina A (todos de Sigma-Aldrich) a 1 µg/ml. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 2% y se permeabilizaron con saponina al 0.5% y se tiñeron con anticuerpos contra IFN- γ (XMG1.2), IL-17 (TC11-18H10), IL-4 (11B11) o FoxP3 (MF23), todos de BD Pharmingen y se analizaron por citometría de flujo.

3.3. Inmunotransferencia (WB, Western Blot):

Se utilizaron DCs diferenciadas *in vitro* a partir de precursores de la médula ósea con Flt3-L y se seleccionaron negativamente las cDCs utilizando B220 Microbeads (MACS, Miltenyi Biotec) para eliminar las pDCs (B220⁺CD11b⁻) en el separador AUTOMACS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lisaron con el kit “ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit” (Calbiochem), para obtener el extracto de membrana. Se cargaron 20µg del extracto de proteínas de membrana en un gel SDS-PAGE del 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Trans-Blot (BioRad, Hercules, CA). Los anticuerpos utilizados para revelar el WB fueron: anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y anti-S1P₁ (Cayman Chemical, Michigan).

3.4. Ensayos de trans migración:

La migración de cDCs diferenciadas *in vitro* a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L se analizó en cámaras de quimiotaxis “Transwell” (Costar),

como describen del Pozo y col. (del Pozo et al., 1995). En estos ensayos la cámara de quimiotaxis se coloca sobre un pocillo que contiene 400 μ l de medio con los distintos estímulos y se añaden $3 \cdot 10^5$ células en 100 μ l en la cámara superior. Para estos ensayos se utilizó medio RPMI 1640 suplementado con 0.1% de BSA libre de ácidos grasos (Equitech Bio Inc, Kerville, TX) y S1P recombinante (Cayman Chemical) a las concentraciones comprendidas entre 0.1 y 10 μ M. Tras 2.5 h de incubación, las cDCs que han migrado a través de la membrana de la cámara de quimiotaxis se recogieron del pocillo inferior, se contaron en el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA) y se analizaron fenotípicamente utilizando los mAb anti-B220-FITC y anti-CD11b-PE (BD).

3.5. Determinación de la producción de citoquinas:

Para cuantificar la producción de citoquinas por los linfocitos T generados en respuesta a oxazolona en el modelo de HSC, se extrajeron las células totales del ganglio linfático drenante (inguinal) después de 5 días de la estimulación de la epidermis del abdomen con el hapteno. Los linfocitos totales fueron estimulados con anti-CD3 (BD-PharMingen) (10 μ g/ml) durante 24 h y los sobrenadantes de cultivo se recogieron para analizar la producción de IFN- γ e IL-4 por ELISA (**E**nzyme **L**inked **I**mmuno **S**orbent **A**ssay) (eBioscience, San Diego, CA).

4. Técnicas de imagen:

4.1. Cortes histológicos:

Las muestras provienen de las orejas de ratones tratados con Ox y se obtuvieron 48 h después de la estimulación secundaria con Ox al 1%. Las orejas se fijaron con formalina y se embebieron en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 μ m de espesor. Tras ello las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las muestras se analizaron con objetivos 4x, 10x y 20x de un microscopio de fluorescencia de la marca Nikon (Nikon eclipse 90i).

4.2. Inmunofluorescencia de la dermis y epidermis:

Se utilizaron muestras de dermis y epidermis de oreja de ratones CD69^{-/-} y de ratones control, obtenidas tal como se explica en el apartado 2.3, para analizar la

distribución de células MHC-II⁺ por inmunofluorescencia. Para ello se fijaron las muestras de tejido con acetona y se tiñeron con MHC II FITC (I-A/I-E, BD). Las muestras se montaron en solución de Mowiol (Calbiochem, San Diego, CA) y se analizaron con objetivos 10x y 20x de un microscopio de fluorescencia de la marca Nikon (Nikon eclipse 90i).

4.3. Microscopía multifotón:

Para analizar la distribución de las DCs en los ganglios linfáticos de ratones CD69^{-/-} se llevaron a cabo ensayos de microscopía multifotón del ganglio fijado 18 h después de haber inyectado *in vivo* DCs diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L y maduras con LPS (24 h, 1 µg/ml). Las células fueron marcadas previamente con sondas fluorescentes: Sonda naranja (CellTracker orange, CMTMR) y sonda azul (CellTracker blue, CMAC), ambas de Molecular Probes (Invitrogen). Se inyectaron 5.10⁵ células en cada almohadilla plantar de las extremidades traseras de los ratones. En cada extremidad se inyectó una combinación distinta de células marcadas, es decir, DCs CD69^{-/-} CMAC + DCs WT CMTMR y DCs CD69^{-/-} CMTMR + DCs WT CMAC. Con esto se eliminan las diferencias de movilidad que pueda provocar la propia sonda.

A las 16 h se inyectó anti-PNAd (Meca79/Alexa 594, BD Biosciences), que permite teñir las vénulas de endotelio alto del ganglio. Se inyectó 1 µg de anticuerpo por ratón *i.v.* y se dejó actuar 30 min. Pasado este tiempo, se sacrificó a los ratones y se extrajeron los ganglios poplíteos de cada extremidad, eliminando todo resto de grasa y de vasos linfáticos. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 1 h en agitación. Posteriormente se lavaron en PBS y se incluyeron en agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Invitrogen). Después se congelaron a -20°C y se deshidrataron durante 6 h con metanol. Por último, los bloques se trataron con una solución de BABB, Benzyl alcohol (Sigma-Aldrich) y Benzyl benzoato (Sigma-Aldrich), en proporción 1:2 durante 18 h. El BABB aporta una elevada transparencia al bloque de agarosa, permitiendo una visualización de hasta 650 µm de espesor con el microscopio multifotón (Olympus, BX50WI fluorescence con un sistema Bio-Rad Radiance 2000 MP Confocal/Multiphoton, controlado por el software Lasersharp de Bio-Rad Laboratories). Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Volocity^R para Mac.

5. Modelos de ratón

5.1. Artritis inducida por colágeno. Inducción y seguimiento:

Se preparó CFA mezclando 20 mg de *M. tuberculosis* inactivado por calor (H37Ra; Disco, Detroit, MI) con 20 ml de adyuvante de Freund incompleto (Sigma- Aldrich). El CII de pollo (Sigma-Aldrich) se disolvió durante 16 h a 4°C en 10 mM de ácido acético a una concentración final de 2 mg/ml y se mezcló con un volumen idéntico de CFA. Los ratones fueron inyectados i.d. en la base del rabo y reestimulados los días 21 y 38, siguiendo un protocolo modificado del que describen Campbell y col. (Campbell et al., 2000). Los ratones control se trataron con CFA sin CII. La severidad de la artritis se siguió analizando los síntomas clínicos de las extremidades delanteras de acuerdo con la siguiente escala: grado 0, sin hinchazón; 1, ligera hinchazón y eritema; 2, inflamación pronunciada; 3, rigidez en la articulación. La inflamación de las articulaciones de las extremidades traseras se midió con un calibre digital. Cada extremidad recibe un valor según la escala anterior, pudiendo establecerse un máximo de 12 puntos por ratón.

5.2. Transferencia adoptiva de artritis:

Se purificaron células T de los ganglios inguinales de ratones DBA/1 dos días después de la estimulación con CII + CFA y se trataron *in vitro* con el mAb 2.3 o su control de isotipo, el mAb 2.2 (IgG2a), en presencia de complemento de conejo (Serotec, Oxford, UK). La lisis parcial de las células CD69⁺ se comprobó por citometría de flujo y se inyectaron i.v. $5 \cdot 10^5$ células a ratones DBA/1 no inmunizados. Posteriormente estos ratones fueron inyectados con CFA-CII y se siguió el desarrollo de la AIC como se ha explicado en el apartado anterior.

5.3. Artritis inducida por anticuerpos anti-CII:

Se inyectaron i.v. grupos de ratones CD69^{-/-} BALB/c y controles BALB/c con 2 mg de una combinación de cuatro mAb diferentes generados por el hibridoma B de ratón de Arthrogen-AICJ (Chemicon International, Inc). Después de 2 días, se inyectaron i.p. 50 µl de LPS (Sigma-Aldrich) por ratón. La artritis comienza a desarrollarse 4 días después de la inyección de la mezcla de anticuerpos, observándose el enrojecimiento de las articulaciones, a los 6 días está bien establecida, con al menos dos extremidades severamente enrojecidas e inflamadas y alcanza su máxima intensidad entre los días 7 y 8 después del inicio del tratamiento.

5.4. Modelos de reclutamiento de neutrófilos:

- Modelo de reclutamiento a cavidades de aire dorsales en respuesta a zimosano:

Se provocó la formación de cavidades de aire en el dorso de ratones BALB/c a partir de inyecciones de 5 ml de aire estéril s.c. a día 0 y 3 ml a día 3. Los ratones se anestesiaron previamente con ketamina/xylazina. El sexto día se inyectaron en la cavidad 0.5 ml de suero salino estéril o 0.5 ml 1% p/v de zimosano A (Sigma-Aldrich) diluido en suero salino. Después de 4 h los ratones se sacrificaron y las cavidades de aire fueron lavadas una vez con 5 ml PBS-EDTA para recoger el infiltrado celular y el fluido exudado. Todas las suspensiones se lavaron una vez con PBS, se resuspendieron en 0.5 ml de PBS y se cuantificaron por citometría de flujo utilizando una concentración conocida de fluoroesferas de poliestireno como control. Como estaba previamente descrito, se comprobó que >90% de las células del exudado eran neutrófilos (Konno y Tsurufuji, 1983).

- Modelo de reclutamiento peritoneal en respuesta a tioglicolato:

Se inyectaron i.p. grupos de ratones normales y CD69^{-/-} con 2 ml de una solución al 4% p/v de tioglicolato (Sigma-Aldrich). A las 4 h del tratamiento los ratones se sacrificaron y las células se recogieron lavando la cavidad peritoneal con 10 ml de medio RPMI 1640 incompleto. Los eritrocitos presentes en el lavado se eliminaron mediante lisis hipotónica. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 1 ml RPMI 1640 al 10% de FBS. El número de neutrófilos fue determinado utilizando un hemocitómetro Neubauer. Las células se analizaron mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos específicos contra Gr-1 y F4/80 (BD Pharmingen). Más del 80% de las células analizadas eran neutrófilos caracterizados por Gr-1⁺ y F4/80⁻.

5.5. Modelo de hipersensibilidad por contacto en respuesta a oxazolona:

La HSC fue inducida tratando la piel del abdomen de los ratones con 50 µl de Ox (4-Etoximetileno-2-fenil-2-oxazolin-5-ona, Sigma-Aldrich) al 3% en etanol y con 10 ml en cada almohadilla plantar de las extremidades traseras. Tras 5 días se realizó una estimulación secundaria con 10 µl de Ox al 1% en cada lado de la oreja derecha. La oreja izquierda se utilizó como control y fue tratada sólo con etanol.

La inflamación de la oreja se midió diariamente durante 4 días utilizando un calibre digital. El engrosamiento neto de la oreja en mm se calculó sustrayendo la medida

obtenida en la oreja tratada con etanol de la medida de la oreja tratada secundariamente con Ox. Para el análisis de la respuesta T *in vivo*, los ganglios inguinales se extrajeron 5 días después de la sensibilización en la piel del abdomen, se disgregaron y se filtraron las suspensiones celulares. Posteriormente, se realizó la tinción intracelular de las citoquinas IFN- γ e IL-17 y del factor de transcripción FoxP3, siguiendo el protocolo que se detalla en el apartado de citometría de flujo.

5.6. Modelo de migración de dDCs y LCs de la piel a los ganglios linfáticos con FITC-acetona-dibutilfalato:

Se trató la piel del abdomen de los ratones con 100 μ l de una mezcla de FITC (Sigma-Aldrich) a concentración final de 5 mg/ml disuelto en dibutilfalato y acetona 1:1 (vol:vol). Los ratones fueron sacrificados a las 18, 24 o 48 h de la sensibilización y se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales. Los ganglios fueron incubados durante 10 min a 37°C en una mezcla de Colagenasa A (Sigma-Aldrich) a 0.5 mg/ml, y DNasa I 0.1% glicerol en medio RPMI 1640, 10% FBS, 5 mM EDTA. Posteriormente se realizaron las suspensiones celulares de los ganglios, se contó el número de total células y se marcaron para su análisis por citometría de flujo.

6. Ensayos para la caracterización de los anticuerpos anti-CD69

6.1. Generación y caracterización *in vivo* de los anticuerpos monoclonales anti-CD69:

Los anticuerpos anti-CD69 de ratón se generaron mediante la fusión de células NS-1 de mieloma con células de bazo procedentes de ratones CD69^{-/-} previamente inmunizados con células pre-B 300-19 de ratón, como se describe en la bibliografía (Esplugues et al., 2003; Sancho et al., 2003).

Para determinar el efecto *in vivo* del anticuerpo anti-CD69 2.3, se inyectaron ratones DBA/1 con Concanavalina A (Con A) a razón de 50 μ g por extremidad y por inyección, para inducir la expresión de CD69 en los ganglios linfáticos drenantes. Se inyectaron 300 μ g i.v. de anti-CD69 2.3 y su control de isotipo, el anticuerpo monoclonal 2.22, y se estudió la posible depleción de las células T CD69⁺ por citometría de flujo.

Como ensayo directo para determinar el posible papel del mAb 2.3 en la depleción de células CD69⁺ *in vivo*, se utilizaron linfoblastos T de bazo obtenidos de ratones C57BL/6 normales o CD69^{-/-} cultivados durante 4 días en presencia de IL-2 (100 U/ml). La IL-2 recombinante humana se obtuvo de M. Gately (Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ) y fue proporcionada por el programa “National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent program, Division of AIDS”. Posteriormente, se recogieron, se lavaron y se resuspendieron a una concentración final de 10⁷ células/ml en medio RPMI 1640, y se marcaron con 0.5 μM de carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE; Molecular Probes, Invitrogen) incubándolos durante 15 min a 37°C. Tras la incubación, el exceso de CFSE fue eliminado por adición de RPMI 1640, 10% FBS. Tras el marcaje, las células se resuspendieron en medio a una concentración de 5.10⁷ células/ml y se inyectaron a los ratones 200 μl de la suspensión i.v. en la vena de la cola. Los ratones fueron de nuevo inyectados i.p. con 300 μg de mAb anti-CD69 o su control de isotipo. Tras 48 h, las células del bazo de los ratones inyectados se analizaron por citometría de flujo para estudiar la expresión de CD8 y se determinó la proporción de células CFSE⁺. Para el tratamiento de la AIC, tras la inmunización con CII (día 21), los anticuerpos anti-CD69 se inyectaron i.p. (500 μg por inyección) a los tiempos indicados.

6.2. Ensayos de citotoxicidad:

Se extrajeron células de bazo de ratones control o CD69^{-/-} tratados con 5 μg/ml de Con A durante 24 h y posteriormente se cultivaron en presencia de IL-2 (100 U/ml), estas células se utilizan como células diana. Las células diana se cargaron con 100 μCi de Na₂ ⁵¹CrO₄ (Amersham Pharmacia Biotech) durante 2 h a 37°C, se lavaron cuatro veces y se cultivaron en RPMI 1640 incompleto en placas de 96 pocillos (1.10⁴ células). Los mAb se añadieron a la concentración final indicada y las placas se incubaron 15 min a 4°C. Después se añadió complemento de conejo (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá) a una dilución final de 1/10. Seguidamente las placas se incubaron durante 45 min a 37°C y se centrifugaron a 200 g durante 5 min. Se midió la radiactividad de cada sobrenadante y se calculó el porcentaje de lisis específica de la siguiente manera: % de lisis específica = [(cpm de la muestra – cpm espontáneas) / (cpm máximas – cpm espontáneas)] x 100. La liberación espontánea de ⁵¹Cr es siempre <10% de las cpm máximas.

6.3. Ensayos funcionales *ex vivo* tras el tratamiento con el mAb anti-CD69 2.3:

Para determinar si el tratamiento *in vivo* con el mAb 2.3 afectaba al patrón de secreción de citoquinas por las células T efectoras, se inyectó una mezcla de CFA + CII preparado como se ha explicado anteriormente a ratones DBA/1 en la almohadilla plantar y seguidamente se inyectaron los mAb anti-CD69 i.p. o su control de isotipo (300 µg/ratón). Después de 5 días se extrajeron los ganglios linfáticos drenantes y se incubaron las células obtenidas en placas de 96 pocillos con CII hervido (100 µg/ml) durante 48 h. Posteriormente, se realizó la tinción intracelular de IL-4 e IFN- γ como se describe en el apartado de citometría de flujo.

Para los ensayos de proliferación celular se extrajeron los ganglios linfáticos y se cultivaron los linfocitos en placas de 96 pocillos en presencia de distintas dosis de CII hervido o de un mAb anti-CD3 (10 µg/ml). Las células se incubaron durante 48 h y se cargaron con 1 µCi por pocillo de timidina [metil- ^3H] (Amersham, Little Chalfont, UK) durante las últimas 12 h de cultivo. Finalmente las células se recogieron en filtros de fibra de vidrio para determinar la concentración de timidina [^3H] absorbida.

RESULTADOS

1. Estudio de CD69 como diana terapéutica en artritis:

Como ya hemos tratado en la introducción, CD69 actúa como regulador negativo en la artritis inducida por colágeno (AIC) (Sancho et al., 2005). Para evaluar las potenciales estrategias terapéuticas de esta molécula, se generaron dos anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD69 de ratón y se estudiaron sus efectos en la AIC.

1.1. Caracterización *in vitro* de los mAb anti-CD69

La inmunización de los ratones CD69^{-/-} con células de ratón que están expresando CD69 permitió la selección de dos anticuerpos anti-CD69, el 2.2 (isotipo IgG1) y el 2.3 (isotipo IgG2a). En primer lugar se estudió la capacidad *in vitro* de estos dos anticuerpos para mediar citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) en células diana que expresaran CD69. Para ello se cultivaron células de bazo con Con A para inducir la expresión de CD69 y se incubaron con los anticuerpos anti-CD69 más proteínas del complemento de conejo. El mAb 2.3 indujo la lisis de estas células de manera dosis dependiente, mientras que el 2.2 no indujo CDC a ninguna de las dosis ensayadas (Fig. 9).

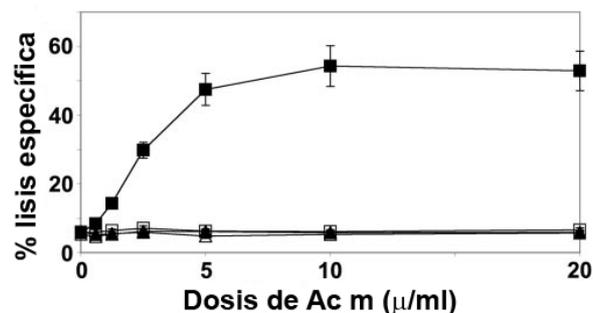


Fig. 9. El mAb anti-CD69 2.3 produce CDC. Se activaron células de bazo con Con A y se cargaron con ⁵¹Cr como está indicado en Materiales y Métodos. Después se añadieron distintas diluciones de mAb anti-CD69 2.2 (▲) o 2.3 (■) o sus controles de isotipo, 2.8 (Δ) o 2.22 (□), respectivamente, en presencia de complemento de conejo y se determinó el porcentaje de lisis específica. En la gráfica se representa la media aritmética \pm DE de tres experimentos independientes.

Posteriormente se analizó la capacidad de estos anticuerpos de unirse a los receptores Fc empleando células dendríticas (DCs) de ratones CD69^{-/-} diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L (como se describe en Materiales y Métodos). En este caso, se observó que el mAb 2.3 se unía específicamente a receptores Fc, ya que esta unión se podía bloquear tratando las DCs con el mAb anti-

CD16/32, que reconoce específicamente CD16, el receptor de Fc de IgG de baja afinidad III (FcR III) y CD32, el FcR II. Por el contrario, el mAb 2.2 no se une a los receptores Fc expresados por las DCs diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea (Fig. 10).

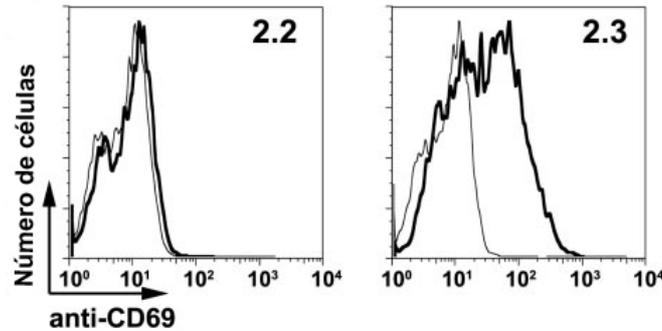


Fig. 10. Unión de los mAbs anti-CD69 a los receptores Fc en DCs. Se generaron DCs a partir de precursores de la médula ósea de ratones CD69^{-/-} como se indica en Materiales y Métodos. Los histogramas representan la unión a los receptores Fc de los mAb anti-CD69 en ausencia (línea gruesa) o presencia (línea fina) de anti-CD16/32. Panel izquierdo: unión del mAb 2.2. Panel derecho: Unión del mAb 2.3. Se muestra un experimento representativo de los tres experimentos realizados.

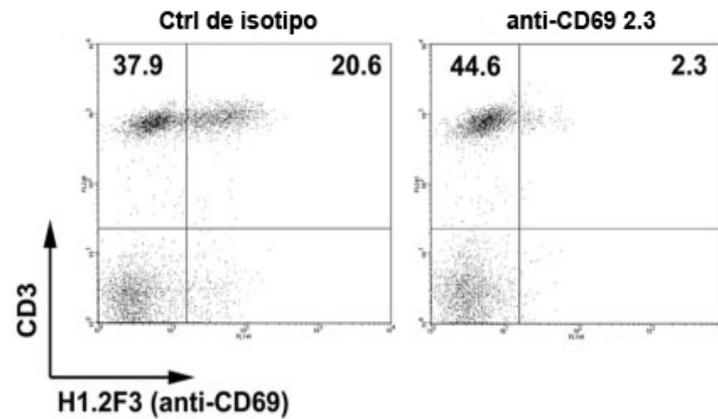
En conclusión, los mAbs anti-CD69 2.2 y 2.3 mostraban comportamientos *in vitro* diferentes, lo que parecía indicar que estas diferencias se correlacionarían con diferentes efectos funcionales *in vivo*.

1.2. Efecto de los mAb anti-CD69 *in vivo*:

La administración del mAb anti-CD69 2.2 modula negativamente la expresión de CD69 en membrana *in vivo* sin ningún efecto lítico sobre las células, como describen Esplugues y col. (Esplugues et al., 2005). Para estudiar el efecto del mAb 2.3 en la expresión de CD69 *in vivo*, se inyectó Con A en las almohadillas plantares de las extremidades traseras de los ratones para inducir la expresión de CD69 en las células del ganglio linfático poplíteo y posteriormente se les trató i.v. con el mAb 2.3 o su control de isotipo, el mAb 2.22. Los linfocitos del ganglio se purificaron 48 h más tarde y se tiñeron *ex vivo* con anti-CD3 y con anti-CD69 (H1.2F3). Los ratones tratados con el control de isotipo mostraban una inducción parcial de CD69, fundamentalmente en la población CD3⁺ (22.1 ± 4.2%, n=6). El porcentaje total de la población CD3⁺ en este grupo fue de 56.3 ± 5.4%, n=6. Después del tratamiento con el 2.3, no se observó

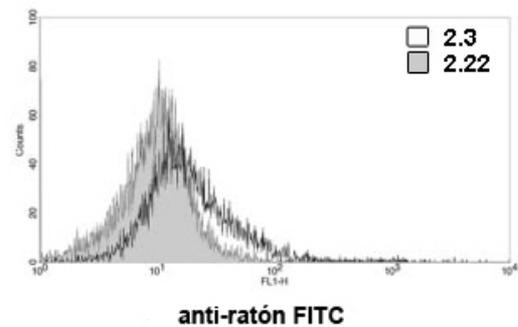
tinción de las células CD3⁺ con el H1.2F3 (Fig. 11). Además, se observó una ligera reducción en el número de CD3⁺, siendo el porcentaje total de estas células en este grupo de 46.4 ± 4.8% (n=6) (Fig. 11).

Fig. 11. Expresión de CD69 tras el tratamiento *in vivo* con el mAb anti-CD69 2.3. Ratones tratados con Con A fueron inyectados con el mAb 2.3 o con su control de isotipo, el 2.22, como se indica en Materiales y Métodos, y tras dos días las células de los ganglios se tiñeron con anti-CD3 y anti-CD69 (H1.2F3). Diagrama representativo (n = 6 ratones por grupo).



Hay muchos factores que podrían contribuir a la pérdida de tinción por el H1.2F3; primero, que CD69 se hubiera regulado negativamente de la membrana, segundo, que CD69 sí se estuviera expresando pero que el mAb 2.3 bloqueara la unión del mAb H1.2F3, y tercero, que las células CD69⁺ se hubieran deplecionado por citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC, Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) o CDC. Para estudiar lo que estaba ocurriendo se tiñeron *ex vivo* los linfocitos activados con Con A y tratados *in vivo* con el mAb 2.3 o con su control de isotipo con un anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado a FITC (Dako, CA, USA). Esta tinción permitió detectar un nivel bajo de mAb 2.3 unido a CD69 en la membrana, siendo esta unión significativamente menor que la observada para CD69 en el control de isotipo del experimento anterior (Fig. 12). Estos resultados revelan que el mAb 2.3 induce la regulación negativa parcial de la molécula y/o la depleción de células CD69⁺.

Fig. 12. Ratones tratados con Con A fueron inyectados con el mAb 2.3 o su control de isotipo, el 2.22, como se indica en Materiales y Métodos, y después de dos días las células de los ganglios se tiñeron directamente con anti-Ig de ratón conjugado a FITC. La figura representa un histograma representativo de los ratones tratados con el mAb 2.22 (histograma coloreado) y de los ratones tratados con el mAb 2.3 (línea gruesa), de los 6 experimentos realizados.



La ligera reducción en el número de células CD3⁺ mostrado en la Fig. 11 podría indicar un efecto parcialmente depletor del mAb 2.3. Sin embargo, la variación normal en la proporción de esas subpoblaciones en cada ratón no nos permitía establecer ninguna conclusión mediante esta aproximación indirecta. Para desarrollar un análisis directo del potencial depletor del mAb 2.3, se derivaron linfoblastos T a partir de células de bazo CD69^{+/+} o CD69^{-/-} cultivándolos con IL-2 y se activaron con Con A *in vitro*. Los linfoblastos CD69^{+/+} presentaban niveles elevados de CD69 en membrana, preferentemente en la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ (Fig. 13).

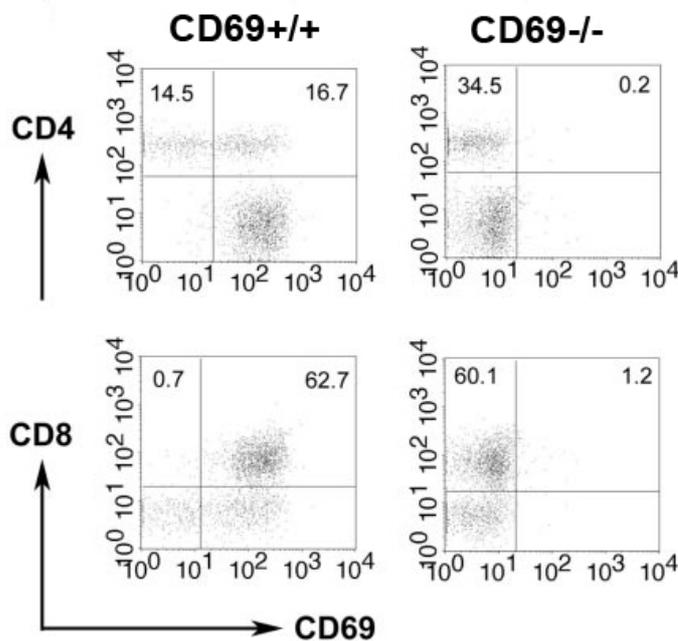


Fig. 13. Expresión de CD69 en las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ de linfoblastos T. Se cultivaron linfoblastos T como se indica en Materiales y Métodos a partir de células de bazo de ratones normales y CD69^{-/-} activados *in vitro* con Con A, y se tiñeron para CD69 y para CD8 o CD4. Los números en los diagramas representan el porcentaje de células por cada cuadrante. En la figura se muestra un experimento representativo de los cuatro realizados.

Posteriormente se marcaron los linfoblastos activados con la sonda fluorescente CFSE y se inyectaron i.v. junto con el mAb 2.3 o su control de isotipo. Dos días después se extrajeron las células del bazo y se comparó la proporción de células CD8⁺ CFSE⁺ entre los grupos de ratones tratados con el mAb 2.3 o el 2.22.

Este análisis directo, mostró una clara depleción parcial de los linfoblastos activados CD69⁺ de los ratones control (Fig. 14, panel izquierdo), pero no de los linfoblastos de ratones CD69^{-/-} (Fig. 14, panel derecho) en respuesta al mAb 2.3, confirmando la correlación entre la depleción por el mAb 2.3 y la expresión de CD69.

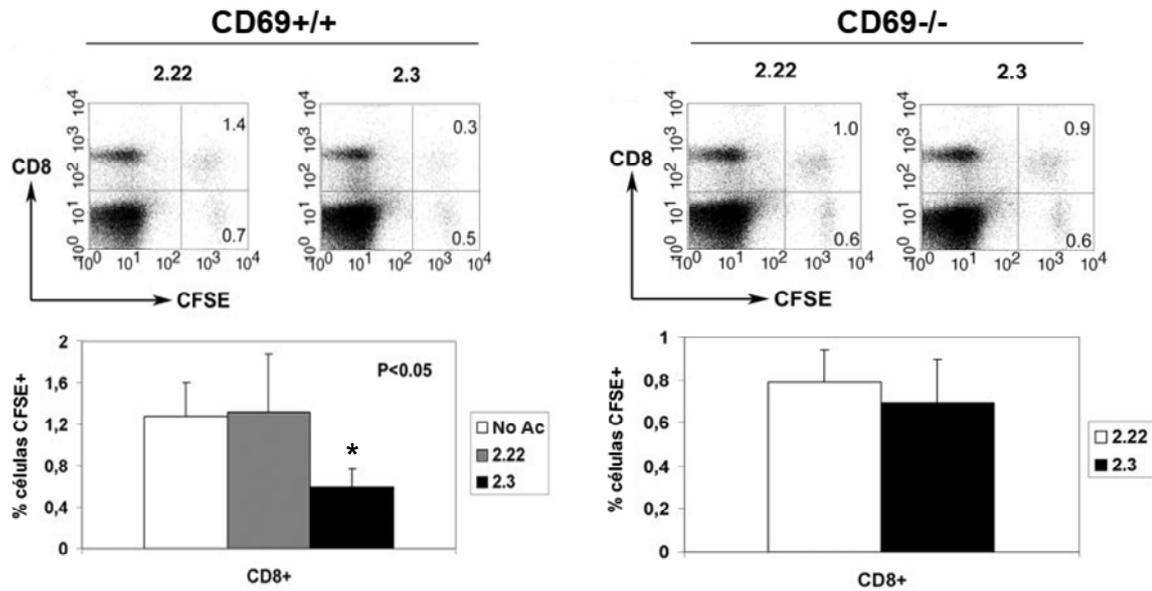


Fig. 14. El tratamiento *in vivo* con el mAb 2.3 reduce el porcentaje de linfoblastos CD69^{+/+} transferidos a ratones control. Los linfoblastos T de ratones CD69^{+/+} (panel izquierdo) o de ratones CD69^{-/-} (panel derecho) se tiñeron con CFSE y se transfirieron a ratones C57BL/6. Los ratones fueron inyectados posteriormente con el mAb 2.3 o su control de isotipo, 2.22. Los diagramas de puntos de los paneles superiores muestran la frecuencia de células CFSE⁺ transferidas en el bazo después de dos días de tratamiento en los ratones tratados con el mAb 2.3 o con su control de isotipo, 2.22. Los números en los diagramas representan el porcentaje de células en cada correspondiente cuadrante. Se muestra un experimento representativo de los cuatro realizados. Los diagramas de barras representan la media aritmética \pm DE de la frecuencia de linfoblastos CFSE⁺CD8⁺ en cada grupo de 4 ratones (*P<0.05, ANOVA no paramétrico).

1.3. Efecto del tratamiento con mAb anti-CD69 en el desarrollo de la AIC:

Para explorar los posibles efectos del mAb 2.2 en enfermedades inflamatorias, inyectamos el mAb 2.2 a ratones DBA/1 tratados con CFA + CII. Estos experimentos mostraron que el mAb 2.2 administrado durante las etapas tempranas de la enfermedad (días 22 y 28 desde la primera estimulación) aumenta la AIC significativamente (Fig. 15). Además, para determinar el posible mecanismo de acción de este anticuerpo, se analizaron los niveles de ARNm para diferentes citoquinas en las extremidades inflamadas, observándose que la administración del mAb 2.2 estaba asociada con la reducción de los niveles de TGF- β 1 en la articulación y con un aumento en la transcripción de IL-1 β (Fig. 15). Estos resultados indican que la ausencia de CD69 en la membrana provoca una exacerbación de la inflamación, de acuerdo con los datos previamente publicados en el laboratorio en los ratones CD69^{-/-} (Sancho et al., 2003).

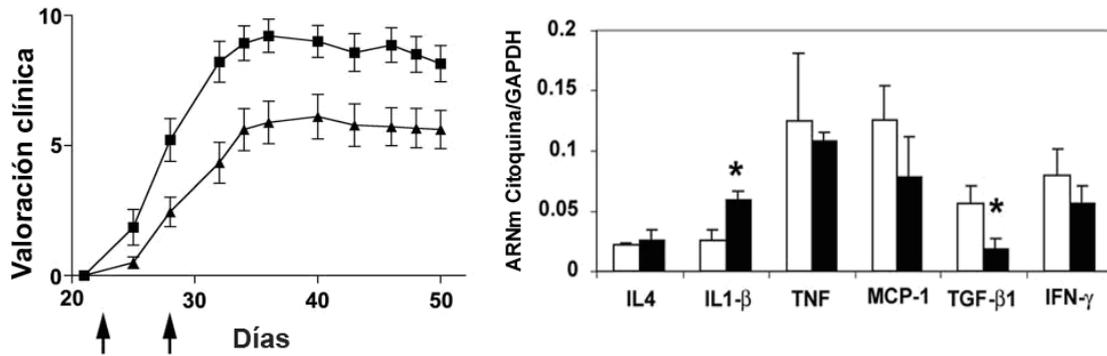
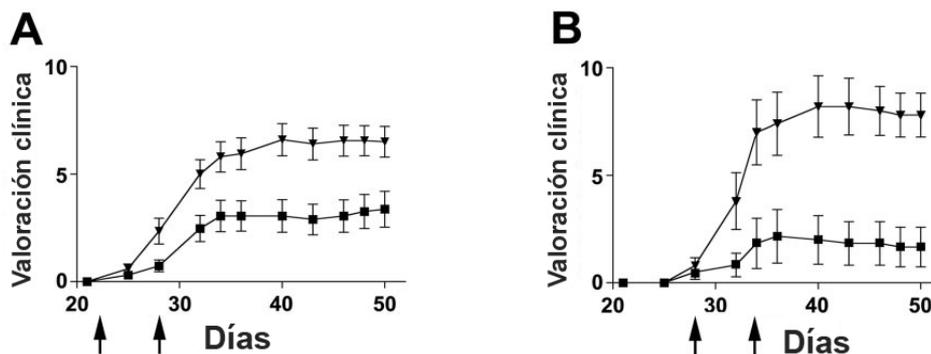


Fig. 15. Efecto del tratamiento *in vivo* con el mAb 2.2 en el desarrollo de la AIC. Se inyectaron ratones con CII + CFA en los días 0 y 21 para inducir AIC. Los días 22 y 28 tras la primera estimulación (señalados con flechas) se inyectaron el mAb anti-CD69 2.2 (■) y su control de isotipo, el mAb 2.8 (▲) y la inflamación fue medida como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se han expresado como la media aritmética \pm DE de tres experimentos con 6 ratones por grupo y por experimento. Las diferencias mostradas son significativas ($P < 0.05$, T de Student). En el panel de la derecha se realizaron PCRs semicuantitativas a tiempo real con ARN extraído de las extremidades inflamadas (a día 29 tras la estimulación secundaria) de ratones tratados con el mAb 2.2 (barras negras) o con el control de isotipo (barras blancas). Se analizaron las citoquinas que están indicadas en la gráfica y se refirieron al nivel de expresión del GAPDH (gen control de expresión), como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se representan como media aritmética \pm DE de dos experimentos con 6 ratones por grupo y por experimento (* $P < 0.05$, T de Student).

Por el contrario, el tratamiento con el mAb 2.3 mostró que durante las etapas tempranas de la enfermedad se inhibía significativamente el desarrollo de la AIC (Fig. 16 A). Además, la administración del mAb 2.3 después del comienzo de la inflamación continuaba reduciendo significativamente la severidad de la AIC (Fig. 16 B). De acuerdo con esto, se observó la reducción significativa en los niveles locales de mediadores proinflamatorios, como IL-1 β , TNF- α y MCP-1 (Fig. 16 C), pero sin un efecto significativo sobre la expresión génica del TGF- β 1. Finalmente, el tratamiento con el mAb 2.3 no reveló ningún efecto en la respuesta inflamatoria severa de las últimas etapas de la progresión de la enfermedad (Fig.16 D).



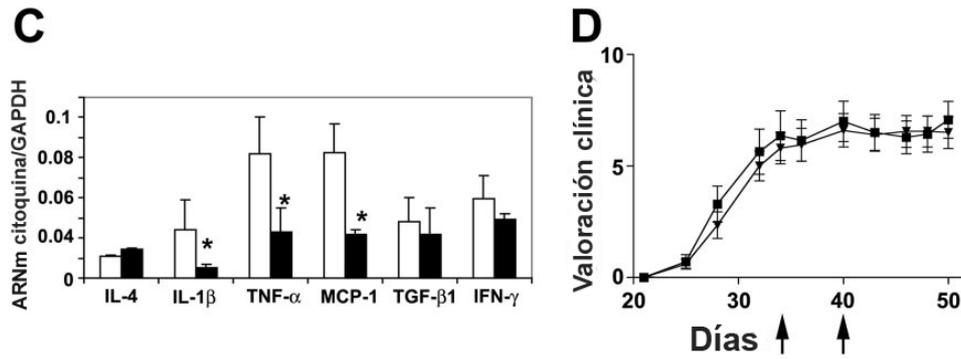


Fig. 16. Efecto del tratamiento *in vivo* con el mAb 2.3 en el desarrollo de la AIC. (A) Los ratones se trataron como en la figura anterior, tal y como está indicado en Materiales y Métodos, y con los mAbs anti-CD69 2.3 (■) o su control de isotipo, el mAb 2.22 (▼), en los días 22 y 28 (señalados con flechas) tras la primera inmunización. (B) Los ratones se trataron como en el apartado A, pero los anticuerpos se inyectaron los días 28 y 34 (flechas). (C) PCR semicuantitativa a tiempo real de las extremidades inflamadas (analizadas a día 29 tras la estimulación secundaria) de ratones tratados con el mAb 2.3 (barras negras) o con el control de isotipo (barras blancas). Se analizaron las citoquinas que están indicadas en la gráfica y se refirieron al nivel de expresión del GAPDH (gen control de expresión), como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se representan como media aritmética \pm DE de dos experimentos con 6 ratones por grupo y por experimento (* $P < 0.05$, T de Student). (D) Los ratones se trataron como en el apartado A, pero los anticuerpos se inyectaron los días 34 y 40 (flechas). (A, B, D) Los resultados expresan la valoración clínica de la inflamación como la media aritmética \pm DE de tres experimentos independientes con 6 ratones por grupo y por experimento. Las diferencias mostradas en A y B son significativas ($P < 0.05$, T de Student).

1.4. La depleción parcial de las células CD69⁺ previene el desarrollo de la AIC:

También se realizaron experimentos de transferencia de células con el fin de determinar si la depleción parcial de las células que expresaban CD69 por el mAb 2.3 podría ser la responsable de la disminución de la AIC. Para ello se purificaron linfocitos T de ganglios linfáticos de ratones tratados previamente con CII + CFA y se trataron *in vitro* con el mAb 2.3 o con su control de isotipo (mAb 2.22) en presencia de complemento activado. El mAb 2.3 deplecionaba parcialmente las células estimuladas por el CII + CFA, como se observa por la reducción en el porcentaje de células CD25⁺ en comparación con el tratamiento con el control de isotipo (Fig. 17 A). Estos linfocitos T de ganglio fueron inyectados *i.v.* en ratones DBA/1 que posteriormente fueron tratados con CII + CFA. El seguimiento clínico muestra que las células T tratadas con el mAb 2.3 eran significativamente menos efectivas para la inducción de AIC que aquellas tratadas con el control de isotipo (Fig. 17 B). Además, la depleción parcial de estas

células CD69⁺ obtenidas tras el tratamiento con CII + CFA es suficiente para disminuir la severidad de la AIC.

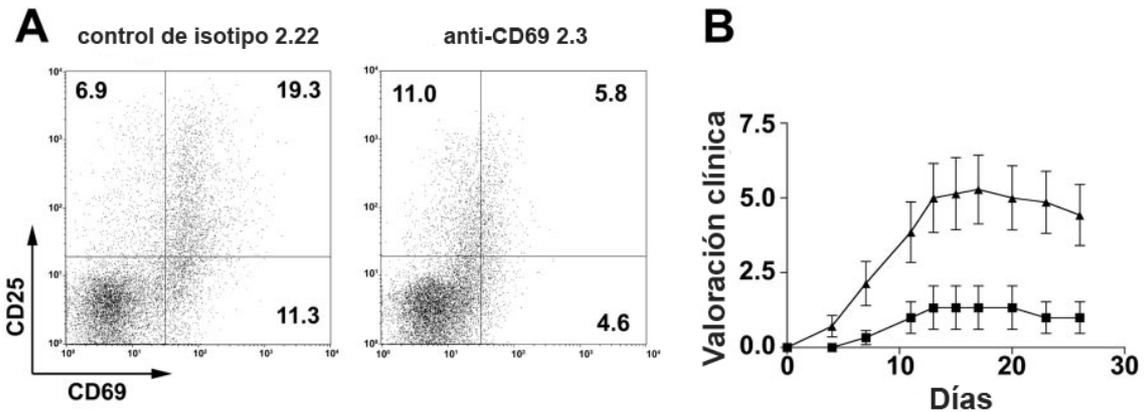


Fig. 17. La depleción parcial de las células CD69⁺ previene el desarrollo de la AIC. Se trataron ratones DBA/1 con CII + CFA y a los dos días se purificaron las células T de los ganglios drenantes y se trataron con el mAb 2.3 (■) o su control de isotipo, el 2.22 (▲) en presencia de complemento activo. **(A)** Tinción de las células T para CD25 y CD69 después del tratamiento. **(B)** Se inyectaron i.v. estas células T a ratones naïve DBA/1 a los que posteriormente se trató con CII + CFA. Los resultados expresan la media aritmética ± DE de la valoración clínica de cada ratón, de tres experimentos independientes con 6 ratones por grupo y por experimento. Las diferencias mostradas son significativas ($P < 0.05$, T de Student).

1.5. El mAb 2.3 reduce la respuesta efectora contra el CII:

Para determinar si el tratamiento con este anticuerpo afectaba a la generación de células efectoras específicas para CII, los mAbs 2.2, 2.3 o 2.22 (control de isotipo del mAb 2.3) fueron inyectados simultáneamente a la inyección de CII *in vivo*. Cinco días después, se extrajeron los linfocitos de los ganglios linfáticos drenantes y se indujo su proliferación con CII. Estos análisis mostraron que el tratamiento *in vivo* con el mAb 2.3 previene la proliferación *in vitro* en respuesta a CII (Fig. 18A). Por el contrario, la proliferación de linfocitos inducida por un estímulo policlonal, como es un mAb anti-CD3, no estaba afectada (Fig. 18 A).

Estos resultados sugieren que la depleción parcial inducida por el tratamiento con el mAb 2.3 afecta selectivamente a células activadas por CII, reduciendo su proliferación específica y quizás la secreción de citoquinas que controlan las fases iniciales de la inflamación. Para evaluar esta posibilidad, se inyectaron ratones con CII + CFA y se trataron *in vivo* con el mAb 2.3 o su control de isotipo. Cinco días después de la

inyección de CII se extrajeron los ganglios linfáticos drenantes, se estimularon las células con CII desnaturalizado durante 48 h y se analizaron las citoquinas intracelulares en las células CD4⁺ por citometría de flujo. La frecuencia de células secretoras de IFN- γ estaba significativamente reducida en los linfocitos T de los ratones tratados con el mAb 2.3 (Fig. 18 B y C). Este efecto del mAb 2.3 puede estar causado por la depleción selectiva de células T que responden al CII proliferando y secretando citoquinas, lo que contribuiría a la atenuación de la AIC.

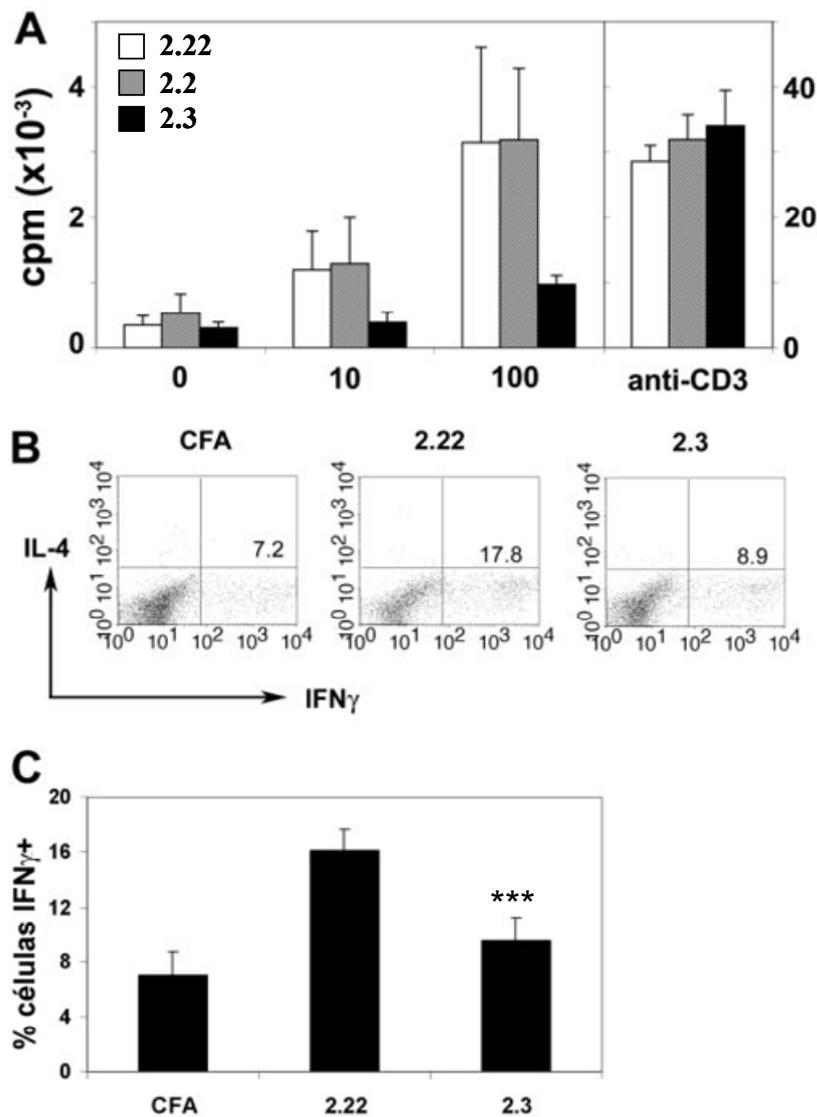


Fig. 18. El mAb 2.3 reduce la respuesta efectora contra el CII. (A) Reducción de la respuesta proliferativa específica de CII tras el tratamiento *in vivo* con el mAb 2.3. Los ratones se inyectaron con CII + CFA los días 0 y 21. El día 21 se inyectaron con el mAb 2.3 (barras negras), con su control de isotipo, el mAb 2.22 (barras blancas) o con el mAb anti-CD69 2.2 (barras grises). Cinco días después se sacrificó a los ratones y se cultivaron las

células de los ganglios linfáticos *in vitro* con distintas dosis de CII o anti-CD3, después se analizó la proliferación como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm DE de tres experimentos independientes. **(B)** El tratamiento con el mAb 2.3 *in vivo* reduce la proporción de células T productoras de IFN- γ en respuesta a CII. Los ratones fueron sensibilizados con CFA o con CII + CFA y tratados con mAb anti-CD69 2.3 o su control de isotipo, 2.22. Se aislaron las células de los ganglios drenantes, se activaron y se tiñeron para CD4 y para IL4 e IFN- γ intracelulares, como se indica en Materiales y Métodos. Los diagramas de puntos muestran un experimento representativo de dos experimentos realizados (5 ratones/experimento) del ratio IL-4/IFN- γ intracelular en las células CD4⁺ de los ratones tratados con los diferentes mAb anti-CD69. Los números representan el % de células IFN- γ ⁺. **(C)** El porcentaje de células IFN- γ ⁺ en la subpoblación CD4⁺ se representa como la media aritmética \pm DE de dos experimentos con 5 ratones por grupo (**P<0.0001, ANOVA no paramétrico).

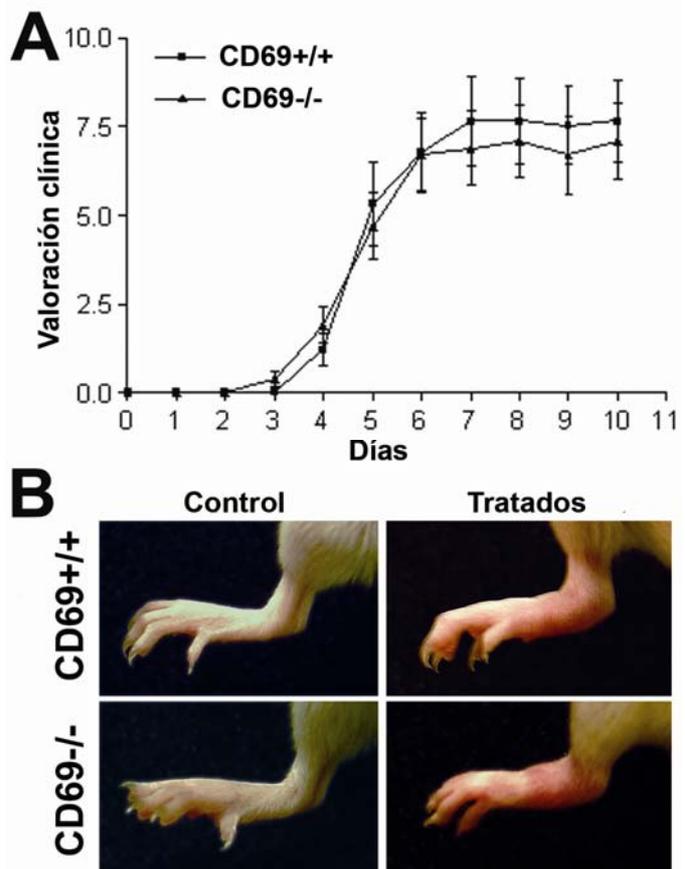
2. Papel de CD69 en inflamación aguda mediada por neutrófilos:

2.1. Los ratones CD69^{-/-} desarrollan una respuesta normal en el modelo de artritis inducida por anticuerpos anti-CII (AIAC).

Después de haber descrito que los ratones CD69^{-/-} desarrollan una forma exacerbada de AIC (Sancho et al., 2003), nos planteamos analizar la respuesta inflamatoria asociada a una forma distinta de artritis, la artritis inducida por anticuerpos anti-CII (AIAC). En este contexto se había publicado previamente que los ratones CD69^{-/-} mostraban una respuesta atenuada a esta forma de artritis (Murata et al., 2003), sin embargo estos datos no concordaban con el tipo de respuesta observado en los ratones CD69^{-/-} generados en nuestro laboratorio. Para desarrollar la AIAC, se inyectaron 2 mg de mAbs anti-CII (mezcla de 4 mAbs anti-CII comerciales, Arthrogen-AICJ) a ratones normales y CD69^{-/-} en el fondo genético de BALB/c, que reaccionan contra epítomos del CII implicados en el desarrollo de la artritis (Myers et al., 1995), y se trataron 2 días después con 50 μ g/ratón de LPS. El desarrollo de la artritis fue estudiado mediante el análisis de la valoración clínica medida a diario durante 10 días. Como se ha descrito previamente, los ratones desarrollan los primeros síntomas de la enfermedad el día 4 tras el tratamiento inicial y la artritis alcanza su máximo aproximadamente entre los días 7 y 8 (Fig. 19 A). Sorprendentemente, tanto los ratones normales como los ratones CD69^{-/-} mostraban una incidencia y severidad semejantes (Fig. 19 A). Además, el análisis visual de las articulaciones inflamadas mostraba una hinchazón similar y los mismos signos característicos de la artritis erosiva en ambos grupos de ratones (Fig. 19 B). Estos

resultados indican que el desarrollo de la artritis y la respuesta inflamatoria asociada con la AIAC no está afectada en los ratones CD69^{-/-}.

Fig. 19. Evaluación clínica de la AIAC en ratones CD69^{-/-}. (A) Los ratones BALB/c normales (■) y CD69^{-/-} (▲) fueron tratados con anticuerpos anti-CII i.v. (2 mg por ratón) en el día 0, y con LPS (50 µg por ratón) i.p. el día 2 y se observó diariamente la severidad de la artritis. Los resultados mostrados están realizados utilizando 12 ratones por grupo y corresponden a tres experimentos independientes. Los resultados se han representado como media aritmética ± DE del valor asignado a la severidad clínica y no muestran diferencias estadísticamente significativas. (B) Vista macroscópica representativa de las articulaciones con artritis 9 días después de la inyección de los anticuerpos anti-CII.



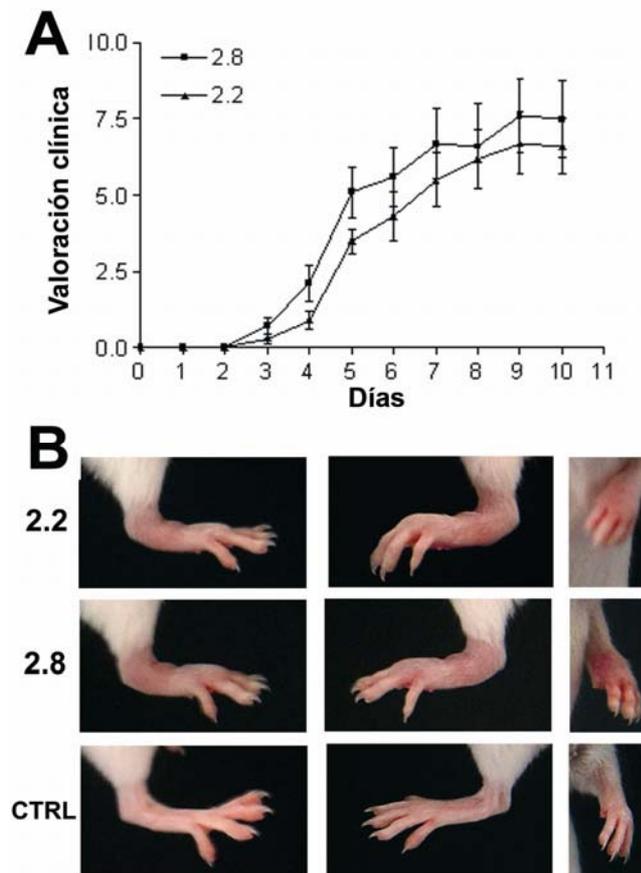
2.2. La regulación negativa de la expresión en membrana de CD69 no afecta a la severidad de la AIAC.

Los datos descritos en el apartado anterior muestran resultados opuestos a los datos previos publicados por Murata y col. (Murata et al., 2003). En ambos estudios se utilizaron los mismos reactivos comerciales para generar la AIAC y el mismo procedimiento experimental, las únicas diferencias radican en que los ratones CD69^{-/-} han sido generados de forma independiente, lo que sugiere que la contradicción podría deberse a diferencias intrínsecas entre las dos líneas de ratones CD69^{-/-}. Para clarificar este aspecto, se llevaron a cabo experimentos de inducción de AIAC en ratones BALB/c normales tratados o sin tratar con el mAb anti-CD69 2.2, que como hemos visto en el apartado anterior, regula negativamente la expresión en membrana de CD69 pero no depleciona las células que lo expresan (Esplugues et al., 2005; Sancho et al., 2006). Además, el tratamiento *in vivo* con este mAb 2.2 aumenta el rechazo de tumores

dependiente de células NKs y la AIC, reproduciendo el fenotipo observado en los ratones CD69^{-/-} (Esplugues et al., 2005; Sancho et al., 2006).

Se trataron ratones BALB/c normales i.p. con 300 µg de anti-CD69 2.2 purificado o con su control de isotipo, el mAb 2.8, el primero y el quinto día desde el inicio del tratamiento para producir la AIAC. Se realizó un seguimiento diario de la artritis mediante una valoración clínica durante diez días. La incidencia y severidad de la AIAC fue muy similar tanto en los ratones tratados con mAb anti-CD69 como en aquellos tratados con su control de isotipo (Fig. 20 A). Además, las articulaciones inflamadas mostraban los mismos signos externos de enrojecimiento e hinchazón en ambos grupos de ratones (Fig. 20 B).

Fig. 20. (A) Grupos de ratones BALB/c fueron tratados con el protocolo para desarrollar AIAC y además fueron tratados i.p. con 300 µg de mAb anti-CD69 2.2 (▲) o con su control de isotipo, el mAb 2.8 IgG1 (■), en los días 0 y 5 del tratamiento. Los resultados corresponden a 10 ratones por grupo de dos experimentos independientes. La gráfica representa la media aritmética ± DE del valor de la severidad clínica y las diferencias observadas no son estadísticamente significativas. (B) Vista macroscópica representativa de las articulaciones con artritis 9 días después de la inyección de los anticuerpos anti-CII.



Para confirmar la modulación negativa de la expresión de CD69 en membrana en estas condiciones experimentales, se analizaron mediante citometría de flujo células de timo extraídas de los ratones sometidos a la AIAC (Fig. 21). Como se había descrito previamente, observamos que los timocitos de ratón muestran un pequeño porcentaje de células CD69⁺ (10-15%) (Yamashita et al., 1993). El tratamiento con el control de

isotipo, el mAb 2.8 no afectó al porcentaje de células CD69⁺, mientras que el tratamiento con el mAb 2.2 redujo la expresión de CD69 hasta niveles mínimos, similares a los obtenidos analizando timocitos del ratón CD69^{-/-} (Fig. 21).

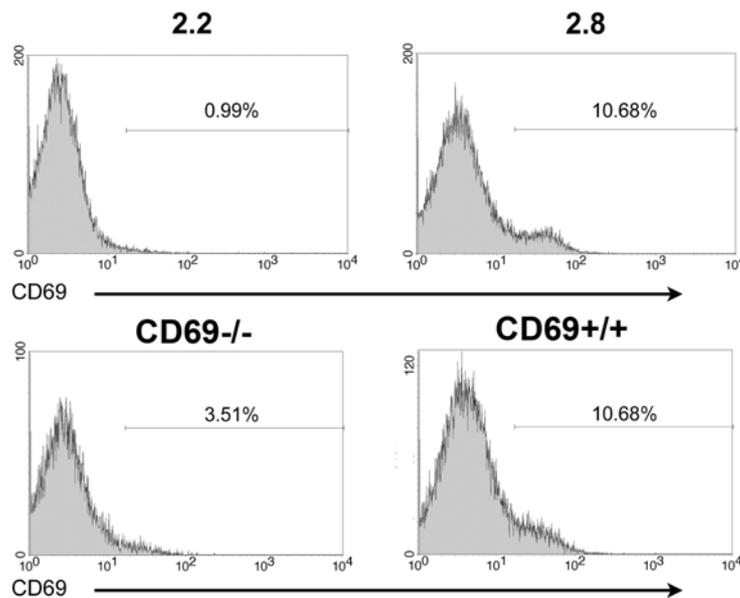


Fig. 21. Expresión de CD69 en timocitos de ratones tratados con mAb anti-CD69. Los ratones BALB/c fueron sometidos al protocolo de inducción de AIAC y posteriormente fueron tratados i.p. en los días 0 y 5 con el mAb 2.2 o su control de isotipo el mAb 2.8. El día 5 después de la última inyección con el anticuerpo, se extrajo el timo de los ratones CD69^{-/-} y de los ratones tratados con el mAb 2.2 o su control de isotipo, el mAb 2.8. Las células totales de timo se analizaron por citometría de flujo para estudiar la expresión de CD69. Los porcentajes de células CD69⁺ están indicados en los histogramas. La figura muestra un análisis representativo de diez ratones por grupo.

También se analizó el porcentaje de células CD69⁺ en bazo, que es mucho menor que en el timo (cerca del 2%) y el porcentaje de células CD69⁺ en los ratones tratados con el mAb 2.2 o con su control de isotipo, el mAb 2.8 y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en timocitos, observándose una fuerte reducción en esa pequeña proporción de células CD69⁺ con el tratamiento con el mAb 2.2 (datos no mostrados). Estos resultados corroboran que se está produciendo la modulación negativa de CD69 de la membrana después del tratamiento *in vivo* con el mAb anti-CD69 2.2 y permiten concluir que esta modulación no afecta a la severidad de la AIAC.

2.3. La modulación negativa de CD69 afecta a los mediadores inflamatorios en AIAC.

Con objeto de caracterizar la respuesta inflamatoria en ratones normales tratados con el anti-CD69 mAb 2.2, analizamos los niveles de expresión del ARNm de los principales mediadores inflamatorios en las extremidades con artritis de los ratones tratados por PCR semicuantitativa a tiempo real. La severidad de la artritis correlaciona con los niveles de expresión de IL-6, IL-1 β , MCP-1 y TNF- α , como ocurre en otros modelos experimentales de artritis (Kagari et al., 2002).

La expresión del ARNm de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-6 y la quimioquina MCP-1, el día 10 después de la inyección con los anticuerpos anti-CII estaba aumentada en las extremidades inflamadas de los ratones tratados con mAb anti-CD69 en comparación con las de ratones tratados con los mAb control (Fig. 22). En este análisis los niveles de ARNm de TNF- α eran casi indetectables (datos no mostrados) confirmando los datos previamente publicados en AIAC para esta citoquina (Kagari et al., 2002), donde se demuestra que su pico de expresión aparece entre los días 3 y 4 y decae rápidamente después de este momento. Por el contrario, la expresión de TGF- β estaba significativamente reducida en las extremidades inflamadas de los ratones tratados con mAb anti-CD69 en comparación con los ratones no tratados.

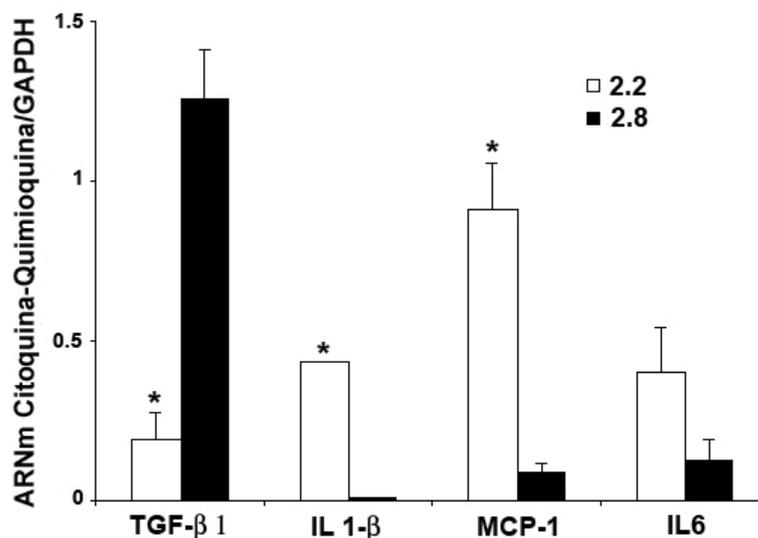


Fig. 22. La expresión de citoquinas y quimioquinas en las extremidades con artritis tratadas con anticuerpos anti-CD69 (2.2 con barras blancas y 2.8 con barras negras) se analizó por PCR semicuantitativa a tiempo real a partir del ARNm. Los resultados de cada citoquina se normalizaron mediante la expresión de GAPDH medida en paralelo en cada muestra. Cada barra representa la media aritmética \pm error medio estándar de seis ratones (* P < 0.05, prueba de Mann-Whitney).

Estos resultados indican que la modulación negativa en la expresión de CD69 durante la AIAC provoca un incremento en la expresión de mediadores inflamatorios y disminuye la expresión de la citoquina inmunosupresora TGF- β , como se describió previamente para la AIC en los ratones CD69^{-/-}. Sin embargo, estas diferencias locales en las citoquinas proinflamatorias no afectan significativamente al curso de esta artritis mediada por neutrófilos.

2.4. El reclutamiento de neutrófilos en dos modelos independientes no está afectado en ratones CD69^{-/-}

Los resultados descritos anteriormente indican que la respuesta inflamatoria aguda asociada con la AIAC no está afectada por la ausencia de CD69, lo que sugiere que la función inflamatoria de los neutrófilos no estaría inhibida. Para analizar más profundamente la respuesta inflamatoria aguda en ratones CD69^{-/-}, se utilizaron dos modelos de reclutamiento de neutrófilos: la migración de neutrófilos hacia una cavidad de aire dorsal en respuesta a zimosano y la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal en respuesta a tioglicolato.

En el primer modelo, la inyección de zimosano en las cavidades formadas por la inyección de aire subcutáneo en el dorso de los ratones, induce la acumulación de neutrófilos (Konno y Tsurufuji, 1983). De forma similar, los neutrófilos se acumulan en la cavidad peritoneal 4 h después de ser inyectados los ratones con tioglicolato (Ajuebor et al., 1999).

En ambos sistemas experimentales, el número de neutrófilos acumulado fue similar en ratones CD69^{-/-} y en ratones normales y significativamente mayor que en los ratones control tratados con PBS (Fig. 23, panel superior). Un 90% de las células recogidas expresaban altos niveles de CD11b (Fig. 23, paneles inferiores) y niveles bajos de CD62L (datos no mostrados), lo que corresponde a un perfil de neutrófilos activados, dándose el mismo perfil en ambos tipos de ratones (normales y CD69^{-/-}). La expresión de CD69 también se analizó por citometría de flujo en los neutrófilos del fluido exudado de la cavidad de aire de los ratones tratados con zimosano y de la cavidad peritoneal de los ratones tratados con tioglicolato. En ambos casos, los neutrófilos que procedían de ratones normales no expresaban CD69 (Fig. 23, paneles inferiores), indicando que ninguno de estos dos estímulos es suficiente para inducir la expresión de CD69 en estos neutrófilos.

Estos resultados indican que la ausencia de CD69 no afecta a la respuesta inflamatoria de los neutrófilos, confirmando en varios modelos diferentes e independientes que CD69 no tiene un papel significativo en respuestas inflamatorias mediadas por neutrófilos.

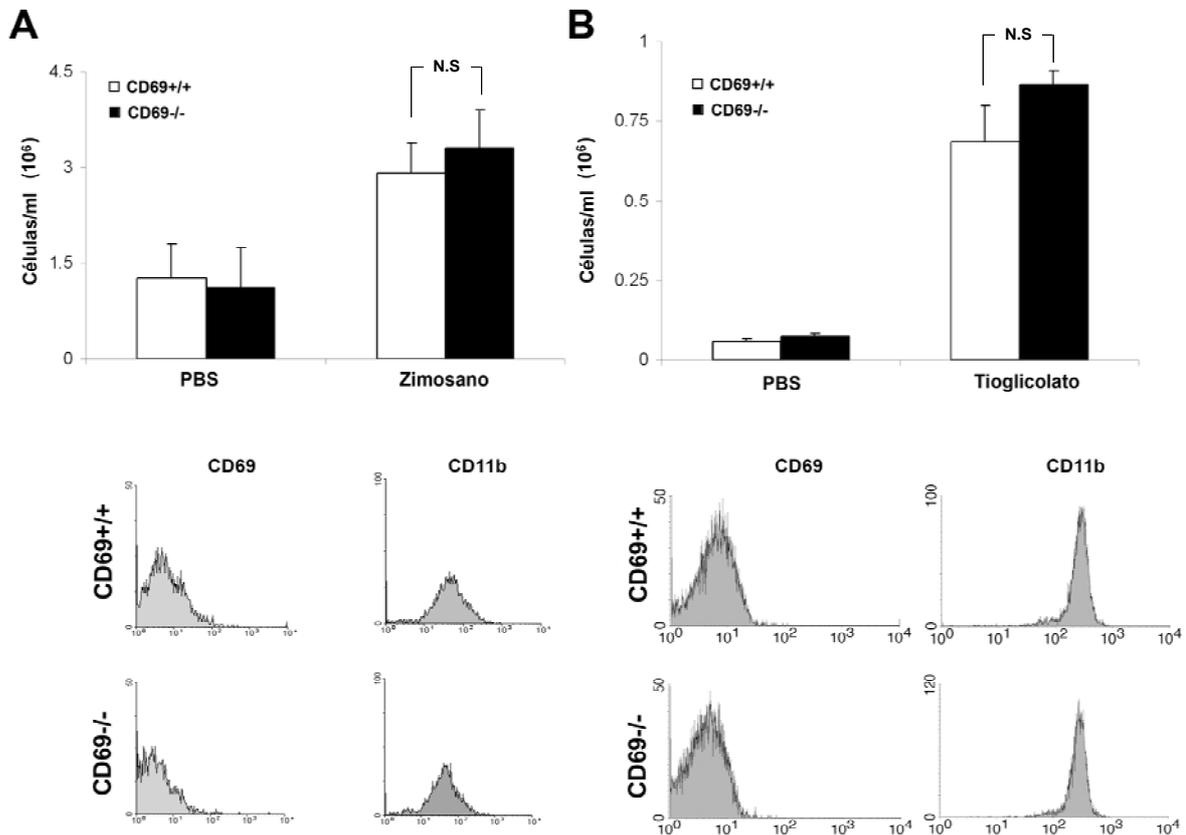


Fig. 23. El reclutamiento de neutrófilos en modelos de inflamación aguda no está afectado en ratones CD69^{-/-}. (A) En la gráfica superior izquierda se muestra la migración celular a las cavidades de aire dorsales en ratones BALB/c control (barras blancas) o CD69^{-/-} (barras negras) en animales tratados con zimosano o con PBS. Después de 4 h, los ratones fueron sacrificados y los neutrófilos infiltrados se contaron. En los resultados se representa la media aritmética ± DE de 14 ratones control y 8 ratones CD69^{-/-} de dos experimentos independientes. En el panel inferior se muestra la expresión de CD69 o CD11b en neutrófilos (seleccionados por el marcaje Gr1⁺ y F4/80⁺) de los ratones CD69^{+/+} o CD69^{-/-} tratados con zimosano. Los histogramas muestran un experimento representativo. (B) En la gráfica superior derecha se representa la tasa de migración de neutrófilos después de 4 h de tratamiento con tioglicolato en ratones BALB/c control (barras blancas) o CD69^{-/-} (barras negras) comparando con animales tratados con PBS (control). Los resultados representan la media aritmética ± DE de 4 ratones control y 6 ratones CD69^{-/-}. En el panel inferior se representa el perfil de expresión de CD69 o CD11b en los neutrófilos de los ratones CD69^{+/+} o CD69^{-/-} tratados con tioglicolato de un experimento representativo. (N.S, diferencias estadísticamente no significativas).

3. Papel de CD69 en hipersensibilidad por contacto:

3.1. Los ratones CD69^{-/-} desarrollan una respuesta exacerbada en el modelo de hipersensibilidad por contacto.

Los ratones se sensibilizaron el día 1 mediante la administración en el abdomen rasurado de 50 μ L de oxazolona (Ox) al 3% en etanol (p/v). A los 5 días se aplicaron 10 μ L de Ox al 1% en la oreja derecha, utilizando como control la oreja izquierda tratada sólo con el vehículo (etanol). Los siguientes días tras la segunda sensibilización se efectuaron las medidas del espesor de las orejas, sacrificando algunos ratones para tomar las muestras para los estudios histológicos y bioquímicos.

El curso de la respuesta inflamatoria siguió una cinética similar tanto en los ratones CD69^{-/-} como en los ratones control, apareciendo el pico de inflamación a las 24-48 horas (Fig. 24, panel izquierdo). En este punto la inflamación se ha observado significativamente aumentada en los ratones CD69^{-/-} (Fig. 24, panel derecho).

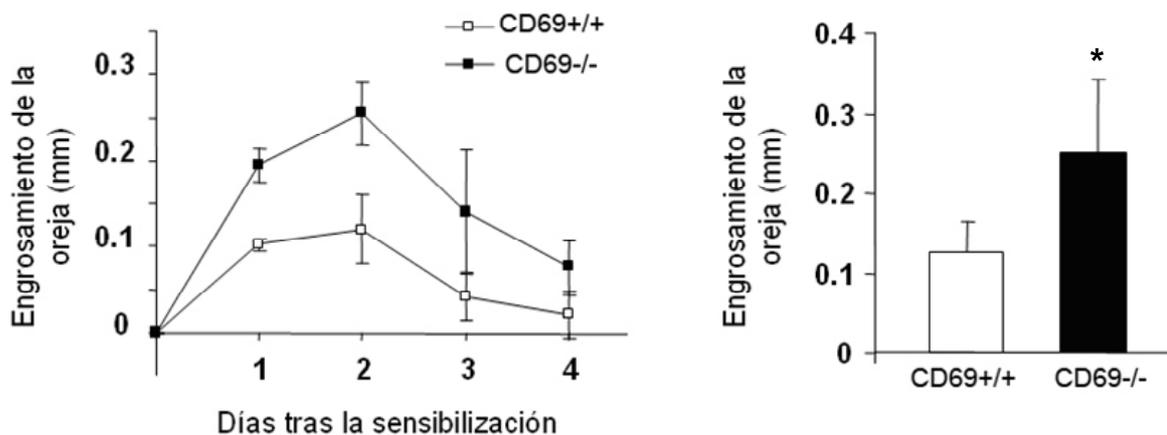


Fig. 24. Los ratones CD69^{-/-} desarrollan una respuesta exacerbada a la hipersensibilidad por contacto en respuesta a Ox. Grupos de ratones C57BL/6 WT (\square) o CD69^{-/-} (\blacksquare) fueron sensibilizados el día 1 mediante la aplicación de Ox al 3% en etanol (p/v). El día 5 fueron tratados con 10 μ L de Ox al 1% en la oreja derecha. Los siguientes días se efectúan las medidas del espesor de las orejas. En el diagrama de barras se representa la media \pm DE de la medida de engrosamiento de la oreja en mm a las 24 h de la aplicación de Ox en la oreja de 15 ratones control (barra blanca) o CD69^{-/-} (barra negra) (* $P < 0.05$, T de Student).

Además, el análisis histológico de las orejas analizadas en su pico de inflamación, mostró los cambios patológicos asociados con la HSC incrementados en los ratones

CD69^{-/-}. Así, podemos observar el aumento del edema y del número de células infiltrantes (Fig. 25).

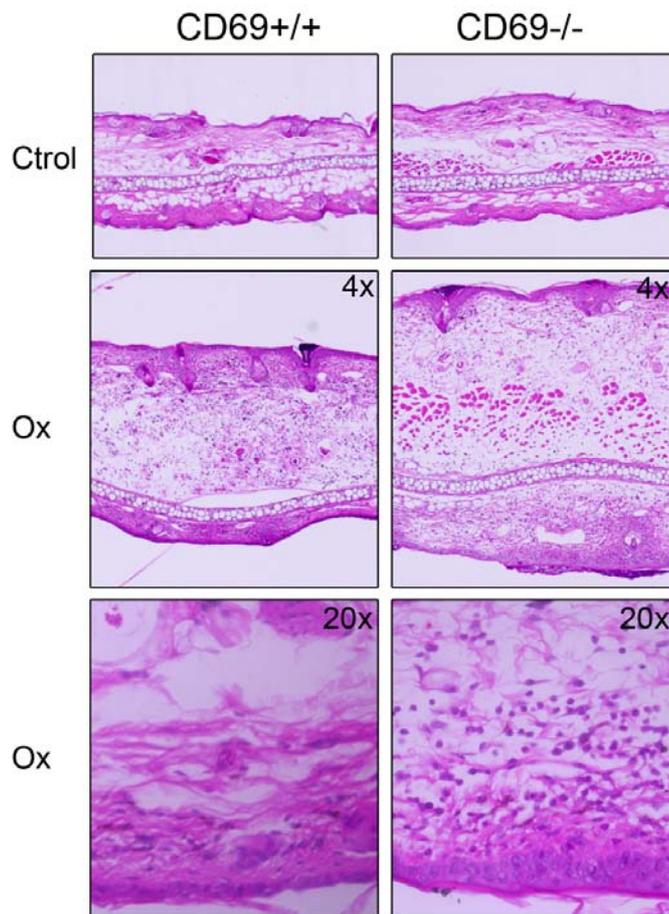


Fig. 25. El análisis histológico de la respuesta inflamatoria en respuesta a Ox en la oreja mostró los cambios patológicos asociados con la HSC incrementados en los ratones CD69^{-/-}. Las muestras de piel de la oreja se tomaron 48 h tras la segunda aplicación de Ox y se fijaron con formalina durante 24 h como está descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente se embebieron en parafina y las secciones se tiñeron con HyE. Las imágenes se tomaron utilizando los objetivos 4X y 20X como está indicado en cada panel.

También se estudiaron los niveles de expresión de los principales mediadores inflamatorios implicados en este modelo en las orejas inflamadas el día en que se encuentran en su pico de inflamación. La expresión de estos mediadores se analizó por PCR semicuantitativa a tiempo real (Fig. 26) y permitió observar que la mayor severidad de la respuesta inflamatoria en los ratones CD69^{-/-} también correlacionaba con el aumento de los niveles de expresión de ARNm de TNF- α e IL-1 β , principales citoquinas de la respuesta inflamatoria en la piel (Jakob et al., 2001); IL-6, un importante activador de células T y mediador de reacciones de fase aguda (Jones et al.,

2005); e IL-17, la principal citoquina de la respuesta Th17 (Weaver et al., 2006). Sin embargo en este modelo los niveles de ARNm de TGF- β no difieren entre los ratones normales y los CD69^{-/-}.

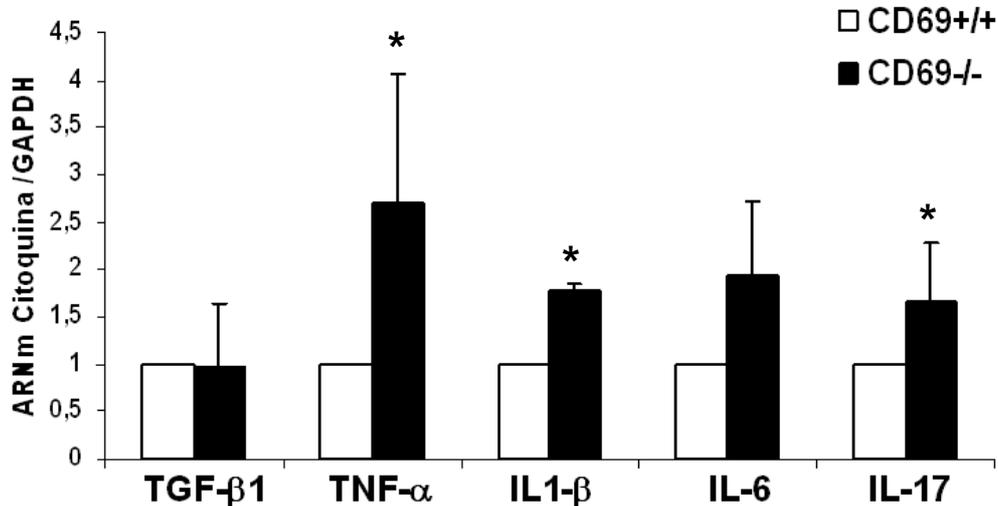


Fig. 26. Los principales mediadores inflamatorios analizados por PCR semicuantitativa a tiempo real están incrementados en los ratones CD69^{-/-} comparados con los ratones control. Se analizó el ARN total extraído de la oreja inflamada a 24 h de la estimulación secundaria por PCR semicuantitativa a tiempo real. En el gráfico se representa la expresión del ARNm de las citoquinas señaladas en el tejido de los ratones CD69^{-/-} (barras negras) y de los ratones control (barras blancas). El nivel de expresión de cada citoquina se ha referido al nivel de expresión del GAPDH, como se indica en Materiales y Métodos (*P<0.05, T de Student).

3.2. Caracterización de la respuesta T efectora en los ganglios linfáticos de los ratones CD69^{-/-} tratados con oxazolona.

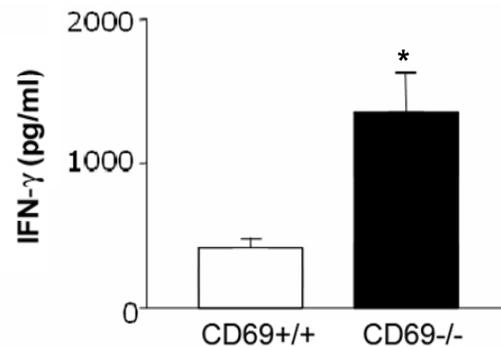
El análisis de las células T específicas generadas tras la sensibilización de la piel con haptenos para HSC revela que se generan dos tipos de poblaciones efectoras: las células T CD8⁺ y las células CD4⁺. Varios estudios independientes han demostrado que son las células CD8⁺ las que actúan como las principales efectoras del proceso (Gocinski y Tigelaar, 1990; Bour et al., 1995; Bouloc et al., 1998; Martin et al., 2000; Saint-Mezard et al., 2005). La respuesta de HSC requiere el reclutamiento de las CD8⁺ específicas a la piel, en el sitio de la estimulación secundaria, donde inducen la apoptosis de queratinocitos a través de su actividad citotóxica (Xu et al., 1997; Kehren et al., 1999; Akiba et al., 2002). Recientemente se ha descrito que la respuesta inflamatoria asociada a HSC está reducida en los ratones IL-17^{-/-} (Nakae et al., 2002) y también en ratones normales tratados con anticuerpos neutralizantes anti-IL-17 (He et al., 2006). Se ha

observado que la principal población efectora durante la fase de resolución de la HSC son las células $CD8^+$ secretoras de IL-17 (He et al., 2006).

Sin embargo las células $CD4^+$ también tienen un papel importante en este modelo, ya que tanto los ratones deficientes en MHC de clase II, como los que carecen de linfocitos T $CD4^+$ circulantes, o ratones a los que se les han deplecionado las $CD4^+$ mediante el tratamiento *in vivo* con mAb anti- $CD4$, desarrollan una respuesta a HSC aumentada y prolongada con respecto a los ratones control (Gocinski y Tigelaar, 1990; Bour et al., 1995; Bouloc et al., 1998; Saint-Mezard et al., 2005). Estos resultados indican que las células $CD4^+$ hapteno específicas no contribuyen a la fase efectora de la HSC y que inducen la regulación negativa de la respuesta, restringiendo el desarrollo de las $CD8^+$ durante esta fase (Gorbachev y Fairchild, 2004).

Para caracterizar la respuesta T efectora generada en la HSC en los ganglios linfáticos drenantes de los ratones $CD69^{-/-}$, se purificaron los linfocitos totales de ganglio a los 5 días de la sensibilización con Ox y se estimularon con anti- $CD3$ durante 24 h. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron para analizar la producción de citoquinas por ELISA. La secreción de $IFN-\gamma$ se encontró significativamente incrementada en los linfocitos totales de ganglio de los ratones $CD69^{-/-}$ en comparación con los de los ratones normales (Fig. 27), mientras que la secreción de IL-4, la principal citoquina reguladora de la respuesta Th2 no mostraba variación (datos no mostrados).

Fig. 27. Los linfocitos de ganglio total activados de ratones $CD69^{-/-}$ muestran un incremento en la producción de $IFN-\gamma$. Se purificaron los linfocitos totales de ganglio y se estimularon con anti- $CD3$ durante 24 h. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron para analizar la producción de $IFN-\gamma$ por ELISA. El resultado muestra el análisis de los linfocitos provenientes de 4 ratones distintos (* $P < 0.05$, T de Student).



Para estudiar qué diferencias existen en la generación de linfocitos T efectores en los ratones $CD69^{-/-}$ con respecto a los ratones control, se analizó el porcentaje de células $CD4^+$ y $CD8^+$ generadas en los ganglios y su tinción intracelular para las citoquinas expresadas por las principales poblaciones efectoras descritas en la respuesta inmune inflamatoria: $IFN-\gamma$ (Th1) e IL17 (Th17). La proporción de células $CD4^+$ y $CD8^+$ en los

ganglios de los ratones $CD69^{-/-}$ no está alterada en comparación con los ratones control tras el tratamiento con Ox (datos no mostrados). Después de analizar por citometría de flujo la tinción intracelular de citoquinas, se observó que la proporción de células $IL-17^{+}$ estaba aumentada en los ratones $CD69^{-/-}$ sometidos a HSC con Ox con respecto a los ratones control tratados de la misma forma. Sin embargo, el porcentaje de células $IFN-\gamma^{+}$ no varía en ninguna de las dos subpoblaciones de linfocitos (Fig. 28).

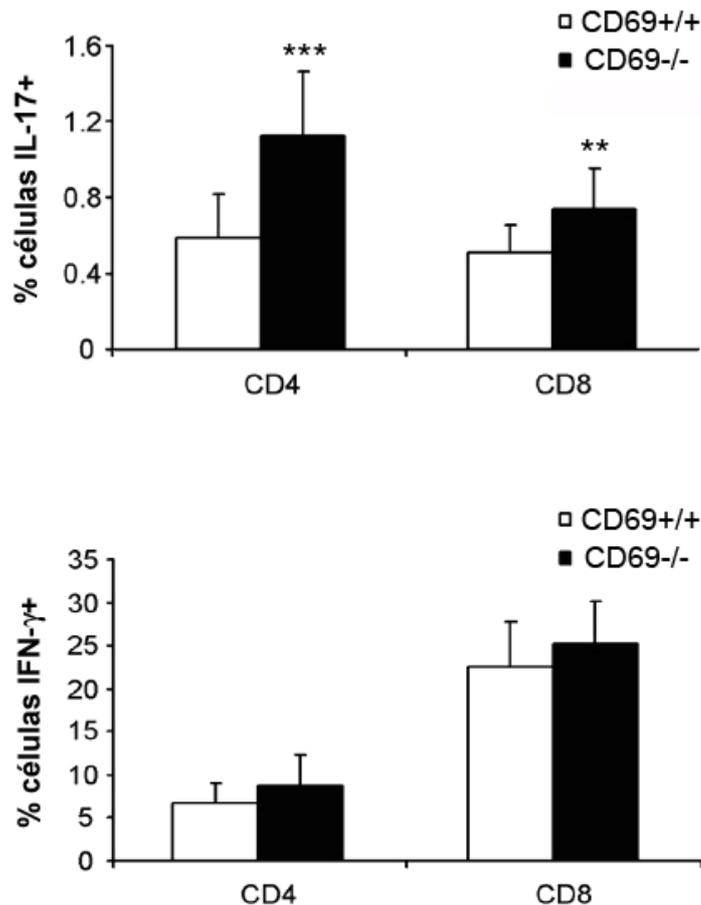


Fig. 28. La proporción de células $IL-17^{+}$ se encuentra incrementada en la subpoblación de linfocitos T en los ratones $CD69^{-/-}$. Se purificaron los linfocitos T $CD4^{+}$ y $CD8^{+}$ de los ganglios linfáticos a los 5 días de la sensibilización secundaria con Ox, se estimularon con PMA e Ionomicina durante 24 h y se tiñeron intracelularmente con anti- $IL17$ y con anti- $IFN\gamma$ para analizar por citometría de flujo la proporción de células $IL17^{+}$ e $IFN\gamma^{+}$. Las barras blancas corresponden a los ratones $CD69^{+/+}$, mientras que las barras negras corresponden a los ratones $CD69^{-/-}$. Los resultados muestran la media aritmética \pm DE de un total de 18 ratones para $CD4^{+}$ y 15 ratones para $CD8^{+}$ en 4 experimentos independientes (***) $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, T de Student).

Estos resultados indican que la sensibilización con Ox genera más respuesta Th17 en los ratones $CD69^{-/-}$.

3.3. Estudio de la generación de linfocitos T reguladores en la respuesta a HSC en ratones CD69^{-/-}

Durante la fase de sensibilización de la HSC, las células CD4⁺CD25⁺ dependientes de IL-2 presentes en los ganglios linfáticos que drenan la piel restringen el desarrollo de las células T efectoras que median la respuesta inmune a Ox (Kish et al., 2005; Kish et al., 2007). Además, las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ son capaces de inhibir la respuesta a la HSC tras la estimulación secundaria con el hapteno (Ring et al., 2006) y son necesarias para la tolerancia oral y la inhibición de la inflamación cutánea mediada por células T CD8⁺ (Dubois et al., 2003). Para comprobar si las células T reguladoras también están contribuyendo al incremento en la respuesta a HSC observado en los ratones CD69^{-/-}, se analizaron las células T CD4⁺FoxP3⁺ en estos ratones tras la sensibilización con el hapteno. Las células totales de los ganglios linfáticos que drenan la piel de ratones tratados con Ox fueron analizadas 5 días después de la sensibilización por citometría de flujo para estudiar la expresión de CD4 y FoxP3 y determinar el ratio del porcentaje de células CD4⁺ FoxP3⁺ y FoxP3⁻ (Fig. 29 A). Los resultados de dos experimentos independientes mostraron que la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ FoxP3⁺ no está alterada en ratones CD69^{-/-} en comparación con ratones control (Fig. 29 B).

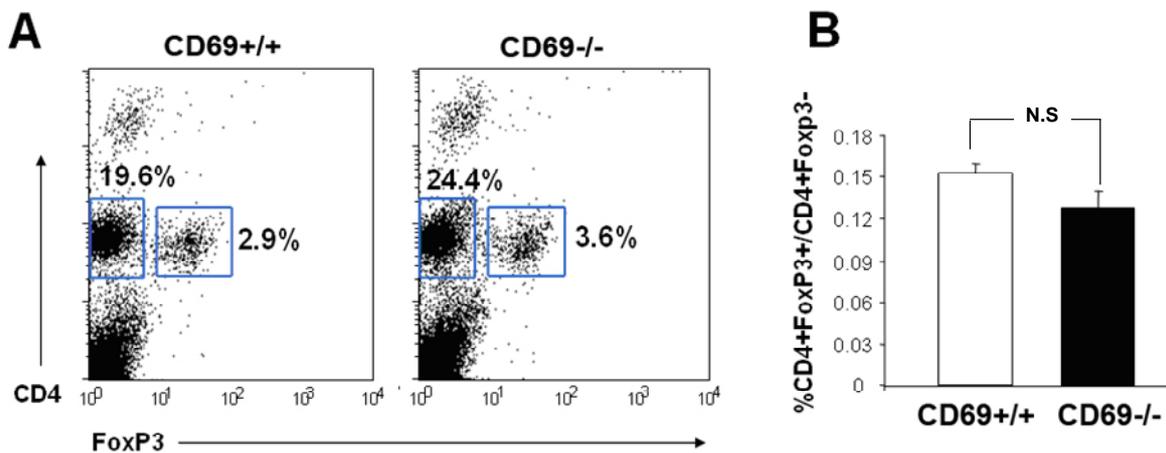


Fig. 29. Las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ no están alteradas en los ratones CD69^{-/-} tratados con Ox. (A) El porcentaje de linfocitos T de ganglio linfático CD4⁺FoxP3⁻ y CD4⁺FoxP3⁺ no está modificado significativamente en ratones CD69^{-/-} tratados con Ox con respecto a los ratones control. Se obtuvieron los linfocitos totales de los ganglios linfáticos drenantes a los 5 días de la sensibilización con Ox, se estimularon con PMA e ionomicina durante 24 h y se tiñeron intracelularmente con anti-CD4 y anti-FoxP3 para su análisis por citometría de flujo. (B) El diagrama de barras muestra la media ± DE del ratio del porcentaje de linfocitos CD4⁺ FoxP3⁺ / CD4⁺ FoxP3⁻ en los ratones control (barra blanca) y en los ratones CD69^{-/-} (barra negra) de 5 experimentos independientes (N.S, diferencias no significativas).

3.4. Caracterización de la fase de sensibilización en el modelo de HSC en ratones CD69^{-/-}

Las LCs y las dDCs son las células presentadoras de antígeno que están implicadas en la respuesta a HSC (Macatonia et al., 1987; Kripke et al., 1990). Estas células son inmaduras en la piel y maduran durante la migración a los ganglios linfáticos que drenan la piel después de activarse al capturar el antígeno. Para estudiar si la migración de estas células estaba afectada decidimos utilizar un modelo que consiste en pintar la piel con una sustancia irritante (acetona y dibutilfalato 1:1) y FITC, lo que permite detectar las células que provienen de la piel directamente marcadas en el ganglio drenante. Tras 24 h de la administración cutánea de FITC, se analizó en el ganglio la proporción de DCs FITC⁺, caracterizadas por la expresión de la integrina específica de DCs CD11c y se observó un incremento significativo de dos veces en los ratones CD69^{-/-} en comparación con los ratones control (Fig. 30 A y B). Este incremento en la migración de las DCs de los ratones CD69^{-/-} se observó desde 18 h después de la administración del tratamiento y continuaba aumentado a las 48 h (datos no mostrados). Las DCs FITC⁺ que alcanzan el ganglio presentan un fenotipo de DCs maduras basándonos en sus niveles de moléculas coestimuladoras y de receptores de quimioquinas, a pesar de que la expresión de estas moléculas es similar en los ratones control y en los ratones CD69^{-/-} (Fig. 30 C).

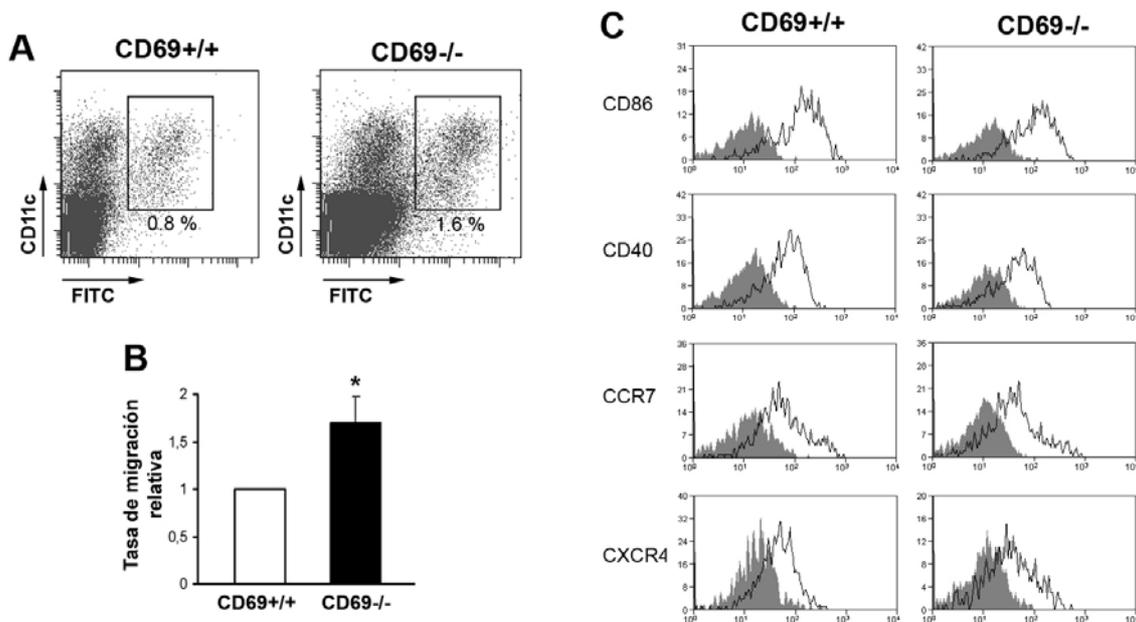


Fig. 30. La migración de células CD11c⁺FITC⁺ está incrementada en los ratones CD69^{-/-} en un modelo de migración *in vivo*. (A) Los ratones control y CD69^{-/-} fueron sensibilizados en la piel del abdomen con FITC a 5 mg/ml disuelto en acetona-dibutilfalato 1:1. A las 24 h fueron sacrificados y se

obtuvieron las células totales de los ganglios linfáticos inguinales que drenan la piel del abdomen. Las células de ganglio se tiñeron con anti-CD11c conjugado con PE y con anti-CD86, anti-CD40, anti-CCR7 y anti-CXCR4 biotinilados y posteriormente marcados con estreptavidina PerCP. Las células provenientes de la piel se detectaron por citometría de flujo por estar marcadas con FITC. **(B)** La proporción de células CD11c⁺FITC⁺ se cuantificó en 6 experimentos independientes con 4 ratones por grupo y se representa como migración de los ratones CD69^{-/-} con respecto a los CD69^{+/+} en términos relativos (*P<0.05, T de Student). **(C)** Se analizó el fenotipo de las células CD11c⁺FITC⁺ por citometría de flujo para las moléculas coestimuladoras y receptores de quimioquinas que se mencionan en la figura. Se representan las DCs CD11c⁺FITC⁺ migradas al ganglio en la curva sin relleno, frente a las DCs residentes CD11c⁺FITC⁻ en la curva sombreada. Los histogramas elegidos son representativos de 5 experimentos realizados independientemente.

4. Caracterización de las poblaciones de DCs en el ratón CD69^{-/-}. Papel de CD69 en la migración de DCs.

Se estudió el efecto de la ausencia de CD69 en la generación y distribución de las distintas subpoblaciones de DCs, ya que el aumento de migración de la piel al ganglio observado en el modelo anterior nos sugiere que otras etapas de la biología de las DCs podrían estar afectadas. De hecho, las DCs en el ratón derivan de precursores de la médula ósea, que pueden diferenciarse localmente o bien pueden migrar a través de la sangre o la linfa y entrar en la piel, los órganos linfoides o el bazo, generando las distintas subpoblaciones residentes en esos tejidos (Leon et al., 2005). Un desequilibrio en estos procesos de migración podría alterar la proporción de alguna de las subpoblaciones de DCs o su distribución en el tejido. Por otro lado, también decidimos estudiar la expresión de CD69 en DCs, ya que hasta el momento no se había descrito la expresión de este marcador en ninguna de las subpoblaciones conocidas de DCs de ratón.

4.1. Expresión de CD69 por subpoblaciones de DCs.

La expresión de CD69 por las principales subpoblaciones de DCs presentes en el ratón fue analizada tras su maduración inducida a través de receptores de tipo “toll-like” (TLR, Toll-Like Receptors). En primer lugar se analizaron las DCs diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L, que permite la generación de células dendríticas convencionales (cDC) y plasmacitoides (pDC) (Brasel et al., 2000), mientras que el GM-CSF, utilizado en los sistemas de diferenciación clásicos, sólo permite generar células dendríticas convencionales (cDC). Además este

sistema representa una aproximación más fisiológica para el análisis *in vitro* de las subpoblaciones de DCs, ya que genera las mismas subpoblaciones presentes en los órganos linfoides en condiciones basales. Tras 7 días de diferenciación, la presencia de cDCs y pDCs en el cultivo se confirma mediante el análisis de la expresión de CD11c en paralelo con la expresión diferencial de CD11b y B220 respectivamente (Nakano et al., 2001). Tras la maduración inducida por CpG-ODN 1826, un ligando del TLR-9 que se expresa tanto en las cDCs como en las pDCs y la maduración inducida por LPS, ligando del TLR-4, que provoca la maduración preferencial de las cDCs, se analizó la expresión de CD69 y se observó su inducción tanto en las cDCs como en las pDCs, como ocurre tras activación en otros tipos de leucocitos (Fig. 31 A). Esta expresión de CD69 correlacionaba con el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 (Fig. 31 A), CD40 y MHC de clase II (MHC II) (datos no mostrados), lo que sugiere que la regulación positiva de CD69 ocurre en paralelo con el proceso de maduración de las DCs en ratón.

Para confirmar que la regulación de la expresión de CD69 por las DCs de ratón en respuesta a estímulos de maduración también ocurre *in vivo*, se analizó la expresión de CD69 en las principales subpoblaciones presentes en los órganos linfoides secundarios del ratón tras la inyección i.v. de estímulos de maduración. Después de 15 h de la inyección i.v. de LPS y CpG, se estudiaron las subpoblaciones de DCs aisladas *ex vivo* del bazo para analizar el nivel de expresión de CD69 junto con el de otras moléculas coestimuladoras. En los órganos linfoides de ratón se han descrito distintas subpoblaciones de DCs caracterizadas por presentar funciones específicas y que difieren en su estado de maduración y expresión de marcadores fenotípicos (Ardavin, 2003). En el caso concreto del bazo, las subpoblaciones de DCs contienen las dos principales subpoblaciones de DCs, pDCs y cDCs, y estas últimas incluyen otras dos poblaciones que se pueden distinguir por su expresión diferencial de CD8 α .

Los resultados mostraron que CD69 estaba significativamente incrementado tras el tratamiento con LPS en las cDCs CD8 α ⁺ y CD8 α ⁻ (Fig. 31 B) y que su expresión correlacionaba con la regulación positiva de moléculas coestimuladoras como CD86 (datos no mostrados). Por otro lado, la inducción de CD69 en las pDCs tras estimulación con CpG estaba incrementada incluso antes de producirse el aumento de otras moléculas coestimuladoras (datos no mostrados).

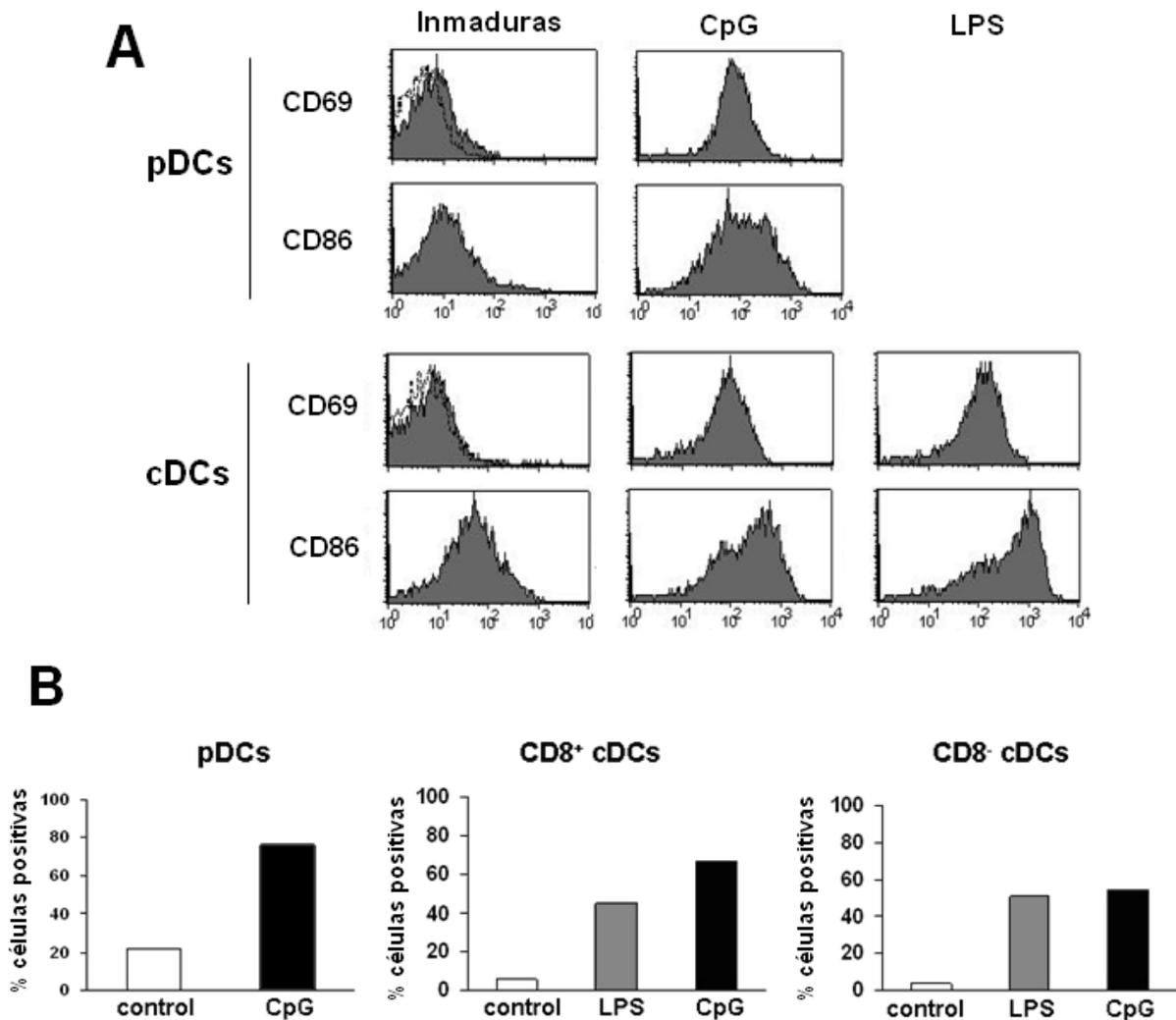


Fig. 31. Las DCs de ratón expresan CD69 tras estimulación con LPS o con CpG. (A) Se analizó por citometría de flujo la expresión de CD69 en las dos subpoblaciones de DCs obtenidas por diferenciación *in vitro* a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L y maduras con LPS y CpG durante 24 h, como se explica en Materiales y Métodos. Estos datos se representan junto con la expresión de la molécula coestimuladora CD86, que aumenta en paralelo con la maduración. En el histograma solapado se muestra el perfil del control de isotipo (línea fina). (B) Se analizaron las subpoblaciones de DCs aisladas *ex vivo* del bazo para cuantificar su nivel de expresión de CD69. Después de 15 h de la inyección i.v. de LPS y CpG, se obtuvieron fracciones enriquecidas en DCs del bazo y se tiñeron con anti-B220-FITC, anti-CD11c-PE, anti-CD8-APC y anti-CD69-biot + St PerCP para su análisis por citometría de flujo. Los tres gráficos representan la expresión de CD69 en porcentaje de células positivas en las distintas subpoblaciones de DCs presentes en el bazo, pDCs, cDCs CD8 α^+ y cDCs CD8 α^- . Cada gráfico corresponde a un experimento representativo de 3 experimentos realizados.

4.2. Caracterización de las subpoblaciones de DCs en los ratones CD69^{-/-}

Después de demostrar que la inducción de CD69 correlaciona con el incremento de expresión de moléculas coestimuladoras producido tras la maduración de DCs, decidimos estudiar si la diferenciación y la maduración de las subpoblaciones de DCs estaba afectada en los ratones CD69^{-/-}. Para ello, se analizó en primer lugar la diferenciación de DCs a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L en ratones control y CD69^{-/-}. Después de 7 días de diferenciación, observamos que la generación de DCs era equivalente en ambos tipos de ratones, obteniéndose una proporción similar de pDCs y cDCs (Fig. 32 A). Cuando se comparó la respuesta a maduración mediada por LPS o CpG de las DCs de los ratones control con las obtenidas de los ratones CD69^{-/-}, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los marcadores de maduración MHC II, CD40, CD80 o CD86 (Fig. 32 B).

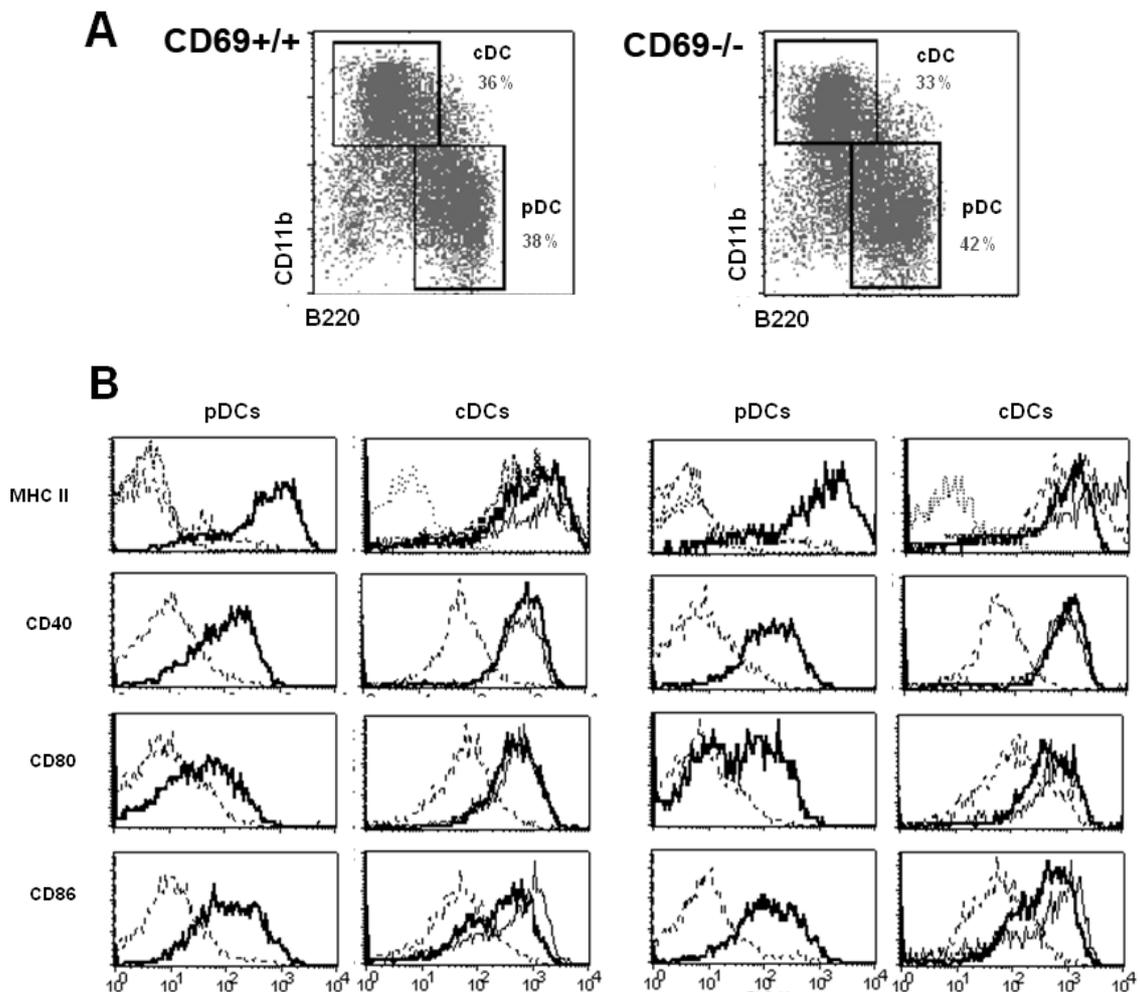
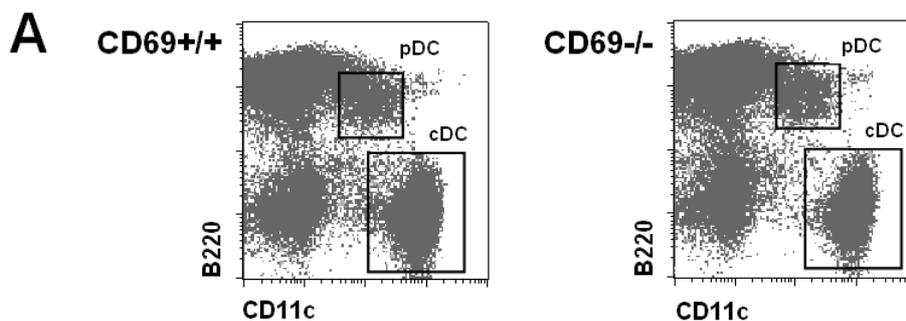


Fig. 32. Caracterización de las subpoblaciones de DCs obtenidas tras diferenciación *in vitro* a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L en los ratones CD69^{-/-}. (A) Se obtuvieron los precursores de la médula ósea de ratones control y de ratones CD69^{-/-} y después de 7 días

de diferenciación en presencia de Flt3-L, las células se marcaron con anti-B220-FITC y con anti-CD11b-PE y se analizó la proporción de pDCs y cDCs generadas por citometría de flujo, distinguiendo ambas poblaciones por sus niveles de B220 y CD11b (cDC: CD11b⁺B220⁻ y pDC: CD11b⁻B220⁺). **(B)** También se analizó por citometría de flujo la expresión de varios marcadores que aumentan su expresión tras maduración con LPS o CpG, como MHC II, CD40, CD80 y CD86 en ambas subpoblaciones de DCs en los ratones control (paneles izquierda) y en los ratones CD69^{-/-} (paneles derecha). Se representan las DCs inmaduras (línea de puntos), las DCs maduras con LPS (línea fina continua) y las DCs maduras con CpG (línea gruesa). Se muestra un experimento representativo de más de 10 experimentos realizados.

A pesar de que la diferenciación *in vitro* no está afectada en los ratones CD69^{-/-}, también se analizaron las subpoblaciones de DCs *in vivo* en los distintos órganos linfoides, observándose que tampoco había diferencias en la proporción y porcentaje relativo de las subpoblaciones de pDCs y cDCs entre los ratones CD69^{-/-} y los ratones control. Tanto en ganglios linfáticos, como en timo (datos no mostrados) o en bazo (Fig. 33 A), la proporción de pDCs y cDCs era equivalente, indicando que la diferenciación no estaba afectada por la ausencia de CD69. Para determinar si la maduración de las DCs *in vivo* podría estar afectada en ausencia de CD69, se analizó la expresión de MHC II y CD86 tras el tratamiento *in vivo* con LPS y CpG en las DCs obtenidas del bazo de ratones control y CD69^{-/-}. Los dos ligandos de TLR inducen la maduración de las cDCs, pero sólo el CpG induce la maduración de las pDCs. Tras 15 h de la inyección i.v. de LPS o CpG, las cDCs y las pDCs obtenidas mostraban un fenotipo maduro en ambos tipos de ratones, como se indica por el aumento de expresión de MHC II y CD86. La expresión de moléculas coestimuladoras y de MHC II aumenta con la maduración tanto en pDCs como en cDCs, aunque los niveles son más altos en cDCs que en pDCs, tanto *in vivo* como *in vitro*. En conclusión, CD69 no parece tener un papel en el desarrollo de las DCs por algún defecto en la migración de sus precursores o en la regulación de la expresión de MHC II y moléculas coestimuladoras durante la maduración de las DCs inducida a través de TLRs *in vivo* e *in vitro*.



B

MHC II

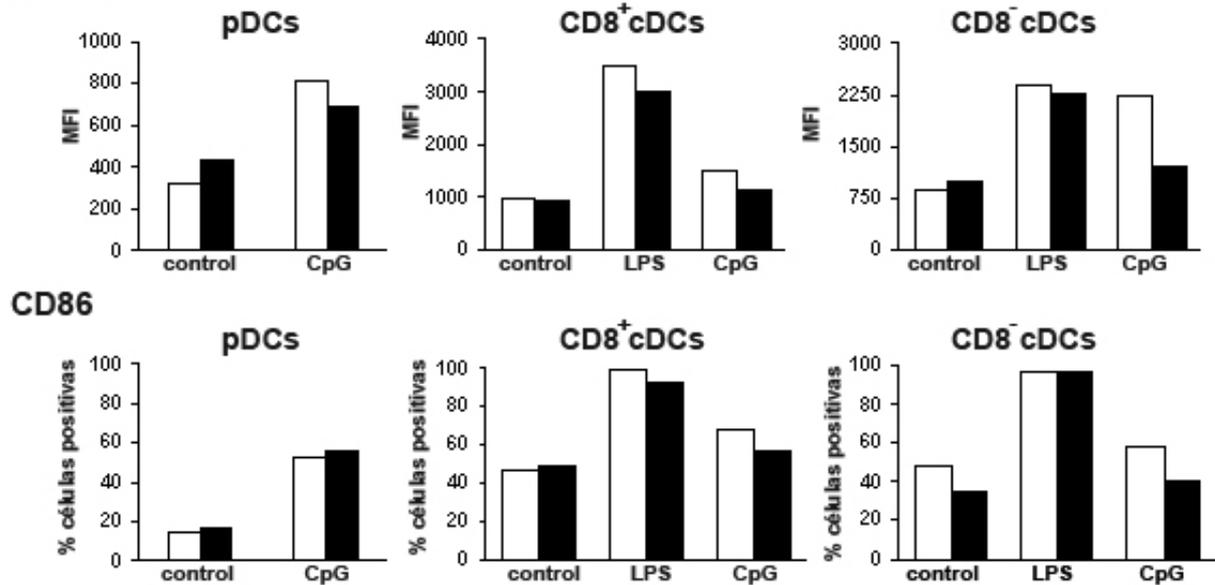


Fig. 33. Caracterización de las DCs en órganos linfoides de los ratones CD69^{-/-}. (A) Se analizaron por citometría de flujo las subpoblaciones de DCs en el bazo de ratones control (panel izquierdo) y CD69^{-/-} (panel derecho), utilizándose como marcadores anti-B220 FITC y anti-CD11c PE (pDCs: B220⁺ y cDCs: B220⁻). (B) Para estudiar la maduración de las DCs *in vivo* en los ratones CD69^{-/-}, se analizó por citometría de flujo la expresión de MHC II y CD86 15 h después de la inyección i.v. de LPS y CpG como está indicado en Materiales y Métodos. Se obtuvieron fracciones enriquecidas en DCs y se tiñeron con anti-CD11c PE, anti-B220 FITC, anti-CD8 APC y anti-MHC II biot + St PerCP o anti-CD86 biot + St PerCP. La figura representa la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) obtenida al analizar la expresión de MHC II (paneles superiores) y el porcentaje de células CD86⁺ (paneles inferiores) en ratones normales (barras blancas) y ratones CD69^{-/-} (barras negras) de un experimento representativo de 3 realizados. Tanto la expresión de MHC II como de CD86 se ha analizado en las subpoblaciones de pDCs, CD8⁺ cDCs y CD8⁻ cDCs, como está indicado en la figura.

4.3. Efecto de la ausencia de CD69 en la distribución y movilización de las DCs y LCs de la piel:

A pesar de que la diferenciación y la maduración inducida por TLRs no estaba afectada en los ratones CD69^{-/-}, otro aspecto fundamental en la función de las DCs como es la migración sí que se encuentra afectado, como hemos mostrado en los experimentos de migración *in vivo* de DCs de la piel al ganglio linfático.

Atendiendo a estos resultados, nos planteamos analizar el número y distribución de las dDCs y LCs en condiciones de homeostasis en ratones CD69^{-/-} con respecto a los

ratones control. Para ello, se obtuvieron muestras de epidermis de las orejas, se fijaron y se tiñeron para MHC II, observando que no había diferencias significativas en cuanto a la distribución y densidad de las LCs MHC II⁺ entre los ratones CD69^{-/-} y los ratones control.

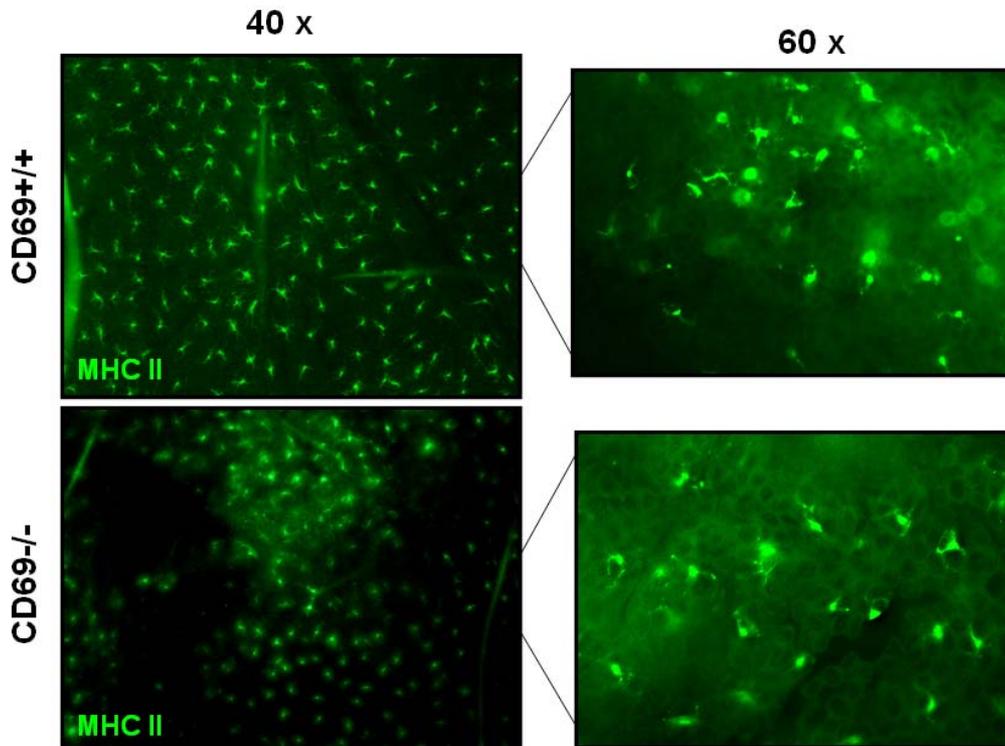


Fig. 34. Distribución de las células MHC II⁺ en la epidermis de ratones CD69^{-/-}. Se obtuvieron muestras de piel de la oreja de los ratones y se trataron como se explica en Materiales y Métodos, se fijaron con acetona y se tiñeron con anti-MHC II FITC. Las imágenes se analizaron con los aumentos 40X y 60X en un microscopio de fluorescencia Nikon, tal como está indicado en la figura.

Para cuantificar la proporción y el número de LCs y dDCs de la piel de los ratones CD69^{-/-} con respecto a los ratones control, se obtuvieron explantes de piel de la oreja, se trataron con tripsina para separar dermis y epidermis y se mantuvieron en cultivo durante 18 h con medio RPMI 10% FBS y GM-CSF para permitir la salida al medio de las DCs, como se indica en Materiales y Métodos. Posteriormente se recuperaron las células del sobrenadante de cultivo de la epidermis y de la dermis por separado y se analizó por citometría de flujo la expresión de MHC II para distinguir las LCs y las dDCs de los queratinocitos.

Como se puede observar en la Fig. 35, el número de LCs y dDCs obtenido en los ratones CD69^{-/-} es equivalente al obtenido en los ratones control.

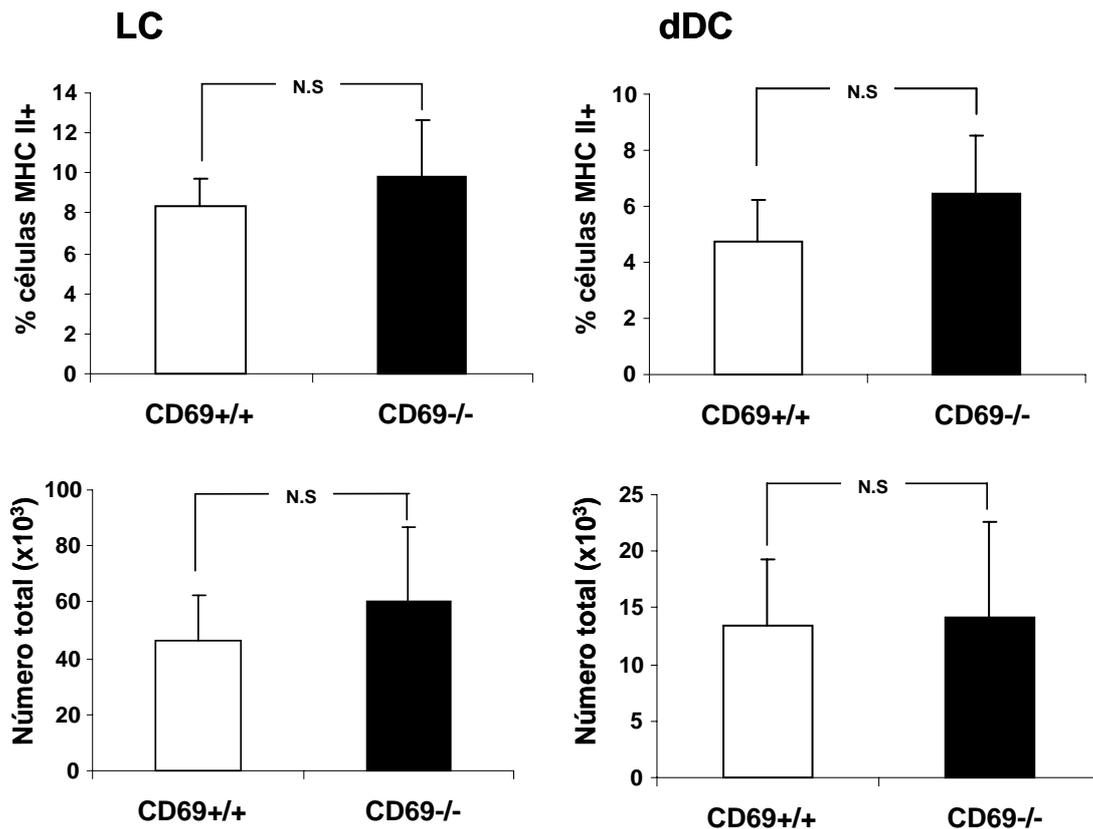


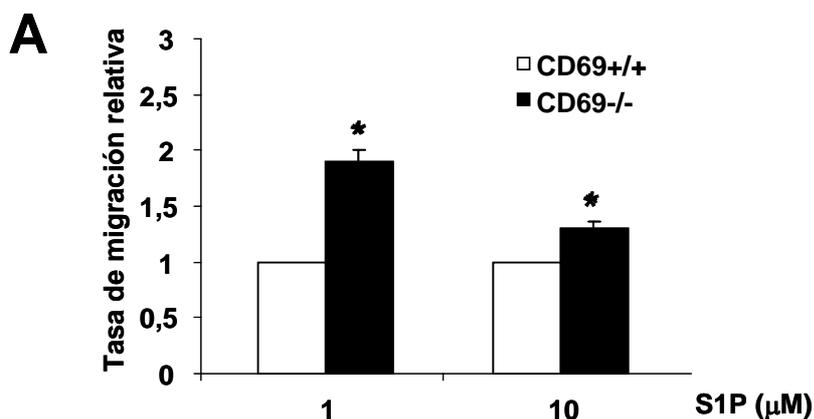
Fig. 35. Cuantificación de LCs y dDCs obtenidas a partir de explantes de piel en ratones CD69^{-/-} comparados con los ratones control. Las muestras de piel obtenidas de las orejas de ratones control y CD69^{-/-} fueron tratadas con tripsina para separar dermis y epidermis y cultivadas durante 18 h en medio RPMI 10% FBS con GM-CSF para provocar la migración de las LCs (epidermis) y dDCs (dermis) al sobrenadante, como se indica en Materiales y Métodos. Posteriormente se contó el número total de células obtenido y se analizó por citometría de flujo utilizando como marcador anti-MHC II conjugado a FITC. En los dos paneles superiores se muestra el porcentaje de células MHC II⁺ analizados en las poblaciones correspondientes a las LCs (panel izquierdo) y a las dDCs (panel derecho). En los paneles inferiores se representa el número de LCs o dDCs calculado a partir del total y el porcentaje de células MHC II⁺ (x10³) obtenido después del cultivo de los explantes de piel de los ratones control (barras blancas) y de los ratones CD69^{-/-} (barras negras). Los resultados muestran la media ± DE de 5 ratones analizados independientemente (N.S., diferencias no significativas estadísticamente).

Estos resultados sugieren que CD69 está modulando la migración de las DCs de la piel en respuesta a un antígeno, no observándose diferencias en estado basal en las subpoblaciones de DCs estudiadas en el ratón CD69^{-/-}, ni en los mecanismos de respuesta a maduración. El aumento de DCs CD69^{-/-} procedentes de la piel observado en el ganglio en el modelo de migración *in vivo* a FITC, tampoco se debe a que en condiciones de homeostasis la proporción de LCs y dDCs de la piel esté incrementada en los ratones CD69^{-/-}.

4.4. Las DCs de los ratones CD69^{-/-} presentan un incremento en la migración a S1P y tienen aumentada la expresión de S1P₁ en membrana tras maduración con LPS.

Recientemente se ha demostrado la regulación de la expresión del receptor S1P₁ en la membrana de los linfocitos a través de CD69, así como su implicación en procesos de migración como la salida de los linfocitos activados de los órganos linfoides secundarios (Shiow et al., 2006). Además, también se ha descrito que S1P está implicado en el proceso de migración de DCs de la piel a los ganglios linfáticos en ratón (Czeloth et al., 2005; Gollmann et al., 2008) y que las DCs maduras responden *in vitro* a S1P, un fenómeno que correlaciona con el aumento de los niveles de expresión de ARNm de S1P₁ (Czeloth et al., 2005).

Para estudiar la posible contribución de S1P al aumento de migración observado *in vivo* en las DCs de los ratones CD69^{-/-}, se realizaron ensayos de transmigración a distintas concentraciones de S1P. Los receptores de S1P presentan alta afinidad por el ligando y reconocen S1P a concentraciones nanomolares (Rosen et al., 2003). El número máximo de células migradas *in vitro* se obtiene en un rango de concentraciones de S1P que va desde 0.1 μ M hasta 10 μ M en experimentos de dosis respuesta a S1P (datos no mostrados). Este porcentaje de migración sería equivalente al que se obtiene utilizando concentraciones de 0,01 μ g/ml de CCL21, ligando de CCR7, que se sabe que actúa como potente quimioatrayente de DCs maduras (datos no mostrados) (Vecchi et al., 1999). Utilizando DCs diferenciadas *in vitro* a partir de precursores de la médula ósea tratadas con LPS, ligando del TLR-4 que provoca la maduración de las cDCs, en el rango de concentraciones de S1P entre 1 y 10 μ M, se observó un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células migradas de ratones CD69^{-/-} (Fig. 36). Estas DCs migradas son preferencialmente cDCs, caracterizadas por la expresión de CD11c y CD11b, y por la ausencia de expresión de B220, como se analizó por citometría de flujo (datos no mostrados).



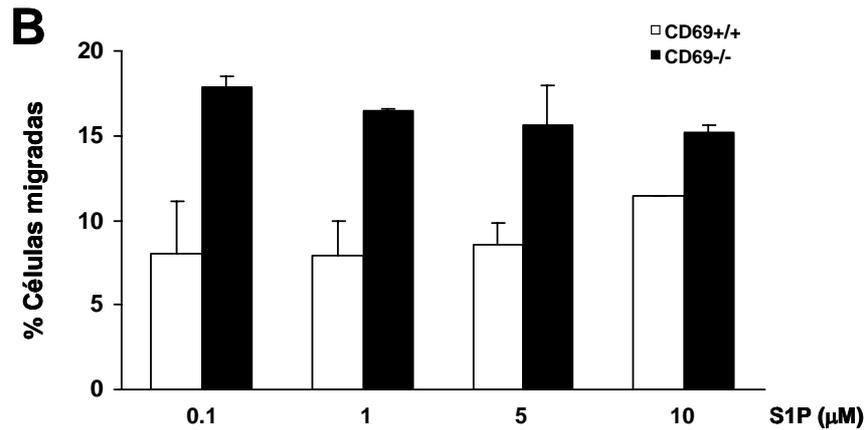


Fig. 36. Las DCs activadas con LPS de ratones CD69^{-/-} responden mejor a S1P₁ en ensayos de trans migración que las de ratones control. Para realizar los ensayos de trans migración se añadieron 3.10⁵ DCs maduras con LPS en 100 μl de medio RPMI suplementado con 0.1% de BSA libre de ácidos grasos en la cámara superior y se depositaron 400 μl de este mismo medio con S1P a las concentraciones indicadas en los gráficos en la cámara inferior. Tras 2.5 h de incubación, las cDCs se recogieron y se contaron en el citómetro. **(A)** Se muestra la media aritmética ± DE de tres experimentos independientes de la tasa de migración relativa representada como incremento de migración de las DCs CD69^{-/-} (barras negras) sobre las DCs CD69^{+/+} (barras blancas), a las que se ha asignado arbitrariamente el valor de 1 (*P<0.05, T de Student). **(B)** El gráfico muestra el porcentaje de células migradas calculado a partir del número de células vivas recuperado en la cámara inferior sobre el número total de células (considerado el 100%). Se muestra un experimento representativo de los 4 realizados, de la media aritmética de los duplicados del experimento ± DE de las DCs CD69^{+/+} (barras blancas) y de las DCs CD69^{-/-} (barras negras).

Estos datos sugieren que CD69 podría estar regulando la expresión de S1P₁ no sólo en linfocitos sino también en DCs, lo que explicaría el aumento en la migración *in vitro* de las DCs en respuesta a S1P observado. Para estudiar esta hipótesis se diferenciaron DCs a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L en ratones control y CD69^{-/-}. Tras 7 días de diferenciación se activaron con LPS, se lisaron y se analizó por inmunotransferencia (WB, **Western Blot**) la expresión de S1P₁, observándose un claro incremento en los ratones CD69^{-/-} (Fig. 37).

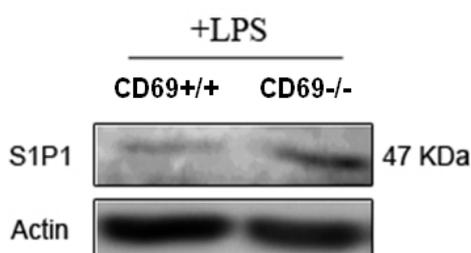
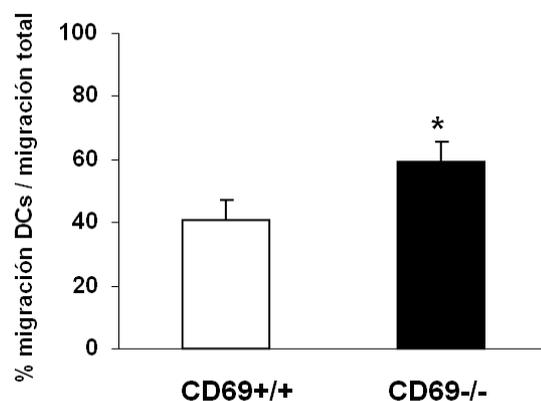


Fig. 37. La expresión de S1P₁ por WB en DCs CD69^{-/-} activadas con LPS está incrementada con respecto a las DCs control. Se cargaron 20 μg de fracción de membrana de 4.10⁶ de DCs CD69^{-/-} o CD69^{+/+} activadas con LPS en un gel SDS-PAGE del 10% como se indica en Materiales y Métodos. Se analizó la expresión de S1P1 por WB y se utilizó como control de carga la expresión de actina. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

4.5. La migración *in vivo* de las DCs está incrementada en los ratones CD69^{-/-}, aunque su distribución en ganglio no varía.

Para validar los resultados obtenidos *in vitro*, decidimos utilizar otro modelo de migración *in vivo* a los ganglios linfáticos, así como analizar las DCs una vez han llegado al ganglio mediante microscopía multifotónica intravital. Para ello se utilizaron DCs diferenciadas de precursores de la médula osea después de 7 días de cultivo con Flt3-L, se trataron con LPS para conseguir la maduración preferencial de las cDCs y se marcaron con dos sondas intracelulares que emiten en distintas longitudes de onda del espectro de luz: CMTMR y CFSE. En la almohadilla plantar de cada extremidad de ratones control, se inyectó s.c. una combinación distinta de células marcadas, es decir, en una se inyectaron DCs CD69^{-/-} CFSE + DCs CD69^{+/+} CMTMR y en la otra DCs CD69^{-/-} CMTMR + DCs CD69^{+/+} CFSE. Con esta estrategia experimental se minimizan las posibles diferencias de movilidad que pueda provocar la propia sonda. Después de 18 h de la inyección *in vivo*, se realizaron suspensiones celulares de los ganglios poplíteos y se analizaron por citometría de flujo para cuantificar el porcentaje de células migradas en cada canal. El porcentaje de migración observado en 4 experimentos independientes reveló un incremento significativo de la migración de las DCs CD69^{-/-} de 1.5 veces aproximadamente (Fig. 38), confirmando que estas DCs, que responden mejor a S1P *in vitro*, también tienen una mayor tasa de migración al ganglio *in vivo* cuando son inyectadas subcutáneamente. Además, este ensayo permite corroborar que el incremento de migración observado en los ratones CD69^{-/-} no se debe a efectos secundarios generados en el propio ratón deficiente en CD69 y que este efecto es específico de las DCs.

Fig. 38. Las DCs CD69^{-/-} migran más al ganglio linfático cuando son inyectadas *in vivo* que las DCs CD69^{+/+}. El gráfico muestra el porcentaje de migración de las DCs llegadas al ganglio poplíteo 18 h después de su inyección *in vivo* en la almohadilla plantar de las extremidades traseras de los ratones CD69^{+/+} (barra blanca) y CD69^{-/-} (barra negra). El gráfico muestra la media ± DE de 6 experimentos independientes (*P < 0.05, T Student).

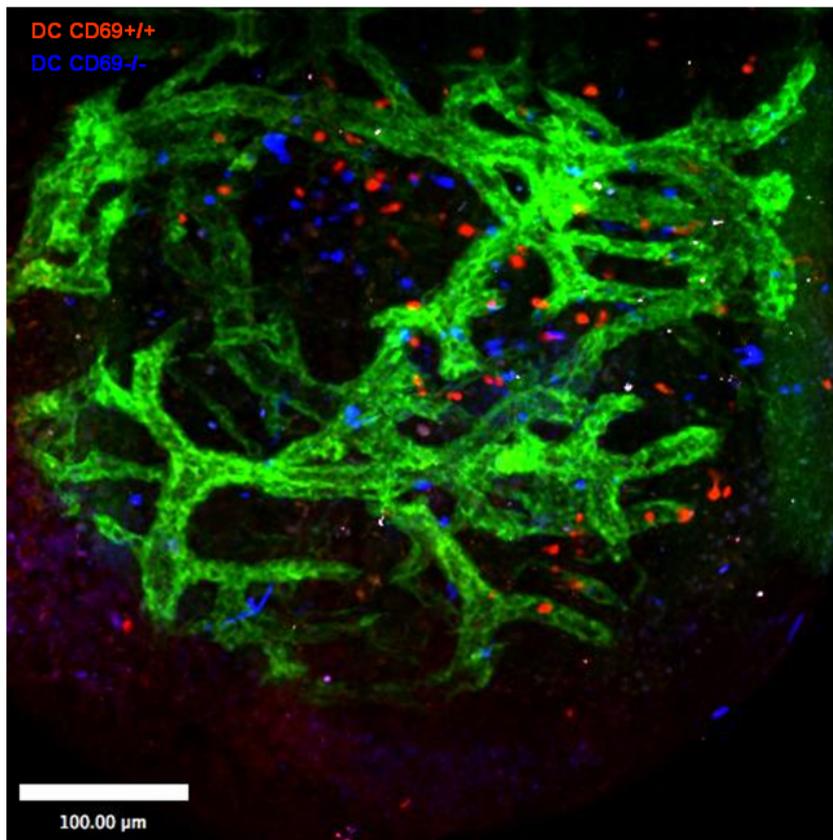


La distribución de las DCs en compartimentos especializados de los tejidos linfoides, así como de los linfocitos T y B es un proceso guiado por una amplia red de quimioquinas y receptores de quimioquinas (Cavanagh y Von Andrian, 2002). Las DCs cargadas con el antígeno migran de la periferia a los órganos linfoides a través de los vasos linfáticos aferentes (Forster et al., 1999). Una vez dentro de los órganos linfoides, las DCs expresan CCL19, que está bien establecido que atrae a las células T naïve así como a otras DCs a través de su interacción con CCR7 (Sallusto et al., 1998).

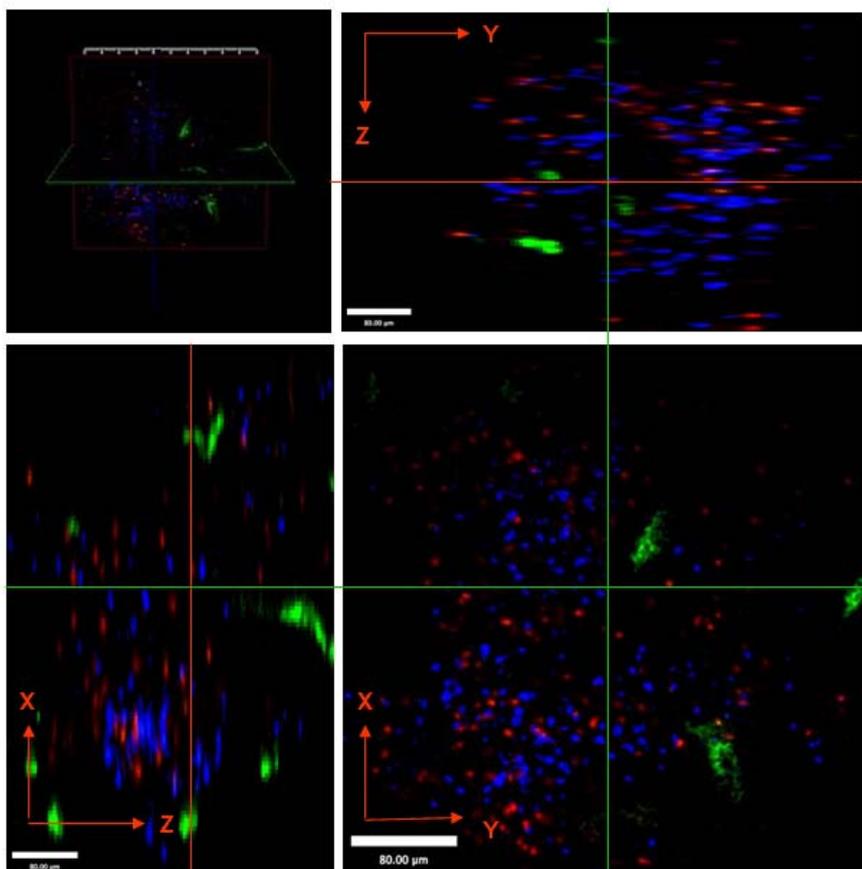
En este contexto tisular, quisimos estudiar si el aumento observado en la migración de las DCs *in vivo* podría estar asociado con algún cambio en la distribución de las DCs en los ganglios linfáticos de ratones CD69^{-/-}. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de microscopía multifotón del ganglio fijado 18 h después de haber inyectado s.c. las DCs maduras con LPS y marcadas con las sondas fluorescentes CMTMR y CMAC en una combinación distinta en cada extremidad, del mismo modo que en el experimento anterior. Para visualizar la distribución de las DCs en el ganglio y ver sus posiciones relativas con respecto a las vénulas de endotelio alto, se inyectó un mAb anti-PNAd i.v. 30 min antes de sacrificar a los ratones. Posteriormente se extrajeron los ganglios poplíteos, se fijaron, se incluyeron en bloques de agarosa al 1% y se trataron con una solución de BABB, tal como se explica en Materiales y Métodos. La ventaja de este protocolo consiste en que el BABB aporta una elevada transparencia al bloque de agarosa, permitiendo una visualización de hasta 650 µm de espesor con el microscopio multifotón.

La reconstrucción tridimensional de las imágenes obtenidas permitió observar que la distribución de estas células en el ganglio es normal (Fig. 39 A-D). Tanto las DCs CD69^{-/-} como las CD69^{+/+}, se distribuyen cerca de las vénulas de endotelio alto y están excluidas de los folículos B, situándose cerca de las zonas donde se encuentran las células T (Kissenpfennig y Malissen, 2006; Bousso, 2008). Por otro lado, el análisis de las imágenes con el programa Velocity permite realizar contajes del número de células marcadas que se detectan en la reconstrucción tridimensional, observándose un aumento en el número de DCs CD69^{-/-} con respecto a las DCs control independiente de la sonda utilizada para su marcaje, lo que corrobora el dato que ya se había cuantificado por citometría de flujo en el experimento de transferencia adoptiva de la Fig. 38.

A



B



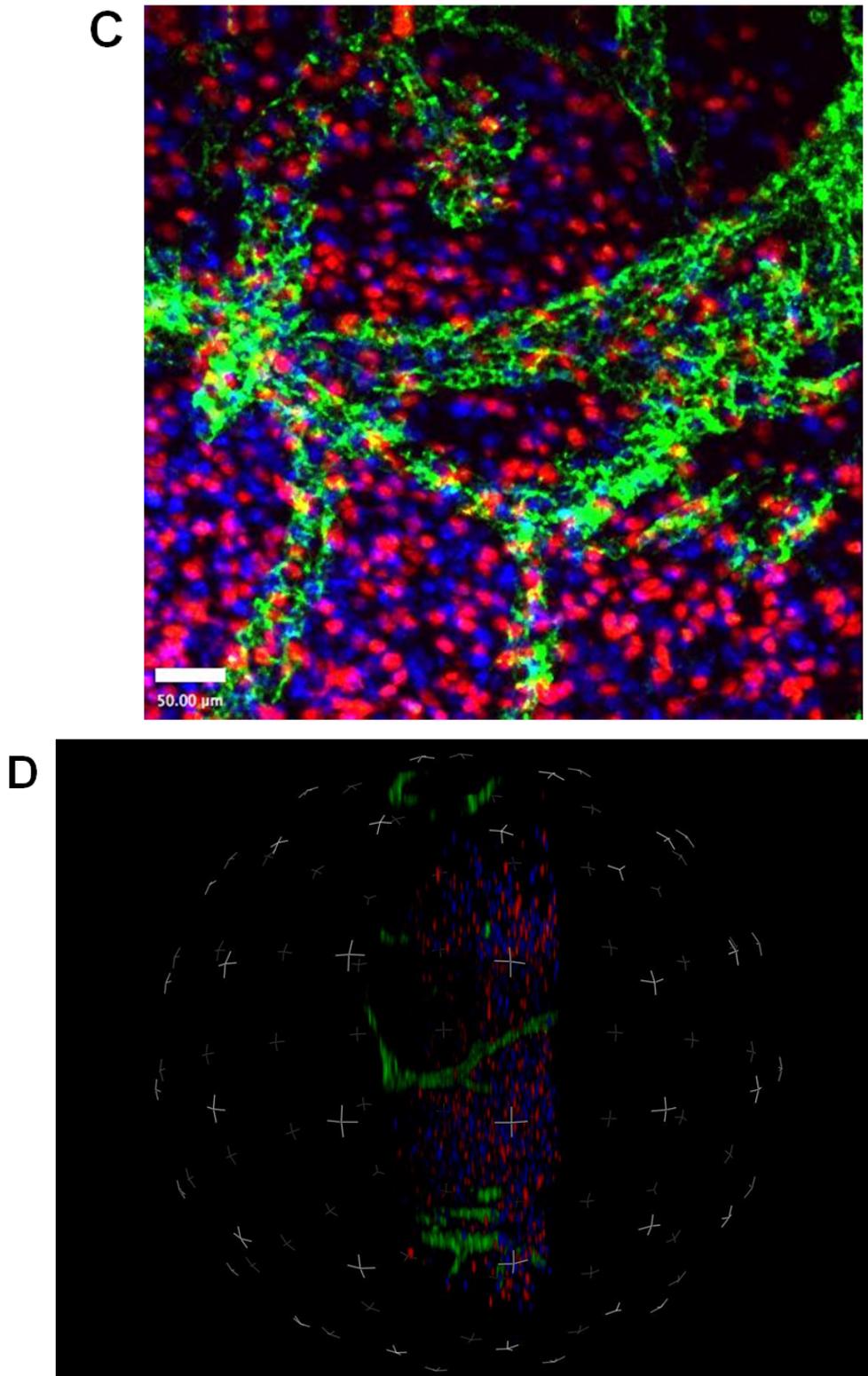


Fig. 39. Las DCs $CD69^{-/-}$ muestran una distribución similar a las DCs $CD69^{+/+}$ en el ganglio linfático después de ser inyectadas *in vivo*. Para analizar la distribución de las DCs en los ganglios linfáticos de ratones $CD69^{-/-}$ se llevaron a cabo ensayos de microscopía multifotón del ganglio fijado 18 h después de haber inyectado *in vivo* DCs diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-

L y maduradas con LPS, marcadas con las sondas fluorescentes CMTMR y CMAC. A las 16 h se inyectó i.v. 1 μ g de anti-PNAd (Meca79/Alexa 594), que permite teñir las vénulas de endotelio alto del ganglio y se dejó actuar durante 30 min. Posteriormente se sacrificó a los ratones, se extrajeron los ganglios poplíteos de cada extremidad y se incluyeron en un bloque de agarosa, tratándolos como se explica en Materiales y Métodos. Los bloques se visualizaron con el microscopio multifotón (Olympus, BX50WI) y se realizaron cortes hasta 650 μ m de espesor. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Velocity^R para Mac, que permite obtener una reconstrucción tridimensional integrando todos los cortes **(A)**, la reconstrucción de cada plano espacial (X-Y, X-Z y Z-Y) **(B)**, la reconstrucción de la imagen en un solo plano **(C)** y vídeos de la reconstrucción 3D **(D)**. En esta figura se muestra un experimento representativo de los 4 realizados, donde las DCs CD69^{+/+} se han marcado con CMTMR (rojo) y las DCs CD69^{-/-} se han marcado con CMAC (azul).

DISCUSIÓN

1. CD69 actúa como molécula moduladora de la respuesta inmune *in vivo*.

Tanto el patrón de expresión de CD69 como su posible papel como receptor de transducción de señales, parecen indicar una función relevante de CD69 en la respuesta inmune. Además, la expresión de CD69 durante el desarrollo y maduración de los timocitos o las células B, así como durante la activación de linfocitos maduros, apuntaban a un posible papel en la diferenciación y maduración de estas células (D'Ambrosio et al., 1994). Sin embargo, a pesar de que las evidencias *in vitro* sugerían un posible papel proinflamatorio para CD69, la expresión constitutiva de la molécula por células T en ratones transgénicos, no estaba asociada a un aumento en inflamación (Feng et al., 2002; Nakayama et al., 2002). Además, el análisis de respuestas específicas de antígeno en ratones CD69^{-/-} no reveló ninguna función de CD69 en ese contexto (Lauzurica et al., 2000).

Dado que los resultados *in vitro* e *in vivo* resultaban poco esclarecedores, se estudió el papel de CD69 en un modelo *in vivo* de inflamación crónica, la AIC. Este análisis se basó en dos evidencias previas: CD69 está persistentemente expresado en los focos inflamatorios (Laffón et al., 1991) y el gen de CD69 se localiza en una región que contiene *loci* de susceptibilidad para muchas enfermedades autoinmunes, incluida la AIC (Remmers et al., 1996). La respuesta a AIC en los ratones CD69^{-/-} claramente apuntaba hacia un nuevo papel regulador para la molécula. Los ratones CD69^{-/-} desarrollan una forma exacerbada de AIC con un aumento de respuesta de células T y B contra el colágeno. Este incremento en la respuesta correlaciona con la reducción en los niveles de TGF- β en las articulaciones inflamadas, ya que esta citoquina tiene un papel antiinflamatorio en AIC, disminuyendo la expresión de otros mediadores proinflamatorios (Brandes et al., 1991). Además, el tratamiento con anticuerpos bloqueantes anti-TGF- β aumenta la severidad de la artritis, incrementando las citoquinas proinflamatorias y las quimioquinas, en ratones normales pero no en ratones CD69^{-/-} (Sancho et al., 2003).

2. Estudio de CD69 como diana terapéutica en artritis.

Dado el posible papel regulador de CD69 en la respuesta inmune inflamatoria, se ha establecido su potencial terapéutico en enfermedades autoinmunes, utilizando mAb anti-CD69 de distintos isotipos que aumentan o inhiben la severidad de la AIC y demuestran

como los mAbs son reactivos valiosos para estudiar la función de CD69. Así, el anticuerpo IgG1 anti-CD69 2.2, que media la modulación negativa de la expresión en membrana de CD69 (Esplugues et al., 2005), provoca un incremento en la susceptibilidad a la AIC, induciendo un fenotipo similar al de los ratones CD69^{-/-}, con reducción de la producción de TGF- β . Estos datos son totalmente consistentes con los efectos inhibidores del mAb 2.2 observados en el crecimiento y metástasis de tumores MHC de clase I^{neg} en ratones CD69^{-/-}, donde se observó un aumento de la muerte mediada por células NKs, provocando un fenotipo similar al que se había observado previamente en los ratones CD69^{-/-} (Esplugues et al., 2003).

Por el contrario, el mAb IgG2a anti-CD69 2.3 inhibe fuertemente el desarrollo de la AIC. Se ha observado que la primera fase de la respuesta inmune secundaria, cuando los linfocitos T efectoras continúan en el ganglio, es el período más sensible al tratamiento con el mAb 2.3. Como CD69 es un marcador de células activadas que posteriormente estarían mediando un efecto proinflamatorio en AIC, la depleción de todas o algunas de estas subpoblaciones de células previene el desarrollo de la artritis en este modelo. Además, en los experimentos donde se trataba a los ratones *in vivo* con el mAb 2.3, se observó la reducción en el número de células CD69⁺ en ganglios linfáticos activados, lo que sugería que se estaba produciendo una depleción parcial de estas células. Para evaluar esta hipótesis directamente, se transfirieron linfoblastos T marcados con CFSE a ratones tratados con el mAb 2.3 o con su control de isotipo y se midió el número de células en el bazo dos días después. El resultado mostró una clara depleción parcial de células marcadas por el mAb 2.3. Estas observaciones están apoyadas por los experimentos de transferencia adoptiva, que claramente demuestran que la depleción *in vitro* dependiente de complemento de las células T CD25⁺ CD69⁺ por el mAb 2.3 previene la consecuente transferencia de la enfermedad por células T sensibilizadas contra CII.

Debido a que la lisis de células CD69⁺ por el mAb 2.3 es sólo parcial, quisimos evaluar si podría explicar por sí misma la reducción de reactividad específica contra el CII dirigida a reducir la inflamación. El tratamiento *in vivo* con el mAb 2.3 reduce la proliferación en respuesta a CII y la frecuencia de células específicas contra CII secretoras de IFN- γ . Estos datos muestran que la depleción parcial provocada por el mAb 2.3 afecta al número de células efectoras contra CII, lo que explicaría la disminución de la severidad de la AIC.

El hecho de que tanto el mAb 2.2 como el 2.3 compitan por su unión a CD69 (datos no mostrados), sugiere que ambos reconocen un epítipo solapante en la molécula. Los efectos opuestos observados para estos dos anticuerpos, se deben a su diferente capacidad de unir complemento activado, provocando la depleción parcial de las células CD69⁺ en el caso del mAb 2.3. Además, no podemos descartar que la diferente unión a receptores Fc pueda tener un papel complementario. El mAb 2.3 es una IgG2a, un isotipo que es capaz de unirse de forma monomérica a los receptores FcγRI con alta afinidad presentes en la membrana de macrófagos de ratón (Leu et al., 1988). Por el contrario, el isotipo del mAb 2.2 es IgG1, que requiere la agregación o formación de inmunocomplejos para interactuar con los receptores Fc (Diamond y Scharff, 1980). Esta diferencia permite hipotetizar que el mAb 2.3 se podría unir a los receptores Fc de la membrana de las DCs y unirse a moléculas de CD69 de las células activadas al mismo tiempo, durante las interacciones célula-célula *in vivo*, generando señales intracelulares. Es posible que la unión a esas moléculas de CD69 medie una inhibición en la respuesta Th17, simulando lo que podría ocurrir al producirse la unión a su ligando natural en ese contexto, como podríamos inferir a partir de nuestros resultados en el modelo de HSC. La disminución de la respuesta Th17 actuaría disminuyendo la severidad de la enfermedad, ya que se ha descrito recientemente que las células efectoras que secretan IL-17 son fundamentales en el modelo de AIC (Nakae et al., 2003).

Se requerirían varios estudios para confirmar o refutar estas posibilidades, además puede haber explicaciones alternativas. Por ejemplo, la unión de los mAbs 2.2 o 2.3 puede también tener efectos diferentes en la modulación de la expresión en membrana de CD69 y en la transducción de señales. Además, CD69 puede tener un papel en la generación de células T CD4⁺ reguladoras. A favor de este punto de vista, está la evidencia de que hay una subpoblación de células CD4⁺CD69⁺ en tejidos linfoides periféricos y en infiltrados inflamatorios en un modelo de lupus de ratón que son anérgicas, incapaces de sintetizar citoquinas proinflamatorias y que inhiben la síntesis de citoquinas por parte de las células CD4⁺CD69⁻ (Ishikawa et al., 1998). Por otra parte, existe una población recientemente descrita por Han y col. CD69⁺CD4⁺CD25⁻ en un modelo de tumores en ratón, donde la activación de ERK dependiente de la señalización a través de CD69 lleva a estos linfocitos T reguladores a expresar TGF-β1 de membrana, que media la supresión de la proliferación de células T (Han et al., 2009).

Tanto la exacerbación de la AIC como la inhibición del crecimiento de tumores observado en ratones CD69^{-/-} (Esplugues et al., 2003; Sancho et al., 2003) se observa también en los ratones tratados con el mAb 2.2, que modula negativamente la expresión de CD69 y reproduce transitoriamente el fenotipo del ratón CD69^{-/-} (Esplugues et al., 2005). Además, este mAb 2.2 es muy útil para estudiar los efectos de la deficiencia en CD69 sin necesidad de utilizar estrategias genéticas (ratones CD69^{-/-}).

En conclusión, nuestros resultados con el mAb 2.2 confirman en un modelo experimental independiente, que CD69 actúa como molécula reguladora negativa de la respuesta inmune, como se había observado previamente en los ratones CD69^{-/-} (Esplugues et al., 2003; Sancho et al., 2003). Sin embargo, CD69 es también un marcador de células T antígeno específicas activadas. Así, la depleción parcial de estas subpoblaciones de células activadas con el mAb anti-CD69 2.3 es una potente herramienta para modular la respuesta inmune.

3. Papel de CD69 en inflamación aguda mediada por neutrófilos:

Como hemos concluido en los apartados anteriores, los efectos observados *in vivo* para CD69 en el modelo de AIC claramente demostraban una función moduladora negativa de la respuesta inmune inflamatoria. Sin embargo, utilizando otros ratones CD69^{-/-} generados independientemente, se había descrito previamente que los ratones CD69^{-/-} mostraban una marcada reducción de la respuesta inflamatoria en un modelo acelerado de artritis dependiente de neutrófilos (modelo de AIAC), lo que sugería que CD69 podría tener un papel fundamental en la función de los neutrófilos durante la inducción de artritis en AIAC (Murata et al., 2003). En conclusión, estos datos sugerían que CD69 podría tener un papel dual en inflamación: como regulador negativo en procesos inflamatorios dependientes de linfocitos y de células NKs, y como regulador positivo en respuestas inflamatorias agudas mediadas por neutrófilos (Sancho et al., 2005).

Sin embargo, estos efectos opuestos parecían difíciles de reconciliar, ya que la fase efectora de la AIC es dependiente no sólo de linfocitos, sino también de respuestas mediadas por anticuerpos y por neutrófilos (Seki et al., 1988; Wipke y Allen, 2001). Para clarificar este punto, decidimos estudiar el modelo de AIAC en nuestros ratones CD69^{-/-}. Después de este estudio encontramos que: (1) la severidad de la artritis inducida por mAb anti-CII no estaba reducida en los ratones CD69^{-/-} y de hecho, no mostraban diferencias significativas, a pesar de que las condiciones experimentales, los

reactivos utilizados y el método para valorar el seguimiento de la artritis eran similares a los utilizados en los datos previamente documentados (Murata et al., 2003); (2) la modulación negativa de CD69 *in vivo* en ratones normales tratados con el mAb 2.2, que mimetiza el fenotipo de los ratones CD69^{-/-} (Esplugues et al., 2005; Sancho et al., 2006), tampoco mostró ningún efecto significativo en la severidad de la artritis; (3) el ARNm de las principales citoquinas proinflamatorias implicadas en AIAC estaba incrementado a nivel local en los ratones normales tratados con el mAb 2.2 con respecto a los tratados con su control de isotipo; y (4) el descenso de los niveles de TGF- β en la articulación observados en AIC se observa también en el modelo de AIAC.

La controversia generada por estas observaciones con respecto a los datos previos publicados por Murata y col. podrían deberse a diferencias intrínsecas entre las dos líneas de ratones CD69^{-/-}, más que a diferencias en las condiciones experimentales. Sin embargo, nuestros estudios con el mAb 2.2 en el modelo de AIAC en ratones normales clarifican esta discrepancia. El tratamiento *in vivo* de los ratones con este mAb modula negativamente la expresión de CD69, pero no depleciona las células que lo expresan. El tratamiento con el mAb 2.2 provoca un fenotipo similar al de los ratones CD69^{-/-}. Como hemos visto, el mAb 2.2 aumenta el rechazo de tumores dependiente de células NKs e incrementa la AIC en ratones normales (Esplugues et al., 2005; Sancho et al., 2006). Por tanto, estos resultados demuestran que la regulación *in vivo* de CD69 no provoca ningún efecto en la severidad de la enfermedad en el modelo de AIAC.

En este momento, es difícil saber si hay diferencias intrínsecas entre nuestro ratón CD69^{-/-} y el utilizado por Murata y col. (Murata et al., 2003). No obstante, nosotros hemos confirmado nuestros resultados mediante una estrategia experimental independiente utilizando el bloqueo de la expresión de CD69 mediante el mAb anti-CD69 2.2. Estos experimentos muestran claramente que nuestros resultados no se deben a ninguna alteración genética adicional producida durante los procesos de recombinación en la generación de ratones CD69^{-/-}.

También se ha evaluado la expresión de citoquinas y quimioquinas clave en las articulaciones con artritis, ya que en la AIAC, la expresión de diferentes mediadores inflamatorios correlaciona con la inflamación (Kagari et al., 2002). En este sentido, se ha observado que los niveles de IL-6, IL-1 β y MCP-1 están aumentados en las articulaciones con artritis de los ratones tratados con el mAb 2.2. Estos datos son consistentes con nuestros resultados previos, donde un incremento en las citoquinas proinflamatorias correlacionaba con el aumento en la inflamación observado en los

ratones CD69^{-/-} en el modelo de AIC (Sancho et al., 2003). Además, en este modelo, el aumento en la respuesta inflamatoria estaba asociado con el descenso en la expresión de TGF- β (Sancho et al., 2003; Sancho et al., 2006). De forma similar, en la AIAC, el tratamiento con el mAb 2.2 también reduce los niveles de TGF- β . En este modelo el incremento observado en las citoquinas proinflamatorias no está asociado con el incremento en la severidad de la enfermedad. La respuesta inflamatoria en el modelo de AIAC aguda es rápida y robusta, probablemente cercana al máximo. En esta situación, el incremento observado en las citoquinas proinflamatorias en ausencia de CD69 podría no culminar en un aumento en la inflamación. Esta observación es consistente con nuestros resultados previos en AIC, donde el incremento de la respuesta era más evidente en la artritis moderada observada en ratones C57BL/6 (Sancho et al., 2003), que en la artritis severa observada en ratones DBA/1 (Sancho et al., 2006).

Con objeto de dilucidar el papel de CD69 en la función inflamatoria de los neutrófilos, también estudiamos la respuesta en dos modelos adicionales de inflamación aguda en ratones CD69^{-/-}. Primeramente se estudió un modelo de reclutamiento de neutrófilos en respuesta a zimosano, que permite estudiar la respuesta inflamatoria en un fluido semejante al líquido sinovial, ya que las cavidades formadas por inyección subcutánea de aire desarrollan una capa de membrana sinovial (Edwards et al., 1981). Esta acumulación de neutrófilos en respuesta al tratamiento no se encuentra afectada en ratones CD69^{-/-}. Estos resultados también se confirman en otro modelo de reclutamiento de neutrófilos en la cavidad peritoneal en respuesta a tioglicolato. Los datos obtenidos claramente indican que el déficit genético de CD69 no afecta a las respuestas mediadas por neutrófilos en tres modelos experimentales diferentes: el modelo de AIAC, el de reclutamiento de neutrófilos en respuesta a zimosano y el de tioglicolato. Estos datos van en contra de una posible función reguladora positiva de CD69 en la función de neutrófilos.

4. Papel dual de CD69: Efecto sobre la diferenciación de linfocitos T en la respuesta inmune y sobre la migración celular.

Para analizar en detalle las observaciones previas que implican a CD69 como regulador negativo de la respuesta inmune inflamatoria, decidimos utilizar un modelo de hipersensibilidad por contacto al alérgeno Ox para estudiar la respuesta en los ratones CD69^{-/-} con respecto a los ratones de fenotipo salvaje. A pesar de que el curso de la

respuesta a Ox es similar en el tiempo en ambos tipos de ratones, la inflamación de la oreja y los cambios patológicos asociados a la HSC están aumentados en los ratones CD69^{-/-}. El análisis de la expresión del ARNm de los mediadores inflamatorios presentes en el tejido inflamado permitió observar un aumento en las principales citoquinas proinflamatorias de la respuesta a HSC. Estos resultados muestran que la respuesta asociada a HSC está incrementada en ausencia de CD69 y confirman a CD69 como regulador negativo de la respuesta inmune.

Los resultados obtenidos en el modelo de AIC mostraban que el incremento de la inflamación en los ratones CD69^{-/-} estaba asociado a la disminución en los niveles de expresión de la citoquina TGF- β en las articulaciones inflamadas (Sancho et al., 2003). Además, los estudios *in vivo* con mAb anti-TGF- β mostraron que la reducción de los niveles de esta citoquina son los responsables, al menos parcialmente, de la respuesta exacerbada que generan los ratones CD69^{-/-}. En este sentido, en el modelo de HSC no se observó que CD69 estuviera implicado en la regulación de TGF- β en el foco inflamatorio. A pesar de que TGF- β ha sido descrito como la diana principal para la regulación de la inflamación en AIC por CD69, estos datos sugerían que debe haber otros mecanismos reguladores implicados en este modelo y por ello se estudió la posible regulación *in vivo* de la diferenciación de los linfocitos T o de su función reguladora, ya que ninguno de estos procesos se había estudiado previamente en los ratones CD69^{-/-}. Además, los resultados de otros grupos que relacionan a CD69 con S1P₁, aportan un nuevo punto de vista sobre el papel funcional de CD69, implicándolo en los procesos de recirculación y migración de linfocitos (Shiow et al., 2006), lo que podría explicar, al menos en parte, alguno de los efectos observados.

4.1. Papel de CD69 en la diferenciación de los linfocitos T efectores en el ganglio en el modelo de HSC.

La respuesta a HSC en ratón es un excelente modelo experimental para analizar la generación de linfocitos T efectores en respuesta a alérgenos de contacto. Durante la fase de sensibilización las dDCs y las LCs capturan el antígeno y lo llevan hasta el ganglio, donde lo presentan a los linfocitos T vírgenes y se generan las poblaciones efectoras. Durante la fase de sensibilización, en el ganglio linfático se generan varios tipos distintos de células específicas contra el hapteno: las células T CD8⁺, efectoras durante la fase de resolución de la respuesta y las células T CD4⁺, productoras de IL4,

que actúan como células reguladoras disminuyendo la inflamación en este modelo (Gocinski y Tigelaar, 1990; Bour et al., 1995; Bouloc et al., 1998; Saint-Mezard et al., 2005). La población CD8⁺ productora de IL-17 (Th17) se considera actualmente como la principal población efectora, ya que se ha observado que la respuesta a HSC está reducida en ratones IL-17^{-/-} (Nakae et al., 2002) y en ratones de fenotipo salvaje tratados con mAb anti-IL-17 neutralizantes (He et al., 2006).

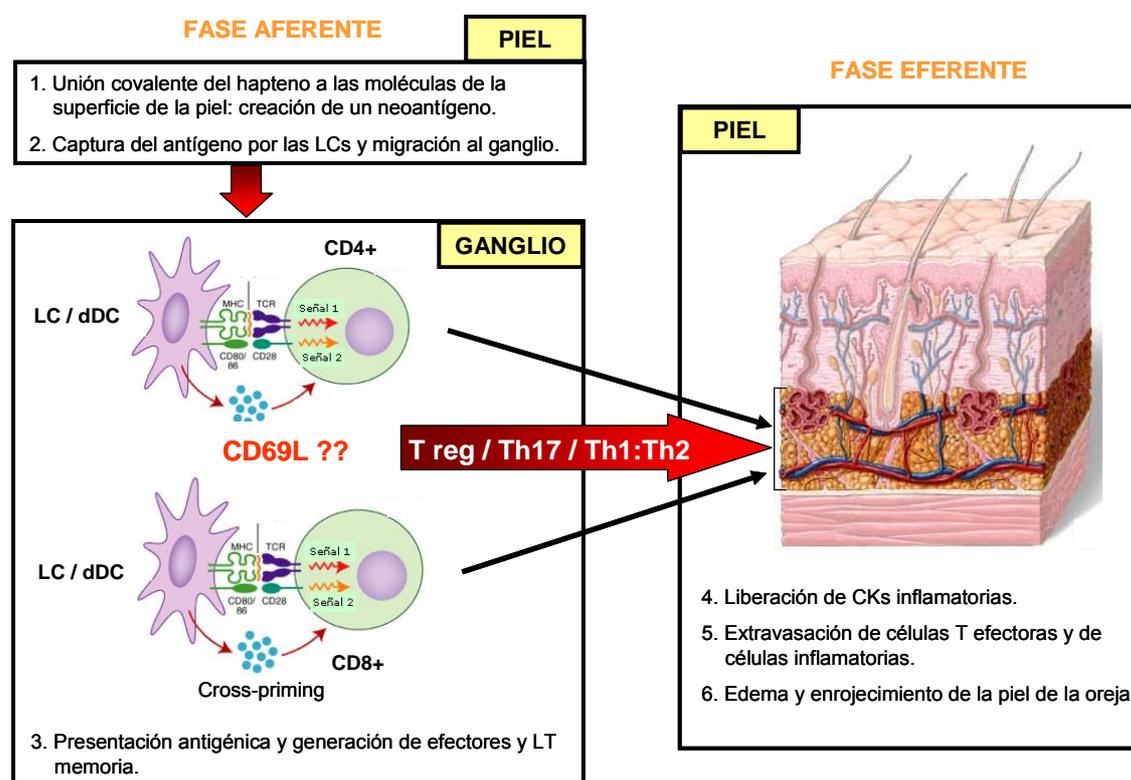


Fig. 40. Esquema de la respuesta inmune a Ox en el modelo de HSC. La fase de sensibilización o aferente comienza con la aplicación de Ox en la piel del abdomen de los ratones. Este proceso conlleva la captura del antígeno por las células presentadoras de antígeno de la piel y su migración al ganglio linfático drenante. Posteriormente se produce la respuesta inmune específica contra el hapteno en el ganglio con la generación de linfocitos T efectoras, linfocitos T de memoria y la generación de una pequeña proporción de células T reguladoras. La fase de resolución o fase eferente comienza cuando se trata de nuevo a los ratones con Ox en la piel de la oreja, provocando la migración de los linfocitos efectoras generados en la fase anterior y la consiguiente respuesta inflamatoria.

Como hemos mostrado en los resultados, la sensibilización de los ratones CD69^{-/-} con Ox provoca una respuesta específica contra el hapteno en los linfocitos T del ganglio que drena la piel, con mayor producción de IFN- γ que en los ratones control tras estimular estas células *in vitro*. Sin embargo, al analizar la tinción intracelular de IL-17, la principal citoquina implicada en la respuesta HSC (Nakae et al., 2002) en las

subpoblaciones de linfocitos generadas en el ganglio, se observó un aumento de células T CD8⁺ IL-17⁺ y CD4⁺ IL-17⁺, siendo el fenotipo proinflamatorio más pronunciado en la población CD4⁺. Estos datos parecen apuntar a que la ausencia de CD69 provoca que las células CD4⁺ que diferencian normalmente a un fenotipo polarizado hacia Th2 en este modelo, se diferencien preferentemente a un fenotipo proinflamatorio Th17, lo que explicaría el aumento de inflamación observado.

Por otro lado, la respuesta HSC depende del balance entre células T efectoras específicas, que provocan una respuesta inflamatoria tras la estimulación secundaria con el hapteno y las células reguladoras, que controlan la extensión de esta respuesta. Además de las células específicas de hapteno Th2, que muestran esta función reguladora negativa, las células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) desarrolladas en los ganglios linfáticos (Kish et al., 2007) tienen la capacidad de regular la respuesta HSC (Dubois et al., 2003; Ring et al., 2006). Sin embargo, los datos obtenidos sugieren que CD69 no parece tener un papel en la generación de esta subpoblación Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), aunque para confirmar esta hipótesis sería necesario utilizar modelos experimentales adicionales, en los cuales estas células tuvieran un papel importante en tolerancia y regulación de la respuesta inflamatoria.

Por otra parte, como ya se ha comentado previamente, está descrito que CD69 y S1P₁ se excluyen mutuamente de la membrana en linfocitos (Shiow et al., 2006). Por otro lado, también ha sido recientemente descrito que ratones transgénicos que sobreexpresan S1P₁ en linfocitos T CD4⁺, la diferenciación de células efectoras específicas de antígeno está más polarizada hacia Th17 cuando son tratadas con S1P (Liao et al., 2007). Este hecho, junto con la anterior observación de que los ratones tratados con Ox muestran un aumento de células T IL17⁺, parece indicar un posible mecanismo por el cual CD69 podría estar controlando la diferenciación hacia Th17 de los linfocitos en ganglio, a través de un proceso regulado por S1P₁.

4.2. Efecto de la modulación de la expresión de S1P₁ por CD69 en linfocitos.

El estudio de la contribución de CD69 a través de S1P₁ a la diferenciación Th17 es difícil de dilucidar, ya que la regulación de la expresión en membrana de S1P₁ también afecta al mecanismo de salida de los linfocitos del ganglio linfático (Schwab y Cyster, 2007; Shiow et al., 2006). Además el efecto de la manipulación de S1P₁ en la respuesta inmune puede alterar la activación de los linfocitos T, la migración o ambos procesos.

Está claro que los linfocitos activados que están expresando CD69 se diferencian a células efectoras en los ganglios linfáticos, donde se encuentran retenidos por su expresión de CCR7 y posteriormente salen del ganglio por un mecanismo dependiente de S1P₁ (Schwab y Cyster, 2007). La ausencia de CD69 promueve un aumento en la expresión en membrana de S1P₁ y esto puede trasladarse a un aumento en la migración a la linfa o a los tejidos inflamados, donde los niveles de S1P se sabe que son elevados (Schwab y Cyster, 2007). Todos estos datos sugieren que CD69 debe regular la respuesta inmune no sólo limitando la diferenciación hacia Th17, sino controlando su tasa de migración a los tejidos inflamados. Esta hipótesis está apoyada por los datos que demuestran que la expresión de CD69 es muy elevada en los linfocitos infiltrantes de enfermedades inflamatorias crónicas y también en linfocitos y en ganglios linfáticos que drenan tejidos inflamados (García-Monzón et al., 1990; Laffón et al., 1991; Hartnell et al., 1993; Mampaso et al., 1993; Coventry et al., 1996; Zajac et al., 1998).

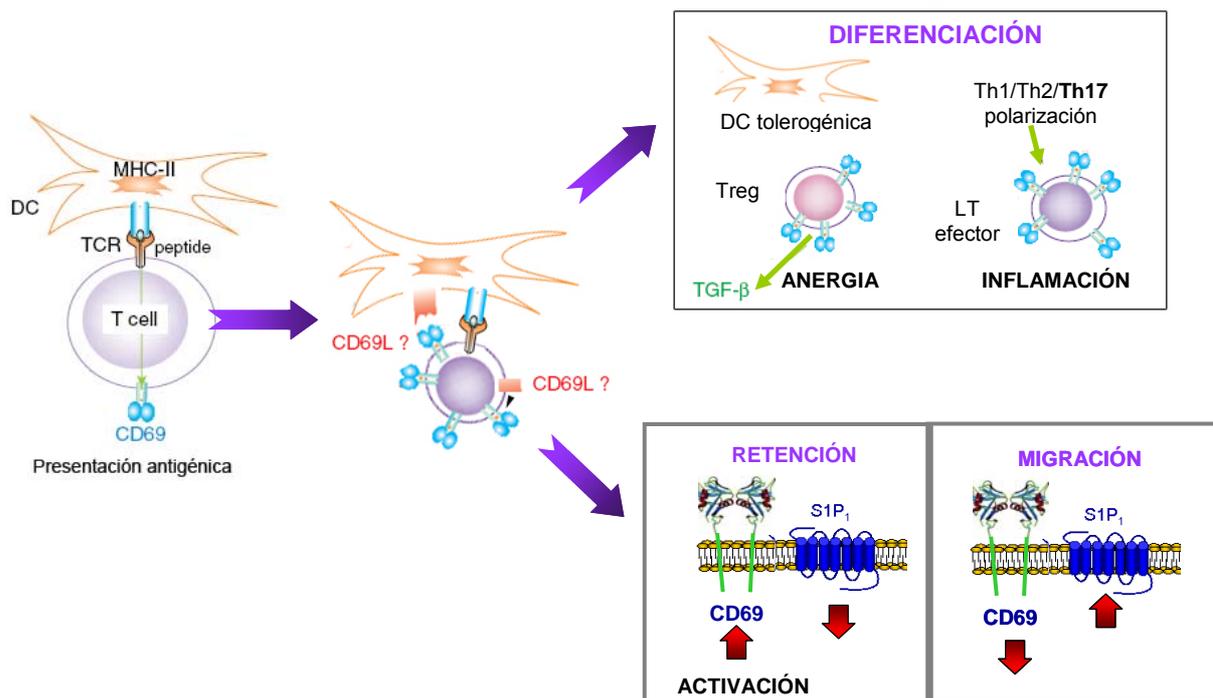


Fig. 41. Esquema que representa los procesos de la respuesta inmune donde CD69 puede estar ejerciendo su papel funcional. En esta ilustración se hace referencia al papel dual de CD69 descrito en la bibliografía y observado en nuestros resultados experimentales. Por un lado en la diferenciación de linfocitos T efectoras en el ganglio linfático, donde podría estar regulando la generación de linfocitos efectoras Th17, y por otro, en la migración de estos linfocitos, donde regula la salida del timo y de los órganos linfoides secundarios.

4.3. Efecto de la modulación de la expresión de S1P₁ por CD69 en células dendríticas.

Hemos discutido el efecto que puede tener la regulación en membrana de S1P₁ mediada por CD69 en la polarización de la diferenciación de las células T hacia Th17. Por otro lado, el efecto de CD69 en los procesos de migración de los linfocitos del timo y de los órganos linfoides secundarios está bastante bien establecido (Schwab y Cyster, 2007). Para estudiar si este efecto de CD69 en migración celular podría ocurrir en un contexto distinto de la salida de linfocitos de ganglio, decidimos estudiar si la fase de sensibilización de la HSC estaba afectada, ya que un aumento en la llegada de células presentadoras de antígeno desde la piel al ganglio podría explicar, al menos parcialmente, el incremento en la respuesta inmune a Ox observada en los ratones CD69^{-/-}. Utilizando un modelo que permite la migración de dDCs y LCs de la piel al ganglio mediante la administración de un irritante y FITC en la epidermis, observamos un aumento en el número de células migradas FITC⁺CD11c⁺ en los ratones CD69^{-/-} en comparación con los ratones control. El análisis fenotípico de estas células mostró que los principales marcadores de activación están regulados positivamente en la membrana tanto en ratones CD69^{-/-} como en los ratones control.

Con el fin de poder analizar el efecto de CD69 en los procesos de migración de DCs, decidimos en primer lugar, analizar su expresión en la membrana de estas células, ya que, aunque está ampliamente descrito que CD69 se expresa tras activación en todas las células derivadas de la médula ósea, excepto en eritrocitos (Testi et al., 1994), nunca se había analizado la expresión de CD69 en DCs de ratón después de someterlas a estímulos de maduración. En este sentido, se observó que tanto las DCs diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L, como las principales subpoblaciones presentes en los órganos linfoides secundarios, expresan CD69 en respuesta a maduración inducida a través de TLRs. Este incremento en la expresión de CD69 correlacionaba con la regulación positiva de otras moléculas coestimuladoras inducidas durante la maduración.

Otro aspecto importante en el estudio del efecto de CD69 en los procesos de migración de DCs fue el análisis de la generación y distribución de las distintas subpoblaciones de DCs en los ratones CD69^{-/-}, ya que un desequilibrio en los procesos de migración podría mediar un defecto en la generación de las distintas subpoblaciones de DCs residentes en los tejidos a partir de precursores de la médula ósea, que pueden

migrar a través de la sangre o la linfa (Ardavin, 2003). En este sentido observamos que: (1) la diferenciación de DCs a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L era equivalente en ratones CD69^{-/-} y en ratones control, con una proporción semejante de pDCs y cDCs en ambos tipos de ratones y sin diferencias significativas en cuanto a la expresión de MHC II y de moléculas coestimuladoras tras la maduración vía TLR; (2) tampoco había diferencias en la proporción y porcentaje relativo de las subpoblaciones de pDCs y cDCs de los distintos órganos linfoides entre los ratones CD69^{-/-} y los ratones control, ni en la expresión de MHC II y de moléculas coestimuladoras tras la maduración vía TLR *in vivo*; por último, (3) la ausencia de CD69 tampoco parece tener un efecto en la distribución y densidad de las dDCs y LCs de la piel.

El aumento de migración de las DCs de los ratones CD69^{-/-} en el modelo de migración *in vivo* con FITC podría explicarse por una modulación diferente en la expresión de CCR7 en las DCs que migran desde la piel, ya que está demostrado que CCR7 es crucial para la migración de DCs de los tejidos periféricos a los ganglios linfáticos drenantes en todas las superficies expuestas medio externo, incluyendo los pulmones, la mucosa intestinal y la piel (Jakubzick et al., 2006; Jang et al., 2006; Ohl et al., 2004). De hecho, ratones deficientes en CCR7 o mutantes que no expresan los ligandos de CCR7 (CCL19 y CCL21) tienen serios defectos en la migración de LCs y dDCs a los ganglios que drenan la piel (Forster et al., 1999; Gunn et al., 1999; Martín-Fontecha et al., 2003; Ohl et al., 2004). No obstante, también se ha implicado a otras moléculas en estos procesos. Está descrito que el bloqueo de CXCR4 con un antagonista farmacológico selectivo provoca el bloqueo de la migración de DCs en el modelo basado en la aplicación de un irritante y FITC (Kabashima et al., 2007), demostrando que este receptor también puede estar implicado en la respuesta inmune cutánea. Sin embargo, al analizar la expresión de CCR7 y de CXCR4 en las células FITC⁺CD11c⁺ de ganglio a las 24 h de la sensibilización de la piel, observamos la regulación positiva en la membrana de ambos receptores, lo que correlaciona con el fenotipo maduro observado para estas células, siendo los niveles de expresión en membrana de estos receptores semejantes entre los ratones CD69^{-/-} y los ratones control.

El hecho de que los ratones CCR7^{-/-} o los mutantes que carecen de CCL19 y CCL21 tengan defectos en la migración DCs a los ganglios que drenan la piel, siendo este defecto parcial, con una pequeña tasa de migración residual de las DCs (Forster et al.,

1999; Gunn et al., 1999; Martín-Fontecha et al., 2003; Ohl et al., 2004), sugiere la existencia de otros mecanismos independiente a CCR7 para la migración de DCs al ganglio. En este sentido se ha descrito que S1P está implicado en el proceso de migración de DCs de la piel al ganglio en ratón (Czeloth et al., 2005), ya que en un modelo de migración tratando la piel con irritantes y FITC idéntico al utilizado en nuestros experimentos, Czeloth y col. han observado que la administración del análogo de S1P FTY720 bloquea la migración de las LCs y dDCs al ganglio en más de un 50% a las 48 h del tratamiento.

Por este motivo, decidimos estudiar en profundidad la capacidad migratoria de las DCs diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea en presencia de Flt3-L en ensayos de trans migración *in vitro* en respuesta a S1P. En este sentido, se observó un claro incremento en el porcentaje de las células migradas en las DCs maduras con LPS de ratones CD69^{-/-} con respecto a los ratones control en un amplio rango de concentraciones de S1P. Estos datos sugieren que CD69 podría estar regulando la expresión de S1P₁ no sólo en linfocitos, sino también en DCs, lo que explicaría el aumento de migración en respuesta a S1P observado. Para confirmar esta hipótesis se analizó la expresión de S1P₁ por WB en estas DCs maduras con LPS y se observó un incremento de casi dos veces en las DCs CD69^{-/-} con respecto a las DCs control.

Otro proceso muy controlado por factores quimioatrayentes y la modulación de la expresión de sus receptores, es la distribución de las DCs en compartimentos especializados de los tejidos linfoides. En este sentido, está documentado que las dDCs y las LCs que provienen de la piel, entran en los ganglios por los vasos linfáticos aferentes y ocupan el exterior del córtex, cerca de los conductos que rodean a las vénulas de endotelio alto y en las proximidades de los folículos de células B (Itano y Jenkins, 2003). El proceso que sigue a la administración epicutánea de un alérgeno en la piel consiste en la producción local de citoquinas proinflamatorias (principalmente IL-1 β y TNF- α) con la consiguiente movilización de LCs y dDCs que atraviesan la matriz extracelular y aumentan la expresión de CCR7 mientras maduran (Jakob et al., 2001). Estas DCs alcanzan los ganglios linfáticos, cuyas células endoteliales expresan los ligandos de CCR7 (CCL21 y CCL19) y llegan al ganglio (Forster et al., 1999), donde se sitúan en las zonas ricas en linfocitos T o áreas paracorticales. Las células estromales de esas zonas T expresan constitutivamente CCL21 y CCL19 (Forster et al., 1999).

Para evaluar si la distribución de las DCs CD69^{-/-} en el ganglio estaba alterada, se utilizó otro modelo de migración *in vivo* que consiste en la inyección s.c. de DCs diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea marcadas con sondas fluorescentes en ratones control. Mediante la transferencia adoptiva de las DCs del ratón CD69^{-/-} a ratones de fenotipo salvaje, se excluyen los posibles efectos secundarios debidos a la utilización de un ratón modificado genéticamente y se determina que el efecto observado en migración es intrínseco de las DCs. En este sistema pudimos comprobar que el aumento de respuesta quimiotáctica a S1P observado en los ensayos de transmigración *in vitro* en las DCs CD69^{-/-}, correlacionaba con un incremento significativo de migración *in vivo* de las DCs CD69^{-/-} con respecto a las DCs control al ganglio linfático drenante. Además este sistema permitió analizar la distribución de las DCs en el ganglio por microscopía multifotónica, observándose que la distribución de las DCs CD69^{-/-} no estaba alterada.

Todas estas observaciones corroboran el papel de CD69 como modulador negativo de la respuesta inmune asociada a enfermedades inflamatorias y focalizan su función en los procesos de generación de la respuesta inmune adaptativa. El mecanismo de regulación de la respuesta inmune mediado por CD69 parece implicar a la migración de las DCs de los tejidos periféricos al ganglio linfático y a la polarización de la respuesta T efectora hacia un fenotipo Th17.

CONCLUSIONES

1. CD69 tiene un papel importante como molécula reguladora negativa de la respuesta inmune inflamatoria en la artritis inducida por colágeno (AIC). Esta respuesta puede modularse mediante la administración *in vivo* de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD69. El mAb anti-CD69 2.2 induce la regulación negativa de CD69 en la membrana, aumentando la severidad clínica de la enfermedad, mientras que el tratamiento con el mAb anti-CD69 2.3 inhibe el desarrollo de la AIC mediante la depleción parcial de las células CD69⁺, reduciendo la respuesta efectora contra el colágeno II (CII).
2. No se ha demostrado que CD69 ejerza un papel significativo en la fase aguda de la respuesta inflamatoria de la artritis. En el modelo de artritis inducida por anticuerpos anti-CII los ratones CD69^{-/-} desarrollan una respuesta inflamatoria aguda semejante a la observada en los ratones control. Además, CD69 tampoco está implicado en el reclutamiento de neutrófilos, como se ha observado en dos modelos de inflamación aguda diferentes.
3. El mecanismo por el cual CD69 modula negativamente la respuesta inmune inflamatoria implica a los mecanismos de diferenciación de los linfocitos T efectores, ya que los ratones CD69^{-/-} desarrollan una respuesta exacerbada en el modelo de hipersensibilidad por contacto (HSC), con un aumento en la proporción de células IL-17⁺ generadas en el ganglio en respuesta a oxazolona.
4. El estudio de la fase de sensibilización del modelo de HSC ha permitido observar que CD69 tiene un papel en el proceso de migración de las células dendríticas (DCs) al ganglio linfático mediante un mecanismo que al menos implica la modulación de la expresión en membrana del receptor de esfingosina 1 fosfato 1 (S1P₁).
5. Tanto las DCs diferenciadas a partir de precursores de la médula ósea, como las principales subpoblaciones de DCs presentes en los órganos linfoides de ratón, aumentan la expresión en membrana de CD69 tras maduración, como ocurre en otros tipos de leucocitos.
6. La migración de precursores de DCs a los tejidos no parece estar afectada por la ausencia de CD69, ya que los ratones CD69^{-/-} no muestran diferencias significativas con respecto a los ratones control en la distribución y proporción de las principales subpoblaciones de DCs.

BIBLIOGRAFÍA

- Afeltra, A., M. Galeazzi, G.M. Ferri, A. Amoroso, O. De Pita, F. Porzio, and L. Bonomo. 1993. Expression of CD69 antigen on synovial fluid T cells in patients with rheumatoid arthritis and other chronic synovitis. *Ann Rheum Dis.* 52:457-60.
- Ajuebor, M.N., A.M. Das, L. Virag, R.J. Flower, C. Szabo, and M. Perretti. 1999. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J Immunol.* 162:1685-91.
- Akiba, H., J. Kehren, M.T. Ducluzeau, M. Krasteva, F. Horand, D. Kaiserlian, F. Kaneko, and J.F. Nicolas. 2002. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8⁺ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol.* 168:3079-87.
- Alfonso, C., M.G. McHeyzer-Williams, and H. Rosen. 2006. CD69 down-modulation and inhibition of thymic egress by short- and long-term selective chemical agonism of sphingosine 1-phosphate receptors. *Eur J Immunol.* 36:149-59.
- Ardavin, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 3:582-90.
- Awasthi, A and Kuchroo VK. 2009. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *International Immunology.* In press.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18:767-811.
- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245-52.
- Barthlott, T., H. Kohler, H. Pircher, and K. Eichmann. 1997. Differentiation of CD4(high)CD8(low) coreceptor-skewed thymocytes into mature CD8 single-positive cells independent of MHC class I recognition. *Eur J Immunol.* 27:2024-32.
- Bieber, T., A. Rieger, G. Stingl, E. Sander, P. Wanek, and I. Strobel. 1992. CD69, an early activation antigen on lymphocytes, is constitutively expressed by human epidermal Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 98:771-6.

- Bouloc, A., A. Cavani, and S.I. Katz. 1998. Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells. *J Invest Dermatol.* 111:44-9.
- Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J.L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J.P. Revillard, and J.F. Nicolas. 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol.* 25:3006-10.
- Bousso, P. 2008. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat Rev Immunol.* 8:675-84.
- Brandes, M.E., J.B. Allen, Y. Ogawa, and S.M. Wahl. 1991. Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest.* 87:1108-13.
- Brasel, K., T. De Smedt, J.L. Smith, and C.R. Maliszewski. 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood.* 96:3029-39.
- Brawand, P., D.R. Fitzpatrick, B.W. Greenfield, K. Brasel, C.R. Maliszewski, and T. De Smedt. 2002. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol.* 169:6711-9.
- Brezinschek, R.I., P.E. Lipsky, P. Galea, R. Vita, and N. Oppenheimer-Marks. 1995. Phenotypic characterization of CD4+ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J Immunol.* 154:3062-77.
- Campbell, I.K., J.A. Hamilton, and I.P. Wicks. 2000. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 30:1568-75.
- Campbell, I.K., K. O'Donnell, K.E. Lawlor, and I.P. Wicks. 2001. Severe inflammatory arthritis and lymphadenopathy in the absence of TNF. *J. Clin. Invest.* 107:1519-27.
- Caspar-Bauguil, S., M. Saadawi, A. Negre-Salvayre, M. Thomsen, R. Salvayre, and H. Benoist. 1998. Mildly oxidized low-density lipoproteins suppress the proliferation of

activated CD4⁺ T-lymphocytes and their interleukin 2 receptor expression in vitro. *Biochem J.* 330 (Pt 2):659-66.

- Castellanos, M.C., C. Munoz, M.C. Montoya, E. Lara-Pezzi, M. López-Cabrera, and M.O. de Landazuri. 1997. Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. *J Immunol.* 159:5463-73.
- Castellanos Mdel, C., S. López-Giral, M. López-Cabrera, and M.O. de Landazuri. 2002. Multiple cis-acting elements regulate the expression of the early T cell activation antigen CD69. *Eur J Immunol.* 32:3108-17.
- Cavanagh, L.L., and U.H. Von Andrian. 2002. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol Cell Biol.* 80:448-62.
- Cebrián, M., J. Miguel Redondo, A. López-Rivas, G. Rodriguez-Tarduchy, M.O. De Landazuri, and F. Sánchez-Madrid. 1989. Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur J Immunol.* 19:809-15.
- Cebrián, M., E. Yagüe, M. Rincón, M. López-Botet, M.O. de Landázuri, and F. Sánchez-Madrid. 1988. Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *J Exp Med.* 168:1621-37.
- Cook, A.D., E.L. Braine, I.K. Campbell, M.J. Rich, and J.A. Hamilton. 2001. Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res.* 3:293-8.
- Corte, G., L. Moretta, G. Damiani, M.C. Mingari, and A. Bargellesi. 1981. Surface antigens specifically expressed by activated T cells in humans. *Eur J Immunol.* 11:162-4.
- Cosulich, M.E., A. Rubartelli, A. Risso, F. Cozzolino, and A. Bargellesi. 1987. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:4205-9.
- Coventry, B.J., S.C. Weeks, S.E. Heckford, P.J. Sykes, J. Bradley, and J.M. Skinner. 1996. Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in

- tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma: selective expression of early activation markers. *J. Immunol.* 156:3486-3492.
- Cush, J.J., and P.E. Lipsky. 1988. Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:1230-8.
 - Czeloth, N., G. Bernhardt, F. Hofmann, H. Genth, and R. Forster. 2005. Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J Immunol.* 175:2960-7.
 - D'Ambrosio, D., D.A. Cantrell, L. Frati, A. Santoni, and R. Testi. 1994. Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. *Eur J Immunol.* 24:616-20.
 - De Maria, R., M.G. Cifone, R. Trotta, M.R. Rippo, C. Festuccia, A. Santoni, and R. Testi. 1994. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med.* 180:1999-2004.
 - del Pozo, M., P. Sánchez-Mateos, M. Nieto, and F. Sánchez-Madrid. 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell Biol.* 131:495-508.
 - Diamond, B., and M.D. Scharff. 1980. IgG1 and IgG2b share the Fc receptor on mouse macrophages. *J Immunol.* 125:631-3.
 - Dong, C. 2006. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol.* 6:329-33.
 - Drickamer, K., and M.E. Taylor. 1993. Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol.* 9:237-64.
 - Dubois, B., L. Chapat, A. Goubier, M. Papiernik, J.F. Nicolas, and D. Kaiserlian. 2003. Innate CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are required for oral tolerance and inhibition of CD8⁺ T cells mediating skin inflammation. *Blood.* 102:3295-301.
 - Edwards, J.C., A.D. Sedgwick, and D.A. Willoughby. 1981. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol.* 134:147-56.

- Escribano, L., A. Orfao, J. Villarrubia, F. Martín, J.I. Madruga, M. Cuevas, J.L. Velasco, A. Rios, and J.F. San Miguel. 1997. Sequential immunophenotypic analysis of mast cells in a case of systemic mast cell disease evolving to a mast cell leukemia. *Cytometry*. 30:98-102.
- Esplugues, E., D. Sancho, J. Vega-Ramos, C. Martínez, U. Syrbe, A. Hamann, P. Engel, F. Sánchez-Madrid, and P. Lauzurica. 2003. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J Exp Med*. 197:1093-106.
- Esplugues, E., J. Vega-Ramos, D. Cartoixa, B.N. Vazquez, I. Salaet, P. Engel, and P. Lauzurica. 2005. Induction of tumor NK-cell immunity by anti-CD69 antibody therapy. *Blood*. 105:4399-406.
- Feng, C., K.J. Woodside, B.A. Vance, D. El-Khoury, M. Canelles, J. Lee, R. Gress, B.J. Fowlkes, E.W. Shores, and P.E. Love. 2002. A potential role for CD69 in thymocyte emigration. *Int Immunol*. 14:535-44.
- Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 99:23-33.
- Galea, P., R. Brezinschek, P.E. Lipsky, and N. Oppenheimer-Marks. 1994. Phenotypic characterization of CD4⁻/alpha beta TCR⁺ and gamma delta TCR⁺ T cells with a transendothelial migratory capacity. *J Immunol*. 153:529-42.
- García-Monzón, C., R. Moreno-Otero, J.M. Pajares, A. García-Sánchez, M. López-Botet, M.O. de Landazuri, and F. Sánchez-Madrid. 1990. Expression of a novel activation antigen on intrahepatic CD8⁺ T lymphocytes in viral chronic active hepatitis. *Gastroenterology*. 98:1029-1035.
- Gavioli, R., A. Risso, D. Smilovich, I. Baldissarro, M.C. Capra, A. Bargellesi, and M.E. Cosulich. 1992. CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms. *Cell Immunol*. 142:186-96.
- Gilliet, M., A. Boonstra, C. Paturel, S. Antonenko, X.L. Xu, G. Trinchieri, A. O'Garra, and Y.J. Liu. 2002. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 195:953-8.

- Gocinski, B.L., and R.E. Tigelaar. 1990. Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol.* 144:4121-8.
- Gollmann, G., H. Neuwirt, C.H. Tripp, H. Mueller, G. Konwalinka, C. Heufler, N. Romani, and M. Tiefenthaler. 2008. Sphingosine-1-phosphate receptor type-1 agonism impairs blood dendritic cell chemotaxis and skin dendritic cell migration to lymph nodes under inflammatory conditions. *Int Immunol.* 20:911-23.
- Gómez, M., S.M. Sanz-González, Y.N. Abu Nabah, A. Lamana, F. Sánchez-Madrid, and V. Andres. 2009. Atherosclerosis development in apolipoprotein E-null mice deficient for CD69. *Cardiovasc Res.* 81:197-205.
- Gorbachev, A.V., and R.L. Fairchild. 2004. CD4⁺ T cells regulate CD8⁺ T cell-mediated cutaneous immune responses by restricting effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol.* 172:2286-95.
- Gorelik, L., S. Constant, and R.A. Flavell. 2002. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med.* 195:1499-505.
- Gorelik, L., and R.A. Flavell. 2001. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med.* 7:1118-22.
- Gunn, M.D., S. Kyuwa, C. Tam, T. Kakiuchi, A. Matsuzawa, L.T. Williams, and H. Nakano. 1999. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med.* 189:451-60.
- Han, Y., Q. Guo, M. Zhang, Z. Chen, and X. Cao. 2009. CD69⁺ CD4⁺ CD25⁻ T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta1. *J Immunol.* 182:111-20.
- Hara, T., L.K. Jung, J.M. Bjorndahl, and S.M. Fu. 1986. Human T cell activation. III. Rapid induction of a phosphorylated 28 kD/32 kD disulfide-linked early activation antigen (EA 1) by 12-o-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, mitogens, and antigens. *J Exp Med.* 164:1988-2005.

- Hartnell, A., D.S. Robinson, A.B. Kay, and A.J. Wardlaw. 1993. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology*. 80:281-6.
- He, D., L. Wu, H.K. Kim, H. Li, C.A. Elmetts, and H. Xu. 2006. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol*. 177:6852-8.
- Hernández-García, C., B. Fernández-Gutiérrez, I.C. Morado, A.A. Bañares, and J.A. Jover. 1996. The CD69 activation pathway in rheumatoid arthritis synovial fluid T cells. *Arthritis Rheum*. 39:1277-1286.
- Iannone, F., V.M. Corrigall, G.H. Kingsley, and G.S. Panayi. 1994. Evidence for the continuous recruitment and activation of T cells into the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 24:2706-13.
- Infante-Duarte, C., H.F. Horton, M.C. Byrne, and T. Kamradt. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*. 165:6107-15.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J*. 11:3887-95.
- Ishikawa, S., S. Akakura, M. Abe, K. Terashima, K. Chijiwa, H. Nishimura, S. Hirose, and T. Shirai. 1998. A subset of CD4+ T cells expressing early activation antigen CD69 in murine lupus: possible abnormal regulatory role for cytokine imbalance. *J Immunol*. 161:1267-73.
- Itano, A.A., and M.K. Jenkins. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol*. 4:733-9.
- Ivanov, II, B.S. McKenzie, L. Zhou, C.E. Tadokoro, A. Lepelley, J.J. Lafaille, D.J. Cua, and D.R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 126:1121-33.
- Jakob, T., J. Ring, and M.C. Udey. 2001. Multistep navigation of Langerhans/dendritic cells in and out of the skin. *J Allergy Clin Immunol*. 108:688-96.

- Jakubzick, C., F. Tacke, J. Llodra, N. van Rooijen, and G.J. Randolph. 2006. Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol.* 176:3578-84.
- Jang, M.H., N. Sougawa, T. Tanaka, T. Hirata, T. Hiroi, K. Tohya, Z. Guo, E. Umemoto, Y. Ebisuno, B.G. Yang, J.Y. Seoh, M. Lipp, H. Kiyono, and M. Miyasaka. 2006. CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol.* 176:803-10.
- Jones, S.A. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 175: 3463–3468.
- Kabashima, K., N. Shiraishi, K. Sugita, T. Mori, A. Onoue, M. Kobayashi, J. Sakabe, R. Yoshiki, H. Tamamura, N. Fujii, K. Inaba, and Y. Tokura. 2007. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *Am J Pathol.* 171:1249-57.
- Kagari, T., H. Doi, and T. Shimoizato. 2002. The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J Immunol.* 169:1459-66.
- Kanegane, H., and G. Tosato. 1996. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood.* 88:230-5.
- Kehren, J., C. Desvignes, M. Krasteva, M.T. Ducluzeau, O. Assossou, F. Horand, M. Hahne, D. Kagi, D. Kaiserlian, and J.F. Nicolas. 1999. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med.* 189:779-86.
- Khallou-Laschet, J., G. Caligiuri, E. Groyer, E. Tupin, A.T. Gaston, B. Poirier, M. Kronenberg, J.L. Cohen, D. Klatzmann, S.V. Kaveri, and A. Nicoletti. 2006. The proatherogenic role of T cells requires cell division and is dependent on the stage of the disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:353-8.
- Kish, D.D., A.V. Gorbachev, and R.L. Fairchild. 2005. CD8+ T cells produce IL-2, which is required for CD(4+)CD25+ T cell regulation of effector CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J Leukoc Biol.* 78:725-35.

- Kish, D.D., A.V. Gorbachev, and R.L. Fairchild. 2007. Regulatory function of CD4⁺CD25⁺ T cells from Class II MHC-deficient mice in contact hypersensitivity responses. *J Leukoc Biol.* 82:85-92.
- Kissenpfennig, A., and B. Malissen. 2006. Langerhans cells--revisiting the paradigm using genetically engineered mice. *Trends Immunol.* 27:132-9.
- Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 177:566-73.
- Konno, S., and S. Tsurufuji. 1983. Induction of zymosan-air-pouch inflammation in rats and its characterization with reference to the effects of anticomplementary and anti-inflammatory agents. *Br J Pharmacol.* 80:269-77.
- Kripke, M.L., C.G. Munn, A. Jeevan, J.M. Tang, and C. Bucana. 1990. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol.* 145:2833-8.
- Kuruvilla, A.P., R. Shah, G.M. Hochwald, H.D. Liggitt, M.A. Palladino, and G.J. Thorbecke. 1991. Protective effect of transforming growth factor b1 on experimental autoimmune disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2918-2921.
- Laffón, A., R. García-Vicuna, A. Humbria, A.A. Postigo, A.L. Corbi, M.O. de Landazuri, and F. Sánchez-Madrid. 1991. Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 88:546-52.
- Lamana, A., D. Sancho, A. Cruz-Adalia, G.M. Del Hoyo, A.M. Herrera, M. Feria, F. Diaz-González, M. Gómez, and F. Sánchez-Madrid. 2006. The role of CD69 in acute neutrophil-mediated inflammation. *Eur J Immunol.* 36:2632-8.
- Lanier, L.L., D.W. Buck, L. Rhodes, E. Ding, E. Evans, C. Barney, and J.H. Phillips. 1988b. Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu-23 antigen. *J. Exp. Med.* 167:1572-1585.

- Lauzurica, P., D. Sancho, M. Torres, B. Albella, M. Marazuela, T. Merino, J.A. Bueren, A.C. Martínez, and F. Sánchez-Madrid. 2000. Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice. *Blood*. 95:2312-20.
- Leon, B., M. López-Bravo, and C. Ardavin. 2005. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol*. 17:313-8.
- Leu, R.W., C.J. Robinson, J.A. Wiggins, B.J. Shannon, J.A. Rummage, and M.J. Horn. 1988. Photometric assays for FcRI-dependent binding, phagocytosis, and antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by monomeric IgG gamma 2a in murine peritoneal macrophages. *J Immunol Methods*. 113:269-78.
- Liao, J.J., M.C. Huang, and E.J. Goetzl. 2007. Cutting edge: Alternative signaling of Th17 cell development by sphingosine 1-phosphate. *J Immunol*. 178:5425-8.
- Llera, A.S., F. Viedma, F. Sánchez-Madrid, and J. Tormo. 2001. Crystal structure of the C-type lectin-like domain from the human hematopoietic cell receptor CD69. *J Biol Chem*. 276:7312-9. Epub 2000 Oct 17.
- López-Cabrera, M., E. Munoz, M.V. Blazquez, M.A. Ursa, A.G. Santis, and F. Sánchez-Madrid. 1995. Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements. *J Biol Chem*. 270:21545-51.
- López-Cabrera, M., A.G. Santis, E. Fernandez-Ruiz, R. Blacher, F. Esch, P. Sánchez-Mateos, and F. Sánchez-Madrid. 1993. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med*. 178:537-47.
- Macatonia, S.E., S.C. Knight, A.J. Edwards, S. Griffiths, and P. Fryer. 1987. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med*. 166:1654-67.
- MacDonald, T.T. 1998. T cell immunity to oral allergens. *Curr Opin Immunol*. 10:620-7.

- Mampaso, F., F. Sánchez-Madrid, R. Marcen, A. Molina, J. Pascual, T. Bricio, A. Martín, and V. Alvarez. 1993. Expression of adhesion molecules in allograft renal dysfunction. A distinct diagnostic pattern in rejection and cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation*. 56:687-91.
- Mandala, S., R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G.J. Shei, D. Card, C. Keohane, M. Rosenbach, J. Hale, C.L. Lynch, K. Rupprecht, W. Parsons, and H. Rosen. 2002. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science*. 296:346-9.
- Manoury-Schwartz, B., G. Chiocchia, N. Bessis, O. Abehsira-Amar, F. Batteux, S. Muller, S. Huang, M.C. Boissier, and C. Fournier. 1997. High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J Immunol*. 158:5501-6.
- Martín, S., M.B. Lappin, J. Kohler, V. Delattre, C. Leicht, T. Preckel, J.C. Simon, and H.U. Weltzien. 2000. Peptide immunization indicates that CD8+ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 115:260-6.
- Martín-Fontecha, A., S. Sebastiani, U.E. Hopken, M. Ugucioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med*. 198:615-21.
- Matloubian, M., C.G. Lo, G. Cinamon, M.J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M.L. Allende, R.L. Proia, and J.G. Cyster. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 427:355-60.
- McInnes, I.B., B.P. Leung, R.D. Sturrock, M. Field, and F.Y. Liew. 1997. Interleukin-15 mediates T cell-dependent regulation of tumor necrosis factor-alpha production in rheumatoid arthritis. *Nat Med*. 3:189-95.
- Montoya, M.C., D. Sancho, G. Bonello, Y. Collette, C. Langlet, H.T. He, P. Aparicio, A. Alcover, D. Olive, and F. Sánchez-Madrid. 2002. Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol*. 3:159-68.

- Moretta, A., A. Poggi, D. Pende, G. Tripodi, A.M. Orengo, N. Pella, R. Augugliaro, C. Bottino, E. Ciccone, and L. Moretta. 1991. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med.* 174:1393-8.
- Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 7:145-73.
- Murata, K., M. Inami, A. Hasegawa, S. Kubo, M. Kimura, M. Yamashita, H. Hosokawa, T. Nagao, K. Suzuki, K. Hashimoto, H. Shinkai, H. Koseki, M. Taniguchi, S.F. Ziegler, and T. Nakayama. 2003. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *Int Immunol.* 15:987-92.
- Murphy, K.M., and S.L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.* 2:933-44.
- Myers, L.K., H. Miyahara, K. Terato, J.M. Seyer, J.M. Stuart, and A.H. Kang. 1995. Collagen-induced arthritis in B10.RIII mice (H-2r): identification of an arthritogenic T-cell determinant. *Immunology.* 84:509-13.
- Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano, and Y. Iwakura. 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity.* 17:375-87.
- Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo, and Y. Iwakura. 2003. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol.* 171:6173-7.
- Nakamura, S., S.S.J. Sung, J.M. Bjorndahl, and S.M. Fu. 1989. Human T cell activation. IV. T cell activation and proliferation via the early activation antigen EA 1. *J. Exp. Med.* 169:677-689.
- Nakano, H., M. Yanagita, and M.D. Gunn. 2001. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 194:1171-8.

- Nakayama, T., D.J. Kasprovicz, M. Yamashita, L.A. Schubert, G. Gillard, M. Kimura, A. Didierlaurent, H. Koseki, and S.F. Ziegler. 2002. The generation of mature, single-positive thymocytes in vivo is dysregulated by CD69 blockade or overexpression. *J Immunol.* 168:87-94.
- Nishikawa, K., T. Morii, H. Ako, K. Hamada, S. Saito, and N. Narita. 1992. In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J Allergy Clin Immunol.* 90:169-74.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning, and R. Forster. 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* 21:279-88.
- Panayi, G., J. Lanchbury, and G. Kingsley. 1992. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 35:729-35.
- Pérez, V.L., L. Van Parijs, A. Biuckians, X.X. Zheng, T.B. Strom, and A.K. Abbas. 1997. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity.* 6:411-7.
- Pietschmann, P., J.J. Cush, P.E. Lipsky, and N. Oppenheimer-Marks. 1992. Identification of subsets of human T cells capable of enhanced transendothelial migration. *J Immunol.* 149:1170-8.
- Portales-Pérez, D., R. González-Amaro, C. Abud-Mendoza, and S. Sánchez-Armáss. 1997. Abnormalities in CD69 expression, cytosolic pH and Ca²⁺ during activation of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 6:48-56.
- Rangachari, M., N. Mauermann, R.R. Marty, S. Dirnhofer, M.O. Kurrer, V. Komnenovic, J.M. Penninger, and U. Eriksson. 2006. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med.* 203:2009-19.
- Reiner, S.L. 2007. Development in motion: helper T cells at work. *Cell.* 129:33-6.

- Remmers, E.F., R.E. Longman, Y. Du, A. O'Hare, G.W. Cannon, M.M. Griffiths, and R.L. Wilder. 1996. A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats. *Nat. Genet.* 14:82-85.
- Ring, S., S.C. Schafer, K. Mahnke, H.A. Lehr, and A.H. Enk. 2006. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *Eur J Immunol.* 36:2981-92.
- Risso, A., D. Smilovich, M.C. Capra, I. Baldissarro, G. Yan, A. Bargellesi, and M.E. Cosulich. 1991. CD69 in resting and activated T lymphocytes. Its association with a GTP binding protein and biochemical requirements for its expression. *J Immunol.* 146:4105-14.
- Roncarolo, M.G., and M. Battaglia. 2007. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol.* 7:585-98.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 212:28-50.
- Rosen, H., C. Alfonso, C.D. Surh, and M.G. McHeyzer-Williams. 2003. Rapid induction of medullary thymocyte phenotypic maturation and egress inhibition by nanomolar sphingosine 1-phosphate receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10907-12.
- Saint-Mezard, P., C. Chavagnac, M. Vocanson, J. Kehren, A. Rozieres, S. Bosset, M. Ionescu, B. Dubois, D. Kaiserlian, J.F. Nicolas, and F. Berard. 2005. Deficient contact hypersensitivity reaction in CD4^{-/-} mice is because of impaired hapten-specific CD8⁺ T cell functions. *J Invest Dermatol.* 124:562-9.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 6:345-52.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155:1151-64.

- Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C.R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 28:2760-9.
- Sánchez-Mateos, P., M. Cebrián, A. Acevedo, M. López-Botet, M.O. De Landazuri, and F. Sánchez-Madrid. 1989. Expression of a gp33/27,000 MW activation inducer molecule (AIM) on human lymphoid tissues. Induction of cell proliferation on thymocytes and B lymphocytes by anti-AIM antibodies. *Immunology.* 68:72-9.
- Sánchez-Mateos, P., and F. Sánchez-Madrid. 1991. Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur J Immunol.* 21:2317-25.
- Sancho, D., M. Gómez, G. Martínez Del Hoyo, A. Lamana, E. Esplugues, P. Lauzurica, A.C. Martínez, and F. Sánchez-Madrid. 2006. CD69 targeting differentially affects the course of collagen-induced arthritis. *J Leukoc Biol.* 80:1233-41.
- Sancho, D., M. Gómez, and F. Sánchez-Madrid. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 26:136-40.
- Sancho, D., M. Gómez, F. Viedma, E. Esplugues, M. Gordón-Alonso, M. García-López, H. de la Fuente, C. Martínez-A., P. Lauzurica, and F. Sánchez-Madrid. 2003. CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor- β production in collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.* 112:872-882.
- Sancho, D., A.G. Santis, J.L. Alonso-Lebrero, F. Viedma, R. Tejedor, and F. Sánchez-Madrid. 2000. Functional analysis of ligand-binding and signal transduction domains of CD69 and CD23 C-type lectin leukocyte receptors. *J Immunol.* 165:3868-75.
- Sancho, D., M. Yanez-Mo, R. Tejedor, and F. Sánchez-Madrid. 1999. Activation of peripheral blood T cells by interaction and migration through endothelium: role of lymphocyte function antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-15. *Blood.* 93:886-96.
- Schwab, S.R., and J.G. Cyster. 2007. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol.* 8:1295-301.

- Screpanti, V., R.P. Wallin, H.G. Ljunggren, and A. Grandien. 2001. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol.* 167:2068-73.
- Seki, N., Y. Sudo, T. Yoshioka, S. Sugihara, T. Fujitsu, S. Sakuma, T. Ogawa, T. Hamaoka, H. Senoh, and H. Fujiwara. 1988. Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol.* 140:1477-84.
- Shioh, L.R., D.B. Rosen, N. Brdickova, Y. Xu, J. An, L.L. Lanier, J.G. Cyster, and M. Matloubian. 2006. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature.* 440:540-4.
- Smyth, M.J., J.M. Kelly, A.G. Baxter, H. Korner, and J.D. Sedgwick. 1998. An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med.* 188:1611-9.
- Smyth, M.J., M. Taniguchi, and S.E. Street. 2000. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol.* 165:2665-70.
- Swat, W., M. Dessing, H. von Boehmer, and P. Kisielow. 1993. CD69 expression during selection and maturation of CD4+8+ thymocytes. *Eur J Immunol.* 23:739-46.
- Swierkosz, J.E., P. Marrack, and J.W. Kappler. 1979. Functional analysis of T cells expressing Ia antigens. I. Demonstration of helper T-cell heterogeneity. *J Exp Med.* 150:1293-309.
- Tada, T., T. Takemori, K. Okumura, M. Nonaka, and T. Tokuhisa. 1978. Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J Exp Med.* 147:446-58.
- Taylor-Fishwick, D.A., and J.N. Siegel. 1995. Raf-1 provides a dominant but not exclusive signal for the induction of CD69 expression on T cells. *Eur J Immunol.* 25:3215-21.
- Testi, R., D. D'Ambrosio, R. De Maria, and A. Santoni. 1994. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today.* 15:479-83.

- Testi, R., J. Phillips, and L. Lanier. 1988. Constitutive expression of a phosphorylated activation antigen (Leu 23) by CD3bright human thymocytes. *J Immunol.* 141:2557-2563.
- Testi, R., J.H. Phillips, and L.L. Lanier. 1989. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. Requirement for receptor cross-linking, prolonged elevation of intracellular [Ca⁺⁺] and stimulation of protein kinase C. *J Immunol.* 142:1854-60.
- Testi, R., F. Pulcinelli, L. Frati, P.P. Gazzaniga, and A. Santoni. 1990. CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *J Exp Med.* 172:701-7.
- Ueno, T., K. Hara, M.S. Willis, M.A. Malin, U.E. Hopken, D.H. Gray, K. Matsushima, M. Lipp, T.A. Springer, R.L. Boyd, O. Yoshie, and Y. Takahama. 2002. Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus. *Immunity.* 16:205-18.
- Unutmaz, D., P. Pileri, and S. Abrignani. 1994. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med.* 180:1159-64.
- Vecchi, A., L. Massimiliano, S. Ramponi, W. Luini, S. Bernasconi, R. Bonecchi, P. Allavena, M. Parmentier, A. Mantovani, and S. Sozzani. 1999. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J Leukoc Biol.* 66:489-94.
- Vermeire, K., H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau, and P. Matthys. 1997. Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol.* 158:5507-13.
- Watanabe, N., M. Gavrieli, J.R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S.K. Loftin, M.A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T.L. Murphy, J.H. Russell, J.P. Allison, and K.M. Murphy. 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol.* 4:670-9.
- Weaver, C.T., L.E. Harrington, P.R. Mangan, M. Gavrieli, and K.M. Murphy. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 24:677-88.

- Weis, W.I., M.E. Taylor, and K. Drickamer. 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* 163:19-34.
- Wipke, B.T., and P.M. Allen. 2001. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 167:1601-8.
- Xu, H., A. Banerjee, N.A. Dilulio, and R.L. Fairchild. 1997. Development of effector CD8⁺ T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 158:4721-8.
- Yamashita, I., T. Nagata, T. Tada, and T. Nakayama. 1993. CD69 cell surface expression identifies developing thymocytes which audition for T cell antigen receptor-mediated positive selection. *Int Immunol.* 5:1139-50.
- Zajac, A.J., J.N. Blattman, K. Murali-Krishna, D.J. Sourdive, M. Suresh, J.D. Altman, and R. Ahmed. 1998. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med.* 188:2205-13.
- Ziegler, S.F., S.D. Levin, L. Johnson, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, E. Baker, G.R. Sutherland, A.L. Feldhaus, and F. Ramsdell. 1994. The mouse CD69 gene. Structure, expression, and mapping to the NK gene complex. *J Immunol.* 152:1228-36.
- Zingoni, A., G. Palmieri, S. Morrone, M. Carretero, M. López-Botel, M. Piccoli, L. Frati, and A. Santoni. 2000. CD69-triggered ERK activation and functions are negatively regulated by CD94 / NKG2-A inhibitory receptor. *Eur J Immunol.* 30:644-51.

ANEXO I
PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE
EL DESARROLLO DE LA TESIS

- Hortensia de la Fuente, María Mittelbrunn, Lorena Sánchez-Martín, Miguel Vicente-Manzanares, **Amalia Lamana**, Ruggero Pardi, Carlos Cabañas and Francisco Sánchez-Madrid. Synaptic clusters of MHC class II molecules induced on DCs by adhesion molecules-mediated initial T cell scanning. *Mol Biol Cell*. 2005 Jul; 16(7):3314-22.
- David Sancho, Manuel Gómez, Gloria Martínez del Hoyo, **Amalia Lamana**, Enric Esplugues, Pilar Lauzurica, Carlos Martínez-A and Francisco Sánchez-Madrid. CD69 targeting differentially affects the course of collagen-induced arthritis. *J Leukoc Biol*. 2006 Dec; 80(6):1233-41.
- **Amalia Lamana**, David Sancho, Aránzazu Cruz-Adalia, Gloria Martínez del Hoyo, Ada María Herrera, Manuel Feria, Federico Díaz-González, Manuel Gómez and Francisco Sánchez-Madrid. The Role of CD69 in acute neutrophil-mediated inflammation. *Eur J Immunol*. 2006 Oct; 36(10):2632-8.
- Ana Urzainqui, Gloria Martínez del Hoyo, **Amalia Lamana**, Hortensia de la Fuente, Olga Barreiro, Isabel M Olazábal, Pilar Martín, Martin K. Wild, Diezmar Vestweber, Roberto González-Amaro and Francisco Sánchez-Madrid. Functional role of PSGL-1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J Immunol*. 2006 Dec 1; 179(11):7457-65.
- Manuel Gómez, Silvia M Sanz-González, Yafa Naim Abu Nabah, **Amalia Lamana**, Francisco Sánchez-Madrid and Vicente Andrés. Atherosclerosis development in apolipoprotein E-null mice deficient for CD69. *Cardiovasc Res*. 2009 Jan 1; 81(1):197-205.
- **Amalia Lamana**, Pilar Martín, Aránzazu Cruz-Adalia, Marta Ramírez, Hortensia de la Fuente, Cristina Escribano, José Luis Rodríguez-Fernández, Jens Stein, Francisco Sánchez-Madrid and Gloria Martínez del Hoyo. CD69 regulates the migration of dendritic cells. *Manuscrito en preparación*.
- Pilar Martín, Manuel Gómez, **Amalia Lamana**, Marta Ramírez-Huesca, Aránzazu Cruz-Adalia, Cristina Gutiérrez, Francisco Sánchez-Madrid. CD69 regulates Th17 cell differentiation and controls inflammation. *Manuscrito en revisión*.
- Hortensia de la Fuente, **Amalia Lamana**, María Mittelbrunn, Silvia Pérez-Gala, Salvador González, Amaro García-Diez, Miguel Ángel Vega, Francisco Sánchez-Madrid. Identification of Genes Responsive to Solar Simulated UV Radiation in Human Monocyte-derived Dendritic Cells. *Manuscrito en preparación*.