

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO FUNCIONAL DE LA EXPRESIÓN CELULAR DE
CD1D FRENTE A LA ACTIVIDAD CITOLÍTICA TIPO NK**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yolanda Campos Martín

Bajo la dirección del doctor:
Eduardo Martínez Naves

Madrid, 2006

- **ISBN: 978-84-669-2944-8**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**Efecto funcional de la expresión
celular de CD1d frente a la
actividad citolítica tipo NK.**

TESIS DOCTORAL

YOLANDA CAMPOS MARTÍN

Madrid, 2006

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

**Efecto funcional de la expresión
celular de CD1d frente a la
actividad citolítica tipo NK.**

TESIS DOCTORAL

YOLANDA CAMPOS MARTÍN

Madrid, 2006

Tesis Doctoral

Efecto funcional de la expresión celular de CD1d frente a la actividad citolítica tipo NK.

AUTOR: Yolanda Campos Martín

DIRECTOR: Dr. Eduardo Martínez Naves

LUGAR DE REALIZACIÓN: Área de Inmunología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
MADRID

Firma del doctorando

VºBº Director de la tesis

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



2006

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCIÓN	
1. Complejo Principal de Histocompatibilidad.....	4
2. Sistema CD1	
-Características genéticas.....	5
-Expresión tisular de moléculas del sistema CD1.....	7
-CD1 del grupo I.....	8
-CD1 del grupo II.....	11
-Características funcionales de CD1d:presentación a células NKT.....	12
3. Células NK.....	19
4. Células dendríticas e infección por parásitos del género <i>Leishmania</i>	
-Células dendríticas.....	22
-Relación entre células dendríticas y células NK.....	23
-Infección de células dendríticas por <i>Leishmanias</i>	25
II. OBJETIVOS	31
III. MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Actividad citolítica de células NK frente a células que expresan CD1d humano.....	33
2. Efecto de los ligandos de CD1d α y β -GalCer.....	39
3. Desarrollo de un modelo de infección <i>in vitro</i> de células dendríticas por <i>L. infantum</i> . Actividad citolítica NK y NKT. NKT productoras de citocinas.....	40
IV. RESULTADOS	
1. Actividad citolítica de células NK frente a células que expresan CD1d humano	
-Generación de células HLA de clase I deficientes transfectadas con CD1d.....	47
-Estudio de la actividad citolítica NK frente a células diana que expresan CD1d	47
-Reversión de la inhibición producida por CD1d con el F(ab') ₂ de un anticuerpo específico de CD1d humano.....	52
2. Efecto de los ligandos de CD1d α y β -GalCer	
-Efecto de α y β -GalCer presentados por CD1d beca inhibición de la actividad citolítica de células NK.....	54
-Marcaje de células efectoras con tetrámeros de CD1d unido a α -GalCer.....	59
3. Desarrollo de un modelo de infección <i>in vitro</i> de células dendríticas humanas por <i>Leishmania infantum</i>	
-Infección de células dendríticas por <i>Leishmania infantum</i>	61
-Estudio de marcadores de maduración en células dendríticas infectadas con <i>Leishmania infantum</i>	62
-Estudio de la actividad citolítica de células NK frente a células dendríticas inmaduras, maduras e infectadas con <i>Leishmania infantum</i>	65

4. Estudio de la respuesta de células iNKT frente a células dendríticas infectadas con <i>Leishmania infantum</i>	
-Estudio de células iNKT frente a la expresión de CD1d en células dendríticas inmaduras infectadas con <i>Leishmania infantum</i>	69
-Estudio de células iNKT frente a células dendríticas cultivadas con extractos antigénicos de <i>L. infantum</i> o con LPG de <i>L. donovani</i>	73
V.DISCUSIÓN	
1. Actividad citolítica de células NK frente a células diana con expresión de CD1d.....	78
2. Células dendríticas humanas infectadas por amastigote y promastigote de <i>L. infantum</i>	84
VI.CONCLUSIÓN.....	94
VII.BIBLIOGRAFÍA.....	96
VIII.ABREVIATURAS.....	111
IX.PUBLICACIONES.....	113
X.ANEXOS.....	114

RESUMEN

RESUMEN

La actividad citolítica de células NK puede ser inhibida por el reconocimiento de moléculas MHC de clase I clásicas y no clásicas. El sistema CD1 está formado por una familia de glicoproteínas relacionadas con las moléculas MHC de clase I clásicas. CD1a, -b y -c presentan lípidos o glicolípidos a linfocitos T, recientemente ha sido descrito su capacidad de inhibir la actividad lítica de células NK, al igual que ocurre con CD1d1 de ratón. En este trabajo se describe como CD1d humano es capaz de inhibir la actividad lítica de células NKs. El tratamiento con α -GalCer o β -GalCer, ligandos de CD1d, revierte la inhibición inicialmente observada.

Las células dendríticas (DC) expresan niveles fisiológicos de CD1d y poseen una importante función en la respuesta inmune, lo que nos llevó a estudiar su interacción con células NK y NKT. Además, parásitos del género *Leishmania* pueden disminuir la expresión de moléculas CD1 del grupo I. En nuestro trabajo se muestran como las iDCs infectadas con *L. infantum*, a pesar de no incrementar la expresión de moléculas HLA de clase I, son resistentes a la lisis de células NK, debido al aumento de expresión de HLA-E, ligando del receptor inhibitor CD94/NKG2A. Las iDCs infectadas poseen una mayor expresión de CD1d, siendo eficazmente reconocidas y lisadas por células iNKT, que producen además altas concentraciones de IFN- γ . Estos resultados sugieren un importante papel de las células NKT en la respuesta inmune innata frente a *Leishmania*.

SUMMARY

The cytotoxic activity of Natural Killer cells can be inhibited by classical and non-classical MHC molecules. The CD1 system is formed by a family of glycoproteins that are related to classical MHC. CD1a, b and c molecules present lipids or glycolipids to T cells and it has been shown that these molecules can inhibit target cell lysis by human NK cells. It has also been shown that mouse CD1d molecules can protect cells from NK cell mediated cytotoxicity. We describe how human CD1d can inhibit NK-cell mediated cytolysis. Incubation of target cells with the ligands for CD1d, α -GalCer and β -GalCer abolishes the protective effect of CD1d in our *in vitro* killing assays.

Dendritic cells (DC) express physiological level of CD1d and play an important role in immune response, which lead us to study their interaction with NK and NKT cells. There is growing evidence that *Leishmania* parasites can modify the CD1 group I expression of DCs. We found that infected *Leishmania infantum* iDCs that do not up-regulate HLA class I molecules, become resistant to killing mediated by autologous NK cells due to the up-regulation of HLA-E expression, inhibitory ligand of the NK receptor CD94/NKG2A. Furthermore, iDCs infected with *L. infantum* up-regulate CD1d cell surface expression and consequently can be efficiently recognized and killed by iNKT cells that produce significant amounts of IFN- γ . These data suggest an important role in the innate immune response against *Lesihmania*.

INTRODUCCIÓN

1.-COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) se descubrió como una región multi-loci constituida por genes altamente polimórficos, los cuales determinaban el resultado de los trasplantes tisulares entre individuos. El Complejo Principal de Histocompatibilidad humano es conocido con las siglas HLA (*Human Leukocyte Antigens*).

Los genes del sistema HLA humano están presentes en el brazo corto del cromosoma 6 y se clasifican en genes HLA de clase I y de clase II. Son un conjunto de *loci* ligados genéticamente con expresión codominante en cada individuo. La característica más sobresaliente de los genes del HLA es su extenso polimorfismo, de gran importancia para la respuesta inmunitaria adaptativa.

Existen dos tipos de moléculas producto de los genes HLA denominadas moléculas MHC de clase I y de clase II. Son glucoproteínas de superficie cuya función consiste en presentar péptidos a los linfocitos T. Ambas están formadas por subunidades estructurales diferentes pero que le dan una conformación tridimensional muy similar (Figura 1).

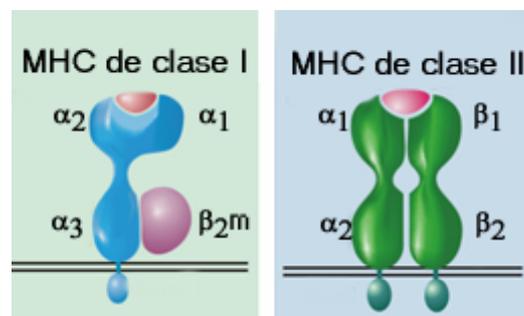


Figura 1.- Moléculas MHC de clase I y II. MHC de clase I formada por cadena α (dominios α_1 , α_2 y α_3) unida a β_2m . MHC de clase II, cadenas α (dominios α_1 y α_2) y β (β_1 y β_2). En rosa se muestra el péptido presentado por las moléculas MHC. (Tomada de Regueiro et al, Inmunología. Panamericana).

Además de los genes elevadamente polimórficos de MHC de clase I y II, existen muchos genes de clase I que codifican para proteínas con escaso polimorfismo, algunas de ellas sin función atribuida. Inicialmente se denominaron MHC de clase I no clásico. Estructuralmente son proteínas similares a las codificadas por los genes MHC de clase I, aunque no todos desempeñan funciones relacionadas con el sistema inmunitario. Algunos genes de clase I no clásico se localizan dentro del complejo MHC. La expresión celular es variable tanto en lo que respecta a la cantidad en superficie como a la distribución tisular. Recientemente se ha propuesto otra clasificación de esta familia multigénica (Hughes, A.L. et al., 1999), según la

cual, los genes HLA de clase I clásicos (HLA-A, -B y -C) se agruparían como HLA de clase Ia. Los genes HLA de clase I no clásicos se dividirían en tres subfamilias: los que están dentro de la región cromosómica MHC y que muestran alta similitud con los clásicos (HLA-E, -F y -G) se agruparían como HLA de clase Ib; los que están dentro de la región cromosómica MHC y que muestran baja similitud con los clásicos (HFE y MIC) como HLA de clase Ic; y los situados fuera de la región cromosómica MHC y en general de baja similitud con los clásicos (CD1, EPCR, FcRN, MR1, ULBP y ZAG) como HLA de clase Id.

2.-SISTEMA CD1 (*Cluster of Differentiation 1*).

El sistema CD1 forma parte de las molécula MHC de clase Id. CD1 fue la primera molécula de esta familia que se describió codificada fuera del complejo MHC (Calabi, F. et al., 1986). Al igual que las proteínas MHC de clase I, son heterodímeros de superficie formados por la unión no covalente de una cadena α a β_2m (β_2 microglobulina). Su característica más importante es la capacidad de presentar antígenos de naturaleza lipídica y glicolipídica a linfocitos T.

2.1.-Características genéticas.

El sistema humano CD1 esta formado por cinco genes denominados CD1A, CD1B, CD1C, CD1D y CD1E, que dan lugar a cinco proteínas: CD1a, -b, -c, -d y -e ((Martin, L.H. et al., 1987); (Calabi, F. et al., 1989)). Son genes localizados en el cromosoma 1 en la región q23.1 (Figura 2) y codifican para una cadena α formada por tres dominios (α_1 , α_2 y α_3) (Martin, L.H. et al., 1987). El dominio α_3 es el más homólogo entre todos los miembros de la familia CD1 (aproximadamente un 80%) (Martin, L.H. et al., 1986).

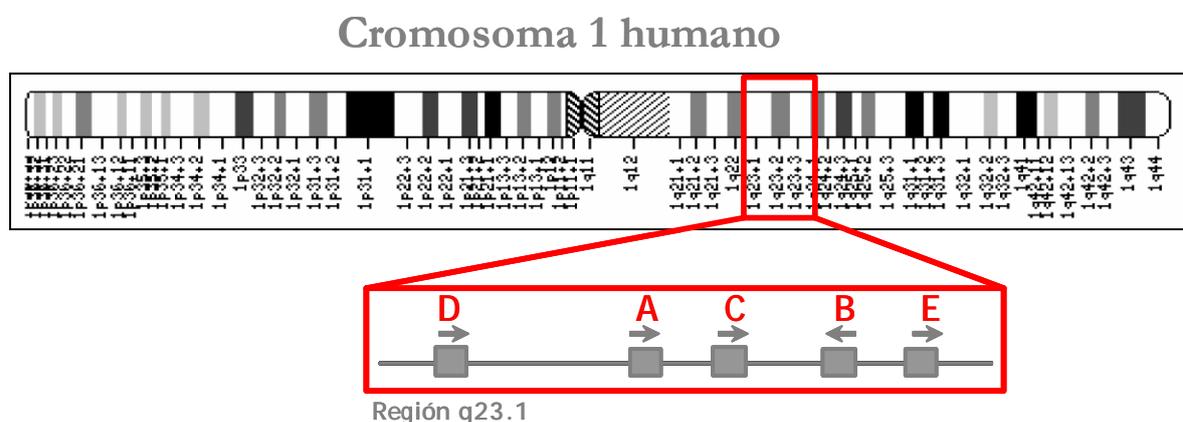


Figura 2.- Localización y organización cromosómica de los genes CD1 humanos.

Las moléculas de la familia CD1 se clasifican en dos grupos atendiendo a la similitud de secuencia de los dominios α_1 y α_2 , y a su distribución tisular. En el grupo I se encuentran las proteínas CD1a, -b y -c, CD1d forma el grupo II y CD1e quedaría en una posición intermedia entre ambos grupos (Calabi, F. et al., 1989) (Figura 3).

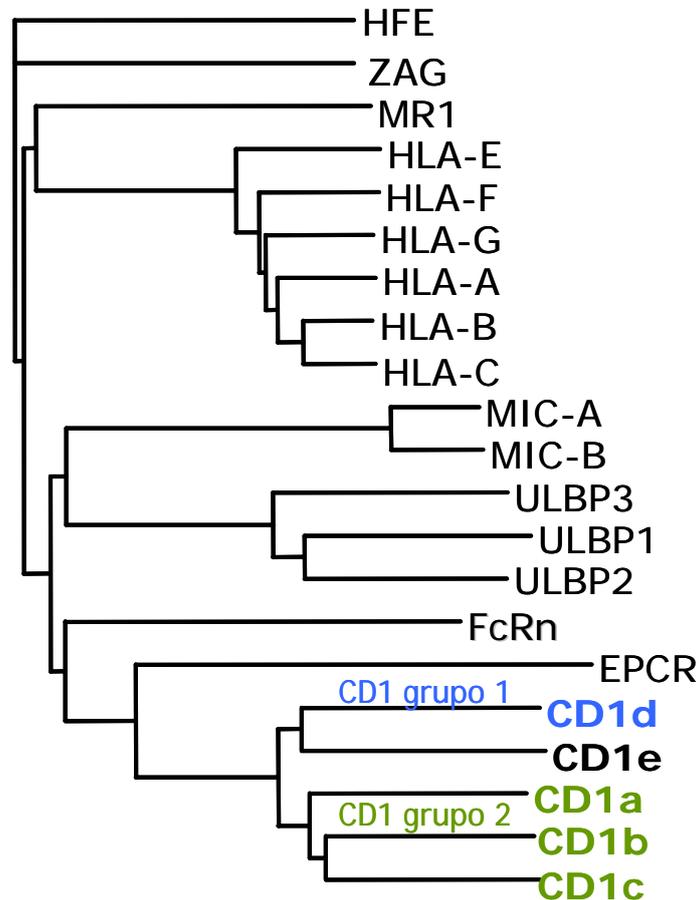


Figura 3.- Árbol filogenético de la familia MHC de clase I.

Estudios realizados con diferentes grupos étnicos revelan que los genes del sistema CD1 poseen escaso polimorfismo, en algunos casos los cambios nucleotídicos son silenciosos ((Han, M. et al., 1999);(Oteo, M. et al., 1999)). Ese limitado polimorfismo destaca al comparar con las moléculas MHC de clase I clásicas, donde se hace necesario el polimorfismo dada la alta frecuencia de cambios peptídicos de los patógenos que presenta. En el caso de CD1, existe poca posibilidad de cambios en las cadenas lipídicas de los antígenos que presentan, no siendo necesario un amplio polimorfismo. En ratón han sido identificados dos genes (CD1D1 y CD1D2) ortólogos al CD1D humano ((Bradbury, A. et al., 1988); (Balk, S.P. et al., 1991)), las ratas solo poseen un gen CD1 también ortólogo al CD1D humano ((Ichimiya, S. et al., 1993);(Matsuura, A. et al., 1997)). También han sido descritos estos genes en ovejas

((Rhind, S.M. et al., 1996) ;(Ferguson, E.D. et al., 1996)), vacas (Parsons, K.R. et al., 1991), conejos ((Calabi, F. et al., 1989);(Hayes, S.M. et al., 2001)) y cobayas entre otros (Dascher, C.C. et al., 1999).

Poco se conoce de la regulación transcripcional de los genes CD1. Los genes del grupo I se inducen *in vitro* en monocitos humanos tras el cultivo con GM-CSF (*Granulocyte\ Macrophage Colony-Stimulating Factor*) o GM-CSF e IL-4 (*Interleucine 4*) ((Kasinrerk, W. et al., 1993); (Porcelli, S. et al., 1992)), o *in vivo* después de estar expuesto a patógenos (Sieling, P.A. et al., 1999). Células dendríticas tratadas con RSG (Rosiglitazona), agonista del factor de transcripción PPAR γ (*Peroxisome Prolifelator Activated Receptor*), disminuyen la expresión de CD1a (Nencioni, A. et al., 2002) y del resto de moléculas CD1 del grupo I (Szatmari, I. et al., 2004). PPAR γ es un miembro de la familia de receptores hormonales del núcleo, factor regulador de genes relacionados con la captura, acumulación y almacenamiento de lípidos que además participa en la diferenciación de monocitos a células dendríticas (Willson, T.M. et al., 2001). CD1d, a diferencia de las moléculas CD1 del grupo I, no aumenta la expresión en monocitos estimulados con GM-CSF e IL-4 (Exley, M. et al., 2000). El factor de transcripción PPAR γ induce la expresión de CD1d en células dendríticas derivadas de monocitos después de una disminución inicial. Se podría especular que siendo PPAR γ un factor que coordina la acumulación y presentación de lípidos, también podría actua en la presentación de éstos por CD1d (Szatmari, I. et al., 2004). En el último año, se ha descrito una región promotora localizada delante del gen CD1D1 de ratón que posee una secuencia de unión para la familia de factores de transcripción Ets (Geng, Y. et al., 2005). En humanos, el factor de transcripción SP1 posee un papel importante en la función del promotor proximal de CD1D humano. El análisis de la región promotora de CD1D muestra que LEF-1 (*Lymphoid Enhancer-binding Factor 1*), IFN- γ y NF-IL6 probablemente también contribuirían a la regulación de la expresión de CD1d (Chen, Q.Y. et al., 2004) .

2.2.-Expresión tisular de moléculas del sistema CD1.

Las moléculas CD1 tienen una expresión tisular restringida. Las moléculas CD1 del grupo I se expresan en células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos. También se expresan en timocitos corticales y se induce en monocitos de sangre periférica (Porcelli, S. et al., 1992). CD1c se expresa en algunos tipos de células B (Smith, M.E. et al., 1988). Las moléculas CD1 del grupo II como el CD1d de ratón, se expresa en células presentadoras de antígeno como son las células

dendríticas, macrófagos y células B ((Brossay, L. et al., 1997);(Roark, J.H. et al., 1998);(Mandal, M. et al., 1998)). CD1d en humanos se expresan en monocitos, la expresión disminuye en células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos, en células dendríticas maduras con LPS la expresión de CD1d es comparable a la de monocitos, también aparecen en macrófagos (Spada, F.M. et al., 2000). En estas células de origen mieloide la expresión de CD1d es baja comparando con la expresión en células B circulantes y en timocitos corticales ((Exley, M. et al., 2000);(Blumberg, R.S. et al., 1991)). También hay expresión en células epiteliales y células parenquimales del intestino e hígado (Canchis, P.W. et al., 1993).

2.3.- CD1 del grupo I: CD1a, -b y -c.

Características estructurales y tráfico intracelular.

Las moléculas CD1 del grupo I, son proteínas de superficie con capacidad de presentación antigénica. Existen formas solubles resultado de *splicings* alternativos del RNA mensajero (Woolfson, A. et al., 1994). Poseen tres dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 , un dominio transmembranal y otro citoplásmico. Los dominios α_1 y α_2 forman una hendidura profunda e hidrofóbica que permite la unión de antígenos de naturaleza lipídica donde la región polar queda expuesta para su reconocimiento por el TCR de células T (Figura 4). Las moléculas CD1b poseen la hendidura de unión antigénica más profunda de todas las moléculas CD1, que le permite unir antígenos con cadena acilo de más de 80 carbonos ((Gadola, S.D. et al., 2002);(Batuwangala, T. et al., 2004)). CD1a por el contrario posee un lugar de unión antigénica mas restringido ((Zajonc, D.M. et al., 2003.Zajonc, D.M. et al., 2005)).

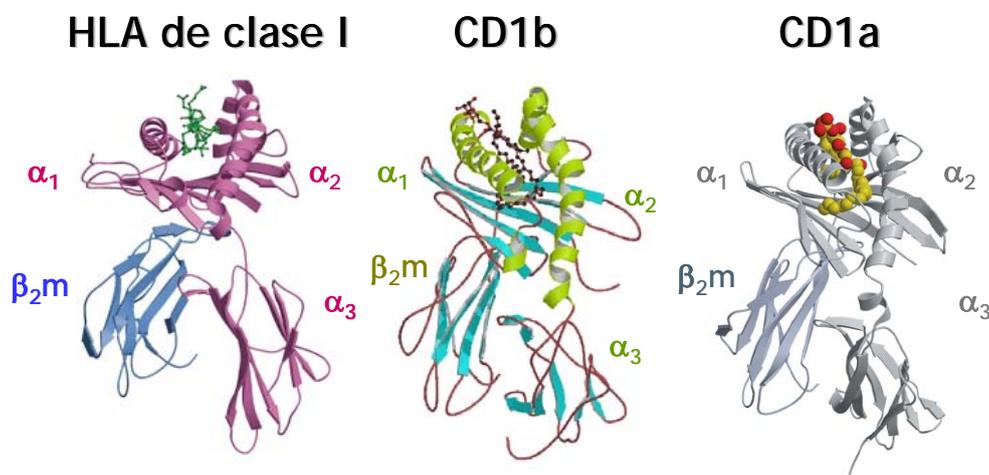


Figura 4.- Gráfico estructural comparativo de una molécula HLA de clase I (HLA-A) con las moléculas CD1a y CD1b cristalizadas.

Las moléculas CD1a, -b y -c se expresan en la superficie celular asociadas a β_2m y unidas a un lípido endógeno (Figura 5). Una vez allí son internalizados y se dirigen a endosomas tempranos donde quedan las moléculas CD1a (Sugita, M. et al., 1999), CD1b se dirige después a los lisosomas (Briken, V. et al., 2002). Tanto en los endosomas como en los lisosomas adquieren nuevos antígenos, propios o exógenos y vuelven a la superficie celular. CD1c tendría un tráfico celular mezcla de los anteriores, pudiendo ir tanto a los endosomas tempranos como a los lisosomas ((Sugita, M. et al., 2000);(Briken, V. et al., 2000)).

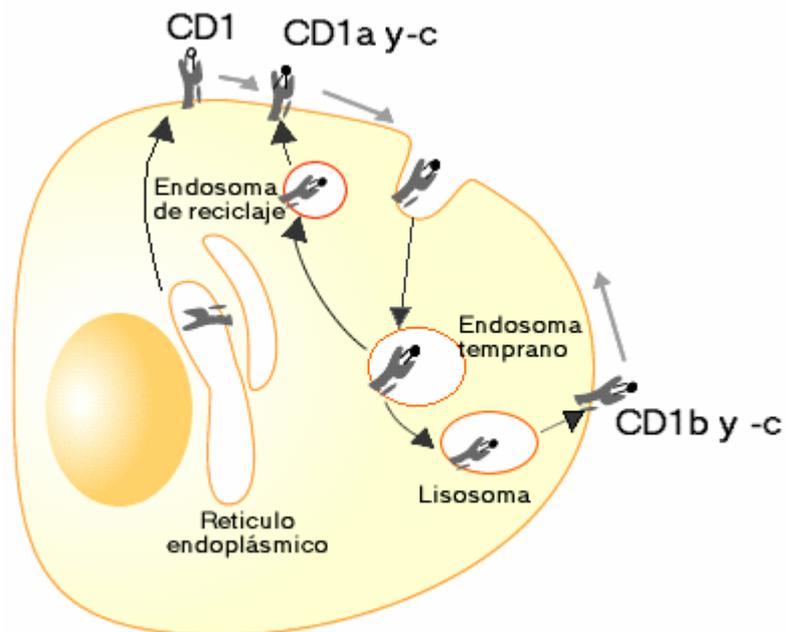


Figura 5.- Tráfico intracelular de moléculas CD1 del grupo I. Ensamblaje y unión de antígenos propios (en blanco) o exógenos (en negro).

Presentación antigénica y características funcionales.

La identificación de los primeros antígenos presentados por CD1 a linfocitos T mostró que se trataba de antígenos lipídicos (Beckman, E.M. et al., 1994). CD1b presenta ácidos micólicos unidos a glucosa (Beckman, E.M. et al., 1994) y diacilgliceroles (Sieling, P.A. et al., 1995); CD1c presenta glicofosfolípidos de origen bacteriano (Moody, D.B. et al., 2000) y CD1a por su parte, presenta lipopéptidos de *Mycobacterium tuberculosis* (Moody, D.B. et al., 2004) (Figura 6).

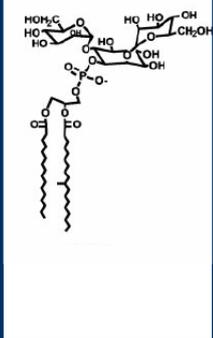
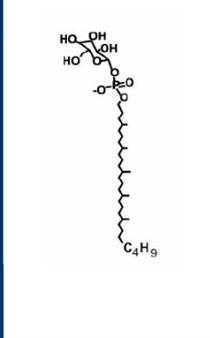
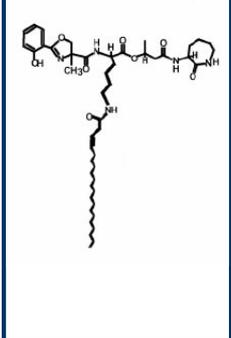
CD1b		CD1c	CD1a
Ácidos micólicos	Diacilgliceroles	Glicofosfolípidos	Lipopéptidos
			

Figura 6.- Algunos glicolípidos presentados por CD1b, -c y -a.

Los linfocitos T restringidos por CD1 reconocen esta molécula presentadora a través del TCR ((Grant, E.P. et al., 1999);(Moody, D.B. et al., 2000);(Spada, F.M. et al., 2000)), análisis de las cadenas α y β del TCR, demuestran que existe variabilidad de cadenas restringidas por CD1. Estos linfocitos son estimulados con antígenos micobacterianos principalmente, presentados por CD1 y responden con proliferación, producción de citocinas y citolisis, también poseen actividad microbica con producción de granulinas ((Rosat, J.P. et al., 1999); (Sieling, P.A. et al., 2000)).

Existen clones de linfocitos T restringidos por CD1 que reconocen CD1a, -b y -c en ausencia aparente de antígenos exógenos. Estos linfocitos T autorreactivos, son citolíticos y secretan principalmente $\text{IFN-}\gamma$ y otras citocinas de tipo Th1 ((Porcelli, S. et al., 1989);(Spada, F.M. et al., 2000);(Vincent, M.S. et al., 2002);(Faure, F. et al., 1990)). Son capaces de inducir la maduración de células dendríticas derivadas de monocitos y son muy importantes para que estas células dendríticas adquieran capacidad de producir IL-12 ((Vincent, M.S. et al., 2002);(Leslie, D.S. et al., 2002)). Pueden jugar por tanto un papel destacado en la actuación de las células dendríticas en el comienzo de la respuesta inmune, que podría influir en la posterior respuesta adaptativa. Los linfocitos T autorreactivos actuaría como puente entre la respuesta innata y adaptativa ((Spada, F.M. et al., 2000);(Vincent, M.S. et al., 2003)).

El CD1 presentado por células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting cells*) también se relaciona con procesos crónicos asociados con enfermedades autoinmunes, tanto del sistema nervioso periférico ((Khalili-Shirazi, A. et al., 1998);(Van, R., I et al., 2000)) como nervios central (Battistini, L. et al., 1996). En pacientes con esclerosis múltiple se han aislado linfocitos T restringidos por CD1 que reconocen gangliosidos y otros lípidos abundantes en el sistema nervioso,

sugiriendo su participación en la patogénesis de esta enfermedad ((Shamshiev, A. et al., 1999);(Shamshiev, A. et al., 2002)).

2.4.- CD1 del grupo II: CD1d.

Características Estructurales.

CD1d al igual que las otras moléculas del sistema CD1 se expresa en la superficie celular unido a β_2m y poseen capacidad de presentar glicolípidos. CD1d en humanos y ratones puede expresarse sin la asociación a β_2m (Balk, S.P. et al., 1994), tratándose de una isoforma con glicosilación alterada o deficiente, que parece restringida a células epiteliales (Kim, H.S. et al., 1999).

La molécula CD1d humana ha sido recientemente cristalizada tanto unida a antígeno como sola (Figura 7). El lugar de unión a antígeno esta formado por los dominios α_1 y α_2 , que forman una hendidura profunda e hidrofóbica formada por dos canales (A' y C') que conectan con la superficie y permiten la unión de las cadenas lipídicas, quedando la región hidrofílica del glicolípidos expuesta para su reconocimiento (Koch, M. et al., 2005). La hendidura de unión antigénica adquiere una conformación más ancha cuando CD1d no esta unido a antígeno, favoreciendo la unión de glicolípidos, una vez producida la unión la hendidura se estrecha.

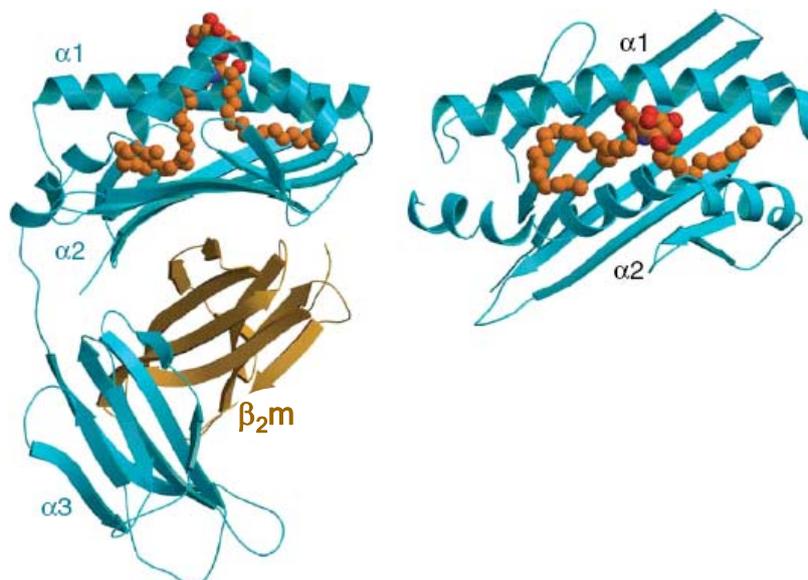


Figura 7.- Estructura de CD1d humano. Dominios α_1 , α_2 y α_3 (en azul), unido a β_2m (en amarillo). La hendidura de unión antigénica esta ocupada por un glicolípidos (en naranja). Adaptado de (Koch, M. et al., 2005).

Tráfico intracelular.

La molécula CD1d generada en el retículo endoplásmico y unida a β_2m se dirige a la membrana plasmática, una vez allí se internaliza dirigiéndose a lisosomas

y endosomas (Jayawardena-Wolf, J. et al., 2001). En los lisosomas puede cambiar los antígenos endógenos que presenta por otros, en este proceso actúan diferentes Saposinas (*Sphingolipid Activator Proteins, SAPs*) cuya función es favorecer la degradación de glicosfingolípidos por enzimas solubles ((Zhou, D. et al., 2004);(Kang, S.J. et al., 2004) ;(Winau, F. et al., 2004)) (Figura 8). La localización de CD1d murino en los lisosomas es esencial para la presentación de antígenos a células T CD1d específicas ((Chiu, Y.H. et al., 2002);(Zhou, D. et al., 2004)). Recientemente se ha propuesto la función como chaperona de una proteína microsomal MTP (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*) presente en el retículo endoplásmico que une lípidos endógenos, su función es previa a las saposinas en los lisosomas. La expresión de MTP no es ubicua, se encuentra en células presentadoras de antígeno, células mononucleares del hígado de ratón y células B humanas y murinas (Dougan, S.K. et al., 2005).

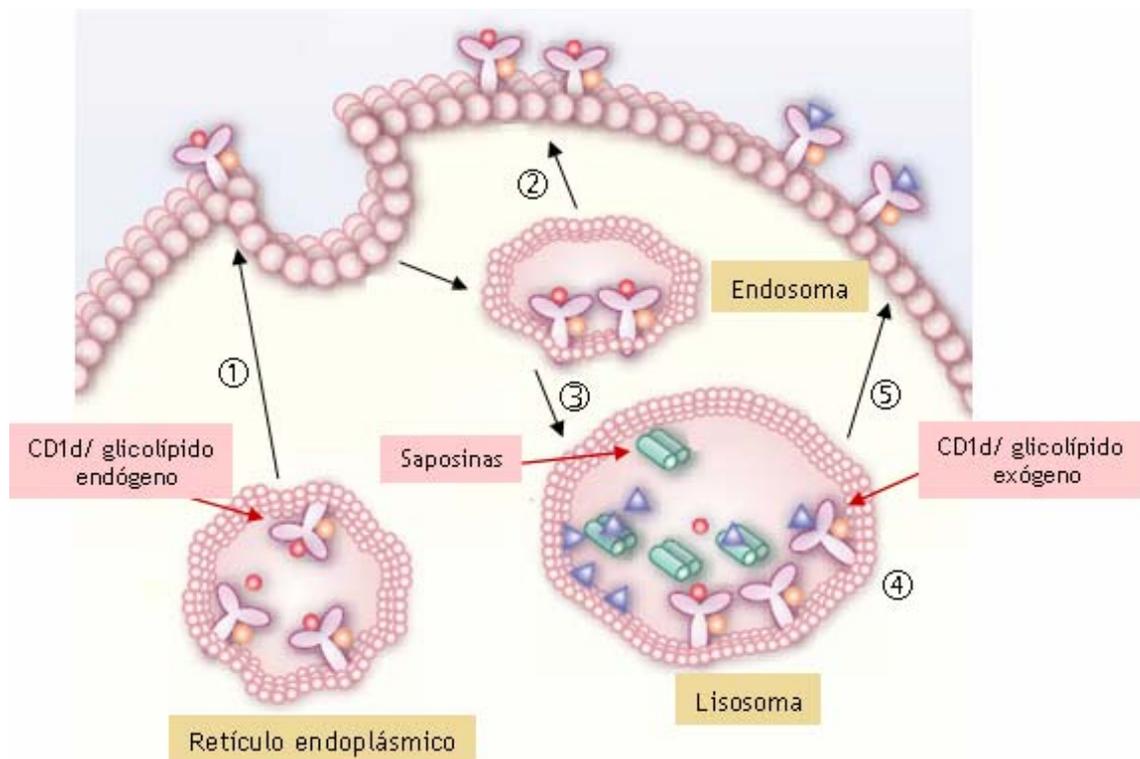


Figura 8.- Tráfico intracelular de moléculas CD1d. Ensamblaje y unión de glicolípidos, representado en cinco pasos. Adaptado de (Kronenberg, M., 2004).

2.5.-Características funcionales de CD1d: presentación a células NKT.

La función más conocida y estudiada de CD1d humano y de ratón es la presentación de antígenos a células T restringidas por CD1d, conocidas como NKTs por ser linfocitos T que expresan marcadores característicos de células NKs.

□ **Fenotipo de células NKTs.** Las células NKTs constituyen una subpoblación de células T que coexpresan receptores de células NK, NK1.1 y CD122, y que tienen un TCR semi-invariante (Bendelac, A. et al., 1997). Fueron descritas primeramente en ratón, se trataba de una pequeña población de células T (0.4%) de dobles negativas $CD4^- CD8^-$, con un TCR $V\beta 8.2$, y marcador de células NK, NK1.1 (Budd, R.C. et al., 1987). Años más tarde se caracterizó su TCR, comprobando que era invariante $V\alpha 14-V\beta 8.2$ (Lantz, O. et al., 1994). Las células NKT están restringidas por CD1d (Bendelac, A. et al., 1995), siendo más reactivos si esta molécula presenta α -Galactosilceramida (α -GalCer) (glicolípido encontrado en un extracto de la esponja marina *Agelas mauritanicus*, que fue aislado y caracterizado inicialmente por su potente actividad antitumoral) (Kawano, T. et al., 1997)). α -GalCer, es un carbohidrato unido en α a una ceramida, CD1d se une a la porción de ceramida, quedando el azúcar hidrofílico expuesto para su unión con el TCR (Figura 9).

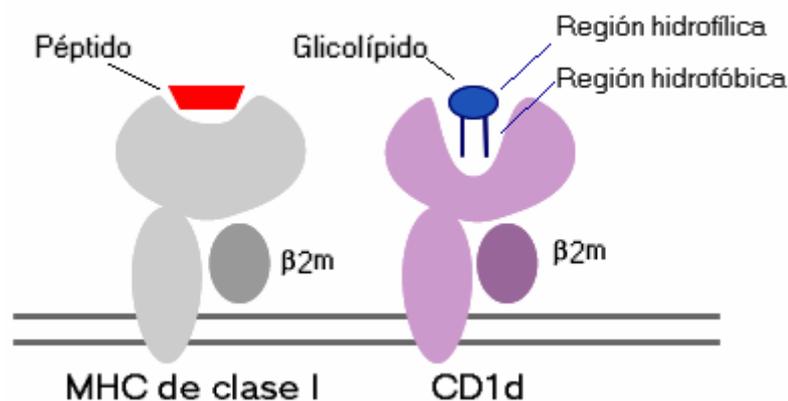


Figura 9.- Presentación antigénica de MHC de clase I y CD1d. Posición de la región hidrofóbica e hidrofílica del glicolípido presentado por CD1d.

En ratón ya se han descrito cuatro categorías diferentes de NKT en función del tipo de TCR que expresen, pero todas poseen marcadores de células NKs: La primera categoría incluye a las células descritas inicialmente, $V\alpha 14-J\alpha 18 V\beta 8.2/7/2$ (Lantz, O. et al., 1994), pueden ser $CD4^+$ o DN (Benlagha, K. et al., 2000). Otra categoría de NKT (Cardell, S. et al., 1995), autorreactiva frente a CD1d, presenta un TCR más diverso, caracterizado como $V\alpha 3.2-J\alpha 9/V\alpha 8, V\beta 8$ (Park, S.H. et al., 2001). Una tercera categoría de NKT incluye células no dependientes de CD1d, y con un TCR muy diverso (Eberl, G. et al., 1999). La última categoría engloba células NKT de ratón, que expresan CD49B (α_2 -integrina) y un TCR muy diverso (Hammond, K.J. et al., 1999). Todas las categorías de NKT se encuentran distribuidas mayoritariamente en timo, hígado, bazo y médula ósea (Eberl, G. et al., 1999).

En humanos existen células NKT homólogas a las de ratón que expresan marcadores celulares típicos de células NK, CD161, y un TCR invariante $V\alpha 24$ - $V\beta 11$. Reconocen α -GalCer presentada por CD1d (Brossay, L. et al., 1998). Fenotípicamente son dobles negativas o $CD4^+$. Recientemente se ha identificado otro tipo de NKT humano, $V\alpha 24^+$ $CD8^+$ que no produce IL-4, a diferencia de las NKT $CD4^+$ o DN (Takahashi, T. et al., 2002). En la médula ósea, se ha encontrado otro tipo de células NKT que reconocen a CD1d y poseen un TCR no-invariante (Exley, M.A. et al., 2001). Las células NKT las podemos encontrar en sangre en un pequeño porcentaje (0.2% de células T en sangre), en hígado la población no es tan abundante como en ratón ((Norris, S. et al., 1999) ;(Karadimitris, A. et al., 2001) ;(Kita, H. et al., 2002)).

□ **Función de células NKT.** Las células NKT poseen actividad citolítica ((Metelitsa, L.S. et al., 2001);(Kawano, T. et al., 1999)) además son capaces de una rápida producción de citocinas como IL-4 e $IFN-\gamma$, lo que le permite actuar sobre otros tipos celulares como linfocitos T, B, células NK, macrófagos y dendríticas ((Carnaud, C. et al., 1999. Metelitsa, L.S. et al., 2001);(Eberl, G. et al., 2000);(Singh, N. et al., 1999) ;(Nishimura, T. et al., 2000) (Gonzalez-Asequinolaza, G. et al., 2002) ;(Nakagawa, R. et al., 2000) ;(Burdin, N. et al., 1999) ;(Naumov, Y.N. et al., 2001)). Esta producción de citocinas le ofrece un papel importante en la polarización de respuesta hacia Th1 o Th2 (Smyth, M.J. et al., 2000).

Se ha observado que las células NKT ($V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$) procedentes de PBLs activadas con α -GalCer, presentan una actividad antitumoral citotóxica dependiente de perforina *in vitro* e *in vivo*. Esta actividad citotóxica no depende de los niveles de expresión de MHC de clase I en las células dianas, teniendo un mecanismo de actuación diferente al de células NKs (Kawano, T. et al., 1999). Células NKT humanas seleccionadas con tetrámeros CD1d unidos a α GalCer, presentan actividad citotóxica cuando se las enfrenta a células tumorales que presentan CD1d, y producen IL-2 que induce la citotoxicidad mediada por células NK que actuaría frente a aquellas células tumorales CD1d⁺ (Metelitsa, L.S. et al., 2001).

Las células NKTs participan en la respuesta frente a algunas infecciones bacterianas, virales y parasitarias. Poseen una importante función en las fases tempranas de la respuesta con la producción de $IFN-\gamma$, como en el caso de infecciones bacterianas por *Pseudomonas aeruginosa* (Nieuwenhuis, E.E. et al., 2002). También actúan en la respuesta inmune frente al virus de la Hepatitis B y C ((Exley, M.A. et al., 2002);(Exley, M.A. et al., 2001);(Baron, J.L. et al., 2002)). Parásitos como *Plasmodium* y *Trypanosoma cruzi* poseen glicolípidos en su cubierta

que pueden ser presentados por CD1d, aunque la relación entre la respuesta inmune a estos parásitos y células NKT no queda muy clara ((Schofield, L. et al., 1999);(Molano, A. et al., 2000);(Duthie, M.S. et al., 2002)). También se ha descrito la importancia de células NKT en la respuesta temprana a infecciones por *L. major* (Ishikawa, H. et al., 2000).

□ Células NKT en patología. El número de NKT se encuentra disminuido en numerosas enfermedades autoinmunes, como es el caso de la Esclerosis múltiple (Sumida, T. et al., 1995) y Diabetes Mellitus insulino-dependiente (Wilson, S.B. et al., 1998). En la Polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), se encuentra aumentado el número de NKT (Illies, Z. et al., 2000). Lo mismo que en la soriasis (Bonish, B. et al., 2000) y Miastenia Gravis (Nagane, Y. et al., 2001). En Hepatitis B y C se observa infiltrado de NKT (Nutti, S. et al., 1998).

□ Antígenos presentados por CD1d a células NKTs. Se han descrito numerosos antígenos que pueden ser presentados por CD1d a células NKT:

1. Dentro de los antígenos sintéticos, el antígeno más conocido presentado por CD1d humano y de ratón es la α -GalCer. Otros glicolípidos sintéticos han sido estudiados, llegando a la conclusión de que lo importante para el reconocimiento de las células NKT es el enlace en α entre el azúcar y la ceramida ((Kawano, T. et al., 1997);(Spada, F.M. et al., 1998)). Aunque también existen clones de NKT murinos capaces de reconocer β -GalCer ((Gumperz, J.E. et al., 2000); (Ortaldo, J.R. et al., 2004)). Recientemente se ha generado una α -GalCer (PBS-57) mas soluble que la inicialmente aislada de la esponja marina (KRN7000) (Liu et al., 2005). (Figura 10).

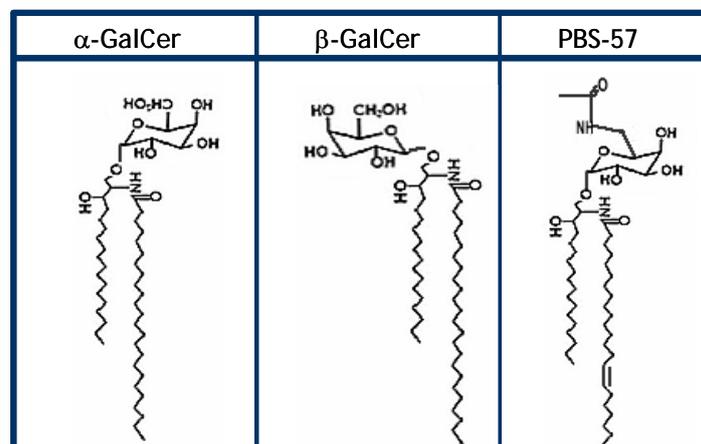


Figura 10.- Antígenos sintéticos presentados por CD1d.

2. Muchos fueron los estudios realizados para intentar determinar antígenos endógenos presentados por CD1d y su efecto sobre células NKT. Primeramente el glucosil-fosfatidilinositol (GPI) fue identificado como ligando endógeno de CD1d en ratón, la unión se produce a través del fosfatidilinositol, que se une con gran afinidad al CD1d (Joyce, S. et al., 1998). Este antígeno sin embargo no es reconocido mayoritariamente por células NKT murinas (Molano, A. et al., 2000), aunque si ha sido descrito un clon NKT $V\alpha 14J\alpha 15$ capaz de reconocer fosfatidilinositol unido a CD1d de ratón (Gumperz, J.E. et al., 2000). GPI podría tener un papel importante en el mantenimiento de la conformación de CD1d durante el ensamblaje en el retículo endoplásmico, hasta que fuera intercambiado por otro antígeno (De Silva, A.D. et al., 2002). Un linfoma murino de células T L5178-R, libera al medio de cultivo un glicolípido alterado denominado gangliotriaosil-ceramida (aGM2) que es capaz de inhibir la estimulación de células NKT típicas $V\alpha 14$, pero no actúa sobre NKT no típicas $V\alpha 5$ (Sriram, V. et al., 2002). Otro antígeno natural presentado por CD1d de ratón es la fosfatidil-etanolamina (PE), capaz de activar un hibridoma de células NKT de cadena invariante. La activación depende del grado de insaturación de las cadenas acilo que presenta la PE (Rauch, J. et al., 2003). Recientemente ha sido identificado otro ligando endógeno presentado por CD1d y reconocido por células NKT, la isoglobotrihexosylceramide (iGb3) (Figura 11).

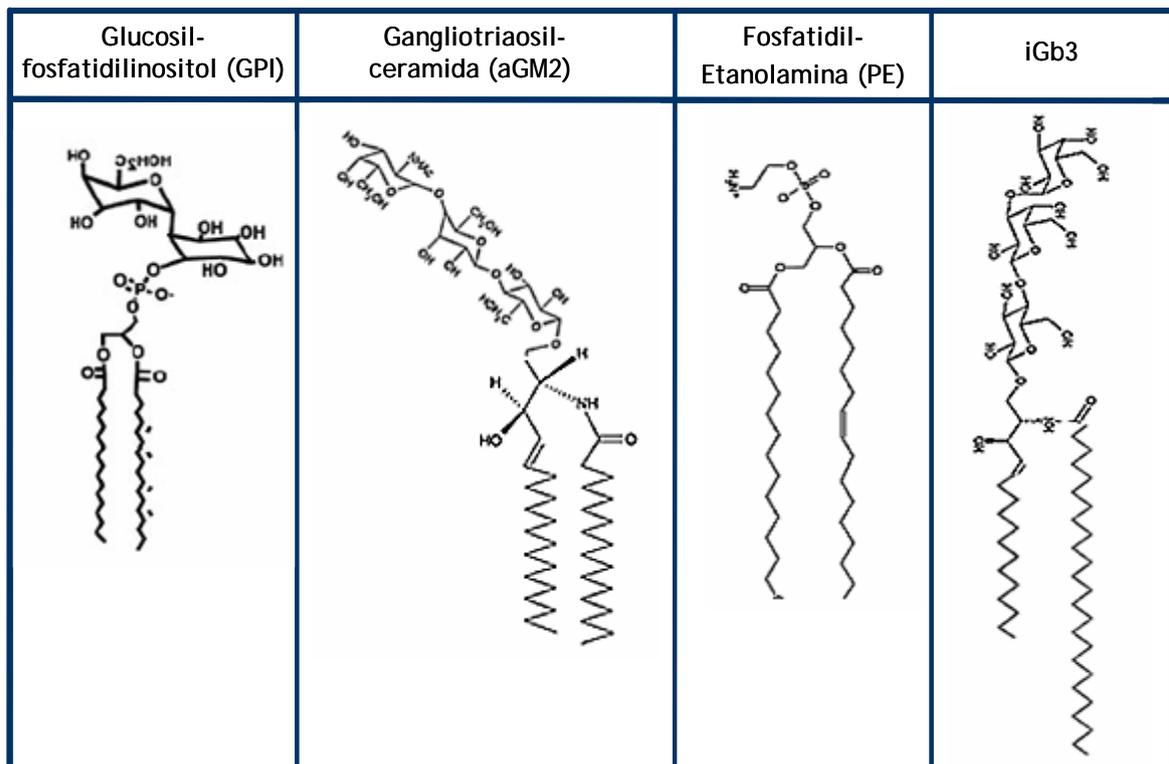


Figura 11.- Antígenos endógenos presentados por CD1d.

Es un glicolípido que se genera a partir de la síntesis o degradación de isoglobo-glicoesfingolípidos, la degradación que depende de la enzima β -Hexosaminidasa, se produce en los lisosomas donde se uniría a CD1d (Zhou, D. et al., 2004). La síntesis es dependiente de galactosiltransferasas deficientes o en baja expresión en humanos (Keusch, J.J. et al., 2000) (Figura 12).

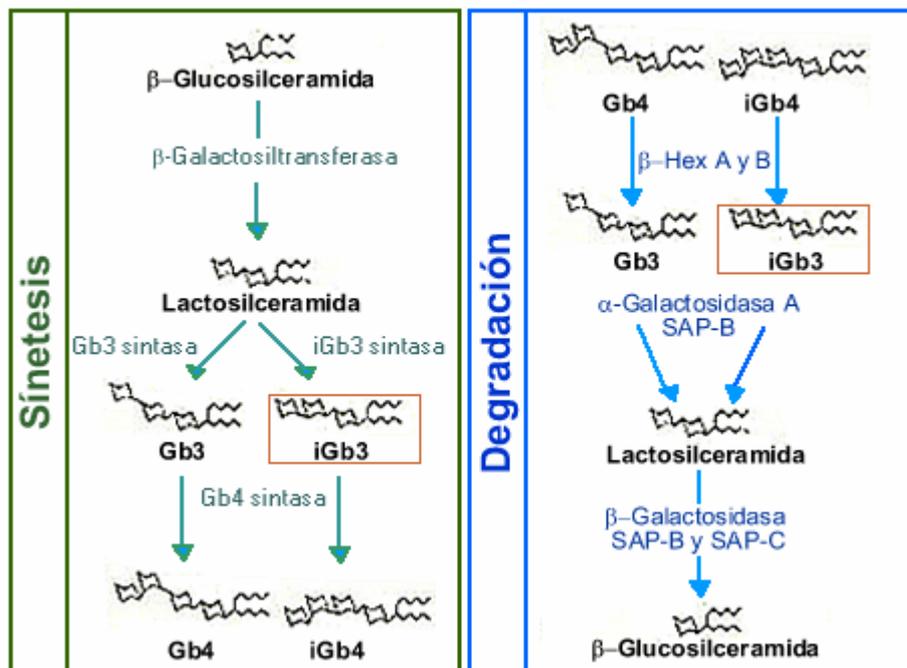


Figura 12.- Degradación lisosomal de Isoglobo-glicoesfingolípidos.

- En el último año se ha descrito como las células NKT humanas y de ratón actúan en infecciones bacterianas y pueden reconocer glicolípidos bacterianos presentados por CD1d. Fosfatidilinositol manosa (PIM) fue descrito como un primer antígeno micobacteriano capaz de estimular las células NKT (Fischer, K. et al., 2004). Por otro lado las células NKT también son capaces de reconocer esfingolípidos presentes en la pared bacteriana de *Spingomonas* (α -proteobacterias Gram-negativas carentes de LPS) unidas a CD1d ((Kinjo, Y. et al., 2005); (Wu, D. et al., 2005)). Son bacterias Gram-negativas que no poseen LPS en su cubierta, en su lugar expresan glicoesfingolípidos (GSL) (Kawahara, K. et al., 2000). En la respuesta inmune frente a bacterias Gram-negativas con LPS, como *Salmonella typhimurium*, las células NKT no reconocen antígenos bacterianos presentados por las células infectadas, sino CD1d unido a iGb3, siendo además necesaria la estimulación con la IL-12 producida por las células presentadoras (Mattner, J. et al., 2005) (Figura 13).

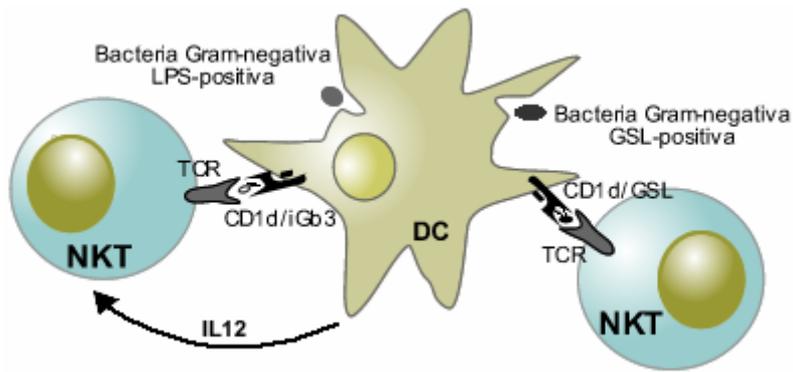


Figura13.- Estimulación de células NKT por CD1d/iGb3 + IL-12 o CD1d/GSL.

□ Ontogenia de células NKTs. En la selección tímica de las células NKT actúan timocitos inmaduros corticales $CD4^+CD8^+$ que expresan CD1d (Bendelac, A., 1995). La adquisición de receptores NK como el CD161 y algunos receptores inhibidores NK, no se produce en el timo, indicando que la completa maduración de las células es post-tímica ((Gapin, L. et al., 2001);(Benlagha, K. et al., 2002);(Pellicci, D.G. et al., 2002)). La expresión de receptores inhibidores NK por las células NKTs ha sido propuesto como un mecanismo para controlar la expansión y control de autorreactividad de estas células (MacDonald, H.R., 2002) (Figura 14).

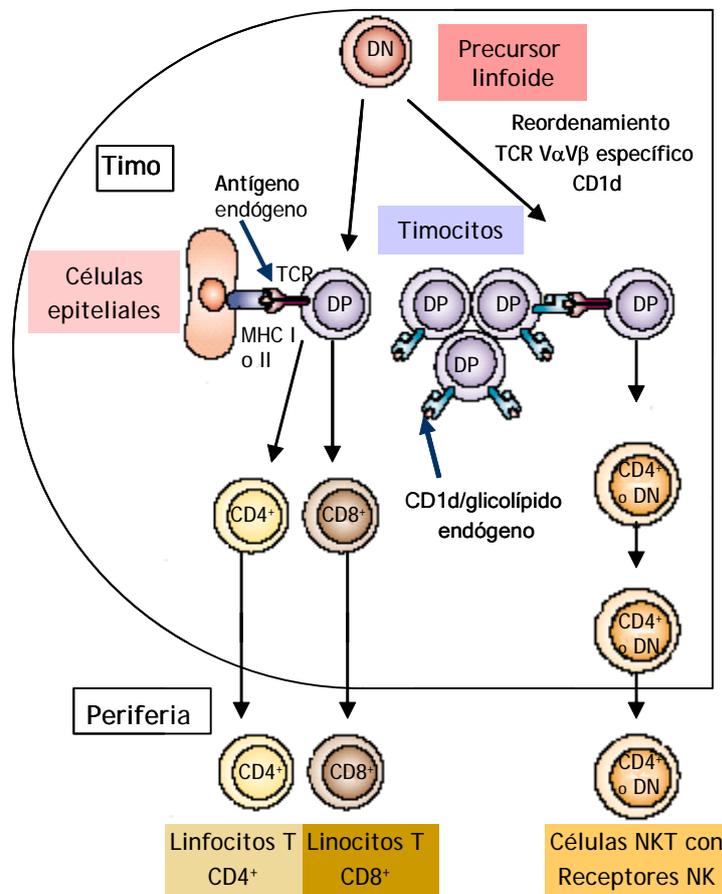


Figura 14.- Selección tímica de células NKT con estimulación de CD1d expresado en timocitos $CD4^+ CD8^+$ (Dobles positivos). Maduración extratímica de células NKT con expresión de receptores de células NKs. Adaptada de (Kronenberg, M. et al., 2002)

El antígeno endógeno iGb3 presentado por CD1d es reconocido por las células NKT y podría actuar en la selección. En ratones deficientes de β -Hexosaminidasa disminuye radicalmente la población de células NKT, lo que apoya la hipótesis de que actúe en la selección tímica. Además las células NKT son capaces de estimularse en la periferia con este glicolípido (Zhou, D. et al., 2004). Quedan dudas en como un ligando es capaz de seleccionar positivamente a las células NKT en el timo y estimularlo en la periferia, es posible que existan diferencias en los niveles de expresión de iGb3 en tejidos o tipos celulares o que la respuesta de las NKT dependiera además de otros factores como la IL-12 (Godfrey, D.I. et al., 2004)

3.-CÉLULAS NKs (*Natural killer*).

Las células NK se definen como linfocitos citotóxicos, que se diferencian a partir de un progenitor compartido con el linaje linfocitario T, no poseen en su superficie receptores específicos para antígenos, lo que les diferencia de los linfocitos T y B. Las células NK forman parte de la inmunidad innata y actúan en la primera línea defensiva frente a virus, parásitos y bacterias. Además las células NK poseen receptores ($Fc\gamma RIII$ o CD16) para el fragmento Fc (Fragmento cristalizante) de los anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG3, pudiendo eliminar células diana cubiertas de anticuerpos (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC*).

Son células que además se caracterizan por tener capacidad de reconocer moléculas MHC de clase I. Las células NK pueden actuar frente a células infectadas por determinados virus y algunos tumores, que alteran de algún modo la expresión celular de moléculas MHC propias. En esta función, la actividad citolítica de las células NK está regulada por un complejo equilibrio entre señales contrapuestas, activadoras e inhibitoras (Figura 15).

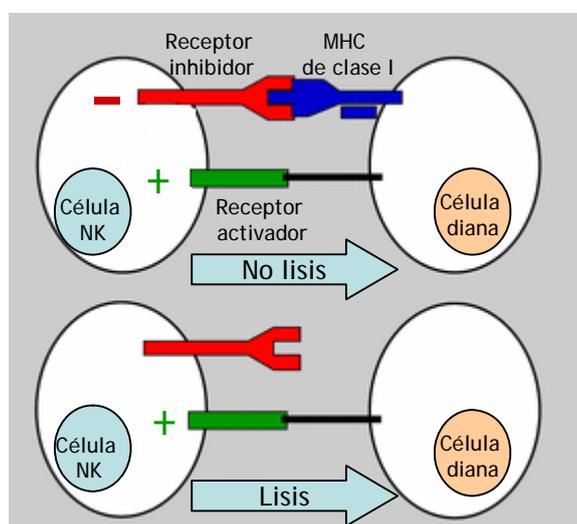


Figura 15.- Reconocimiento de células NKs a células diana. Receptores inhibidores y activadores.

3.1.- Receptores y ligandos.

Receptores activadores e inhibidores.

Se han encontrado numerosas moléculas de membrana implicadas en la señal de activación de la célula NK de las que en su gran mayoría se desconoce el ligando que reconocen, entre ellas podemos destacar: NKG2D (Bauer, S. et al., 1999), NKp30 (Pende, D. et al., 1999), NKp44 (Vitale, M. et al., 1998), NKp46 (Sivori, S. et al., 1997), y NKR-P1 (Chambers, W.H. et al., 1989).

Por otra parte, se encuentran receptores inhibidores implicados en el reconocimiento de las moléculas MHC de clase I, algunos también presentes en subpoblaciones de linfocitos T citotóxicos (Mingari, M.C. et al., 1998). Los receptores inhibidores poseen secuencias ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) que contribuyen al reclutamiento de tirosinfosfatasa y regulan tanto la función citotóxica como la producción de citocinas (D'Andrea, A. et al., 1996). Las células NK pueden expresar distintas combinaciones de estos receptores inhibidores, pero al menos uno de ellos reconoce moléculas MHC propias. La señal de un receptor inhibido prevalece sobre la recibida por receptores activadores, contribuyendo a preservar la tolerancia frente a células autólogas (Raulet, D.H., 1999). Se han identificado receptores activadores que reconocen moléculas MHC de clase I, no conociéndose aún su papel fisiológico (Moretta, A. et al., 1998).

Los receptores inhibidores que reconocen moléculas MHC de clase I (Navarro, F. et al., 2001), se han clasificado dentro de receptores de la superfamilia de las inmunoglobulinas o de las lectinas tipo C ((Lanier, L.L., 1998);(Moretta, A. et al., 1996);(Long, E.O., 1999)):

□ Receptores NK de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

1. Receptores de la familia KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*), son proteínas monoméricas de membrana que se expresan en células NK y en subpoblaciones de linfocitos T. Se distinguen dos grupos según el número de dominios tipo inmunoglobulina extracelulares, así existen receptores KIR2D y KIR3D (con dos y tres dominios, respectivamente). Los receptores inhibidores poseen dos motivos ITIM en el tallo citoplásmico (KIR2DL o KIR3DL) y se diferencian de los receptores con tallo citoplásmico corto (KIR2DS o KIR3DS) que se unen una proteína DAP12 que transduce señal activadora (Figura 16).
2. Receptores ILT (*Immunoglobulin Like Transcripts*), monómeros con dos o cuatro dominios tipo inmunoglobulina, que se expresan en células NK, linfocitos T y en otras del linaje hematopoyético, que las diferencia de los KIR. Se distinguen tres grupos: receptores con región citoplásmica larga con motivos

ITIM y función inhibidora, receptores con cola citoplásmica corta y función activadora y por último receptores solubles sin región transmembrana (Figura 16).

□ Receptores NK tipo Lectina.

Son receptores formados por la unión por puentes disulfuro de dos heterodímeros CD94/NKG2. Existen diferentes tipos de proteínas NKG2: NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E y NKG2H. NKG2D es un receptor activador que no forma dímeros con CD94 y no pertenece estrictamente a la familia NKG2. CD94 carece de capacidad para transducir señales y su función principal parece ser la de permitir el ensamblaje y transporte de las moléculas NKG2 a la superficie celular. NKG2A posee motivos ITIM en su tallo citoplásmico, NKG2C no los posee y se asocian a DAP12 transduciendo señal activadora (Figura 16).

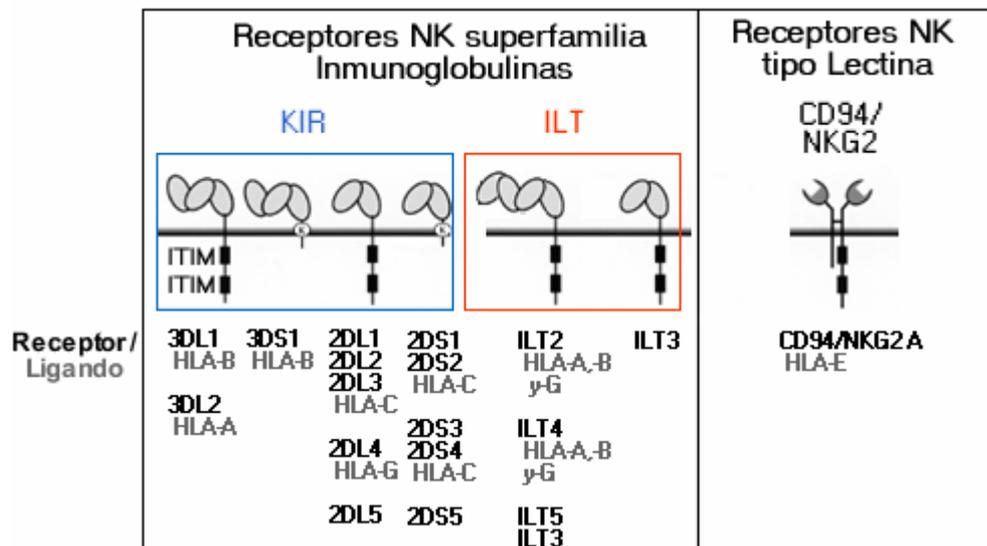


Figura 16.- Algunos ejemplos de receptores inhibidores de las dos familias: Inmunoglobulinas y Lectinas, y sus ligandos HLA de clase I.

Células NK y moléculas CD1.

Las moléculas del sistema CD1 además de presentar antígenos a linfocitos T, poseen otra importante función al ser reconocidas por células NKs. Las células NKs las reconocen a través de receptores inhibidores hasta ahora desconocidos.

Las moléculas CD1a, -b y -c inhiben parcialmente la actividad citolítica de células NK CD3⁻ aisladas de sangre periférica y de líneas celulares NK (Carbone, E. et al., 2000), como es el caso de la línea celular NKL aislada de un linfoma de células NKs (Robertson, M.J. et al., 1996). La presentación de extractos lipídicos derivados de *Mycobacterium tuberculosis* por CD1b aumenta la inhibición inicialmente

observada al presentar antígenos endógenos (Carbone, E. et al., 2000). El receptor o receptores inhibidores causantes de la inhibición aún no han sido identificados.

CD1d de ratón al igual que las moléculas CD1 del grupo I inhiben la actividad citolítica de células NK murinas, aumentando la inhibición conforme aumenta el tiempo de cultivo de las células NK empleadas en el ensayo (Chang, C.S. et al., 1999). El receptor responsable de la inhibición no ha sido caracterizado aunque si se ha conseguido aislar la población de células NK que se inhiben ante la presencia de CD1d expresado en la superficie (Huang, M.M. et al., 2004).

4.-CÉLULAS DENDRÍTICAS E INFECCIÓN POR PARÁSITOS DEL GÉNERO *Leishmania*.

4.1.- Células dendríticas.

Las células dendríticas (*Dendritic cells*, DC) son las más potentes activadoras de linfocitos T. Las DCs inmaduras se localizan en órganos de la periferia y en superficies mucosas, donde están en continuo contacto con antígenos. En su forma inmadura son muy eficientes en la captura de antígenos y en la liberación de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (Sallusto, F. et al., 2000).

Poseen receptores capaces de reconocer determinados componentes de los patógenos, uno de ellos son los de la familia tipo Toll (*Toll-Like Receptor*, TLR). En humanos han sido descritos diez tipos de TLRs expresados en monocitos, macrófagos, células dendríticas, principalmente. Uno de ellos el TLR4 reconoce lipopolisacárido (LPS) presente en la pared bacteriana. La estimulación a través de los TLR produce la maduración de las células dendríticas y migración a nódulos linfáticos ((Iwasaki, A. et al., 2004);(Shi, G.X. et al., 2004);(Hou, W.S. et al., 2004) ;(Akira, S., 2003);(Gordon, S., 2002);(Park, Y. et al., 2002.Reis e Sousa., 2004)), que las convierte en células dendríticas maduras capaces de estimular células T a través de la mayor capacidad que adquieren de presentar antígenos (aumento en la expresión de moléculas MHC) y capacidad coestimuladora con la expresión de moléculas: CD40, CD80 y CD86 (Steinman, R.M., 2003).

Los diferentes tipos de células dendríticas en humanos están poco definidas, las más caracterizadas son las células dendríticas epidérmicas (de Langerhans), células dendríticas dérmicas (intersticiales), células interdigitantes en nódulos linfáticos y las células dendríticas de sangre periférica mieloides o plasmacitoides. En los últimos años se ha estado trabajando con un modelo de diferenciación de células

dendríticas a partir de monocitos tratados con IL-4 y GM-CSF, obteniéndose un fenotipo de células dendríticas inmaduras (moDCs) (Tabla 1).

DCs mieloides	DCs plasmacitoides	moDCs	Intersiticiales	Langerhans
CD11c ⁺	CD11c ⁻	CD11c ⁺	CD11c ⁺	CD11c ⁺
CD123 ^{low}	CD123 ⁺	CD123 ⁻	CD123 ⁻	CD123 ⁺
CD1a ⁻	CD1a ⁻	CD1a ⁺	CD1a ⁺	CD1a ⁺
CD13 ⁺	CD13 ⁻	CD13 ⁺	CD13 ⁺	CD13 ⁺
CD33 ⁺	CD33 ⁻	CD33 ⁺	CD33 ⁺	CD33 ⁺
CD4 ⁺	CD4 ^{high}	CD4 ⁺	CD4 ⁺	CD4 ⁺
HLA-DR ^{high}	HLA-DR ^{low}	HLA-DR ^{high}	HLA-DR ^{high}	HLA-DR ^{high}
CD86 ⁺	CD86 ^{low}	CD86 ⁺	CD86 ⁺	CD86 ⁺

Tabla 1.- Marcadores fenotípicos de los distintos tipos de células dendríticas.

Las células dendríticas pueden generar respuesta Th1 o Th2 dependiendo del ambiente que les rodee o de los estímulos que reciban ((Kalinski, P. et al., 1999);(Vieira, P.L. et al., 2000);(Tanaka, H. et al., 2000);(Nagai, T. et al., 2003).

4.2.- Relación entre células dendríticas y células NKs.

Las células dendríticas y las células NKs pertenecientes a la inmunidad innata poseen una serie de interrelaciones bidireccionales. Los lugares en los que se pueden poner en contacto son en los focos de infección y en nódulos linfáticos.

Las células dendríticas a través de la producción de citocinas y del contacto celular, actúan sobre las células NKs (Figura 17a).

□ Con la producción de citocinas, entre las que destacan: IL-12, IL-18, IL-15, IFN- α e IFN- β , inducen la proliferación y producen la activación de células NKs (que producen IFN- γ y actividad citolítica) ((Fernandez, N.C. et al., 2002);(Jinushi, M. et al., 2003);(Granucci, F. et al., 2004)).

□ Las células dendríticas establecen contacto con las células NK activándola, aunque no están muy claras las moléculas que interviene ((Fernandez, N.C. et al., 2002);(Granucci, F. et al., 2004);(Piccioli, D. et al., 2002);(Gerosa, F. et al., 2002)). Las células dendríticas inmaduras expresan constitutivamente ligandos (CD48 y CD70)

de receptores activadores de células NK (2B4 y CD27, respectivamente) participando en la activación de células NK. Las células dendríticas maduras por su parte, aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras pudiendo incluso expresar ligandos de receptores activadores (Jinushi, M. et al., 2003).

Las células NKs, puede regular la función de células dendríticas (Figura 17 b y c).

□ Las células NK a través de la producción de IFN- γ y TNF maduran las células dendríticas ((Piccioli, D. et al., 2002);(Gerosa, F. et al., 2002); (Mailliard, R.B. et al., 2002)).

□ Los niveles de células dendríticas inmaduras están reguladas por la actividad citolítica de las células NKs. Las células dendríticas inmaduras son lisadas por células NK autólogas y alogénicas, para ello es necesario un previo reconocimiento entre células efectoras y dianas, en el que actúa la unión entre CD40 (en células dendríticas) y CD40L (en células NKs) (Carbone, E. et al., 1999). La señal activadora en la célula NK viene dada por el receptor activador NKp30 que reconoce un ligando en la célula dendrítica (Ferlazzo, G. et al., 2003). Se han descrito algunos métodos de evasión de esta respuesta NK en células infectadas, por ejemplo en macrófagos infectados con *Leishmania donovani*, se ha observado supresión de la expresión de CD40(Buates, S. et al., 2001). También la infección por citomegalovirus humano inhibe la actividad citolítica NK. La expresión de pp65, proteína mayoritaria del citomegalovirus, interacciona con el receptor activador NKp30 impidiendo que tramita la señal activadora (Arnon, T.I. et al., 2005).

Las células dendríticas maduras sin embargo, son resistentes a la actividad citolítica de células NK. El virus de la influenza madura células dendríticas protegiéndolas de la lisis de células NKs (Wilson, J.L. et al., 1999). Células dendríticas infectadas con bacterias sufren también una rápida maduración con aumento de la expresión de HLA de clase I, volviéndose también resistentes a la lisis por NKs (Ferlazzo, G. et al., 2003). La inhibición que se observa es causada por el aumento de expresión de moléculas HLA de clase I que se produce durante la maduración, y especialmente por HLA-E. De entre todos los clones NKs, aquellos con alta expresión del receptor inhibidor CD94/NKG2A (que reconoce HLA-E), son los causantes de la inhibición de las células dendríticas maduras y de la lisis de las dendríticas inmaduras con menor expresión de HLA-E (Della Chiesa M. et al., 2003).

La regulación de los niveles de células dendríticas inmaduras por las células NK, se postula como un mecanismo de máxima activación de inmunidad adaptativa,

permitiendo sólo a las dendríticas maduras actuar en la presentación antigénica (Moretta, L. et al., 2003).

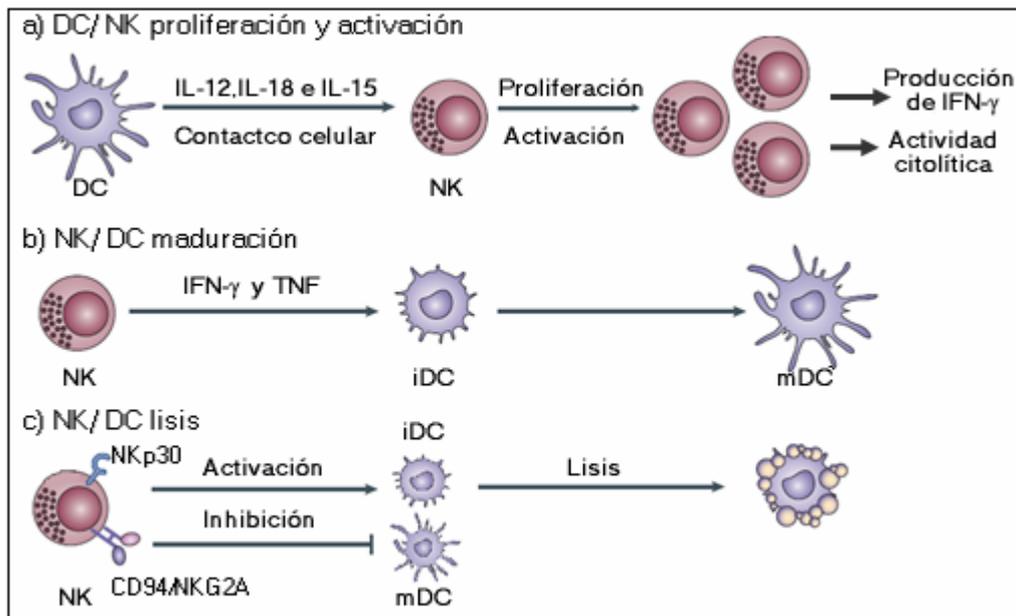


Figura 17.- Relación entre células dendríticas y NKs. a) Proliferación y activación de células NKs. b) Maduración células dendríticas inmaduras (iDCs) y c) Lisis de células dendríticas inmaduras e inhibición de dendríticas maduras (mDCs). Adaptada de (Degli-Esposti, M.A. et al., 2005).

4.3.- Infección de células dendrítica por Leishmanias.

g. *Leishmania*

Dentro de este género nos encontramos con parásitos que se desarrollan en el citoplasma de células fagocíticas y que son transmitidos por pequeñas moscas hematófagas del género *Phlebotomus*. Existen numerosas especies algunas de ellas afectan tanto al hombre como a otros mamíferos.

□ Morfología, el género *Leishmania* adquiere dos formas a lo largo de su ciclo vital: la forma amastigote única forma presente en el hospedador mamífero, se encuentra en el citoplasma de células fagocíticas, dentro de vacuolas parasitóforas. Son organismos ovals con un solo núcleo esférico y con un cinetoplasto (masa de ADN mitocondrial, que se tiñe intensamente en tinciones hematológicas). La forma promastigote, se encuentra en el tracto digestivo de los flebotomos hembras infectadas. Poseen una morfología alargada con un extremo posterior alargado del que surge un flagelo. El núcleo está situado en el centro y el cinetoplasto se encuentra cerca del extremo anterior (Figura 18).

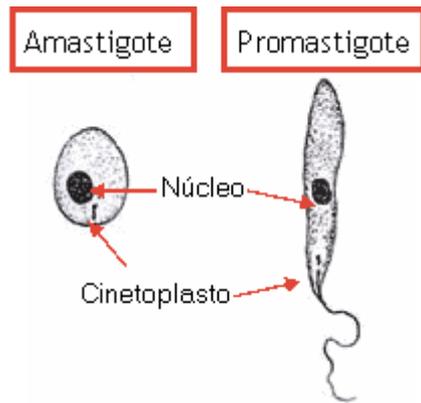


Figura 18.- Morfología de las dos formas del g. *Leishmania* (amastigote y promastigote).

□ Ciclo vital, intervienen dos hospedadores, uno mamífero y un vector u hospedador invertebrado. El ciclo comienza en el vector cuando pica a un mamífero infectado y además de sangre ingiere macrófagos con amastigotes en su citoplasma. En el intestino medio del vector los amastigotes quedan liberados y se dividen por fisión binaria. Se transforman en promastigotes que también se multiplican, desplazándose finalmente a la probóscide donde serán introducidos en la picadura a un nuevo mamífero. En el mamífero, el ciclo comienza cuando una flebótomo hembra infectada pica a un mamífero e introduce junto con su saliva, promastigotes infectantes (metacíclicos). Algunos de ellos son eliminados por los mecanismos de defensa, pero otros penetran en células fagocíticas donde permanecen en vesículas parasitóforas y se transforman en amastigotes. Se multiplican hasta alcanzar un elevado número provocando la destrucción celular, los amastigotes liberados alcanzan nuevas células fagocíticas, repitiéndose el proceso (Figura 19). Roedores y cánidos infectados se convierten en reservorios de las *Leishmanias*.

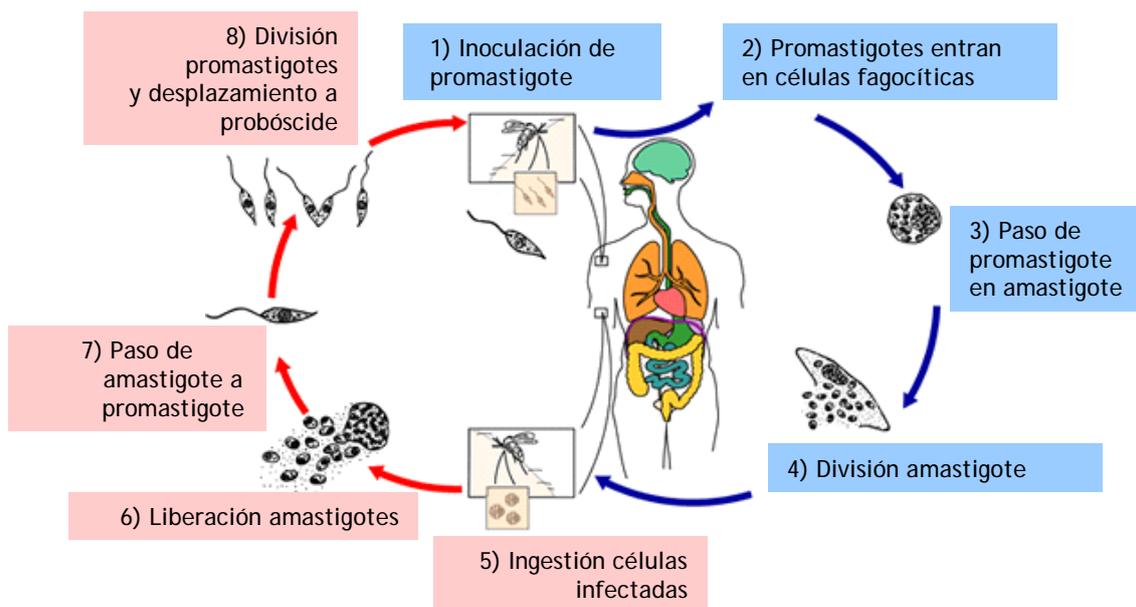


Figura 19.- Ciclo vital de la *Leishmania*, con la infección del vector (pasos 5-8) y del hospedador (pasos 1-4).

□ Patogenia, tras la infección de macrófagos se produce una respuesta inflamatoria que se traduce en una reacción granulomatosa con la aparición de pápulas. Por necrosis superficial la pápula se ulcera, tras varios meses y por acción del sistema inmune la úlcera cura, dejando una cicatriz. Este tipo de Leishmaniasis, cuya infección sólo se limita a la piel y cura espontáneamente se conoce como *Leishmaniasis cutánea*, todas las especies de *Leishmania* pueden producirla. Algunas especies se expanden hacia las mucosas (bucales y nasales), como consecuencia se destruyen la piel y mucosas afectadas, esta manifestación se conoce como *Leishmaniasis mucocutánea*. Por último, algunas especies como *L. infantum* y *L. donovani*, son además capaces de infectar vísceras y tejidos con abundantes células fagocíticas, como el hígado, bazo, pulmones y médula ósea. Esta afección es conocida como *Leishmaniasis visceral* y es la más grave de ellas.

□ Distribución geográfica, se considera que las Leishmaniasis se encuentran distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales. La distribución está limitada por la presencia de los flebotomos y la susceptibilidad de estos a los climas fríos. *L. infantum*, en concreto, se encuentra distribuida por toda la cuenca del mediterráneo.

Infección de células dendríticas por *Leishmania*

Los linfocitos T juegan un papel fundamental en la respuesta frente a parásitos intracelulares. En infecciones con *Leishmania* es importante la respuesta Th1 con la producción de citocinas como IFN- γ y TNF α (Solbach, W. et al., 2000). Las células dendríticas son de gran importancia para la inmunidad adaptativa por ser un potente activador de células T después de una infección, a través de la presentación de antígenos, y producción de citocinas y quimiocinas, como la IL-12 ((Granucci, F. et al., 2003);(Granucci, F. et al., 2003)).

Las Leishmanias pueden infectar las células dendríticas eficientemente. Hasta ahora el único receptor descrito capaz de reconocer la forma amastigote y promastigote de Leishmanias que producen Leishmaniasis visceral (como *L. infantum*) es DC-SIGN. Forma parte dentro de los receptores lectina tipo C (*Pathogen Recognition Receptors*, PRRs)(Brandonisio, O. et al., 2004) . Aunque la mayor parte de las Leishmania inoculadas por el vector son opsonizadas y fagocitadas por receptores de complemento (Dominguez, M. et al., 2002). Una vez en el interior celular se encuentran en vesículas parasitóforas (endosomas tardíos y lisosomas) donde continúan su ciclo vital. Tras la infección las células dendríticas pueden

producir IL-12 dependiendo del subtipo de célula dendrítica y de la especie de *Leishmania* (Brandonisio, O. et al., 2004). En el caso de Leishmanias que producen Leishmaniasis visceral la producción de IL-12 está disminuida (Ghalib, H.W. et al., 1995).

Existe una cierta controversia acerca de la posibilidad o no de maduración de células dendríticas por estos parásitos (McDowell, M.A. et al., 2002). Células dendríticas infectadas con *L. amazonensis* opsonizadas producen una rápida maduración, en contraste con células infectadas con los mismos parásitos no opsonizados, donde la falta de maduración evita la respuesta Th1 (Prina, E. et al., 2004). Otros estudios presentan al LPG expresado por la forma promastigote de *L. mexicana* como responsable de la maduración observada en células dendríticas de ratón (Aebischer, T. et al., 2005). Las distintas especies de parásitos usadas en los estudios y el modo de obtención de los parásitos son las explicaciones más probables de esta variabilidad de resultados. *L. infantum* no produce maduración tras infectar a células dendríticas derivadas de monocitos (Caparrós E. et al., 2005). La falta de maduración unida a la inhibición de migración que se produce tras la infección con algunas especies de *Leishmania*, se propone como mecanismos de evasión del parásito (Brandonisio, O. et al., 2004).

Las Leishmanias poseen una enorme capacidad de resistencia a ambientes hidrolíticos que se encuentran tanto en el insecto como en el mamífero. Pueden inactivar mecanismos de defensa innata, como la actividad del complemento (Spath, G.F. et al., 2003), a radicales de oxígeno (Chan, J. et al., 1989) e inhibe la fusión de los fagolisosomas (Desjardins, M. et al., 1997). Esa resistencia se la da la densa superficie de glicolípidos que posee en su cubierta, entre ellos destacan el Lipofosfoglicano (LPG) y otros glicoinisitolfosfolípidos (GIPLs). La forma amastigote no presenta o posee una expresión disminuida de LPG ((McConville, M.J. et al., 1991);(Bahr, V. et al., 1993)) siendo dominante la expresión de GIPLs (Winter, G. et al., 1994). El LPG está formado por cuatro dominios: un dominio de fosfatidilinositol de anclaje a la membrana, un dominio de heptasacáridos, repeticiones de fosfodisacáridos y una cubierta neutral de galactosas y manosas. Diferencias entre especies se encuentran en cambios de azúcares en el dominio de repeticiones de fosfodisacáridos y en la cubierta de glúcidos (McConville, M.J. et al., 1993) (Figura 20).

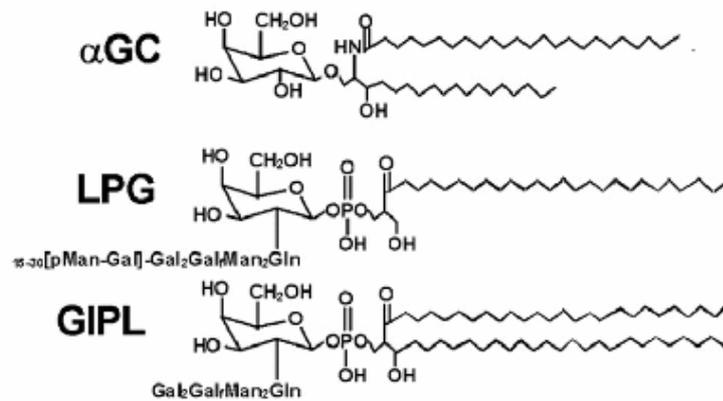


Figura 20.- Semejanza estructural entre α GalCer presentada por CD1d y los glicolípidos presentes en la cubierta de Leishmanias (LPG y GIPLs). Adaptada de (Amprey, J.L. et al., 2004).

Las moléculas del sistema CD1 se caracterizan por su capacidad de presentar glicolípidos, pudiendo actuar en la respuesta inmune frente a estos patógenos intracelulares que poseen multitud de glicolípidos en la cubierta. En estudios con células dendríticas inmaduras humanas infectadas con la forma promastigote de *L. donovani*, se observa una disminución de expresión de moléculas CD1 del grupo I, encontrándose bloqueada la presentación lipídica (Amprey, J.L. et al., 2004). No es el primer mecanismo de evasión descrito para parásitos intracelulares, en infecciones por *Mycobacterium* y *Leishmania* se han descrito disminución de moléculas presentadoras de antígenos ((Reiner, N.E. et al., 1988);(Stenger, S. et al., 1998)), degradación de moléculas presentadoras de antígenos por infecciones con la forma amastigote de *L. amazonensis* y *L. mexicana* (Antoine, J.C. et al., 1999), e interferencia con la presentación antigénica en la infección por el promastigote de *L. major* (Fruth, U. et al., 1993).

El LPG y otros glicosilinositol fosfolípidos de *L. donovani* se presentan como candidatos para unirse con CD1d. Pueden estimular una población de linfocitos T naive de hígado restringidos por CD1d para producir IFN- γ y actuarían en la respuesta temprana frente a infección visceral por *Leishmania* en ratón (Amprey, J.L. et al., 2004). También se ha descrito la importancia de células NKT en la respuesta temprana en infecciones de ratón por *L. major* (Ishikawa, H. et al., 2000).

OBJETIVOS

OBJETIVOS.

El sistema CD1 forma parte de las moléculas MHC de clase Id y constituye una tercera familia de moléculas presentadoras de antígeno. Se diferencian de las moléculas MHC de clase I y II en su limitado polimorfismo y en la naturaleza lipídica de los antígenos que presenta. Existen dos grupos diferenciados según la similitud de la secuencia y la expresión tisular. Las moléculas del grupo I (CD1a, -b y -c) inhiben la actividad citolítica de células NKs humanas. También las moléculas CD1d1 de ratón (ortólogas a las moléculas humanas CD1 del grupo II), inhiben la actividad citolítica de células con actividad NK. La interacción de CD1d en humanos con células NK no ha sido descrita hasta ahora.

Las células NK establecen un amplio rango de interacciones funcionales con las células dendríticas, entre ellas la capacidad de lisar las células dendríticas inmaduras, sin embargo, cuando éstas reciben estímulos para madurar se hacen resistente a la citólisis mediada por NKs.

Algunos patógenos intracelulares son capaces de subvertir la activación de las células dendríticas que infectan. Por ejemplo, algunas especies de parásitos del género *Leishmania* son capaces de inhibir la maduración de las células dendríticas que infectan. Además *L. donovani* inhibe la expresión de moléculas CD1-a, -b y -c.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de la expresión de CD1d sobre la actividad citolítica de células NKs humanas. Para ello se utilizó un modelo en el que CD1d es expresado en células diana deficientes de HLA de clase I.
 - a. El efecto de α y β -GalCer, ligandos de CD1d, en la inhibición de la actividad citolítica NK.
2. Desarrollar un modelo de infección de células dendríticas *in vitro* con *Leishmania infantum*. Se pretende estudiar:
 - a. Variaciones en la expresión de marcadores de maduración de células dendríticas, especialmente CD1.
 - b. Actividad citolítica de células NK frente a células dendríticas infectadas con *L. infantum*.
 - c. Estudio de la actividad citolítica y producción de citocinas de células NKT frente a células dendríticas infectadas con *L. infantum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.-ACTIVIDAD CITOLÍTICA DE CÉLULAS NK FRENTE A CÉLULAS QUE EXPRESAN CD1d HUMANO.

1.1.-Clonaje del cDNA de CD1D en el vector de expresión pSRαNeo:

ARN total. Células epiteliales Caco-2 (de 5 a 10 millones) fueron lisadas con un volumen del reactivo *ULTRASPEC™ RNA* (Biotecx Laboratories, Inc.) a 4°C x 5min para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. A continuación la incubación a 4°C x 5min con 0'2 volúmenes de cloroformo (triclorometano) separó en una fase orgánica a las proteínas y el ADN y en una fase acuosa al ARN. Tras una centrifugación a 12.000g 15min x 4°C la fase acuosa se recuperó y el ARN total de la célula se precipitó con un volumen de isopropanol a 4°C x 10min. El ARN precipitado se lavó varias veces con un volumen de etanol 75% (en agua con 0'1% DEPC, dietil-pirocarbonato) a 4°C. Tras la última centrifugación a 7.000g x 5min 4°C el ARN se secó al vacío 10 min y luego se resuspendió en 50µl de agua con DEPC 0'1%.

Síntesis de cDNA por RT-PCR. El cDNA fue sintetizado a partir de 1µg de RNA total utilizando el *1st Strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR* (Boehringer Mannheim, Roche Diagnostics). Para obtener el cDNA correspondiente al total de la célula se mezclaron en un volumen de 20µl: tampón de reacción 1x, 5mM MgCl₂, 1mM dNTPs, 50 unidades de inhibidor de RNAsa (Roche y Takara Shuzo Co.Ltd), 1'6µg cebador-p(dT)₁₅, 20 unidades de AMV *reverse transcriptase* y 1µg de ARN total.

Amplificación del cDNA de CD1D. En un volumen final de 100µl se mezclaron tampón de reacción 1x, 1µM cebador-5', 1µM cebador-3', 200 µM dNTPs (Boehringer Mannheim-Roche), 2mM MgCl₂, 20µl de cDNA y 4U de Taq-polimerasa (AMED-Biomaster). Los cebadores empleados hibridan con la región 5'UT y 3'UT de la secuencia de cDNA de CD1D y se les adicionaron a sus extremos 5' dianas de enzimas de restricción: Sal I en el cebador-5' y Hind III en el cebador-3' (Tabla 2). La amplificación se realizó en el termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE con bromuro de etidio y visualizados con luz UV en un transiluminador Gel-Doc 2000 (BioRad).

		SECUENCIA 5'►3'	T _m
Cebador 5'	CD1D UP	GGGCG▼TCGACAGAAGAGTGCGCAGGTCAGAG Sal I	83.5° C
Cebador 3'	CD1D DOWN	CCGCAAGCT▼TGAAGTCTTGGGAACCTGAGGTC Hind III	80.2 °C

Tabla 2.-Secuencia, longitud y temperatura de Melting de los cebadores utilizados para amplificar el cDNA completo de CD1D. El cebador CD1DUP llevaba la diana para Sal I y el cebador CD1D Down la diana para Hind III. Ambas dianas aparecen subrayadas y se marca la zona de corte con ▼.

El cDNA completo de CD1D se clonó en el vector de expresión pSRαNeo entre las dianas XhoI y Hind III (**Figura 21**). Bacterias competentes *E. coli* cepa XL1-Blue fueron transformadas con el vector pSRαNeo nativo y el vector pSRαNeo portando el cDNA de CD1D para obtener grandes cantidades de ambos plásmidos, los cuales una vez purificados por el sistema *QIAGEN Plasmid Midi* o *Maxi Kit* (QIAGEN) se utilizaron para transfectar células de la línea LCL 721.221.

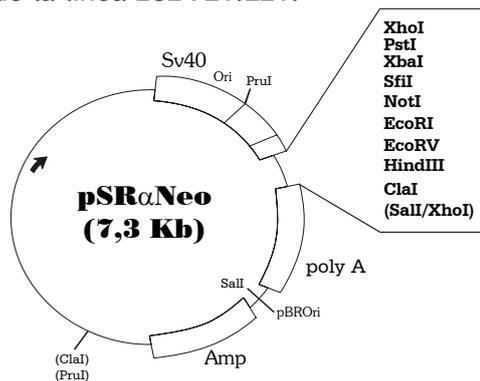


Figura 21.- Mapa circular y mapa de restricción del sitio de clonaje del vector de expresión pSRαNeo

1.2.-Transfección de la línea LCL 721.221 con CD1D:

Línea LCL.721.221. La línea LCL 721.221 (ATCC CRL 1855) es una línea de linfocitos B aislados de una mujer caucásica sana e inmortalizados con el virus de Epstein-Barr. Esta línea linfoblastoide no expresa ni HLA-A, ni HLA-B, ni HLA-C debido a una delección parcial del complejo MHC inducida por irradiación con rayos γ . Esta línea expresa DPw2, DQw1, DR1 y niveles normales de β_2m (Shimizu, Y. et al., 1989). Fue cultivada en RPMI-1640, 1% antibiótico/antimicótico (GibcoBRL) y 10% de suero de ternera fetal (Harlan Sera-Lab) y bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C, 5% CO₂).

Transfección de la línea LCL 721.221. La línea LCL 721.221 fue transfectada con el vector pSR α Neo nativo y con el vector pSR α Neo portando el cDNA de CD1D humano. Tras varios lavados, diez millones de células se resuspendieron a 4°C en 800 μ l de tampón de electroporación (20mM HEPES, 5mM Dextrosa, 130mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HPO₄ pH:7.2) y se le adicionaron 40 μ g del ADN plasmídico. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación de 0.4cm de ancho (Gene Pulser[®] Cuvette, BioRad) y se electroporó en un electroporador Gene Pulser[®] II (BioRad) con las siguientes condiciones: resistencia infinita, 250 mvoltios y 950 μ F de capacitancia. A continuación se realizaron varios lavados en RPMI o PBS para eliminar los restos de membranas y células muertas. Las células se crecieron inicialmente en el medio de cultivo sin antibiótico de selección durante una semana, posteriormente se adiciona el antibiótico, G418 o geneticina (Gibco) para células eucariotas a concentraciones crecientes hasta 1.5mg/ml.

Selección celular con microesferas magnéticas. Las células con mayor nivel de expresión de CD1d se seleccionaron con un anticuerpo específico para CD1d humano, 51.1.3 (IgG2b) (cedido por el Dr. Porcelli), y microesferas magnéticas (Dynabeads M-450, Dynal). Para ello se emplearon 5x10⁶ de células, se lavaron en medio de cultivo RPMI-1640 a 4°C y se ajustaron a 1x10⁶ células/ml. A continuación se incubaron con el anticuerpo 51.1.3 durante 1 h, con agitación orbital y a 4°C. Tras varios lavados para eliminar el anticuerpo no unido a las células, se añadió el anticuerpo anti-IgG unido a microesferas magnéticas. Se incubó durante otra hora a 4°C con agitación orbital. Aquellas células que estaban unidas al anticuerpo unido a microesferas magnéticas se retuvieron en los siguientes lavados con el uso de un imán.

1.3.-Cultivo de Células con actividad NK:

Obtención y cultivo de PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Las PBMCs fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de densidad (*Lymphoprep*, Amersham Biosciences), a partir de sangre y de *Buffy coats* de donantes sanos (Obtenidos del Banco de Sangre de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid y del Centro de Trasfusiones de la Comunidad de Madrid). Las células fueron mantenidas durante 24-72 horas en medio de cultivo RPMI-1640, 1% antibiótico/antimicótico y 10% de suero de ternera fetal con 800U rhIL-2 (cedido por Hoffman-LaRoche y Dr Craig W Reynolds) previo al ensayo de citotoxicidad.

Selección y cultivo de células NK (CD56⁺CD3⁻). Células NK CD56⁺CD3⁻ fueron aisladas de PBMCs de *Buffy coats* de donantes sanos usando el *NK cell Isolation*

Kit II human (Miltenyi Biotec). Las PBMCs fueron incubadas con un cóctel de anticuerpos conjugados a biotina (CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD123 y glicoforina A). Se añadieron 10 μ l de cóctel por cada 1x10⁷ millones de células y se incubaron 10 minutos a 4°C, en PBS. Posteriormente, 20 μ l de anticuerpo anti-Biotina unido a esferas magnéticas fueron añadidos por cada 1x10⁷ millones de células. Después de varios lavados las células pasaron por una columna LS unida a imán (Miltenyi Biotec), sólo las células CD56⁺CD3⁻ eluyeron por la columna. Una posterior eliminación de células CD3⁺ fue necesaria en algunos casos para una mayor pureza de células CD56⁺CD3⁻. Las células que eluyeron del imán fueron incubadas con anti-CD3 Leu4-PE humano (Becton Dickinson), 10 μ l de anticuerpo por cada 1x10⁷ millones de células, durante 10 min a 4°C y en PBS. Posteriormente 20 μ l de anti-PE unido a esferas magnéticas fue añadido a la concentración indicada de células. Las células volvieron a pasar por una columna MS unida a imán (Miltenyi Biotec). Todas aquellas células CD3⁻ eluyeron del imán obteniéndose en todos los casos una población de más del 95% de células NK CD56⁺CD3⁻, como se pudo comprobar en estudios de citometría (Epics Elite, Coulter). Las células fueron mantenidas en medio de cultivo en medio de cultivo RPMI-1640, 1% antibiótico/antimicótico y 10% de suero de ternera fetal, enriquecido con 50U/ml rhIL-2, hasta su uso en ensayos de citotoxicidad.

Cultivo de líneas celulares con actividad NK. La línea celular NKL (cedida por el Dr. López-Botet) procedente de un paciente con leucemia granular linfocítica (LGL) CD3⁻CD16⁺CD56⁺ y dependiente de IL-2 para su cultivo *in vitro* (Robertson, M.J. et al., 1996). Fue cultivada con RPMI-1640, 1% antibiótico/antimicótico, 10% suero humano AB (Sigma-Aldrich) y 50U/ml rhIL-2.

Las líneas celulares de linfocitos T CD8⁺ inmortalizadas con *Herpesvirus saimiri* (HVS) con actividad NK (cedida por el Dr. Regueiro). La mayoría poseen actividad citolítica tipo NK frente a la línea celular K562, deficiente de HLA de clase I (Biesinger, B. et al., 1992). Fueron cultivadas en 50% RPMI-1640, 50% PanSerin 401 (PanTM Biotech GmbH), con 1% antibiótico/antimicótico, 10% suero de ternera fetal y activado con 40U/ml rhIL-2.

1.4.-Células NKT:

Expansión y cultivo de NKT. PBMCs fueron obtenidas por centrifugación en gradiente de *Lymphoprep*, fueron cultivadas en RPMI-1640, 1% antibiótico/antimicótico, 1mM Piruvato (GibcoBRL), 10% de suero de ternera fetal 50U/ml de rhIL-2 y α -Galactosilceramida (100ngr/ml) (cedida por Kirin). Las células se mantuvieron en placas de 24 pocillos a una concentración de 1x10⁶ millones de células/ml de medio de

cultivo bajo condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO₂) durante 15 días.

Selección de células iNKT (Vα24⁺Vβ11⁺). Las células NKT fueron seleccionadas positivamente por separación magnética (Miltenyi Biotec) con anticuerpos específicos Vα24-FITC y Vβ11-PE humanos (Beckman Coulter). Todas las células fueron incubadas con anti-Vβ11-PE (10μl/1x10⁷células) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-PE (20μl/1x10⁷ células) unido a bolas magnéticas (Miltenyi Biotec), 10 minutos a 4°C. Tras varios lavados las células pasaron a través de columnas MS (Miltenyi Biotec), quedando las células unidas a anticuerpo retenidas en la columna. Una vez separada la columna del imán, las células Vβ11⁺ retenidas fueron recuperadas diluidas en PBS. Se procedió a la eliminación de las esferas magnéticas unidas al anticuerpo anti-PE, para posteriormente separar las células Vα24⁺ de las Vβ11⁺ ya seleccionadas. Se añadió 10μl de *Multisort Release Reagent* por cada 1 ml de células en suspensión, incubando durante 10min a 4°C. Después de lavar varias veces las células fueron incubadas con 30μl de *Stop Reagent* durante 10min a 4°C. Las células Vβ11⁺ fueron esta vez marcadas con anti-Vα24-FITC, y se repitió el protocolo. Al final obtuvimos una población con más del 95% de células NKT Vα24⁺Vβ11⁺, como se comprobó por estudios de citometría.

1.5.-Anticuerpos, marcaje extracelular de citometría, producción de F(ab')₂ y bloqueo de moléculas de superficie:

Anticuerpos y sobrenadantes. Los anticuerpos anti-CD1d humano moAbs usados fueron: el 51.1.3 (ratón IgG_{2b}) (Cedido por el Dr. Porcelli), y el CD1d42 (Ratón IgG₁, k) (BD PharMingen™). Otros anticuerpos usados fueron los sobrenadantes de OKT6 anti-CD1a (ratón IgG₁) y MB40.3 anti-HLA-B48 (ratón IgG₁), procedentes de ATCC. Anti-CD3 Leu4-Pe (Becton Dickinson), anti- Vα24-FITC y anti-Vβ11-PE (Beckman Coulter), anti-CD56-PE (Miltenyi Biotec). Como anticuerpos secundarios se usaron anticuerpos policlonales de cabra anti-IgG de ratón (H+L) (Caltag) unidos a PE o FITC y anticuerpo secundario anti-Kappa-PE (Becton Dickinson). Finalmente tetrámeros CD1d-Fc/ PA-A488 (cedidos por la Dra. J.Gumperz) también fueron usados en citometría.

Marcaje extracelular de citometría. 20x10⁴-30x10⁴ células fueron usadas en cada marcaje. Las células en cultivo fueron lavadas en PBS, dejándolas en un volumen final de 50μl, al que se añadió 1μgr de anticuerpo purificado. En marcajes con sobrenadantes de anticuerpos, las células fueron resuspendidas directamente en 50μl de éste. Se incubaron durante 30min a 4°C. Después de varios lavados, en el caso de que el anticuerpo estuviera marcado directamente, se resuspendió en 400μl de PBS. En

caso contrario, las células fueron resuspendidas en 40 μ l de PBS + 1 μ l de anticuerpo secundario, e incubadas 30 min a 4°C y en oscuridad. Las células se resuspendieron en PBS después de varios lavados. Tanto en el marcaje directo o indirecto, se procedió a su análisis por el citómetro (Epics Elite, Coulter).

Producción de fragmento F(ab')₂. Los F(ab')₂ de CD1d42 y MB40.3 fueron generados usando el kit *Immunopure Fab y F(ab')₂*, de Pierce. Los anticuerpos fluyeron a través de una columna que contiene la enzima Ficina, que durante 20 horas cortó los anticuerpos incubando a 37°C. El F(ab')₂ fue separado del fragmento Fc al fluir el resultado de la digestión por una columna de proteína A. Los fragmentos F(ab')₂ fueron concentrados usando un Centricon YM-10 (Millipore) y disueltos en PBS. La concentración de F(ab')₂ generada se midió por el método colorimétrico de Bio-Rad DC, basado en el de Lowry. La recta patrón fue elaborada con un anticuerpo de concentración conocida, se midió la absorbancia a 750nm y se interpoló la absorbancia de nuestro purificado. Para comprobar la correcta fragmentación los anticuerpos fueron chequeados en un gel SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras (DTT y β -Mercaptoetanol). Las líneas celulares CD1d.221 y HLA-B48.221 fueron marcadas con dichos anticuerpos, seguido de un anticuerpo secundario anti-Kappa-PE, para comprobar que los fragmentos reconocían las moléculas.

Bloqueo de moléculas de superficie con F(ab')₂. Las células dianas fueron incubadas con 4 μ g/ml de anticuerpo específico F(ab')₂ CD1d42 y MB40.3, durante 30 min a temperatura ambiente y previo al ensayo de citotoxicidad en RPMI 1640 1% suero de ternera fetal.

1.6.-Ensayos de citotoxicidad:

Ensayo estándar de ⁵¹Cr y Kit no-radiactivo de detección de LDH (Lactato Deshidrogenasa) (Roche). En el ensayo estándar de ⁵¹Cr, las células diana fueron incubadas con 50 μ Ci de Cr radiactivo durante 1 hora a 37°C y 5% de CO₂, antes de enfrentarlas a las células efectoras. 5000 células diana por pocillo fueron cultivadas en placa de 96 pocillos con fondo en "V" con las células efectoras durante 4 horas. Diferentes ratios Efecto: Target (E: T) fueron empleados, todos ellos por triplicado. Los porcentajes de lisis específica fueron dados a partir de la cantidad de ⁵¹Cr o LDH liberada al medio durante la lisis. El ⁵¹Cr fue medido con un contador γ . La LDH es una enzima que rápidamente se libera ante un daño de la membrana celular, como es la lisis celular. El sobrenadante de los pocillos fue incubado con una mezcla de reacción procedente del kit de LDH, obteniéndose al final un producto coloreado (formazán)

(Figura 22). Un espectrofotómetro de placa (Microplate Autoreader Bio-Tek, Cultek) fue usado para medir la cantidad de formazán formado (Absorbancia a 490).

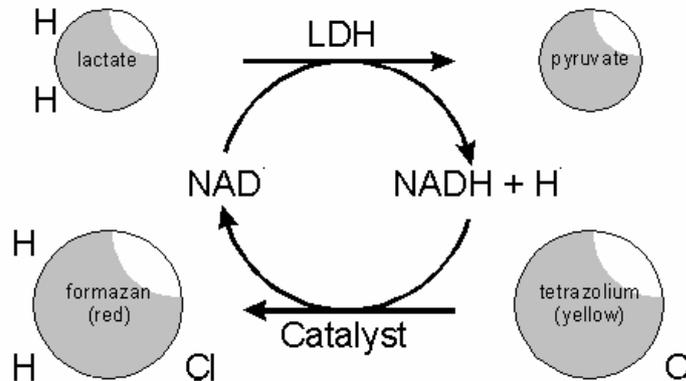


Figura 22.- Esquema representativo de reacción enzimática de LDH.

El porcentaje de lisis específica fue calculado teniendo en cuenta la Absorbancia a 490 (Abs_{490}) de la lisis mínima, máxima y la obtenida en cada ratio, siguiendo la formula:

$$\%Lisis = \frac{Ratio_{Abs\ 490nm} - Min_{Abs490nm}}{Max_{Abs490nm} - Min_{Abs490}}$$

1.7.-Análisis estadístico:

Los porcentajes de lisis fueron analizados con el test de Kolmogorov-Smirnoff y Chi-cuadrado, para determinar si pertenecían a una distribución Normal. Un test de ANOVA, fue usado para estudiar diferencias entre las varianzas de los valores de lisis. Los resultados fueron representados como la media de los valores de lisis \pm error estándar de la media (EEM). Statgraphics y SPSS fueron los programas informáticos utilizados en la elaboración de la estadística.

2.-EFECTO DE LOS LIGANDS DE CD1d α Y β -GALCER.

2.1.- Cultivo de células dianas con antígenos glicolipídicos.

Las células diana Mock.221 y CD1d.221 fueron cultivadas 12 horas antes del ensayo de citotoxicidad con diferentes antígenos glicolipídicos. $3,5 \times 10^5$ células fueron cultivadas en un volumen final de 500 μ l, con 100ngr/ml de dichos antígenos. P-20 y DMSO fueron usados como tratamiento control de nuestras células dianas.

Antígenos CD1d específico	α - Galactosilceramida disuelta en P-20 (Kirin)
	α - Galactosilceramida disuelta en DMSO (cedido por el Dr.Savage)
	β - Galactosilceramida sintética C12 (Avanti Polar Lipids), disuelta en DMSO
	β - Galactosilceramida de cerebro bovino (Sigma), disuelta en DMSO
Antígenos CD1 específicos	Ácido micólico procedente de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Cepa humana) (Sigma), disuelto en DMSO.

Tabla 3.- Antígenos CD1 específicos utilizados.

2.2.- Análisis estadístico.

Para analizar el efecto de los ligandos de CD1 frente a la actividad lítica de células con actividad NK, se calculó el porcentaje de inhibición de la lisis, que viene dado como la diferencia entre el % de lisis de las células Mock.221 y CD1d.221, CD1a.221 o HLA-B48.221, para cada tratamiento (Sin tratamiento, con antígeno y solvente control). El análisis estadístico seguido con los % de inhibición de lisis fueron los mismo que anteriormente se han explicado (Sección 1, apartado 7).

3.-DESARROLLO DE UN MODELO DE INFECCIÓN *in vitro* DE CÉLULAS DENDRÍTICAS POR *Leishmania infantum*. ACTIVIDAD CITOLÍTICA NK Y iNKT. iNKT PRODUCTORAS CITOCINAS.

3.1.- Selección de monocitos y cultivo de células dendríticas.

Selección de monocitos. Las muestras fueron obtenidas a partir de PBMCs separadas por centrifugación en gradiente de *Lymphoprep*, a partir de *Buffy coats* de donantes sanos (Banco de Sangre de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid y del Centro de Trasfusiones de la Comunidad de Madrid). Los monocitos fueron seleccionados por: 1) **adhesión a plástico**, PBMCs fueron mantenidas durante dos horas a una concentración de $3,5 \times 10^6$ células/ml, en frascos de cultivo a 37°C y con 5% CO₂. Las células en

suspensión fueron retiradas tras varios lavados con RPMI-1640, de modo que los monocitos quedaron pegados a la superficie del frasco. 2) **selección de células CD14 positivas**, PBMCs fueron incubadas con un anticuerpo anti-CD14 unido a bolas magnéticas (Miltenyi biotech) a una concentración de 20 μ l de anticuerpo por cada 1×10^7 células. Después de una incubación de 10 minutos las células se resuspendieron en 500 μ l y fueron pasadas por una columna magnética.

Cultivo de células dendríticas. Los monocitos pegados a sustrato fueron mantenidos durante 5 días en medio de cultivo RPMI-1640, 1% antibiótico/antimicótico y 10% de suero de ternera fetal y bajo condiciones estándar de cultivo celular (37°C, 5% CO₂). Las células dendríticas fueron suplementadas con 800U de GM-CSF y 600U IL-4. Para obtener células dendríticas maduras las células dendríticas inmaduras fueron incubadas después de esos 5 días con 10 μ g/ml de LPS (Lipopolisacarido de *Escherichia coli* liofilizado) durante 2 días.

3.2.-Infección de células dendríticas. Tratamiento con extractos antigénicos o Lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania donovani*.

Infección de células dendríticas con *Leishmania infantum*. Las formas amastigote y promastigote de *Leishmania* infectan a las células dendríticas mantenidas en cultivo durante 5 días con GM-CSF e IL-4. A un ratio de 5:1 (Parasito: dendrítica) fueron cultivadas durante 48 horas previo a los ensayos de citotoxicidad y de producción de citocinas.

Para comprobar la infección de células dendríticas con amastigote y promastigote de *Leishmania infantum*, las células dendríticas fueron infectadas con parásitos marcados con CFSE (Carboxifluorescein diacetato succinimidil éster) (Molecular Probes) 10 μ g/ml durante 10 minutos. Después de dos días, fueron analizados por citometría de flujo.

Las células dendríticas fueron cultivadas con Rosiglitazona (RSG) a una concentración de 2,5 μ M y 5 μ M de antagonista de RSG (GW9662) durante 5 días. Las células infectadas con amastigote o promastigote también fueron tratadas a la vez con antagonista después de 5 días de cultivo para la diferenciación de iDCs.

Tratamiento de células dendríticas con extractos antigénicos de *L. infantum* o LPG de *L. donovani*. Las células dendríticas fueron cultivadas durante dos días con extractos antigénicos de amastigote y promastigote, a una concentración de 5 μ g/ml o 1 μ g/ml de LPG. Previo al uso de las células en citotoxicidad o en estimulación de células NKT para producción de citocinas.

3.3.- Cultivo células NK y NKT autólogas.

Células NK autólogas. Fueron obtenidas partiendo de aquellas células que o bien no fueron pegadas a sustrato o bien no quedaron retenidas en la columna de selección de células CD14⁺. Durante varios días fueron cultivados en RPMI-1640, 1% antibiótico/antimicótico y 10% de suero de ternera fetal, con 800U rh-IL-2. Las células CD56⁺CD3⁻ fueron seleccionadas con el Kit II de selección de NK humanas (Sección 1, apartado 3).

Células NKT autólogas. PBMCs de algunos donantes fueron separadas en dos partes, en una primera, las células fueron usadas para expandir NKT (Sección 1, apartado 4). Y la otra parte fue congelada en Nitrógeno líquido. Días antes de seleccionar las células iNKT (V α 24⁺/ β 11⁺) (Sección 1, apartado 4), las PBMCs fueron descongeladas, seleccionándose las células CD14⁺, siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

3.4.-Anticuerpos, sobrenadantes y purificación de anticuerpos. Marcaje extracelular de citometría, producción de F(ab')₂ y bloqueo de moléculas de superficie:

Anticuerpos. Además de los anticuerpos ya indicados (sección 1, apartado 5), otros anticuerpos usados, fueron: anti-CD40 humano (Ratón IgG₁) (BD PharMingenTM); 3D12 (anti-HLA-E humano, ratón IgG₁) (cedido por el Dr. Gereghy); anti-CD86 humano-PE (BD PharMingenTM); anti-CD80 humano-PE (BD PharMingenTM) y anti-HLA-DR-PE (BD PharMingenTM). La proteína de fusión NKp30-Ig (cedido por el Dr. Mandelboim). Anticuerpo secundario de cabra anti-Ig humana total unido a FITC (Kallestad).

Sobrenadantes y purificación de anticuerpos. El sobrenadante del anticuerpo monoclonal anti-CD94, HP3D9 (IgG₁) (cedido por el Dr. López -Botet), fue purificado a través de una columna de afinidad de proteína A (Bio-Rad Laboratories). El sobrenadante fue diluido en un tampón de pH básico (pH=9), y aplicado sobre la columna de proteína A. Después de lavar la columna con tampón básico, el anticuerpo pegado a la proteína A por el fragmento Fc fue eluido con búfer ácido (pH=3). Y recogido sobre un volumen de Tris HCl pH=9. El eluido fue dializado en PBS durante dos días. El anticuerpo dializado fue concentrado usando un Centricon YM-10 (Millipore). La concentración final de anticuerpo purificado fue calculada usando la relación:

$$\text{mg/ml anticuerpo} = A_{280} \times 0.74 \times \text{factor de dilución}$$

Conjugación de Fluoresceína a W6/32 (anti-HLA-I). W6/32 anticuerpo anti-HLA I (ratón IgG_{2a}) purificado previamente en nuestro laboratorio, fue unido a FITC siguiendo el protocolo descrito en Current Protocols de unión de FITC a anticuerpo. El anticuerpo fue dializado durante dos días en 500ml de tampón de marcaje FITC (0.05M Ácido bórico, 0.2M NaCl y pH 9.2) a 4°C. La concentración de anticuerpo fue calculada midiendo la absorbancia a 280 nm y usando la relación:

$$\text{mg/ml} = A_{280} \times 0.74 \times \text{factor de dilución}$$

1mg de anticuerpo fue incubado durante dos horas a temperatura ambiente con 20µl de una concentración de FITC 5mg/ml diluido previamente en DMSO. Para eliminar el FITC no unido a anticuerpo se procedió a una segunda diálisis esta vez con 500ml de tampón de diálisis (0.1M TrisHCl, pH 7.4; 0.1% NaN₃; 0.2M NaCl, ajustando todo el tampón a un pH 7.4) a 4°C.

Producción de fragmento F (ab')₂. El F (ab')₂ de W6/32 fue generado siguiendo el protocolo descrito en el Current Protocols de digestión con Pepsina (Sigma-Aldrich). 1.5 mg de anticuerpo fue diluido durante 4 horas a 4°C, en buffer acetato pH 4. Se calculó la concentración de IgG midiendo la absorbancia a 280, calculando la concentración según el coeficiente de extinción correspondiente a IgG_{2a}:

$$\text{mg/ml} = A_{280} \times 1.43 \times \text{factor de dilución}$$

Previo a la fragmentación a gran escala del anticuerpo dializado, se procedió a determinar el tiempo de incubación de mayor eficacia de actividad de la pepsina. Una vez elegido el tiempo de incubación, se añadió 0.1mg/ml de pepsina disuelta en tampón acetato a pH 4, a 1mg de anticuerpo. Después de 8 horas de incubación se paró la reacción añadiendo 50µl de Tris base 2M por cada ml de reacción. El F (ab')₂ fue separado del fragmento Fc al fluir el resultado de la digestión por una columna de proteína A. Los fragmentos fueron concentrados usando un Centricon YM-10 (Millipore) y disolviéndolo en PBS. La concentración de F(ab')₂ generada se midió por el método colorimétrico de Bio-Rad DC, basado en el de Lowry. La recta patrón fue elaborada con un anticuerpo de concentración conocida, midiéndose la absorbancia a 750nm, e interpolando la absorbancia de nuestro purificado. Para comprobar la correcta fragmentación, los anticuerpos fueron chequeados en un gel SDS-PAGE al 10%, bajo condiciones reductoras.

Los F(ab')₂ del anticuerpo monoclonal CD1d42 (anti-CD1d humano), 3D12 (anti HLA-E humano) y MB40.3 (anti-HLA-B48), éste último usado como control, fueron

generados por digestiones con Ficina (Sección 1 apartado 5).

Bloqueo de moléculas de superficie con F(ab')₂. Las células dendríticas infectadas con amastigote y promastigote de *Leishmania infantum*, y células dendríticas maduras, fueron bloqueadas con los F(ab')₂ de los anticuerpo W6/32 (anti-HLA-I), CD1d42 (anti-CD1d humano), 3D12 (anti-HLA-E) y MB40.3 (anti-HLA-B48 humano) previo al ensayo de citotoxicidad. Las células NK autólogas CD56⁺ CD3⁻ también fueron bloqueadas con el anticuerpo monoclonal HP3D9 (anti-CD94 humano) (Sección 1 apartado 5).

Bloqueo de enlace Gal α1-3 Gal con lectina IB4. Las células dendríticas infectadas con amastigote o promastigote, cultivadas con extractos antigénicos de *Leishmania infantum* o con LPG de *Leishmania donovani* fueron incubadas durante 15 minutos en PBS con 0.1mM de CaCl₂ y 1µg/ml de IB4 (*Fluorescein bandeiraea* (Griffonia) Simplicifolia Lectin I (Isolectin B4) (Vector Laboratories), previo al ensayo de citotoxicidad o al estudio de producción de citocinas de células NKT.

3.5.-Citotoxicidad.

Las células dendríticas inmaduras, infectadas con *L. infantum* y dendríticas maduras fueron enfrentadas a células NK CD56⁺ CD3⁻ autólogas. Las células dendríticas cultivadas con extractos antigénicos de *L. infantum* y con LPG de *L. donovani* fueron a su vez enfrentadas a células NKT autólogas seleccionadas previamente (Vα24⁺ Vβ11⁺). Ensayos de citotoxicidad no radiactivos de liberación de LDH fueron realizados en todos estos estudios (Sección 1, apartado 6).

3.6.-Producción de citocinas.

Las células NKT (Vα24⁺ Vβ11⁺) seleccionadas previamente, fueron estimuladas durante 8 horas a 37°C y 5% CO₂, con células dendríticas inmaduras en una proporción de 1:5 (Células dendríticas: células NKTs), infectadas con las formas amastigote y promastigote o cultivadas con extractos antigénicos de *L. infantum*. También fueron tratadas con LPG de *L. donovani*. Después de la incubación se midió el porcentaje de células NKT productoras de IFN-γ e IL-4. Para ello, se utilizó el kit de detección de citocinas humanas (Miltenyi Biotec). Las células NKT productoras después de la estimulación, fueron incubadas con un doble anticuerpo anti-CD3 por un lado y anti-IFN-γ o IL-4 por otro, durante 45 minutos a 37°C. Las citocinas fueron secretadas en ese tiempo y retenidas por el anticuerpo anti-citocina pegado a la célula. Las células

secretoras de citocinas fueron marcadas con otro anticuerpo anti-citocina marcado con PE. El porcentaje de células NKT productoras se analizó por citometría de flujo.

3.7.-Marcaje de células NKT con dímeros de CD1d unidos a ligando.

Las células NKT fueron marcadas con dímeros de CD1d cargados con α -GalCer o con LPG y analizadas por citometría de flujo. 4 μ g de dímeros de CD1d (BD Pharmingen) fueron incubados con 0.55 μ g de α -GalCer o LPG, en PBS pH=7, durante 12 horas a 37°C. 1x10⁶ de células NKTs fueron incubados durante 10 min en PBS 1% suero humano AB, a 4°C. 2 μ g de dímero cargado con antígeno fue añadido a la suspensión de células NKT en PBS 1% suero AB. Después de 1 hora de incubación a 4°C, las células se lavaron e incubaron de nuevo durante 10 minutos en PBS con 1% suero AB. Las células se volvieron a incubar con 2 μ g de anticuerpo secundario FITC (anti-IgG de ratón) durante 30 minutos a 4°C. Tras lavar las células fueron resuspendidas en 400 μ l de PBS y se analizaron por citometría.

Los estudios de desplazamiento antigénico se realizaron incubando los dímeros ya unidos a α -GalCer o a LPG, con una concentración 3 ó 10 veces superior de LPG o α -GalCer, respectivamente, durante 12 horas a 37°C.

3.8.-Análisis estadístico.

Se analizaron las medias \pm desviación estándar (DEM) de los valores obtenidos de los estudios de marcadores de superficie (CD1a, CD1d, HLA-I, HLA-DR, CD86, HLA-E...), tanto como en los porcentajes de células positivas, como en los MFI (*Mean Fluorescence Intensity*). Se calcularon la normalidad y ANOVA de dichos análisis.

Las diferencias en los porcentajes de lisis entre los distintos tratamientos fueron analizados también tanto en normalidad como con test ANOVA (Sección 1 apartado 7).

RESULTADOS

1.-ACTIVIDAD CITOLÍTICA DE CÉLULAS NK FRENTE A CÉLULAS QUE EXPRESAN CD1d HUMANO.

1.1.-Generación de células HLA clase I deficientes transfectadas con CD1d.

Con el objeto de estudiar el efecto que tiene la expresión de CD1d sobre la actividad citolítica de células NK, se usaron líneas celulares deficientes de HLA de clase I, con el fin de eliminar la señal inhibitoria que estas moléculas ejercen sobre las células NKs. La línea L721.221 fue transfectada con el plásmido pSR α Neo con o sin la región codificante para la molécula CD1d humana. También se utilizó la línea celular C1R transfectada igualmente con el plásmido pSR α Neo y la región para CD1d. En ambas líneas celulares fue necesario seleccionar aquellas células con mayor sobreexpresión de CD1d en la superficie celular. Para ello se realizó una selección con bolas magnéticas y un anticuerpo específico para CD1d (51.1.3). Los resultados de la selección magnética se comprobaron por citometría de flujo. Se generaron líneas controles (Mock.221 y C1R.Mock) con el plásmido pSR α Neo y líneas que sobreexpresaban la molécula deseada CD1d (CD1d.221 y C1R.CD1d) (Figura 23).

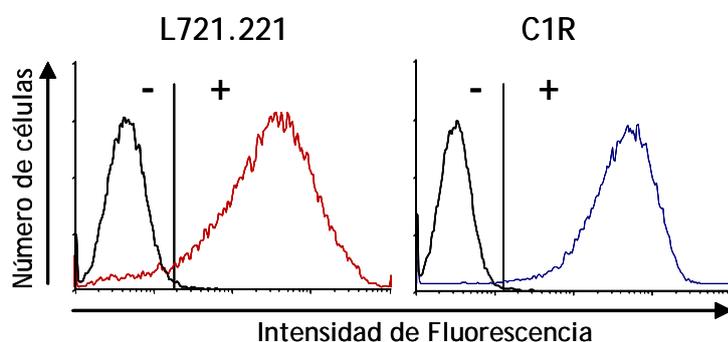


Figura 23.- Expresión de CD1d en las líneas celulares CD1d.221 (—) y C1R.CD1d (—). Y las líneas controles Mock.221 y C1R.Mock (—). El anticuerpo 51.1.3, específico para CD1d fue usado en el análisis de citometría.

1.2.- Estudio de la actividad citolítica NK frente a células diana que expresan CD1d.

Las células NK expresan receptores inhibidores en su superficie que reconocen algunas moléculas HLA de clase Ia (HLA-A, -B y -C) y Ib (HLA-E, -F y -G) al igual que HLA de clase Id como es el caso de moléculas del sistema CD1 (CD1a, b y c), e inhiben su actividad citolítica.

Para estudiar si las células NK también se inhiben al reconocer CD1d humano sobreexpresado en células diana deficientes de HLA de clase I, se enfrentaron ambos

tipos celulares en ensayos de citotoxicidad estándar de liberación de ^{51}Cr o de liberación de LDH (Lactato Deshidrogenasa).

Distintos tipos de células efectoras fueron usadas para estudiar el efecto de la expresión de CD1d. En un principio y en estudios preliminares se emplearon PBMCs frescas aisladas de donantes sanos. Éstas fueron enfrentadas, como control, a células diana que sobreexpresaban la molécula HLA de clase I B48 (HLA-B48.221) ó CD1a (CD1a.221), moléculas que inhiben la actividad citolítica NK, y frente a CD1d.221, objeto de nuestro estudio. Como control positivo de lisis, se usó la línea Mock.221 deficiente de clase HLA de clase I y de CD1 (Figura 24a). Los resultados mostraron una ligera inhibición de la lisis cuando las células diana expresaban CD1d, similar a la observada con las células diana HLA-B48.221 y CD1a.221, utilizadas como controles.

Teniendo en cuenta que esos resultados apoyaban la hipótesis inicial, se continuó con el estudio, utilizando PBMCs activadas con IL-2 durante 2-3 días (Figura 24b) y células NK $\text{CD56}^+\text{CD3}^-$ seleccionadas magnéticamente de PBMCs (Figura 24c), como células efectoras. Las células diana empleadas fueron las mismas que las usadas inicialmente: HLA-B48.221, CD1a.221, CD1d.221 y Mock.221.

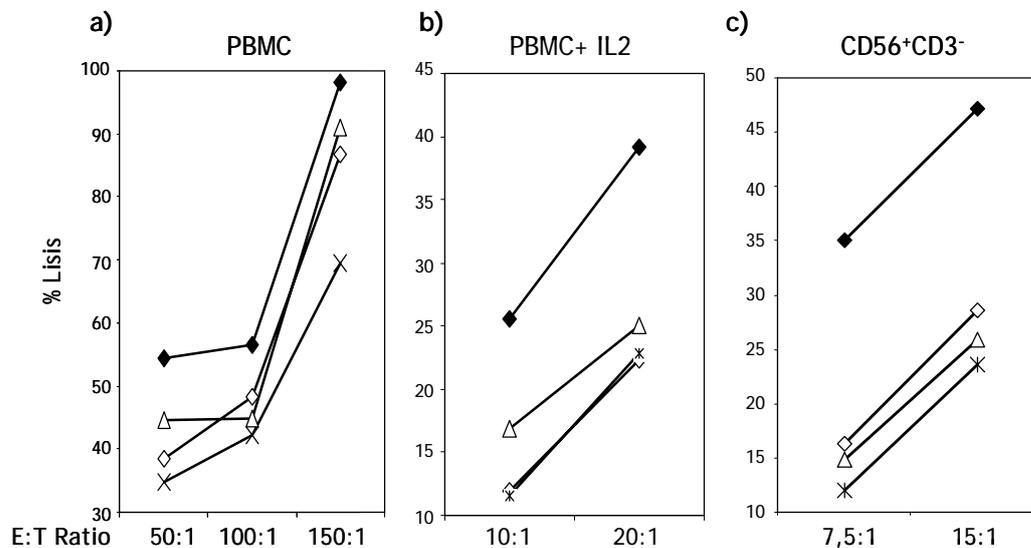


Figura 24.- a) Actividad citolítica de PBMCs frescas como células efectoras. b) PBMCs activadas con IL-2. c) células NK $\text{CD56}^+\text{CD3}^-$. Mock.221(◆). CD1d.221 (◇), HLA-B48.221 (Δ) y CD1a.221 (*).

Los resultados fueron semejantes a los obtenidos con PBMCs frescas aunque la inhibición fue mayor. La actividad citolítica disminuyó cuando las células diana expresan CD1d, HLA-B48 o CD1a en su superficie, comparando con la línea control. Con las células efectoras NKs $\text{CD56}^+\text{CD3}^-$ se observaron las mayores diferencias en porcentaje de lisis entre células diana control (Mock) y dianas con sobreexpresión de moléculas inhibitoras (CD1d, CD1a y HLA-B48).

Para apoyar los resultados que se observaron de inhibición de la actividad citolítica NK frente a la expresión de CD1d en la superficie de las células diana L721.221, se añadió otra línea celular diana a los estudios. La línea C1R también deficiente de HLA de clase I fue enfrentada a células NK $CD56^+CD3^-$ en ensayos de citotoxicidad. Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con la línea L721.221. Se redujo la actividad citolítica cuando CD1d estaba expresado en las células diana comparando con las líneas controles (Mock.221 y C1R.Mock). (Figura 25).

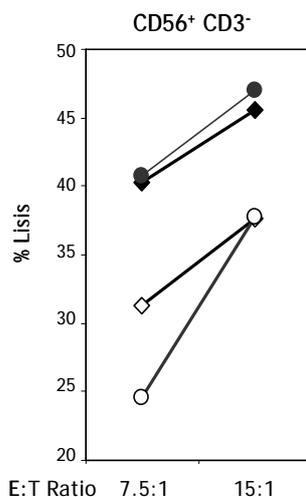


Figura 25.- La actividad citolítica de células NK $CD56^+CD3^-$. Células dianas controles Mock.221 (◆), C1R.Mock (●), CD1d.221 (◇) y CD1d.C1R (○).

No solo se emplearon dos líneas diferentes de células diana, también otros tipos de células efectoras con actividad NK fueron incluidos en los análisis. Se estudió la actividad de la línea policlonal humana NKL enfrentada a las células diana L721.221 transfectadas con CD1d, CD1a, HLA-B48 y control (Figura 26). El porcentaje de lisis fue menor con células diana que expresan CD1d, CD1a y HLA-B48, como ocurrió en los casos anteriores con células efectoras de donantes sanos.

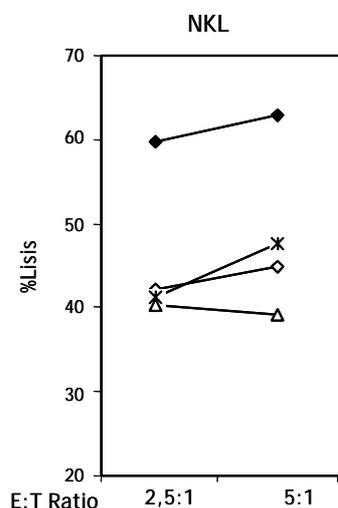


Figura 26.- Actividad citolítica de células NKL frente a células diana; CD1d.221 (◇), CD1a.221 (*), HLA-B48.221 (Δ) y Mock.221 (◆).

También se inhibió la actividad lítica de la línea NKL cuando CD1d estaba expresado en la línea C1R teniendo en cuenta el control C1R.Mock (Figura 27).

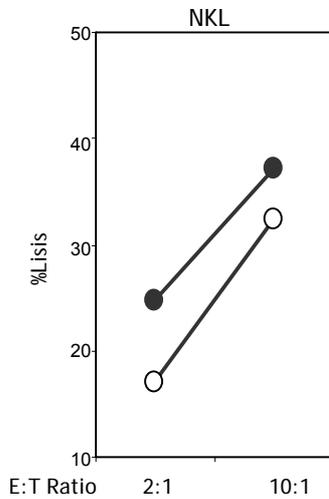


Figura 27.- Diferencias en el porcentaje de lisis de células NKL entre células C1R.CD1d (O) y C1R.Mock (●).

Otro tipo celular con actividad citolítica NK son los linfocitos T humanos CD8⁺ transformados con *Herpesvirus Saimiri* (HVS), que pueden mostrar actividad citotóxica frente a la línea K562 (Biesinger, B. et al., 1992). Se estudió si también poseían actividad lítica frente a las líneas celulares diana L721.221 y C1R que se habían incluido en nuestro estudio. Varias líneas oligoclonales de linfocitos T infectadas con HVS fueron usadas en ensayos de citotoxicidad, como HVS-CTO, HVS-CJL y HVS-ANZ. Todas ellas fueron capaces de lisar la línea Mock.221 y se inhibieron frente a CD1d.221, como se observa en la Figura 28.

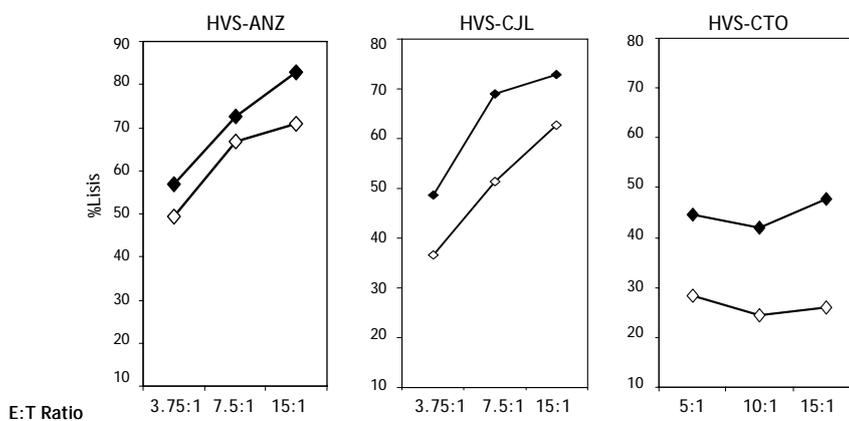


Figura 28.- Actividad citolítica de líneas de linfocitos T-HVS (HVS-ANZ, HVS-CJL y HVS-CTO) frente a dianas (CD1d.221 (◇) y control Mock.221 (◆).

De entre todas estas líneas HVS fue con la línea HVS-CTO con la que se obtuvieron diferencias más notables al comparar entre células diana control y dianas con expresión de CD1d y por esto fue elegida para posteriores estudios. Al enfrentarla a la línea celular diana C1R.CD1d se observó el mismo efecto inhibitorio (Figura 29).

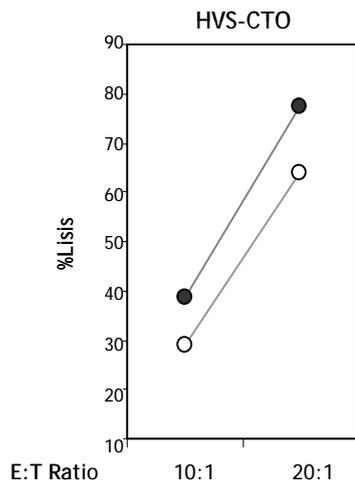


Figura 29.- Actividad lítica de la línea HVS-CTO frente a C1R.CD1d (O) y C1R.Mock (●).

Todas las células efectoras usadas en los estudios: PBMCs frescas, PBMCs cultivadas con IL-2, células CD56⁺CD3⁻ y las líneas celulares NKL y T-HVS, mostraron inhibición de la actividad lítica cuando las células diana expresaban CD1d en su superficie celular, ya fuera en la línea celular L721.221 o en la C1R. La inhibición fue comparable a la que se obtuvo con otras moléculas de las que ya se había descrito su capacidad para inhibir la actividad citolítica NK, como son las moléculas CD1a y HLA-B48. En todos los casos los resultados fueron repetidos un número suficiente de veces que nos permitió realizar análisis estadístico con las diferentes células efectoras: CD56⁺CD3⁻, NKL y HVS-CTO, y líneas celulares diana L721.221 (Mock.221, CD1d.221) (Figura 30a) o C1R (C1R.Mock y C1R.CD1d) (Figura 30b). Los experimentos mostraron diferencias significativas al comparar los porcentajes de lisis de las dianas control y las trasfectadas con CD1d, en los diferentes ratios y con las distintas células efectoras.

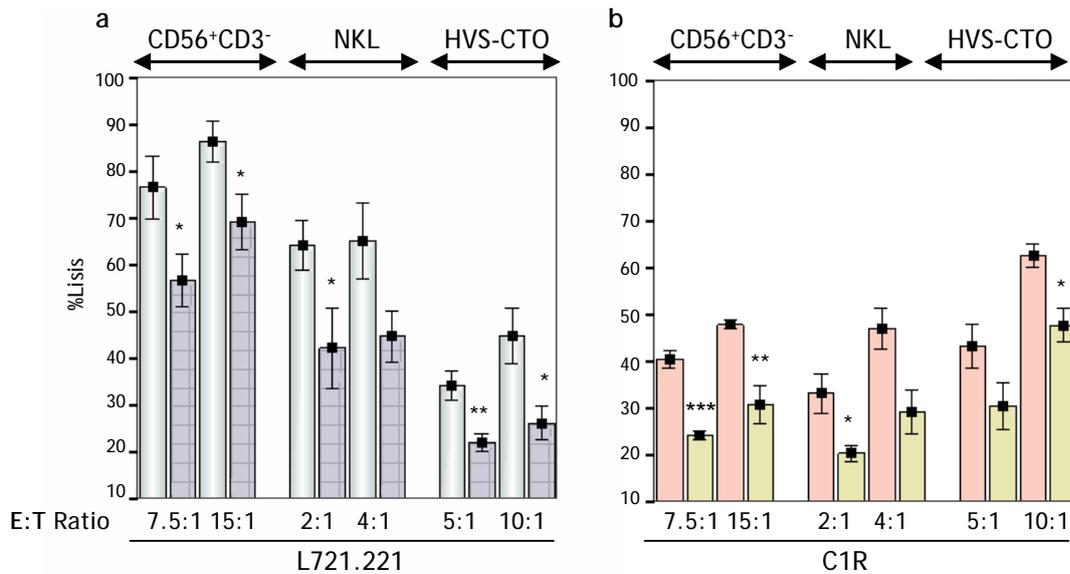


Figura 30.- Se muestra la media \pm EEM. a) Los porcentajes de lisis con las células Mock.221 (□) y CD1d.221 (■) son significativamente diferentes a: los E:T Ratio 7.5:1 y 15:1 frente a CD56⁺CD3⁻ (*, p=0.041 y *, p=0.034, respectivamente) (n=8); E:T Ratio 2:1 frente a NK (*, p=0.048) (n=7) y E:T Ratio 5:1 y 10:1 frente a HVS-CTO (**, p=0.004 y *, p=0.019) (n=8). b) Las dianas C1R.Mock (■) muestran diferencias significativas con C1R.CD1d (□), a los E:T Ratio: 7.5:1 y 15:1 frente a CD56⁺CD3⁻ (***, p=0.0003 y **, p=0.007) (n=4); 2:1 frente a NK (*, p=0.04) (n=3) y 10:1 frente a HVS-CTO (*, p=0.02) (n=3).

1.3.- Reversión de la inhibición producida por CD1d con el F(ab')₂ de un anticuerpo específico de CD1d humano.

Para confirmar que el efecto observado era específico de CD1d, esta molécula fue bloqueada con el fragmento F(ab')₂ (Fragmento de unión a antígeno) del anticuerpo monoclonal específico de CD1d humano CD1d42.

EL fragmento F(ab')₂ fue generado a partir del corte enzimático del anticuerpo comercial CD1d42 (IgG1_c) con Ficina. El F(ab')₂ fue separado del Fc (Fragmento cristalizante). Para comprobar que el corte enzimático del anticuerpo había sido correcto, se procedió a separar el F(ab')₂ en gel SDS-PAGE (Figura 31a). El F(ab')₂ del anticuerpo MB40.3 (IgG1) (anti HLA-B48 humano) fue usado como control en ensayos de bloqueo posteriores y también fue digerido con Ficina (Figura 31b). En un gel SDS-PAGE y bajo condiciones reductoras el anticuerpo se separó en: una banda de 50kDa de la cadena pesada y otra de 25kDa de la ligera. Los fragmentos F(ab')₂ generados, bajo condiciones reductoras se separaron en dos bandas de 25kDa, correspondientes al fragmento Fab. La foto muestra que la digestión fue correcta y también la separación del fragmento Fc generado.

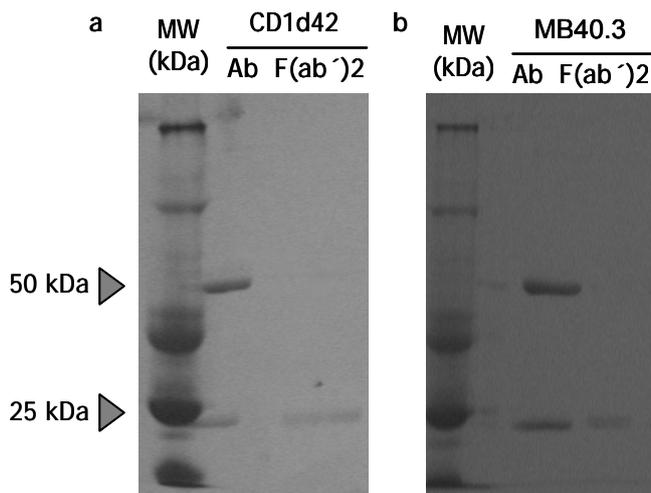


Figura 31.- En un gel SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. a) anticuerpo y F(ab')₂ de CD1d42 (IgG1,κ) anti-CD1d humano. b) anticuerpo y F(ab')₂ Mb40.3 (IgG1) anti-HLA-B48 humano.

El fragmento F(ab')₂ generado fue capaz de reconocer la molécula CD1d expresada en los dos tipos de líneas celulares dianas usadas CD1d.221 y C1R.CD1d, como se observa en el análisis de citometría que se realizó (Figura 32). El F(ab')₂ MB40.3 fue usado como control en el marcaje y no se unió a ninguna de las dos líneas celulares con expresión de CD1d.

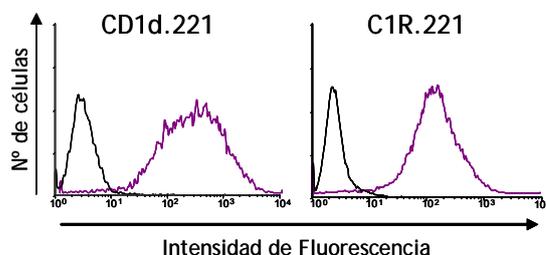


Figura 32.- Marcaje celular de CD1d.221 y C1R.CD1d con los fragmentos F(ab')₂ CD1d42 (—) y F(ab')₂ MB40.3 (—).

Con el fin de revertir la inhibición lítica observada con CD1d, las células diana Mock.221 y CD1d.221 fueron incubadas con el anticuerpo F(ab')₂ específico para CD1d humano antes del ensayo de citotoxicidad. En el mismo ensayo se pusieron células diana sin anticuerpo e incubadas con el F(ab')₂ MB40.3. Las células efectoras fueron células NK CD56⁺CD3⁻, NKL y HVS-CTO. CD1d quedó bloqueado y no accesible para su reconocimiento por la célula efectora. Los resultados mostraron una reversión de la inhibición cuando CD1d estaba unido a su anticuerpo, no observándose este efecto cuando las células diana fueron tratadas con el control F(ab')₂ MB40.3 o el tratamiento blanco. Se analizó la normalidad de los resultados y

se compararon las varianzas (ANOVA). Se observaron diferencias significativas cuando las células diana CD1d.221 fueron bloqueadas con F(ab')₂ CD1d42 con respecto al tratamiento blanco o control (F(ab')₂ MB40.3) (Figura 33). Con las células diana control (Mock), no existieron diferencias entre las células incubadas con los F(ab')₂ de los anticuerpos MB40.3, CD1d42 o las células solas.

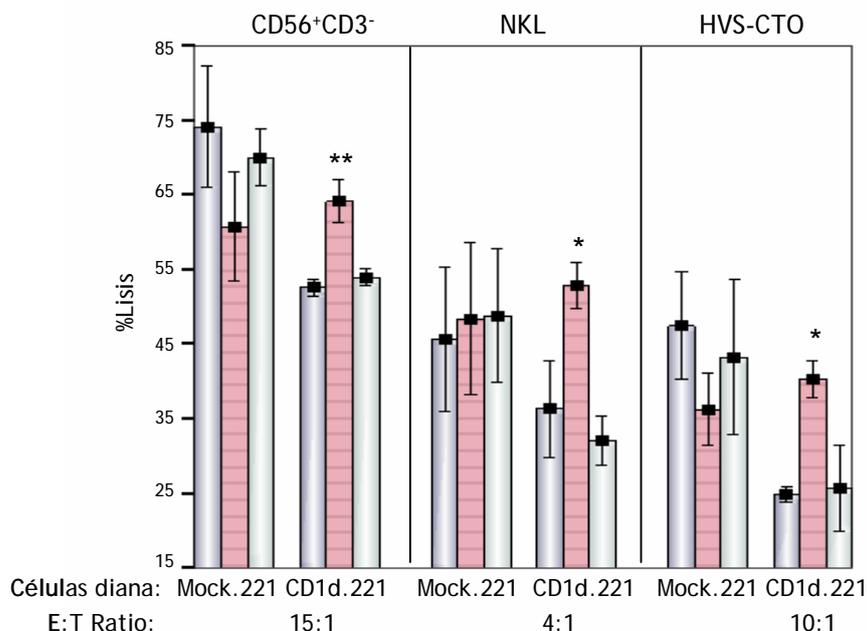


Figura 33.- Mock.221 y CD1d.221 frente a CD56⁺CD3⁻, NKL y HVS-CTO. Diferencias significativas entre CD1d.221 tratadas con F(ab')₂ CD1d42 (■) y sin tratamiento (□) o con F(ab')₂ control (▨): con las células efectoras CD56⁺CD3⁻ (**, p=0.009)(n=3), NKL (*, p= 0.039)(n=3) y HVS-CTO (*, p=0.044)(n=3). Se representa la media ± EEM.

2.- EFECTO DE LOS LIGANDOS DE CD1d: α Y β-GALACTOSILCERAMIDA.

2.1.- Efecto de α y β-GalCer presentado por CD1d en la inhibición de la actividad lítica de células NK.

CD1d tiene la capacidad de presentar glicolípidos endógenos y exógenos. Posee un lugar de unión antigénico profundo e hidrofóbico, que permite la unión de largas cadenas lipídicas también hidrofóbicas. α-GalCer es una ceramida exógena y potente activadora de células NKT, que procede de extractos de una esponja marina. β-GalCer es otra ceramida que posee la misma región apolar que α-GalCer, región por la que se une a CD1d. Tan solo se diferencia en el modo en que se une la galactosa a la ceramida, región polar que queda expuesta para su reconocimiento por receptores en la célula efectora.

Se estudió el efecto de cada uno de estos antígenos presentados por CD1d sobre la actividad lítica de células NK. Las células diana CD1d.221 fueron incubadas con α -GalCer toda la noche para favorecer la unión del antígeno a CD1d. Para confirmar que el CD1d expresado en la línea CD1d.221 estaba unido a esta ceramida, se enfrentaron estas células diana a células NKT ($V\alpha 24^+ V\beta 11^+$) seleccionadas después de una expansión con α -GalCer. Las células NKT reconocieron α -GalCer presentado por CD1d e incrementaron su actividad lítica. La gráfica muestra este aumento en el porcentaje de lisis existiendo un efecto dosis dependiente (Figura 34).

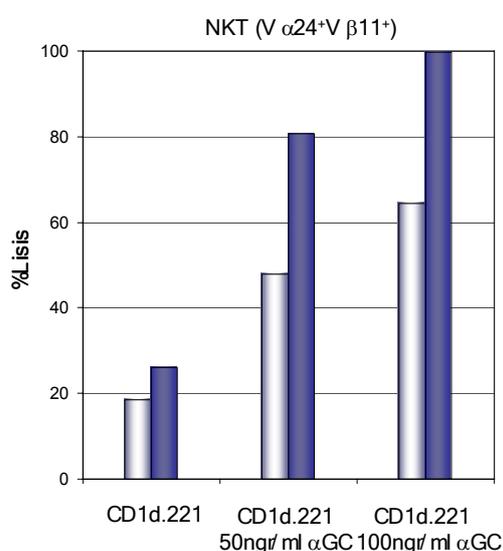


Figura 34.- Actividad citolítica de células NKT frente a CD1d unido a α -GalCer y enfrentada a células NKT. E:T Ratio 5:1 (□) y E:T Ratio 10:1 (■).

Una vez confirmada la unión de la ceramida al CD1d expresado en la línea CD1d.221, se analizó cómo actuaban las células NK al reconocer estos antígenos presentados por CD1d. Las células diana Mock.221 y CD1d.221 fueron cultivadas con α -GalCer, con P-20 (vehículo en que está disuelto la ceramida) o sin tratamiento, previo al ensayo de citotoxicidad. La concentración de α -GalCer añadida a los cultivos fue la misma que la utilizada para expandir células NKT (100ng/ml). Las células efectoras empleadas en todos los ensayos fueron las células NK $CD56^+CD3^-$. Con los porcentajes de lisis de los distintos E:T Ratio, se calcularon los porcentajes de inhibición de la lisis, que vienen dados como la diferencia entre la lisis de las células control y las células CD1d.221 para cada tratamiento (Sin tratamiento, α -GalCer y P-20).

Los resultados se analizaron estadísticamente después de comprobar que pertenecían a una distribución normal. Se observaron diferencias significativas al comparar el porcentaje de inhibición de la lisis entre dianas cultivadas solas y cultivadas con α -GalCer o con P-20. Se produjo una disminución de la inhibición de la

lisis, o lo que es lo mismo, un aumento de la actividad lítica cuando CD1d presentaba α -GalCer o la línea diana CD1d.221 era cultivada con P-20 (Figura 35). No se pudo descartar que el efecto observado fuera causado por el vehículo P-20 o por la ceramida, ya que ambos porcentajes de inhibición de la lisis no se diferenciaban entre ellos.

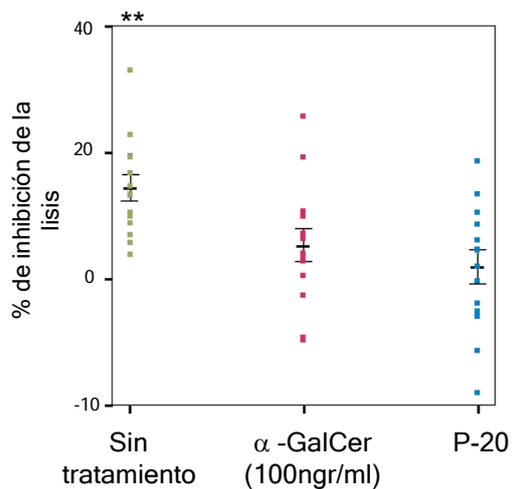


Figura 35.- Diferencias entre el porcentaje de inhibición de la lisis de dianas sin tratamiento y cultivadas con α -GalCer o P-20 (**,p=0.0028) (n= 14). Se representa la dispersión de datos, indicando la media \pm EEM.

Para eliminar el efecto de P-20 fue necesario utilizar α -GalCer disuelta en otro solvente orgánico. α -GalCer disuelta en DMSO fue usada en los siguientes ensayos realizados. Las células efectoras que se utilizaron en todos los ensayos fueron las células NK CD56⁺CD3⁻. (Figura 36). El porcentaje de inhibición de la lisis en este caso solo disminuyó con el glicolípido y no con el solvente orgánico. Se observaron diferencias significativas entre las dianas cultivadas con α -GalCer y las cultivadas solas o con DMSO. α -GalCer presentado por CD1d hizo desaparecer la protección que la expresión de esta molécula unida a lípido endógeno tenía sobre la lisis de las células efectoras NK.

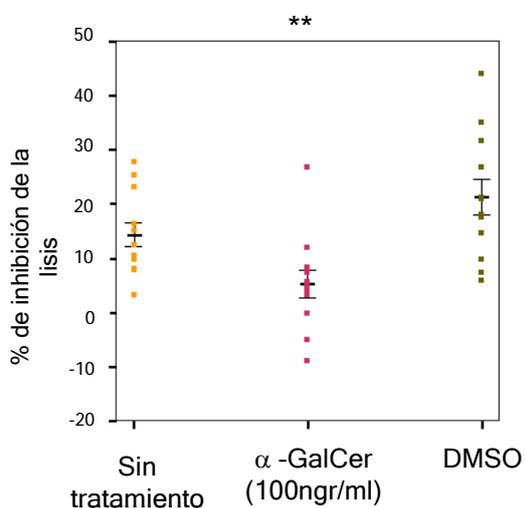


Figura 36.- α -GalCer presentada por CD1d y disuelta en DMSO comparada con células no tratadas o cultivadas con DMSO. (**,p= 0.001) (n=12). Se representa la dispersión de datos, indicando la media \pm EEM.

β -GalCer también se une a CD1d, y se estudió el efecto de este antígeno del mismo modo que con α -GalCer. En un principio se trabajó con β -GalCer disuelta en DMSO y procedente de cerebro bovino (Figura 37a), pero al no tratarse de la ceramida pura, los experimentos se repitieron con β -GalCer C12 sintética y también diluida en DMSO (Figura 37b). La concentración de ceramida añadida fue la misma que con α -GalCer (100ngr/ml). Las células efectoras empleadas en todos los ensayos fueron las células NK CD56⁺CD3⁻. Los resultados con ambas ceramidas indicaron que existe una disminución del porcentaje de inhibición de la lisis en ambos casos, al igual que ocurría con α -GalCer. Se observaron diferencias significativas (ANOVA) al comparar las dianas cultivadas con ceramida con las células solas o cultivadas con DMSO.

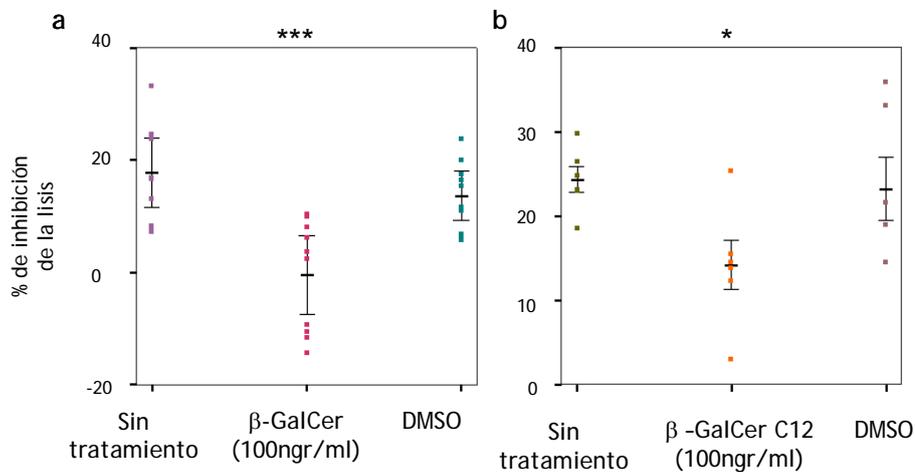


Figura 37.- Efecto de β -GalCer disuelta en DMSO: a) β -GalCer es comparada con las células sin tratamiento y cultivadas con DMSO (***, $p=0.0001$) ($n=10$). b) con β -GalCer C12 sintética comparada con células control (DMSO) y sin tratamiento (*, $p=0.046$) ($n=6$). Se representa la dispersión de datos, indicando la media \pm EEM.

Se apreció por tanto un efecto cuando las ceramidas fueron presentadas por CD1d y se enfrentaron a células NK. Para confirmar que el efecto fue causado por la presentación de la ceramida por CD1d y no por el efecto de la ceramida sobre esas células diana, se realizaron los mismos análisis con otras células diana que expresaban otras moléculas en su superficie, como son HLA-B48.221 y CD1a.221. Ambos tipos celulares fueron cultivados con α -GalCer disuelta en P-20 o DMSO (con resultados similares) y β -GalCer C12 disuelta en DMSO y se enfrentaron a células efectoras NK CD56⁺ CD3⁻. Se calcularon los porcentajes de inhibición de la lisis (diferencia entre el porcentaje de lisis de las células Mock.221 y las diana HLA-B48.221 y CD1a.221, respectivamente). Se analizaron las varianzas (ANOVA) de los datos obtenidos después de comprobar que se trataban de distribuciones normales

(Figura 38 a y b). En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas al tratar con las ceramidas comparando con los controles con DMSO o P-20 y con las células dianas sin tratamiento. Células efectoras CD56⁺CD3⁻ fueron empleadas en el análisis.

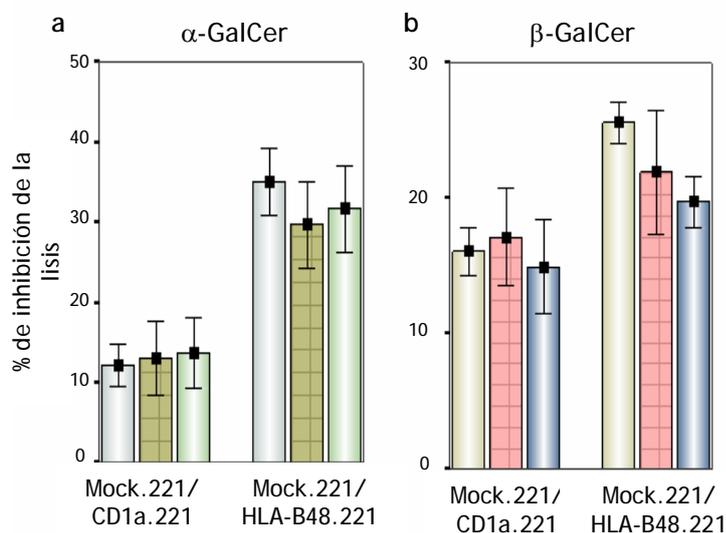


Figura 38.- La media del porcentaje de inhibición de lisis entre células Mock y CD1a y HLA-B48 es representado \pm EEM. a) Células diana sin tratamiento (□), con α -GalCer (■) y DMSO (■) (n=12). b) Dianas sin tratamiento (□), con β -GalCer C12 (■) y DMSO (■) (n=6).

También decidimos analizar el efecto de otro antígeno glicolípido presentado por CD1, y estudiar su efecto en la actividad citolítica de células NK. El ácido micólico es uno de los constituyentes de la pared bacteriana de *Mycobacterium tuberculosis*. Presentado por CD1b produce un aumento en la inhibición de la actividad citolítica de células NK (Carbone, E. et al., 2000). Las células diana utilizadas en los ensayos fueron: Mock.221, CD1d.221, CD1a.221 y HLA-B48.221. Al igual que en los casos anteriores, las células diana cultivadas con este glicolípido (CD1a.221, CD1d.221 y HLA-B48.221) no presentaron cambios en el porcentaje de inhibición con respecto a las células sin tratamiento o con DMSO (Figura 39). No hubo diferencias significativas en la varianza de las distribuciones normales.

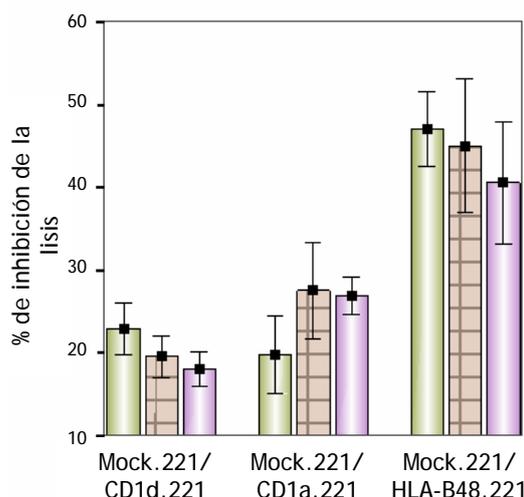


Figura 39.- Porcentaje de inhibición de la lisis entre Mock.221 y: CD1d.221, CD1a.221 y HLA-B48. Dianas sin tratamiento (■), con ácido micólico (■) y con DMSO (■). (n=8). Se representa la media \pm EEM.

Como conclusión podemos decir que no todos los glicolípidos produjeron un aumento de la lisis sobre las células NK al ser cultivados con la línea CD1d.221, sólo se observó con α y β -GalCer. Tampoco todas las células diana aumentaron su sensibilidad frente a la actividad lítica de células NK, cuando fueron cultivadas con la α y β -GalCer, sólo las que expresaban CD1d.

Además comprobamos que el tratamiento de las células diana con α o β -GalCer no incrementó ni disminuyó la expresión de CD1d en la línea L721.221 (Figura 40).

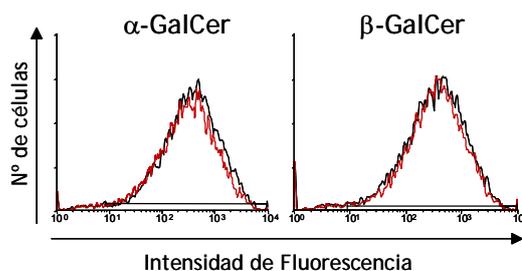


Figura 40.- Expresión de CD1d en la línea celular CD1d.221 cultivada con α o β -GalCer (—) o sin tratamiento (—).

2.2.- Marcaje de células efectoras NK con tetrámeros de CD1d unido a α -GalCer.

El hecho de que CD1d unido con α o β -GalCer eliminara el efecto protector que inicialmente poseía en un cultivo normal, plantea la posibilidad de que la célula NK no reconociera CD1d unido a estas ceramidas. Para corroborar esta hipótesis las células efectoras CD56⁺ CD3⁻, NKL, HVS-CTO se marcaron con tetrámeros de CD1d (CD1d-Fc/PA-A488) unidos a α -GalCer, y en doble marcaje con marcadores

específicos: CD56, CD25 y CD3, respectivamente. No se observó unión del tetrámero a las células efectoras, lo que apoyaba la idea de que estas células no reconocen CD1d unido a α -GalCer. Las células NKT $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ fueron utilizadas como control de tinción positivo (Figura 41).

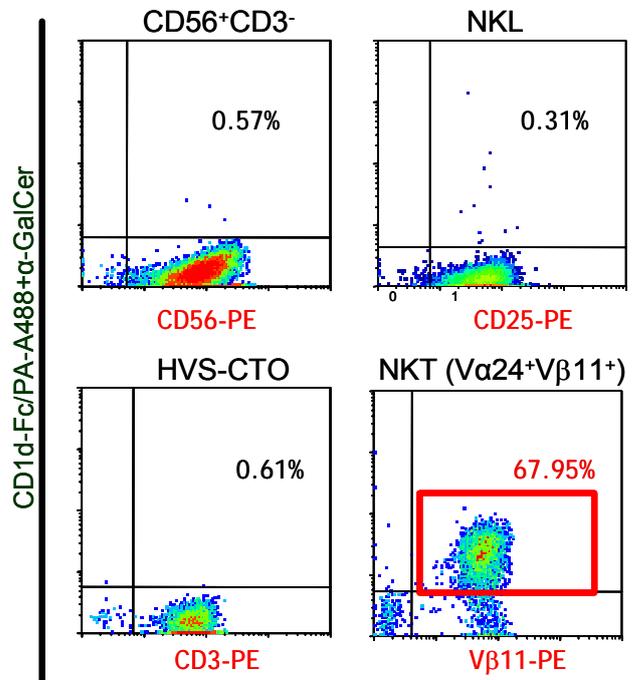


Figura 41.- Marcaje de células efectoras CD56⁺CD3⁻, NKL y HVS-CTO con el tetrámero de CD1d unido a α -GalCer.

Como **conclusión global** de este apartado podemos afirmar que la molécula CD1d humana expresada en las líneas celulares HLA de clase I deficientes, L721.221 y C1R, inhibió la actividad citolítica de células efectoras con actividad NK. Dicha inhibición fue revertida cuando CD1d estaba unido a α o β -GalCer, lo que nos hizo pensar en una falta de reconocimiento del receptor inhibidor a este complejo CD1d:Ceramida, apoyado por los resultados de marcajes con tetrámeros de CD1d: α -GalCer.

3.-DESARROLLO DE UN MODELO DE INFECCIÓN *in vitro* DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS POR *Leishmania infantum*.

3.1.- Infección de células dendríticas por *Leishmania infantum*.

Las células dendríticas inmaduras pueden ser infectadas por diversos tipos de parásitos pasando a un estadio de maduración. Las células dendríticas maduras migran a los ganglios donde presentan antígenos a los linfocitos T.

Decidimos estudiar la relación entre células dendríticas infectadas por *Leishmania infantum* y células NKs autólogas. Como modelo, se utilizaron células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica (GM-CSF e IL-4) que fueron infectadas con las formas amastigote y promastigote de *Leishmania infantum*. Para comprobar que las Leishmanias fueron fagocitadas por las dendríticas inmaduras, los parásitos se marcaron con CFSE (Marcador fluorescente que se une a los grupos aminos presentes en la cubierta parasitaria) previo a la infección y se cultivaron con las células dendríticas durante 48 horas. Se analizó por citometría el porcentaje de células dendríticas infectadas, que eran aquellas fluorescentes (Figura 42). Se observó que la mayor parte de las dendríticas del cultivo se encontraban infectadas tanto por la forma amastigote como por la promastigote. La media de intensidad de fluorescencia fue mayor en el caso de infección con la forma amastigote posiblemente por la mayor eficiencia de infección de la forma amastigote en células dendríticas (Colmenares, M. et al., 2004).

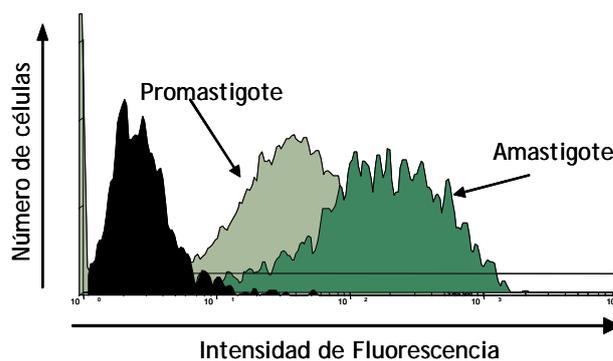


Figura 42.- Células dendríticas infectadas con promastigote o amastigote de *Leishmania infantum*. El histograma en negro corresponde a las células dendríticas que no han estado en contacto con el parásito.

3.2.- Estudio de marcadores de maduración en células dendríticas infectadas con *Leishmania infantum*.

Para comenzar con el estudio, se analizó la capacidad de *L. infantum* para madurar las células dendríticas inmaduras. Se estudió la expresión de marcadores de maduración en las células dendríticas 48 horas después de la infección. En trabajos publicados anteriormente existe cierta controversia en cuanto a si existe maduración o no en las células dendríticas infectadas, dependiendo tanto de la especie usada de *Leishmania*, como del origen de las células dendríticas. También se analizó el efecto de la infección de *Leishmania* sobre la expresión de moléculas CD1a y CD1d.

Se realizó un estudio de marcadores de maduración en células dendríticas humanas infectadas con las formas amastigote o promastigote de *Leishmania infantum*. Las células dendríticas de distintos donantes sanos fueron incluidas en el estudio, donde las moléculas analizadas fueron CD1a, HLA-I, HLA-DR, CD86, CD80 y CD40. Los marcadores expresados por las células dendríticas maduras con LPS fueron usados como control de maduración (Figura 43).

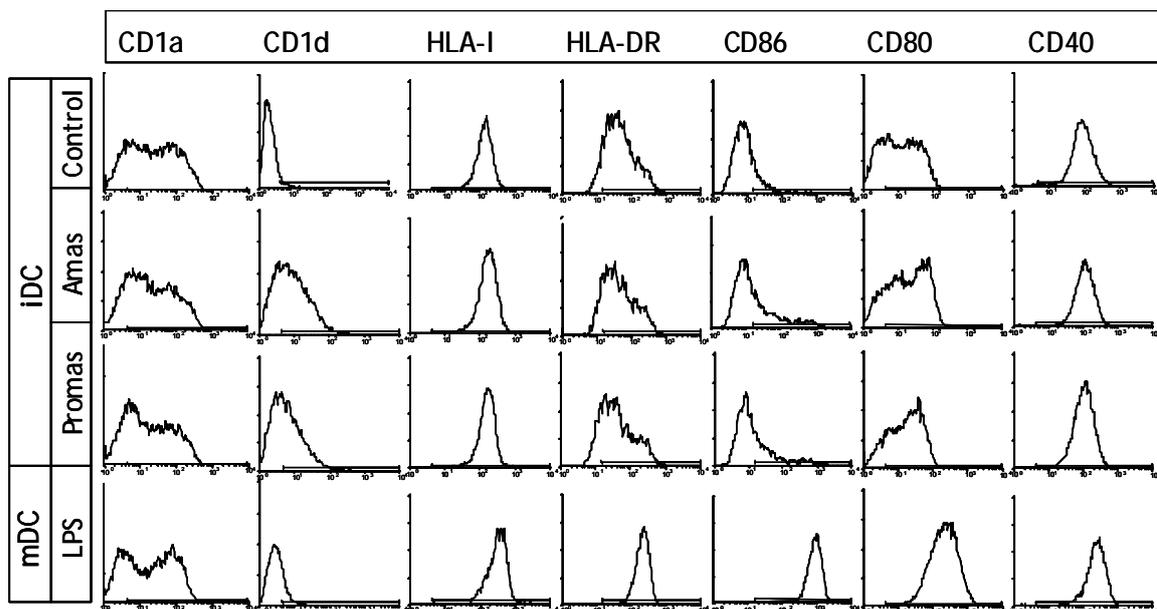


Figura 43.- Ejemplo representativo de la expresión de distintos marcadores en células dendríticas inmaduras (Control), infectadas con la forma amastigote (Amas), con promastigote (Promas) y en células dendríticas maduras (LPS) en un experimento representativo.

El análisis estadístico de múltiples experimentos (Reflejado en la tabla 1) reveló que no existen diferencias significativas entre células dendríticas infectadas con *Leishmania* y células inmaduras. Además, observamos que las células dendríticas tratadas con LPS como se esperaba, incrementaron significativamente (ANOVA) la expresión de HLA de clase I, HLA-DR y CD86, con respecto al resto de tratamientos

(Tabla 4). También CD80 y CD40 fueron comparativamente diferentes en células dendríticas maduras, aunque el análisis de varianza de estos marcadores no se pudo realizar ya que no se estudiaron en un número suficiente de donantes. Nótese que en unos casos se estudió la intensidad media de fluorescencia (HLA-I, HLA-DR y CD40) y en el resto el porcentaje de expresión de la molécula en las células dendríticas. En el caso de las moléculas CD1, observamos que no existen variaciones en la expresión de moléculas CD1a en células dendríticas infectadas o maduras con LPS. Por el contrario, observamos un incremento en el porcentaje de células positivas para CD1d. Este hecho fue especialmente llamativo porque CD1d fue el único marcador que incrementó su expresión en células dendríticas infectadas con *L. infantum*. (Tabla 4).

Tabla 4

	CD1a	CD1d	MFI HLA-I	MFI HLA-DR
Control	78,92 ±18,56	13,97% ±3,8	132,71±45,6	40,56±28,84
Amas	81,42±18,19	54,93% ±21,9 ***	164,04±56,17	65,35±47,30
Promas	81,07±19,39	44,13% ±20,5 **	150,54±59,43	61,04±37,74
LPS	84,61±7,7	22,7% ±9,5	290,31±58,5 **	195,31±87,99 **
	CD86	CD80	MFI CD40	
Control	30,43%±15,11	66,57%	99,75	
Amas	48,83%±11,75	79,07%	119,66	
Promas	45,62%±20	80,73%	109,4	
LPS	98,89%±1,18 ***	99,97%	249,36	

Tabla 4.- Se muestran la media ± DE de expresión de distintos marcadores (CD1a (n= 13), CD1d (n=15), HLA-I (n= 13), HLA-DR (n= 7), CD86 (n= 5), CD80 y CD40) en células dendríticas inmaduras (Control), con amastigote (Amas), con promastigote (Promas) y dendríticas maduras (LPS). Estas últimas poseen diferencias con respecto al resto de células dendríticas en: MFI HLA-I (**, p= 0.0015); MFI HLA-DR (**, p= 0.008) y CD86 (***, p= 0.0001). Entre iDCs inmaduras (Control) (n= 15) y DCs infectadas existen diferencias en la expresión de CD1d: Amas (***, p=0.0001, n= 15) y Promas (**, p= 0.0011, n= 15).

Posteriormente realizamos estudios de cinética de expresión a 8, 24 y 48 horas para estudiar como se incrementaba la expresión CD1d en la superficie de las células dendríticas una vez infectadas con la forma amastigote o promastigote de *Leishmania*. Células dendríticas no infectadas fueron incluidas en el estudio cinético (Figura 44). El aumento de CD1d en infección con amastigote o promastigote fue paulatino hasta las 24 horas, alcanzándose el máximo al final del experimento: 48 horas.

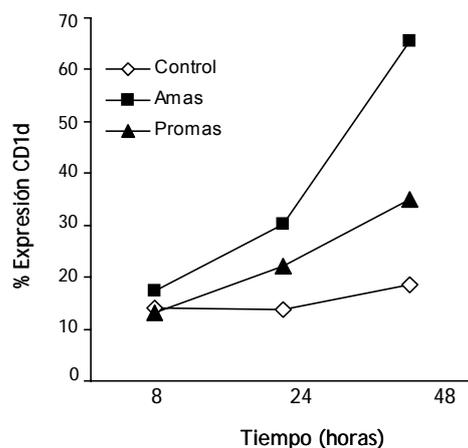


Figura 44.- Cinética de expresión de CD1d en DCs infectadas con *L. infantum* (Experimento representativo de tres realizados).

Como resumen de los resultados obtenidos podemos decir que las células dendríticas inmaduras infectadas con *L. infantum* no pasaron a un estadio de maduración. No aumentó ninguno de los marcadores característicos de maduración, aunque si cabe destacar el aumento de CD1d en la superficie celular tras la infección tanto con la forma amastigote como promastigote.

Hasta ahora poco se conoce acerca de la regulación de transcripción de moléculas del sistema CD1. Recientemente se ha descrito como PPAR γ (factor de transcripción de genes relacionados con la captura, acumulación y almacenamiento de lípidos) actúa en la inducción de CD1d y disminución de CD1a (Szatmari, I. et al., 2004). Se estudió si este factor actuaba en la inducción que se observaba de CD1d en las células dendríticas infectadas por *L. infantum*, para ello utilizamos la Rosiglitazona (RSG), que es un agonista de PPAR γ y la fenilbenzamida-GW9662 antagonista de PPAR γ . Se analizó la expresión de CD1d en células dendríticas inmaduras e infectadas *L. infantum*, con o sin antagonista añadido al mismo tiempo que el parásito (Figura 45).

Como control, se trataron células dendríticas inmaduras con RSG y/o antagonista durante 5 días. El antagonista funcionó correctamente e impidió que aumentara la expresión de CD1d por la presencia de RSG. La expresión de CD1d no varió cuando las células dendríticas infectadas fueron tratadas con el antagonista de PPAR γ ni con el agonista RSG.

Atendiendo a los resultados obtenidos, el aumento de expresión de CD1d fue independiente del factor de transcripción PPAR γ .

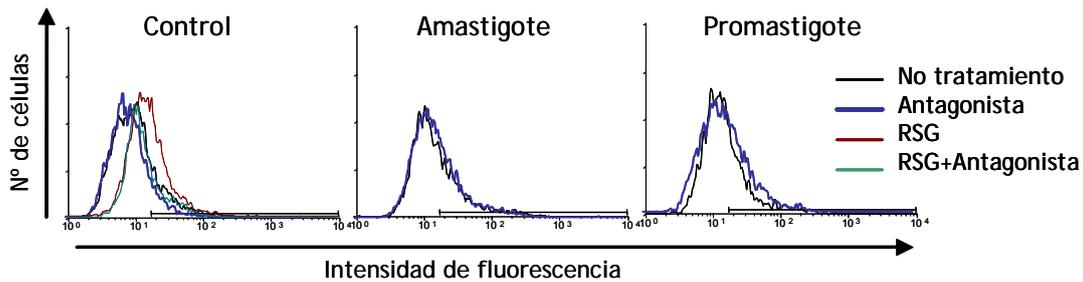


Figura 45.- Expresión de CD1d en dendríticas inmaduras, inmaduras con RSG e infectadas con *Leishmania infantum*

3.3.- Estudio de la actividad citolítica de células NK frente a células dendríticas inmaduras, maduras e infectadas con *Leishmania infantum*.

Teniendo en cuenta que las células dendríticas infectadas con *L. infantum* no expresaban los marcadores típicos de maduración, nos planteamos si serían lisadas por células NK. Para ello realizamos experimentos de citotoxicidad con células NKs enfrentadas a células dendríticas infectadas con *Leishmania infantum*, ya fuera con la forma amastigote o la promastigote. Se observó una inhibición en el porcentaje de lisis específico de células NK CD56⁺CD3⁻ autólogas comparando las células dendríticas inmaduras con las infectadas. Las células dendríticas maduras fueron usadas como control de inhibición (Figura 46). Diferentes ensayos de citotoxicidad fueron realizados con células dianas y efectoras de distintos donantes, observándose diferencias estadísticamente significativas (ANOVA). Resultados similares fueron obtenidos con células NK heterólogas.

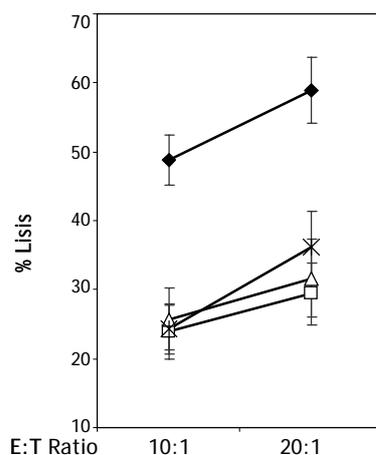


Figura 46.- Se muestran la media \pm EEM del porcentaje de lisis (n=10). Diferencias significativas entre iDCs control (\blacklozenge) y: con amastigote (\square) a E:T ratio 10:1 (***, p= 0.0001), y 20:1 (***, p= 0.0001); con promastigote (\triangle) a E:T ratio 10:1 (***, p= 0.0003) y 20:1 (***, p= 0.0007) y mDCs (\blacksquare) al E:T ratio 10:1 (***, p=0.0001) y E:T ratio 20:1 (**, p= 0.0016).

Enlazando con los resultados anteriores en los que se observa un aumento de CD1d y teniendo en cuenta que hemos descrito que CD1d protege de la lisis frente a células NKs, decidimos comprobar esta hipótesis. Como control realizamos bloqueos

con anticuerpos anti-HLA de clase I (F(ab')₂ del anticuerpo W6/32, ya que estas moléculas no aumentan en células infectadas (Figura 47b). Las células dendríticas diana se incubaron con F(ab')₂ del anticuerpo CD1d42 (anti-CD1d humano) y con un F(ab')₂ control (anti-HLA-B48). En los ensayos de citotoxicidad frente a células NK CD56⁺CD3⁻ autólogas, se observó un ligero aumento del porcentaje de lisis tras el bloqueo de CD1d, pero no alcanzó a los valores de lisis obtenidos con las células dendríticas inmaduras no infectadas (Figura 47a).

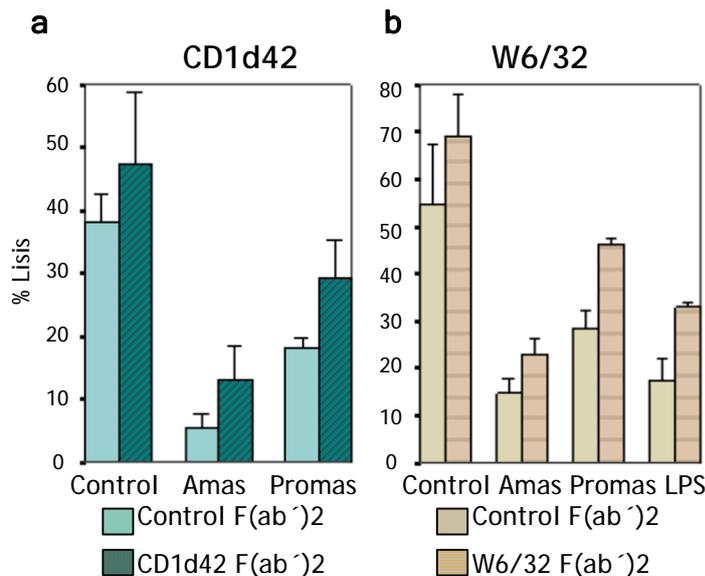


Figura 47.- a) Bloqueos con CD1d42 y b) W6/32 F(ab')₂. Ensayos de citotoxicidad de células dendríticas inmaduras, infectadas con amastigote, con promastigote, y maduras con LPS, frente a células CD56⁺CD3⁻ autólogas. E:T Ratio 10:1. Experimentos representativos de dos realizados en cada caso. Se muestra la media de la lisis ± EEM de los triplicados del ensayo citotóxico.

Otra explicación para la inhibición de la lisis observada en células dendríticas infectadas podría ser que las células dendríticas infectadas regularan negativamente la expresión de ligandos de receptores activadores. La lisis de las células dendríticas inmaduras se produce por activación del receptor activador NKp30 en las células NKs (Ferlazzo, G. et al., 2002). Por ello decidimos utilizar la proteína de fusión NKp30-Fc para analizar posibles cambios en la expresión de ligandos de este receptor en las células dendríticas. Las células dendríticas infectadas con *L. infantum* fueron marcadas con esta proteína de fusión en análisis de citometría (Figura 48). No se observaron cambios en la unión de NKp30-Fc a su ligando en las células dendríticas inmaduras, comparando con células dendríticas infectadas con amastigote o promastigote. Por tanto esto no explicaría la falta de actividad lítica de las células NK CD56⁺CD3⁻ frente a las células infectadas.

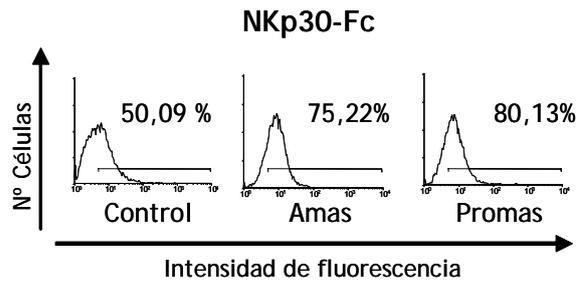


Figura 48.- Marcaje de NKp30-Fc en las células dendríticas inmaduras (Control), infectadas con amastigote y con promastigote.

Descartada la hipótesis anterior decidimos estudiar el efecto de otro ligando conocido para receptores inhibidores de las células NK, como es la molécula HLA-E. HLA-E presenta péptidos hidrofóbicos, generalmente péptidos líderes de otras moléculas HLA de clase I. Aunque no se produjo aumento de moléculas HLA de clase I en las células dendríticas infectadas, pudiera ser que aumentara la expresión de HLA-E en superficie por otros motivos. Nuestros estudios de expresión de HLA-E demostraron que, sorprendentemente, sí se produjo un aumento en la expresión de HLA-E de las células dendríticas infectadas con *Leishmania infantum*, tanto con la forma amastigote como con la promastigote (Figura 49). Como control positivo de aumento de expresión de HLA-E se utilizaron células dendríticas maduras (Tratadas con LPS). Los valores de expresión de HLA-E no fueron tan altos en células dendríticas infectadas como en el caso de dendríticas maduras, pero sí fueron significativamente mayores que los expresados en células inmaduras (ANOVA).

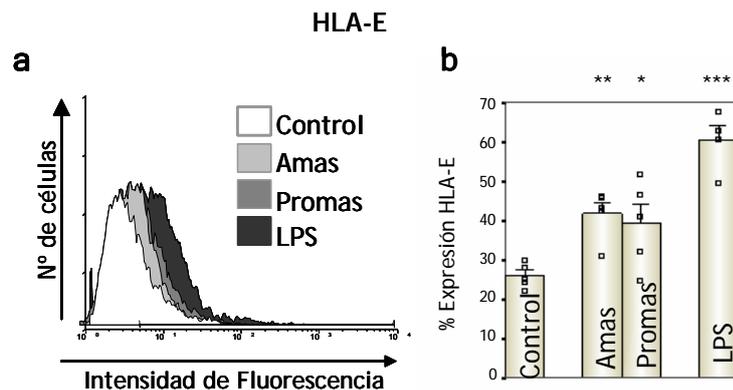


Figura 49.- Expresión de HLA-E. a) Histograma representativo. b) Se representa la media \pm EEM del porcentaje de expresión de HLA-E y la dispersión de los valores obtenidos. Hay diferencias significativas al comparar células dendríticas solas (Control) (n=5) y células: con Amastigote (Amas) (**, p=0.001, n= 5); con promastigote (Promas) (*, p= 0.03, n=5); y con LPS (***, p=0.0001, n=4).

Teniendo en cuenta estos resultados, el siguiente paso fue analizar el efecto de la expresión de HLA-E en la inhibición de la lisis. Como en los casos anteriores, se bloqueó la unión de HLA-E con su receptor CD94/NKG2A en la célula efectora. El

fragmento F(ab')₂ del anticuerpo específico para HLA-E (3D12), fue usado para incubar las células dendríticas. El F(ab')₂ (anti-HLA-B48) fue usado como control (Figura 50). Los resultados mostraron una reversión de la inhibición con diferencias significativas (ANOVA) al comparar los porcentajes de lisis con células dendríticas bloqueadas con 3D12 y las incubadas con F(ab')₂ control. A diferencia de los casos anteriores (HLA de clase I y CD1d) se alcanzaron en algunos ratios los valores obtenidos con las células dendríticas inmaduras. Las células dendríticas maduras fueron usadas como control, ya que en su inhibición actúa el reconocimiento entre CD94/NKG2A en la célula NK y el HLA-E que expresaban las dianas. En las células dendríticas inmaduras no infectadas no se observaron cambios al incubarlas con anticuerpo anti-HLA-E o con el control.

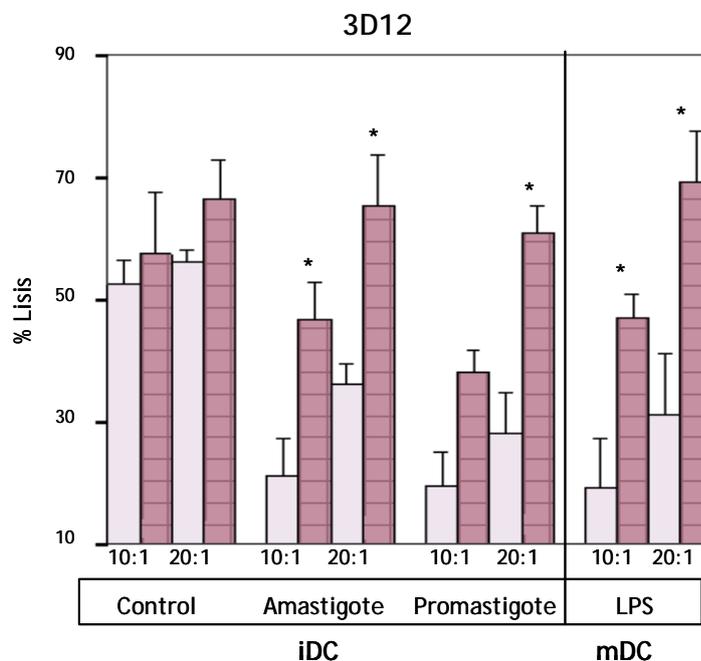


Figura 50.- Se representa la media \pm EEM del porcentaje de lisis con F(ab')₂ 3D12 (■) y control (n=3) (□). Con amastigote E:T ratio 10:1 (*, p=0.045) y 20:1 (*, p=0.023); con promastigote E:T 20:1 (*, p= 0.028) y dendríticas maduras LPS, E:T 10:1 (*, p=0.03) y E:T 20:1 (*, p=0.011).

El receptor específico de HLA-E en las células NK es CD94/NKG2A y también fue bloqueado con un anticuerpo específico (HP3D9). Las células efectoras fueron incubadas con dicho anticuerpo, para después enfrentarlas en un ensayo citolítico con las células dendríticas. La población de células NK con expresión mayoritaria de este receptor inhibitor fueron bloqueadas. Sólo la señal de receptores activadores fue mantenida en esta población de células NK y aumentó la actividad citolítica de modo significativo (ANOVA) frente a células dendríticas infectadas con *Leishmania infantum* o cultivadas con LPS, a pesar de la expresión de HLA-E. El porcentaje de

lisis llegó a niveles comparables a los obtenidos con las células dendríticas inmaduras. Las dendríticas maduras fueron usadas como control (Figura 51).

A modo de conclusión podemos decir que las células dendríticas infectadas con *L. infantum* aumentaron la expresión de HLA-E, esta molécula protegió a estas células de la lisis por NKs interaccionando con el receptor inhibitor CD94/NKG2A.

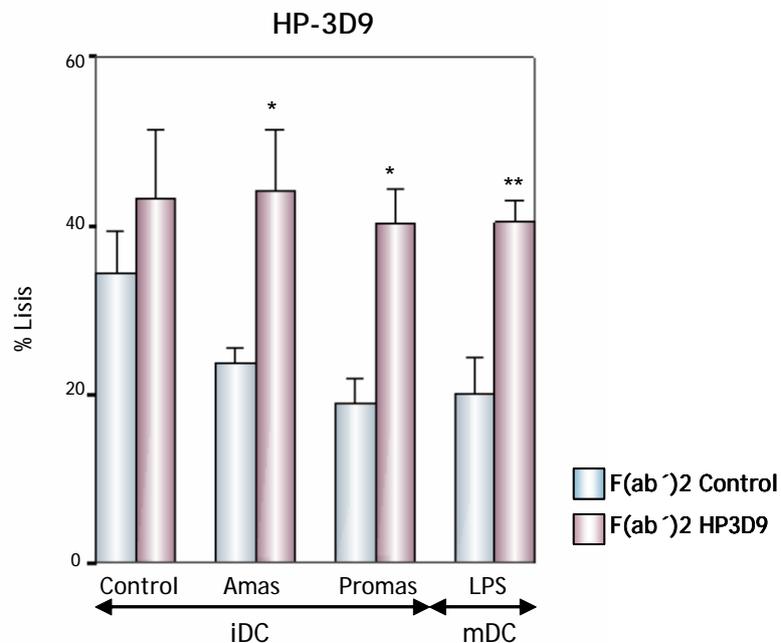


Figura 51- Se representa la media del porcentaje de lisis \pm SEM con HP3D9 y anticuerpo control (n=3), E:T Ratio 10:1. Hay diferencias significativas (ANOVA). Con Amastigote (*, p=0.049); con promastigote (*, p= 0.012) y LPS (**, p=0.007).

4.-ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE CÉLULAS iNKT FRENTE A CÉLULAS DENDRÍTICAS INFECTADAS CON *L. infantum*.

4.1.- Estudio de células iNKT frente a la expresión de CD1d en células dendríticas inmaduras infectadas con *Leishmania infantum*.

En los experimentos precedentes se demostró que las células dendríticas infectadas con *Leishmania infantum* aumentaban la expresión de CD1d en su superficie, por lo tanto se hizo necesario estudiar cómo se comportaban las células NKT frente a células dendríticas infectadas.

Decidimos realizar estudios de actividad citolítica y de producción de citocinas de células NKT autólogas $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ (iNKT):

4.1.1.-Actividad citolítica.

Las células iNKT autólogas después de dos semanas en expansión con α -GalCer fueron seleccionadas con anticuerpos anti-V α 24 y V β 11 para separarlas del resto de PBMCs aún presentes en el cultivo. En los ensayos de citotoxicidad las células iNKT se enfrentaron a las células dendríticas inmaduras, donde la expresión de CD1d era aproximadamente igual al 20%. Además se utilizaron como células diana células dendríticas infectadas con la forma amastigote y promastigote de *Leishmania infantum*, donde la expresión de CD1d aumentaba hasta 40% de media, aproximadamente. La α -GalCer ligando conocido de CD1d y potente activador de la actividad citolítica de células NKT fue utilizado como indicador de lisis máxima. Nuestros resultados indicaron un aumento estadísticamente significativo (ANOVA) de la actividad lítica cuando las células diana fueron las dendríticas infectadas con *Leishmania*, al comparar células dendríticas inmaduras con células infectadas con la forma promastigote. Las células dendríticas infectadas con amastigote aún mostrando un mayor porcentaje de lisis no mostró diferencias estadísticamente significativas. De modo general sí podemos decir que las células iNKT autólogas mataron más eficientemente las células infectadas con *L. infantum* (Figura 52).

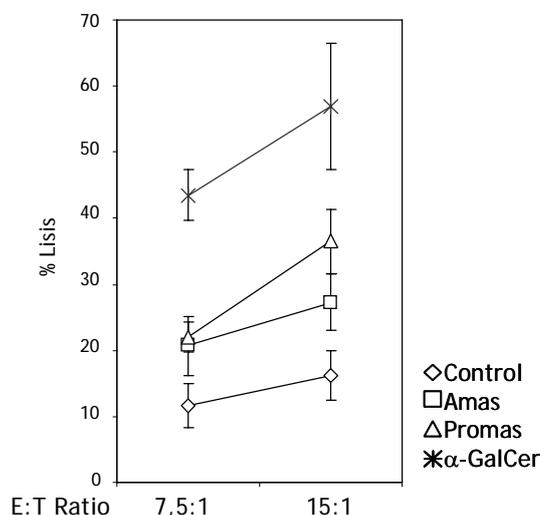


Figura 52.- Media del porcentaje de lisis \pm EEM (n=6). Existen diferencias significativas al comparar las células dendríticas no infectadas con células infectadas con promastigote E:T 15:1 (*, p= 0.02) y cultivadas con α -GalCer a E:T Ratio 7.5:1 (**, p= 0.003) y 15:1 (*, p= 0.013).

Recientemente se ha identificado el glicolípido iGb3 como ligando endógeno presentado por CD1d y reconocido por células NKT. Para analizar la naturaleza del ligando presentado por CD1d en las células dendríticas infectadas por *L. infantum* a las células iNKT decidimos aprovechar una característica específica de iGb3. Este

glicolípido pose un enlace terminal α 1-3 entre dos galactosas. La lectina IB4 se une específicamente a dicho enlace, de modo que bloquea el reconocimiento de NKTs al iGb3 (Zhou, D. et al., 2004). El hecho de que se observara un aumento de CD1d, planteaba la posibilidad de que uniera otro glicolípido abundante después de la infección.

Las células dendríticas inmaduras e infectadas con *Leishmania* fueron incubadas con IB4 previo al ensayo de citotoxicidad con las células autólogas iNKT. α -GalCer, no posee el enlace Gal α 1-3Gal en su extremo, de modo que la utilizamos de control negativo en el bloqueo. La actividad citolítica de células iNKT fue bloqueada con la lectina IB4 en todos los casos excepto con α -GalCer. El bloqueo fue estadísticamente significativo con las células dendríticas infectadas con amastigote (ANOVA)(Figura 53).

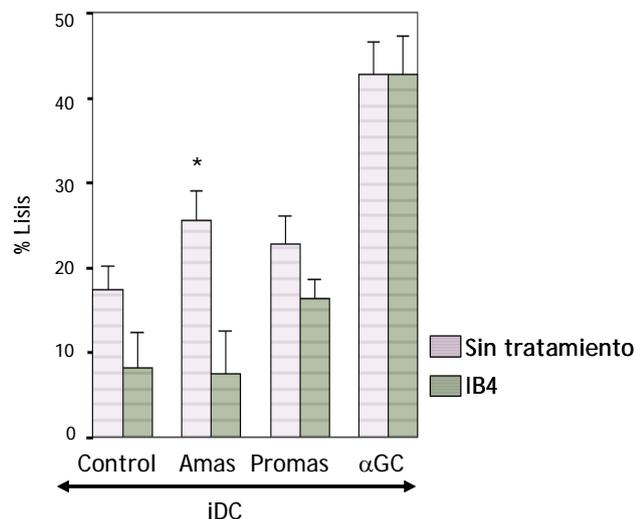


Figura 53.- Media del porcentaje de lisis \pm EEM (n=3). Hay diferencias significativas (ANOVA) al comparar las células dendríticas con las bloqueadas con IB4. Amastigote E:T Ratio 10:1 (*, $p=0.029$).

Las células dendríticas infectadas con *L. infantum* fueron lisadas más eficazmente que aquellas no infectadas por las células iNKT. El porcentaje de lisis fue bloqueado tras el tratamiento de las células infectadas con IB4.

4.1.2.-Producción citocinas.

Las células NKT son capaces de sintetizar importantes cantidades de citocinas, especialmente IFN- γ e IL-4 por lo que decidimos estudiar su producción. Células iNKT autólogas fueron cultivadas durante 8 horas con células dendríticas, midiéndose posteriormente el porcentaje de iNKT productoras de citocinas. Las células dendríticas usadas fueron, dendríticas inmaduras e infectadas con amastigote y

promastigote de *Leishmania infantum*. Se tuvo en cuenta la producción basal de citocinas de las células iNKT que no estuvieron en contacto con células dendríticas. Las células dendríticas cultivadas durante toda la noche con α -GalCer y co-cultivadas con iNKT, fueron usadas como indicador máximo en la producción de estas citocinas. Se observó un aumento en la producción de IFN- γ cuando las células dendríticas habían estado en contacto con *Leishmania infantum* comparando con las células no infectadas (control), aunque los valores fueron bastante inferiores a los obtenidos cuando CD1d presenta α -GalCer. La producción de IL-4 fue muy similar en todos los casos. (Figura 54a). Al igual que con la actividad citolítica, estudiamos como se comportaban las células iNKT al bloquear el ligando que presenta CD1d con IB4. Se observó una disminución del porcentaje de células iNKT productoras de IFN- γ , única citocina estudiada en el bloqueo. Las células dendríticas incubadas con α -GalCer, no disminuyeron su capacidad de estimular a las células iNKT para producir IFN- γ tras el tratamiento con IB4 (Figura 54b).

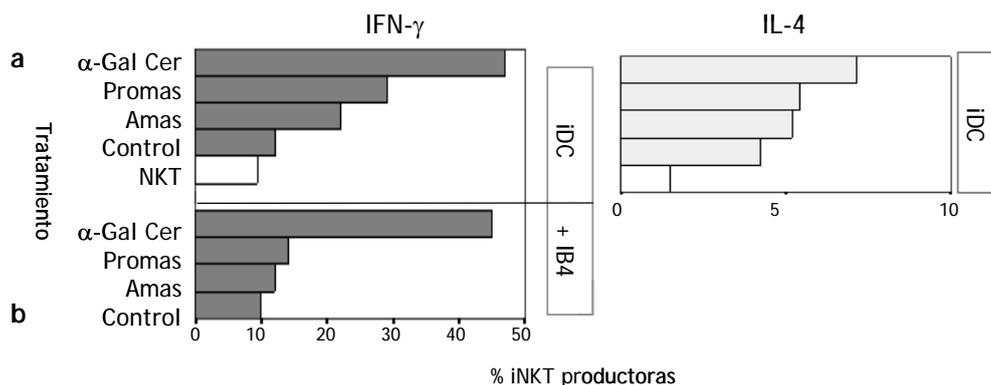


Figura 54.- Porcentaje de células iNKT productoras en los diferentes tratamientos: producción basal (NKT), dendríticas no infectadas (control), infectadas con Amastigote, promastigote o cultivadas con α -GalCer. a) de IFN- γ e IL-4, b) de IFN- γ tras bloqueo con IB4 en la producción de IFN- γ . Experimentos representativos de tres realizados.

Las células dendríticas infectadas estimularon las células iNKT en la producción de IFN- γ , más eficazmente que las no infectadas. La mayor estimulación de las células iNKT se produjo tanto a nivel de producción de IFN- γ y de actividad citolítica, como ya habíamos visto anteriormente. En ambos casos la estimulación quedó bloqueada tras el tratamiento con IB4, lectina que se une específicamente al enlace terminal α 1-3 entre dos galactosas, característico del ligando endógeno de CD1d, iGb3.

4.2.- Estudio de células iNKT frente a células dendríticas cultivadas con extractos antigénicos de *Leishmania infantum* o con LPG de *Leishmania donovani*.

Hemos visto que las células dendríticas aumentaron la expresión de CD1d en la superficie celular después de la infección con *Leishmania infantum*. Existía la posibilidad de que presentaran glicolípidos antigénicos de Leishmanias. La cubierta de las Leishmanias es rica en glicolípidos (GIPLs). El antígeno más conocido es el Lipofosfoglicano (LPG), abundante en la forma promastigote y casi ausente en amastigote de *L. infantum*. LPG, es un glicolípidos que se ha descrito como posible candidato para ser presentado por CD1d (Amprey, J.L. et al., 2004)

Se analizó el efecto que podía tener el cultivo de células dendríticas con extractos antigénicos de amastigote o promastigote de *Leishmania infantum*. EL LPG purificado de *L. donovani*, también fue incluido en nuestros estudios.

Al igual que con los parásitos, se estudió la expresión de CD1d en superficie. Las células dendríticas inmaduras, procedentes de monocitos de PBMCs expandidos durante 5 días con GM-CSF e IL-4 fueron cultivadas con extractos antigénicos y LPG añadidos al cultivo. Después de 48 horas, se midió la expresión de CD1d en la superficie celular. CD1d aumentó en las células dendríticas tratadas con estos antígenos, existiendo diferencias significativas (ANOVA) al comparar con células dendríticas sin tratamiento (Figura 55). Los niveles de expresión fueron comparables a los alcanzados tras la infección con las formas amastigote y promastigote de *L. infantum* (Figura 43).

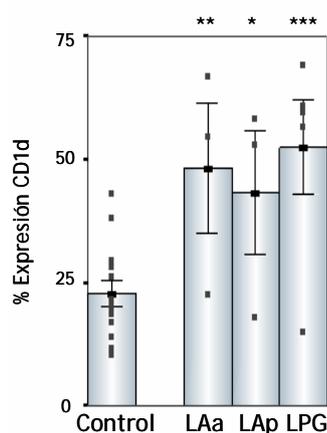


Figura 55.- Diferencias en el porcentaje de expresión de CD1d entre células dendríticas inmaduras (Control) (n=15) y: dendríticas con extracto antigénico de amastigote (LAa) (n=3) (**, p=0.0046), extracto de promastigote (LAp) (n=3) (*, p=0.015) y LPG (n=5) (***, p=0.0004). Se representa la media del porcentaje de expresión ± EEM.

Estos resultados obtenidos podrían explicarse por la presentación de CD1d del LPG, como en el caso del CD1d ratón (Amprey, J.L. et al., 2004). Con el fin de comprobar si el LPG se une a CD1d humano realizamos ensayos de unión y desplazamiento *in vitro* con α -GalCer y LPG, utilizando dímeros de CD1d:Ig. Los dímeros se unieron en un primer paso a α -GalCer o a LPG. Para comprobar la eficacia de la unión se realizaron ensayos de citometría de flujo con los dímeros CD1d:Ig y las células iNKT seleccionadas previamente. Los dímeros unidos a LPG no tiñeron las células iNKT. Posteriormente los dímeros que en un principio habían estado en contacto con uno de los antígenos, se pusieron con el contrario, LPG o α -GalCer, respectivamente. Al añadir α -GalCer a los dímeros ya tratados con LPG (en una concentración tres veces superior de ceramida) hubo un desplazamiento del ligando unido y las células iNKT se marcaron. En el caso contrario, fue necesario una concentración diez veces superior de LPG para que se produjera el desplazamiento de la ceramida. Las iNKTs perdieron así su unión al dímero (Figura 56). Estos resultados sugieren que el LPG de *L. donovani* puede unirse al CD1d humano, aunque con menor afinidad que α -GalCer.

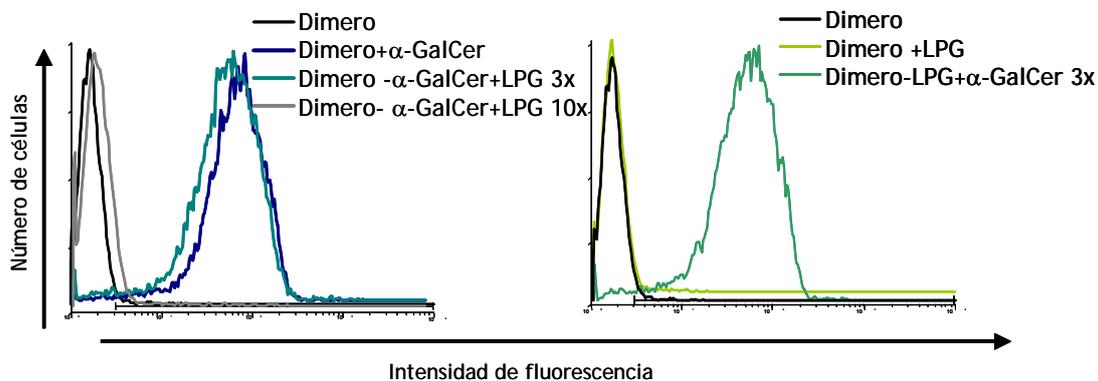


Figura 56.- Marcaje de iNKTs con dímero unido a antígeno glicolípido. Estudio de desplazamiento antigénico.

Como en el caso de células dendríticas infectadas *L. infantum* también se estudió la actividad citolítica y producción de citocinas en células iNKT autólogas puestas en contacto con células dendríticas cultivadas con extractos antigénicos y con LPG purificado:

4.2.1.- Actividad citolítica

La actividad citolítica de células iNKT autólogas enfrentadas a células dendríticas cultivadas con extractos antigénicos de *Leishmania infantum*, mostraron

un aumento del porcentaje de lisis comparado con las dendríticas sin tratamiento (Figura 57).

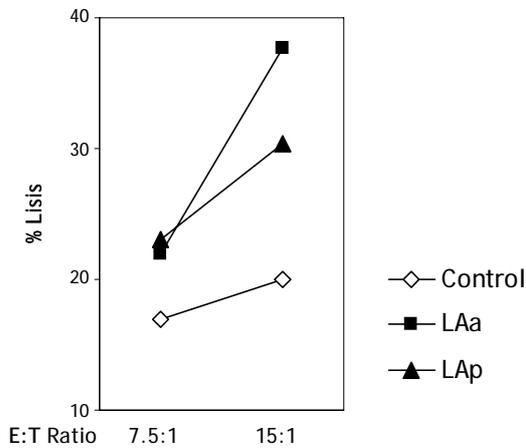


Figura 57.- Actividad citolítica de células iNKT autólogas frente a dendríticas inmaduras (control) o cultivadas con extractos antigénicos de amastigote (LAa) y promastigote (LAp). Ensayo representativo de dos realizados.

El Lipofosfoglicano (LPG) purificado de *Leishmania donovani*, fue cultivado con células dendríticas y se hicieron estudios para ver como se comportaba con respecto a la actividad citolítica de células iNKT autólogas. La posibilidad de que CD1d presentara LPG y no iGb3, hizo necesario medir la lisis con bloqueo de la lectina IB4 (Figura 58). Los porcentajes de lisis mostraron un aumento de la actividad lítica de células NKT enfrentadas a dendríticas cultivadas con LPG. Esta lisis fue revertida al bloquear con la lectina, existiendo diferencias estadísticamente significativas (ANOVA), entre células cultivadas con y sin LPG, y entre éstas últimas y las bloqueadas con lectina IB4.

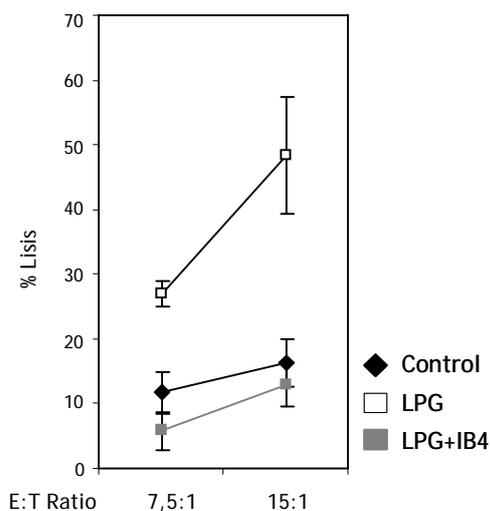


Figura 58.- Porcentaje de lisis de células iNKT (n=3). Existen diferencias significativas entre células control y cultivadas con LPG: E:T Ratio 7.5:1 (*, p= 0.034) y E:T 15:1 (*, p= 0.03). Y entre las dendríticas cultivadas con LPG sin bloqueo y bloqueadas con IB4: E:T Ratio 7,5:1 (**, p=0.0019) y 15:1 (*, p= 0.013).

4.2.2.- Producción de citocinas

Se midió la producción de citocinas de células iNKT autólogas estimuladas con células dendríticas cultivadas previamente con extractos antigénicos o con LPG. La producción de IFN- γ e IL-4 fue analizada en todos los tratamientos además de la producción basal de citocinas de células iNKT sin estar en contacto con dendríticas y las que habían estado co-cultivadas con células dendríticas sin tratamiento (control) (Figura 59a). Con LPG la producción de IFN- γ fue además estudiada con bloqueo de IB4 (Figura 59b). Los resultados fueron similares a los obtenidos cuando infectábamos las dendríticas con parásitos vivos. Se observó un aumento de células iNKT productoras de IFN- γ cuando se cultivaron con las células dendríticas tratadas con extractos antigénicos siendo más llamativo el aumento cuando las células dendríticas estuvieron cultivadas con extractos de promastigote o con LPG. El efecto del bloqueo con IB4 fue estudiado en células dendríticas tratadas con LPG obteniéndose una disminución de las iNKTs productoras. En la producción de IL-4 las mayores diferencias se observaron al comparar las células dendríticas cultivadas con extractos de promastigote con las dendríticas inmaduras sin tratamiento.

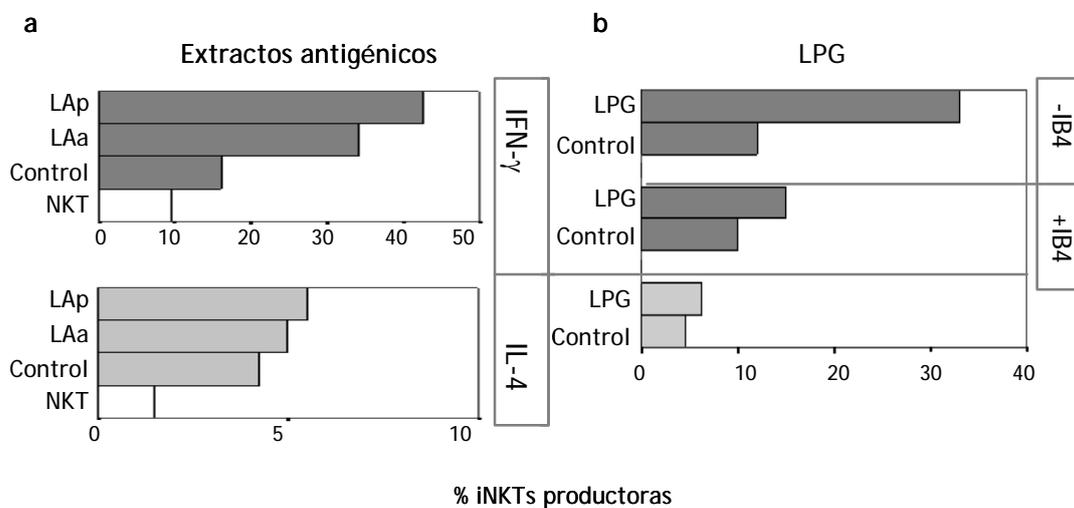


Figura 59.- Células iNKT productoras de IFN- γ e IL-4, frente a células dendríticas cultivadas con a) extractos antigénicos o b) LPG. Bloqueo con IB4 de producción de IFN- γ en dendríticas cultivadas con LPG. Experimento representativo de tres realizados.

El tratamiento de células dendríticas con extractos antigénicos de *L. infantum* y con LPG de *L. donovani*, al igual que el tratamiento con parásitos vivos, produjo un aumento de CD1d en la superficie celular que conllevó una mayor sensibilidad de las células tratadas a la lisis de células iNKT y una mayor capacidad para estimular a éstas en la producción de IFN- γ .

DISCUSIÓN

1.-ACTIVIDAD CITOLÍTICA DE CÉLULAS NK FRENTE A CÉLULAS DIANA CON EXPRESIÓN DE CD1d.

Las moléculas MHC de clase I poseen una importante función en la inmunidad adaptativa, ya que son capaces de presentar antígenos a linfocitos T específicos para comenzar la respuesta inmune. Las células NK, que forman parte de la inmunidad innata, inhiben su actividad citolítica al reconocer las moléculas MHC de clase I. El sistema CD1 se encuentra dentro de las moléculas MHC de clase Id y al igual que las moléculas MHC de clase I, pueden presentar antígenos a linfocitos T y pueden ser reconocidas por células NK. CD1a, -b y -c inhiben la lisis de células NK humanas (Carbone, E. et al., 2000), CD1d de ratón también inhibe la actividad de células NKs murinas (Chang, C.S. et al., 1999).

1.1.-Estudio de la actividad citolítica de células humanas NK frente a la sobreexpresión de CD1d en células diana.

Decidimos estudiar si las moléculas CD1d son capaces de inhibir las células NK humanas. Para ello utilizamos un modelo en el que las líneas celulares L721.221 y C1R, deficientes de HLA de clase I, fueron utilizadas como diana. Estas líneas fueron transfectadas con CD1d y se seleccionaron líneas con altos niveles de expresión de la proteína.

Nuestros resultados indicaron que las células NKs enfrentadas a células diana con sobreexpresión de CD1d (L721.221 y C1R) inhibieron su actividad citolítica comparando con los porcentajes de lisis obtenidos con las líneas diana control. El fenómeno observado fue reproducible usando cualquiera de las dos líneas celulares diana transfectadas. La inhibición obtenida frente a la expresión de CD1d, al utilizar PBMCs frescas de donantes sanos, fue comparable a la obtenida con líneas diana que sobreexpresaban HLA-B48 en su superficie. Las diferencias entre los porcentajes de lisis se hizo más significativa al utilizar células efectoras cultivadas con IL-2, ya fueran PBMCs o células NKs seleccionadas CD56⁺CD3⁻. De algún modo las células NKs cultivadas con IL-2 fueron más sensibles a la inhibición por CD1d. En trabajos previos (Chang, C.S. et al., 1999), se puso de manifiesto la necesidad de cultivar las células efectoras con IL-2 antes de su uso en ensayos de citotoxicidad para que se inhibieran frente a CD1d de ratón (Chang, C.S. et al., 1999). Posteriormente, el mismo grupo describió que sólo las células NKs de ratón cultivadas con IL-2 eran capaces de reconocer CD1d de ratón unido a microsferas, sugiriendo que la activación de células NKs con IL-2 era necesaria para permitir el crecimiento de una población NK

minoritaria con receptores para CD1d de ratón o para aumentar la expresión *de novo* de dichos receptores en toda la población (Huang, M.M. et al., 2004).

Los estudios con otras células efectoras, como la línea celular policlonal NKL y linfocitos T inmortalizados con *Herpesvirus saimiri* (HVS), corroboraron los resultados obtenidos con células NKs de donantes sanos e inhibieron su actividad citolítica en ensayos de citotoxicidad frente a las líneas celulares dianas transfectadas con CD1d. No todos los linfocitos T inmortalizados con HVS poseen actividad citolítica NK frente a la línea celular deficiente de HLA de clase I K562, diana en la que primeramente se describió este efecto (Biesinger, B. et al., 1992). Tampoco todas las líneas HVS fueron capaces de lisar las líneas celulares diana control utilizadas (L721.221 y C1R). Además de entre aquellas líneas que si poseían esta capacidad, no todas se inhibieron de la misma manera al reconocer las líneas con sobreexpresión de CD1d. La línea HVS-CTO fue de entre todas las estudiadas la que mayor porcentaje de inhibición presentó frente a la expresión de CD1d.

Cabe destacar que los porcentajes de lisis con la línea celular diana C1R fueron menores a los obtenidos con la otra línea diana utilizada, L721.221. La línea C1R expresa una pequeña cantidad de HLA-B35 y cantidades normales de HLA-Cw4 (Zemmour, J. et al., 1992), que puede inducir la expresión de HLA-E en la superficie celular. Aún así la alta expresión de CD1d en estas células transfectadas nos permitió encontrar diferencias en el porcentaje de lisis entre las células control y las transfectadas con CD1d.

La inhibición de la actividad citolítica NK frente a células que sobreexpresan CD1d podría haberse debido a un aumento en superficie de HLA-E unido al péptido líder de CD1d y a su reconocimiento por el receptor inhibitor NK CD94/NKG2A en las células efectoras. Las líneas celulares diana utilizadas tienen defectos en la expresión de moléculas HLA de clase Ia, pero la expresión de HLA-E no se encuentra alterada, tan solo no se expresa en superficie por ausencia de péptidos líderes. La secuencia peptídica que puede presentar HLA-E y que reconoce eficazmente el receptor inhibitor CD94/NKG2A (Vales-Gomez, M. et al., 1999) no se encuentra en el péptido líder de CD1d humano (Porcelli, S.A., 1995), como se observa en la tabla 5.

Péptido líder CD1d humano	MGCLLFLLLWALLQAWGS
Péptido líder de HLA-G (Secuencia de unión a HLA-E)	V MAP <u>RTL</u> FL

Tabla 5.- Secuencias de los péptidos líderes de CD1d y de HLA-G. El péptido líder de HLA-G es reconocido por el receptor inhibitor CD94/NKG2A. Cambios en las posiciones P2, P3 y P7 (subrayados) alteran indirectamente la unión y cambios en P6 y P8 (negrita) afectan directamente la unión.

De modo que la única explicación a la inhibición de la actividad NK observada fue por el reconocimiento de CD1d. Así lo confirmaron los resultados obtenidos de bloqueo con anticuerpos monoclonales. El F(ab')₂ del anticuerpo específico para CD1d (CD1d42) pudo revertir la inhibición inicialmente observada, llegando en algunos casos a los porcentajes de lisis obtenidos con las líneas celulares control.

En los ensayos de citotoxicidad fueron utilizados distintos tipos de células efectoras; células NK CD56⁺CD3⁻ procedentes de donantes sanos y líneas celulares con actividad NK, como la NKL y los linfocitos T inmortalizados con HVS. Todos ellos inhibieron su actividad citolítica al reconocer CD1d en la superficie celular. CD1d es una molécula no polimórfica que debe ser reconocida por un receptor inhibidor conservado expresado en células NK y algunas células T. Los receptores inhibidores tipo inmunoglobulina y tipo lectina C se pueden expresar en ambos tipos celulares, de modo que podría tratarse de cualquiera de ellos. No se observaron diferencias en los porcentajes de inhibición al utilizar células NK CD56⁺CD3⁻ de distintos donantes, lo que nos muestra que no existe mucha diferencia en la expresión celular de este receptor en los donantes tras un cultivo de varios días con IL-2.

Recientemente se ha publicado un trabajo en el que se describe la unión *in vitro* de un receptor tipo inmunoglobulina y la molécula CD1d1 de ratón. CD160 se expresa en células NKs, NKTs y células T CD8⁺, posee una función reguladora en la producción de citocinas de éstas células, aunque se desconoce su papel en la actividad citolítica NK (Maeda, M. et al., 2005).

1.2.-Efecto de α y β -GalCer presentado por CD1d.

Las moléculas CD1 presentan antígenos endógenos o exógenos de naturaleza lipídica y podrían tener un papel en la inmunidad innata como indicadores de infección en la respuesta mediada por células NKs. La única diferencia radicaría en que, en lugar de presentar péptidos como hacen las moléculas MHC de clase I, presentarían, entre otros, glicolípidos de origen bacteriano, que las moléculas MHC de clase I les es imposible unir.

En los trabajos de Carbone, E. et al., 2000, estudiaron el efecto de la presentación de antígenos lipídicos por moléculas del sistema CD1 sobre la actividad de células NK. En estos estudios, se observó que las células transfectadas con CD1b mostraron una mayor protección frente a la actividad citolítica NK cuando tenían unido ácido micólico de *Mycobacterium tuberculosis*. Esto podría implicar un mecanismo de evasión de la respuesta inmune, ya que la unión del antígeno bacteriano favoreció el reconocimiento del ligando inhibidor NK en la célula efectora.

CD1d es capaz de presentar distintos tipos de glicolípidos gracias a su profunda hendidura hidrofóbica de unión antigénica. α -GalCer es el antígeno sintético más conocido, por esta razón decidimos estudiar el efecto de esta ceramida presentada por CD1d en nuestros ensayos de citotoxicidad. También estudiamos el efecto de β -GalCer que tan solo se diferencia de α -GalCer en la unión del azúcar a la ceramida y comprobar si afectaba ese cambio en el reconocimiento por el receptor inhibidor NK. El estudio de antígenos específicos de CD1d nos permitió abordar de otro modo la especificidad de la inhibición producida por CD1d.

Las células diana con α -GalCer unida a CD1d y enfrentadas a células con actividad NK $CD56^+CD3^-$ fueron lisadas más eficientemente que cuando no estaban unidas a esta ceramida. Sorprendentemente, el vehículo (Polisorbato-20) en que estaba disuelta la ceramida causó el mismo efecto sobre la actividad NK haciendo imposible discernir cual era el causante de la eliminación de la protección. El Polisorbato-20 (P-20) o Tween-20 es un detergente que permite a la ceramida disolverse. Al tratarse de un detergente podría producir cambios en la estructura lipídica de la membrana celular haciéndola más sensible a la lisis y esto explicaría el fenómeno que observábamos, aunque dado que las células diana HLA-B48.221 y CD1a.221 tratadas con P-20 o α -GalCer mantuvieron la inhibición frente a la actividad lítica NK, no nos hizo pensar que el tratamiento con detergente aumentara la sensibilidad a la lisis de las células diana, de modo que dicha hipótesis fue descartada. También podría ocurrir que el P-20 alterara de algún modo el ligando endógeno que presenta CD1d, que es de naturaleza lipídica. Esta modificación influiría en el reconocimiento entre el receptor inhibidor y el CD1d de la célula diana. Con el fin de aclarar este punto, decidimos utilizar α -GalCer disuelta en otro solvente orgánico, en este caso DMSO. Obtuvimos resultados que claramente diferenciaban el efecto causado por la ceramida del efecto del tratamiento control con DMSO. La ceramida unida a CD1d eliminó la protección que la expresión de esta molécula ofrecía al presentar antígenos de naturaleza endógena.

Además, β -GalCer causó el mismo efecto sobre la actividad citolítica NK, tanto la ceramida extraída de extractos de cerebro bovino como la sintética, β -GalCer C12. Las ceramidas estaban disueltas en DMSO, que no produjo ningún efecto al ser cultivado con las células dianas. En estos experimentos se usaron como control otras células dianas transfectadas con moléculas que inhiben la actividad citolítica NK, como son CD1a y HLA-B48 que fueron cultivadas con ambas ceramidas (en experimentos independientes) y no se observaron cambios en sus porcentajes de

inhibición al comparar con las células sin tratamiento o cultivadas con DMSO. Por lo que el efecto de α y β -GalCer es específico de CD1d.

Es de destaca que el cultivo con estas ceramidas no modificó los niveles de expresión en superficie de CD1d en las células transfectadas. Además se estudió si el mismo efecto de reversión de la inhibición podía ser causado por otro glicolípido presentado por CD1 en las células diana. El cultivo con ácido micólico no produjo cambios en el porcentaje de inhibición de las células efectoras. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que el aumento de lisis de las células diana CD1d.221 tratadas con α o β -GalCer que observamos, no fue causado por el efecto de las ceramidas sobre las células diana, siendo además específico ya que otros glicolípidos como el ácido micólico no tuvieron efecto. Por lo tanto, parece lógico pensar que las diferencias en porcentaje de lisis fueron causadas por cambios en el reconocimiento entre la célula efectora y el CD1d de la diana.

La interpretación más lógica de los resultados obtenidos es que tanto α -GalCer como β -GalCer se unen a CD1d y podrían desplazar al ligando endógeno de CD1d, que sería importante para la correcta interacción con el receptor inhibitor de la célula NK. Esto implica que la estructura del ligando, y no solo la simple expresión de CD1d, sería importante para su correcto reconocimiento por al célula efectora (Figura 60). Los resultados obtenidos con el vehículo, P-20, también apoyarían esta hipótesis. El P-20 es un detergente no-iónico con región hidrofílica y cadena acilo, capaz de romper la interacción entre lípidos o entre éstos y proteínas. El DMSO, carece de esta capacidad y no actúa directamente sobre el lípido, interacciona con átomos de hidrógenos de las moléculas de agua, aumentando la polaridad y solubilidad de lípidos en solución.

Siguiendo en la línea de intentar confirmar la importancia del ligando que presenta CD1d, las células efectoras fueron marcadas con tetrámeros de CD1d unidos a α -GalCer, no observándose tinción celular. Estos resultados son similares a los descritos en ratón por Ortaldo, J.R. et al., 2004, en los que incluyen además estudios con tetrámeros de CD1d cargados con β -GalCer, que tampoco se unen a células NK. La falta de unión podría deberse a una baja expresión del receptor inhibitor con escasa afinidad además por su ligando, aunque otros receptores inhibidores NK si son capaces de unirse a tetrámeros de sus ligandos, descrito en trabajos anteriores ((Vance, R.E. et al., 1998);(Hanke, T. et al., 1999)). En los estudios con CD1d de ratón, se pudo comprobar la existencia de una población de NKs que reconocía CD1d cargado con α -GalCer y unidos a microesferas del mismo tamaño que una célula, pero no se unían a CD1d en forma de tetrámeros. Los autores del trabajo interpretan

esto en términos de afinidad y avidéz. Esto es, la unión del receptor a CD1d tendría muy baja afinidad, y sólo sería detectable en situaciones de alta avidéz (una célula o una esfera del tamaño de una célula) (Huang, M.M. et al., 2004). Fusionando estos resultados y los nuestros, nos llevaría a pensar en la existencia de un receptor en la célula NK capaz de reconocer CD1d unido a la ceramida que no produce inhibición de la actividad citolítica, tal como observamos en nuestros resultados y que por falta de avidéz no lo detectamos con el tetrámero de CD1d unido α -GalCer, y otro receptor que reconoce CD1d unido a ligando endógeno que produce inhibición de la actividad lítica de la célula efectora.

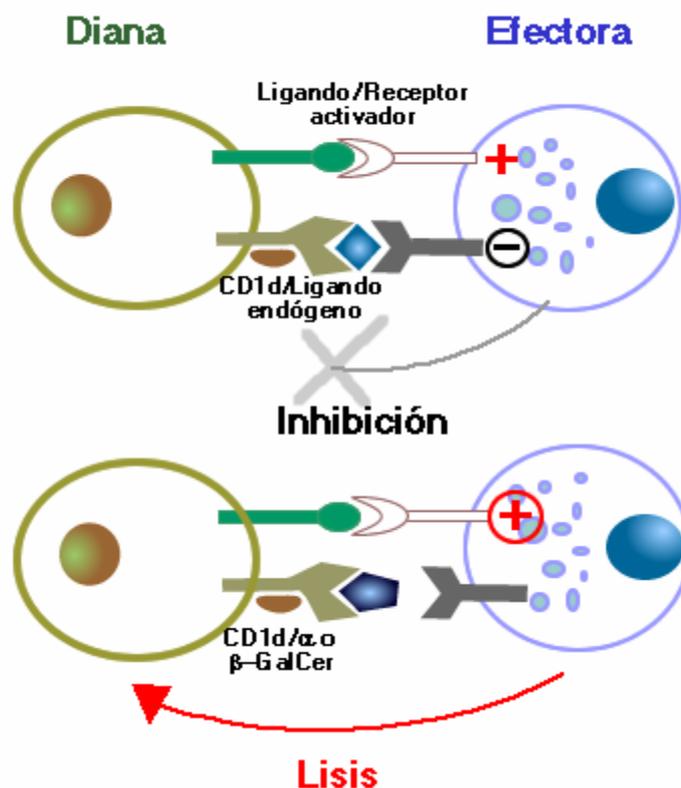


Figura 60.-Dibujo representativo del reconocimiento de CD1d y su ligando por células NKs. CD1d unido a α o β -GalCer no es reconocido por el receptor inhibidor y no señaliza, no así el CD1d unido a ligando endógeno cuya señalización bloquea la señal del receptor activador.

El significado fisiológico de estos hallazgos no está claro. Por una parte no hay que olvidar que el modelo *in vitro* utilizado es un sistema artificial en el que se observa el efecto de la expresión de CD1d en células que carecen totalmente o casi totalmente de HLA de clase I. Además la expresión de CD1d de nuestros transfectantes es mucho más alta de lo que se espera encontrar *in vivo*.

Decidimos investigar las posibles implicaciones del aumento o disminución de CD1 en un modelo de infección por *Leishmania*.

2.-CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS INFECTADAS POR AMASTIGOTE Y PROMASTIGOTE DE *Leishmania infantum*.

Las células dendríticas son las únicas capaces de presentar antígenos a linfocitos T vírgenes, lo que les confiere un importante papel en la presentación antigénica. Esta función la pueden realizar, entre otros motivos, gracias a la expresión de moléculas MHC de clase I y II, también presentan moléculas del sistema CD1, tanto del grupo I como del grupo II. La expresión de moléculas del sistema CD1 del grupo I disminuye tras la infección de células dendríticas por el parásito intracelular *Leishmania donovani*, según se publicó recientemente (Amprey, J.L. et al., 2004). Por otro lado es bien conocida la interrelación que existe entre células dendríticas y células NK, pudiendo éstas últimas lisar las células dendríticas inmaduras. Los parásitos del género *Leishmania* tienden a evitar la maduración de la célula infectada para el mejor establecimiento de la infección (Brandonisio, O. et al., 2004). Todos estos argumentos nos llevaron a estudiar el papel fisiológico de CD1d expresado en las células dendríticas infectadas por *Leishmania* y su relación con la actividad citolítica de células NK. Para ello decidimos utilizar un modelo de infección *in vitro*, en el que las células dendríticas derivadas de monocitos fueron infectadas con *L. infantum*.

Las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica expresan DC-SIGN en su superficie y fueron eficazmente infectadas por *L. infantum* tras dos días en cultivo. DC-SIGN es un receptor capaz de unir amastigote y promastigote de *Leishmania infantum* (Colmenares, M. et al., 2004), que se encuentra dentro de los receptores lectina tipo C (*Pathogen Recognition Receptors*, PRRs).

2.1.-Estudio de marcadores de maduración en células dendríticas infectadas con *L. infantum*.

Las células dendríticas tras la captura de un patógeno pasan a un estado de maduración. En la infección de células dendríticas por parásitos intracelulares del género *Leishmania*, existe cierta controversia acerca de la capacidad de maduración, que depende de cual sea el origen de las células infectadas y cuales las especies del parásito que infecten. El hecho de que impidan la maduración se considera como un mecanismo de evasión, que permite el establecimiento de la infección antes del comienzo de la respuesta adaptativa que se inicia con la maduración de las células dendríticas. Marcadores clásicos de maduración son las moléculas presentadoras de antígeno (HLA de clase I y clase II) y moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40), todos ellos fueron analizados en nuestro trabajo. Tras la infección de células

dendríticas con *L. infantum* no observamos aumento de expresión en superficie de ninguna de estas moléculas ni con amastigote ni con promastigote, fenómeno ya descrito en la infección con amastigote de *L. infantum* (Caparrós E. et al., 2005). Las células dendríticas infectadas por *L. infantum* no maduraron comparando con los niveles de marcadores de maduración que se obtuvieron con las células dendrítica cultivadas con LPS. La entrada de amastigote y promastigote de *L. infantum* es independiente de los TLR expresados en las células dendríticas, aunque se han descrito algunas especies de *Leishmania* capaces de señalar a través de MyD88, molécula adaptadora común a TLR, induciendo maduración de las células dendríticas (Brandonisio, O. et al., 2004). *L. infantum* interacciona con el receptor DC-SIGN y según nuestros resultados podría sugerir que no está dando señales de maduración a la célula dendrítica infectada.

La expresión de moléculas del sistema CD1 también fue analizada en nuestro trabajo. Las células dendríticas infectadas con *L. infantum*, a diferencia de los resultados previamente publicados con *L. donovani* (Amprey, J.L. et al., 2004), no disminuyeron la expresión de moléculas CD1a. La falta de similitud que existen entre la biología de ambas especies podría explicar la variación en la expresión de moléculas CD1 del grupo I después de la infección (Wilson, M.E. et al., 2005). También analizamos la expresión de CD1d, y sorprendentemente observamos un aumento de células dendríticas infectadas con amastigote y promastigote que expresaban CD1d en superficie. El máximo de expresión se alcanzó al final de nuestro periodo de infección, a las 48 horas. La expresión de CD1d en células dendríticas derivadas de monocitos disminuye con respecto a la expresión inicial en monocitos, aunque células dendríticas activadas con PPAR γ inducen la expresión de CD1d tras una disminución inicial (Szatmari, I. et al., 2004). En un intento de estudiar que mecanismos actuaban en el aumento de expresión de CD1d que observábamos, trabajamos con RSG (análogo de PPAR γ) y GW9662 (antagonista de PPAR γ), pero los resultados mostraron que los niveles de CD1d expresados eran independientes del efecto de PPAR γ y de su antagonista. No obstante, podríamos especular que partiendo de la baja expresión de CD1d que tienen las células dendríticas inmaduras sería necesaria la inducción de RNA tras la infección. La señal que podría dirigir esta inducción es una cuestión difícil de abordar, podría deberse a la mayor disponibilidad de ligando para CD1d, ya fuera por una mayor actividad enzimática que generara más cantidad de ligandos o por la presencia de antígenos lipídicos del parásito que fueran ligandos directos o precursores de ligandos para CD1d. También la mayor expresión

de CD1d podría inducirse por la actividad del propio parásito o incluso por una señalización inicial de contacto parasitario.

2.2.-Actividad citolítica de células NKs frente a células dendríticas infectadas con *L. infantum*.

Las células NK autólogas y heterólogas son capaces de lisar células dendríticas inmaduras, en la activación de estas células está implicado el receptor activador NKp30. Las células dendríticas maduras, por el contrario, son resistentes a esta actividad lítica. Las células dendríticas infectadas con *L. infantum* (amastigote o promastigote) a pesar de no madurar fueron resistentes a la actividad citolítica de células NKs autólogas, alcanzándose unos niveles de lisis similares a los obtenidos con las células dendríticas maduras. Nuestra hipótesis inicial fue que el incremento de CD1d observado en la superficie de las células dendríticas infectadas podría actuar protegiéndolas de la lisis de las células NKs. Esta hipótesis fue descartada tras realizar ensayos de bloqueo con anticuerpos específicos, que excluyeron un papel relevante de CD1d en la inhibición de la actividad lítica NK.

Otra posible explicación se basaba en la aparición de cambios en la célula infectada que pudieran impedir la actividad citolítica NK, ya fuera por una disminución en la expresión de moléculas como CD40, o del ligando del receptor activador NKp30. Aunque los experimentos de citometría de flujo mostraron que los niveles de ligando de NKp30 y CD40 no disminuyeron tras la infección en la célula dendrítica.

Por último, realizamos estudios de expresión de HLA-E en la superficie celular de las células dendríticas y observamos un aumento significativo de dicha molécula después de la infección. Las células dendríticas inmaduras infectadas con amastigote o promastigote de *L. infantum* aumentaron la expresión de HLA-E en la superficie celular, aunque no a niveles tan altos como los obtenidos en las células dendríticas maduras con LPS. Una posible explicación para este aumento es que la infección con *L. infantum* aumentara la expresión de moléculas distintas de HLA con péptidos capaces de ser presentados por las moléculas HLA-E, como es el caso descrito de la proteína MRP7 (*Multidrug resistance -associate protein 7*), que se expresa bajo condiciones de estrés celular por calor, y cuyos péptidos derivados de la región transmembranal son presentados por HLA-E (Wooden, S.L. et al., 2005). También podría ocurrir que HLA-E presentara péptidos derivados del ciclo vital de *L. infantum*, tanto de la forma amastigote como de la promastigote, en este sentido también encontramos antecedentes en la bibliografía en los que se describe como HLA-E es

capaz de presentar el péptido líder de la glicoproteína UL40 del citomegalovirus humano (Tomasec, P. et al., 2000). Una última posibilidad sería que HLA-E se estabilizara en la superficie celular después de la infección con el parásito, por otro tipo de mecanismos.

Aunque los niveles de expresión de HLA-E en células infectadas no fueron tan altos como en células dendríticas maduras, si fueron suficientes para inhibir la actividad citolítica de células NK. Así lo demostraron los bloqueos realizados con el anticuerpo específico para HLA-E (3D12) que revertieron la inhibición y se alcanzaron valores líticos próximos a los obtenidos con las células dendríticas inmaduras no infectadas. También fue bloqueado el receptor inhibidor CD94/NKG2A en las células efectoras, de modo que la población de células NKs con expresión mayoritaria de CD94/NKG2A perdió la señal inhibidora y solo se mantuvo la señal del receptor activador.

EL receptor inhibidor CD94/NKG2A reconoce HLA-E, pero en la unión influye además el péptido que este presentando HLA-E, no todos los complejos HLA-E/péptido señalizan inhibición (Vales-Gomez, M. et al., 1999). Por tanto, la inhibición que observamos no sólo fue causada por el aumento de HLA-E en la superficie celular también fue necesario que el péptido que estuviera presentando fuera reconocido por CD94/NKG2A y produjera inhibición.

Las células dendríticas infectadas con *L. infantum* no maduran, lo que se cree puede ser un mecanismo de evasión de la respuesta inmune de estos parásitos, que dificultaría la activación de células T. Estas células dendríticas inmaduras podrían entonces ser eliminadas por las células NK. Sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo, sugieren que tampoco las células NK podrían activarse y reconocer las células dendríticas infectadas, ya que son inhibidas a través de su receptor CD94/NKG2A. Esto está de acuerdo con datos de otros autores en los que se indicaba la escasa importancia de las células NK en la respuesta inmune frente a este parásito (Solbach, W. et al., 2000).

2.3.-Actividad citolítica y producción de citocinas de células iNKTs frente a células dendríticas infectadas con *L. infantum*.

En los experimentos realizados se observó un incremento de CD1d en la superficie celular de las células dendríticas infectadas con *L. infantum* y también en las cultivadas con extractos antigénicos de amastigote o promastigote de *L. infantum* y en las cultivadas con LPG de *L. donovani*. Esta expresión de CD1d puede ser relevante fisiológicamente en las infecciones por *L. infantum*. Nuestros resultados *in*

vitro indican que la expresión de CD1d es reconocida eficientemente por las células iNKT, que actúan lisando las células diana que sobreexpresan CD1d. Además estas células efectoras sintetizan IFN- γ , pero no IL-4.

Se ha descrito que las células NKTs pueden ser activadas de dos modos frente a una infección bacteriana. Por un lado, pueden reconocer el antígeno endógeno iGb3 presentado por CD1d. La respuesta se amplifica gracias a la IL-12 producida por las células dendríticas en respuesta a la señalización vía TLRs del LPS bacteriano. Otro modo de activación es a través del reconocimiento de glicosilceramidas exógenas procedentes de bacterias Gram-negativas LPS-negativas (*Ehrlichia muris* y *Sphingomonas capsulate*) donde no es necesario la IL-12 (Mattner, J. et al., 2005). El ligando endógeno iGb3 posee un enlace Gal α 1-3Gal en el extremo terminal, al que se une la lectina IB4 y bloquea el reconocimiento de las células NKTs (Zhou, D. et al., 2004).

Tanto la actividad citolítica como la producción de IFN- γ de células iNKTs que expandimos de distintos donantes, disminuyó tras el tratamiento de las células dendríticas con la lectina IB4. De modo que el ligando que estaba presentando CD1d a las células iNKTs poseía el enlace Gal α 1-3Gal en el extremo terminal. Una posibilidad podría ser que CD1d estuviera presentando iGb3 u otro lípido de la *Leishmania*, a las células iNKT y que éstas se activaran.

Fue interesante comprobar que tras el cultivo con LPG de *L. donovani* obtuvimos los mismos resultados, tanto de activación de iNKTs en citotoxicidad como de producción de IFN- γ : todos ellos fueron bloqueados con IB4. Este hecho nos llevó a pensar que este compuesto entraba dentro de la célula y era capaz de activar los mismos mecanismos que las formas amastigote y promastigote de *L. infantum*. Dado que el LPG es capaz de desplazar la α -GalCer presentada por CD1d de ratón (Amprey, J.L. et al., 2004), cabía la posibilidad que un compuesto derivado de éste con enlace terminal Gal α 1-3Gal fuera presentado por CD1d. El lugar de anclaje del LPG esta formado por fosfatidilinositol (PI) elemento capaz de unirse a la hendidura de CD1d, el Glucosilfosfatidilinositol (GPI) ya había sido descrito como ligando de CD1d por su unión a través de PI (Joyce, S. et al., 1998). La estructura bioquímica del LPG nos muestra además la presencia del enlace Gal α 1-3Gal, dentro del dominio de fosfoheptasacáridos del LPG (Turco, S.J. et al., 1987) (Figura 61). Por lo tanto cabría la posibilidad teórica de que por degradación enzimática se produjera un compuesto derivado del LPG con enlace Gal α 1-3Gal terminal.

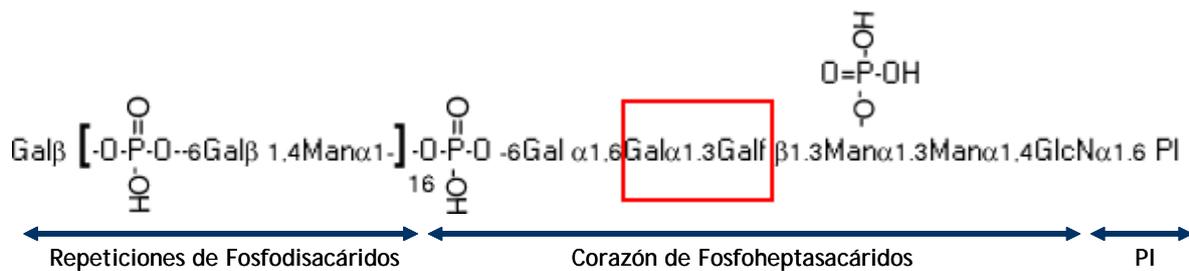


Figura 61.- Estructura bioquímica de LPG, *Leishmania donovani*.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que las células NKTs no se marcaron con los dímeros de CD1d cargados con LPG, estas células efectoras no reconocieron el LPG sin modificar presentado por CD1d, apoyando la posibilidad de que en nuestros ensayos funcionales, las células NKT fueron activadas por compuestos derivados del LPG y no por el propio LPG. Respecto a la infección natural con la forma amastigote de *L. infantum* carente de LPG, podría presentar compuestos derivados de GIPLs muy abundantes en su cubierta. En la bibliografía se encuentran referencias a la importancia del papel de células NKTs en la respuesta inmune en relación a la posibilidad de que CD1d presente glicolípidos de la cubierta de la *Leishmania* (el LPG y otros GIPLs de *L. donovani*), las células NKT del hígado responden produciendo IFN- γ (Amprey, J.L. et al., 2004). También se ha descrito la importancia de células NKT en la respuesta temprana en infecciones de ratón por *L. major* (Ishikawa, H. et al., 2000).

Retomando el tema de la expresión de CD1d, el aumento fue observado en las células dendríticas infectadas o cultivadas con extractos antigénicos de *L. infantum* y cultivadas con LPG de *L. donovani*, se descartó así la explicación de que el incremento de la expresión fuera causado por la propia actividad del parásito en el interior celular, ya que tanto los extractos antigénicos como el LPG fueron capaces de reproducirlo. Esto nos llevaría a pensar en una señalización celular común a todos los tratamientos que aumentara la transcripción de CD1d, ya fuera provocada por un contacto a nivel de superficie celular o a nivel intracelular. DC-SIGN no parece ser el encargado de transmitir esta señal, ya que aunque es el receptor al que se une *L. infantum* antes de su internalización, la unión es independiente de LPG (Colmenares, M. et al., 2004) y tanto el parásito como este compuesto produjeron aumento de CD1d en la superficie celular de la célula dendrítica inmadura. Como alternativa, los TLR no solo se expresan en la superficie celular, también pueden estar presentes en otros compartimentos celulares. Ligandos endógenos producidos por estrés o daño celular pueden estimular éstos receptores endógenos (Akira, S. et al., 2001). En la infección por *L. infantum* se podrían haber producido cambios en algunos

componentes celulares que estimularan TLR endógenos u otros receptores que estuvieran presentes, y señalizaran inducción de la transcripción de CD1d.

Los monocitos poseen una alta transcripción de CD1d que disminuye cuando se diferencian a células dendríticas (Szatmari, I. et al., 2004), por tanto, una posibilidad sería que tras la infección de *L. infantum* se reiniciara la transcripción de mRNA para CD1d. Otra posibilidad, sería que CD1d fuera re-expresado en la superficie gracias a la disponibilidad de ligando apropiado. El ligando para CD1d podría ser iGb3 u otro cualquiera derivado de los glicolípidos del parásito (LPG o GIPLs). Incluso la mayor disponibilidad de ligando podría señalar la transcripción de CD1d. Una mayor cantidad de iGb3 podría venir dada por un aumento de la actividad enzimática de β -hexosaminidasa que degrada iGb4 en iGb3, tras la infección. Incluso por la pérdida de actividad de enzimas lisosomales que degradan el iGb3. Algunas sustancias secretadas por las Leishmanias pueden inhibir la actividad de enzimas lisosomales, como es el caso de la galactosidasa (El On, J. et al., 1980);(Chakraborty, P. et al., 1989)). Esta enzima puede degradar iGb3 en glucosilceramidas, de modo que iGb3 se acumularía en los lisosomas y estaría disponible para su unión a CD1d.

2.4.-Respuesta inmune innata frente a *L. infantum*.

Teniendo en cuenta todos los resultados y a modo de resumen cabe destacar que las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos infectadas con *L. infantum* no sufren un proceso de maduración. Trabajos previos realizados con amastigote de *L. infantum*, ponen además de manifiesto la falta de migración CCR7 dependiente de las células dendríticas infectadas (Caparrós E. et al., 2005). Esto impediría la migración a los nódulos linfáticos donde comienza la respuesta inmune con la activación de linfocitos T. La respuesta inmune eficaz tras la infección de parásitos es la tipo Th1, que comienza con la producción de $INF\gamma$. Las células NKs pueden migran a los focos de infección siendo capaces de activarse y producir $IFN-\gamma$. Después de la infección con *L. infantum* las células dendríticas estarían recluidas en el foco de infección e interaccionarían con las células NKs. Las células NK, podrían comenzar la respuesta inmune actuando frente a las células infectadas ya que éstas permanecen en estado inmaduro, pero tras la infección y según nuestros resultados, se produciría un aumento de expresión de HLA-E que evitaría el comienzo de la actividad lítica de las células NK. Los receptores inhibidores regulan tanto la actividad citotóxica como la producción de citocinas por parte de las células NKs (D'Andrea, A. et al., 1996), así la señal del receptor inhibidor CD94/NKG2A tampoco

aumentaría la producción de IFN- γ , importante para el comienzo de la respuesta Th1 y para activar a las dendríticas y macrófagos infectados en la eliminación del parásito.

Por otra parte frente a la infección por *L. infantum* se podría producir una activación de células NKTs que migraran al foco de infección, y reconocieran el CD1d expresado en las células dendríticas infectadas. En el caso de una infección con Leishmanias que producen inflamación visceral, como es el caso de *L. infantum* la producción de IL-12 está disminuida (Ghalib, H.W. et al., 1995), de modo que las células NKTs solo recibirían señal a través del CD1d que les presentaría un antígeno endógeno o exógeno procedente de la *Leishmania*, pero con la secuencia glucídica terminal Gal α 1-3Gal. Las células NKT aumentarían su actividad citolítica y serían capaces de eliminar las células dendríticas inmaduras infectadas que no habían sido eliminadas por las células NKs. Además podrían producir IFN- γ necesario para el comienzo de la respuesta inmune Th1 y la activación de células fagocíticas que eliminaran estos parásitos intracelulares a través de las especies reactivas de óxido nítrico (NO) y oxígeno (O_2^- y $H_2 O_2$), que son eficientes moléculas efectoras en la eliminación de Leishmanias (Murray, H.W., 1981).

El IFN- γ producido por las células NKT pueden favorece la maduración de las células dendríticas. Este efecto sólo ha sido descrito cuando las células NKT son activadas con α -GalCer pero no con otro tipo de estimulación (Kronenberg, M., 2005). Sin duda cabe la posibilidad que las células NKTs llegadas al foco de infección podrían madurar las células dendríticas infectadas con *L. infantum* después de unirse al CD1d aumentado tras la infección. También se ha descrito que las células NKT pueden estimular las células dendríticas en la producción de IL-12 por contacto CD40L/CD40 (Kronenberg, M., 2005). La IL-12 esta disminuida en la Leishmaniasis visceral (Ghalib, H.W. et al., 1995) pero la expresión podría aumentar como hemos argumentado por acción de estas células NKTs activadas. La IL-12 dirigiría la respuesta inmune a tipo Th1 (con producción de IFN- γ) además de activar a células NK tanto en la producción de citocinas (IFN- γ) como en su actividad citolítica inhibida en un principio por la expresión de HLA-E en la célula dendrítica infectada (Figura 62).

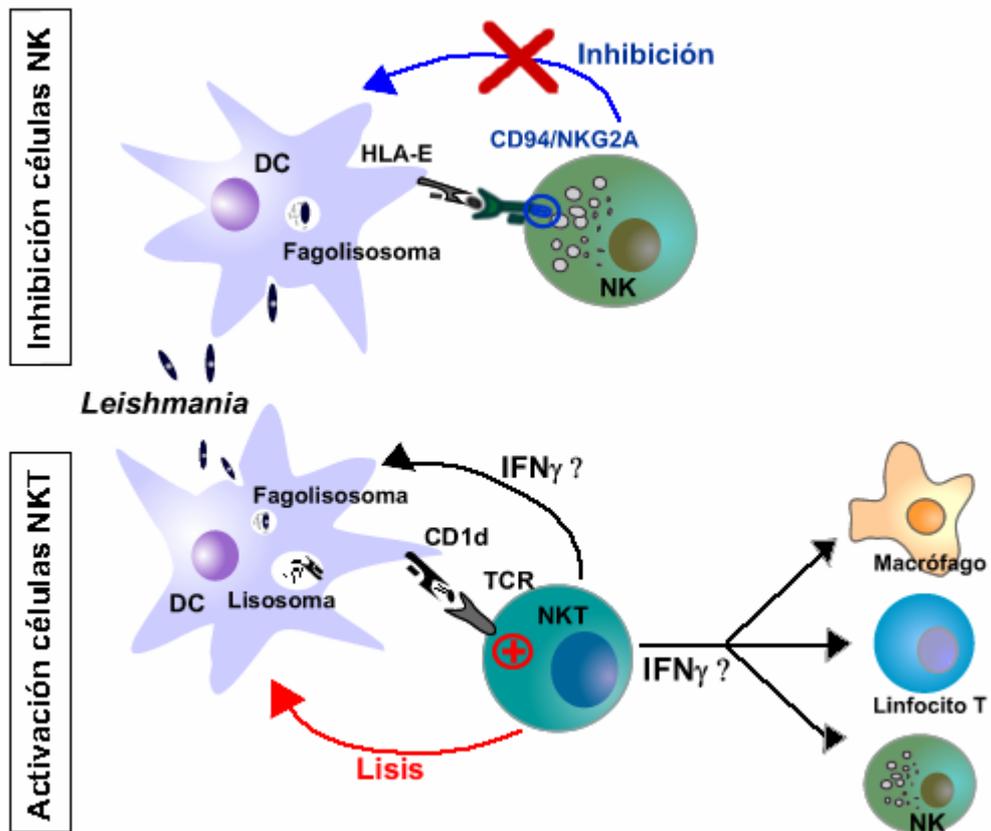


Figura 62.- Esquema representativo de respuesta inmune tras la infección de células dendríticas con *L. infantum*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión de CD1d humano en células diana deficientes de HLA de clase I, inhibe la actividad de células citolíticas NK.
2. La presentación de ligandos diferentes del endógeno por CD1d, como son α y β -GalCer, elimina la protección que posee la expresión de CD1d sobre la actividad citolítica NK, lo que sugiere que la inhibición de la actividad NK mediada por CD1d es dependiente de ligando.
3. Las células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos de sangre periférica, fagocitan eficientemente los parásitos de *Leishmania infantum*. Sin embargo, esta fagocitosis no induce la expresión de marcadores de maduración.
4. Las células dendríticas infectadas con *L. infantum* se protegen de la lisis mediada por células NKs gracias al aumento de expresión de HLA-E en superficie.
5. En células dendríticas infectadas con *L. infantum* no se ve modificada la expresión de moléculas CD1a, que forma parte de moléculas CD1 del grupo I. Por el contrario, se observa un incremento significativo de CD1d tras la infección o cultivo con extractos antigénicos de *L. infantum* y tras el cultivo con LPG de *L. donovani*.
6. Las células iNKT reconocen eficientemente las células dendríticas inmaduras infectadas por *L. infantum*, y responden frente a ella produciendo lisis celular e IFN- γ .
7. El reconocimiento de las células dendríticas inmaduras infectadas por las células iNKTs es bloqueada por la lectina IB4, lo que implica que el ligando que presenta CD1d posee el enlace glucosídico terminal Gal α 1-3 Gal.

BIBLIOGRAFÍA

A

1. Aebischer, T., C. L. Bennett, M. Pelizzola, C. Vizzardelli, N. Pavelka, M. Urbano, M. Capozzoli, A. Luchini, T. Ilg, F. Granucci, C. C. Blackburn, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2005. A critical role for lipophosphoglycan in proinflammatory responses of dendritic cells to *Leishmania mexicana*. *Eur.J.Immunol.* 35:476-486.
2. Akira, S. 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 15:5-11.
3. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2:675-680.
4. Amprey, J. L., J. S. Im, S. J. Turco, H. W. Murray, P. A. Illarionov, G. S. Besra, S. A. Porcelli, and G. F. Spath. 2004. A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J.Exp.Med.* 200:895-904.
5. Amprey, J. L., G. F. Spath, and S. A. Porcelli. 2004. Inhibition of CD1 expression in human dendritic cells during intracellular infection with *Leishmania donovani*. *Infect.Immun.* 72:589-592.
6. Antoine, J. C., T. Lang, E. Prina, N. Courret, and R. Hellio. 1999. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. *J.Cell.Sci.* 112 (Pt 15):2559-2570.
7. Arnon, T. I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D. G. Wolf, and O. Mandelboim. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat.Immunol.* 6:515-523.

B

8. Bahr, V., Y. D. Stierhof, T. Ilg, M. Demar, M. Quinten, and P. Overath. 1993. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 58:107-121.
9. Balk, S. P., P. A. Bleicher, and C. Terhorst. 1991. Isolation and expression of cDNA encoding the murine homologues of CD1. *J.Immunol.* 146:768-774.
10. Balk, S. P., S. Burke, J. E. Polischuk, M. E. Frantz, L. Yang, S. Porcelli, S. P. Colgan, and R. S. Blumberg. 1994. Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium. *Science* 265:259-262.
11. Baron, J. L., L. Gardiner, S. Nishimura, K. Shinkai, R. Locksley, and D. Ganem. 2002. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity.* 16:583-594.
12. Battistini, L., F. R. Fischer, C. S. Raine, and C. F. Brosnan. 1996. CD1b is expressed in multiple sclerosis lesions. *J.Neuroimmunol.* 67:145-151.
13. Batuwangala, T., D. Shepherd, S. D. Gadola, K. J. Gibson, N. R. Zaccai, A. R. Fersht, G. S. Besra, V. Cerundolo, and E. Y. Jones. 2004. The crystal structure of human CD1b with a bound bacterial glycolipid. *J.Immunol.* 172:2382-2388.
14. Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729.
15. Beckman, E. M., S. A. Porcelli, C. T. Morita, S. M. Behar, S. T. Furlong, and M. B. Brenner. 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* 372:691-694.
16. Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J.Exp.Med.* 182:2091-2096.

17. Bendelac, A., O. Lantz, M. E. Quimby, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, and R. R. Brutkiewicz. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* 268:863-865.
18. Bendelac, A., M. N. Rivera, S. H. Park, and J. H. Roark. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu.Rev.Immunol.* 15:535-562.
19. Benlagha, K., T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2002. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296:553-555.
20. Benlagha, K., A. Weiss, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2000. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J.Exp.Med.* 191:1895-1903.
21. Biesinger, B., I. Muller-Fleckenstein, B. Simmer, G. Lang, S. Wittmann, E. Platzer, R. C. Desrosiers, and B. Fleckenstein. 1992. Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:3116-3119.
22. Blumberg, R. S., C. Terhorst, P. Bleicher, F. V. McDermott, C. H. Allan, S. B. Landau, J. S. Trier, and S. P. Balk. 1991. Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J.Immunol.* 147:2518-2524.
23. Bonish, B., D. Jullien, Y. Dutronc, B. B. Huang, R. Modlin, F. M. Spada, S. A. Porcelli, and B. J. Nickoloff. 2000. Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells. *J.Immunol.* 165:4076-4085.
24. Bradbury, A., K. T. Belt, T. M. Neri, C. Milstein, and F. Calabi. 1988. Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. *EMBO J.* 7:3081-3086.
25. Brandonisio, O., R. Spinelli, and M. Pepe. 2004. Dendritic cells in Leishmania infection. *Microbes.Infect.* 6:1402-1409.
26. Briken, V., R. M. Jackman, S. Dasgupta, S. Hoening, and S. A. Porcelli. 2002. Intracellular trafficking pathway of newly synthesized CD1b molecules. *EMBO J.* 21:825-834.
27. Briken, V., R. M. Jackman, G. F. Watts, R. A. Rogers, and S. A. Porcelli. 2000. Human CD1b and CD1c isoforms survey different intracellular compartments for the presentation of microbial lipid antigens. *J.Exp.Med.* 192:281-288.
28. Brossay, L., M. Chioda, N. Burdin, Y. Koezuka, G. Casorati, P. Dellabona, and M. Kronenberg. 1998. CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J.Exp.Med.* 188:1521-1528.
29. Brossay, L., D. Jullien, S. Cardell, B. C. Sydora, N. Burdin, R. L. Modlin, and M. Kronenberg. 1997. Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J.Immunol.* 159:1216-1224.
30. Buates, S. and G. Matlashewski. 2001. General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection. *J.Immunol.* 166:3416-3422.
31. Budd, R. C., G. C. Miescher, R. C. Howe, R. K. Lees, C. Bron, and H. R. MacDonald. 1987. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J.Exp.Med.* 166:577-582.
32. Burdin, N., L. Brossay, and M. Kronenberg. 1999. Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur.J.Immunol.* 29:2014-2025.

C

33. Calabi, F., K. T. Belt, C. Y. Yu, A. Bradbury, W. J. Mandy, and C. Milstein. 1989. The rabbit CD1 and the evolutionary conservation of the CD1 gene family. *Immunogenetics* 30:370-377.
34. Calabi, F., J. M. Jarvis, L. Martin, and C. Milstein. 1989. Two classes of CD1 genes. *Eur.J.Immunol.* 19:285-292.

35. Calabi, F. and C. Milstein. 1986. A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature* 323:540-543.
36. Canchis, P. W., A. K. Bhan, S. B. Landau, L. Yang, S. P. Balk, and R. S. Blumberg. 1993. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. *Immunology* 80:561-565.
37. Caparrós E., Diego Serrano, Amya Puig-Kröger, Lorena Riol, Fátima Lasala, Iñigo Martínez, Fernando Vidal-Vanaclocha, Rafael Delgado, Jose Luis Rodríguez-Fernández, Luis Rivas, Angel L corbi, and María Colmenares. 2005. Role of the C-Type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. *Immunobiology*.
38. Carbone, E., G. Terrazzano, A. Melian, D. Zanzi, L. Moretta, S. Porcelli, K. Karre, and S. Zappacosta. 2000. Inhibition of human NK cell-mediated killing by CD1 molecules. *J.Immunol.* 164:6130-6137.
39. Carbone, E., G. Terrazzano, G. Ruggiero, D. Zanzi, A. Ottaiano, C. Manzo, K. Karre, and S. Zappacosta. 1999. Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur.J.Immunol.* 29:4022-4029.
40. Cardell, S., S. Tangri, S. Chan, M. Kronenberg, C. Benoist, and D. Mathis. 1995. CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J.Exp.Med.* 182:993-1004.
41. Carnaud, C., D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka, and A. Bendelac. 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J.Immunol.* 163:4647-4650.
42. Chakraborty, P. and P. K. Das. 1989. Suppression of macrophage lysosomal enzymes after *Leishmania donovani* infection. *Biochem.Med.Metab Biol.* 41:46-55.
43. Chambers, W. H., N. L. Vujanovic, A. B. DeLeo, M. W. Olszowy, R. B. Herberman, and J. C. Hiserodt. 1989. Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J.Exp.Med.* 169:1373-1389.
44. Chan, J., T. Fujiwara, P. Brennan, M. McNeil, S. J. Turco, J. C. Sibille, M. Snapper, P. Aisen, and B. R. Bloom. 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:2453-2457.
45. Chang, C. S., L. Brossay, M. Kronenberg, and K. P. Kane. 1999. The murine nonclassical class I major histocompatibility complex-like CD1.1 molecule protects target cells from lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *J.Exp.Med.* 189:483-491.
46. Chen, Q. Y. and N. Jackson. 2004. Human CD1D gene has TATA boxless dual promoters: an SP1-binding element determines the function of the proximal promoter. *J.Immunol.* 172:5512-5521.
47. Chiu, Y. H., S. H. Park, K. Benlagha, C. Forestier, J. Jayawardena-Wolf, P. B. Savage, L. Teyton, and A. Bendelac. 2002. Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d. *Nat.Immunol.* 3:55-60.
48. Colmenares, M., A. L. Corbi, S. J. Turco, and L. Rivas. 2004. The dendritic cell receptor DC-SIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J.Immunol.* 172:1186-1190.

D

49. D'Andrea, A., C. Chang, J. H. Phillips, and L. L. Lanier. 1996. Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J.Exp.Med.* 184:789-794.
50. Dascher, C. C., K. Hiromatsu, J. W. Naylor, P. P. Brauer, K. A. Brown, J. R. Storey, S. M. Behar, E. S. Kawasaki, S. A. Porcelli, M. B. Brenner, and K. P. LeClair. 1999. Conservation of a CD1 multigene family in the guinea pig. *J.Immunol.* 163:5478-5488.

51. De Silva, A. D., J. J. Park, N. Matsuki, A. K. Stanic, R. R. Brutkiewicz, M. E. Medof, and S. Joyce. 2002. Lipid protein interactions: the assembly of CD1d1 with cellular phospholipids occurs in the endoplasmic reticulum. *J.Immunol.* 168:723-733.
52. Degli-Esposti, M. A. and M. J. Smyth. 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat.Rev.Immunol.* 5:112-124.
53. Della Chiesa M., M. Vitale, S. Carlomagno, G. Ferlazzo, L. Moretta, and A. Moretta. 2003. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur.J.Immunol.* 33:1657-1666.
54. Desjardins, M. and A. Descoteaux. 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the Leishmania lipophosphoglycan. *J.Exp.Med.* 185:2061-2068.
55. Dominguez, M., I. Moreno, M. Lopez-Trascasa, and A. Torano. 2002. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J.Exp.Med.* 195:451-459.
56. Dougan, S. K., A. Salas, P. Rava, A. Agyemang, A. Kaser, J. Morrison, A. Khurana, M. Kronenberg, C. Johnson, M. Exley, M. M. Hussain, and R. S. Blumberg. 2005. Microsomal triglyceride transfer protein lipidation and control of CD1d on antigen-presenting cells. *J.Exp.Med.* 202:529-539.
57. Duthie, M. S., M. Wleklinski-Lee, S. Smith, T. Nakayama, M. Taniguchi, and S. J. Kahn. 2002. During Trypanosoma cruzi infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein. *Infect.Immun.* 70:36-48.

E

58. Eberl, G., R. Lees, S. T. Smiley, M. Taniguchi, M. J. Grusby, and H. R. MacDonald. 1999. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J.Immunol.* 162:6410-6419.
59. Eberl, G. and H. R. MacDonald. 2000. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur.J.Immunol.* 30:985-992.
60. El On, J., D. J. Bradley, and J. C. Freeman. 1980. Leishmania donovani: action of excreted factor on hydrolytic enzyme activity of macrophages from mice with genetically different resistance to infection. *Exp.Parasitol.* 49:167-174.
61. Exley, M., J. Garcia, S. B. Wilson, F. Spada, D. Gerdes, S. M. Tahir, K. T. Patton, R. S. Blumberg, S. Porcelli, A. Chott, and S. P. Balk. 2000. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology* 100:37-47.
62. Exley, M. A., N. J. Bigley, O. Cheng, S. M. Tahir, S. T. Smiley, Q. L. Carter, H. F. Stills, M. J. Grusby, Y. Koezuka, M. Taniguchi, and S. P. Balk. 2001. CD1d-reactive T-cell activation leads to amelioration of disease caused by diabetogenic encephalomyocarditis virus. *J.Leukoc.Biol.* 69:713-718.
63. Exley, M. A., Q. He, O. Cheng, R. J. Wang, C. P. Cheney, S. P. Balk, and M. J. Koziel. 2002. Cutting edge: Compartmentalization of Th1-like noninvariant CD1d-reactive T cells in hepatitis C virus-infected liver. *J.Immunol.* 168:1519-1523.
64. Exley, M. A., S. M. Tahir, O. Cheng, A. Shaulov, R. Joyce, D. Avigan, R. Sackstein, and S. P. Balk. 2001. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J.Immunol.* 167:5531-5534.

F

65. Faure, F., S. Jitsukawa, C. Miossec, and T. Hercend. 1990. CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood gamma/delta cells. *Eur.J.Immunol.* 20:703-706.

66. Ferguson, E. D., B. M. Dutia, W. R. Hein, and J. Hopkins. 1996. The sheep CD1 gene family contains at least four CD1B homologues. *Immunogenetics* 44:86-96.
67. Ferlazzo, G., B. Morandi, A. D'Agostino, R. Meazza, G. Melioli, A. Moretta, and L. Moretta. 2003. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 33:306-313.
68. Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Munz. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J.Exp.Med.* 195:343-351.
69. Fernandez, N. C., C. Flament, F. Crepineau, E. Angevin, E. Vivier, and L. Zitvogel. 2002. Dendritic cells (DC) promote natural killer (NK) cell functions: dynamics of the human DC/NK cell cross talk. *Eur.Cytokine Netw.* 13:17-27.
70. Fischer, K., E. Scotet, M. Niemeyer, H. Koebernick, J. Zerrahn, S. Maillet, R. Hurwitz, M. Kursar, M. Bonneville, S. H. Kaufmann, and U. E. Schaible. 2004. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:10685-10690.
71. Fruth, U., N. Solioz, and J. A. Louis. 1993. Leishmania major interferes with antigen presentation by infected macrophages. *J.Immunol.* 150:1857-1864.

G

72. Gadola, S. D., N. R. Zaccai, K. Harlos, D. Shepherd, J. C. Castro-Palomino, G. Ritter, R. R. Schmidt, E. Y. Jones, and V. Cerundolo. 2002. Structure of human CD1b with bound ligands at 2.3 Å, a maze for alkyl chains. *Nat.Immunol.* 3:721-726.
73. Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat.Immunol.* 2:971-978.
74. Geng, Y., P. Laslo, K. Barton, and C. R. Wang. 2005. Transcriptional regulation of CD1D1 by Ets family transcription factors. *J.Immunol.* 175:1022-1029.
75. Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J.Exp.Med.* 195:327-333.
76. Ghalib, H. W., J. A. Whittle, M. Kubin, F. A. Hashim, A. M. el Hassan, K. H. Grabstein, G. Trinchieri, and S. G. Reed. 1995. IL-12 enhances Th1-type responses in human Leishmania donovani infections. *J.Immunol.* 154:4623-4629.
77. Godfrey, D. I., D. G. Pellicci, and M. J. Smyth. 2004. Immunology. The elusive NKT cell antigen--is the search over? *Science* 306:1687-1689.
78. Gonzalez-Aseguinolaza, G., L. Van Kaer, C. C. Bergmann, J. M. Wilson, J. Schmiege, M. Kronenberg, T. Nakayama, M. Taniguchi, Y. Koezuka, and M. Tsuji. 2002. Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J.Exp.Med.* 195:617-624.
79. Gordon, S. 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930.
80. Grant, E. P., M. Degano, J. P. Rosat, S. Stenger, R. L. Modlin, I. A. Wilson, S. A. Porcelli, and M. B. Brenner. 1999. Molecular recognition of lipid antigens by T cell receptors. *J.Exp.Med.* 189:195-205.
81. Granucci, F., S. Feau, V. Angeli, F. Trottein, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2003. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J.Immunol.* 170:5075-5081.
82. Granucci, F., I. Zanoni, S. Feau, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2003. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 22:2546-2551.

83. Granucci, F., I. Zanoni, N. Pavelka, S. L. Van Dommelen, C. E. Andoniou, F. Belardelli, M. A. Degli Esposti, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2004. A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J.Exp.Med.* 200:287-295.
84. Gumperz, J. E., C. Roy, A. Makowska, D. Lum, M. Sugita, T. Podrebarac, Y. Koezuka, S. A. Porcelli, S. Cardell, M. B. Brenner, and S. M. Behar. 2000. Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity.* 12:211-221.

H

85. Hammond, K. J., S. B. Pelikan, N. Y. Crowe, E. Randle-Barrett, T. Nakayama, M. Taniguchi, M. J. Smyth, I. R. van Driel, R. Scollay, A. G. Baxter, and D. I. Godfrey. 1999. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur.J.Immunol.* 29:3768-3781.
86. Han, M., L. I. Hannick, M. DiBrino, and M. A. Robinson. 1999. Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens* 54:122-127.
87. Hanke, T., H. Takizawa, C. W. McMahon, D. H. Busch, E. G. Pamer, J. D. Miller, J. D. Altman, Y. Liu, D. Cado, F. A. Lemonnier, P. J. Bjorkman, and D. H. Raulet. 1999. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity.* 11:67-77.
88. Hayes, S. M. and K. L. Knight. 2001. Group 1 CD1 genes in rabbit. *J.Immunol.* 166:403-410.
89. Hou, W. S. and L. Van Parijs. 2004. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat.Immunol.* 5:583-589.
90. Huang, M. M., P. Borszcz, S. Sidobre, M. Kronenberg, and K. P. Kane. 2004. CD1d1 displayed on cell size beads identifies and enriches an NK cell population negatively regulated by CD1d1. *J.Immunol.* 172:5304-5312.
91. Hughes, A. L., M. Yeager, A. E. Ten Elshof, and M. J. Chorney. 1999. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunol.Today* 20:22-26.

I

92. Ichimiya, S., A. Matsuura, S. Takayama, and K. Kikuchi. 1993. Molecular cloning of a cDNA encoding the rat homologue of CD1. *Transplant.Proc.* 25:2773-2774.
93. Illes, Z., T. Kondo, J. Newcombe, N. Oka, T. Tabira, and T. Yamamura. 2000. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J.Immunol.* 164:4375-4381.
94. Ishikawa, H., H. Hisaeda, M. Taniguchi, T. Nakayama, T. Sakai, Y. Maekawa, Y. Nakano, M. Zhang, T. Zhang, M. Nishitani, M. Takashima, and K. Himeno. 2000. CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int.Immunol.* 12:1267-1274.
95. Iwasaki, A. and R. Medzhitov. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 5:987-995.

J

96. Jayawardena-Wolf, J., K. Benlagha, Y. H. Chiu, R. Mehr, and A. Bendelac. 2001. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity.* 15:897-908.
97. Jinushi, M., T. Takehara, T. Kanto, T. Tatsumi, V. Groh, T. Spies, T. Miyagi, T. Suzuki, Y. Sasaki, and N. Hayashi. 2003. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J.Immunol.* 170:1249-1256.

98. Joyce, S., A. S. Woods, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, A. D. De Silva, A. Boesteanu, S. P. Balk, R. J. Cotter, and R. R. Brutkiewicz. 1998. Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science* 279:1541-1544.

K

99. Kalinski, P., J. H. Schuitemaker, C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J. Immunol.* 162:3231-3236.
100. Kang, S. J. and P. Cresswell. 2004. Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells. *Nat. Immunol.* 5:175-181.
101. Karadimitris, A., S. Gadola, M. Altamirano, D. Brown, A. Woolfson, P. Klenerman, J. L. Chen, Y. Koezuka, I. A. Roberts, D. A. Price, G. Dusheiko, C. Milstein, A. Fersht, L. Luzzatto, and V. Cerundolo. 2001. Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98:3294-3298.
102. Kasinrerk, W., T. Baumruker, O. Majdic, W. Knapp, and H. Stockinger. 1993. CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 150:579-584.
103. Kawahara, K., H. Moll, Y. A. Knirel, U. Seydel, and U. Zahringer. 2000. Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *Eur. J. Biochem.* 267:1837-1846.
104. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Taura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, and M. Taniguchi. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626-1629.
105. Kawano, T., T. Nakayama, N. Kamada, Y. Kaneko, M. Harada, N. Ogura, Y. Akutsu, S. Motohashi, T. Iizasa, H. Endo, T. Fujisawa, H. Shinkai, and M. Taniguchi. 1999. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer Res.* 59:5102-5105.
106. Keusch, J. J., S. M. Manzella, K. A. Nyame, R. D. Cummings, and J. U. Baenziger. 2000. Expression cloning of a new member of the ABO blood group glycosyltransferases, iGb3 synthase, that directs the synthesis of isogloboglycosphingolipids. *J. Biol. Chem.* 275:25308-25314.
107. Khalili-Shirazi, A., N. A. Gregson, M. Londei, L. Summers, and R. A. Hughes. 1998. The distribution of CD1 molecules in inflammatory neuropathy. *J. Neurol. Sci.* 158:154-163.
108. Kim, H. S., J. Garcia, M. Exley, K. W. Johnson, S. P. Balk, and R. S. Blumberg. 1999. Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin. *J. Biol. Chem.* 274:9289-9295.
109. Kinjo, Y., D. Wu, G. Kim, G. W. Xing, M. A. Poles, D. D. Ho, M. Tsuji, K. Kawahara, C. H. Wong, and M. Kronenberg. 2005. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434:520-525.
110. Kita, H., O. V. Naidenko, M. Kronenberg, A. A. Ansari, P. Rogers, X. S. He, F. Koning, T. Mikayama, W. J. Van De, R. L. Coppel, M. Kaplan, and M. E. Gershwin. 2002. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 123:1031-1043.
111. Koch, M., V. S. Stronge, D. Shepherd, S. D. Gadola, B. Mathew, G. Ritter, A. R. Fersht, G. S. Besra, R. R. Schmidt, E. Y. Jones, and V. Cerundolo. 2005. The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide. *Nat. Immunol.* 6:819-826.
112. Kronenberg, M. 2004. Presenting fats with SAPs. *Nat. Immunol.* 5:126-127.
113. Kronenberg, M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 23:877-900.

114. Kronenberg, M. and L. Gapin. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat.Rev.Immunol.* 2:557-568.

L

115. Lanier, L. L. 1998. NK cell receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 16:359-393.
116. Lantz, O. and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J.Exp.Med.* 180:1097-1106.
117. Leslie, D. S., M. S. Vincent, F. M. Spada, H. Das, M. Sugita, C. T. Morita, and M. B. Brenner. 2002. CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J.Exp.Med.* 196:1575-1584.
118. Long, E. O. 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 17:875-904.

M

119. MacDonald, H. R. 2002. Immunology. T before NK. *Science* 296:481-482.
120. Maeda, M., C. Carpenito, R. C. Russell, J. Dasanjh, L. L. Veinotte, H. Ohta, T. Yamamura, R. Tan, and F. Takei. 2005. Murine CD160, Ig-Like Receptor on NK Cells and NKT Cells, Recognizes Classical and Nonclassical MHC Class I and Regulates NK Cell Activation. *J.Immunol.* 175:4426-4432.
121. Mailliard, R. B., S. Egawa, Q. Cai, A. Kalinska, S. N. Bykovskaya, M. T. Lotze, M. L. Kapsenberg, W. J. Storkus, and P. Kalinski. 2002. Complementary dendritic cell-activating function of CD8+ and CD4+ T cells: helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses. *J.Exp.Med.* 195:473-483.
122. Mandal, M., X. R. Chen, M. L. Alegre, N. M. Chiu, Y. H. Chen, A. R. Castano, and C. R. Wang. 1998. Tissue distribution, regulation and intracellular localization of murine CD1 molecules. *Mol.Immunol.* 35:525-536.
123. Martin, L. H., F. Calabi, F. A. Lefebvre, C. A. Bilsland, and C. Milstein. 1987. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:9189-9193.
124. Martin, L. H., F. Calabi, and C. Milstein. 1986. Isolation of CD1 genes: a family of major histocompatibility complex-related differentiation antigens. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:9154-9158.
125. Matsuura, A., Y. Hashimoto, M. Kinebuchi, K. Kasai, S. Ichimiya, S. Katabami, H. Chen, T. Shimizu, and K. Kikuchi. 1997. Rat CD1 antigen: structure, expression and function. *Transplant.Proc.* 29:1705-1706.
126. Mattner, J., K. L. Debord, N. Ismail, R. D. Goff, C. Cantu, III, D. Zhou, P. Saint-Mezard, V. Wang, Y. Gao, N. Yin, K. Hoebe, O. Schneewind, D. Walker, B. Beutler, L. Teyton, P. B. Savage, and A. Bendelac. 2005. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434:525-529.
127. McConville, M. J. and J. M. Blackwell. 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J.Biol.Chem.* 266:15170-15179.
128. McConville, M. J. and M. A. Ferguson. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem.J.* 294 (Pt 2):305-324.
129. McDowell, M. A., M. Marovich, R. Lira, M. Braun, and D. Sacks. 2002. *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect.Immun.* 70:3994-4001.
130. Metelitsa, L. S., O. V. Naidenko, A. Kant, H. W. Wu, M. J. Loza, B. Perussia, M. Kronenberg, and R. C. Seeger. 2001. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity

- directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J.Immunol.* 167:3114-3122.
131. Mingari, M. C., A. Moretta, and L. Moretta. 1998. Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses. *Immunol.Today* 19:153-157.
 132. Molano, A., S. H. Park, Y. H. Chiu, S. Nosseir, A. Bendelac, and M. Tsuji. 2000. Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. *J.Immunol.* 164:5005-5009.
 133. Moody, D. B., M. R. Guy, E. Grant, T. Y. Cheng, M. B. Brenner, G. S. Besra, and S. A. Porcelli. 2000. CD1b-mediated T cell recognition of a glycolipid antigen generated from mycobacterial lipid and host carbohydrate during infection. *J.Exp.Med.* 192:965-976.
 134. Moody, D. B., T. Ulrichs, W. Muhlecker, D. C. Young, S. S. Gurcha, E. Grant, J. P. Rosat, M. B. Brenner, C. E. Costello, G. S. Besra, and S. A. Porcelli. 2000. CD1c-mediated T-cell recognition of isoprenoid glycolipids in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Nature* 404:884-888.
 135. Moody, D. B., D. C. Young, T. Y. Cheng, J. P. Rosat, C. Roura-Mir, P. B. O'Connor, D. M. Zajonc, A. Walz, M. J. Miller, S. B. Lavery, I. A. Wilson, C. E. Costello, and M. B. Brenner. 2004. T cell activation by lipopeptide antigens. *Science* 303:527-531.
 136. Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, R. Biassoni, M. C. Mingari, and L. Moretta. 1996. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu.Rev.Immunol.* 14:619-648.
 137. Moretta, A., S. Sivori, M. Ponte, M. C. Mingari, and L. Moretta. 1998. Stimulatory receptors in NK and T cells. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 230:15-23.
 138. Moretta, L., G. Ferlazzo, M. C. Mingari, G. Melioli, and A. Moretta. 2003. Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells. *Vaccine* 21 Suppl 2:S38-S42.
 139. Murray, H. W. 1981. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *J.Exp.Med.* 153:1302-1315.

N

140. Nagai, T., O. Devergne, T. F. Mueller, D. L. Perkins, J. M. van Seventer, and G. A. van Seventer. 2003. Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation. *J.Immunol.* 171:5233-5243.
141. Nagane, Y., K. Utsugisawa, D. Obara, and H. Tohgi. 2001. NKT-associated markers and perforin in hyperplastic thymuses from patients with Myasthenia gravis. *Muscle Nerve* 24:1359-1364.
142. Nakagawa, R., I. Serizawa, K. Motoki, M. Sato, H. Ueno, R. Iijima, H. Nakamura, A. Shimosaka, and Y. Koezuka. 2000. Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells. *Oncol.Res.* 12:51-58.
143. Naumov, Y. N., K. S. Bahjat, R. Gausling, R. Abraham, M. A. Exley, Y. Koezuka, S. B. Balk, J. L. Strominger, M. Clare-Salzer, and S. B. Wilson. 2001. Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:13838-13843.
144. Navarro, F. and M. López-Botet. 2001. Receptores de células NK específicos para moléculas HLA de clase I. *Inmunología* 20:38-48.

145. Nencioni, A., F. Grunebach, A. Zobywalski, C. Denzlinger, W. Brugger, and P. Brossart. 2002. Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J.Immunol.* 169:1228-1235.
146. Nieuwenhuis, E. E., T. Matsumoto, M. Exley, R. A. Schleipman, J. Glickman, D. T. Bailey, N. Corazza, S. P. Colgan, A. B. Onderdonk, and R. S. Blumberg. 2002. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat.Med.* 8:588-593.
147. Nishimura, T., H. Kitamura, K. Iwakabe, T. Yahata, A. Ohta, M. Sato, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, T. Kawano, M. Taniguchi, M. Nakui, M. Sekimoto, and T. Koda. 2000. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int.Immunol.* 12:987-994.
148. Norris, S., R. Halkar, J. Galt, J. Petros, and J. Keller. 1999. Bone metastases from poorly differentiated adenocarcinoma of the prostate diagnosed by In-111 ProstaScint (Capromab Pendetide) images with negative results of Tc-99m MDP bone scan and without significant elevation of prostate-specific antigen. *Clin.Nucl.Med.* 24:905-907.
149. Nuti, S., D. Rosa, N. M. Valiante, G. Saletti, M. Caratozzolo, P. Dellabona, V. Barnaba, and S. Abrignani. 1998. Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 28:3448-3455.

O

150. Ortaldo, J. R., H. A. Young, R. T. Winkler-Pickett, E. W. Bere, Jr., W. J. Murphy, and R. H. Wiltout. 2004. Dissociation of NKT stimulation, cytokine induction, and NK activation in vivo by the use of distinct TCR-binding ceramides. *J.Immunol.* 172:943-953.
151. Oteo, M., J. F. Parra, I. Mirones, L. I. Gimenez, F. Setien, and E. Martinez-Naves. 1999. Single strand conformational polymorphism analysis of human CD1 genes in different ethnic groups. *Tissue Antigens* 53:545-550.

P

152. Park, S. H., A. Weiss, K. Benlagha, T. Kyin, L. Teyton, and A. Bendelac. 2001. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. *J.Exp.Med.* 193:893-904.
153. Park, Y., S. W. Lee, and Y. C. Sung. 2002. Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. *J.Immunol.* 168:5-8.
154. Parsons, K. R., C. J. Howard, and P. Sopp. 1991. Immunohistology of workshop monoclonal antibodies to the bovine homologue of CD1. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 27:201-206.
155. Pellicci, D. G., K. J. Hammond, A. P. Uldrich, A. G. Baxter, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2002. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J.Exp.Med.* 195:835-844.
156. Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J.Exp.Med.* 190:1505-1516.
157. Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri, and N. M. Valiante. 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J.Exp.Med.* 195:335-341.

158. Porcelli, S., M. B. Brenner, J. L. Greenstein, S. P. Balk, C. Terhorst, and P. A. Bleicher. 1989. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes. *Nature* 341:447-450.
159. Porcelli, S., C. T. Morita, and M. B. Brenner. 1992. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 360:593-597.
160. Porcelli, S. A. 1995. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv.Immunol.* 59:1-98.
161. Prina, E., S. Z. Abdi, M. Lebastard, E. Perret, N. Winter, and J. C. Antoine. 2004. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J.Cell Sci.* 117:315-325.

R

162. Rauch, J., J. Gumperz, C. Robinson, M. Skold, C. Roy, D. C. Young, M. Lafleur, D. B. Moody, M. B. Brenner, C. E. Costello, and S. M. Behar. 2003. Structural features of the acyl chain determine self-phospholipid antigen recognition by a CD1d-restricted invariant NKT (iNKT) cell. *J.Biol.Chem.* 278:47508-47515.
163. Raulet, D. H. 1999. Development and tolerance of natural killer cells. *Curr.Opin.Immunol.* 11:129-134.
164. Reiner, N. E., W. Ng, T. Ma, and W. R. McMaster. 1988. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:4330-4334.
165. Reis e Sousa. 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin.Immunol.* 16:27-34.
166. Rhind, S. M., B. M. Dutia, C. J. Howard, and J. Hopkins. 1996. Discrimination of two subsets of CD1 molecules in the sheep. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 52:265-270.
167. Roark, J. H., S. H. Park, J. Jayawardena, U. Kavita, M. Shannon, and A. Bendelac. 1998. CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J.Immunol.* 160:3121-3127.
168. Robertson, M. J., K. J. Cochran, C. Cameron, J. M. Le, R. Tantravahi, and J. Ritz. 1996. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp.Hematol.* 24:406-415.
169. Rosat, J. P., E. P. Grant, E. M. Beckman, C. C. Dascher, P. A. Sieling, D. Frederique, R. L. Modlin, S. A. Porcelli, S. T. Furlong, and M. B. Brenner. 1999. CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T cell pool. *J.Immunol.* 162:366-371.

S

170. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 18:593-620.
171. Schofield, L., M. J. McConville, D. Hansen, A. S. Campbell, B. Fraser-Reid, M. J. Grusby, and S. D. Tachado. 1999. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* 283:225-229.
172. Shamshiev, A., A. Donda, I. Carena, L. Mori, L. Kappos, and G. De Libero. 1999. Self glycolipids as T-cell autoantigens. *Eur.J.Immunol.* 29:1667-1675.
173. Shamshiev, A., H. J. Gober, A. Donda, Z. Mazorra, L. Mori, and G. De Libero. 2002. Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. *J.Exp.Med.* 195:1013-1021.
174. Shi, G. X., K. Harrison, S. B. Han, C. Moratz, and J. H. Kehrl. 2004. Toll-like receptor signaling alters the expression of regulator of G protein signaling proteins in dendritic

- cells: implications for G protein-coupled receptor signaling. *J.Immunol.* 172:5175-5184.
175. Shimizu, Y. and R. DeMars. 1989. Production of human cells expressing individual transferred HLA-A,-B,-C genes using an HLA-A,-B,-C null human cell line. *J.Immunol.* 142:3320-3328.
176. Sieling, P. A., D. Chatterjee, S. A. Porcelli, T. I. Prigozy, R. J. Mazzaccaro, T. Soriano, B. R. Bloom, M. B. Brenner, M. Kronenberg, P. J. Brennan, and . 1995. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 269:227-230.
177. Sieling, P. A., D. Jullien, M. Dahlem, T. F. Tedder, T. H. Rea, R. L. Modlin, and S. A. Porcelli. 1999. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J.Immunol.* 162:1851-1858.
178. Sieling, P. A., M. T. Ochoa, D. Jullien, D. S. Leslie, S. Sabet, J. P. Rosat, A. E. Burdick, T. H. Rea, M. B. Brenner, S. A. Porcelli, and R. L. Modlin. 2000. Evidence for human CD4+ T cells in the CD1-restricted repertoire: derivation of mycobacteria-reactive T cells from leprosy lesions. *J.Immunol.* 164:4790-4796.
179. Singh, N., S. Hong, D. C. Scherer, I. Serizawa, N. Burdin, M. Kronenberg, Y. Koezuka, and L. Van Kaer. 1999. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J.Immunol.* 163:2373-2377.
180. Sivori, S., M. Vitale, L. Morelli, L. Sanseverino, R. Augugliaro, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta. 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J.Exp.Med.* 186:1129-1136.
181. Smith, M. E., J. A. Thomas, and W. F. Bodmer. 1988. CD1c antigens are present in normal and neoplastic B-cells. *J.Pathol.* 156:169-177.
182. Smyth, M. J. and D. I. Godfrey. 2000. NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat.Immunol.* 1:459-460.
183. Solbach, W. and T. Laskay. 2000. The host response to Leishmania infection. *Adv.Immunol.* 74:275-317.
184. Spada, F. M., F. Borriello, M. Sugita, G. F. Watts, Y. Koezuka, and S. A. Porcelli. 2000. Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells. *Eur.J.Immunol.* 30:3468-3477.
185. Spada, F. M., E. P. Grant, P. J. Peters, M. Sugita, A. Melian, D. S. Leslie, H. K. Lee, E. van Donselaar, D. A. Hanson, A. M. Krensky, O. Majdic, S. A. Porcelli, C. T. Morita, and M. B. Brenner. 2000. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J.Exp.Med.* 191:937-948.
186. Spada, F. M., Y. Koezuka, and S. A. Porcelli. 1998. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J.Exp.Med.* 188:1529-1534.
187. Spath, G. F., L. A. Garraway, S. J. Turco, and S. M. Beverley. 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:9536-9541.
188. Sriram, V., S. Cho, P. Li, P. W. O'Donnell, C. Dunn, K. Hayakawa, J. S. Blum, and R. R. Brutkiewicz. 2002. Inhibition of glycolipid shedding rescues recognition of a CD1+ T cell lymphoma by natural killer T (NKT) cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:8197-8202.
189. Steinman, R. M. 2003. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 111:675-697.
190. Stenger, S., K. R. Niazi, and R. L. Modlin. 1998. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis. *J.Immunol.* 161:3582-3588.
191. Sugita, M., E. P. Grant, E. van Donselaar, V. W. Hsu, R. A. Rogers, P. J. Peters, and M. B. Brenner. 1999. Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. *Immunity.* 11:743-752.

192. Sugita, M., W. N. van Der, R. A. Rogers, P. J. Peters, and M. B. Brenner. 2000. CD1c molecules broadly survey the endocytic system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:8445-8450.
193. Sumida, T., A. Sakamoto, H. Murata, Y. Makino, H. Takahashi, S. Yoshida, K. Nishioka, I. Iwamoto, and M. Taniguchi. 1995. Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J.Exp.Med.* 182:1163-1168.
194. Szatmari, I., P. Gogolak, J. S. Im, B. Dezso, E. Rajnavolgyi, and L. Nagy. 2004. Activation of PPARgamma specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. *Immunity.* 21:95-106.

T

195. Takahashi, T., S. Chiba, M. Nieda, T. Azuma, S. Ishihara, Y. Shibata, T. Juji, and H. Hirai. 2002. Cutting edge: analysis of human V alpha 24+CD8+ NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunol.* 168:3140-3144.
196. Tanaka, H., C. E. Demeure, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J.Exp.Med.* 192:405-412.
197. Tomasec, P., V. M. Braud, C. Rickards, M. B. Powell, B. P. McSharry, S. Gadola, V. Cerundolo, L. K. Borysiewicz, A. J. McMichael, and G. W. Wilkinson. 2000. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science* 287:1031.
198. Turco, S. J., S. R. Hull, P. A. Orlandi, Jr., S. D. Shepherd, S. W. Homans, R. A. Dwek, and T. W. Rademacher. 1987. Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemistry* 26:6233-6238.

V

199. Vales-Gomez, M., H. T. Reyburn, R. A. Erskine, M. Lopez-Botet, and J. L. Strominger. 1999. Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E. *EMBO J.* 18:4250-4260.
200. Van, R., I. L. H. Van den Berg, W. M. Bosboom, H. G. Otten, and T. Logtenberg. 2000. Expression of accessory molecules for T-cell activation in peripheral nerve of patients with CIDP and vasculitic neuropathy. *Brain* 123 (Pt 10):2020-2029.
201. Vance, R. E., J. R. Kraft, J. D. Altman, P. E. Jensen, and D. H. Raulet. 1998. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J.Exp.Med.* 188:1841-1848.
202. Vieira, P. L., E. C. de Jong, E. A. Wierenga, M. L. Kapsenberg, and P. Kalinski. 2000. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J.Immunol.* 164:4507-4512.
203. Vincent, M. S., J. E. Gumperz, and M. B. Brenner. 2003. Understanding the function of CD1-restricted T cells. *Nat.Immunol.* 4:517-523.
204. Vincent, M. S., D. S. Leslie, J. E. Gumperz, X. Xiong, E. P. Grant, and M. B. Brenner. 2002. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat.Immunol.* 3:1163-1168.
205. Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J.Exp.Med.* 187:2065-2072.

W

206. Willson, T. M., M. H. Lambert, and S. A. Kliewer. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu.Rev.Biochem.* 70:341-367.
207. Wilson, J. L., L. C. Heffler, J. Charo, A. Scheynius, M. T. Bejarano, and H. G. Ljunggren. 1999. Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells. *J.Immunol.* 163:6365-6370.
208. Wilson, M. E., S. M. Jeronimo, and R. D. Pearson. 2005. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. *Microb.Pathog.* 38:147-160.
209. Wilson, S. B., S. C. Kent, K. T. Patton, T. Orban, R. A. Jackson, M. Exley, S. Porcelli, D. A. Schatz, M. A. Atkinson, S. P. Balk, J. L. Strominger, and D. A. Hafler. 1998. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391:177-181.
210. Winau, F., V. Schwierzeck, R. Hurwitz, N. Rimmel, P. A. Sieling, R. L. Modlin, S. A. Porcelli, V. Brinkmann, M. Sugita, K. Sandhoff, S. H. Kaufmann, and U. E. Schaible. 2004. Saposin C is required for lipid presentation by human CD1b. *Nat.Immunol.* 5:169-174.
211. Winter, G., M. Fuchs, M. J. McConville, Y. D. Stierhof, and P. Overath. 1994. Surface antigens of Leishmania mexicana amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *J.Cell Sci.* 107 (Pt 9):2471-2482.
212. Wooden, S. L., S. R. Kalb, R. J. Cotter, and M. J. Soloski. 2005. Cutting edge: HLA-E binds a peptide derived from the ATP-binding cassette transporter multidrug resistance-associated protein 7 and inhibits NK cell-mediated lysis. *J.Immunol.* 175:1383-1387.
213. Woolfson, A. and C. Milstein. 1994. Alternative splicing generates secretory isoforms of human CD1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:6683-6687.
214. Wu, D., G. W. Xing, M. A. Poles, A. Horowitz, Y. Kinjo, B. Sullivan, V. Bodmer-Narkevitch, O. Plettenburg, M. Kronenberg, M. Tsuji, D. D. Ho, and C. H. Wong. 2005. Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:1351-1356.

Z

215. Zajonc, D. M., M. D. Crispin, T. A. Bowden, D. C. Young, T. Y. Cheng, J. Hu, C. E. Costello, P. M. Rudd, R. A. Dwek, M. J. Miller, M. B. Brenner, D. B. Moody, and I. A. Wilson. 2005. Molecular mechanism of lipopeptide presentation by CD1a. *Immunity.* 22:209-219.
216. Zajonc, D. M., M. A. Elsliger, L. Teyton, and I. A. Wilson. 2003. Crystal structure of CD1a in complex with a sulfatide self antigen at a resolution of 2.15 Å. *Nat.Immunol.* 4:808-815.
217. Zemmour, J., A. M. Little, D. J. Schendel, and P. Parham. 1992. The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J.Immunol.* 148:1941-1948.
218. Zhou, D., C. Cantu, III, Y. Sagiv, N. Schrantz, A. B. Kulkarni, X. Qi, D. J. Mahuran, C. R. Morales, G. A. Grabowski, K. Benlagha, P. Savage, A. Bendelac, and L. Teyton. 2004. Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins. *Science* 303:523-527.
219. Zhou, D., J. Mattner, C. Cantu, III, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y. P. Wu, T. Yamashita, S. Teneberg, D. Wang, R. L. Proia, S. B. Levery, P. B. Savage, L. Teyton, and A. Bendelac. 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306:1786-1789.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

α -GalCer- Alpha-Galactosilceramida.

β -GalCer- Beta-Galactosilceramida.

β_2m - Beta 2-microglobulina

CD - *Cluster* de diferenciación.

CFSE- Carboxifluorescein diacetato succinimidil éster.

DEM- Desviación estándar.

DMSO- Dimetilsulfoxido.

EEM- Error estándar de la media.

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*. Isotiocianato de fluoresceína.

GIPLs-Glicoinositolfosfolípidos.

GM-CSF- *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

HVS - *Herpesvirus saimiri*.

IB4- Isolectina B4 de *Fluorescein bandeiraea* (Griffonia) Simplicifolia

IFN- Interferon

IL - Interleuquina

ITIM - *Immune receptor tyrosine-based inhibition motifs*. Motivos de inhibición en tirosina del receptor inmunológico.

ITAM - *Immune receptor tyrosine-based activation motifs*. Motivos de activación en tirosina del receptor inmunológico.

LPS- Lipopolisacarido.

LPG- Lipofosfoglicano.

MFI- Intensidad media de Fluorescencia

PBS - *Phosphate buffered saline*. Tampón fosfato salino

PBMCs-*Periheral blood mononuclear cells*. Células mononucleares de sangre periférica.

PCR - *Polimerase chain reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa.

PE - *Phycoerythrin*. Ficoeritrina

PPAR γ - *Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ* . Factor de transcripción de genes relacionados con la captura, acumulación y almacenamiento de lípidos.

rhIL-2 - *recombinant human IL-2*. IL-2 humana recombinante.

RSG-Rosiglitazona. Análogo de PPAR γ .

Th- Células T *helper*

TCR - *T cell receptor*. Receptor para antígeno de la célula T

PUBLICACIONES

PUBICACIONES

El trabajo presentado en esta tesis ha sido divulgado en las siguientes publicaciones:

1.- Campos-Martín, Y., d. M. Gomez, B. Gozalbo-Lopez, J. Suela, and E. Martinez-Naves. 2004. Expression of human CD1d molecules protects target cells from NK cell-mediated cytotoxicity. *J.Immunol.* 172:7297-7305.

The cytotoxic activity of Natural Killer cells can be inhibited by classical and non-classical MHC molecules. The CD1³ system is formed by a family of glycoproteins that are related to classical MHC. CD1a, b and c molecules present lipids or glycolipids to T cells and are involved in defense against microbial infections, especially mycobacteria. It has been shown recently that these molecules can inhibit target cell lysis by human NK cells. It has also been shown that mouse CD1d molecules can protect cells from NK cell mediated cytotoxicity. In the present study we describe how human CD1d, orthologous to murine CD1 molecules, can inhibit NK-cell mediated cytotoxicity. We have expressed CD1d in the HLA class I deficient cell lines L721.221 and C1R. The inhibitory effect is observed when effector NK cells from different donors are used, as well as in different cell lines with NK activity. The inhibitory effect was reversed by incubating the target cells with a monoclonal antibody specific for human CD1d. Incubation of target cells with the ligands for CD1d, α -GalCer³ and β -GalCer³ abolishes the protective effect of CD1d in our *in vitro* killing assays. Staining the effector cells using CD1d tetramers loaded with α -GalCer was negative, suggesting that the putative inhibitory receptor does not recognize CD1d molecules loaded with α -GalCer.

2.- Yolanda Campos-Martín, María Colmenares, Beatriz Gozalbo-López, Marta López-Núñez, Paul B. Savage and Eduardo Martínez-Naves. Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. Enviado 2005.

Dendritic cells (DC) play an important role in innate and adaptive immunity, interacting with T cells, Natural Killer (NK) and NKT cells. A critical step in the interaction of the parasitic protozoa *Leishmania* with their host is the evasion of both innate and adaptive immunity, producing a long-lasting chronic infection. There is growing evidence that these parasites can modify the antigen-presenting and immunoregulatory functions of DCs. The cells and mechanisms involved in innate immune response against *Leishmania* are still poorly understood. Here, we investigated how *Leishmania infantum* infection affects DC interactions with NK and invariant NKT (iNKTs) cells in humans. We found that infected iDCs do not up-regulate HLA class I molecules. Despite this, iDCs become resistant to killing mediated by autologous NK cells due to the up-regulation of HLA-E expression, which protects target cells from NK mediated lysis through interaction with the inhibitory receptor CD94/NKG2A. Furthermore, iDCs infected with *L. infantum* up-regulate CD1d cell surface expression and consequently can be efficiently recognized and killed by iNKT cells that produce significant amounts of IFN- γ . These data suggest that *L. infantum* could be able to evade NK recognition; in contrast, iNKTs may play an important role in the immune response against *Leishmania*.

ANEXOS

Curriculum vitae

Datos Personales

Yolanda Campos Martín

Nacida en Toledo el 3 de Marzo de 1978

Estado Civil: Soltera

Nacionalidad: Española

Dirección Madrid: C/ Federico Carlos Sainz de Robles 31, 3ºC. 28035

Correo electrónico: ycmartin@hotmail.com

Teléfono: 654097156

Formación Académica

Lda. Biología 1996/2001

Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid

Doctorado:

Programa de Inmunología Medica: Patología y Terapéutica

Periodo de docencia 2001/02

Periodo de Investigación 2002/03

Suficiencia Investigadora (DEA) Junio 2003

Idiomas:

Ciclo Elemental de inglés. Escuela Oficial de Idiomas de Madrid.

Participación en Proyectos de I+D

Título del proyecto: Análisis estructural y funcional de las moléculas MR1 (MHC-related 1) y CD1. Ref: BMC2001-1382

Entidad Financiadora: Ministerio de Ciencia y Tecnología

Título del proyecto: Inmunobiología de las moléculas MR1 y CD1. Ref. BFU2004-01938

Entidad Financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia

Título del proyecto: Las moléculas MHC no clásicas en la respuesta inmune: papel de CD1d y MR1. Ref: PI050512

Entidad Financiadora: FIS

Publicaciones científicas

Yolanda Campos-Martín, Manuel Gómez del Moral, Beatriz Gozalbo-López, Javier Suela and Eduardo Martínez-Naves.

Expression of human CD1d molecules protects target cells from NK cell-mediated cytotoxicity. J Immunol. 2004 Jun 15;172(12):7297-305.

Manuel Gomez del Moral, Beatriz Aviles, Ingrid K. Colberger, Yolanda Campos-Martin, Javier Suela, Joaquin Alvarez, M. Jesús Perez-Contin, Ana Sánchez-Fructuoso, Alberto Barrientos and Eduardo Martinez-Naves.

Expression of adhesion molecules and RANTES in kidney transplant from nonheart-beating donors.

Transpl Int. 2005 Mar;18(3):333-40.

Yolanda Campos-Martín, María Colmenares, Beatriz Gozalbo-López, Marta López-Nuñez, Paul B. Savage and Eduardo Martínez-Naves

Immature human dendritic cells infected with Leishmania infantum are resistant to NK mediated cytotoxicity, but are efficiently recognized by NKT cells. Enviado

Contribuciones a Congresos

Autores: Y. Campos-Martín, M. Gómez del Moral, E. Martínez-Naves.

Título: Estudio de la interacción de la molécula CD1d (HLA-Ib) humana con células NK

Tipo de participación: Poster

Congreso: XXVIII Congreso Nacional de Inmunología

Publicación: Vol: 21, 47.2002.

Lugar celebración: Valladolid

Fecha: Junio 2002

Autores: J.F. Parra-cuadrado, Y. Campos-Martín, P. Navarro, M. Gómez del Moral, F. Setién y E. Martínez-Naves.

Título: "Inmunoprecipitación de la molécula MR1 (MHC Related 1) con antisueros específicos"

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXVIII Congreso Nacional de Inmunología

Publicación: Vol: 21, 32.2002

Lugar celebración: Valladolid

Fecha: Junio 2002

Autores: Gómez del Moral M., Avilés B., Colberger I; Campos-Martín Y; Sánchez-Fructuoso A., Prats D., Barrientos B. y Martínez Naves E.

Título: "Estudio de la expresión génica de ICAM-1, LFA-1, LFA-3, VCAM-1, RANTES, CD40 y CD40L en riñones de donantes en parada utilizados en trasplante renal".

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXVIII Congreso Nacional de Inmunología

Publicación: Vol: 21, 87.2002

Lugar celebración: Valladolid

Fecha: Junio 2002

Autores: Y. Campos-Martín, M. Gómez del Moral, E. Martínez-Naves

Título: -. "La molécula CD1d inhibe la actividad citotóxica de células NK en humanos".

Tipo de participación: Oral

Congreso: Congreso Nacional de Inmunología.

Publicación: Vol: 22, 159.2003.

Lugar celebración: Cádiz

Fecha: Mayo 2003

Autores: E.Peralbo, O.de la Rosa, Y.Campos-Martín, JG.Casado, R.Tarazona, E.Martínez-Naves y R.Solana.

Título: Análisis de la actividad citotóxica de células NKT V 24+ V 11+ expandidas *in vitro*"

Tipo de participación: Poster

Congreso: XXIX Congreso Nacional de Inmunología.

Publicación: Vol :22,164.2003.

Lugar celebración: Cádiz

Fecha: Mayo 2003

Autores: Yolanda Campos-Martín, Manuel Gómez del Moral, Beatriz Gozalbo-López, Javier Suela and Eduardo Martínez-Naves

Título: Expresión of human CD1d molecules protects target cells from NK cell mediated cytotoxicity

Tipo de participación: Póster

Congreso: Centro de reuniones sobre Biología. Fundación Juan March: STIMULATORY AND INHIBITORY RECEPTORS OF THE INNATE IMMUNE SYSTEM

Lugar celebración: : Fundación Juan March.Madrid Fecha: Enero 2004

Autores: Yolanda Campos-Martín, Manuel Gómez del Moral, Beatriz Gozalbo-López, Javier Suela and Eduardo Martínez-Naves

Título: La inhibición de la actividad citotóxica de las células NK por CD1d es dependiente de ligando

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

Publicación: Vol 23 (Suplemento 1), 88. 2004

Lugar celebración: Santander

Fecha: Mayo 2004

Autores: Beatriz Gozalbo López, Fernando Setién Baranda, Yolanda Campos Martín, Manuel Gómez del Moral, Javier Suela Rubio, Eduardo Martínez Naves

Título: Producción de una proteína de fusión MR1-FLAG soluble en células de ratón y humanas

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

Publicación: Vol 23 (Suplemento 1), 84. 2004.

Lugar celebración: Santander

Fecha: Mayo 2004

Autores: E. Peralbo, O. de la Rosa, Y. Campos-Martín, JG. Casado, R. Tarazona, J. Peña, E. Martínez Naves, R. Solana

Título: Caracterización fenotípica y funcional de células NKT V α 24+ V β 11+ expandidas *in vitro*

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

Publicación: Vol 23 (Suplemento 1),90.2004

Lugar celebración: Santander

Fecha: Mayo 2004

Autores: Suela J, Campos-Martín Y, Gozalbo López B, Gómez-del Moral M, Martínez Naves E.

Título: Obtención y caracterización de una línea inmortalizada de células epiteliales del túbulo proximal renal usando vectores retrovirales con telomerasa

Tipo de participación: Poster

Congreso: XXX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

Publicación: Vol 23 (Suplemento 1), 162. 2004.

Lugar celebración: Santander

Fecha: Mayo 2004

Autores: Campos-Martín Y, Colmenares M, López-Nuñez M, Gozalbo-López B, Suela J, Martínez-Naves E.

Título: LA INFECCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y MACRÓFAGOS POR *Leishmania infantum* INDUCE EXPRESIÓN DE CD1D Y CONFIERE RESISTENCIA A LA LISIS POR CÉLULAS NK AUTÓLOGAS.

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXXI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

Publicación: Inmunología 24 (Suplemento 1), 116. 2005.

Lugar celebración: Córdoba

Fecha: Mayo 2005

Autores: Gozalbo López B, Gómez del Moral M, Campos Martín Y, Suela Rubio J, López Nuñez M, Setién Baranda E F, Martínez Naves E

Título: LA MOLÉCULA MR1 SE ACUMULA EN VESÍCULAS INTRACELULARES Y PUEDE LLEGAR A SUPERFICIE CELULAR A 26°C

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXXI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

Publicación: Inmunología 24 (Suplemento 1), 111. 2005.

Lugar celebración: Córdoba

Fecha: Mayo 2005

Autores: Suela Rubio J, Gómez del Moral M, Campos Martín Y, Gozalbo López B, Meza N, Sánchez Fructuosos A, Nuñez Peña J R, Barrientos Guzmán A, Martínez Naves E.

Título: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR HIF (HIPOXIA INDUCIBLE FACTOR) EN RIÑONES PARA TRANSPLANTE DE DONANTES EN ASISTOLIA

Tipo de participación: Oral

Congreso: XXXI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología

Publicación: Inmunología 24 (Suplemento 1), 89. 2005.

Lugar celebración: Córdoba

Fecha: Mayo 2005

Expression of Human CD1d Molecules Protects Target Cells from NK Cell-Mediated Cytolysis¹

Yolanda Campos-Martín,* Manuel Gómez del Moral,[†] Beatriz Gozalbo-López,* Javier Suela,* and Eduardo Martínez-Naves^{2*}

The cytotoxic activity of NK cells can be inhibited by classical and nonclassical MHC molecules. The CD1 system is formed by a family of glycoproteins that are related to classical MHC. CD1a, b, and c molecules present lipids or glycolipids to T cells and are involved in defense against microbial infections, especially mycobacteria. It has been shown recently that these molecules can inhibit target cell lysis by human NK cells. It has also been shown that mouse CD1d molecules can protect cells from NK cell-mediated cytotoxicity. In the present study, we describe how human CD1d, orthologous to murine CD1 molecules, can inhibit NK cell-mediated cytotoxicity. We have expressed CD1d in the HLA class I-deficient cell lines L721.221 and C1R. The inhibitory effect is observed when effector NK cells from different donors are used, as well as in different cell lines with NK activity. The inhibitory effect was reversed by incubating the target cells with a mAb specific for human CD1d. Incubation of target cells with the ligands for CD1d, α -galactosylceramide (α -GalCer), and β -GalCer abolishes the protective effect of CD1d in our in vitro killing assays. Staining the effector cells using CD1d tetramers loaded with α -GalCer was negative, suggesting that the putative inhibitory receptor does not recognize CD1d molecules loaded with α -GalCer. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 7297–7305.

Natural killer cells are a lymphoid population distinct from T and B lymphocytes. Initially, NK cells were characterized as cells capable of killing some tumor cells without previous activation. It is now known that NK cells play important roles in host defense against pathogens such as herpesvirus, in tumor immunity, and in the rejection of transplants. Upon activation, NK cells are able to secrete a variety of cytokines that can induce inflammation. They also play a role in regulating the immune response.

NK cells are regulated through activating and inhibitory receptors that allow them to distinguish between healthy and diseased cells. There are a number of these receptors, and their function is the subject of active research. The ligand(s) for activating receptors has not yet been identified (1). The ligands for inhibitory receptors are MHC class I proteins (2). Loss of expression of class I proteins induced by a viral infection or a tumoral transformation renders most cells highly susceptible to lysis by NK cells. Thus, NK cells seem to act as complementary players to CTL because they are able to kill cells invisible to CTL.

Initially, classical MHC class I molecules were identified as ligands for NK inhibitory receptors (2). Recognition of class I molecules is highly specific, and there are receptors capable of distinguishing locus or allelic variants of MHC class I molecules (3). Nonclassical MHC molecules are also able to inhibit NK lysis (4). CD94/NKG2A is an inhibitory receptor that recognizes

HLA-E, a nonpolymorphic MHC class Ib molecule in humans (5). In mice, Qa-1, which is HLA-E orthologous, is recognized by CD94/NKG2A (6). Another member of the Qa-2 family, Q9 has also been shown to inhibit NK cell and lymphokine-activated killer (3) cell-mediated cytotoxicity (7). The family of MHC-related genes also includes genes, in mice and in humans, outside the MHC complex. Recently, a new taxonomy for this family of genes has been proposed (8). Following this nomenclature, classical HLA-A, -B, and -C would be named as HLA class Ia, whereas the genes located inside the HLA complex and showing high similarity to the classical (HLA-E, -F, and -G) would be named as class Ib. More divergent genes with respect to the classical and located inside the HLA complex (MIC, HFE) would be named as HLA class Ic. Finally, genes located outside the HLA complex, and often being more divergent with respect to the classical (FcRN, ZAG, MR1, CD1, ULBP, EPCR), would be named as class Id. This last group includes gene-encoding and Ag-presenting molecules such as MR1 and CD1.

The CD1 genes encode a family of glycoproteins that are related to MHC molecules (9). CD1 molecules can be divided in two groups according to sequence homology and tissue distribution (10). Human CD1A, -B, and -C genes are members of group I, whereas group II is formed by CD1D. Mice only have group II CD1 genes, CD1D1 and CD1D2, which are 95% homologous. Mouse and human CD1 molecules are able to present nonpeptide Ags to T cells. CD1a, b, and c molecules present lipids or glycolipids to T cells and are involved in defense against microbial infections, especially mycobacteria. The three-dimensional structure of the murine CD1d molecule has been solved, and it shows a folding very similar to HLA class I molecules (11). Human CD1d and murine CD1d1 are able to present α -galactosylceramide (α -GalCer³; a ceramide initially isolated from a marine sponge with a potent antitumoral effect) to NKT cells (12). NKT cells are a specialized set of T lymphocytes capable of secreting large

*Unidad de Inmunología and [†]Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Received for publication December 15, 2003. Accepted for publication April 7, 2004.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by a grant from Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (BMC2001-1382) (to E.M.-N.). Y.C.-M. is the recipient of a predoctoral fellowship from Universidad Complutense. B.G.-L. is supported by a predoctoral fellowship from Spanish Ministerio de Educación y Cultura.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Eduardo Martínez-Naves, Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Avenida Complutense s/n. 28040 Madrid, Spain. E-mail address: emnaves@med.ucm.es

³ Abbreviations used in this paper: α -GalCer, α -galactosylceramide; β -GalCer, β -galactosylceramide; HVS, *Herpesvirus saimiri*; LDH, lactate dehydrogenase; P-20, polysorbate 20; rHL-2, human rHL-2.

amounts of cytokines, including IL-4 and IFN- γ , which can have multiple regulatory activities (13).

It has been shown that murine CD1d1 molecules can inhibit the cytotoxic activity of lymphokine-activated killer cells (14). Furthermore, it has been shown that human CD1 group I molecules, CD1a, b, and c, can also inhibit NK cell lysis (15). We show in this study that human CD1d molecules can also inhibit NK activity.

Materials and Methods

CD1D cloning and expression

Total RNA was isolated from the epithelial cell line Caco-2 using the ULTRASPEC RNA isolation method (Biotech Laboratories, Houston, TX). First strand cDNA was synthesized from total RNA using first strand cDNA synthesis kit (Roche Biochemicals-Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Full-length CD1D cDNA was obtained after PCR amplification using primers CD1D3 (5'), GGGCGTCGACAGAAGAGTGCGCAGGTCAGAG and CD1D4 (3'), CCGCAAGCTTGAAGTCTTGGGAACCTGAGGTC containing *Sall* and *HindIII* recognition sites at 5' ends. The PCR products were sequenced and cloned into pSR α Neo vector. The plasmid was transfected by electroporation in the HLA class I-deficient lymphoblastoid cell lines L721.221 (16) and C1R (17).

Cells expressing high levels of CD1d were selected using Dynabeads M-450 (Dynal Biotech, Great Neck, NY) and the Ab 51.1.3 (gift from Dr. S. A. Porcelli, Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) specific for human CD1d (18, 19). HLA-B48.221 (20) and CD1a.221 (21), generated previously in our laboratory, were used as controls in the cytotoxicity assays. All the cell lines were cultured in RPMI 1640, 1% antibiotic/antimycotic solution (Life Technologies, Carlsbad, CA), and 10% FCS (Harlan Sera-Lab, Indianapolis, IN).

NK cell culture

PBMC were isolated by centrifugation on Lymphoprep (Amersham Biosciences, Amersham, U.K.) gradients from healthy donors and from healthy donors' buffy coats (obtained from the Blood Bank of the Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain). Cells were activated for 48–72 h with 800 IU/ml human rIL-2 (rhIL-2) (gift from Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ, and Dr. C. W. Reynolds, Frederick Cancer Research and Development Center, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, MD), before their use in cytotoxicity assays. Fresh NK cells CD56⁺ were isolated from PBMC activated with 800 IU/ml rhIL-2 (3) for 48–72 h. CD56⁺ was selected by immunomagnetic separation using magnetic beads (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany). CD56⁺ cells were maintained in culture with rhIL-2 (50 IU/ml) previous to the cytotoxicity assays. CD56⁺CD3⁻ were isolated from PBMC healthy donors' buffy coats, using the NK Cell Isolation kit II human (Miltenyi Biotec). Two rounds of CD3⁺ cell depletion were used, and >95% of the cells were CD56⁺CD3⁻ as assessed by FACS analysis. CD56⁺CD3⁻ cells were activated with rhIL-2 (50 IU/ml) previous to the cytotoxicity assays. All these effector cells were cultured in RPMI 1640, 1% antibiotic/antimycotic solution, and 10% FCS. The cell line NKL (22) (kindly provided by Dr. M. López-Botet, Unidad de Inmunopatología molecular, Universidad Pompeu Fabra, Barcelona, Spain) was cultured with RPMI 1640, 1% antibiotic/antimycotic solution, 10% human serum AB (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), and rhIL-2 (50 IU/ml). T cell lines CD8⁺ immortalized with *Herpesvirus saimiri* (HVS) with NK activity (23) were cultured in 50% RPMI 1640, 50% PanSerin 401 (PAN; Biotec International, Aidenbach, Germany) with 1% antibiotic/antimycotic solution, and 10% FCS, and activated with 40 IU/ml rhIL-2.

NKT cell expansion

PBMC were isolated by centrifugation on Lymphoprep gradients from healthy donors. A total of 1×10^6 cells/ml was cultured in 24-well plates with RPMI 1640, 1% antibiotic/antimycotic solution, and 10% FCS. PBMC were activated with 50 IU/ml rhIL-2 and 100 ng/ml α -GalCer (Kirin, Tokyo, Japan), for 2 wk. Abs, anti-V α 24 and anti-V β 11 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), were used to isolate NKT cells by Miltenyi Biotec MicroBeads, and to identify them by FACS analysis.

Abs, F(ab')₂ production, and flow cytometry analysis

Anti-human CD1d mAbs used in this study were 51.1.3 (mouse IgG2b) (gift from Dr. S. A. Porcelli) (18, 19) and CD1d42 (mouse IgG1, κ) (BD PharMingen, San Diego, CA). Other Abs used were: anti-human CD1a OKT6 (mouse IgG1) culture supernatant (from American Type Culture

Collection (ATCC), Manassas, VA); anti-human HLA-B48 MB40.3 (mouse IgG1) culture supernatant (from ATCC) purified by protein A column affinity (Bio-Rad, Richmond, CA); conjugated anti-human CD3 Leu4-PE (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ); a PE-coupled polyclonal goat anti-mouse IgG (H + L) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), used as a secondary Ab in FACS analysis; and conjugated anti-human CD56-PE (Miltenyi Biotec). Finally, CD1d-Fc/PA-A488 tetramers (24) (gift from Dr. J. Gumperz, Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin-Madison Medical School, Madison, WI) were also used in FACS analysis. An Epics Elite cytometer (Beckman Coulter) was used in the flow cytometry analysis. Typically, 20×10^4 to 30×10^4 cells were stained in each analysis.

F(ab')₂ CD1d42 and MB40.3 (used as negative control) were generated, using an Immunopure IgG1 Fab and F(ab')₂ preparation kit (Pierce, Rockford, IL), by Ficin enzymatic digestion for 20 h, and purified by passing through a protein A column, followed by concentration of the sample using CentriconYM-10 (Millipore, Billerica, MA) and dissolving in PBS (Valeant, Costa Mesa, CA). The concentration of F(ab')₂ was measured by the Bio-Rad DC colorimetric assay for protein, based on the Lowry assay. The correct fragmentation of the Abs was checked in a SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels under reducing conditions. CD1d.221 and CD1d.C1R were labeled with CD1d42 F(ab')₂, followed by anti-mouse Ig κ -PE (BD Biosciences), to be sure that the F(ab')₂ generated recognized CD1d expressed in these cell lines.

L721.221 and C1R transfectant cell lines were incubated with 4 μ g/ml specific anti-CD1d F(ab')₂ for 30 min at room temperature, washed twice, and used in the cytotoxicity assays.

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was measured using the conventional 4-h ⁵¹Cr release assay (15) and the nonradioactive cytotoxicity detection kit lactate dehydrogenase (LDH; Roche Biochemicals). Target cells were cultured in 96-well plates V, with effector cells for 4 h, at different E:T ratio. The percentage of specific lysis in each assay depends on the amount of LDH activity detected in the culture supernatant. LDH is rapidly released into the cell culture supernatant upon damage of the plasma membrane. The culture cell-free supernatants were collected and incubated with the reaction mixture from the kit. A Microplate Autoreader Bio-Tek instrument (Cultek, Madrid, Spain) was used to read the absorption. All cytotoxic assays were performed in triplicate. Percent specific lysis was calculated as: $100 \times (\text{experiment value} - \text{low control})/(\text{high control} - \text{low control})$.

Pretreatment of Mock.221 and CD1d.221 was performed by adding 100 ng/ml α -GalCer dissolved in polysorbate 20 (P-20) (Kirin), α -GalCer dissolved in DMSO (a gift from Dr. P. Savage, Department of Chemistry and Biochemistry, Brigham Young University, Provo, UT), synthetic β -galactosylceramide (β -GalCer) (C12) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), and bovine brain β -GalCer (Sigma-Aldrich) as CD1d Ags. Mycolic acid from *Mycobacterium tuberculosis* (human strain) (Sigma-Aldrich) was used as an additional CD1 Ag control. P-20 (Kirin) and DMSO (Sigma-Aldrich), respectively, were used as controls, added to 35×10^4 cells in a final volume of 500 μ l of culture medium, and incubated overnight at 37°C. Purified CD56⁺CD3⁻ were used as effector cells.

Statistical analysis

We analyzed samples with the Kolmogorov-Smirnoff and χ^2 tests for normality distribution and Bartlett and Cochran's test to assure homoscedasticity. We used one-way ANOVA to test for differences between experiments. The figures represent the mean \pm SEM of specific lysis in our cytotoxicity tests.

To analyze the CD1 ligand effect on our in vitro cytotoxicity tests, we first calculated the percentage of lysis inhibition, which represented the difference between percentage of lysis of Mock.221 and percentage of lysis of CD1d.221, in each treatment (nontreatment, ligand treatment, and vehicle).

Results

Expression of CD1d molecules on the MHC class I-negative cell lines inhibits the cytotoxicity of NK cells and different cell lines with NK activity

To investigate the possible action of CD1d on NK cells, we decided to use the class I-negative cell line L721.221 and C1R as models. Both L721.221 and C1R cells were transfected with human CD1d cDNA. Expression of CD1d molecules on the cell surface was analyzed by FACS. Cells expressing high levels of CD1d were selected by magnetic beads. Next, we obtained two cell lines

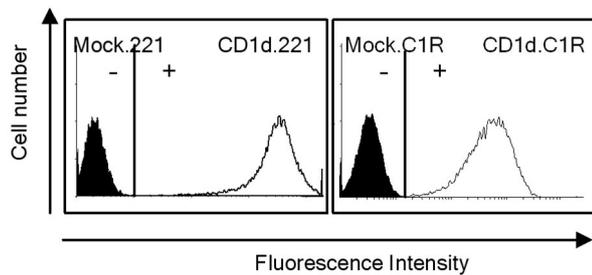


FIGURE 1. Analysis of CD1d expression. L721.221 and C1R cells transfected with CD1d-encoding cDNA express high levels of CD1d on the cell surface, as assessed by FACS analysis. Filled histograms indicate the fluorescence intensity of cells Mock.221 or Mock.C1R stained with CD1d42 mAb. Open histograms show fluorescence of cells CD1d.221 or CD1d.C1R stained with CD1d42 mAb. The symbol – shows the stained cells obtained with the isotype control mAb.

that we named CD1d.221 and CD1d.C1R. We also transfected L721.221 and C1R cells with the vector alone, generating the mock cell lines that we used as controls. Fig. 1 shows the expression of CD1d analyzed by FACS using the CD1d-specific Ab CD1d42. Transfected L721.221 and C1R cells express high levels of CD1d compared with those of the mock-transfected controls.

We first decided to study the possible effect of CD1d expression on the cell surface, using as effector cells freshly isolated PBMC. Our initial *in vitro* killing assays included Mock.221 and CD1d.221 as target cells. As a control, we decided to include cells previously generated in our laboratory, expressing high levels of CD1a (CD1a.221) and the class I HLA molecule B48 (HLA-B48.221). The CD1a molecule has been previously shown to inhibit NK lysis, and HLA-B48 is a classical class I molecule that is likely to inhibit NK cytotoxicity. The killing activity of freshly isolated PBMC was inhibited in the cells expressing HLA-B48, CD1a, as well as in CD1d, in comparison with the mock-trans-

ected cell lines, as shown in Fig. 2*a*. This inhibition was observed in independent experiments using cells from different donors, although the amount of the protection varied between individuals (results not shown). Results showing higher levels of inhibition were obtained in experiments with bulk short-term IL-2-activated PBMC, as shown in Fig. 2*b*. A clear reduction in the susceptibility to NK lysis was observed in CD1a.221, HLA-B48.221, and CD1d.221 cells compared with the mock-transfected L721.221 cells.

We next purified CD56⁺CD3⁻ cells and used them as effector cells in the *in vitro* killing assays. At this point, we also decided to include a second target cell type, and the CD1d cDNA was transfected into the HLA class I-deficient C1R cell (see Fig. 1). As expected, both C1R and L721.221 cells were efficiently lysed by CD56⁺CD3⁻ cells. The expression of CD1d on the cell surface significantly reduced the specific lysis in both targets, as shown in Fig. 2*c*.

We also included in our studies different cell lines with NK activity. First, we used the NKL cell line (22). In this case, CD1d also inhibits the cytotoxic activity against L721.221 and C1R, as shown in Fig. 3*a*.

Human T cells CD8⁺ transformed with HVS-T cells have been shown to display NK activity against the K562 cell line (23). Thus, we decided to investigate whether HVS-T cell lines also were able to kill the cell line L721.221. We tested several HVS-transformed T cells to identify those with significant NK activity against L721.221 cells. Fig. 3*b* shows the results of the cytotoxicity assays using three different CD8⁺ HVS-T cell lines: HVS-CJL, HVS-ANZ, and HVS-CTO. The lysis of CD1d.221 was always lower than the lysis of Mock.221. However, significant differences were observed between the cell lines regarding the ability of CD1d to inhibit killing in the cytotoxicity test. The cell line HVS-CTO was the most sensitive regarding the CD1d inhibition of the NK activity, and for that reason we selected this cell line for subsequent experiments. The NK cytotoxicity of HVS-CTO against the CD1d.C1R was also reduced compared with mock.C1R (Fig. 3*b*).

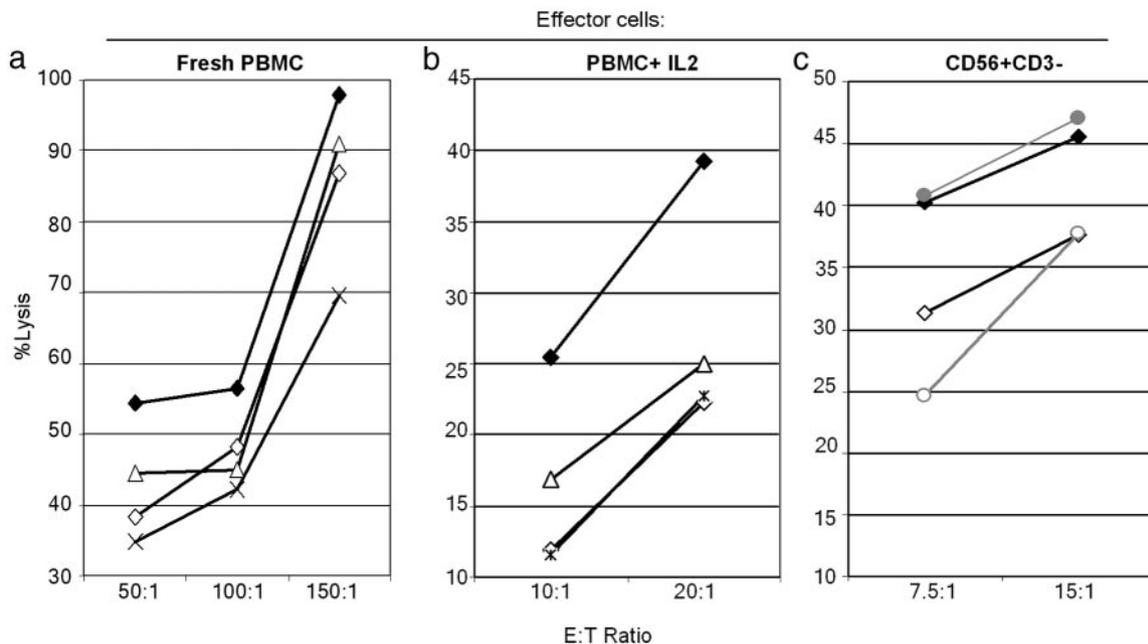


FIGURE 2. PBMCs, IL-2-activated PBMCs, and CD56⁺CD3⁻ cytolytic activity. *a*, Cytotoxicity against Mock.221 cells of freshly isolated PBMC was higher than that of CD1d.221, B48.221, and CD1a.221 transfectants. *b*, The differences were more pronounced when IL-2-activated PBMC were used. Mock.221 (◆), CD1d.221 (◇), HLA-B48.221 (Δ), and CD1a.221 (X). *c*, The cytotoxicity of CD56⁺CD3⁻ effector cells against CD1d.221 and CD1d.C1R transfectants is reduced compared with mock-transfected target cells. Mock.221 (◆), CD1d.221 (◇), Mock.C1R (●), and CD1d.C1R (○). The results shown are representative of at least three independent experiments.

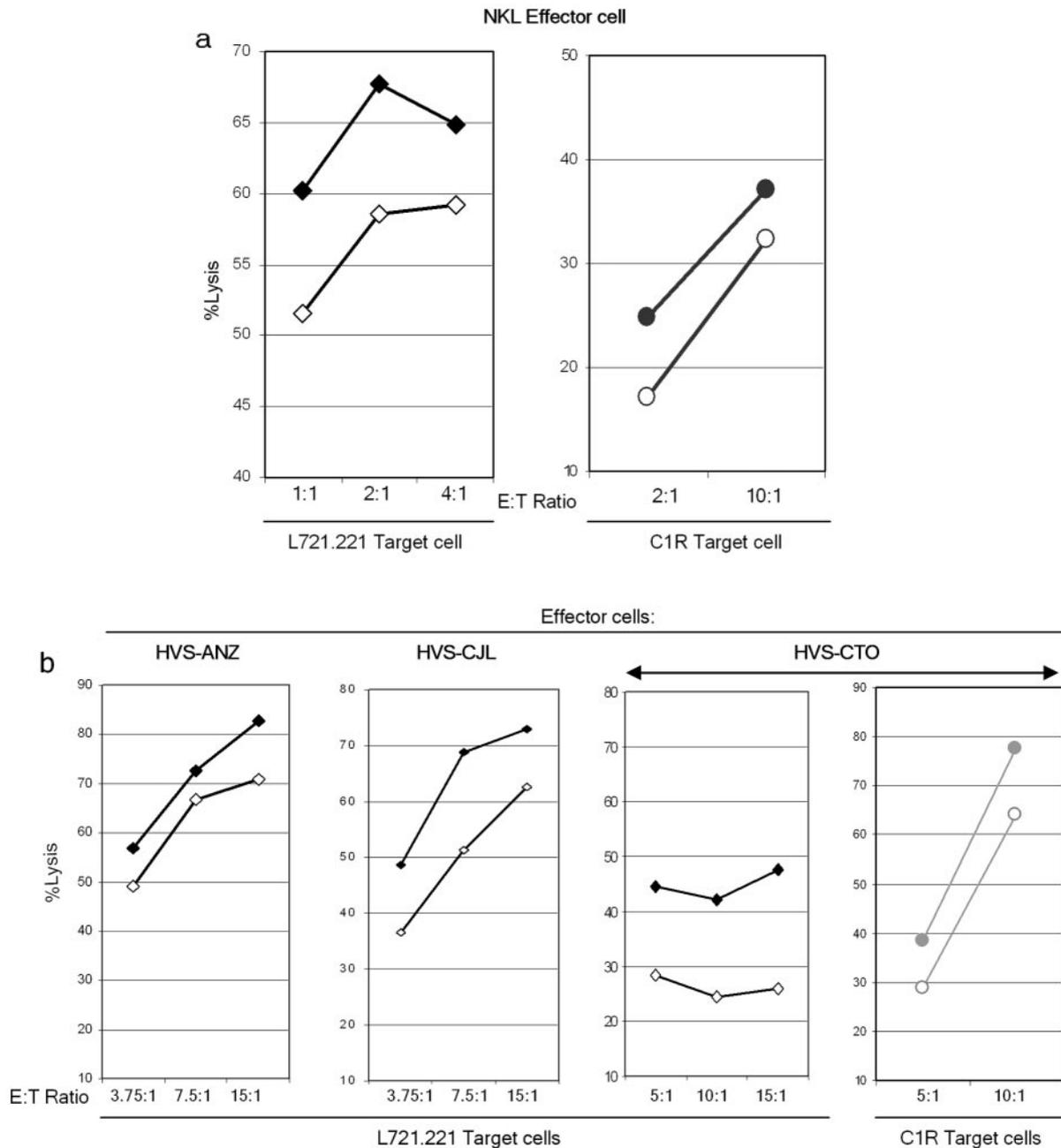


FIGURE 3. Cytolytic activity of NK and HVS-T cell lines. The cytotoxicity of *a*, NKL and *b*, HVS-T cell lines against CD1d.221 and CD1d.C1R transfectants is reduced compared with mock-transfected target cells. Mock.221 (◆), CD1d.221 (◇), Mock.C1R (●), and CD1d.C1R (○). The results shown are representative of at least three independent experiments.

To confirm the results obtained, we decided to replicate a number of experiments and to apply accurate statistical analysis. Fig. 4 summarizes the results of these experiments in which we observed statistically significant differences in the lysis of Mock.221 and CD1d.221 cells with different effector cells: CD56⁺CD3⁻, HVS-CTO, and NKL.

The inhibitory effect of CD1d expression on L721.221 is reversed by mAbs against CD1d

To confirm the specificity of the inhibition of CD1d, we performed additional cytotoxicity experiments in which the target cells were pretreated with mAbs against CD1d. Fig. 5 shows that the F(ab')₂ of the mAb CD1d42 is able to partially reverse the inhibitory effect of CD1d in all the effector cells studied. This reversion was statistically

significant with the three types of effector cells, as observed in Fig. 5. A similar, but less pronounced effect was observed with the mAb 51.1.3 (data not shown).

Effect of α -GalCer on CD1d-dependent NK inhibition

The natural ligand of CD1d molecules is currently unknown. However, human and murine CD1d molecules bind and present α -GalCer to NKT lymphocytes. To investigate the effect of this compound in the inhibition of NK activity, we performed the cytotoxicity tests after pretreating the target cells with α -GalCer. As shown in Fig. 6*a*, our results suggest that pretreatment of the target cells with α -GalCer seems to abolish the inhibitory effect of CD1d. However, when the cells were pretreated with the vehicle (P-20) alone, the same effect

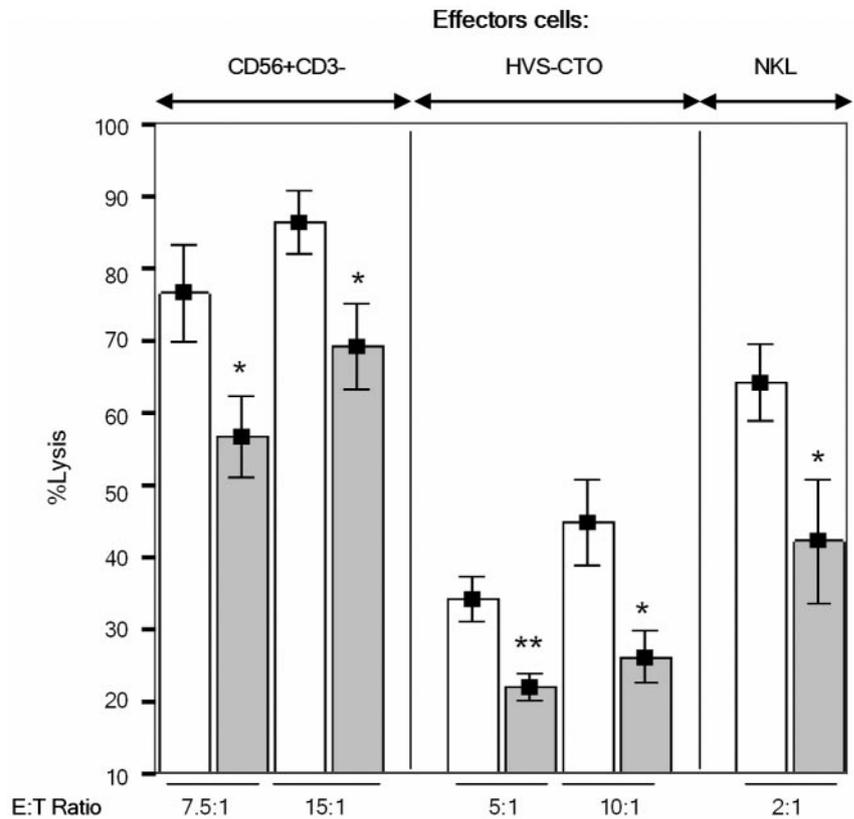


FIGURE 4. Statistical analysis of CD56⁺CD3⁻, HVS-CTO, and NKL cytolytic activity. The figure shows significant differences between Mock.221 and CD1d.221 lysis. The results were analyzed by ANOVA test, which showed: CD56⁺CD3⁻ effector cells, E:T ratio 7.5:1 and 15:1 (*, $p = 0.041$ and *, $p = 0.0346$, respectively) ($n = 8$); HVS-CTO effector cells, E:T ratio 5:1 and 10:1 (**, $p = 0.0044$ and *, $p = 0.0195$, respectively) ($n = 8$); and NKL effector cells, E:T ratio 2:1 (*, $p = 0.0481$) ($n = 7$). □, Correspond to lysis of Mock.221 cells; ▒, correspond to lysis of CD1d.221.

was observed. To avoid the P-20 effect, we next used α -GalCer dissolved in DMSO (Fig. 6*b*), confirming that the effect of α -GalCer is independent of the solvent, DMSO, in this case. It has been described previously that β -GalCer also binds to CD1d, so we tested its effect in the killing assays. Our data indicate that synthetic β -GalCer (as observed in Fig. 6*c*) is able to reverse the inhibitory effect of CD1d and that this effect is also independent of the vehicle (DMSO). Similar data were obtained with bovine brain β -GalCer (data not shown). Pretreatment of HLA-B48.221 and CD1a.221 with α -GalCer and β -GalCer dissolved in DMSO were used as controls, and no statistical differences were observed in their NK lysis inhibition (data not shown). In addition, mycolic acid from *M. tuberculosis*, CD1b-binding lipids, was used as Ag control with our target cells, and no differences in lysis inhibition were observed (data not shown).

To clarify the role of α -GalCer in our assays, we decided to verify its biological effect by testing the cytotoxicity of NKT cells against our CD1d.221 cells treated with or without α -GalCer. As expected, α -GalCer increases the cytotoxicity of NKT cells against CD1d.221 cells in a dose-dependent manner (data not shown), indicating that α -GalCer does bind to CD1d in our cells and can mediate a biological effect in NKT recognition.

Our results suggest that pretreatment of target cells with α -GalCer as well as β -GalCer reverses the inhibitory effect of CD1d expression in NK lysis. One explanation for this could be that these ceramides can displace an unknown endogenous ligand of CD1d, involved in the interaction with the NK inhibitory receptor, impairing its binding to CD1d loaded with α -GalCer or β -GalCer.

To find out whether CD1d loaded with α -GalCer is able to bind any receptor on the surface of NK cells, we performed flow cytometry experiments in which we stained our effector cells with CD1d-Fc/PA-A488 tetramers (a gift from Dr. J. Gumperz). As shown in Fig. 7, CD1d tetramers loaded with α -GalCer failed to stain any of the effector cells used in our study. In contrast, CD1d

tetramer clearly binds to $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ NKT cells used as controls.

Discussion

Previous studies have shown that CD1 molecules can inhibit NK cell-mediated cytotoxicity. Carbone et al. (15) have shown that human CD1a, b, and c molecules can inhibit NK cell-mediated cytotoxicity. Murine CD1 molecules, orthologous to human CD1d, can also inhibit lymphokine-activated killer and NK cytotoxicity (14). Murine and human CD1d molecules are very similar in terms of sequence; they bind the same ligand, α -GalCer; and are recognized by each other's NKT cells (25). The main difference between human and mouse CD1d is the tissue expression pattern. Human CD1d molecules are expressed mainly on epithelial cells, whereas murine CD1d molecules are expressed on most cells of hemopoietic origin (9). The CD1 system is divergent between humans and mice. In contrast to humans and other mammalian species, mice and rats lack orthology to the group I CD1 molecules that are present in other rodents, such as guinea pigs and rabbits (26). For that reason, we thought it would be interesting to investigate whether human CD1d molecules could behave as NK cell inhibitors.

The results of our study showed that NK-mediated cytotoxicity of freshly isolated PBMC, IL-2-activated PBMC, and CD56⁺ cells activated with IL-2 against the NK-sensitive target cell lines L721.221 and C1R can be partially inhibited by expression of CD1d on the cell surface. In addition, we have observed that expression of CD1a can also inhibit the cytotoxicity on L721.221. This observation is in agreement with the results of Carbone et al. (15), in which they observed that the NK-sensitive cell lines T2 and HeLa are protected in NK cytotoxicity assays when transfected with CD1a, b, or c molecules.

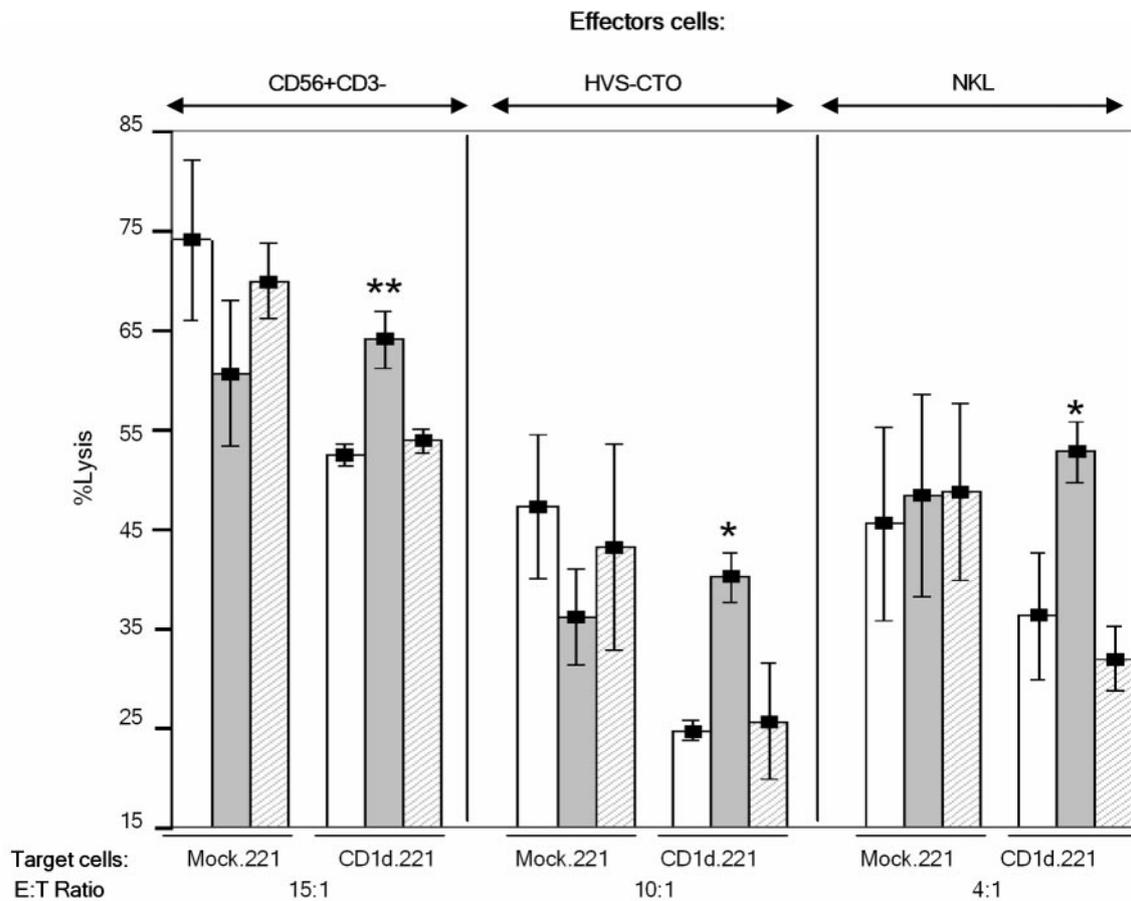


FIGURE 5. Effect of CD1d-specific F(ab')₂ mAb. The inhibitory effect of CD1d expression on L721.221 is reversed by pretreatment of target cells with CD1d42 F(ab')₂ mAb. In CD56⁺CD3⁻, in HVS-CTO, and in NKL, the different colors of the columns depend on the target cells pretreatment. □, Correspond to target cells not pretreated; ■, correspond to target cells pretreated with F(ab')₂ CD1d42; ▨, correspond to F(ab')₂ control. Differences between CD1d.221-nontreated cells and cells treated with control F(ab')₂ are statistically significant: CD56⁺CD3⁻ ($p = 0.0099$; **, $p < 0.01$) ($n = 3$), HVS-CTO ($p = 0.0446$; *, $p < 0.05$) ($n = 3$), and NKL ($p = 0.0396$; *, $p < 0.05$) ($n = 3$).

In our study, we also included two kinds of cell lines with NK activity: NKL and HVS-transformed T cells. NKL is a cell line characterized by having a number of inhibitory receptors, and has been used previously in cytotoxicity experiments with L721.221 cells. Our data showed that this cell line kills L721.221 more efficiently than C1R. This is probably due to the fact that C1R expresses HLA-B35 at reduced levels and normal amounts of HLA-Cw04 (27), which could also induce the expression of HLA-E on the cell surface. It has been described that expression of CD1a, b, and c on C1R (15, 28) does not protect target cells from NK cytotoxicity. This observation could be explained by the masking effect of the endogenous HLA class I molecules. The effect of CD1d expression on C1R was not analyzed in those studies (15, 28). Another possibility could be a higher level of CD1d expression on our CD1d.C1R cells than the expression of CD1a–c in those C1R. However, our data show that CD1d can inhibit the lysis of L721.221 as well as C1R cells. This could suggest that the mechanisms (inhibitory receptors) governing CD1d-mediated inhibition can be different from those involved in CD1 type I molecules.

Most of CD8⁺ HVS-T cell lines have been shown to display NK-like cytotoxic activity, measured as the ability to efficiently kill the K562 cell line (23) (J. R. Regueiro, unpublished observations). We demonstrate in this study that these cells can also efficiently lyse L721.221 and C1R cell lines. Moreover, our data indicate that the NK-like HVS-T cytotoxicity can be inhibited by

expression of CD1d, although the quantitative effect varies between different effector cell lines. The molecular and cellular basis of the NK-like activity of HVS-T cell lines is, to our knowledge, unknown. Our results indicate that these cell lines can be a good model to study mechanisms, such as inhibitory receptors involved in the NK cytotoxicity inhibition by CD1d, and perhaps other MHC-related molecules.

In every case, the lysis inhibition we observed was not complete, but it was specific because it can be reversed in experiments using specific mAbs for CD1d. Another way to study the specificity of the phenomenon is to analyze the effect of CD1d-specific ligands. In mice, some ligands have been described for CD1d1. Cellular glycosylphosphatidylinositol was identified as a major ligand of mouse CD1d1. CD1d1 binds glycosylphosphatidylinositol through its phosphatidylinositol aspect with high affinity (29). Phosphatidylinositol could play a chaperone-like role during the assembly of CD1d1 in vivo (30). It has been described as an autoreactive NKT clone (V α 14J α 15) that is specifically activated, upon recognition of phosphatidylinositol bound to mouse CD1d1 (31). In contrast, the murine T cell lymphoma line L5178-R is known to shed a tumor-associated glycolipid, gangliosylceramide, into the culture medium. It has been found that this glycolipid was presented by CD1d1 and that it can inhibit CD1-specific stimulation of canonical (V α 14⁺), but not noncanonical (V α 5⁺) NKT cells (32). Phosphatidylethanolamine was also described as a natural Ag presented by CD1d1. An invariant NKT cell hybridoma

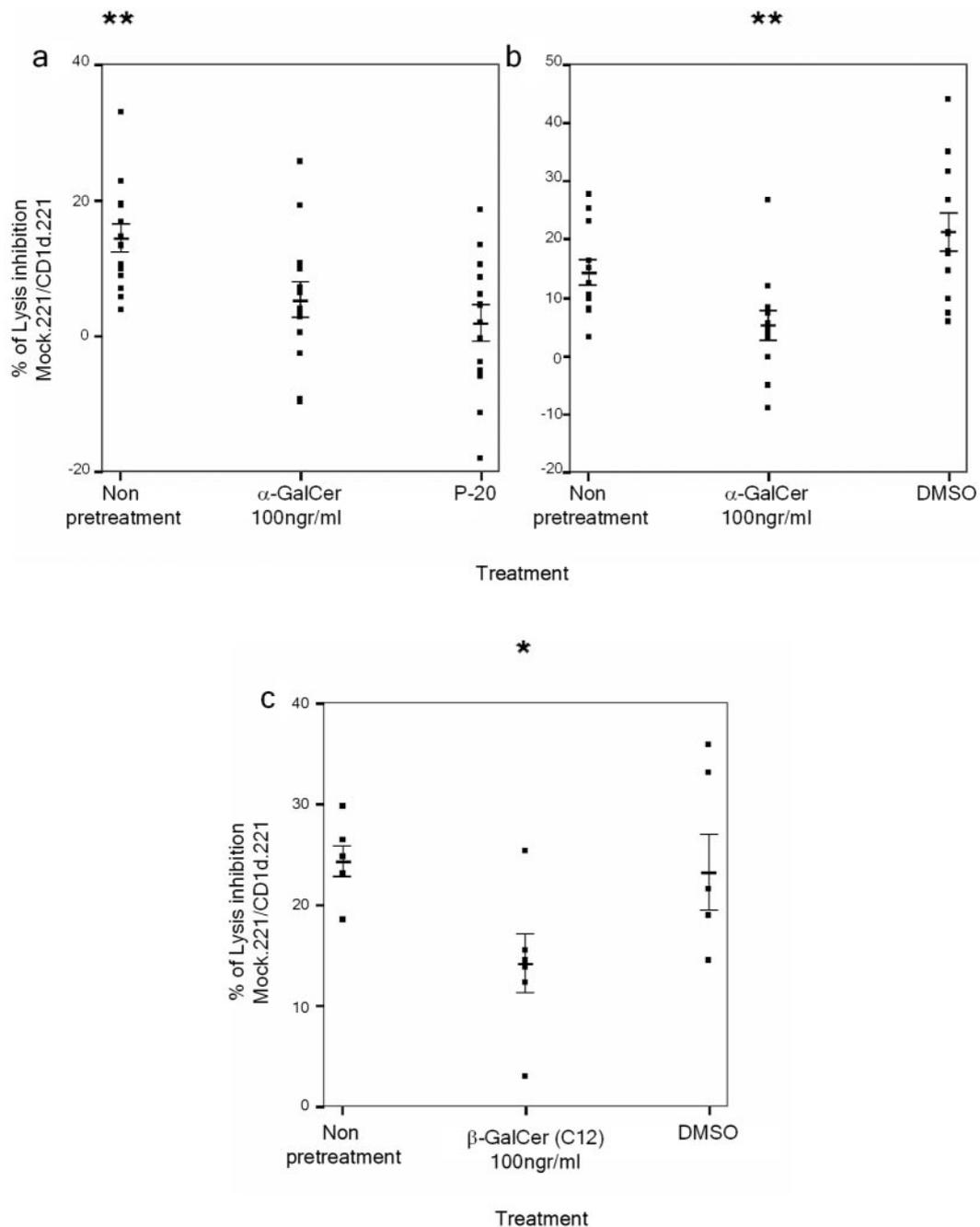


FIGURE 6. Effect of α -GalCer and β -GalCer presented by CD1d. *a*, The percentage of lysis inhibition was lower in target cells treated with α -GalCer and P-20 compared with untreated cells ($p = 0.0028$; **, $p < 0.01$) ($n = 14$). *b*, Pretreatment of target cells with α -GalCer abolishes the protector effect of CD1d compared with DMSO-treated or untreated target ($p = 0.001$; **, $p < 0.01$) ($n = 12$). *c*, β -GalCer bound to CD1d increased the NK lysis, compared with DMSO-treated and untreated target cells ($p = 0.046$; *, $p < 0.05$) ($n = 6$).

(24.8.A) was activated by this Ag, and this activation was correlated with the degree of unsaturation of the acyl chains (33). The natural endogenous ligands of human CD1d are unknown. However, the capacity of CD1d to bind and present α -GalCer is very well known. For this reason, we decided to study the effect of this compound in our cytotoxicity assays. Pretreatment of target cells with α -GalCer seemed to abolish the protective effect of CD1d in our in vitro killing assays. Unexpectedly, the same phenomenon was observed when the target cells were pretreated with P-20, the vehicle in which α -GalCer was dissolved. The reasons for this are unknown. P-20 can augment the sensitivity of the target cells to the NK cell-mediated cytotoxicity. This is, however, unlikely because L721.221 cells pretreated with P-20 are killed with the same effi-

ciency as the untreated targets. Another possibility is that P-20 may alter the nature of an endogenous ligand (maybe a lipid) of CD1d. This ligand could be involved in the interaction between CD1d and an inhibitory NK receptor. Of course, in this case, the effect of α -GalCer cannot be analyzed. In our cells, α -GalCer seems to be bound to CD1d, as demonstrated by the fact that CD1d.221 cells incubated with α -GalCer are more efficiently killed by NKT cells than untreated CD1d.221 cells. We thus decided to analyze the effect of α -GalCer dissolved in DMSO. In this case, no effect was observed with the vehicle (DMSO), but a decrease in the lysis inhibition was obtained in the presence of α -GalCer bound to CD1d, similar to that observed with α -GalCer dissolved in P-20.

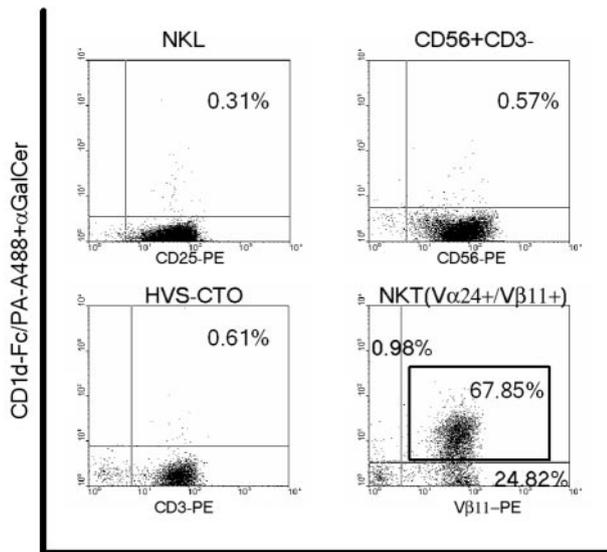


FIGURE 7. CD1d tetramers do not bind NK cells. Effector cells, NKL, CD56⁺CD3⁻, HVS-CTO, and NKT were stained with CD1d-Fc/PA-A488⁺αGalCer, in the y-axis, and with CD25-PE, CD56-PE, CD3-PE, and Vβ11-PE, respectively, in the x-axis.

We also use in our NK-mediated killing assays the related compound, β-GalCer, which is dissolved in DMSO. Pretreatment of CD1d.221 target cells with β-GalCer also abolishes the CD1d-mediated protective effect in the cytotoxicity tests. An explanation for our results could be that β-GalCer and α-GalCer can displace an endogenous ligand for CD1d that could be important for the interaction between the NK inhibitory receptor and CD1d. This receptor could be unable to bind to CD1d loaded with β-GalCer or α-GalCer. In this hypothesis, P-20 could have the effect suggested above, which would not occur when using DMSO as a solvent. This hypothesis could also explain our FACS analysis data in which CD1d tetramers loaded with α-GalCer did not bind to our effector cells. These results are in agreement with those from Gumperz et al. (24) and Ortaldo et al. (34) in which no NK cells were stained and only a fraction of T (NKT) cells was labeled by CD1d tetramers loaded with α-GalCer, and also with β-GalCer (34).

A different effect has a bacterial lipid Ag presented by CD1b, mycolic acid from *M. tuberculosis*, which may be able to significantly augment the protection against NK cell lysis conferred by this CD1 protein (15). This lipid Ag was used in cytotoxic assays with all our target cells, and no effect was observed.

In summary, our data suggest that CD1d could interact with a NK inhibitory receptor in NK and HVS-T cells. This inhibitory receptor could interact with CD1d in a ligand-dependent way, and β-GalCer and α-GalCer would act as antagonists of this ligand.

Our results are in agreement with those of the CD1d system in mice, although in this case, the effect of murine CD1d ligands was not analyzed. However, it was analyzed in the study of Carbone et al. (15), in which extracts from mycobacteria or the purified glucose monomycolate (ligands of type I CD1 molecules) led to an increase in the inhibition of NK killing.

The results presented in this work and those previously published by other groups strongly suggest the existence of inhibitory receptors for CD1 molecules in humans and mice. The identification of those receptors will clarify the important role of CD1 molecules in the immune response.

Acknowledgments

We thank Dr. S. Porcelli for Abs against human CD1d molecules; Dr. M. López-Botet for NKL cell line and for helpful advice; Dr. J. R. Regueiro for HVS-transformed T cell lines; Dr. Jenny Gumperz for the CD1d tetramers; Fundación Jiménez Díaz blood bank for buffy coats; Kirin for α-GalCer; Hoffman-LaRoche and Dr. Craig W. Reynolds for rHL-2; and Dr. Savage for α-GalCer dissolved in DMSO.

References

- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:197.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature* 319:675.
- Lanier, L. L. 1998. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16:359.
- Lopez-Botet, M., M. Llano, F. Navarro, and T. Bellon. 2000. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin. Immunol.* 12:109.
- Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, et al. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391:795.
- Vance, R. E., J. R. Kraft, J. D. Altman, P. E. Jensen, and D. H. Raulet. 1998. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J. Exp. Med.* 188:1841.
- Chiang, E. Y., M. Henson, and I. Stroynowski. 2002. The nonclassical major histocompatibility complex molecule Qa-2 protects tumor cells from NK cell- and lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 168:2200.
- Hughes, A. L., M. Yeager, A. E. Ten Elshof, and M. J. Chorney. 1999. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunol. Today* 20:22.
- Porcelli, S. A., and R. L. Modlin. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 17:297.
- Porcelli, S. A. 1995. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv. Immunol.* 59:1.
- Zeng, Z., A. R. Castano, B. W. Segelke, E. A. Stura, P. A. Peterson, and I. A. Wilson. 1997. Crystal structure of mouse CD1: an MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 277:339.
- Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, et al. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Vα14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626.
- Kronenberg, M., and L. Gapin. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2:557.
- Chang, C. S., L. Brossay, M. Kronenberg, and K. P. Kane. 1999. The murine nonclassical class I major histocompatibility complex-like CD1.1 molecule protects target cells from lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 189:483.
- Carbone, E., G. Terrazzano, A. Melian, D. Zanzi, L. Moretta, S. Porcelli, K. Karre, and S. Zappacosta. 2000. Inhibition of human NK cell-mediated killing by CD1 molecules. *J. Immunol.* 164:6130.
- Shimizu, Y., and R. DeMars. 1989. Production of human cells expressing individual transferred HLA-A, -B, -C genes using an HLA-A, -B, -C null human cell line. *J. Immunol.* 142:3320.
- Edwards, P. A., C. M. Smith, A. M. Neville, and M. J. O'Hare. 1982. A human-hybridoma system based on a fast-growing mutant of the ARH-77 plasma cell leukemia-derived line. *Eur. J. Immunol.* 12:641.
- Exley, M., J. Garcia, S. P. Balk, and S. Porcelli. 1997. Requirements for CD1d recognition by human invariant Vα24⁺ CD4⁻CD8⁻ T cells. *J. Exp. Med.* 186:109.
- Kim, H. S., J. Garcia, M. Exley, K. W. Johnson, S. P. Balk, and R. S. Blumberg. 1999. Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of β₂-microglobulin. *J. Biol. Chem.* 274:9289.
- Martinez-Naves, E., L. D. Barber, J. A. Madrigal, C. M. Vullo, C. Clayberger, S. C. Lyu, R. C. Williams, C. Gorodezky, T. Markow, M. L. Petzl-Erler, and P. Parham. 1997. Interactions of HLA-B*4801 with peptide and CD8. *Tissue Antigens* 50:258.
- Oteo, M., P. Arribas, F. Setien, J. F. Parra, I. Mirones, D. M. Gomez, and E. Martinez-Naves. 2001. Structural characterization of two CD1A allelic variants. *Hum. Immunol.* 62:1137.
- Robertson, M. J., K. J. Cochran, C. Cameron, J. M. Le, R. Tantravahi, and J. Ritz. 1996. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp. Hematol.* 24:406.
- Biesinger, B., I. Muller-Fleckenstein, B. Simmer, G. Lang, S. Wittmann, E. Platzer, R. C. Desrosiers, and B. Fleckenstein. 1992. Stable growth transformation of human T lymphocytes by *herpesvirus saimiri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3116.
- Gumperz, J. E., S. Miyake, T. Yamamura, and M. B. Brenner. 2002. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 195:625.
- Brossay, L., M. Chioda, N. Burdin, Y. Koezuka, G. Casorati, P. Dellabona, and M. Kronenberg. 1998. CD1d-mediated recognition of an α-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J. Exp. Med.* 188:1521.

26. Dascher, C. C., and M. B. Brenner. 2003. Evolutionary constraints on CD1 structure: insights from comparative genomic analysis. *Trends Immunol.* 24:412.
27. Zemmour, J., A. M. Little, D. J. Schendel, and P. Parham. 1992. The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J. Immunol.* 148:1941.
28. Storkus, W. J., M. Wei, P. Cresswell, and J. R. Dawson. 1996. Class I-like CD1A-C do not protect target cells from NK-mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 167:154.
29. Joyce, S., A. S. Woods, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, A. D. De Silva, A. Boesteanu, S. P. Balk, R. J. Cotter, and R. R. Brutkiewicz. 1998. Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol. *Science* 279:1541.
30. De Silva, A. D., J. J. Park, N. Matsuki, A. K. Stanic, R. R. Brutkiewicz, M. E. Medof, and S. Joyce. 2002. Lipid protein interactions: the assembly of CD1d1 with cellular phospholipids occurs in the endoplasmic reticulum. *J. Immunol.* 168:723.
31. Gumperz, J. E., C. Roy, A. Makowska, D. Lum, M. Sugita, T. Podrebarac, Y. Koezuka, S. A. Porcelli, S. Cardell, M. B. Brenner, and S. M. Behar. 2000. Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 12:211.
32. Sriram, V., S. Cho, P. Li, P. W. O'Donnell, C. Dunn, K. Hayakawa, J. S. Blum, and R. R. Brutkiewicz. 2002. Inhibition of glycolipid shedding rescues recognition of a CD1⁺ T cell lymphoma by natural killer T (NKT) cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:8197.
33. Rauch, J., J. Gumperz, C. Robinson, M. Skold, C. Roy, D. C. Young, M. Lafleur, D. B. Moody, M. B. Brenner, C. E. Costello, and S. M. Behar. 2003. Structural features of the acyl chain determine self-phospholipid antigen recognition by a CD1d-restricted invariant NKT (iNKT) cell. *J. Biol. Chem.* 278:47508.
34. Ortaldo, J. R., H. A. Young, R. T. Winkler-Pickett, E. W. Bere, Jr., W. J. Murphy, and R. H. Wiltout. 2004. Dissociation of NKT stimulation, cytokine induction, and NK activation in vivo by the use of distinct TCR-binding ceramides 1. *J. Immunol.* 172:943.

IMMATURE HUMAN DENDRITIC CELLS INFECTED WITH *LEISHMANIA INFANTUM* ARE RESISTANT TO NK MEDIATED CYTOLYSIS BUT ARE EFFICIENTLY RECOGNIZED BY NKT CELLS.

Yolanda Campos-Martín¹, María Colmenares², Beatriz Gozalbo-López¹, Marta López-Núñez¹, Paul B. Savage³ and Eduardo Martínez-Naves^{1*}

Running title: NK-T recognition of *Leishmania infantum* infected dendritic cells.

¹Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense.28040 Madrid. Spain.

²Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC .28040 Madrid. Spain.

³ Department of Chemistry and Biochemistry. Brigham Young University Provo, UT 84602

*Address correspondence and reprint request to Dr. Eduardo Martínez-Naves at his current address: Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Avda. Complutense s/n. 28040 Madrid. Spain.

Phone: 34-913941644, Fax:34-913941641

E-mail address: emnaves@med.ucm.es

Keywords: Human, DC, NK, NKT, CD1d, HLA-E, *Leishmania*

ABSTRACT

Dendritic cells (DC) play an important role in innate and adaptive immunity, interacting with T cells, Natural Killer (NK) and NKT cells. A critical step in the interaction of the parasitic protozoa *Leishmania* with their host is the evasion of both innate and adaptive immunity, producing a long-lasting chronic infection. There is growing evidence that these parasites can modify the antigen-presenting and immunoregulatory functions of DCs. The cells and mechanisms involved in innate immune response against *Leishmania* are still poorly understood.

Here, we investigated how *Leishmania infantum* infection affects DC interactions with NK and invariant NKT (iNKTs) cells in humans. We found that infected iDCs do not up-regulate HLA class I molecules. Despite this, iDCs become resistant to killing mediated by autologous NK cells due to the up-regulation of HLA-E expression, which protects target cells from NK mediated lysis through interaction with the inhibitory receptor CD94/NKG2A. Furthermore, iDCs infected with *L. infantum* up-regulate CD1d cell surface expression and consequently can be efficiently recognized and killed by iNKT cells that produce significant amounts of IFN- γ . These data suggest that *L. infantum* could be able to evade NK recognition; in contrast, iNKTs may play an important role in the immune response against *Leishmania*.