



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
— Facultad de Medicina —**

TESIS DOCTORAL

**ACTIVACIÓN, PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS
Y APOPTOSIS DEL LINFOCITO B EN LA
INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN**

Antonio Clemente Ximenis

2014

Directora

Dra. Joana Maria Ferrer Balaguer

Tutora académica

Dra. Paz Martínez Ramírez

El presente trabajo ha sido realizado con la ayuda de los proyectos FIS 05/0779, FIS 08/0362 y FIS 11/0160. El trabajo del doctorando Antonio Clemente Ximenis ha sido financiado por la beca CEB08/001 de la *Conselleria d'Economia i Innovació del Govern de les Illes Balears* y por el proyecto FIS 11/0160.

A mis padres.

Índice

	Pág.
Abreviaturas	11
Resumen/Summary	17
INTRODUCCIÓN	19
I. Inmunodeficiencias primarias humorales	21
II. Inmunodeficiencia Variable Común	25
2.1. Clínica	25
2.2. Defectos genéticos	28
2.3. Alteraciones linfocitarias	29
2.4. Clasificación de los pacientes	30
III. Activación y diferenciación del linfocito B	32
3.1. Centro germinal	33
3.1.1. Activación a través del BCR	35
3.1.2. Colaboración con el linfocito T	36
3.1.3. Apoptosis del linfocito B	38
3.2. Activación a través de TLR	39
3.3. Papel de las interacciones linfocitarias en periferia ..	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	47
I. Sujetos y criterios de inclusión	49
II. Obtención de células	49
III. Obtención de extractos bacterianos	52

	Pág.
IV. Cultivos celulares.....	52
4.1. Cultivos de células mononucleadas.....	53
4.1.1. Expresión de CD86 y proliferación de linfocitos	
B.....	53
4.2. Cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados y linfocitos	
B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados.....	53
4.2.1. Apoptosis y proliferación.....	53
4.2.2. Producción de inmunoglobulinas y expresión de	
CD38.....	54
V. Citometría de flujo.....	54
5.1. Análisis de marcadores de la superficie celular.....	54
5.1.1. Subpoblaciones de linfocitos B de sangre	
periférica.....	55
5.1.2. Expresión de TRAIL.....	56
5.1.3. Valoración de la pureza celular.....	56
5.1.4. Inducción de la expresión de moléculas de	
membrana.....	56
5.2. Apoptosis.....	57
5.3. Proliferación celular.....	59
5.4. Cuantificación de inmunoglobulinas.....	61
VI. Análisis estadísticos.....	61
RESULTADOS.....	63
CAPÍTULO I. Características de los pacientes estudiados.....	65

	Pág.
1.1. Clasificación de los pacientes con IVC.....	65
CAPÍTULO II. Activación y proliferación del linfocito B en	
cultivos de células mononucleadas.....	67
2.1. Inducción de la expresión de CD86 en linfocitos B	
CD19⁺ seleccionados.....	67
2.1.1. Respuesta al ligando de TLR-9.....	67
2.1.2. Respuesta a los extractos bacterianos.....	68
2.2. Proliferación de linfocitos B CD19⁺ seleccionados.....	70
2.2.1. Respuesta al ligando de TLR-9.....	70
2.2.2. Respuesta a los extractos bacterianos.....	72
CAPÍTULO III. Diferenciación del linfocito B y producción de	
inmunoglobulinas en cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados.	75
3.1. Inducción de la expresión de CD38 en linfocitos B	
CD19⁺ purificados.....	75
3.1.1. Respuesta al ligando de TLR-9.....	75
3.1.2. Respuesta al estímulo T-dependiente.....	76
3.2. Producción de inmunoglobulinas en linfocitos B CD19⁺	
purificados.....	78
3.2.1. Respuesta al ligando de TLR-9.....	78
3.2.2. Respuesta al estímulo T-dependiente.....	79
CAPÍTULO IV. Apoptosis y proliferación de linfocitos B	
CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺.....	81

	Pág.
4.1. Rescate de la apoptosis y proliferación de linfocitos	
B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ seleccionados.....	81
4.1.1. Efecto de la estimulación a través del BCR, TLR-9 o CD40 en controles sanos.....	81
4.1.2. Efecto de la estimulación a través del BCR, TLR-9 o CD40 en pacientes con IVC.....	83
4.1.3. Efecto de la coestimulación con IL-21 en controles sanos.....	86
4.1.4. Efecto de la coestimulación con IL-21 en pacientes con IVC.....	88
4.2. Rescate de la apoptosis y proliferación en linfocitos	
B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados.....	91
4.3. Expresión de TRAIL.....	93
DISCUSIÓN.....	95
CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA.....	115
ANEXO I - Artículos científicos.....	139
ANEXO II - Otras formas de difusión.....	169

ABREVIATURAS

Por orden alfabético

AcMo	<u>Antic</u> uerpos <u>Monoclonales</u> .
ADN	<u>Ácido desoxirribo</u> nucleico.
AID	Del inglés <u>Acti</u> vation- <u>Induced</u> <u>De</u> aminase.
ARN	<u>Ácido r</u> ibo <u>nucleico</u> .
BAFF	Factor activador de la célula B (del inglés <u>B</u> <u>Cell</u> <u>Acti</u> vating <u>F</u> actor).
Bcl-2	Linfoma de célula B-2 (del inglés <u>B</u> <u>Cell</u> <u>Lymphoma-2</u>).
BCR	Receptor de la célula B (del inglés <u>B</u> <u>Cell</u> <u>Receptor</u>).
BSA	Albúmina sérica bovina (del inglés <u>Bovine</u> <u>Seric</u> <u>Albumin</u>).
BLNK	Del inglés; <u>B</u> <u>Cell</u> <u>Linker</u> <u>Protein</u> .
BTK	Tirosina quinasa de Bruton (del inglés <u>Bruton's</u> <u>Tyrosin</u> <u>Kinase</u>).
°C	Grado <u>Celsius</u> .
CD	Del inglés <u>Cluster of</u> <u>Differentiation</u> .
CD40L	Ligando de CD40 (del inglés; <u>CD40</u> <u>Ligand</u>).
CFSE	Carboxifluoresceína (del inglés <u>Carboxy</u> <u>fluorescein</u> <u>Succinimidyl</u> <u>Ester</u>).
CG	<u>Centro</u> <u>Germinal</u> .
CSR	Recombinación y cambio de clase (del inglés <u>Class</u> <u>Switch</u> <u>Recombination</u>).

CTLA-4	Del inglés <u>C</u> ytotoxic <u>T</u> - <u>L</u> ymphocyte <u>A</u> ntigen- <u>4</u> .
CXCR5	Receptor tipo 5 de la quimiocina C-X-C (del inglés <u>C</u> - <u>X</u> - <u>C</u> Chemokine <u>R</u> eceptor <u>T</u> ype <u>5</u>).
dl	<u>d</u> eci <u>l</u> itro.
DR4/5	Receptores de muerte 4/5 (del inglés <u>D</u> eath <u>R</u> eceptors <u>4/5</u>).
ECD	Del inglés <u>E</u> nergy- <u>C</u> oupled <u>D</u> ye.
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético (del inglés <u>E</u> thylened <u>a</u> minet <u>e</u> tetraacetic <u>A</u> cid).
FasL	Ligando de Fas (del inglés <u>F</u> as <u>L</u> igand).
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés <u>F</u> luorescein <u>I</u> so <u>t</u> hioc <u>y</u> anate).
FL	<u>F</u> luorescencia.
H. influenzae	<u>H</u> aemophilus <u>i</u> nfluenzae.
HLA	Antígeno leucocitario humano (del inglés <u>H</u> uman <u>L</u> eukocyte <u>A</u> ntigen).
ICOS	Del inglés <u>I</u> nducible <u>T</u> Cell <u>c</u> o- <u>S</u> timulator).
IDP	<u>I</u> mmunode <u>f</u> iciencia <u>p</u> rimaria.
Ig	<u>I</u> mmunoglobulina.
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eucina.
IoP	Ioduro de Propidio
IP	<u>I</u> ndice de <u>p</u> roliferación.
ITAMs	Motivos de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (del inglés <u>I</u> mmunoreceptor <u>T</u> yrosine-based <u>A</u> ctivation <u>M</u> otifs).

IVC	<u>I</u> mmunodeficiencia <u>V</u> ariable <u>C</u> omún.
MBL2	Lectina de unión a la manosa 2 (del inglés <u>M</u> annose- <u>B</u> inding <u>L</u> ectin <u>2</u>).
mdc	<u>m</u> edio <u>d</u> e <u>c</u> ultivo.
MFI	Media/mediana de la intensidad de fluorescencia (del inglés <u>M</u> ean/ <u>M</u> edian <u>F</u> luorescence <u>I</u> ntensity).
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (del inglés <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex <u>t</u> ype <u>II</u>).
mg	<u>m</u> iligramo.
ml	<u>m</u> ililitro.
µg	<u>µ</u> icrogramo.
µl	<u>µ</u> icrolitro.
mM	<u>m</u> ili <u>M</u> olar.
Msh5	Del inglés <u>M</u> ut <u>S</u> <u>P</u> rotein <u>H</u> omolog <u>5</u> .
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (Del inglés <u>N</u> uclear <u>f</u> actor <u>κ</u> -light-chain-enhancer of activated <u>B</u> cells).
ng	<u>n</u> anogramo.
NK	Del inglés; <u>N</u> atural <u>K</u> iller.
ODN	Oligodesoxinucleótidos de citosina y guanina (del inglés <u>C</u> ytosine - <u>P</u> hosphate - <u>G</u> uanosine <u>O</u> ligodeoxynucleotides).
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógeno (del inglés <u>P</u> athogen- <u>A</u> ssociated <u>M</u> olecular <u>P</u> atterns).

PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <u>Phosphate buffer saline</u>).
PCy5	Del inglés <u>Phycoerythrin Cyanin 5</u> .
Pcy7	Del inglés <u>Phycoerythrin Cyanin 7</u> .
PE	Ficoeritrina (del inglés <u>Phycoerythrin</u>).
PI3K	Fosfoinositol-3 quinasa (del inglés <u>Phosphoinositol-3 Kinase</u>).
PLCy2	Fosfolipasa Cy2 (del inglés <u>Phospholipase Cy2</u>).
RIC	<u>Rango intercuartil</u> .
r.p.m.	<u>revoluciones por minuto</u> .
<i>S. pneumoniae</i>	<u>Streptococcus pneumoniae</u> .
STF	Suero de <u>ternera fetal</u> .
spp.	especies (del latín <u>species</u>).
TA	<u>Temperatura ambiente</u> .
TCR	Receptor de la célula T (del inglés <u>T Cell Receptor</u>).
T_H	T cooperador (del inglés <u>T Helper</u>).
T_{HF}	T cooperador folicular (del inglés <u>T Helper Follicular</u>).
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés <u>Toll Like Receptor</u>).
TNFRS13B /TACI	Del inglés <u>Tumour Necrosis Factor Receptor Superfamily member 13B/Transmembrane Activator and CAML Interactor</u> .

TNFRS13C /BAFF-R	Del inglés <u>T</u> umour <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor <u>S</u> uperfamily member <u>13C/B-Cell</u> <u>A</u> ctivator <u>F</u> actor- <u>R</u> eceptor).
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés <u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor).
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (del inglés <u>TNF-Related</u> <u>A</u> ppoptosis- <u>I</u> nducing <u>L</u> igand).
T_{reg}	<u>T</u> <u>r</u> eguladores.
UNG	Del inglés <u>U</u> racil- <u>DNA</u> <u>G</u> lycosylase.
U	<u>U</u> nidades.
VDR	Receptor de la vitamina D (del inglés <u>V</u> itamin <u>D</u> <u>R</u> eceptor).
VIH	<u>V</u> irus de la <u>i</u> mmunodeficiencia <u>h</u> umana.
vs.	Del latín <u>v</u> ersus.
W	<u>W</u> atio.

RESUMEN

La Inmunodeficiencia Variable Común es un síndrome heterogéneo caracterizado por hipogammaglobulinemia e infecciones recurrentes. La causa no se conoce, aunque se ha propuesto un fallo en la diferenciación final del linfocito B hacia célula de memoria o célula plasmática productora de anticuerpos. Los pacientes pueden clasificarse en 3 grupos (MB0, MB1 o MB2), con distinta presentación y evolución clínica, en función del grado de alteración de los linfocitos B de memoria. Estudiamos si distintos procesos esenciales para la diferenciación del linfocito B están alterados en los pacientes. Para ello, evaluamos: (i) la activación (expresión de CD86 y proliferación celular) en linfocitos B activados con estímulos T-independientes: ODN (ligando de TLR-9) o extractos bacterianos, con o sin anti-IgM (activación a través del BCR); (ii) la diferenciación (expresión de CD38) y producción de IgG, IgA e IgM en linfocitos B activados con anti-CD40 e IL-21 (estímulo T-dependiente) u ODN, en presencia o ausencia de anti-IgM; y (iii) la apoptosis en linfocitos B vírgenes y de memoria activados con anti-CD40, ODN o anti-IgM, en presencia o ausencia de IL-21. Los linfocitos B de pacientes presentan defectos de activación frente a estímulos T-independientes. Su diferenciación hacia células plasmáticas CD38⁺ es deficiente, y la producción de anticuerpos está disminuida frente a todos los estímulos. Únicamente los linfocitos B de memoria de pacientes MB0 son menos sensibles al rescate de la apoptosis tras activación. Estos resultados identifican defectos de diferenciación del linfocito B que ayudan a explicar la hipogammaglobulinemia y la variabilidad fenotípica de los pacientes, y señalan la necesidad de su correcta clasificación.

SUMMARY

Common Variable Immunodeficiency is a heterogeneous syndrome characterized by hypogammaglobulinemia and recurrent infections. The cause of the disease is unknown, although a failure on final B lymphocyte differentiation into memory B lymphocyte or antibody-secreting plasma cell has been suggested. According to the degree of alteration of their memory B lymphocytes compartment, patients are classified into 3 groups (MB0, MB1 and MB2), with different clinical presentation and evolution. We studied whether several essential steps on B lymphocyte differentiation are altered in patients. With this purpose, we evaluated: (i) activation (CD86 expression and cellular proliferation) on B lymphocytes activated with T-independent stimuli: ODN (TLR-9 ligand) or bacterial extracts, with or without anti-IgM (activation through BCR); (ii) differentiation (CD38 expression) and IgG, IgA and IgM production on B lymphocytes activated with anti-CD40 plus IL-21 (T-dependent stimulus) or ODN, in the presence or absence of anti-IgM; and (iii) apoptosis on naïve and memory B lymphocytes activated with anti-CD40, ODN or anti-IgM, in the presence or absence of IL-21. B lymphocytes from patients show decreased activation in response to T-independent stimuli. Their differentiation into CD38⁺ plasma cells is deficient, and antibodies production is diminished in response to all stimuli. Only memory B lymphocytes from MB0 patients are less sensitive to activation-induced rescue from apoptosis. These results identify B lymphocyte differentiation defects that contribute to explaining the hypogammaglobulinemia and phenotypic variability of patients, and highlight the need to correctly classify them.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. Inmunodeficiencias primarias humorales

Las inmunodeficiencias primarias (IDPs) son un grupo de enfermedades causadas por alteraciones del sistema inmunitario que se caracterizan por una alta susceptibilidad a padecer infecciones recurrentes o por patógenos poco habituales. La mayoría de las IDPs están determinadas genéticamente, lo que las convierte en buenos modelos de estudio de los mecanismos moleculares que gobiernan el desarrollo y funcionalidad del sistema inmunitario. Han pasado más de 50 años desde la descripción de la primera IDP congénita, la agammaglobulinemia de Bruton (deficiencia en BTK), que afecta al número y funcionalidad de los linfocitos B. Actualmente existen más de 100 IDPs descritas, que afectan tanto a los linfocitos T o B, como a las células NK o fagocíticas y a proteínas séricas del sistema inmunitario [Notarangelo *et al.* 2009 y Al-Herz *et al.* 2011].

La clasificación de las IDPs puede hacerse atendiendo a su forma de herencia (autosómica o ligada al cromosoma X), al defecto molecular subyacente (p. ej. el déficit de BTK), al componente celular afectado (p. ej. deficiencias en linfocitos T o B y combinadas de linfocitos T y B) e incluso al tipo de deficiencia que las caracteriza (p. ej. las deficiencias en la inmunidad celular o humoral) [Al-Herz *et al.* 2011]. Las IDPs predominantemente de anticuerpos (Tabla 1), entre las que se cuenta la Inmunodeficiencia Variable Común (IVC), son las más frecuentes en humanos (representando hasta el 65% de todas las IDPs) y aparecen como consecuencia

de alteraciones cuantitativas y/o cualitativas de la producción de anticuerpos [Durandy *et al.* 2013]. Defectos en la diferenciación del linfocito B son la causa de la deficiencia en la producción de inmunoglobulinas (Igs), la cual será mayor o menor dependiendo del momento en que se bloquea su desarrollo (Figura 1). Cuando el defecto genético afecta a la edición del receptor del linfocito B (BCR) en fases muy tempranas, como ocurre en las agammaglobulinemias autosómicas recesivas (mutaciones en $C\mu$, $\lambda 5$, $Ig\alpha$, $Ig\beta$, *BLNK* y *PI3K*) o en la ligada al cromosoma X (mutación en *BTK*), se produce una ausencia total de linfocitos B en sangre periférica, los niveles de todas las clases de Igs son muy bajos y la predisposición a infecciones bacterianas es severa. Sin embargo, los defectos que afectan al desarrollo terminal del linfocito B maduro, como las mutaciones en los genes que codifican el CD40 y el CD40L (síndrome de hiper-IgM autosómico recesivo o ligado al cromosoma X, respectivamente), afectan al cambio de clase de Ig (Figura 1). Estos casos cursan con niveles reducidos de IgG e IgA (Tabla 1) y una mayor susceptibilidad a padecer infecciones causadas por patógenos oportunistas [Notarangelo *et al.* 2009]. Por último, algunas mutaciones genéticas que afectan a moléculas implicadas en la activación del linfocito B (Figura 1), alteran fases intermedias de su desarrollo. Pueden ser moléculas del propio linfocito B (CD19, CD20, CD81, BAFF-R, CD21 y TACI) o bien del linfocito T (ICOS), que colabora en su activación. En este caso, la clínica es muy variable, los niveles de linfocitos B circulantes normales o reducidos y al menos dos clases de Igs están afectadas; fenotipo equiparable al de la IVC [Notarangelo *et al.* 2009, Eibel *et al.* 2010 y Yong *et al.* 2011].

Tabla 1. Clasificación de las IDPs predominantemente de anticuerpos.

1. Disminución severa de todas las clases de inmunoglobulinas y ausencia de linfocitos B
<ul style="list-style-type: none"> a. Déficit de Btk b. Déficit de cadena pesada μ c. Déficit de $\lambda 5$ d. Deficiencia de $Ig\alpha$ e. Deficiencia de $Ig\beta$ f. Deficiencia de BLNK g. Deficiencia de PI3K(p85α) h. Inmunodeficiencia con timoma
2. Disminución severa de al menos 2 clases de inmunoglobulinas y valores normales o disminuidos de linfocitos B
<ul style="list-style-type: none"> a. Inmunodeficiencia Variable Común b. Deficiencia de ICOS c. Deficiencia de CD19 d. Deficiencia de TACI e. Deficiencia de receptor de BAFF f. Deficiencia de CD20 g. Deficiencia de CD81
3. Disminución severa de IgG e IgA con valores normales o elevados de IgM y valores normales de linfocitos B
<ul style="list-style-type: none"> a. Deficiencia de CD40L b. Deficiencia de CD40 c. Deficiencia de AID d. Deficiencia de UNG
4. Deficiencias de clases o cadenas ligeras de inmunoglobulinas y valores normales de linfocitos B
<ul style="list-style-type: none"> a. Mutaciones y deleciones de cadenas pesadas b. Deficiencias de cadena kappa c. Deficiencias aisladas de subclases de IgG d. Deficiencias de IgA con deficiencia de subclases de IgG e. Deficiencia selectiva de IgA
5. Deficiencia de anticuerpos específicos y valores normales de inmunoglobulinas y linfocitos B
6. Hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia y valores normales de linfocitos B

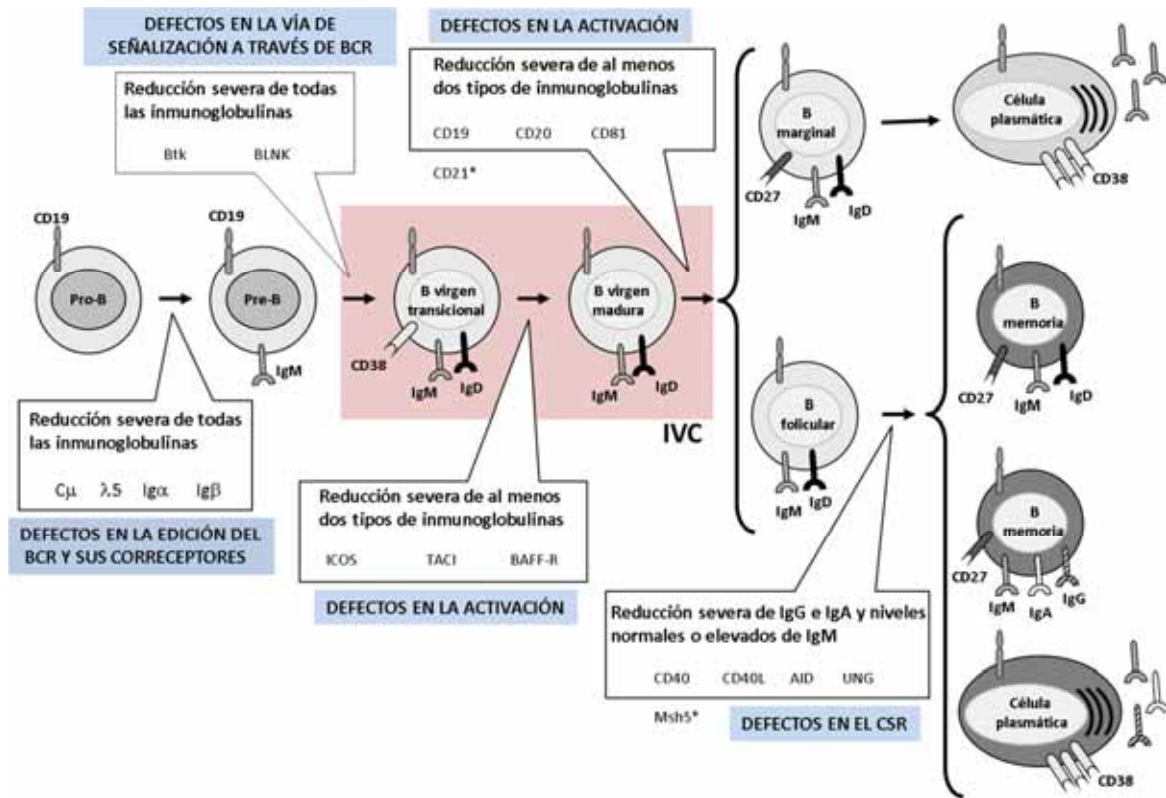


Figura 1. Desarrollo del linfocito B y defectos genéticos en las inmunodeficiencias primarias predominantemente de anticuerpos. Los tipos de Igs afectadas y su grado de alteración, dependen de la fase del desarrollo del linfocito B en la que reside cada mutación genética. En las agammaglobulinemias congénitas, las mutaciones afectan a la edición del BCR, a sus correceptores o a su vía de señalización intracelular, en un estadio muy temprano de la maduración B. Diversas mutaciones y polimorfismos que afectan a los mecanismos de activación del linfocito B, en una fase intermedia de su desarrollo, dan como resultado un fenotipo clínico equiparable al de la IVC (zona sombreada). En la mayoría de casos, la relación mutación/etiopatogenia está bien establecida (deficiencias de ICOS, TACI, BAFF-R, CD19 CD20 y CD81), pero en otros (*) no está bien caracterizada (deficiencias en Msh5 y CD21). Los defectos genéticos que afectan al mecanismo de recombinación y cambio de clase (CSR), en las fases más tardías del desarrollo B, son la base patológica de los síndromes de hiper-IgM (deficiencias en CD40, CD40L, AID y UNG).

II. Inmunodeficiencia Variable Común

La **Inmunodeficiencia Variable Común** (IVC) es la inmunodeficiencia primaria humoral sintomática más prevalente, 1:10000-1:100000 individuos dependiendo del estudio [Chapel *et al.* 2009]. Aunque la deficiencia selectiva de IgA es mucho más prevalente (1:600 individuos), suele ser asintomática [Wang *et al.* 2012]. La IVC agrupa a un conjunto heterogéneo de síndromes de etiología desconocida y caracterizados por hipogammaglobulinemia, infecciones sinopulmonares y gastrointestinales recurrentes y respuesta de anticuerpos a la vacunación baja o ausente [Goldacker *et al.* 2007]. Afecta por igual a ambos sexos y el inicio de los síntomas presenta una distribución bimodal por edades con máximos en la infancia tardía (6-12 años) y en la edad adulta temprana (20-30 años). Los pacientes se benefician de terapia sustitutiva con gammaglobulina [Cunningham-Rundles *et al.* 1999, Wood *et al.* 2007 y Salzer *et al.* 2012].

2.1. Clínica

Debido a la heterogeneidad de la enfermedad, la clínica es muy variable. Además de las infecciones, también se asocian a la IVC procesos autoinmunes e inflamatorios y neoplasias [Park *et al.* 2008 y Yong *et al.* 2011].

La IVC se caracteriza principalmente por **infecciones** recurrentes del tracto respiratorio (neumonías, bronquitis, sinusitis y otitis media principalmente) causadas por patógenos encapsulados, mayoritariamente *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (a partir de ahora *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, respectivamente). Las

complicaciones clínicas derivadas de las neumonías de repetición, como la fibrosis pulmonar y las bronquiectasias, constituyen la principal causa de morbilidad de los pacientes al comprometer su función respiratoria. Las infecciones que afectan al intestino y causan diarrea persistente se deben principalmente a bacterias (*Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp.), y con menos frecuencia a virus o parásitos (*Giardia enteritis*) [Quinti *et al.* 2007]. Estudios recientes refieren una mayor incidencia de infecciones gastrointestinales en aquellos pacientes con IVC con reducción severa de IgA sérica [Yong *et al.* 2011]. Raramente las infecciones se localizan en el tracto urinario (*Ureaplasma* spp.), articulaciones (*Mycoplasma* spp.) o sistema nervioso (virus Varicela-Zóster).

Los **procesos autoinmunes** están presentes en el 25%-50% de los pacientes con IVC. Los más frecuentes son las citopenias (trombocitopenia, anemia hemolítica y, con menos frecuencia, neutropenia) autoinmunes [Park *et al.* 2008]. Un 10% de los pacientes tienen anticuerpos anti-IgA [Horn *et al.* 2007]. Otras complicaciones clínicas menos prevalentes son la anemia perniciosa y las hepatitis o tiroiditis autoinmunes. Menos comúnmente, los pacientes con IVC presentan vitíligo, vasculitis, psoriasis, artritis reumatoide o síndrome de Sjögren. Además, los pacientes con IVC y enteropatía pueden presentar clínica similar a la enfermedad celíaca, cuya relación con la deficiencia selectiva de IgA está bien caracterizada [Park *et al.* 2008]. Sin embargo, dado que la frecuencia de los alelos de HLA-DQ asociados a celiaquía no está aumentada en los pacientes con IVC que presentan enteropatía, ésta debe atribuirse al fallo en la regulación inmune que padecen [Venhoff *et al.* 2013].

Los **procesos inflamatorios** que provocan malabsorción y afección gastrointestinal (microvellosidades intestinales atrofiadas, colitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn y gastritis atrófica) son, después de las infecciones, la segunda causa de diarrea persistente en los pacientes con IVC. Además, la enfermedad granulomatosa afecta al 8-22% de los pacientes con IVC y representa uno de los factores de morbimortalidad más importantes [Park *et al.* 2008]. Su etiología es desconocida y la localización de los granulomas es multisistémica, aunque en la IVC es más común en pulmón, órganos linfoides o bazo. En más del 50% de los casos de IVC con enfermedad granulomatosa, ésta coexiste con complicaciones autoinmunes, sobre todo anemia hemolítica. Las hiperplasias linfoides se asocian en muchos casos a la infiltración granulomatosa. En ausencia de granulomas, las hiperplasias linfoides son de origen reactivo (asociadas a procesos infecciosos o inflamatorios) o desconocido (idiopáticas). Las linfadenopatías a nivel cervical y abdominal son las más comunes. Un 30% de los pacientes presentan esplenomegalia [Park *et al.* 2008 y Yong *et al.* 2011].

El riesgo de desarrollar **neoplasia** es significativamente superior en los pacientes con IVC. Los linfomas no-Hodgkin de origen B, entre los tumores hematológicos, y el carcinoma gástrico, entre los tumores sólidos, son las entidades más comunes en pacientes con IVC. La mayor propensión a padecer neoplasia podría tener su origen en la interacción de diversos factores, como la estimulación antigénica crónica debida a las infecciones, el fallo en la regulación inmune y el contexto genético [Park *et al.* 2008].

2.2. Defectos genéticos

A diferencia de otras IDPs humorales, la mayoría de los casos de IVC son esporádicos y solo el 10-25% se presentan de forma familiar. Se han descrito varias mutaciones genéticas (*ICOS*, *TNFRS13B/TACI*, *CD19*, *CD20*, *CD81*, *TNFRSF13C/BAFF-R*, *CD21* y *MSH5*) asociadas a la IVC, pero están presentes en menos del 10% de los pacientes [Bacchelli *et al.* 2007, Yong *et al.* 2009, Kuijpers *et al.* 2010, van Zelm *et al.* 2010 y Romberg *et al.* 2013]. En algunos casos, los defectos genéticos observados (mutaciones en *ICOS*, *TNFRS13B/TACI* y moléculas del complejo CD19 concretamente) sugieren que el bloqueo del desarrollo B en la IVC puede ser secundario a alteraciones durante la colaboración T-B o la consolidación del centro germinal (CG). El defecto molecular subyacente es desconocido en el resto de pacientes. También se han descrito diversos polimorfismos (*TNF*, *IL10*, *MBL2*, *VDR*, *IL6*), que por sí solos no causan la enfermedad, pero que contribuyen a su variabilidad clínica [Mullighan *et al.* 1999]. Algunos polimorfismos confieren un mayor riesgo de padecer complicaciones clínicas concretas, como la enfermedad granulomatosa (*TNF* 488A e *IL10* 1082A/819T/592A) o las bronquiectasias (polimorfismos de *MBL2* asociados con niveles séricos reducidos de lectinas de unión a la manosa) [Mullighan *et al.* 1999 y Litzman *et al.* 2008].

Actualmente, expertos internacionales en IDPs han desaconsejado que los pacientes que presentan mutaciones monogénicas bien definidas (*ICOS*, *CD19*, *CD20*, *CD81* y *CD21*) sean considerados casos de IVC [Ameratunga *et al.* 2013 y Seppänen *et al.* 2014].

2.3. Alteraciones linfocitarias

Se han descrito alteraciones cuantitativas y cualitativas en linfocitos T y B, células NK y células dendríticas en los pacientes con IVC [North *et al.* 1991, Ferrer *et al.* 1995, Iglesias *et al.* 1999, Rezaei *et al.* 2010, Carvalho *et al.* 2010 y Martínez-Pomar *et al.* 2010]. Sin embargo, entre los hallazgos más consistentes está la deficiente activación, maduración y diferenciación terminal de los linfocitos B hacia linfocitos B de memoria y/o células plasmáticas productoras de Igs [Cunningham-Rundles *et al.* 2006, Yu *et al.* 2009 y Foerster *et al.* 2010]. La deficiente producción de anticuerpos conferiría a los pacientes una mayor susceptibilidad a padecer infecciones y explicaría, en parte, la baja respuesta a la vacunación. Sin embargo, los estudios que intentan asociar alteraciones concretas del sistema inmunitario en IVC con manifestaciones clínicas determinadas, son escasos y poco concluyentes. En esa línea, se ha relacionado la expansión de subpoblaciones de linfocitos B que expresan niveles bajos del receptor CD21 (CD21^{low}) con la presencia de patología autoinmunitaria [Warnatz *et al.* 2002]. El complejo CD21/CD19 actúa como correceptor del BCR durante la respuesta antigénica y la alteración en la expresión de alguno de sus componentes puede afectar a la adquisición de la tolerancia y dar lugar a clones autorreactivos [Fearon *et al.* 2000]. Otros estudios atribuyen la poca efectividad de la vacunación a alteraciones en células dendríticas y linfocitos T que afectan a la presentación del antígeno. Sin embargo, ello no se traduce en una estrategia específica de vacunación en función del fenotipo del paciente. Finalmente, también se han asociado niveles reducidos de linfocitos T reguladores (T_{reg}), y su función disminuida, con las manifestaciones autoinmunitarias de los pacientes [Melo *et al.* 2009,

Arumugakani *et al.* 2010, Arandi *et al.* 2013a y Arandi *et al.* 2013b].

2.4. Clasificación de los pacientes

Dada la heterogeneidad de la IVC, se han propuesto diversas clasificaciones de los pacientes en función de la proporción de poblaciones de linfocitos T vírgenes [Giovannetti *et al.* 2007] o B de memoria [Warnatz *et al.* 2002, Piqueras *et al.* 2003 y Wehr *et al.* 2008] presentes en sangre periférica. La finalidad de estas clasificaciones es definir subgrupos de pacientes que pudieran compartir el mismo mecanismo patogénico y/o asociarlos con una presentación y evolución clínica concretas.

Los niveles de linfocitos B en la IVC pueden ser normales, pero la mayoría de pacientes muestran niveles reducidos de células plasmáticas y de linfocitos B de memoria, tanto de las que no han hecho el cambio de clase de Ig (CD19⁺CD27⁺IgD⁺), como de las que sí lo han hecho (CD19⁺CD27⁺IgD⁻). Menos de un 10% de los pacientes presentan niveles casi indetectables de linfocitos B. El compartimento de linfocitos B de memoria CD19⁺CD27⁺IgD⁻ está habitualmente más alterado [Wehr *et al.* 2008]. Su disminución se ha relacionado con una peor respuesta a la vacunación [Goldacker *et al.* 2007] y una presentación clínica más grave (mayor riesgo de esplenomegalia y enfermedad granulomatosa concretamente). Dicha relación se mantiene independientemente de la estrategia aplicada para clasificar a los pacientes en función del fenotipo de sus linfocitos B: clasificación de París [Piqueras *et al.* 2003], Freiburg [Warnatz *et al.* 2002] o la más recientemente consensuada EUROclass [Wehr *et al.* 2008] (Tabla 2).

A pesar de las evidencias que lo justifican, el estudio funcional *in vitro* de las subpoblaciones de linfocitos B de pacientes con IVC ha sido escasamente abordado y hasta la fecha ha tenido poca repercusión en la práctica clínica.

Tabla 2. Criterios de clasificación y prevalencia de manifestaciones clínicas en pacientes con IVC.

Clasificación	Criterios fenotípicos	Grupo	Clínica (prevalencia %)				
			EM	EG	LA	AI	
Piqueras	Linfocitos B $<11\%$ de $CD27^+$ $>11\%$ de $CD27^+$	$<8\%$ $CD27^+IgD^-$	MBO	47	17	28	17
		$>8\%$ $CD27^+IgD^-$	MB1	34	8	18	12
			MB2	23	0	17	14
Warnatz	PBL $<0.4\%$ de $CD27^+ IgD^-$ $>0.4\%$ de $CD27^+ IgD^-$	$<20\%$ $CD21^{low}$	Ib	58	20	32	26
		$>20\%$ $CD21^{low}$	Ia	41	14	22	15
			II	19	4	17	11
EUROClass	Linfocitos B $\leq 1\%$ de B totales $>1\%$ de B totales	B-	-	-	-	-	
		$\leq 2\%$ $CD27^+IgD^-$	SmB-	52	17	24	21
		$>2\%$ $CD27^+IgD^-$	SmB+	24	4	22	19

EM: esplenomegalia, EG: enfermedad granulomatosa, LA: linfadenopatía, AI: autoinmunidad. PBL: linfocitos de sangre periférica.

III. Activación y diferenciación del linfocito B

La eficacia de la respuesta inmune humoral depende de la capacidad de los linfocitos B para producir anticuerpos de alta afinidad y desarrollar memoria inmunológica a largo plazo frente a antígenos exógenos. La diferenciación del linfocito B es un proceso complejo que se inicia en la médula ósea. Allí, mediante la recombinación de segmentos génicos que codifican la región variable del BCR (molécula de Ig anclada a la membrana), se generan una gran diversidad de clones con distinta especificidad de unión al antígeno. Al salir de la médula ósea al torrente sanguíneo, los linfocitos B expresan ya IgM e IgD en la superficie y se denominan linfocitos B vírgenes transicionales ($CD27^-IgD^+CD38^+$). Éstos migran hacia los órganos linfoides secundarios donde aumenta su nivel de expresión de IgD y dejan de expresar CD38, denominándose entonces linfocitos B vírgenes maduros ($CD27^-IgD^+CD38^-$). La exposición al antígeno en los órganos linfoides secundarios selecciona positivamente los clones de linfocitos B más afines, lo cual induce su maduración hacia linfocitos B marginales ($CD27^+IgD^+CD38^-$), y su proliferación y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos de vida media corta, caracterizadas por la expresión de niveles elevados de CD38 ($CD38^{high}$) [Arce *et al.* 2004]. Los anticuerpos producidos tras el primer contacto con el antígeno son de baja afinidad, generalmente IgM, y se generan mediante un mecanismo independiente de CG. Tras una nueva exposición al antígeno, se produce una respuesta secundaria, más rápida y duradera, que implica la producción de distintas clases de Igs (IgG e IgA), responsables del mantenimiento del título de anticuerpos protectores durante largos periodos de tiempo. Para ello, es necesaria la

generación de linfocitos B de memoria (tanto CD27⁺IgD⁺ como CD27⁺IgD⁻) y células plasmáticas CD38^{high} de larga duración, lo cual tiene lugar tras la reacción del CG [Kurosaki *et al.* 2010, McHeyzer-Williams *et al.* 2012 y Victora *et al.* 2012]. Finalmente, la expresión de CD38 se pierde en los linfocitos B de memoria recirculantes que abandonan el CG [Arce *et al.* 2004 y Perez-Andres *et al.* 2010].

3.1. Centro germinal

Los eventos moleculares esenciales para una respuesta humoral eficaz son: (i) la hipermutación somática, (ii) el cambio de clase de inmunoglobulina y (iii) la maduración de la afinidad. Se producen en el CG durante la diferenciación de los linfocitos B vírgenes seleccionados hacia linfocitos B de memoria y/o células plasmáticas de vida larga [Vinuesa *et al.* 2012]. Los CGs son microestructuras anatómicas que aparecen en los folículos linfoides durante la respuesta inmunitaria y en las que se produce la colaboración con el linfocito T [Slomchick *et al.* 2012 y Victora *et al.* 2010]. La alteración de la colaboración T-B afecta a la organización del CG y puede ser la causa de diversas IDPs humorales, autoinmunidad y linfomas [Gatto *et al.* 2010].

Para la organización del CG deben sucederse en los folículos linfoides: (i) la activación del linfocito B tras el contacto con el antígeno específico a través de su BCR, (ii) un primer contacto del linfocito B con el linfocito T colaborador folicular (T_{HF}) afín (que reconoce el mismo antígeno) y (iii) la maduración de la afinidad del BCR. La maduración de la afinidad del BCR da lugar a la expansión clonal de los linfocitos B que mejor se unen al antígeno (selección positiva) y la muerte celular por apoptosis de los clones de

linfocitos B menos afines o autorreactivos (selección negativa). La expansión clonal y la apoptosis del linfocito B derivan de un segundo contacto positivo o negativo respectivamente, con el linfocito T_{HF} afín y las células presentadoras de antígeno (dendríticas foliculares) (Figura 2).

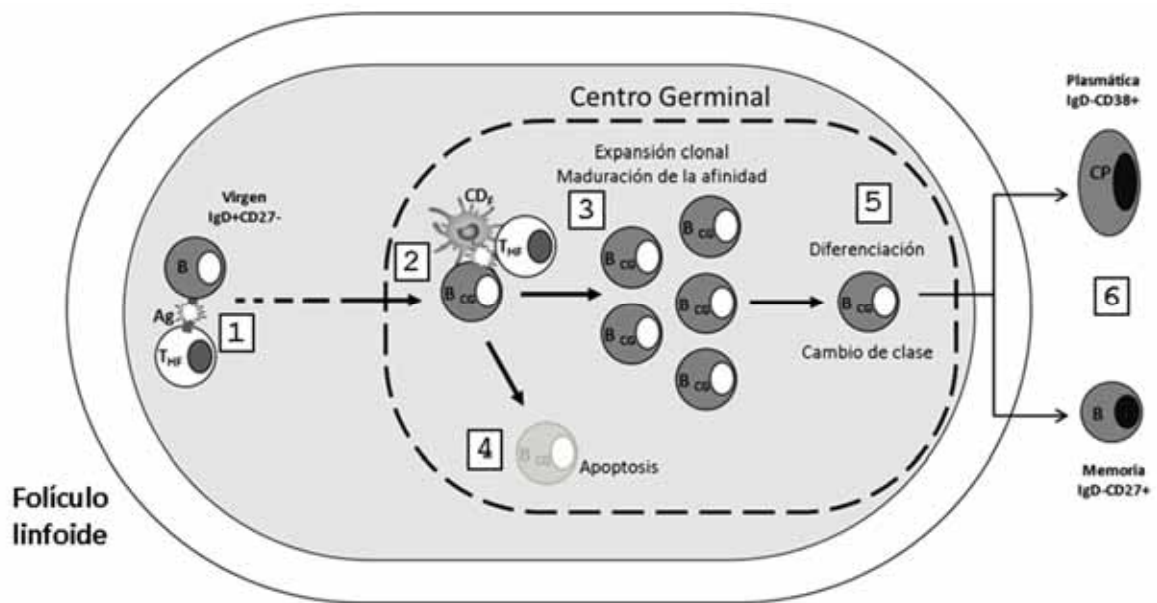


Figura 2. Eventos moleculares en el centro germinal. (1) El linfocito B virgen se activa por el contacto con la célula T colaboradora folicular (T_{HF}) que reconoce el mismo antígeno (Ag). (2) La interacción entre la célula dendrítica folicular (CD_F), el T_{HF} y el linfocito B de centro germinal (B_{CG}) dirige la maduración de afinidad y expansión clonal (3) o apoptosis (4) de los clones de linfocitos B seleccionados positiva o negativamente. Los linfocitos B_{CG} seleccionados positivamente experimentan el cambio de clase de Ig y la diferenciación (5) hacia linfocitos B de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos (6).

Estudios recientes demuestran que los defectos de maduración de los linfocitos B asociados a la IVC alteran la organización estructural y funcional de los CGs [Warnatz *et al.* 2006, Martini *et al.* 2011 y Ou *et al.* 2012].

3.1.1 Activación a través del BCR

El BCR es un complejo proteico compuesto por la Ig anclada a la membrana plasmática, que reconoce el antígeno, asociada a diversas proteínas, como el heterodímero $Ig\alpha/Ig\beta$, que contienen motivos de activación del inmunorreceptor basados en tirosina (ITAMs). Cada clon de linfocito B expresa un BCR único, específico para un determinado antígeno. La unión del antígeno al BCR activa una vía de señalización intracelular que se inicia con la fosforilación de los ITAMs, continúa con una cascada de fosforilación de intermediarios citoplasmáticos (entre ellos la Btk) y la activación de la fosfolipasa $Cy2$ (PLC γ 2) y culmina con la movilización del calcio intracelular. La activación del flujo de calcio es indispensable para una correcta estimulación del linfocito B, su diferenciación hacia célula plasmática y la secreción de anticuerpos. Además, la unión del antígeno al BCR induce la internalización del complejo BCR/antígeno y su movilización hacia los compartimentos intracelulares que contienen las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), las cuales presentan péptidos procesados del antígeno específico al linfocito T colaborador (T_H) afín para fortalecer la respuesta inmunitaria.

En los últimos años se han descrito alteraciones en los mecanismos de activación del linfocito B a través de su BCR en pacientes con IVC [van de Ven *et al.* 2011 y 2012]. Foerster *et al.* demostraron menor movilización del calcio intracelular durante la activación temprana del BCR, en el subgrupo de pacientes con IVC cuyo compartimento B de memoria de sangre periférica está más comprometido (Foerster *et al.* 2010).

Asimismo, la activación a través del BCR induce la expresión de moléculas coestimuladoras como CD70 [Jacquot *et al.* 2000] y CD86 [Boussiotis *et al.* 1993], indispensables para la colaboración con el linfocito T. Dicho proceso puede estar afectado en pacientes con IVC (Groth *et al.* 2002 y Denz *et al.* 2000).

3.1.2 Colaboración con el linfocito T

Los linfocitos T_H que muestran afinidad por el mismo antígeno juegan un papel imprescindible en los procesos de selección positiva y maduración de los linfocitos B. En el CG, las interacciones T-B de baja afinidad dan como resultado una activación defectuosa del linfocito B y su muerte por apoptosis. Una vez que ha reconocido al antígeno (presentado a través del MHC-II), el linfocito T_H CD4⁺ colabora con el linfocito B mediante moléculas coestimuladoras expresadas en su membrana (CD40L, ICOS) y/o la secreción de factores solubles o interleucinas (ILs) [Coffman *et al.* 1993]. La IL-4, IL-10, IL-13 o la IL-21 por ejemplo, actúan como factores reguladores del cambio de clase de Ig (producción de IgG, IgA e IgE) en linfocitos B activados [Poulsen *et al.* 2007, Konforte *et al.* 2009 y Coffman *et al.* 2009].

La colaboración T-B es esencial en las respuestas inmunitarias adaptativas específicas de antígeno que dependen de CG. Al igual que la activación a través del BCR, la estimulación del linfocito B a través de CD40, que simula la interacción T-B en el CG (estímulo T-dependiente), también induce la expresión en su membrana de la molécula coestimuladora CD86 [Jeannin *et al.* 1997], capaz de unirse a CD28 presente en la membrana del linfocito T_H. La adhesión CD86/CD28 refuerza la colaboración T-B e induce la expresión

de CD40L y la secreción de ILs en el linfocito T_H , lo cual intensifica la colaboración e induce finalmente la recombinación y cambio de clase de Ig en el linfocito B [Jeannin *et al.* 1997]. Los linfocitos B de un subgrupo de pacientes con IVC no adquieren niveles normales de CD86 tras ser activados a través del BCR y la señalización a través de CD40 no corrige el defecto [Denz *et al.* 2000].

Entre las ILs que contribuyen especialmente a la colaboración T-B, cabe destacar la IL-21 producida por los linfocitos T_{HF} , identificables por la expresión del receptor CXCR5 [Rasheed *et al.* 2006, Bryant *et al.* 2007 y Shulman *et al.* 2013]. La IL-21 es una de las ILs más potentes para inducir *in vitro* la proliferación del linfocito B humano y su diferenciación hacia célula plasmática, cuando se acompaña de estímulos como anti-CD40 o anti-CD40 combinado con anti-IgM [Ettinger *et al.* 2005]. Así, la IL-21 es capaz de inducir la diferenciación y producción de Igs en linfocitos B vírgenes y el cambio de clase de Ig en linfocitos B de memoria que todavía no han experimentado dicho proceso [Bryant *et al.* 2007 y Ettinger *et al.* 2007]. Por el contrario, la IL-2 o la IL-10 únicamente inducen la diferenciación de linfocitos B de memoria que han experimentado previamente el cambio de clase de Ig [Tangye *et al.* 2003]. En cambio, la estimulación con anti-IgM e IL-21, sin la intervención de la señalización a través de CD40, induce la muerte del linfocito B [Ettinger *et al.* 2005]. Por tanto, el efecto estimulador o inhibidor de la IL-21 depende del estado de maduración y activación del linfocito B, de la influencia de otras ILs y de la presencia de señales coestimuladoras acompañantes.

Se han descrito múltiples alteraciones del linfocito T en pacientes con IVC: aumento de apoptosis [Iglesias *et al.* 1999

y Di Renzo *et al.* 2000], defectos en la respuesta proliferativa frente a antígenos y mitógenos [North *et al.* 1991], en la señalización a través del TCR [Fischer *et al.* 1994 y Pons *et al.* 2006] y en la producción de ILs [Fischer *et al.* 1993, Ferrer *et al.* 1995, Zhou *et al.* 1998 y Pons *et al.* 2006]; expresión disminuida de moléculas coestimuladoras CD40L y CTLA-4 [Farrington *et al.* 1994, Brugnoni *et al.* 1996 y Pons *et al.* 2006] o marcadores de activación como L-selectina y atractina [Zhang *et al.* 1996 y Pozzi *et al.* 2001 respectivamente]; reducción de los niveles de linfocitos T_{reg} y de su funcionalidad [Melo *et al.* 2009, Arumugakani *et al.* 2010, Arandi *et al.* 2013a y Arandi *et al.* 2013b] o baja frecuencia de linfocitos T_H17 [Barbosa *et al.* 2011]. Todas estas alteraciones podrían resultar en una colaboración T-B deficiente, contribuyendo en mayor o menor medida a la respuesta humoral disminuida de los pacientes con IVC.

3.1.3. Apoptosis del linfocito B

La muerte celular programada, o apoptosis, es uno de los mecanismos que controlan la homeostasis celular. Está regulada a través de dos vías, la extrínseca y la intrínseca, que implican, en menor o mayor medida respectivamente, a la mitocondria. En la vía extrínseca median mayoritariamente los receptores de muerte celular de la familia del TNF que tras interaccionar en la membrana celular con sus ligandos específicos, activan la vía proteolítica de las caspasas. A esta familia de receptores pertenecen, además del clásico receptor Fas, también conocido como CD95 o TNFSR6, los receptores del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL, por sus siglas en inglés), también llamados DR4 y DR5 o TNFSR10A y TNFSR10B, respectivamente. En la vía intrínseca sin embargo, juegan un papel determinante

las proteínas pro- y antiapoptóticas de la familia del Bcl-2 que regulan la polarización, estabilidad y función de la membrana mitocondrial.

La apoptosis constituye un mecanismo de control para limitar la aparición de clones de linfocitos B con baja afinidad por el antígeno o autorreactivos, derivados de mutaciones somáticas que ocurren en el CG. En este proceso participan los receptores de la familia del TNF [Koncz *et al.* 2012] y es esencial para la regulación de la respuesta inmunitaria y el mantenimiento de la tolerancia. La pérdida de función de los receptores Fas o DR4-5 y/o de sus ligandos (FasL y TRAIL respectivamente) pueden ocasionar alteraciones "por exceso" de respuesta del linfocito B como: autoinmunidad, linfadenopatía, esplenomegalia, linfomas B y otras neoplasias hematológicas, en ratones [Hao *et al.* 2008 y Zerafa *et al.* 2005] y síndrome linfoproliferativo autoinmune, en humanos [Lenardo *et al.* 2010]. Sin embargo, es escasa la evidencia del papel que juegan posibles alteraciones de dichas vías apoptóticas en la depleción selectiva de linfocitos B y la inhibición de los CGs. La sobreexpresión o ganancia de función de receptores proapoptóticos en el linfocito B, podrían ser la causa de respuestas inmunitarias insuficientes, y explicar en parte la etiopatogenia de ciertas IDPs.

3.2. Activación a través de TLR

Los receptores tipo Toll (TLRs) están codificados en línea germinal y tras interaccionar con sus ligandos específicos, los PAMPs (patrones moleculares asociados a patógeno), desencadenan la respuesta inmunitaria innata que, a diferencia de la adaptativa, no depende de la presentación de

antígeno ni de la colaboración con el linfocito T_H. Se han identificado 10 TLRs diferentes en humanos y descrito su expresión en diversos tipos celulares del sistema inmunitario. Algunos, como el TLR-2 o el TLR-4, se expresan en la membrana celular externa y reconocen ligandos derivados de la envoltura celular bacteriana (peptidoglicano y lipopolisacárido respectivamente). Otros, como el TLR-7 y el TLR-9, se localizan en membranas del compartimento endosómico y reconocen secuencias conservadas en el material genético del patógeno: ARN o ADN, respectivamente [West *et al.* 2006 y Kawai *et al.* 2010].

La respuesta de los linfocitos B a la activación a través de TLRs depende de su estadio de maduración (Dorner *et al.* 2009, Booth *et al.* 2011 y Meyer-Bahlburg *et al.* 2013). Los linfocitos B vírgenes expresan niveles bajos o indetectables de TLR-7 y TLR-9, pero la activación a través de BCR induce su expresión rápidamente [Bernasconi *et al.* 2003]. A diferencia de los linfocitos B vírgenes, los linfocitos B de memoria expresan constitutivamente TLR-2, TLR-6, TLR-7, TLR-9 y TLR-10 y son capaces de proliferar y diferenciarse a células secretoras de Igs cuando se estimulan con los ligandos correspondientes [Bernasconi *et al.* 2003 y Bourke *et al.* 2003]. Tras la activación antigénica, los ligandos de TLRs constituyen un estímulo extrafolicular (estímulo T-independiente) para la diferenciación del linfocito B, que puede llegar incluso a suplir la necesidad de las señales del linfocito T_H [Ruprecht *et al.* 2006].

Aunque los TLRs no son necesarios para la respuesta inmunitaria T-dependiente, pueden colaborar indirectamente en ella. Los TLRs contribuyen a la activación del linfocito T al

favorecer la presentación de antígeno, secreción de ILs y expresión de moléculas coestimuladoras en células presentadoras. Por ejemplo, la estimulación del linfocito B a través de diversos TLRs induce la expresión de CD86, constituyendo un enlace entre la inmunidad innata y adaptativa. Estudios recientes sugieren que la activación a través de TLR-7 y TLR-9 está alterada en linfocitos B de pacientes con IVC. [Cunningham-Rundles *et al.* 2006 y Yu *et al.* 2009].

3.3. Papel de las interacciones linfocitarias en periferia

La diversidad funcional del sistema inmunitario se sustenta en la existencia de varias subpoblaciones de linfocitos T_H con distinta función efectora (T_H1 , T_H2 o T_H17 principalmente) y de linfocitos T_{reg} con función supresora. La naturaleza de la colaboración T-B dependerá del equilibrio de todas las subpoblaciones T, influyendo en el resultado final de la homeostasis del linfocito B en periferia.

Entre los linfocitos T_{HF} recirculantes, las subpoblaciones T_H2 y T_H17 contribuyen de forma diferente al desarrollo y maduración del linfocito B. Por ejemplo, la carencia de linfocitos T_H17 se ha asociado a una disminución de linfocitos B de memoria que han hecho el cambio de clase de Ig, en IDPs como la agammaglobulinemia congénita o la propia IVC [Barbosa *et al.* 2011]. También se ha descrito que la baja cantidad de linfocitos T_{reg} en sangre periférica de pacientes con IVC se asocia a la expansión de la subpoblación B $CD21^{low}$ y la presencia de síntomas autoinmunitarios y esplenomegalia [Arumugakani *et al.* 2010].

El equilibrio de las poblaciones linfocitarias en sangre periférica también puede alterarse en procesos infecciosos crónicos. Por ejemplo, pacientes con VIH tratados con éxito que consiguen controlar la viremia presentan, a pesar de ello, reducción del número de linfocitos B de memoria y del nivel de Igs. La cantidad de linfocitos B de memoria en sangre periférica en este subgrupo de pacientes con VIH, correlacionó inversamente con los niveles de expresión de la molécula proapoptótica TRAIL en la membrana de los linfocitos B [van Grevenynghe et al. 2011].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Defectos en la función del linfocito B de los pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común (activación, proliferación, diferenciación, capacidad de producción de inmunoglobulinas y/o regulación de la apoptosis), podrían ser la causa de la hipogammaglobulinemia y de las alteraciones en la maduración del linfocito B características de los pacientes. La identificación de defectos concretos en los linfocitos B podría revelar las causas subyacentes a la variabilidad fenotípica de los pacientes y permitir su correcta clasificación.

OBJETIVOS

Para demostrar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.** Evaluar la inducción de la expresión en membrana de la molécula coestimuladora CD86 y la proliferación en linfocitos B activados con los estímulos T-independientes: (i) ODN (ligando sintético de TLR-9) o (ii) extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* (ligandos de TLR-2, TLR-4 y TLR-9), en cultivos de células mononucleadas de sangre periférica de controles sanos y pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común. Analizar en cada caso la contribución de la activación con anti-IgM (estímulo que simula la señalización a través del BCR).
- 2.** Evaluar la capacidad de diferenciación hacia células plasmáticas CD38⁺ y la producción de inmunoglobulinas en linfocitos B activados con: (i) ODN o (ii) anti-CD40 e IL-21 (estímulo que simula la colaboración con el linfocito

T), en cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados de sangre periférica de controles sanos y pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común. Analizar en cada caso la contribución de la activación con anti-IgM.

3. Evaluar el grado de apoptosis en linfocitos B vírgenes y de memoria activados con: (i) anti-CD40, (ii) ODN o (iii) anti-IgM, en cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados de sangre periférica de controles sanos y pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común. Analizar en cada caso la influencia de la coestimulación con IL-21.
4. Evaluar la expresión del receptor proapoptótico de membrana TRAIL en linfocitos B vírgenes y de memoria de sangre periférica de controles sanos y pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común.
5. Valorar si los defectos funcionales presentes en los linfocitos B son los mismos en los distintos grupos de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

I. SUJETOS Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

27 pacientes con IVC fueron seleccionados de acuerdo con los criterios diagnósticos propuestos por el grupo de expertos en Inmunodeficiencias Primarias de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS): (i) historia clínica de infecciones recurrentes, (ii) niveles séricos reducidos de IgG, IgA y/o IgM, y (iii) respuesta a la vacunación baja o ausente. Ninguno de los pacientes había padecido infecciones durante los 3 meses previos a la realización del estudio. El estudio se llevó a cabo siguiendo las guías de práctica ética de la Declaración de Helsinki de 1975 y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de las Islas Baleares. Las muestras se obtuvieron previamente a la administración de la dosis de gammaglobulina intravenosa tras la firma del correspondiente consentimiento informado. Los ensayos se llevaron a cabo en paralelo con muestras de controles sanos apareados por edad y sexo.

II. OBTENCIÓN DE CÉLULAS

Las **células mononucleadas** se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica heparinizada extraída mediante venopunción. Las muestras se centrifugaron en gradiente de densidad. Brevemente, 30 ml de sangre se diluyeron con suero salino (1:1) y se dispensaron sobre 2-3 ml de una solución de Ficoll (Rafer) en tubos de 10 ml. Los tubos se centrifugaron 20 minutos a 1100 r.p.m. y temperatura ambiente (TA), a

continuación se descartaron 2-4 ml del sobrenadante y se centrifugaron de nuevo a 1500 r.p.m. otros 20 minutos a TA. Las **células mononucleadas** sobre la solución de Ficoll se recolectaron y se lavaron 2 veces durante 5 minutos en suero salino a 1700 r.p.m. y 1100 r.p.m. sucesivamente. Una alícuota de 10 L de la suspensión celular final se añadió a 90 L de solución de Türk (Panreac) para el recuento de las células mononucleadas en una cámara hemocitométrica de Neubauer.

Los **linfocitos B CD19⁺ purificados** se aislaron mediante selección negativa (Kit de purificación de linfocitos B humanos Untouched™ de Invitrogen) a partir de 30-50x10⁶ de células mononucleadas resuspendidas en tampón fosfato salino (PBS) estéril suplementado con albúmina bovina sérica (BSA) al 0.1% y 2mM de ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA) (PBS-BSA-EDTA). Brevemente, las células se incubaron 20 minutos a 4°C con una mezcla de anticuerpos biotinilados (20 µl/10x10⁶ de células) frente a todos los tipos celulares no-B: anti-CD2, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD36, anti-CD43 y anti-CD235a) y se lavaron con 5-10 ml de PBS-BSA-EDTA a 1700 r.p.m. 5 minutos. A continuación, las células mononucleadas se resuspendieron en PBS-BSA-EDTA (100 µl/10x10⁶ de células), se añadieron microesferas magnéticas conjugadas con estreptavidina (100 µl/10x10⁶ de células), y se incubó la mezcla durante 15 minutos en agitación a TA. Finalmente, la muestra se sometió a un campo magnético y se recuperaron los linfocitos B no adheridos al imán.

La obtención de **linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados** se realizó utilizando los citómetros separadores Epics

Altra Hypersort™ de Coulter o Influx de Becton Dickinson. Brevemente, $2-4 \times 10^6$ de linfocitos B $CD19^+$ purificados se resuspendieron en $100 \mu\text{l}$ de PBS estéril y se incubaron con $5 \mu\text{l}$ de los anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con fluorocromos anti- $CD19-PCy7$ y anti- $CD27-PCy5$ (ambos de Coulter Immunotech) durante 10 minutos. A continuación, los linfocitos B $CD19^+$ purificados y marcados se centrifugaron a 1700 r.p.m. en 2-4 ml de PBS estéril 5 minutos y se resuspendieron en 1-2 ml de PBS estéril suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF) descomplementado (Gibco), 100 U/ml de penicilina y $100 \mu\text{g/ml}$ de estreptomina (Gibco). En el citómetro separador, se identificaron en primer lugar los linfocitos B $CD19^+$ y a continuación, en función de la expresión del marcador $CD27$, se seleccionaron y separaron los linfocitos B $CD19^+CD27^-$ (vírgenes) y $CD19^+CD27^+$ (de memoria) (Figura 3).

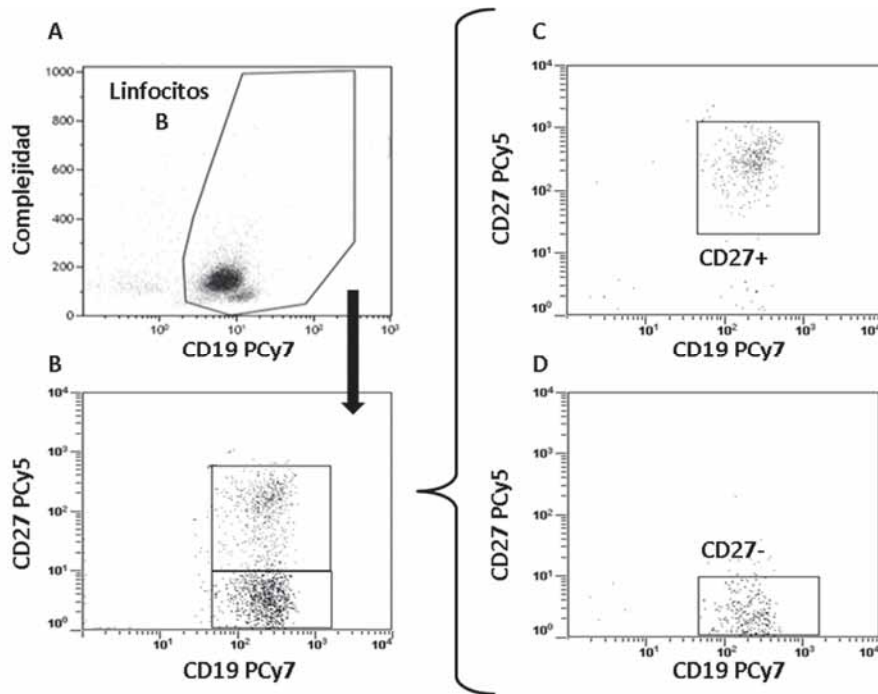


Figura 3. Aislamiento de linfocitos B $CD19^+CD27^-$ y $CD19^+CD27^+$. Se seleccionaron previamente los linfocitos B $CD19^+$ (panel A) y a continuación los $CD19^+CD27^-$ o $CD19^+CD27^+$ (panel B). Los paneles C y D muestran el resultado del aislamiento de las subpoblaciones B.

III. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS BACTERIANOS

Los extractos bacterianos se obtuvieron como se describió previamente [Koga *et al.* 2008 e Imasato *et al.* 2002]. Para preparar el extracto de *H. influenzae* se incubó la cepa no tipable de *H. influenzae* durante 16 horas en placas de agar chocolate y posteriormente durante otras 16 horas en tubos de 30 ml de caldo de cerebro-corazón suplementado con nicotinamida adenina dinucleótido (3.5 µg/ml). Para obtener el extracto de *S. pneumoniae*, las bacterias se cultivaron primero en placas de agar sangre y luego en caldo Todd-Hewitt suplementado con extracto de levadura al 5%. Los cultivos de *H. influenzae* y *S. pneumoniae* se centrifugaron a 7500 r.p.m. 10 y 20 minutos respectivamente y se descartaron los sobrenadantes. Las bacterias fueron resuspendidas en 10 ml de PBS y sonicadas (sonicador Branson) en frío tres veces a 150 W durante 3 minutos a intervalos de 5 minutos. Los lisados se congelaron a -80°C. Previamente a su uso como estímulos celulares, se evaluó la concentración final óptima en cultivo.

IV. CULTIVOS CELULARES

Las células mononucleadas, los linfocitos B CD19⁺ purificados y los linfocitos B CD19⁺CD27⁻ o CD19⁺CD27⁺ aislados se resuspendieron en el siguiente medio de cultivo: RPMI-1640 suplementado con 2mM de Glutamina (biowest), un 10% de STF descomplementado y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) y se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo plano en un volumen de 200 µl/pocillo.

Los estímulos utilizados y sus concentraciones finales en cultivo fueron: anti-IgM (fragmento F(ab')₂ de cabra dirigido contra la fracción constante de la IgM humana de Jackson ImmuneResearch, 5 µg/ml), anti-CD40 (anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra TNFRSF5/CD40 humano de R&D Systems, 1 µg/ml), ODN (oligodesoxinucleótido CpG-ODN2006 tipo B de InvivoGen, 0.6 µg/ml), IL-21 humana recombinante (de Biosource, 100 ng/ml) o los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* a 5 µg/ml. El número de células/pocillo, los estímulos utilizados y la duración del cultivo, se especifican en cada caso particular. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂.

4.1. Cultivos de células mononucleadas

4.1.1. Expresión de CD86 y proliferación de linfocitos B

Células mononucleadas (2x10⁵/pocillo) fueron estimuladas con anti-IgM, ODN o con los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* individualmente o en combinación con anti-IgM; durante 3 días para determinar la expresión en membrana de CD86 o durante 4 días para evaluar la proliferación celular.

4.2. Cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados y linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados

4.2.2. Apoptosis y proliferación

Linfocitos B CD19⁺ purificados o CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados (5x10⁴/pocillo) se estimularon con ODN, anti-IgM o anti-CD40 individualmente o en combinación con IL-21 durante 3 días.

4.2.1. Producción de inmunoglobulinas y expresión de CD38

Linfocitos B CD19⁺ purificados (1×10^5 /pocillo) se estimularon con ODN, anti-IgM, anti-CD40 e IL-21 en diferentes combinaciones durante 11 días. La inducción de la expresión de CD38 en membrana se evaluó en los linfocitos B recolectados tras el cultivo. Los sobrenadantes se congelaron a -70°C hasta la cuantificación de IgG, IgA e IgM.

V. CITOMETRÍA DE FLUJO

Los estudios de marcadores de superficie celular, análisis de apoptosis, análisis de proliferación celular y cuantificación de Igs se llevaron a cabo mediante citometría de flujo utilizando el citómetro analizador Epics FC500 y los *software* de análisis CXP o Kaluza (Beckman Coulter).

5.1. Análisis de marcadores de la superficie celular

Las muestras de sangre periférica con EDTA se incubaron 10 minutos con 5 μl de cada uno de los AcMo conjugados con fluorocromos indicados en cada caso. Paralelamente, se usó el AcMo anti-IgG₁-PE (Becton Dickinson) como control de isotipo. A continuación, siguiendo las instrucciones del *Immunoprep Reagent System* para su uso con el sistema automatizado TQ-Prep (ambos de Beckman Coulter), se eliminaron los hematíes de las muestras con ácido fórmico, se estabilizaron los leucocitos con una solución de carbonato sódico, cloruro sódico y sulfato sódico, y finalmente se fijaron las membranas celulares con paraformaldehído al 1%. Las muestras de células purificadas se incubaron igualmente con los AcMo indicados, se centrifugaron en 2-4 ml de PBS a 1700 r.p.m. 5

minutos y se resuspendieron en 400 μ l de PBS para su análisis. El nivel de expresión de cada marcador se evaluó como la media o la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI).

5.1.1. Subpoblaciones de linfocitos B de sangre periférica

Los porcentajes de las distintas subpoblaciones de linfocitos B se evaluaron en muestras de sangre periférica (100 μ l) incubadas con la siguiente combinación de AcMo: anti-CD19-ECD, anti-CD27-PCy7 (ambos de Coulter Immunotech) y anti-IgD-FITC (Dako). La expresión de IgD en la membrana de los linfocitos B se analizó para clasificar a los pacientes con IVC según los porcentajes de linfocitos B vírgenes ($CD19^+CD27^-IgD^+$), linfocitos B de memoria que no han hecho el cambio de clase de Ig ($CD19^+CD27^+IgD^+$) y de memoria que sí han experimentado dicho proceso ($CD19^+CD27^+IgD^-$). Los porcentajes de cada subpoblación se refirieron al total de linfocitos B $CD19^+$ previamente seleccionados (Figura 4).

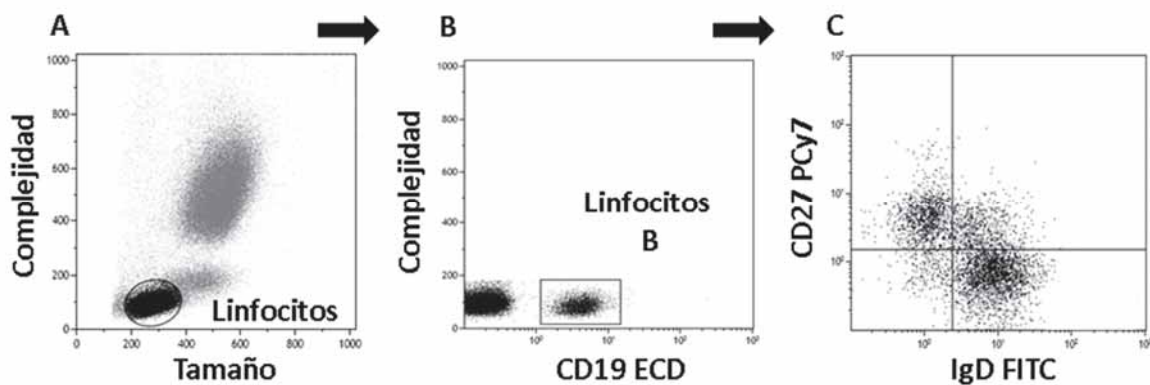


Figura 4. Evaluación de subpoblaciones B vírgenes y de memoria de sangre periférica. En un diagrama de puntos se identificaron los linfocitos en función de su tamaño y complejidad (panel A) y de ellos se seleccionaron los linfocitos B totales o $CD19^+$ (panel B) y se diferenciaron las subpoblaciones de linfocitos B vírgenes ($CD27^-IgD^+$) y de memoria ($CD27^+IgD^+$ o $CD27^+IgD^-$) (Panel C).

5.1.2. Expresión de TRAIL

La expresión de la molécula TRAIL en membrana se evaluó en muestras de sangre periférica (200 μ l) marcadas con anti-CD19-ECD, anti-CD27-PCy7 y anti-TRAIL-PE (Becton Dickinson). Se analizó la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de TRAIL en linfocitos B vírgenes (identificados como CD19⁺CD27⁻) y de memoria (identificados como CD19⁺CD27⁺).

5.1.3. Valoración de la pureza celular

La pureza de las células obtenidas en los distintos procesos de separación celular se evaluó mediante tinción con anti-CD45-FITC, anti-CD19-PCy5 (ambos de Coulter Immunotech) y anti-CD3-PE (Becton Dickinson) para los linfocitos B CD19⁺ purificados, o con anti-CD19-PCy7 y anti-CD27-PCy5 para los linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados. La pureza fue siempre superior al 95%.

5.1.4. Inducción de la expresión de moléculas de membrana.

La inducción de la expresión de CD86 se evaluó en cultivos de células mononucleadas usando anti-CD19-PCy5 y anti-CD86-PE (Coulter Immunotech). La media de intensidad de fluorescencia (MFI) de CD86 se determinó en la población de linfocitos B CD19⁺.

La expresión de CD38 se evaluó en cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados usando anti-CD19-PCy5 y anti-CD38-PE (Coulter Immunotech). Se evaluó el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ que adquirieron el antígeno CD38.

5. 2. Apoptosis

La apoptosis se evaluó en cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados mediante tinción con Anexina V/Ioduro de Propidio (Becton Dickinson). A los 3 días de cultivo, 1×10^5 linfocitos B CD19⁺ purificados se incubaron con anti-CD19-PCy7 y anti-CD27-PCy5. Las células se lavaron a 1700 r.p.m. 5 minutos con PBS frío y se resuspendieron en 100 μ l de una solución tampón de unión (10 mM Hepes - NaOH (pH 7.4) - 140 mM NaCl - 2.5 mM CaCl₂) que optimiza la unión de Anexina V a las membranas celulares apoptóticas. A continuación, las células se incubaron 15 minutos a TA y en oscuridad, con 5 μ l de Ioduro de Propidio (IoP) a 50 μ g/ml y con 5 μ l de Anexina V-FITC a 1.2 μ g/ml. Finalmente, se añadieron 400 μ l de solución tampón de unión. La apoptosis se evaluó en las subpoblaciones de linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ (Figura 5).

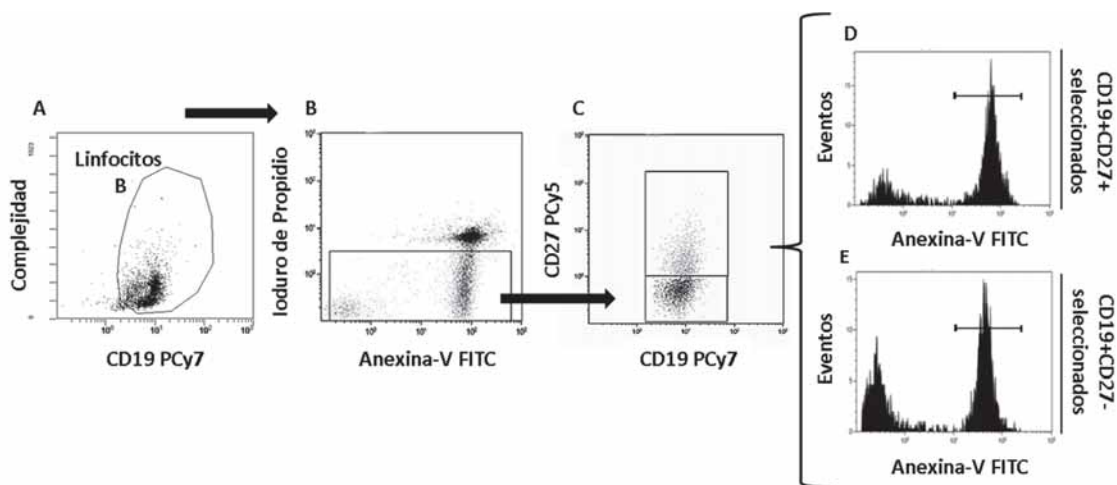


Figura 5. Análisis de la apoptosis en linfocitos B CD19⁺ purificados. Se seleccionaron los linfocitos B CD19⁺ y se descartaron los necróticos Anexina V⁺/IoP⁺ (paneles A y B). A continuación, a partir de linfocitos B CD19⁺CD27⁺ o CD19⁺CD27⁻ previamente seleccionados (C) se determinaron los porcentajes de células apoptóticas Anexina V⁺ (paneles D y E).

En algunos experimentos la apoptosis se analizó en las subpoblaciones de linfocitos B (CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺) previamente aisladas y cultivadas individualmente.

Se realizó una cinética de apoptosis de linfocitos B activados durante 24, 48 y 72 horas, en 3 cultivos independientes, para determinar el momento óptimo en el que valorarla. (Figura 6).

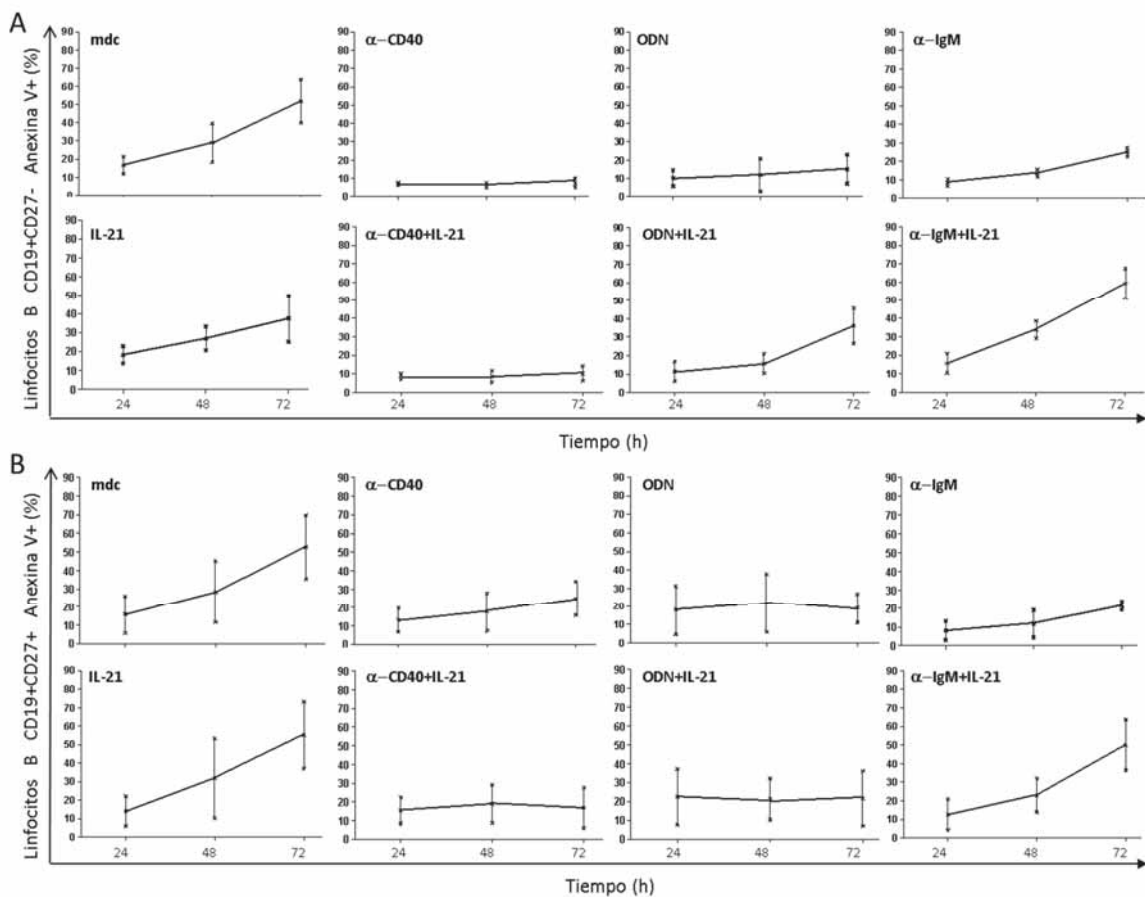


Figura 6. Cinética de apoptosis. Porcentajes de linfocitos B CD19⁺CD27⁻ (panel A) y CD19⁺CD27⁺ (panel B), sin estimular o activados con los distintos estímulos en solitario (fila superior en paneles A y B) o combinados con IL-21 (fila inferior en paneles A y B) durante 24, 48 y 72 horas. Los datos se expresan como la media de 3 experimentos independientes ± la desviación típica. mdc: medio de cultivo.

Se calculó el porcentaje de linfocitos B rescatados de la apoptosis tras estimulación, aplicando la siguiente fórmula matemática:

$$\% \text{ rescate} = \frac{\% \text{ apoptosis basal} - \% \text{ apoptosis post-estimulación}}{\% \text{ apoptosis basal}} \times 100$$

5.3. Proliferación celular

La proliferación en cultivos de células mononucleadas, linfocitos B CD19⁺ purificados o CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados se evaluó mediante carboxifluoresceína (CFSE). Antes del cultivo, las células se marcaron con CFSE. Brevemente, 5-10x10⁶ de células mononucleadas o 1-2x10⁶ de linfocitos B CD19⁺ purificados o CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados se resuspendieron en 1 ml de PBS estéril suplementado con un 5% de STF descomplementado (PBS-STF) al que se añadieron 5 µg o 1 µg de CFSE, respectivamente. Tras 5 minutos de incubación a TA, las células se lavaron 3 veces a 1700 r.p.m. con PBS-STF para eliminar el exceso de CFSE. Las células mononucleadas fueron recolectadas a los 4 días de cultivo y marcadas con anti-CD19-PCy5. Los linfocitos B CD19⁺ purificados o CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados fueron recolectados a los 3 días de cultivo y marcados con anti-CD19-PCy7 y anti-CD27-PCy5. Se valoró la dilución de CFSE, que indica proliferación, como la pérdida de intensidad de fluorescencia en el canal FL-1 del citómetro.

El índice de proliferación (IP) se calculó aplicando la siguiente fórmula matemática [Quah *et al.* 2007 y Hawkins *et al.* 2007]:

$$\text{índice de proliferación} = \frac{100-Y}{Y}$$

donde:

$$Y = X_0 + X_1/2 + X_2/4 + X_3/8 + X_4/16 + \dots + X_n/2^n$$

y donde X₀ son las células (%) que no se han dividido, X₁ las células que se han dividido 1 vez, X₂ las que se han dividido 2 veces y así sucesivamente hasta X_n, siendo n el número total

de divisiones. La Figura 7 muestra un ejemplo representativo del análisis de la proliferación en cultivos de células mononucleadas o de linfocitos B CD19⁺ purificados.

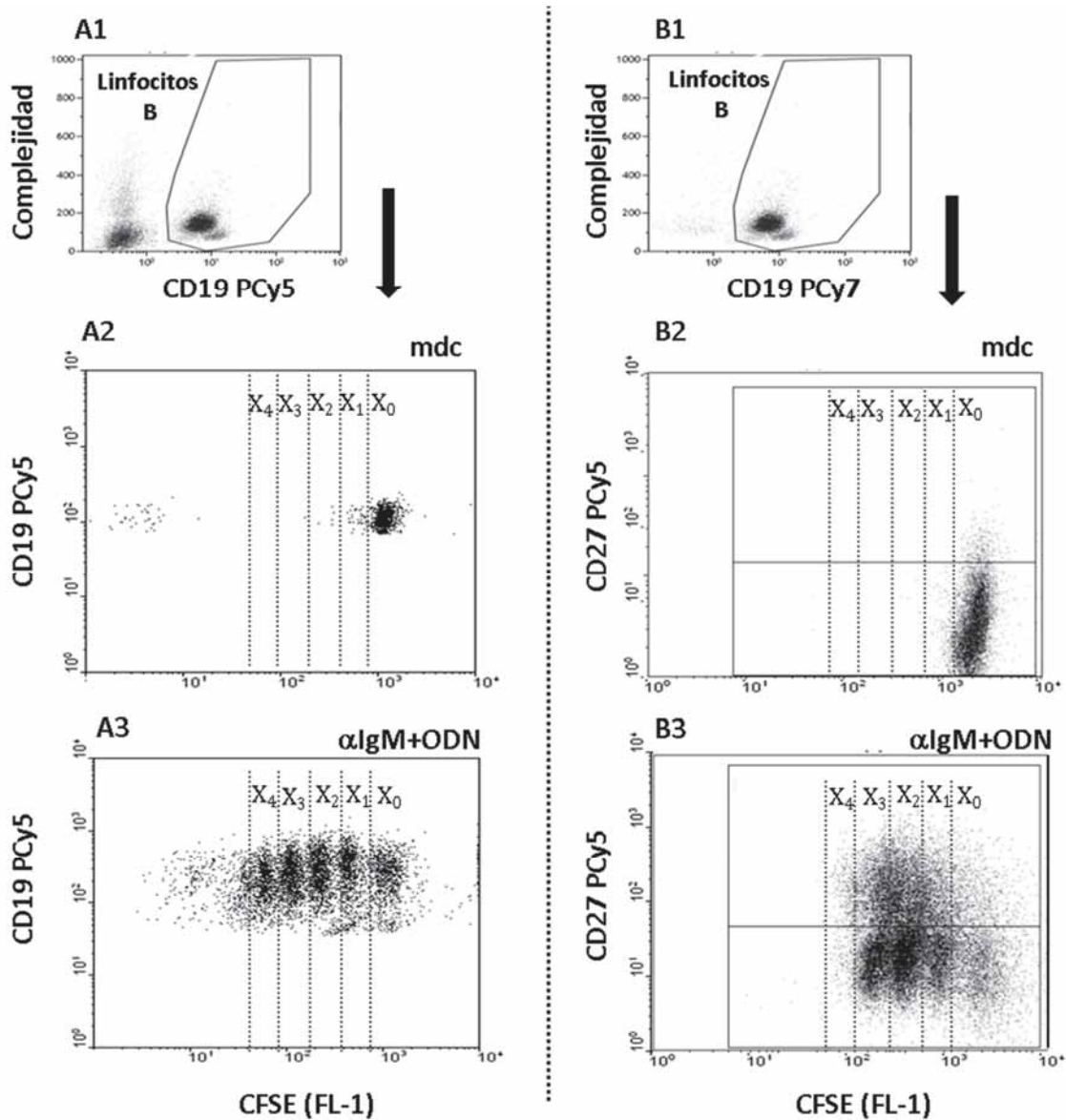


Figura 7. Análisis de la proliferación y cálculo del índice de proliferación. Se analizó la proliferación de linfocitos B CD19⁺ de cultivos de células mononucleadas (columna A) o de linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ de cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados (columna B). Se seleccionaron previamente los linfocitos B CD19⁺ (paneles A1 y B1) y se analizó la dilución de CFSE en células sin estimular (paneles A2 y B2) o estimuladas (paneles A3 y B3). Los porcentajes de células en división (marcadores X₁ a X₄) y de células no divididas (marcadores X₀) se utilizaron para el cálculo del IP. mdc: medio de cultivo.

5.4. Cuantificación de inmunoglobulinas

La producción de IgG, IgA e IgM se evaluó en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados usando el método *Citometric Bead Array* (CBA, Becton Dickinson) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los resultados se evaluaron usando la versión 1.0.1. del *software* informático FCAP-array (Becton Dickinson). Los límites inferiores de detección fueron 0.06, 0.34 y 7.35 ng/ml para la IgM, IgG e IgA, respectivamente.

VI. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media, o bien como la mediana junto con el rango intercuartil (RIC): percentiles 25 y 75. El test Mann-Whitney se usó para comprobar las diferencias estadísticas entre grupos de sujetos o entre subpoblaciones celulares. Para comparar diferencias entre más de 2 grupos se usó el test Kruskal-Wallis. El test Wilcoxon se usó para comparar dos grupos de estímulos celulares apareados (p. ej. cada estímulo simple con el mismo estímulo combinado con IL-21). Un valor de *p* inferior a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo. El análisis se llevó a cabo con la versión 4.0 del *software* estadístico GraphPad Prism. Ningún test estadístico basado en la comparación de medidas de tendencia central fue aplicable al análisis de la apoptosis tras estimulación con anti-IgM e IL-21, ya que la acumulación de los datos no siguió una distribución uniforme.

RESULTADOS

RESULTADOS

CAPÍTULO I. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

Conforme a los criterios diagnósticos de la IVC, los 27 pacientes (7 varones y 20 mujeres) presentaron niveles séricos reducidos de IgG y de IgA y/o IgM e historia clínica de infecciones recurrentes. La edad media de los pacientes fue de 47.8 años (rango: 23-82). Los porcentajes de linfocitos B CD19⁺ en sangre periférica se encontraban dentro de la normalidad [Morbach *et al.* 2010] y fueron similares entre pacientes (mediana: 9.0 %, RIC: 5-17 %) y controles (mediana: 10.0 %, RIC: 8-14 %). Sin embargo, la proporción de las distintas subpoblaciones de linfocitos B de memoria estuvo alterada en los pacientes.

1.1. Clasificación de los pacientes con IVC

De acuerdo a la distribución de linfocitos B de memoria se identificaron 16 individuos (59%) con niveles bajos de linfocitos B CD19⁺CD27⁺ o MB0, 8 individuos (30%) con niveles normales de linfocitos B CD19⁺CD27⁺IgD⁺ y niveles bajos de linfocitos B CD19⁺CD27⁺IgD⁻ o MB1 y 3 individuos (11%) con niveles normales de linfocitos B CD19⁺CD27⁺ o MB2 (Tabla 2). Las proporciones de los distintos grupos de pacientes son semejantes a las de otras cohortes descritas anteriormente [Piqueras *et al.* 2003 y Al Kindi *et al.* 2012]. La Tabla 4 muestra datos demográficos, niveles de Igs séricas, porcentajes de subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica y clasificación de los pacientes con IVC.

Tabla 4. Edad, sexo, niveles séricos de inmunoglobulinas al diagnóstico y subpoblaciones de linfocitos B en sangre periférica de pacientes con IVC.

Paciente	Edad Años	Sexo	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	³ CD19 ⁺ (%)	⁴ CD19 ⁺ (%)			Grupo
							IgD ⁺ CD27 ⁻	IgD ⁺ CD27 ⁺	IgD ⁻ CD27 ⁺	
1	43	¹ V	118	<7	<6	5	94	5	<1	MB0
2	61	V	316	9	12	8	96	3	<1	MB0
3	29	² M	82	<6	5	15	95	<1	<1	MB0
4	29	M	351	20	<6	9	87	6	2	MB0
5	61	M	327	73	30	19	84	5	5	MB0
6	60	M	112	<6	<5	5	95	1	1	MB0
7	60	V	77	<6	<4	2	92	3	<1	MB0
8	67	M	37	<6	<5	5	96	3	<1	MB0
9	34	M	371	<6	34	16	70	2	3	MB0
10	38	V	85	<24	<18	4	90	5	1	MB0
11	23	V	316	<25	21	14	91	4	<1	MB0
12	27	M	280	35	96	8	97	2	<1	MB0
13	28	V	461	<28	<17	20	97	1	<1	MB0
14	26	V	229	<6	12	18	90	1	2	MB0
15	26	M	73	<24	17	4	98	1	<1	MB0
16	49	M	397	126	22	17	82	8	2	MB0
17	73	M	323	98	<6	27	72	27	<1	MB1
18	67	M	434	47	46	14	64	25	4	MB1
19	67	M	452	46	58	7	73	18	5	MB1
20	46	M	406	51	<6	16	77	20	1	MB1
21	47	M	495	44	38	9	75	17	5	MB1
22	33	M	412	<25	62	9	84	8	4	MB1
23	60	M	351	92	38	26	76	7	6	MB1
24	67	M	445	<23	<17	16	84	12	1	MB1
25	82	M	253	26	<16	2	39	14	33	MB2
26	44	M	288	32	14	20	52	10	20	MB2
27	45	M	450	25	96	7	42	44	11	MB2

¹V: varón. ²M: mujer. ³Porcentaje sobre el total de linfocitos. ⁴Porcentaje sobre el total de linfocitos B CD19⁺.

CAPÍTULO II. ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DEL LINFOCITO B EN CULTIVOS DE CÉLULAS MONONUCLEADAS

2.1. Inducción de la expresión de CD86 en linfocitos B CD19⁺ seleccionados

2.1.1. Respuesta al ligando de TLR-9

La estimulación de cultivos de células mononucleadas durante 3 días, a través del BCR (anti-IgM) o de TLR-9 (ODN), incrementó la expresión de CD86 en linfocitos B CD19⁺. Al combinar anti-IgM y ODN, se observó un efecto sinérgico en el incremento de la expresión de CD86 (Figura 8).

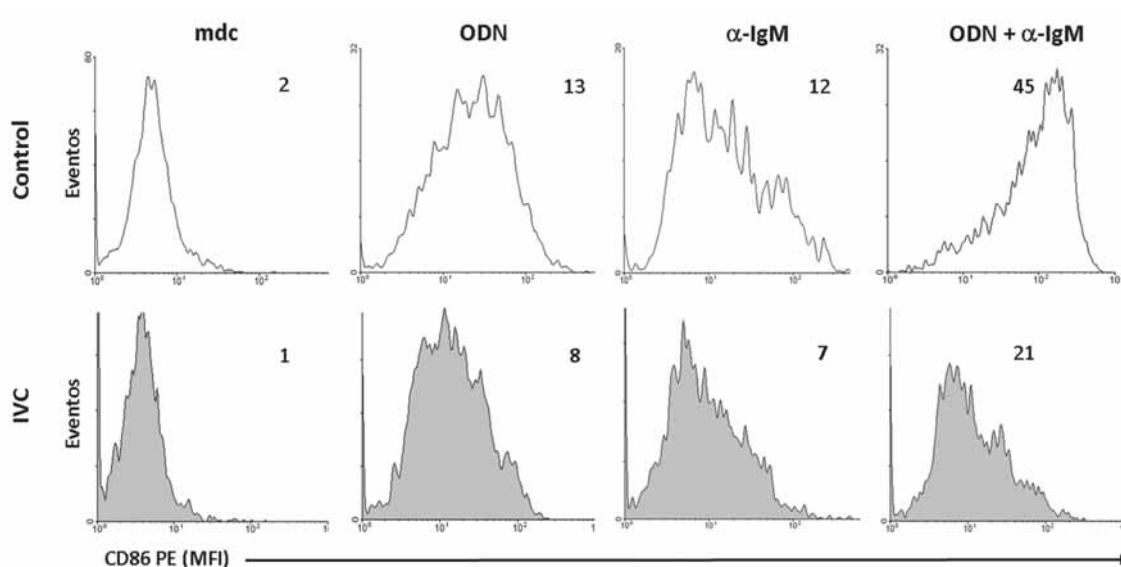


Figura 8. Inducción de la expresión de CD86 en respuesta al ligando de TLR-9 en linfocitos B. Los histogramas representan la expresión de CD86 en linfocitos B CD19⁺ seleccionados sin estimular y tras activación con el ligando de TLR-9 (ODN), anti-IgM y la combinación de ambos. Los números indican las MFI de CD86 de un control (blanco) y un paciente (gris) de un experimento representativo. mdc: medio de cultivo.

Los linfocitos B CD19⁺ de pacientes con IVC expresaron niveles más bajos de CD86 que los de controles al estimular con anti-IgM (media de las MFI de CD86 \pm error estándar de la

media en los linfocitos B de pacientes: 12 ± 2.1 MFI vs. media de las MFI de CD86 \pm error estándar de la media en los linfocitos B de controles: 14 ± 1.8 MFI) u ODN (13 ± 1.9 MFI vs. 14 ± 1.6 MFI), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 9). La combinación de anti-IgM y ODN indujo una menor expresión de CD86 en los linfocitos B CD19⁺ de los pacientes (34 ± 5.2 MFI vs. 48 ± 4.6 MFI, $p < 0.05$) (Figura 9).

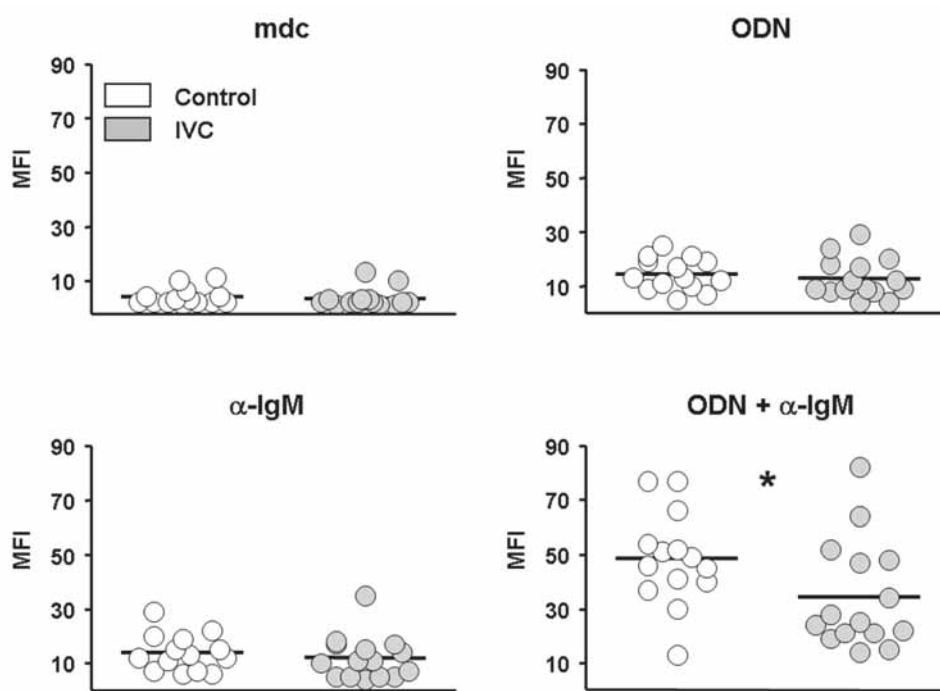


Figura 9. Expresión de CD86 en respuesta al ligando de TLR-9 en linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC. Los círculos representan la expresión (MFI) de CD86 en linfocitos B CD19⁺ seleccionados de controles (blanco) y pacientes (gris) sin estimular y tras activación con ODN o anti-IgM en solitario o en combinación. Las líneas horizontales representan la media de los valores. mdc: medio de cultivo. * $p < 0.05$.

2.1.2. Respuesta a los extractos bacterianos

Los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* inducen discretamente la expresión de CD86 en linfocitos B CD19⁺.

Sin embargo, al combinar cualquiera de los extractos con anti-IgM se observó un efecto sinérgico (Figura 10).

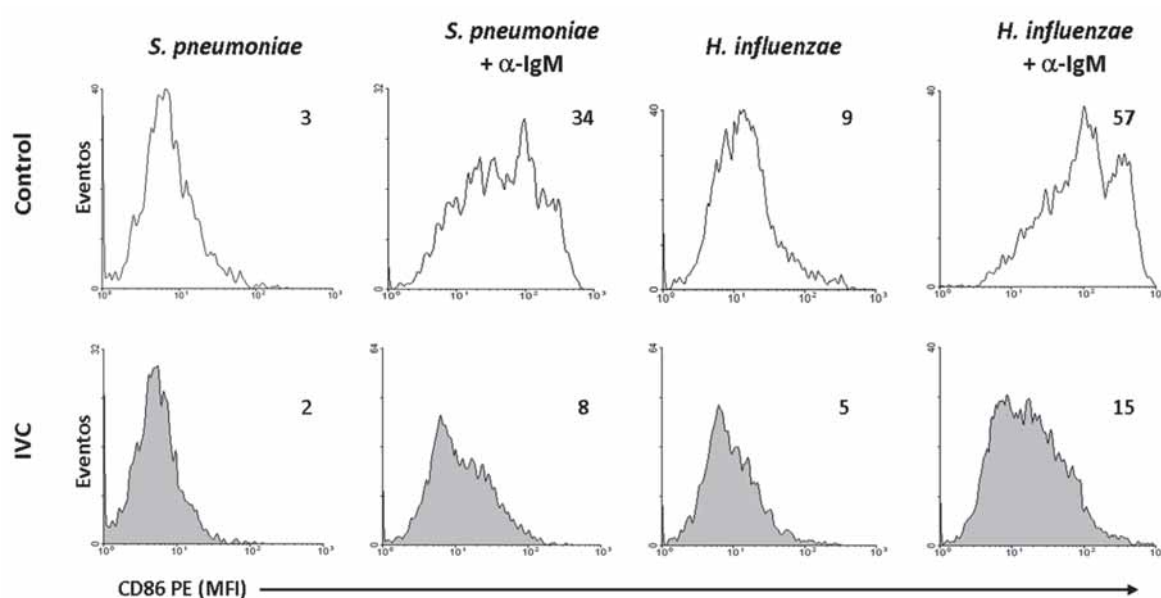


Figura 10. Inducción de la expresión del CD86 en respuesta a los extractos bacterianos en linfocitos B. Los histogramas representan la expresión (MFI) de CD86 en linfocitos B CD19⁺ seleccionados tras activación con los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en solitario o en combinación con anti-IgM. Los números indican las MFI de CD86 en linfocitos B de un control (blanco) y un paciente (gris) de un experimento representativo.

Los extractos de *H. influenzae* fueron más eficientes que los de *S. pneumoniae* induciendo la expresión de CD86 en linfocitos B CD19⁺ de controles de manera aislada (8.9 ± 1.7 MFI vs. 3.8 ± 0.43 MFI respectivamente, $p < 0.05$) y en combinación con anti-IgM (46 ± 6.7 MFI vs. 21 ± 2.8 MFI, $p < 0.05$).

Al comparar pacientes y controles, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la inducción de la expresión de CD86 en linfocitos B CD19⁺ estimulados con extractos bacterianos de *S. pneumoniae* o *H. influenzae* (4.8 ± 1.2 MFI vs. 3.8 ± 0.43 MFI y 6.5 ± 1.1 MFI vs. 8.9 ± 1.7 MFI,

respectivamente). Al añadir anti-IgM, la inducción de la expresión de CD86 fue inferior en pacientes con IVC que en controles, tanto al estimular con el extracto de *S. pneumoniae* (16 ± 3.9 MFI vs. 21 ± 2.8 MFI, $p < 0.05$) como con el extracto de *H. influenzae* (26 ± 6.5 MFI vs. 46 ± 6.7 MFI, $p < 0.05$) (Figura 11).

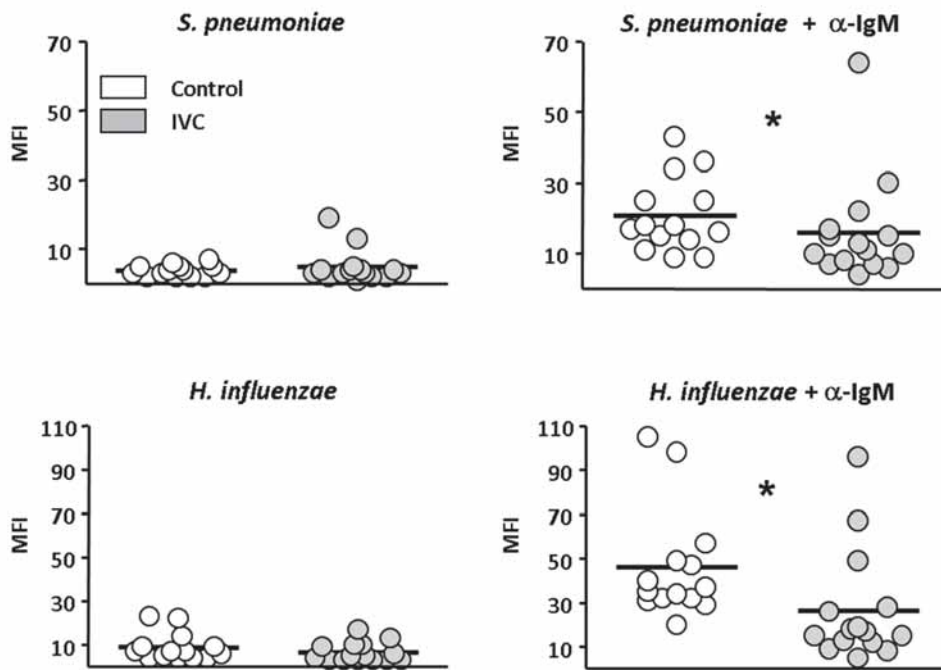


Figura 11. Expresión de CD86 en respuesta a los extractos bacterianos en linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC. Los círculos representan el nivel de expresión (MFI) de CD86 en linfocitos B CD19⁺ seleccionados de controles (blanco) y pacientes (gris) tras activación con los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en solitario o en combinación con anti-IgM. Las líneas horizontales representan la media de los valores. * $p < 0.05$.

2.2. Proliferación de linfocitos B CD19⁺ seleccionados

2.2.1. Respuesta al ligando de TLR-9

La estimulación de las células mononucleadas con ODN fue capaz de inducir proliferación en los linfocitos B CD19⁺. Sin

embargo, aunque anti-IgM aisladamente apenas indujo proliferación, sí incrementó el efecto de ODN (Figura 12).

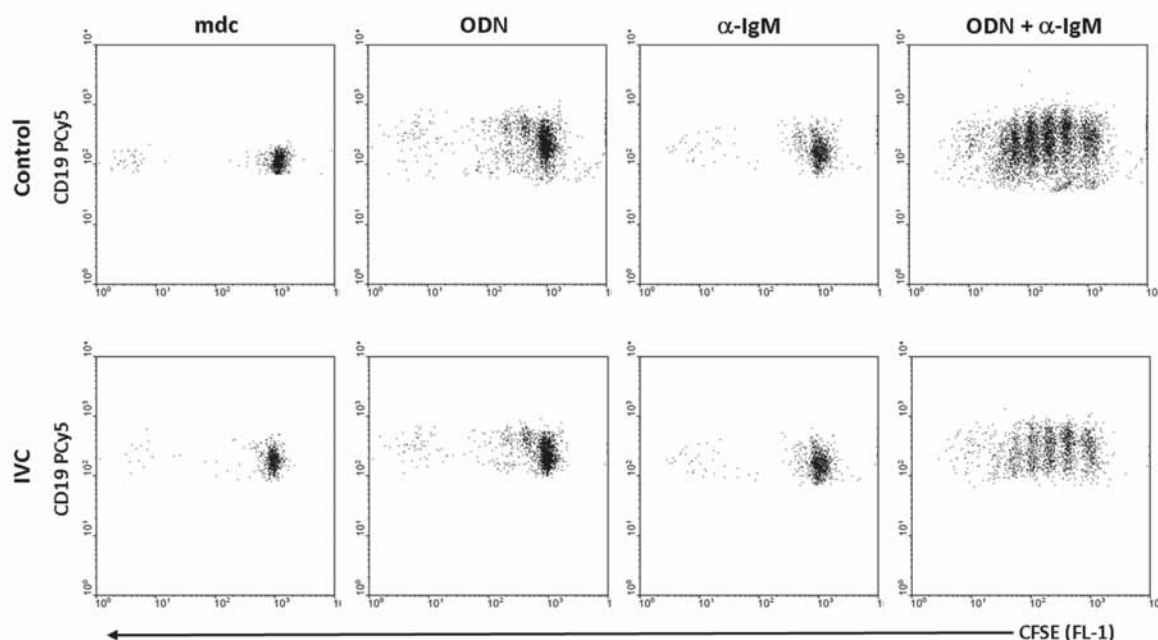


Figura 12. Proliferación de linfocitos B en respuesta al ligando de TLR-9. Los diagramas de puntos representan la dilución de CFSE en linfocitos B CD19⁺ seleccionados sin estimular y tras activación con ODN o anti-IgM en solitario o en combinación, de un control (fila superior) y un paciente (fila inferior) de un experimento representativo. mdc: medio de cultivo.

Al comparar pacientes y controles, los índices de proliferación (IP) en linfocitos B CD19⁺ fueron similares tras estimulación con anti-IgM (media de los IP \pm error estándar de la media en los linfocitos B de pacientes: 1.1 ± 0.01 IP vs. media de los IP \pm error estándar de la media en los linfocitos B de controles: 1.1 ± 0.02 IP), u ODN (1.1 ± 0.03 IP vs. 1.3 ± 0.08 IP) en solitario (Figura 13).

A diferencia de lo que ocurría con la inducción de la expresión de CD86, los IP en linfocitos B CD19⁺ también

fueron similares tras estimular las células mononucleadas con la combinación de anti-IgM y ODN (1.4 ± 0.12 IP vs. 1.5 ± 0.07 IP) (Figura 13).

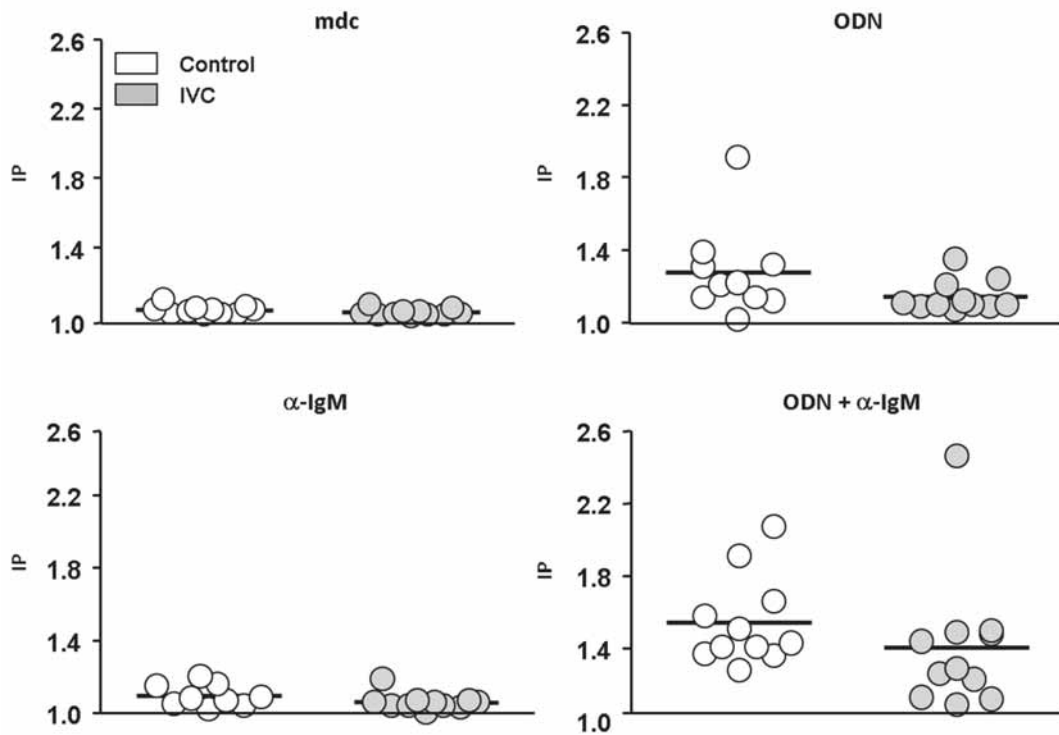


Figura 13. Proliferación de linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC en respuesta al ligando de TLR-9. Los círculos representan los índices de proliferación (IP) de los linfocitos B CD19⁺ seleccionados de controles (blanco) y pacientes (gris) tras activación con anti-IgM u ODN en solitario o en combinación. Las líneas horizontales representan la media de los valores. mdc: medio de cultivo.

2.2.2. Respuesta a los extractos bacterianos

Los linfocitos B CD19⁺ apenas proliferaron en respuesta a los extractos en solitario, pero al combinarlos con anti-IgM, se incrementó la proliferación (Figura 14).

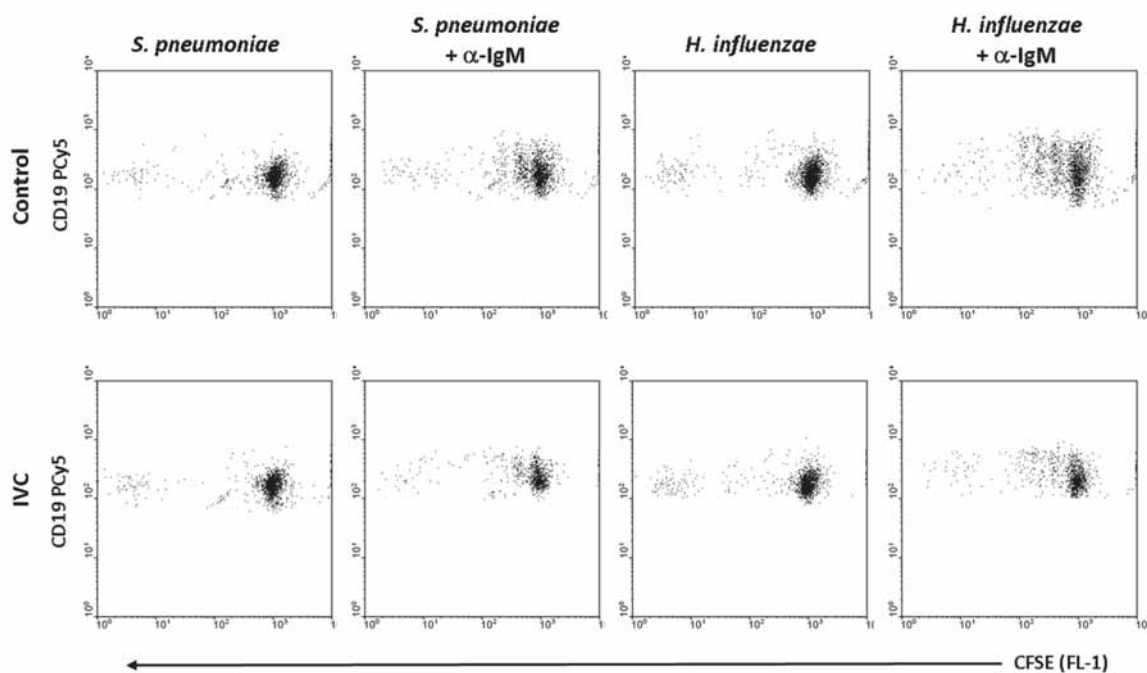


Figura 14. Proliferación de linfocitos B en respuesta a los extractos bacterianos. Los diagramas de puntos representan la dilución de CFSE en linfocitos B CD19⁺ seleccionados, tras activación con los extractos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en solitario o en combinación con anti-IgM, de un control (fila superior) y un paciente (fila inferior) de un experimento representativo.

Los índices de proliferación en linfocitos B CD19⁺ de pacientes con IVC fueron inferiores en comparación a los controles tanto si usamos como estímulo los extractos en solitario de *S. pneumoniae* (1.04 ± 0.02 IP vs. 1.09 ± 0.03 IP, $p < 0.05$) o *H. influenzae* (1.05 ± 0.02 IP vs. 1.11 ± 0.03 IP, $p < 0.05$), como si usamos las combinaciones de *S. pneumoniae* con anti-IgM (1.05 ± 0.02 IP vs. 1.12 ± 0.03 IP, $p < 0.05$) o *H. influenzae* con anti-IgM (1.06 ± 0.02 IP vs. 1.15 ± 0.02 IP, $p < 0.05$) (Figura 15).

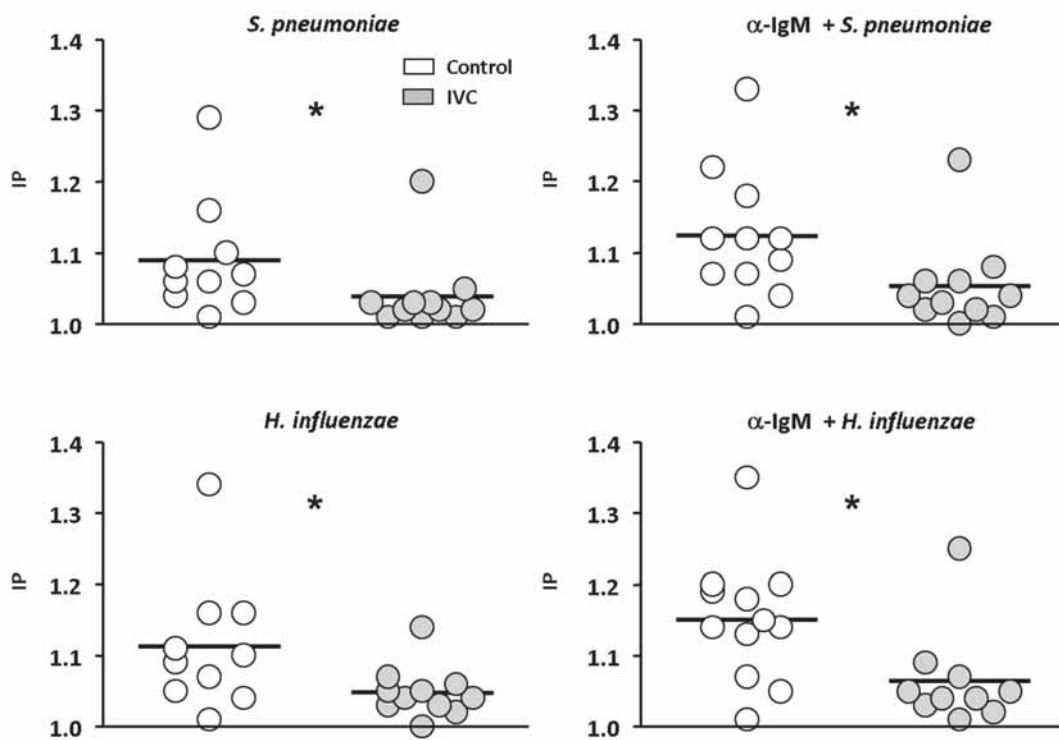


Figura 15. Proliferación de linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC en respuesta a los extractos bacterianos. Los círculos representan los índices de proliferación (IP) de linfocitos B CD19⁺ seleccionados de controles (blanco) y pacientes (gris) tras activación con los extractos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* en solitario o en combinación con anti-IgM. Las líneas horizontales representan la media de los valores. *p<0.05.

CAPÍTULO III. DIFERENCIACIÓN DEL LINFOCITO B Y PRODUCCIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN CULTIVOS DE LINFOCITOS B CD19⁺ PURIFICADOS

3.1. Inducción de la expresión de CD38 en linfocitos B CD19⁺ purificados

3.1.1. Respuesta al ligando de TLR-9

La estimulación durante 11 días con ODN individualmente o en combinación con anti-IgM, indujo la expresión del antígeno CD38, marcador de diferenciación hacia célula plasmática, en linfocitos B CD19⁺ purificados, tanto en pacientes con IVC como en controles (Figura 16).

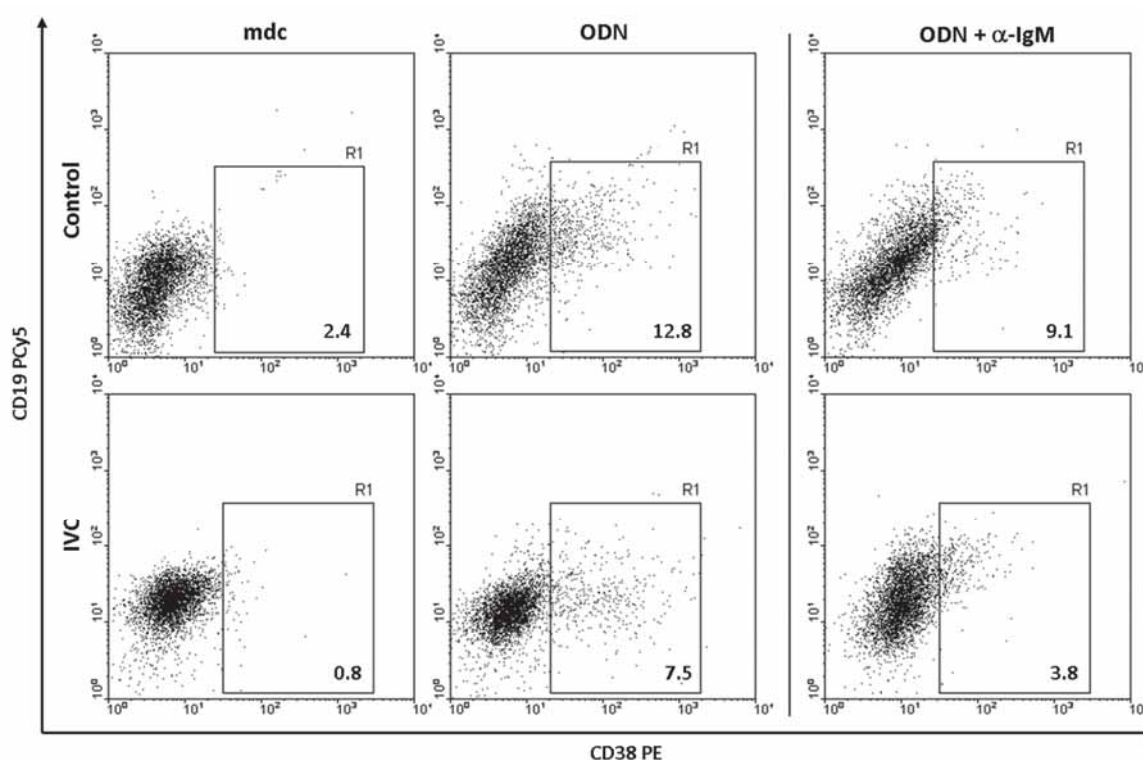


Figura 16. Inducción de la expresión de CD38 en respuesta al ligando de TLR-9 en linfocitos B. Los números indican el porcentaje de linfocitos B CD38⁺ tras activación con ODN en solitario o combinado con anti-IgM de un control (fila superior) y un paciente (fila inferior) de un experimento representativo. mdc: medio de cultivo.

Aunque el porcentaje de linfocitos B CD38⁺ tras estimulación con ODN fue inferior en pacientes con IVC en comparación a los controles (mediana de los % de linfocitos B CD38⁺ en pacientes: 6.33 %, RIC: 5.40-8.96 % vs. mediana de los % de linfocitos B CD38⁺ en controles: 9.07 %, RIC: 4.65-13.24 %), las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. Al añadir anti-IgM a los cultivos tampoco encontramos diferencias significativas entre pacientes con IVC y controles (3.83 %, RIC: 1.81-6.07 % vs. 3.24 %, RIC: 1.54-11.09 %) (Figura 17).

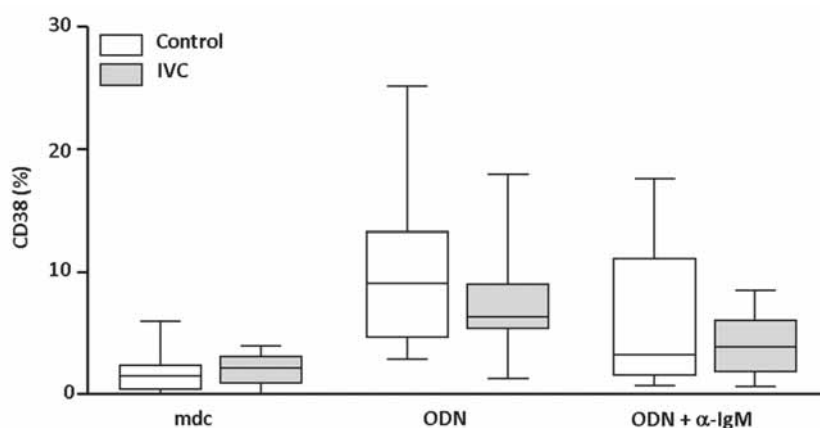


Figura 17. Expresión de CD38 en respuesta al ligando de TLR-9 en linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC. Porcentajes de linfocitos B CD38⁺ en controles y pacientes tras activación con ODN ± anti-IgM. Los diagramas de cajas representan la mediana, el RIC y los valores extremos de 15 pacientes (gris) y 16 controles (blanco). mdc: medio de cultivo.

3.1.2. Respuesta al estímulo T-dependiente

La estimulación con anti-CD40 individualmente o en combinación con anti-IgM no indujo expresión del marcador de diferenciación CD38 en linfocitos B CD19⁺ purificados tras 11 días de cultivo (Figura 18). Este resultado es coherente con el hecho de que la estimulación a través del CD40 o del BCR, de manera individual o en combinación, es capaz de activar al

linfocito B pero no de inducir su diferenciación final hacia célula secretora de Igs. La coestimulación con IL-21 en presencia de anti-CD40 o de anti-CD40 combinado con anti-IgM indujo la diferenciación de los linfocitos B hacia células CD38⁺, tanto en pacientes con IVC como en controles (Figura 18).

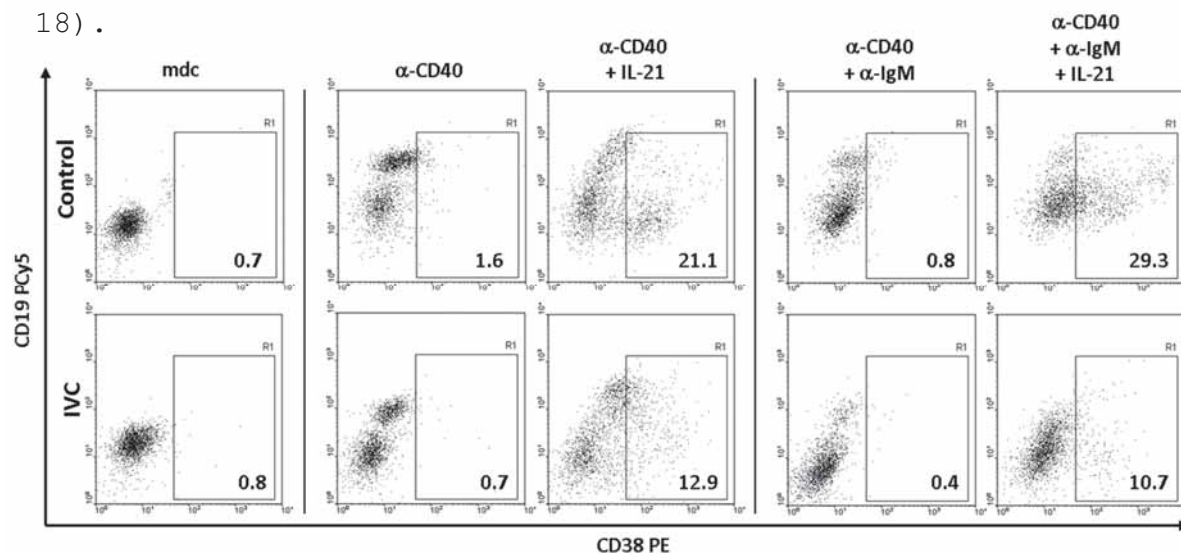


Figura 18. Inducción de la expresión de CD38 en respuesta al estímulo T-dependiente en linfocitos B. Los números indican el porcentaje de linfocitos B CD38⁺ tras activación con anti-CD40 en solitario o combinado con IL-21 y/o anti-IgM de un control (fila superior) y un paciente (fila inferior) de un experimento representativo. mdc: medio de cultivo.

El porcentaje de linfocitos B CD38⁺ de pacientes con IVC sin estimular no fue diferente al de controles (2.12 %, RIC: 0.91-3.029 % vs. 1.45 %, RIC: 0.45-2.35 %) (Figura 19). El porcentaje de linfocitos B que se diferenciaron hacia células CD38⁺ fue inferior en linfocitos B CD19⁺ purificados de pacientes con IVC que en los controles al estimular con anti-CD40 e IL-21 (11.35 %, RIC: 5.62-20.14 % vs. 20.10 %, RIC: 11.56-26.16 %), aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas (Figura 19). Sin embargo, cuando añadimos anti-IgM a los cultivos, sí encontramos diferencias entre pacientes y controles (9.36 %, RIC: 6.12-13.39 % vs. 22.76 %, RIC: 13.87-29.16 %, p<0.05) (Figura 19).

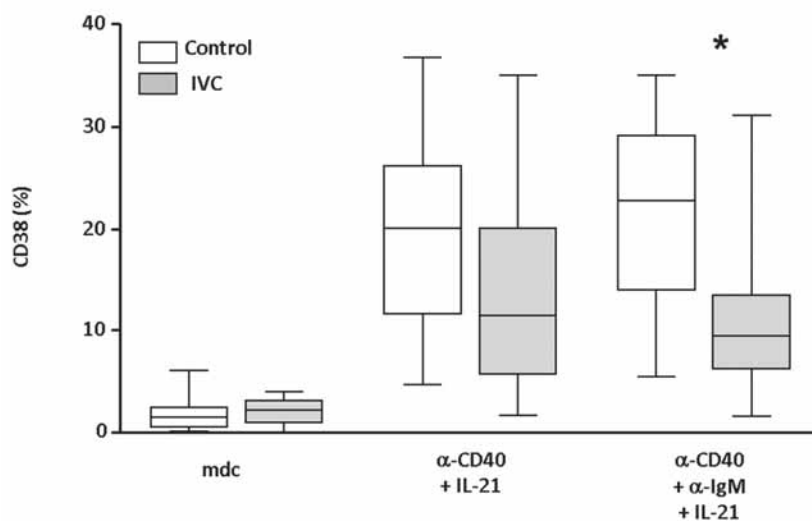


Figura 19. Expresión de CD38 en respuesta al estímulo T-dependiente en linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC. Porcentajes de linfocitos B CD38⁺ en controles y pacientes tras activación con anti-CD40 e IL-21 ± anti-IgM. Los diagramas de cajas representan la mediana, el RIC y los valores extremos de 15 pacientes (gris) y 16 controles (blanco). mdc: medio de cultivo. *p<0.05.

3.2. Producción de inmunoglobulinas en linfocitos B CD19⁺ purificados

3.2.1. Respuesta al ligando de TLR-9

Los linfocitos B CD19⁺ purificados de pacientes con IVC estimulados con ODN produjeron niveles inferiores de IgM que los de controles (mediana en los pacientes: 5215 ng/ml, RIC: 174-10387 ng/ml vs. mediana en los controles: 10049 ng/ml, RIC: 7057-15824 ng/ml) aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 20). La producción de IgM en presencia del estímulo anti-IgM no pudo ser evaluada por interferencias con el sistema de detección.

Los linfocitos B CD19⁺ purificados de pacientes con IVC estimulados con ODN produjeron niveles inferiores de IgG que los de controles (93 ng/ml, RIC: 66-1658 ng/ml vs. 2082 ng/ml, RIC: 1218-6388 ng/ml, p<0.05) (Figura 21, panel

superior izquierdo), así como también niveles inferiores de IgA (281 ng/ml, RIC: 38-7183 ng/ml vs. 5865 ng/ml, RIC: 3004-9325 ng/ml, $p < 0.05$) (Figura 21, panel inferior izquierdo). Las diferencias entre pacientes y controles se mantuvieron tras añadir anti-IgM a los cultivos, tanto en el caso de la producción de IgG (267 ng/ml, RIC: 99-667 ng/ml vs. 2249 ng/ml, RIC: 1090-4845 ng/ml, $p < 0.05$) (Figura 21, panel superior izquierdo), como de IgA (32 ng/ml, RIC: 21-5353 ng/ml vs. 5309 ng/ml, RIC: 3922-10224 ng/ml, $p < 0.05$) (Figura 21, panel inferior izquierdo).

3.2.2. Respuesta al estímulo T-dependiente

Los linfocitos B CD19⁺ purificados de pacientes con IVC estimulados con anti-CD40 e IL-21 produjeron niveles de IgM similares a los de controles (13024 ng/ml, RIC: 4797-39996 ng/ml vs. 14226 ng/ml, RIC: 11374-38289 ng/ml) (Figura 20).

Los linfocitos B CD19⁺ purificados de pacientes con IVC estimulados con anti-CD40 e IL-21 produjeron niveles inferiores de IgG respecto a los de controles (2026 ng/ml, RIC: 955-9421 ng/ml vs. 34912 ng/ml, RIC: 8149-72204 ng/ml, $p < 0.05$) (Figura 21, panel superior derecho), así como también niveles inferiores de IgA (4403 ng/ml, RIC: 1873-16295 ng/ml vs. 15918 ng/ml, RIC: 9791-24989 ng/ml, $p < 0.05$) (Figura 21, panel inferior derecho). De nuevo, las diferencias entre pacientes y controles se mantuvieron al añadir anti-IgM a los cultivos tanto para la producción de IgG (2034 ng/ml, RIC: 449-4036 ng/ml vs. 21606 ng/ml, RIC: 6535-83821 ng/ml, $p < 0.05$) (Figura 21, panel superior derecho), como de IgA (322 ng/ml, RIC: 138-8434 ng/ml vs. 9722 ng/ml, RIC: 5892-13071 ng/ml, $p < 0.05$) (Figura 21, panel inferior derecho).

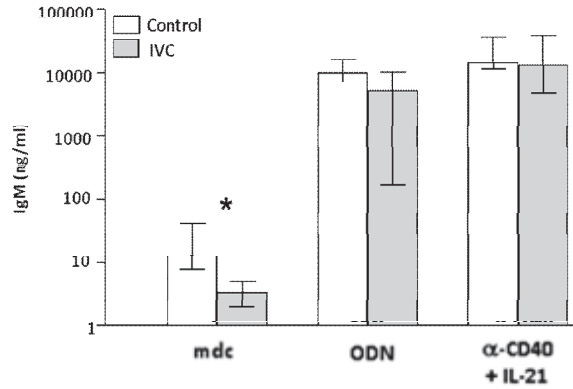


Figura 20. Producción de IgM en respuesta al ligando de TLR-9 y al estímulo T-dependiente. Concentración (ng/ml) de IgM en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados de controles (blanco) y pacientes (gris) tras activación con ODN o anti-CD40 + IL-21. Las barras representan las medianas y el RIC de 15 pacientes y 16 controles. mdc: medio de cultivo. *p<0.05.

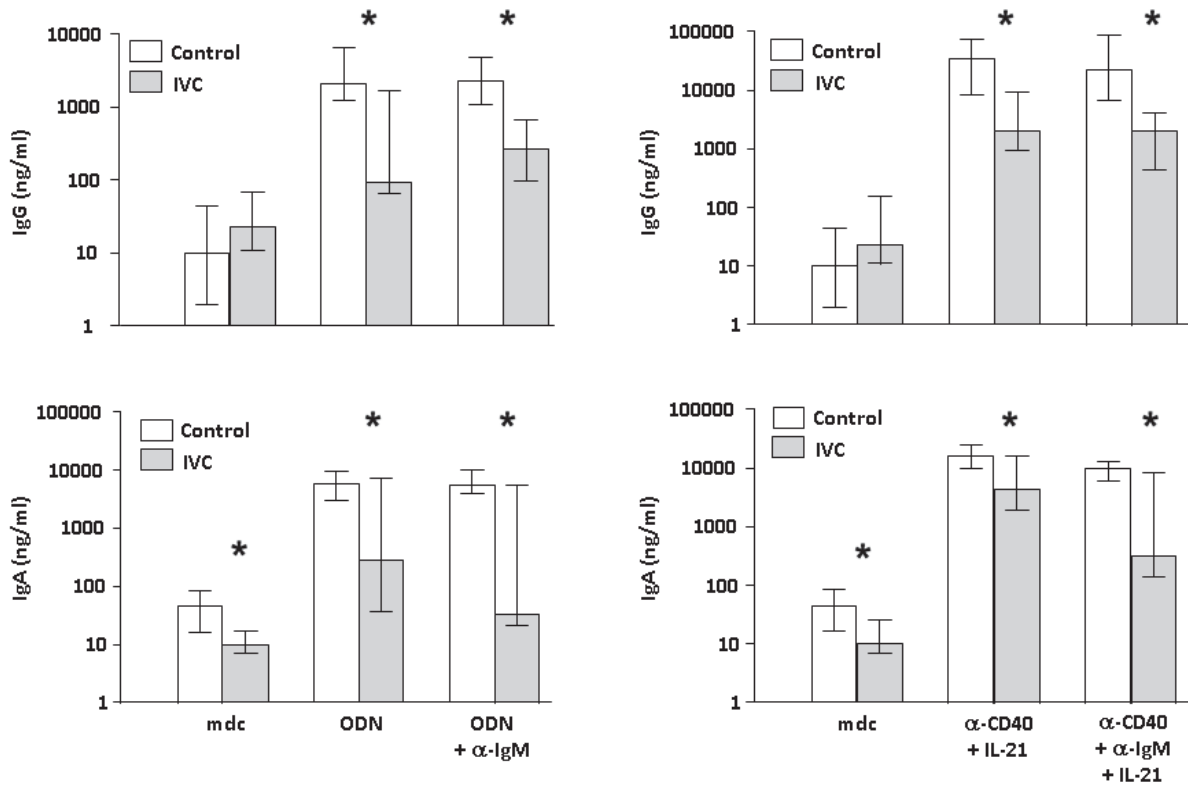


Figura 21. Producción de IgG e IgA en respuesta al ligando de TLR-9 y al estímulo T-dependiente. Concentración (ng/ml) de IgG (fila superior) e IgA (fila inferior) en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados de controles (blanco) y pacientes (gris) tras activación con ODN ± anti-IgM (izquierda) o anti-CD40 + IL-21 ± anti-IgM (derecha). Las barras representan las medianas y el RIC de 15 pacientes y 16 controles. mdc: medio de cultivo. *p<0.05.

CAPÍTULO IV. APOPTOSIS Y PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS B CD19⁺CD27⁻ Y CD19⁺CD27⁺

4.1. Rescate de la apoptosis y proliferación de linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ seleccionados

Los linfocitos B CD19⁺ purificados mueren por apoptosis en cultivo sin estimular [Husain *et al.* 2006]. Después de 3 días de cultivo, se analizó la apoptosis en linfocitos B vírgenes CD19⁺CD27⁻ (abreviado CD27⁻) y de memoria CD19⁺CD27⁺ (abreviado CD27⁺) seleccionados mediante citometría en función de la expresión del antígeno CD27. La apoptosis espontánea fue mayor en los linfocitos B CD27⁺ que en los CD27⁻ (mediana de los % de linfocitos B CD27⁺ apoptóticos: 79.2 %, RIC: 57.6-85.1 % vs. mediana de los % de linfocitos B CD27⁻ apoptóticos: 57.6 %, RIC: 47.4-64.4 %, $p < 0.001$) (Figura 22, panel A).

La activación rescata a los linfocitos B CD19⁺ purificados de la apoptosis. La efectividad del rescate depende del estímulo usado y de la subpoblación de linfocitos B estudiada (Figura 22, panel B).

4.1.1. Efecto de la estimulación a través del BCR, TLR-9 o CD40 en controles sanos.

El estímulo que mejor rescató de la apoptosis a los linfocitos B CD27⁻ fue anti-CD40 seguido de ODN y anti-IgM. Sin embargo, ODN fue el estímulo que mejor rescató de la apoptosis a los linfocitos B CD27⁺ (Figura 22, panel B). En cualquier caso, todos los estímulos evaluados fueron más eficientes en los linfocitos B CD27⁻ que en los CD27⁺: anti-CD40 (mediana de los % de linfocitos B CD27⁻ rescatados tras activación: 77.9 %, RIC: 67.5-86.6 % vs. mediana de los % de

linfocitos B CD27⁺ rescatados tras activación: 23.9%, RIC: 8.1-42.7 %, p<0.001), ODN (71.4 %, RIC: 63.5-76.9 % vs. 57.3 %, RIC: 33.5-71.2 %, p<0.01) y anti-IgM (52.7 %, RIC: 42.9-57.1 % vs. 36.9 %, RIC: 23.8-47.3 %, p<0.01) (Figura 22, panel B).

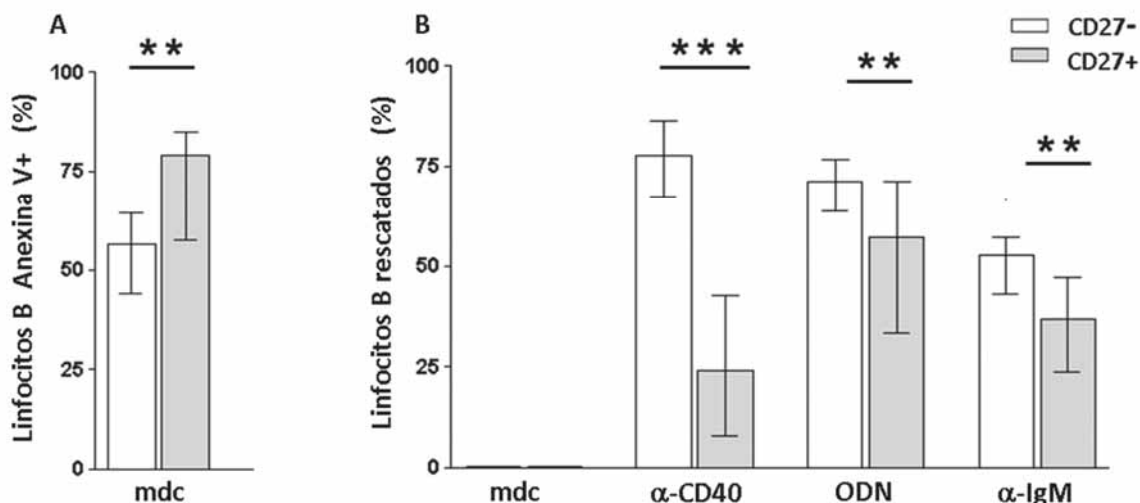


Figura 22. Apoptosis espontánea y rescate de la apoptosis inducido por activación en linfocitos B de controles sanos. (A) Porcentajes de apoptosis en linfocitos B CD27⁻ (blanco) y CD27⁺ (gris) sin estimular. (B) Porcentajes de linfocitos B CD27⁻ y CD27⁺ rescatados de la apoptosis tras activación con anti-CD40, ODN y anti-IgM. Las barras representan las medianas y el RIC de 22 experimentos independientes. mdc: medio de cultivo. **p<0.01, ***p<0.001.

La proliferación se evaluó paralelamente y se tuvo en cuenta para la interpretación de los resultados. Anti-CD40 y anti-IgM no indujeron proliferación ni en los linfocitos B CD27⁻ ni en los CD27⁺, mientras que ODN fue capaz de inducir la proliferación de ambas subpoblaciones (Tabla 4). Aunque los índices de proliferación fueron menores en los linfocitos B CD27⁻ que en los CD27⁺ cuando se estimularon con ODN (mediana de los índices de proliferación en linfocitos B CD27⁻ activados: 0.1, RIC: 0.1-0.2 IP vs. mediana de los índices de proliferación en linfocitos B CD27⁺ activados 1.8, RIC: 1.2-

2.5 IP, $p < 0.001$), el rescate de la apoptosis inducido por éste fue mayor en los CD27⁻ (Tabla 4 y Figura 22, panel B). Estos resultados sugieren que la proliferación y el rescate de la apoptosis son dos procesos independientes.

Tabla 4. Proliferación de las subpoblaciones de linfocitos B.

	Linfocitos B CD27 ⁻		valor p	Linfocitos B CD27 ⁺		valor p	Valor p Linfocitos B CD27 ⁻ vs. CD27 ⁺	
	solo	+ IL-21		solo	+ IL-21		solo	+ IL-21
α-IgM	0.0	0.0	n.s.	0.0	0.0	n.s.	n.s.	n.s.
α-CD40	0.0	0.4	##	0.0	1.0	##	n.s.	***
ODN	0.1	0.2	##	1.8	1.1	##	***	***

Medianas de los índices de proliferación de linfocitos B CD27⁻ y CD27⁺ tras activación con anti-IgM, anti-CD40 u ODN en solitario o combinados con IL-21. Los valores p del test Wilcoxon (## $p < 0.01$ y ### $p < 0.001$) en la cuadrícula izquierda, y del test Mann-Whitney (*** $p < 0.001$) en la derecha, evalúan el efecto de la IL-21 sobre cada estímulo y las diferencias entre subpoblaciones B, respectivamente, de 19 experimentos independientes. n.s.: no significativo.

4.1.2. Efecto de la estimulación a través del BCR, TLR-9 o CD40 en pacientes con IVC.

El rescate de la apoptosis tras activación con anti-CD40 en los linfocitos B CD27⁻ de pacientes con IVC del grupo MB0 fue inferior que en controles y pacientes del grupo MB1, aunque las diferencias solo llegaron a ser estadísticamente significativas en el primer caso (mediana de los % de linfocitos B rescatados tras activación en pacientes MB0: 65.4 %, RIC: 50.7-70.6 % vs. mediana de los % de linfocitos B rescatados tras activación en controles: 77.9 %, RIC: 67.5-86.6 %, $p < 0.05$), (Figura 23 y Figura 24, panel A).

Al activar con ODN, los linfocitos B CD27⁻ del grupo MB0 también fueron menos sensibles al rescate de la apoptosis que

los de controles y pacientes del grupo MB1, aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas (58.8 %, RIC: 34.9-71.0 % vs. 71.4 %, RIC: 63.5-76.9 % y 63.0 %, RIC: 50.3-68.5 % respectivamente, $p=0.075$) (Figura 23 y Figura 24, panel A). Los linfocitos B CD27⁻ del grupo MB1 de pacientes con IVC fueron rescatados de la apoptosis de manera similar a los de controles independientemente del estímulo usado. Tras activación con anti-IgM, los linfocitos B CD27⁻ de ambos grupos de pacientes fueron rescatados de la apoptosis igual que en los controles (Figura 23 y Figura 24, panel A).

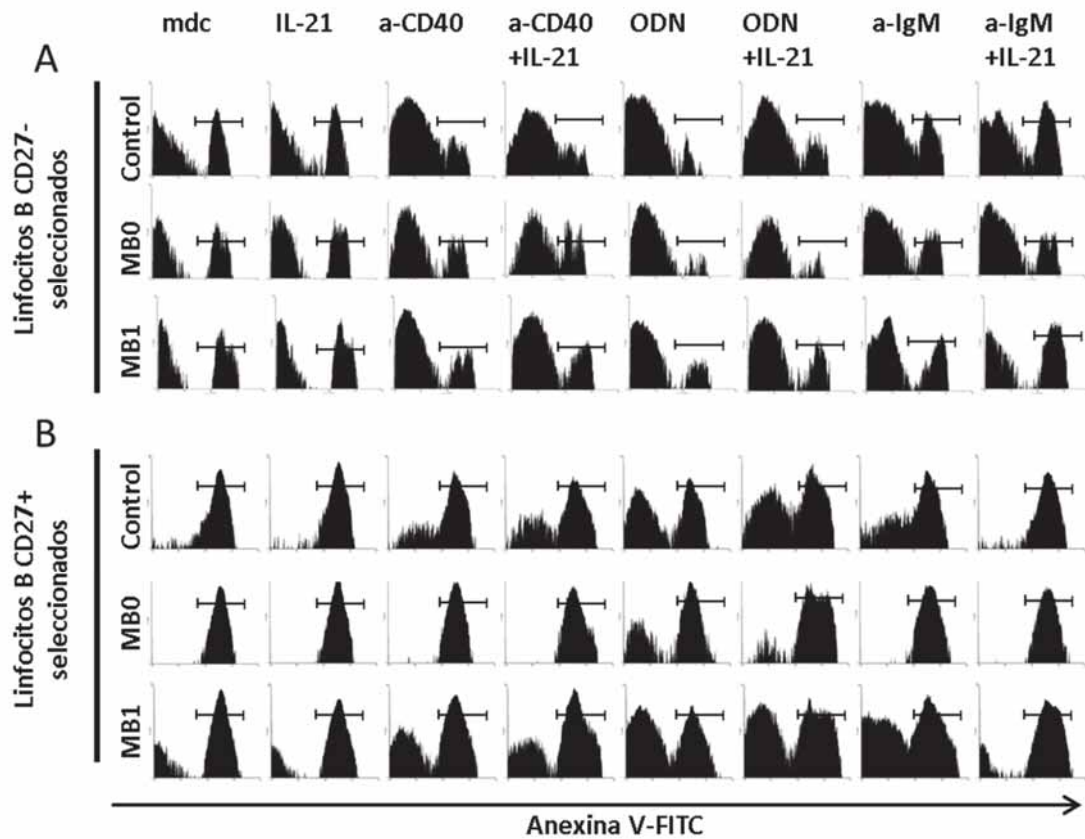


Figura 23. Apoptosis espontánea y tras activación en linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC. Las líneas horizontales en los histogramas diferencian a los linfocitos B CD27⁻ (A) y CD27⁺ (B) apoptóticos (Anexina V⁺) de los viables (Anexina V⁻) tras activación con IL-21, anti-CD40, ODN y anti-IgM individualmente o en combinación, en un control (filas superiores) y un paciente del grupo MB0 (filas centrales) o MB1 (filas inferiores) de un experimento representativo. mdc: medio de cultivo.

Los linfocitos B CD27⁺ de los pacientes con IVC del grupo MB0 activados tanto con anti-CD40 como con ODN fueron menos sensibles al rescate de apoptosis que los de los controles (6.0 %, RIC: 2.8-13.6 % vs. 23.9 %, RIC: 8.1-42.7 %, p<0.01 y 23.2 %, RIC: 2.6-62.1 % vs. 57.3%, RIC: 33.5-71.2 % respectivamente, p<0.05) y pacientes del grupo MB1 (6.0 %, RIC: 2.8-13.6 % vs. 30.6 %, RIC: 17.6-43.6 %, p<0.001 y 23.2 %, RIC: 2.6-62.1 % vs. 65.7%, RIC: 32.2-80.0 % respectivamente, p<0.01) (Figura 23 y figura 24, panel B). El rescate de la apoptosis en linfocitos B CD27⁺ tras activación con anti-IgM, también fue inferior en el grupo MB0 respecto a los controles (19.2 %, RIC: 15.4-26.8 % vs. 36.9%, RIC: 23.8-47.3 %, p<0.05) y pacientes del grupo MB1 (19.2 %, RIC: 15.4-26.8 % vs. 38.2%, RIC: 25.0-64.8 %, p<0.01) (Figura 23 y Figura 24, panel B).

Los linfocitos B CD27⁺ de pacientes del grupo MB1 fueron rescatados de la apoptosis igual que los controles tras ser activados con cualquiera de los estímulos utilizados (Figura 24, panel B). Por tanto, únicamente los linfocitos B CD27⁺ de pacientes con IVC del grupo MB0 fueron siempre más resistentes al rescate de la apoptosis independientemente del estímulo utilizado.

Estos resultados no son la consecuencia de diferencias en la proliferación, ya que tanto los linfocitos B CD27⁺ como los CD27⁻ de los pacientes con IVC del grupo MB0 proliferaron de manera similar a los de los pacientes del grupo MB1 y controles (Figura 24, paneles C y D).

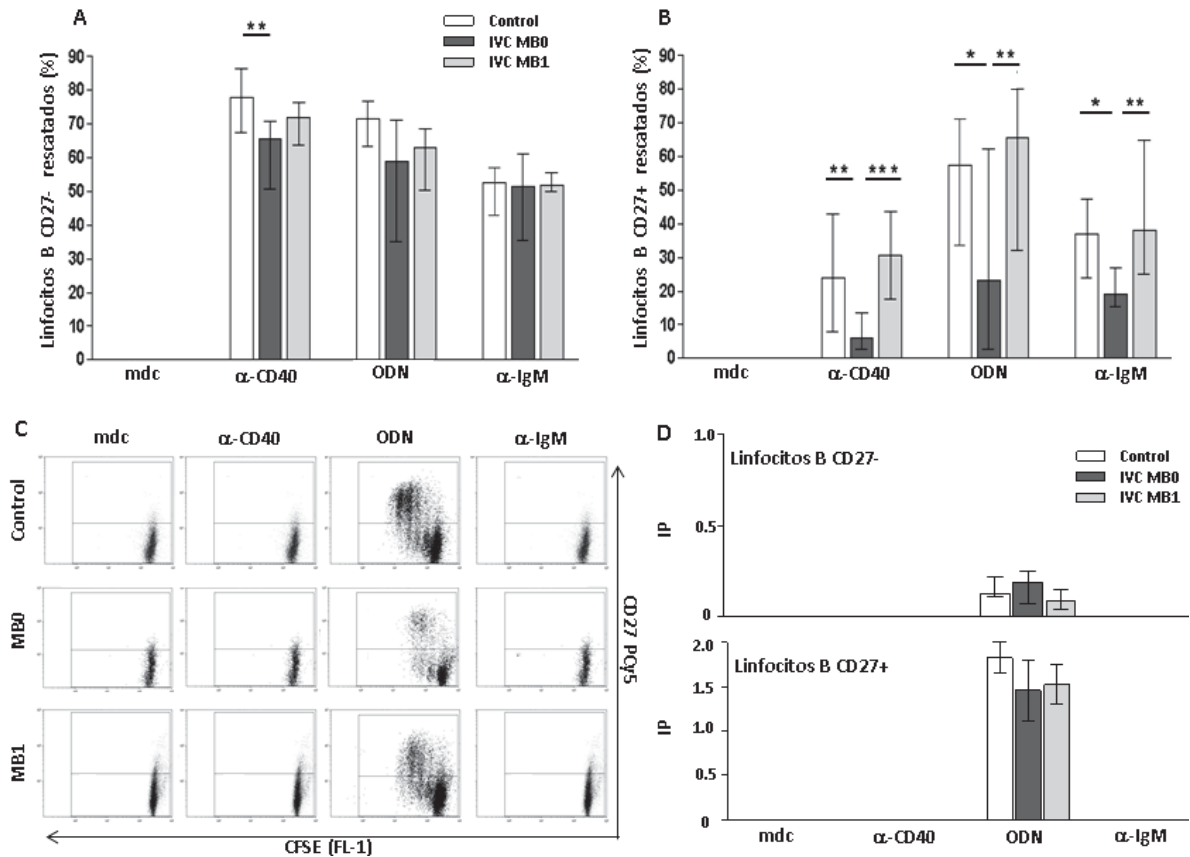


Figura 24. Rescate de la apoptosis y proliferación inducidos por activación en linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC. Porcentajes de linfocitos B CD27⁻ (A) y CD27⁺ (B) rescatados de la apoptosis, tras activación con anti-CD40, ODN o anti-IgM, en controles (n=22), pacientes MB0 (n=12) y MB1 (n=8). (C) Proliferación tras activación en linfocitos B CD27⁻ (cuadrantes inferiores) y CD27⁺ (cuadrantes superiores) de un control (fila superior) y un paciente MB0 (fila central) o MB1 (fila inferior) de un ejemplo representativo. (D) Índices de proliferación tras activación en linfocitos B CD27⁻ (panel superior) y CD27⁺ (panel inferior) de controles (n=19), pacientes MB0 (n=8) y MB1 (n=6). Las barras representan las medianas y el RIC en controles (blanco), pacientes MB0 (gris oscuro) y MB1 (gris claro). mdc: medio de cultivo. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4.1.3. Efecto de la coestimulación con IL-21 en controles sanos.

La IL-21 por si sola fue capaz de rescatar a los linfocitos B CD27⁻ (16.9 %, RIC: 1.3-33.0 %) pero no a los CD27⁺ de la apoptosis espontánea (Figura 25, paneles A y B). A pesar de

ello, en los linfocitos B CD27⁻, la adición de IL-21 moduló negativamente el efecto protector de anti-CD40 (mediana de los % de linfocitos B rescatados tras activación con el estímulo simple: 77.9 %, RIC: 67.5-86.6 % vs. mediana de los % de linfocitos B rescatados tras coestimulación con IL-21: 75.9 %, RIC: 46.5-80.1 % p<0.01) y de ODN (71.4 %, RIC: 63.5-76.9 % vs. 42.7 %, RIC: 25.8-58.1 %, p<0.001) (Figura 25, panel A). En los linfocitos B CD27⁺, la IL-21 redujo el rescate de la apoptosis inducido por ODN (aunque de forma no significativa) y al contrario, incrementó significativamente el efecto protector de anti-CD40 (23.9 %, RIC: 8.1-42.7% vs. 42.8 %, RIC: 26.3-55.7 %, p<0.05) (Figura 25, panel B). La IL-21 no solo revertió el efecto protector de anti-IgM tanto en los linfocitos B CD27⁻ como CD27⁺ sino que, en algunos casos, incluso incrementó el nivel de apoptosis por encima de los valores de apoptosis espontánea (dispersión de puntos en Figura 25).

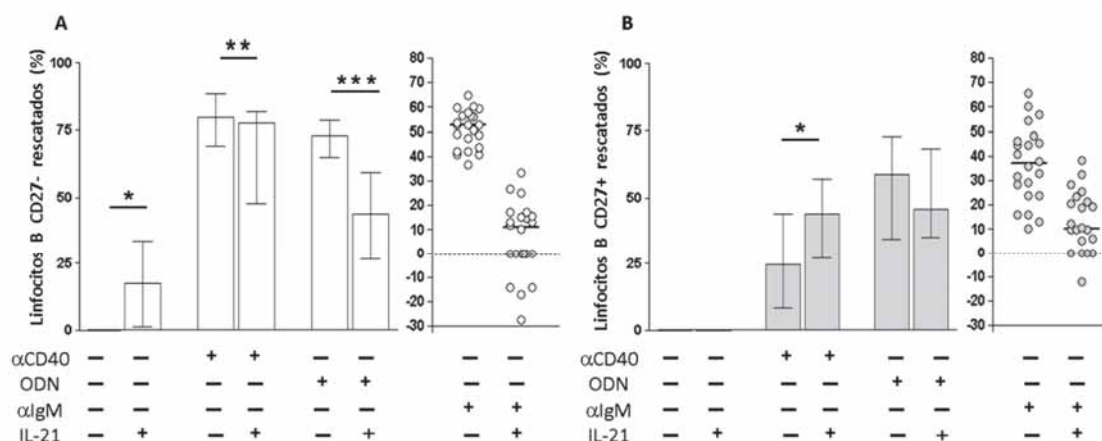


Figura 25. Efecto de la IL-21 sobre la apoptosis espontánea y el rescate de la apoptosis tras activación en linfocitos B de controles sanos. Porcentajes de linfocitos B CD27⁻ (A) y CD27⁺ (B) rescatados de la apoptosis espontánea tras activación con IL-21 en solitario, con anti-CD40 u ODN individualmente y en combinación con IL-21 (barras) o con anti-IgM individualmente y en combinación con IL-21 (círculos). Los datos se expresan como las medianas ± el RIC de 22 cultivos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

La IL-21 modula la proliferación en linfocitos B CD27⁻ y CD27⁺ estimulados. Este efecto debe ser tenido en cuenta al analizar las tasas de apoptosis. Ni los linfocitos B CD27⁻ ni los CD27⁺ proliferaron en respuesta a anti-IgM con IL-21. Ambas subpoblaciones proliferaron en respuesta a anti-CD40 con IL-21 y a ODN en solitario, aunque el índice de proliferación fue mayor en los linfocitos B CD27⁺ en ambos casos. La IL-21 moduló positivamente la proliferación inducida por ODN en linfocitos B CD27⁻ y al contrario, la disminuyó en los CD27⁺ (Tabla 4).

La reducción del rescate de la apoptosis inducida por IL-21 en los linfocitos B CD27⁺ activados con ODN se acompaña de una disminución en la proliferación. Al contrario, el incremento del rescate de la apoptosis en linfocitos B CD27⁺ activados con anti-CD40 va acompañado de un aumento en la proliferación (Figura 25, panel B y Tabla 4). La disminución del rescate de la apoptosis tras coestimulación con IL-21 en linfocitos B CD27⁻ activados con anti-CD40 o con ODN no va acompañada de una reducción en la proliferación (Figura 25, panel A y Tabla 4). Además, a pesar de que la IL-21 indujo una mayor proliferación en los linfocitos B CD27⁺ activados con anti-CD40 o con ODN respecto a los CD27⁻ activados de la misma forma (Tabla 4), el rescate de la apoptosis nunca fue mayor en los linfocitos B CD27⁺ para ninguno de los estímulos (Figura 25). Por tanto, aunque no podemos descartar que el efecto de la IL-21 sobre la apoptosis esté ligado a la proliferación, nuestros resultados apoyan la independencia de ambos procesos.

4.1.4. Efecto de la coestimulación con IL-21 en pacientes con IVC.

La IL-21 por si sola rescató a los linfocitos B CD27⁻ de pacientes con IVC del grupo MB0 igual que a los del grupo MB1 y controles (Figura 23 y Figura 26, panel A). Los linfocitos B CD27⁻ de pacientes con IVC del grupo MB0 fueron menos sensibles al rescate de la apoptosis inducido por anti-CD40 u ODN combinados con IL-21 que los del grupo MB1 y controles, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 26, panel A). Los linfocitos CD27⁺ de pacientes con IVC del grupo MB0 fueron menos sensibles al rescate de la apoptosis que los de controles cuando se estimularon con anti-CD40 e IL-21 (mediana de los % de linfocitos B rescatados tras coestimulación en pacientes: 17.6 %, RIC: 5.1-25.8 % vs. mediana de los % de linfocitos B rescatados tras coestimulación en controles: 42.8 %, RIC: 26.3-55.7 %, p<0.001) o con ODN e IL-21 (21.9 %, RIC: 8.3-53.5 % vs. 44.4 %, RIC: 34.2-66.6 %, p<0.05), y que los del grupo MB1 estimulados de igual forma (17.6 %, RIC: 5.1-25.8 % vs. 35.8 %, RIC: 15.5-67.5 %, p<0.01 y 21.9 %, RIC: 8.3-53.5 % vs. 62.5 %, RIC: 33.4-76.7 %, p<0.01) (Figura 26, panel B). El rescate de la apoptosis en linfocitos B CD27⁻ y CD27⁺ activados con anti-IgM e IL-21 fue similar en controles y pacientes (dispersión de puntos en Figura 26, paneles A y B).

Los linfocitos B CD27⁻ y CD27⁺ de pacientes del grupo MB1 fueron rescatados de la apoptosis de manera similar a los controles tras coestimulación con IL-21 (Figura 26, paneles A y B). Por tanto, únicamente los linfocitos B CD27⁺ de pacientes con IVC del grupo MB0 fueron más resistentes al rescate de la apoptosis independientemente de la coestimulación con IL-21.

Al evaluar la proliferación no hallamos diferencias entre pacientes y controles. De nuevo, las diferentes tasas de apoptosis entre linfocitos B CD27⁺ de pacientes con IVC del grupo MB0 y controles no son atribuibles a diferencias en los índices de proliferación (Figura 26, paneles C y D).

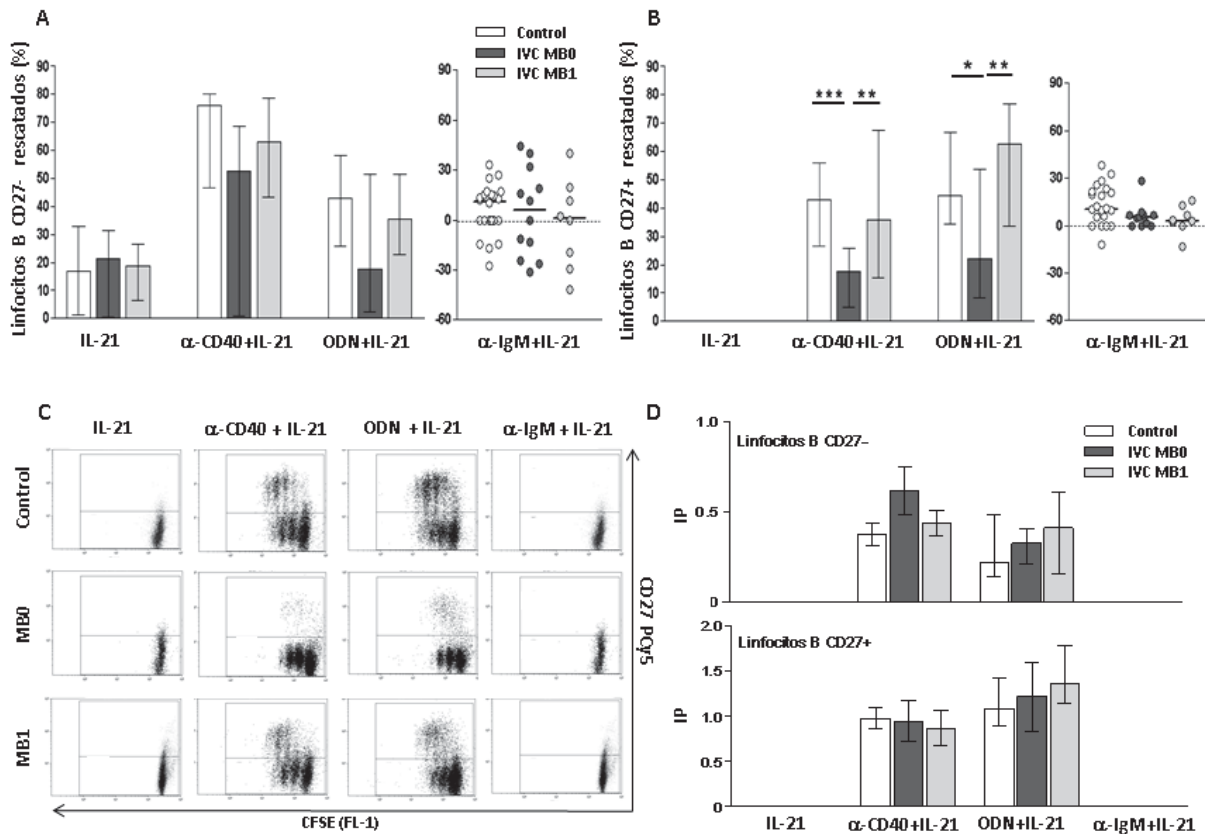


Figura 26. Efecto de la IL-21 sobre el rescate de la apoptosis y proliferación inducido por activación en linfocitos B de controles sanos y pacientes con IVC. Porcentajes de linfocitos B CD27⁻ (A) y CD27⁺ (B) rescatados de la apoptosis tras activación con IL-21 en solitario o en combinación con anti-CD40 u ODN (barras) o con anti-IgM (círculos), en controles (n=22), pacientes MB0 (n=12) y MB1 (n=8). (C) Proliferación tras activación en linfocitos B CD27⁻ (cuadrantes inferiores) y CD27⁺ (cuadrantes superiores) de un control (fila superior) y un paciente MB0 (fila central) o MB1 (fila inferior) de un ejemplo representativo. (D) Índices de proliferación tras activación en linfocitos B CD27⁻ (panel superior) y CD27⁺ (panel inferior) de controles (n=19), pacientes MB0 (n=8) y MB1 (n=6). Los datos se expresan como las medianas ± el RIC en controles (blanco), pacientes MB0 (gris oscuro) y MB1 (gris claro). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

4.2. Rescate de la apoptosis y proliferación en linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados

Al analizar el rescate de la apoptosis inducido por la activación en linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados (histogramas en Figura 27, paneles A y B) se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en linfocitos B CD27⁻ y CD27⁺ seleccionados en cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados (Figura 23), independientemente del estímulo. Además, ninguno de los estímulos indujo la expresión del antígeno CD27 en linfocitos B CD19⁺CD27⁻ cultivados aisladamente (diagramas de puntos en Figura 27, panel A), lo cual valida la estrategia de selección de subpoblaciones por citometría en los cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados.

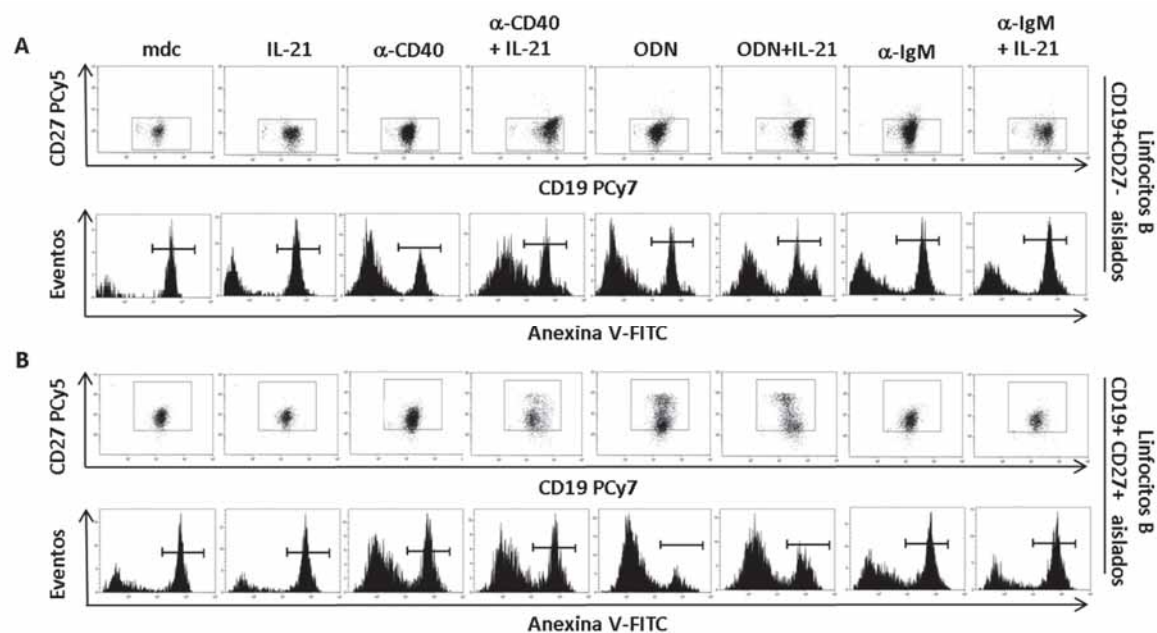


Figura 27. Apoptosis espontánea y tras activación en linfocitos B CD19⁺CD27⁻ y CD19⁺CD27⁺ aislados de controles sanos. Las líneas horizontales en los histogramas diferencian los linfocitos B CD19⁺CD27⁻ (A) y CD19⁺CD27⁺ (B) apoptóticos (Anexina V⁺) y viables (Anexina V⁻), tras activación con IL-21, anti-CD40, ODN y anti-IgM individualmente o en combinación. Los diagramas de puntos representan la expresión de CD27 en linfocitos B CD19⁺CD27⁻ (A) y CD19⁺CD27⁺ (B) activados con los diferentes estímulos tras descartar las células necróticas (IoP⁺). Los histogramas y diagramas de puntos son representativos de 3 experimentos independientes. mdc: medio de cultivo.

Al analizar la proliferación individualmente en linfocitos B $CD19^+CD27^-$ y $CD19^+CD27^+$ aislados (Figura 28), su respuesta a todos los estímulos fue igual que al valorarla en cultivos de linfocitos B $CD19^+$ purificados (Tabla 4).

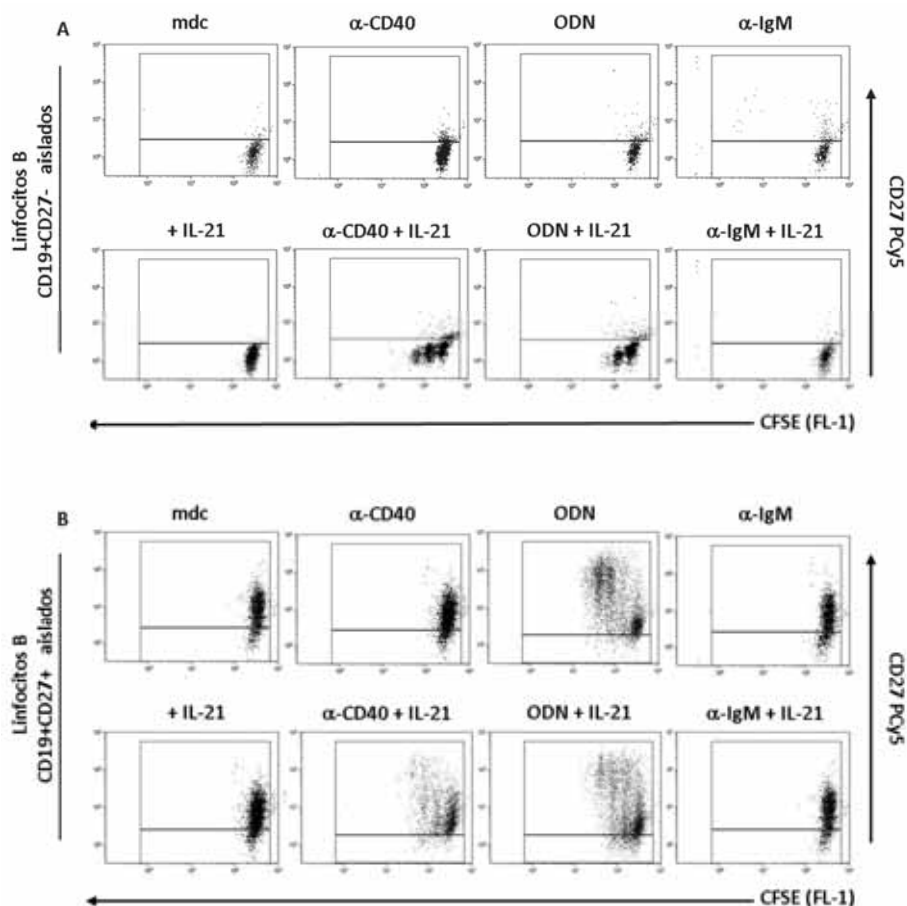


Figura 28. Proliferación tras activación en linfocitos B $CD19^+CD27^-$ y $CD19^+CD27^+$ aislados de controles sanos. Los diagramas de puntos representan la dilución de CFSE y la expresión de CD27 en linfocitos B $CD19^+CD27^-$ (A) y $CD19^+CD27^+$ (B) aislados tras activación con anti-CD40, ODN y anti-IgM en solitario (filas superiores) o con IL-21 (filas inferiores). Los diagramas de puntos son representativos de 3 experimentos independientes. mdc: medio de cultivo.

Estos datos descartan la existencia de interferencias entre las distintas subpoblaciones de linfocitos B $CD19^+CD27^-$ y $CD19^+CD27^+$ que pudieran afectar a la interpretación de resultados al cultivarlas conjuntamente.

4.3. Expresión de TRAIL

Los linfocitos B $CD19^+CD27^-$ de pacientes con IVC del grupo MB0 mostraron niveles de expresión de TRAIL similares a los de controles y pacientes del grupo MB1 (Figura 29). Sin embargo, los niveles de expresión de TRAIL en los linfocitos B $CD19^+CD27^+$ de pacientes con IVC del grupo MB0 fueron superiores a los de controles (mediana de las MFI de TRAIL en linfocitos B $CD19^+CD27^+$ de pacientes; 2.8 MFI, RIC: 2.1-4.6 MFI vs. mediana de las MFI de TRAIL en linfocitos B $CD19^+CD27^+$ de controles; 1.6 MFI, RIC: 1.3-1.9 MFI, $p < 0.001$) y a los de pacientes del grupo MB1 (2.8 MFI, RIC: 2.1-4.6 MFI vs. 1.7 MFI, RIC: 1.4-2.1 MFI, $p < 0.001$). No encontramos diferencias en la expresión de TRAIL entre los linfocitos B $CD19^+CD27^+$ de pacientes con IVC del grupo MB1 y los del grupo control (Figura 29).

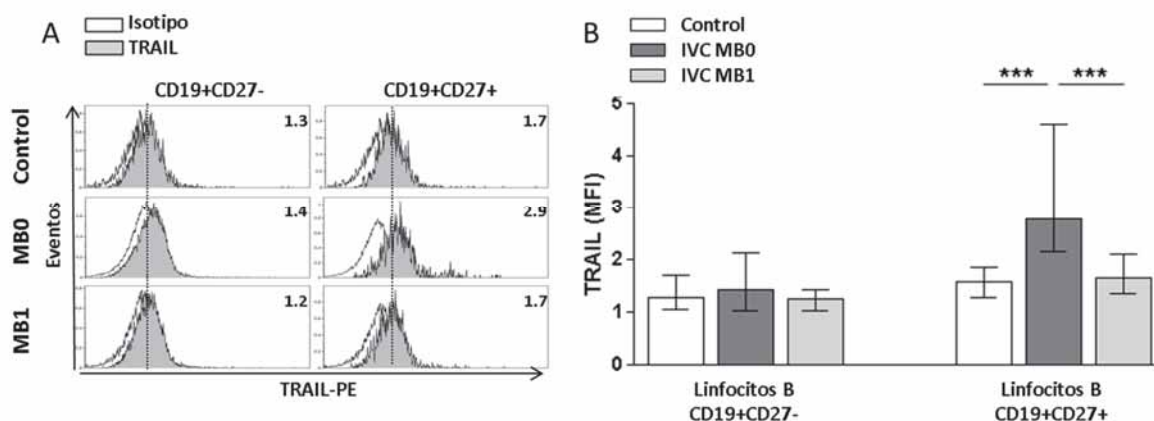


Figura 29. Expresión de TRAIL en subpoblaciones de linfocitos B de sangre periférica de controles sanos y pacientes con IVC. (A) Ejemplo representativo de la expresión de TRAIL (histograma gris) en linfocitos B $CD19^+CD27^-$ (columna izquierda) y $CD19^+CD27^+$ (columna derecha) de sangre periférica de un control (fila superior), un paciente del grupo MB0 (fila central) o MB1 (fila inferior). Los números indican la MFI de TRAIL y los histogramas blancos el control de isotipo. (B) Las barras representan la mediana y el RIC de las MFI de TRAIL de 18 controles (blanco), 9 pacientes del grupo MB0 (gris oscuro) y 6 MB1 (gris claro). *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La Inmunodeficiencia Variable Común se caracteriza por hipogammaglobulinemia, infecciones recurrentes sinopulmonares (causadas mayoritariamente por los patógenos capsulados *S. pneumoniae* y *H. influenzae*) o gastrointestinales y respuesta de anticuerpos defectuosa frente a vacunas proteicas y/o polisacarídicas. También es frecuente la presencia de patología autoinmunitaria, enfermedad granulomatosa y neoplasia. A pesar de que en la IVC se han descrito múltiples alteraciones del sistema inmunitario, su causa sigue siendo desconocida. La anómala distribución de las subpoblaciones de linfocitos B de memoria y la disminución de la producción de anticuerpos en los pacientes sugieren la existencia de uno o varios defectos, aún por descubrir, en el proceso de diferenciación del linfocito B.

Activación del linfocito B

En el presente trabajo nos propusimos estudiar la integridad de distintos mecanismos necesarios para la correcta diferenciación del linfocito B en un grupo de 27 pacientes con IVC. En primer lugar, analizamos los mecanismos de activación de los linfocitos B en dichos pacientes evaluando la inducción de expresión de la molécula coestimuladora CD86 (esencial en la colaboración T-B) y la proliferación celular, en respuesta a ligandos específicos de TLRs: ODN (ligando sintético de TLR-9) y extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* (ligandos de TLR-2, TLR-4 y TLR-9). La activación de los linfocitos B a través de los TLRs es crucial en las respuestas humorales rápidas, independientes del linfocito T. Además, los TLRs contribuyen a las

respuestas dependientes del linfocito T, favoreciendo la colaboración T-B necesaria para producirlas.

Publicaciones recientes han investigado las respuestas mediadas por TLR-9 en linfocitos B de pacientes con IVC, describiéndose defectos de señalización. Cunningham-Rundles *et al.* observaron una baja inducción de la expresión de CD86 y de la producción de IL-6 e IL-10 en respuesta a ODN, en linfocitos B de pacientes. El defecto no correlacionó con el número de linfocitos B de memoria en los pacientes y no se hallaron mutaciones en el gen que codifica TLR-9 [Cunningham-Rundles *et al.* 2006]. Yu *et al.* demostraron que linfocitos B purificados de pacientes con IVC proliferaban menos que los de controles sanos tras estimulación con ligandos de TLR-7. Sin embargo, no se evaluó la respuesta a ligandos de TLR-9 [Yu *et al.* 2009]. Los linfocitos B de nuestra cohorte de pacientes con IVC mostraron además baja inducción de la expresión de CD86 al ser estimulados con ODN en combinación con anti-IgM.

Nuestros resultados indican deficiencias en la señalización a través de TLR-9 o un defecto en la inducción de expresión de TLR-9 al activar el BCR. Los linfocitos B vírgenes humanos expresan bajos niveles de TLRs, que aumentan tras estimularlos a través de BCR [Bernasconi *et al.* 2003]. La señalización mediada por TLR-9 no depende del BCR aunque ambos receptores actúen de forma sinérgica. La unión del antígeno al BCR induce el reclutamiento de TLR-9 hacia los autofagosomas, donde la colocalización con los complejos BCR/antígeno internalizados, facilita la interacción con sus ligandos específicos [Chaturvedi *et al.* 2008]. Este mecanismo explica el sinergismo entre receptores que median en la

inmunidad innata y adaptativa. Nuestros resultados no permiten descartar que este proceso esté también alterado en los pacientes con IVC.

Los defectos descritos se confirman y extienden a otros antígenos microbianos. En nuestra opinión, la estimulación con los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* reproduce mejor que ODN las condiciones de estimulación fisiológicas que se producen durante las infecciones. Dada la tendencia a la autólisis de algunas bacterias *in vivo* [Wang *et al.* 2002], se expondrían varios ligandos de TLRs, simultánea o secuencialmente, al sistema inmune del huésped. Los linfocitos B de pacientes con IVC no respondieron óptimamente a los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* usados aisladamente o en combinación con anti-IgM. Al ser dichas bacterias los patógenos que más comúnmente se aíslan en las infecciones de vías respiratorias de pacientes con IVC, nuestros resultados podrían explicar la baja respuesta de los pacientes a la vacunación frente a *S. pneumoniae* y *H. influenzae* y su mayor susceptibilidad a padecer infecciones respiratorias por estos patógenos.

La respuesta inmune innata frente a *S. pneumoniae* depende de la señalización a través de TLRs, preferentemente TLR-2 y TLR-4, que reconocen lipopéptidos y neumolisina del patógeno, respectivamente [Branger *et al.* 2004 y Malley *et al.* 2003]. TLR-9 juega un papel protector importante en fases tempranas de la infección pulmonar por *S. pneumoniae* [Albiger *et al.* 2007]. *S. pneumoniae* vivo activa la transcripción del NF- κ B y la secreción de IL-8 en líneas celulares 293 embrionarias de riñón humanas induciendo la sobreexpresión de TLR-2 y TLR-9.

H. influenzae induce la expresión de TLR-2 y TLR-4 en dichas células. Estos resultados fueron confirmados con cultivos de células mononucleadas periféricas humanas y los mismos autores demostraron que el ADN genómico purificado de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* fue también capaz de señalar a través de TLR-9 [Mogensen *et al.* 2006]. El hecho de que en nuestros cultivos de células mononucleadas el extracto de *H. influenzae* fuera un estímulo más eficiente que el extracto de *S. pneumoniae* puede atribuirse a la estimulación a través de otros TLRs distintos de TLR-9.

Los TLRs juegan un papel en la respuesta a la vacunación que debe tenerse en cuenta al evaluar la eficacia de la inmunización. Entre los polisacáridos de *S. pneumoniae* incluidos en las vacunas, hay agonistas de TLRs esenciales por su capacidad para inducir la producción de anticuerpos. La vacuna comercial de 23 polisacáridos (Pneumovax 23) contiene ligandos de TLR-2 y TLR-4 importantes para la respuesta antipolisacarídica en ratones [Sen *et al.* 2005] y la inclusión de ODN mejora su respuesta a la vacuna conjugada contra *S. pneumoniae* [Sen *et al.* 2006]. Por tanto, creemos que la deficiente respuesta a la vacunación en los pacientes con IVC puede ser debida no solo a la falta de respuesta frente a antígenos polisacarídicos o proteicos, sino también a una respuesta deficiente frente a ligandos de TLRs presentes en las preparaciones de las vacunas.

El efecto de los ligandos de TLRs en el linfocito B puede ser directo, a través de sus propios TLRs, o indirecto, a través de la producción de ILs por otros tipos celulares (por ejemplo monocitos o células dendríticas) que también reconocen dichos ligandos. El estudio de la activación del

linfocito B en nuestra cohorte de pacientes con IVC fue realizado en cultivos de células mononucleadas y no de linfocitos B purificados. Aunque no podemos descartar la influencia de otras células presentes en el cultivo, varios factores apuntan a un defecto intrínseco del linfocito B. Primero, los resultados se evaluaron directamente en linfocitos B analizando linfocitos CD19⁺ previamente seleccionadas. Segundo, los linfocitos T de la misma cohorte de pacientes preservaron la capacidad de colaboración con el linfocito B [Pons *et al.* 2006]. Finalmente, el hecho de que los monocitos de dichos pacientes respondieran óptimamente a los extractos bacterianos, tanto en lo que se refiere a la inducción de la expresión de moléculas coestimuladoras como a la producción de ILs [Escobar *et al.* 2007], no apoya la hipótesis de que un mecanismo indirecto sea el responsable de las deficiencias de los linfocitos B observadas en los pacientes con IVC.

En resumen, los resultados del estudio de los mecanismos de activación del linfocito B demuestran que los linfocitos B de los pacientes con IVC son deficientes en su respuesta al ligando de TLR-9 (ODN) y también a los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. Concretamente se observa: (i) baja inducción de expresión de CD86 tras estimulación con ODN, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* combinados con anti-IgM y (ii) proliferación disminuida tras estimulación con *S. pneumoniae* y *H. influenzae* de forma individual o combinados con anti-IgM. Estas deficiencias pueden contribuir a la hipogammaglobulinemia y a la baja respuesta a las vacunas que caracteriza a los pacientes.

Diferenciación del linfocito B y producción de inmunoglobulinas.

Varias inmunodeficiencias están relacionadas con defectos de clases de Igs concretas, como por ejemplo: la deficiencia selectiva de IgA [Hammarstrom *et al.* 2000], la deficiencia de subclases de IgG [Jefferis *et al.* 1990 y Smith *et al.* 1992] o los síndromes de hiper-IgM [Durandy *et al.* 2005]. Los pacientes con IVC tienen niveles séricos de IgG reducidos, así como de IgA y/o IgM, y padecen infecciones sinopulmonares recurrentes [Hammarstrom *et al.* 2000, Di Renzo *et al.* 2004 y Cunningham-Rundles *et al.* 2005].

El cambio de clase de Ig es crucial en la diferenciación del linfocito B y la generación de una respuesta inmunitaria humoral competente. Cada clase de Ig se relaciona con una respuesta inmunitaria concreta a determinados patógenos que se genera después de la exposición al antígeno específico [Snapper *et al.* 1993, Jefferis *et al.* 1990 y Smith *et al.* 1992]. El cambio de clase de Ig tras el reconocimiento del antígeno por el linfocito B requiere dos señales adicionales: una señal coestimuladora de la célula T CD4⁺ (por ejemplo el CD40L) y la colaboración de ILs. La IL-4, IL-10, IL-13, IL-21 o el TGF- β , son factores inductores del cambio de clase de Ig necesario para la producción de IgG, IgA e IgE por linfocitos B activados. La IL-21 es una de las ILs más importantes en la diferenciación del linfocito B hacia célula plasmática productora de anticuerpos. Sin embargo, sigue siendo controvertido el papel de cada IL en la producción de las distintas clases de Igs. Por otro lado, estímulos como ODN pueden inducir cambio de clase de Ig, diferenciación hacia célula plasmática y producción de Igs en linfocitos B [Landers *et al.* 2005, Huggins *et al.* 2007 y Hanten *et al.*

2008]. Dicho efecto puede ser modulado estimulando a través del BCR [Rui *et al.* 2003 y Henn *et al.* 2009].

Para profundizar en el alcance de las alteraciones en los linfocitos B de pacientes con IVC, nos planteamos analizar su diferenciación hacia células plasmáticas y la producción de Igs. Además de la respuesta a ODN, que simula una activación T-independiente, evaluamos también la activación con anti-CD40 e IL-21, como estímulo que simula una activación dependiente del linfocito T. Para evitar la influencia de otras poblaciones celulares presentes en cultivo, realizamos los experimentos en cultivos de linfocitos B CD19⁺ purificados.

Estudios funcionales *in vitro* han demostrado que los linfocitos B de pacientes con IVC pueden experimentar el cambio de clase de Ig y producir anticuerpos si se estimulan con combinaciones de anti-CD40, IL-10 y/o IL-4 [Punnonen *et al.* 1997, Zielen *et al.* 1993, Eisenstein *et al.* 1994 y Salek Farrokhi *et al.* 2013]. Además, en cultivos de células mononucleadas, anti-CD40 con IL-21 e IL-4 también indujeron diferenciación del linfocito B y producción de IgG e IgA en pacientes con IVC o deficiencia de IgA [Borte *et al.* 2009]. Sin embargo, Yu *et al.* describieron una menor producción de IgG e IgA tras estimulación de cultivos de células mononucleadas con ligandos de TLR-7, TLR-7/8 o TLR-9 en pacientes con IVC [Yu *et al.* 2009].

En respuesta a la activación T-dependiente (anti-CD40 e IL-21), los linfocitos B purificados de nuestra cohorte de pacientes con IVC presentaron una diferenciación defectuosa hacia célula plasmática (porcentaje de linfocitos B que

adquieren el marcador CD38) y secretaron niveles reducidos de IgG e IgA en comparación con los controles. El hecho de que la secreción de IgM fuera similar en pacientes y controles sugiere la presencia de algún defecto en la maquinaria molecular que regula el cambio de clase de Ig. Sin embargo, dicha maquinaria debe estar parcialmente activa, ya que incluso en aquellos pacientes con mayor carencia de linfocitos B de memoria, detectamos producción de IgG e IgA por los linfocitos B en cultivo.

La producción de IgG depende tanto del número de células secretoras de anticuerpos presentes en el cultivo como de la tasa de secreción de cada célula. Se ha demostrado que la estimulación con ODN e ILs induce niveles de secreción de manera heterogénea en los linfocitos B. Al contrario, la estimulación con anti-CD40 e IL-21 induce la aparición de una población de linfocitos B con altos niveles de secreción de Igs [Henn *et al.* 2009]. Por ello, comparamos la producción de IgG e IgA inducida por ODN en linfocitos B de pacientes con IVC y controles con la inducida por anti-CD40 e IL-21. La estimulación con ODN fue menos eficiente que anti-CD40 e IL-21 para inducir diferenciación hacia célula plasmática y producción de Igs en linfocitos B, tanto en pacientes como en controles.

La diferenciación hacia célula plasmática tras estimulación con ODN fue inferior en pacientes con IVC que en controles, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. La producción de IgG e IgA fue inferior en los pacientes y la adición de anti-IgM a los cultivos no corrigió las deficiencias. Contrariamente a los resultados obtenidos con anti-CD40 e IL-21, la estimulación con ODN también indujo

menor producción de IgM en linfocitos B de pacientes con IVC (aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas). Ello sugiere un mayor defecto en la vía señalización a través de TLR-9, el cual no estaría restringido al cambio de clase de Ig.

En resumen, nuestros resultados demuestran que (i) la diferenciación de los linfocitos B de pacientes hacia células plasmáticas es inferior a la de controles independientemente del estímulo usado, aunque las diferencias únicamente alcanzan la significación estadística al estimular con anti-CD40 e IL-21 combinados con anti-IgM y (ii) la producción de IgG e IgA por parte de los linfocitos B de pacientes con IVC es siempre inferior, cualquiera que sea el estímulo usado. La coestimulación a través de BCR (anti-IgM) no corrige las deficiencias.

Concluimos que los linfocitos B purificados de pacientes con IVC no se diferencian correctamente hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos y secretan un menor nivel de Igs en comparación a los linfocitos B de controles. Estos resultados apuntan a un defecto generalizado en la vía de señalización tanto T-independiente (TLR-9) como T-dependiente (CD40 e IL-21), que repercute en una producción deficiente de Igs.

Sin embargo, no podemos descartar que la menor producción de Igs sea debida a que los linfocitos B de pacientes sobreviven menos en cultivo tras activación. Alternativamente, al tratarse de un síndrome heterogéneo, distintos mecanismos patogénicos pueden contribuir al defecto B generalizado en los diferentes subgrupos de pacientes. Para evaluar dicha

posibilidad nos planteamos valorar la muerte por apoptosis en linfocitos B de pacientes con IVC subdivididos según su clasificación (MB0, MB1, MB2) en función de la distribución de linfocitos B de memoria [Piqueras *et al.* 2003].

Regulación de la apoptosis en el linfocito B

Las señales de supervivencia, crecimiento y desarrollo son necesarias para la homeostasis del linfocito B y su diferenciación hacia diferentes subpoblaciones efectoras. Estas señales dependen de la naturaleza del antígeno reconocido y de la combinación de estímulos proporcionados por correceptores de membrana y/o ILs secretadas en el compartimento linfoide. La homeostasis del linfocito B es el resultado del balance entre señales apoptóticas y de supervivencia. Los linfocitos B estimulados inadecuadamente mueren por apoptosis. Un incremento de la apoptosis podría comprometer el destino del linfocito B y explicar el desequilibrio homeostático del compartimento B de memoria y la hipogammaglobulinemia de los pacientes con IVC.

Demostramos, mediante cultivos de linfocitos B purificados y activados con anti-CD40, ODN o anti-IgM que los linfocitos B de memoria (CD27⁺) fueron menos sensibles al rescate de la apoptosis que los linfocitos B vírgenes (CD27⁻), independientemente del estímulo utilizado. Los linfocitos B CD27⁻ y, particularmente, los CD27⁺ de los pacientes del grupo MB0 (aquellos con el compartimento B de memoria más comprometido) fueron menos sensibles al rescate de la apoptosis que los del grupo MB1 y controles, cuando se activaron con anti-CD40 u ODN. Además, el rescate de la apoptosis fue independiente de la proliferación. Ello fue

particularmente evidente en el caso de anti-CD40 que, aunque no indujo proliferación, rescató de la apoptosis a la mayoría de los linfocitos B CD27⁻.

El efecto de la IL-21, factor de crecimiento imprescindible para la diferenciación del linfocito B, depende tanto de la subpoblación B estudiada como de los coestímulos acompañantes [Ettinger *et al.* 2008]. En ratón, la IL-21 induce apoptosis e inhibición de la proliferación cuando los linfocitos B son activados a través de TLR-4 y TLR-9 [Jin *et al.* 2004]. Sin embargo, dichas células se activan y reducen los niveles de apoptosis en presencia de IL-21, si se estimulan con anti-IgM (en combinación o no con anti-CD40) pero, al contrario, aumentan la apoptosis si la IL-21 se añade después de preactivarlas únicamente con anti-CD40. En nuestras manos, aunque la IL-21 rescató de la apoptosis espontánea a los linfocitos B CD27⁻, redujo el efecto protector de la mayoría de los estímulos, tanto en los linfocitos B CD27⁻ como CD27⁺. La IL-21 incrementó únicamente el efecto protector del anti-CD40 sobre los linfocitos B CD27⁺. Ello sugiere que la IL-21 *per se* aumenta la supervivencia de los linfocitos B CD27⁻ (mayoritariamente vírgenes y transicionales) y que dicho efecto se va perdiendo a medida que las células se activan. Sin embargo, los linfocitos B CD27⁺ se vuelven sensibles al efecto protector de la IL-21 cuando son preactivados con un estímulo T-dependiente (anti-CD40). La activación a través de BCR o del estímulo T-independiente (ODN) insensibiliza a los linfocitos B CD27⁺ frente al efecto protector de la IL-21. La IL-21 es, pues, clave para una respuesta B productiva. Únicamente los linfocitos B de memoria y de zona marginal (contenidos en la población CD27⁺) que reciben la ayuda de linfocitos T_H afines en presencia de IL-21 serían protegidos

de la apoptosis y podrían proliferar y diferenciarse hacia células secretoras de anticuerpos.

Cuando analizamos el efecto de la coestimulación con IL-21 en el rescate de la apoptosis en linfocitos B de pacientes con IVC activados con anti-CD40 u ODN, los linfocitos B CD27⁺ del grupo MB0 fueron menos sensibles al rescate de la apoptosis que los del grupo MB1 y controles. Por tanto, las diferencias observadas previamente no desaparecieron al añadir IL-21 y tampoco pueden atribuirse a defectos en la proliferación. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la incapacidad de los linfocitos B de los pacientes con IVC del grupo MB0 para producir niveles normales de Igs *in vitro* (e *in vivo*) se debe a su mayor susceptibilidad a morir por apoptosis tras ser activados.

Dicha hipótesis se ve reforzada al analizar la expresión de la molécula proapoptótica TRAIL en linfocitos B de pacientes con IVC. Los linfocitos B CD27⁺ de pacientes con IVC del grupo MB0 expresaron niveles significativamente mayores de TRAIL que los del grupo MB1 y controles. TRAIL es un miembro de la familia del TNF capaz de inducir muerte celular programada en células tumorales. Diferentes subpoblaciones de linfocitos B muestran sensibilidades distintas a la apoptosis mediada por TRAIL. La activación a través de BCR sensibiliza a los linfocitos B de memoria, pero no a los linfocitos B vírgenes de sangre periférica, a la apoptosis mediada por TRAIL [Guerreiro-Cacais *et al.* 2010] y TRAIL induce la muerte de células plasmáticas normales [Ursini-Siegel *et al.* 2002]. En concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado [van Grevenynghe *et al.* 2011] que la supervivencia de los linfocitos B de memoria (identificados como CD19⁺CD27⁺) está

gravemente afectada en pacientes con VIH avirémicos, tratados satisfactoriamente, en comparación a controles sin infección. Los linfocitos B de memoria de dichos pacientes mostraron mayor expresión de TRAIL, que correlacionó negativamente con su presencia en sangre periférica (a pesar de no verse afectada su respuesta proliferativa) y con la producción de Igs.

El incremento de apoptosis en los linfocitos B de pacientes con IVC del grupo MB0 puede ser la causa de que un menor número de células se diferencien hacia células secretoras de anticuerpos tras estimulación, lo cual puede explicar la hipogammaglobulinemia y la baja respuesta humoral frente a antígenos. En el caso de los pacientes con IVC del grupo MB1, un mecanismo diferente debe ser responsable, ya que sus linfocitos B se comportan igual que los de controles sanos en lo que se refiere a la susceptibilidad frente a la apoptosis.

Nuestros resultados apoyan que, en humanos, el efecto neto de diferentes estímulos sobre el linfocito B depende tanto de la subpoblación de linfocitos B estudiada como de su estado de activación. Sugerimos que los niveles aumentados de apoptosis en linfocitos B CD27⁺ de los pacientes con IVC del grupo MB0 durante la respuesta inmune pueden dar lugar a una deficiente producción de Igs independientemente de la proliferación. Los resultados destacan la heterogeneidad entre los pacientes con IVC, en los que distintos defectos moleculares subyacen a manifestaciones clínicas comunes, y subrayan la necesidad de clasificar y estudiar separadamente a los pacientes con IVC cuando se evalúa la funcionalidad de sus linfocitos B.

En resumen, los resultados del presente trabajo apoyan la hipótesis de partida de que la función del linfocito B está alterada en los pacientes con IVC. La alteración se manifiesta con defectos de activación y regulación de la apoptosis, lo cual repercute en su diferenciación y capacidad para producir anticuerpos, y contribuye a explicar la inmunodeficiencia característica de dichos pacientes. Un mejor conocimiento de las deficiencias de los linfocitos B en la IVC nos puede ayudar a clasificar mejor a los pacientes y a diseñar mejores estrategias de vacunación que les confieran niveles protectores de anticuerpos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La inducción de la expresión de la molécula coestimuladora CD86 está disminuida en linfocitos B de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común activados con ODN o extractos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, en combinación con anti-IgM.
2. La proliferación en linfocitos B de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común tras activación con los extractos bacterianos de *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, usados individualmente o en combinación con anti-IgM, es menor que en controles.
3. Los resultados indican un defecto en la señalización a través de diversos TLRs en linfocitos B de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común y contribuyen a explicar la hipogammaglobulinemia y la baja respuesta a las vacunas.
4. La diferenciación de los linfocitos B de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos CD38⁺ es inferior que en controles, al activarlos con anti-CD40 e IL-21 (estímulo T-dependiente) combinados con anti-IgM.
5. La producción de IgG e IgA en linfocitos B de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común activados con ODN (estímulo T-independiente) o anti-CD40 e IL-21, o sus combinaciones con anti-IgM, es siempre inferior a la de controles.

6. Los resultados señalan un defecto en la diferenciación hacia células plasmáticas y la producción de anticuerpos en los linfocitos B de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común tras ser activados tanto con estímulos T-independientes como T-dependientes, lo que explicaría en parte la hipogammaglobulinemia característica de los pacientes.
7. El rescate de la apoptosis tras activación con anti-CD40, ODN o anti-IgM, está disminuido en linfocitos B vírgenes, y en mayor medida en linfocitos B de memoria, únicamente en los pacientes del grupo MB0. La coestimulación con IL-21 no corrige dicho defecto.
8. La expresión del receptor proapoptótico TRAIL está incrementada en los linfocitos B de memoria de sangre periférica únicamente en los pacientes del grupo MB0.
9. Una mayor susceptibilidad de los linfocitos B de pacientes del grupo MB0 a la muerte por apoptosis durante la respuesta inmune, puede ser la causa de la baja producción de inmunoglobulinas en dicho grupo de pacientes.
10. El hecho de que un defecto funcional del linfocito B esté presente únicamente en un grupo de pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común, hace necesaria una clasificación consensuada de los mismos, basada en criterios etiopatogénicos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Por orden alfabético

- **Al Kindi M**, Mundy J, Sullivan T, Smith W, Kette F, Smith A, et al. Utility of peripheral blood B cell subsets analysis in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* **2012** Feb;167(2):275-281.
- **Albiger B**, Dahlberg S, Sandgren A, Wartha F, Beiter K, Katsuragi H, et al. Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* **2007** Mar;9(3):633-644.
- **Al-Herz W**, Bousfiha A, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* **2011** Nov 8;2:54.
- **Ameratunga R**, Woon ST, Gillis D, Koopmans W, Steele R. New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* **2013** Nov;174(2):203-211.
- **Arandi N**, Mirshafiey A, Abolhassani H, Jeddi-Tehrani M, Edalat R, Sadeghi B, et al. Frequency and expression of inhibitory markers of CD4(+) CD25(+) FOXP3(+) regulatory T

cells in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* **2013a** May;77(5):405-412.

- **Arandi N**, Mirshafiey A, Jeddi-Tehrani M, Abolhassani H, Sadeghi B, Mirminachi B, et al. Evaluation of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells function in patients with common variable immunodeficiency. *Cell Immunol* **2013b** Feb;281(2):129-133.
- **Arce S**, Luger E, Muehlinghaus G, Cassese G, Hauser A, Horst A, et al. CD38 low IgG-secreting cells are precursors of various CD38 high-expressing plasma cell populations. *J Leukoc Biol* **2004** Jun;75(6):1022-1028.
- **Arumugakani G**, Wood PM, Carter CR. Frequency of Treg cells is reduced in CVID patients with autoimmunity and splenomegaly and is associated with expanded CD2110 B lymphocytes. *J Clin Immunol* **2010** Mar;30(2):292-300.
- **Bacchelli C**, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* **2007** Sep;149(3):401-409.
- **Barbosa RR**, Silva SP, Silva SL, Melo AC, Pedro E, Barbosa MP, et al. Primary B-cell deficiencies reveal a link between human IL-17-producing CD4 T-cell homeostasis and B-cell differentiation. *PLoS One* **2011**;6(8):e22848.
- **Bernasconi NL**, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR

triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* **2003** Jun 1;101(11):4500-4504.

- **Booth J**, Wilson H, Jimbo S, Mutwiri G. Modulation of B cell responses by Toll-like receptors. *Cell Tissue Res* **2011** Jan;343(1):131-140.
- **Borte S**, Pan-Hammarstrom Q, Liu C, Sack U, Borte M, Wagner U, et al. Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood* **2009** Nov 5;114(19):4089-4098.
- **Bourke E**, Bosisio D, Golay J, Polentarutti N, Mantovani A. The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells. *Blood* **2003** Aug 1;102(3):956-963.
- **Boussiotis VA**, Freeman GJ, Gribben JG, Daley J, Gray G, Nadler LM. Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993** Dec 1;90(23):11059-11063.
- **Branger J**, Knapp S, Weijer S, Leemans JC, Pater JM, Speelman P, et al. Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infect Immun* **2004** Feb;72(2):788-794.
- **Brugnoni D**, Airo P, Lebovitz M, Malacarne F, Ugazio AG, Notarangelo LD, et al. CD4+ cells from patients with Common Variable Immunodeficiency have a reduced ability of CD40

ligand membrane expression after in vitro stimulation. *Pediatr Allergy Immunol* **1996** Nov;7(4):176-179.

- **Bryant VL**, Ma CS, Avery DT, Li Y, Good KL, Corcoran LM, et al. Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells. *J Immunol* **2007** Dec 15;179(12):8180-8190.
- **Carvalho KI**, Melo KM, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Costa-Carvalho BT, et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS One* **2010** Sep 9;5(9):10.1371/journal.pone.0012652.
- **Chapel H**, Cunningham-Rundles C. Update in understanding common variable immunodeficiency disorders (CVIDs) and the management of patients with these conditions. *Br J Haematol* **2009** Jun;145(6):709-727.
- **Chaturvedi A**, Dorward D, Pierce SK. The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity* **2008** Jun;28(6):799-809.
- **Coffman RL**, Lebman DA, Rothman P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol* **1993**;54:229-270.
- **Coffman RL**, Lebman DA, Shrader B. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by

lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1989. 170: 1039-1044. *J Immunol* **2009** Jan 1;182(1):8-13.

- **Cunningham-Rundles C**, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* **1999** Jul;92(1):34-48.
- **Cunningham-Rundles C**, Ponda PP. Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* **2005** Nov;5(11):880-892.
- **Cunningham-Rundles C**, Radigan L, Knight AK, Zhang L, Bauer L, Nakazawa A. TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency. *J Immunol* **2006** Feb 1;176(3):1978-1987.
- **Denz A**, Eibel H, Illges H, Kienzle G, Schlesier M, Peter HH. Impaired up-regulation of CD86 in B cells of "type A" common variable immunodeficiency patients. *Eur J Immunol* **2000** Apr;30(4):1069-1077.
- **Di Renzo M**, Zhou Z, George I, Becker K, Cunningham-Rundles C. Enhanced apoptosis of T cells in common variable immunodeficiency (CVID): role of defective CD28 co-stimulation. *Clin Exp Immunol* **2000** Jun;120(3):503-511.
- **Di Renzo M**, Pasqui AL, Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin Exp Med* **2004** Apr;3(4):211-217.
- **Dorner M**, Brandt S, Tinguely M, Zucol F, Bourquin JP, Zauner L, et al. Plasma cell toll-like receptor (TLR) expression

differs from that of B cells, and plasma cell TLR triggering enhances immunoglobulin production. *Immunology* **2009** Dec;128(4):573-579.

- **Durandy A**, Revy P, Imai K, Fischer A. Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. *Immunol Rev* **2005** Feb;203:67-79.
- **Durandy A**, Kracker S, Fischer A. Primary antibody deficiencies. *Nat Rev Immunol* **2013** Jul;13(7):519-533.
- **Eibel H**, Salzer U, Warnatz K. Common variable immunodeficiency at the end of a prospering decade: towards novel gene defects and beyond. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2010** Dec;10(6):526-533.
- **Eisenstein EM**, Chua K, Strober W. B cell differentiation defects in common variable immunodeficiency are ameliorated after stimulation with anti-CD40 antibody and IL-10. *J Immunol* **1994** Jun 15;152(12):5957-5968.
- **Escobar D**, Pons J, Iglesias J, Martínez-Pomar N, Matamoros N y Ferrer JM. Expresión y función de los receptores toll-like (TLR) en monocitos de pacientes con inmunodeficiencia variable común (IVC). *Inmunología* **2007** Mar;26(supl. 1): 93.
- **Ettinger R**, Sims GP, Fairhurst AM, Robbins R, da Silva YS, Spolski R, et al. IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol* **2005** Dec 15;175(12):7867-7879.

- **Ettlinger R**, Sims GP, Robbins R, Withers D, Fischer RT, Grammer AC, et al. IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* **2007** Mar 1;178(5):2872-2882.
- **Ettlinger R**, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. *Immunol Rev* **2008** Jun;223:60-86.
- **Farrington M**, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, et al. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994** Feb 1;91(3):1099-1103.
- **Fearon DT**, Carroll MC. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* **2000**;18:393-422.
- **Ferrer JM**, Iglesias J, Hernandez M, Matamoros N. Alterations in interleukin secretion (IL-2 and IL-4) by CD4 and CD4 CD45RO cells from common variable immunodeficiency (CVI) patients. *Clin Exp Immunol* **1995** Nov;102(2):286-289.
- **Fischer MB**, Hauber I, Vogel E, Wolf HM, Mannhalter JW, Eibl MM. Defective interleukin-2 and interferon-gamma gene expression in response to antigen in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* **1993** Aug;92(2):340-352.

- **Fischer MB**, Hauber I, Eggenbauer H, Thon V, Vogel E, Schaffer E, et al. A defect in the early phase of T-cell receptor-mediated T-cell activation in patients with common variable immunodeficiency. *Blood* **1994** Dec 15;84(12):4234-4241.

- **Foerster C**, Voelxen N, Rakhmanov M, Keller B, Gutenberger S, Goldacker S, et al. B cell receptor-mediated calcium signaling is impaired in B lymphocytes of type Ia patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol* **2010** Jun 15;184(12):7305-7313.

- **Gatto D**, Brink R. The germinal center reaction. *J Allergy Clin Immunol* **2010** Nov;126(5):898-907.

- **Giovannetti A**, Pierdominici M, Mazzetta F, Marziali M, Renzi C, Mileo AM, et al. Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency. *J Immunol* **2007** Mar 15;178(6):3932-3943.

- **Goldacker S**, Draeger R, Warnatz K, Huzly D, Salzer U, Thiel J, et al. Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol* **2007** Sep;124(3):294-303.

- **Groth C**, Drager R, Warnatz K, Wolff-Vorbeck G, Schmidt S, Eibel H, et al. Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* **2002** Jul;129(1):133-139.

- **Guerreiro-Cacais AO**, Levitskaya J, Levitsky V. B cell receptor triggering sensitizes human B cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Leukoc Biol* **2010** Nov;88(5):937-945.
- **Hammarstrom L**, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* **2000** May;120(2):225-231.
- **Hanten JA**, Vasilakos JP, Riter CL, Neys L, Lipson KE, Alkan SS, et al. Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol* **2008** Jul 24;9:39-2172-9-39.
- **Hao Z**, Duncan GS, Seagal J, Su YW, Hong C, Haight J, et al. Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. *Immunity* **2008** Oct 17;29(4):615-627.
- **Hawkins ED**, Hommel M, Turner ML, Battye FL, Markham JF, Hodgkin PD. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. *Nat Protoc* **2007**;2(9):2057-2067.
- **Henn AD**, Rebhahn J, Brown MA, Murphy AJ, Coca MN, Hyrien O, et al. Modulation of single-cell IgG secretion frequency and rates in human memory B cells by CpG DNA, CD40L, IL-21, and cell division. *J Immunol* **2009** Sep 1;183(5):3177-3187.
- **Horn J**, Thon V, Bartonkova D, Salzer U, Warnatz K, Schlesier M, et al. Anti-IgA antibodies in common variable immunodeficiency (CVID): diagnostic workup and therapeutic strategy. *Clin Immunol* **2007** Feb;122(2):156-162.

- **Huggins J**, Pellegrin T, Felgar RE, Wei C, Brown M, Zheng B, et al. CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells. *Blood* **2007** Feb 15;109(4):1611-1619.

- **Husain Z**, Holodick N, Day C, Szymanski I, Alper CA. Increased apoptosis of CD20+ IgA + B cells is the basis for IgA deficiency: the molecular mechanism for correction in vitro by IL-10 and CD40L. *J Clin Immunol* **2006** Mar;26(2):113-125.

- **Iglesias J**, Matamoros N, Raga S, Ferrer JM, Mila J. CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis. *Clin Exp Immunol* **1999** Jul;117(1):138-146.

- **Imasato A**, Desbois-Mouthon C, Han J, Kai H, Cato AC, Akira S, et al. Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable Haemophilus influenzae-induced expression of toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **2002** Dec 6;277(49):47444-47450.

- **Jacquot S**. CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation. *Immunol Res* **2000**;21(1):23-30.

- **Jeannin P**, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, Gauchat JF, Ellis J, Bonnefoy JY. CD86 (B7-2) on human B cells. A functional role in proliferation and selective differentiation into IgE- and IgG4-producing cells. *J Biol Chem* **1997** Jun 20;272(25):15613-15619.

- **Jefferis R**, Kumararatne DS. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin Exp Immunol* **1990** Sep;81(3):357-367.
- **Jin H**, Carrio R, Yu A, Malek TR. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J Immunol* **2004** Jul 1;173(1):657-665.
- **Kawai T**, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **2010** May;11(5):373-384.
- **Koga T**, Lim JH, Jono H, Ha UH, Xu H, Ishinaga H, et al. Tumor suppressor cylindromatosis acts as a negative regulator for Streptococcus pneumoniae-induced NFAT signaling. *J Biol Chem* **2008** May 2;283(18):12546-12554.
- **Koncz G**, Hueber AO. The Fas/CD95 Receptor Regulates the Death of Autoreactive B Cells and the Selection of Antigen-Specific B Cells. *Front Immunol* **2012** Jul 25;3:207.
- **Konforte D**, Simard N, Paige CJ. IL-21: an executor of B cell fate. *J Immunol* **2009** Feb 15;182(4):1781-1787.
- **Kuijpers TW**, Bende RJ, Baars PA, Grummels A, Derks IA, Dolman KM, et al. CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* **2010** Jan;120(1):214-222.

- **Kurosaki T.** B-lymphocyte biology. *Immunol Rev* **2010** Sep;237(1):5-9.

- **Landers CD,** Bondada S. CpG oligodeoxynucleotides stimulate cord blood mononuclear cells to produce immunoglobulins. *Clin Immunol* **2005** Sep;116(3):236-245.

- **Lenardo MJ,** Oliveira JB, Zheng L, Rao VK. ALPS-ten lessons from an international workshop on a genetic disease of apoptosis. *Immunity* **2010** Mar 26;32(3):291-295.

- **Litzman J,** Freiberger T, Grimbacher B, Gathmann B, Salzer U, Pavlik T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphic variants predispose to the development of bronchopulmonary complications but have no influence on other clinical and laboratory symptoms or signs of common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* **2008** Sep;153(3):324-330.

- **Malley R,** Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003** Feb 18;100(4):1966-1971.

- **Martinez-Pomar N,** Raga S, Ferrer J, Pons J, Munoz-Saa I, Julia MR, et al. Elevated serum interleukin (IL)-12p40 levels in common variable immunodeficiency disease and decreased peripheral blood dendritic cells: analysis of IL-12p40 and interferon-gamma gene. *Clin Exp Immunol* **2006** May;144(2):233-238.

- **Martini H**, Enright V, Perro M, Workman S, Birmelin J, Giorda E, et al. Importance of B cell co-stimulation in CD4(+) T cell differentiation: X-linked agammaglobulinaemia, a human model. *Clin Exp Immunol* **2011** Jun;164(3):381-387.
- **McHeyzer-Williams M**, Okitsu S, Wang N, McHeyzer-Williams L. Molecular programming of B cell memory. *Nat Rev Immunol* **2012** Dec 9;12(1):24-34.
- **Melo KM**, Carvalho KI, Bruno FR, Ndhlovu LC, Ballan WM, Nixon DF, et al. A decreased frequency of regulatory T cells in patients with common variable immunodeficiency. *PLoS One* **2009** Jul 29;4(7):e6269.
- **Meyer-Bahlburg A**, Rawlings DJ. Differential impact of Toll-like receptor signaling on distinct B cell subpopulations. *Front Biosci* **2013** Jan 1;17:1499-1516.
- **Mogensen TH**, Paludan SR, Kilian M, Ostergaard L. Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. *J Leukoc Biol* **2006** Aug;80(2):267-277.
- **Morbach H**, Eichhorn EM, Liese JG, Girschick HJ. Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol* **2010** Nov;162(2):271-279.
- **Mullighan CG**, Marshall SE, Bunce M, Welsh KI. Variation in immunoregulatory genes determines the clinical phenotype of

common variable immunodeficiency. *Genes Immun* **1999** Nov;1(2):137-148.

- **North ME**, Webster AD, Farrant J. Defects in proliferative responses of T cells from patients with common variable immunodeficiency on direct activation of protein kinase C. *Clin Exp Immunol* **1991** Aug;85(2):198-201.
- **Notarangelo LD**, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, et al. (International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies). Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* **2009** Dec;124(6):1161-1178.
- **Ou X**, Xu S, Lam KP. Deficiency in TNFRSF13B (TACI) expands T-follicular helper and germinal center B cells via increased ICOS-ligand expression but impairs plasma cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012** Sep 18;109(38):15401-15406.
- **Park MA**, Li JT, Hagan JB, Maddox DE, Abraham RS. Common variable immunodeficiency: a new look at an old disease. *Lancet* **2008** Aug 9;372(9637):489-502.
- **Perez-Andres M**, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, Schmitz A, Almeida J, et al. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom* **2010**;78 Suppl 1:S47-60.
- **Piqueras B**, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B

cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* **2003** Sep;23(5):385-400.

- **Pons J**, Ferrer JM, Martinez-Pomar N, Iglesias-Alzueta J, Matamoros N. Costimulatory molecules and cytokine production by T lymphocytes in common variable immunodeficiency disease. *Scand J Immunol* **2006** May;63(5):383-389.
- **Poulsen LK**, Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Ann Med* **2007**;39(6):440-456.
- **Pozzi N**, Gaetaniello L, Martire B, De Mattia D, Balestrieri B, Cosentini E, et al. Defective surface expression of attractin on T cells in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol* **2001** Jan;123(1):99-104.
- **Punnonen J**, Kainulainen L, Ruuskanen O, Nikoskelainen J, Arvilommi H. IL-4 synergizes with IL-10 and anti-CD40 MoAbs to induce B-cell differentiation in patients with common variable immunodeficiency. *Scand J Immunol* **1997** Feb;45(2):203-212.
- **Quah BJ**, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* **2007**;2(9):2049-2056.
- **Quinti I**, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, et al. Long-term follow-up and outcome of a large

cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* **2007** May;27(3):308-316.

- **Rasheed AU**, Rahn HP, Sallusto F, Lipp M, Muller G. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol* **2006** Jul;36(7):1892-1903.
- **Rezaei N**, Wing JB, Aghamohammadi A, Carlring J, Lees A, Asgarian-Omran H, et al. B-cell-T-cell activation and interaction in common variable immunodeficiency. *Hum Immunol* **2010** Apr;71(4):355-362.
- **Romberg N**, Chamberlain N, Saadoun D, Gentile M, Kinnunen T, Ng YS, et al. CVID-associated TACI mutations affect autoreactive B cell selection and activation. *J Clin Invest* **2013** Oct 1;123(10):4283-4293.
- **Rui L**, Vinuesa CG, Blasioli J, Goodnow CC. Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling. *Nat Immunol* **2003** Jun;4(6):594-600.
- **Ruprecht CR**, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* **2006** Apr;36(4):810-816.
- **Salek Farrokhi A**, Aghamohammadi A, Pourhamdi S, Mohammadinejad P, Abolhassani H, Moazzeni SM. Evaluation of class switch recombination in B lymphocytes of patients with common variable immunodeficiency. *J Immunol Methods* **2013** Aug 30;394(1-2):94-99.

- **Salzer U**, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency - an update. *Arthritis Res Ther* **2012** Sep 24;14(5):223.
- **Sen G**, Khan AQ, Chen Q, Snapper CM. In vivo humoral immune responses to isolated pneumococcal polysaccharides are dependent on the presence of associated TLR ligands. *J Immunol* **2005** Sep 1;175(5):3084-3091.
- **Sen G**, Chen Q, Snapper CM. Immunization of aged mice with a pneumococcal conjugate vaccine combined with an unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotide restores defective immunoglobulin G antipolysaccharide responses and specific CD4+-T-cell priming to young adult levels. *Infect Immun* **2006** Apr;74(4):2177-2186.
- **Seppänen M**, Aghamohammadi A, Rezaei N. Is there a need to redefine the diagnostic criteria for common variable immunodeficiency? *Expert Rev Clin Immunol* **2014** Jan;10(1):1-5.
- **Shlomchik MJ**, Weisel F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev* **2012** May;247(1):52-63.
- **Shulman Z**, Gitlin AD, Targ S, Jankovic M, Pasqual G, Nussenzweig MC, et al. T follicular helper cell dynamics in germinal centers. *Science* **2013** Aug 9;341(6146):673-677.
- **Smith TF**. IgG subclasses. *Adv Pediatr* **1992**;39:101-126.

- **Snapper CM**, Mond JJ. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. *Immunol Today* **1993** Jan;14(1):15-17.

- **Tangye SG**, Avery DT, Deenick EK, Hodgkin PD. Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol* **2003** Jan 15;170(2):686-694.

- **Ursini-Siegel J**, Zhang W, Altmeyer A, Hatada EN, Do RK, Yagita H, et al. TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. *J Immunol* **2002** Nov 15;169(10):5505-5513.

- **van de Ven AA**, Compeer EB, van Montfrans JM, Boes M. B-cell defects in common variable immunodeficiency: BCR signaling, protein clustering and hardwired gene mutations. *Crit Rev Immunol* **2011**;31(2):85-98.

- **van de Ven AA**, Compeer EB, Bloem AC, van de Corput L, van Gijn M, van Montfrans JM, et al. Defective calcium signaling and disrupted CD20-B-cell receptor dissociation in patients with common variable immunodeficiency disorders. *J Allergy Clin Immunol* **2012** Mar;129(3):755-761.e7.

- **van Grevenynghe J**, Cubas RA, Noto A, DaFonseca S, He Z, Peretz Y, et al. Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by Foxo3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J Clin Invest* **2011** Oct;121(10):3877-3888.

- **van Zelm MC**, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandene L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex

formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest* **2010** Apr;120(4):1265-1274.

- **Venhoff N**, Emmerich F, Neagu M, Salzer U, Koehn C, Driever S, et al. The role of HLA DQ2 and DQ8 in dissecting celiac-like disease in common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* **2013** Jul;33(5):909-916.
- **Victora GD**, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* **2010** Nov 12;143(4):592-605.
- **Victora GD** and Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **2012**;30:429-457.
- **Vinuesa CG**, Linterman MA, Goodnow CC, Randall KL. T cells and follicular dendritic cells in germinal center B-cell formation and selection. *Immunol Rev* **2010** Sep;237(1):72-89.
- **Wang B**, Lim DJ, Han J, Kim YS, Basbaum CB, Li JD. Novel cytoplasmic proteins of nontypeable Haemophilus influenzae up-regulate human MUC5AC mucin transcription via a positive p38 mitogen-activated protein kinase pathway and a negative phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. *J Biol Chem* **2002** Jan 11;277(2):949-957.
- **Wang N**, Hammarstrom L. IgA deficiency: what is new? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2012** Dec;12(6):602-608.

- **Warnatz K**, Denz A, Drager R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, et al. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* **2002** Mar 1;99(5):1544-1551.

- **Warnatz K**, Bossaller L, Salzer U, Skrabl-Baumgartner A, Schwinger W, van der Burg M, et al. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* **2006** Apr 15;107(8):3045-3052.

- **Wehr C**, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, et al. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* **2008** Jan 1;111(1):77-85.

- **West AP**, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2006**;22:409-437.

- **Wood P**, Stanworth S, Burton J, Jones A, Peckham DG, Green T, et al. Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review. *Clin Exp Immunol* **2007** Sep;149(3):410-423.

- **Yong PF**, Salzer U, Grimbacher B. The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol Rev* **2009** May;229(1):101-113.

- **Yong PF**, Thaventhiran JE, Grimbacher B. "A rose is a rose is a rose," but CVID is Not CVID common variable immune

deficiency (CVID), what do we know in 2011? *Adv Immunol* **2011**;111:47-107.

- **Yu JE**, Knight AK, Radigan L, Marron TU, Zhang L, Sanchez-Ramon S, et al. Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* **2009** Aug;124(2):349-56, 356.e1-3.
- **Zerafa N**, Westwood JA, Cretney E, Mitchell S, Waring P, Iezzi M, et al. Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *J Immunol* **2005** Nov 1;175(9):5586-5590.
- **Zhang JG**, Morgan L, Spickett GP. L-selectin in patients with common variable immunodeficiency (CVID): a comparative study with normal individuals. *Clin Exp Immunol* **1996** May;104(2):275-279.
- **Zhou Z**, Huang R, Danon M, Mayer L, Cunningham-Rundles C. IL-10 production in common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol* **1998** Mar;86(3):298-304.
- **Zielen S**, Bauscher P, Hofmann D, Meuer SC. Interleukin 10 and immune restoration in common variable immunodeficiency. *Lancet* **1993** Sep 18;342(8873):750-751.

ANEXO I

Artículos científicos



Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients

Danilo Escobar^a, Jaime Pons^a, Antonio Clemente^a, Julio Iglesias^a, Verónica Regueiro^b, José A. Bengoechea^b, Nuria Matamoros^a, Joana M. Ferrer^{a,*}

^a Servei d'Immunologia, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain

^b Centro Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) and Program Infection and Immunity, Fundació Caubet-CIMERA, Bunyola, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2009

Accepted 15 January 2010

Available online 25 January 2010

Keywords:

B cells

Toll-like receptors

Common variable immunodeficiency

ABSTRACT

Common variable immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency characterized by hypogammaglobulinaemia and antibody deficiency to both T dependent and independent antigens. Patients suffer from recurrent sinopulmonary infections mostly caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, but also gastrointestinal or autoimmune symptoms. Their response to vaccination is poor or absent. In this study we investigated B cell activation induced by the TLR9 specific ligand (CpG-ODN) and bacterial extracts from *S. pneumoniae* and *H. influenzae* known to stimulate several TLR. We found that B cells from CVID patients express lower levels of CD86 after stimulation with CpG-ODN, *S. pneumoniae* and *H. influenzae* extracts in combination with anti-IgM antibody and also display a lower proliferative index when stimulated with bacterial extracts. Our results point to a broad TLR signalling defect in B lymphocytes from CVID patients that may be related to the hypogammaglobulinaemia and poor response to vaccination characteristic of these patients.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most frequent symptomatic primary humoral immunodeficiency. It includes a heterogeneous group of disorders of unknown aetiology characterized by deficient antibody production and recurrent respiratory infections by encapsulated bacteria, mostly *S. pneumoniae* and *H. influenzae*. There is a characteristic poor response to vaccination and patients benefit from substitutive gammaglobulin therapy [1,2].

Although several genetic mutations and polymorphisms (ICOS, TNFRS13B/TACI, CD19 and Msh5) have been associated with CVID, they are only present in 10% of the patients [3]. For the rest of the patients, the molecular defect underlying this pathology remains obscure. As a result of the heterogeneity of the syndrome, a vast array of alterations have been described in CVID patients: low numbers and impaired functionality of T cells [4], decreased proliferative response to antigens and mitogens [5], diminished cytokine production [6] and even dendritic cell disturbances [7]. However, the most consistent finding is an intrinsic defect in the maturation and differentiation of B lymphocytes to memory and antibody producing plasma cells. Despite the normal numbers of

B cells, most CVID patients show abnormal late B cell differentiation. CD27⁺ memory B cells, switched memory B cells and plasma cells are generally decreased. Accordingly, memory B cell deficiencies have been related to a worse clinical presentation and poor response to vaccines [8,9].

Differentiation of B lymphocytes is a complex process. A first signal through BCR is required, but effective activation requires a second signal provided by T lymphocytes. This second signal is delivered through membrane molecules or interleukin secretion. TLRs were identified as germline-encoded receptors for microbial patterns capable of trigger innate immunity. To date 10 different TLRs have been described in humans, being differentially expressed by cells of the immune system. Some of them, like TLR2 and TLR4 are expressed on the cell membrane, while others like TLR7 or TLR9 localize in the endosomal compartment [10,11].

Human naïve B cells express low to undetectable levels of TLR7 and TLR9, but BCR cross-linking leads to rapid up-regulation of TLRs expression [12]. Thus, following antigenic stimulation, TLR can provide an additional signal for the differentiation of B cells (and for several stimuli even substitute for T cells) [13]. In contrast to naïve B cells, memory B cells constitutively express TLR2, TLR6, TLR7, TLR9 and TLR10 and proliferate and differentiate to immunoglobulin secreting cells when stimulated with the corresponding ligand [12,14].

Recent findings suggest that TLR9 activation is defective in B cells and plasmacytoid dendritic cells of CVID patients [15]. In this

* Corresponding author. Address: Servei d'Immunologia, Hospital Son Dureta, Andrea Doria 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain. Fax: +34 971 175 698.

E-mail address: juanam.ferrer@ssib.es (J.M. Ferrer).

study we demonstrate that B cells from CVID patients show a defective response to direct TLR9 stimulation with TLR9 specific stimuli, but also to stimulation with *S. pneumoniae* and *H. influenzae* extracts. We postulate that this poor response could contribute to the hypogammaglobulinaemia and impaired vaccine response present in CVID patients.

2. Material and methods

2.1. Patients

CVID patients ($n = 14$) were selected according to diagnostic criteria of the International Union for Immunological Societies scientific group (IUIS) for primary immunodeficiency diseases. Healthy, age and sex matched controls ($n = 14$) were included in each experiment. Patients were on regular substitution therapy with intravenous gammaglobulin every three weeks and did not suffer from infections at the time of the study. After informed consent, blood samples from patients were collected before replacement therapy. Table 1 summarizes age, gender, serum immunoglobulin levels and B cell subpopulations (naive and memory B cells) of the CVID patients studied.

2.2. Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS), glutamine (2 mM), Hepes (200 mM) and antibiotics (penicillin–streptomycin). Cells (2×10^5) were added to 96-well plates and stimulated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of anti-IgM (F(ab')₂ goat anti-human IgM Fc; Jackson ImmunoResearch), 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of CpG-ODN2006 (CpG oligonucleotide type B; InvivoGen), *S. pneumoniae* and *H. influenzae* extracts at a final concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in culture, alone or in combination with anti-IgM.

Cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere during 3 days to measure CD86 expression and 4 days to study proliferation.

2.3. Bacterial extracts

The extracts were obtained as previously described [16,17] and optimal dilution was determined. Briefly, to prepare *H. influenzae* crude extract, nontypable *H. influenzae* (NTHi) were harvested from

a plate of chocolate agar after overnight incubation and incubated in 30 ml of brain heart infusion broth supplemented with NAD (3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After overnight incubation, bacteria were recovered by centrifugation (10,000 \times g for 10 min), and the supernatant was discarded. The resulting pellet was suspended in 10 ml of phosphate-buffered saline and sonicated on ice three times at 150 W for 3 min at 5-min intervals. Subsequently, the lysate was collected and stored at –80 °C. To obtain *S. pneumoniae* crude extract, *Strptococcus* were grown on blood agar plates and in Todd-Hewitt broth supplemented with 0.5% yeast extract (THY) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ water-jacketed incubator. After overnight incubation in THY, bacteria were recovered by centrifugation (10,000 \times g for 20 min at 4 °C) and supernatant was discarded. Bacterial pellet was resuspended in PBS and sonicated as described before. The bacterial lysate was stored at –80 °C.

2.4. Flow cytometry and cell proliferation

We evaluated B cell subpopulations by flow cytometry using a combination of CD19 PCy5 (Coulter Immunotech), anti-IgD FITC (Dako) and CD27 PE (Coulter Immunotech) labelled monoclonal antibodies. Naive (CD19⁺IgD⁺CD27⁻), non-switched memory (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) and switched memory (CD19⁺IgD⁻CD27⁺) B cell subpopulations were referred to the total amount of previously gated CD19⁺ cells. Analysis was performed on a flow cytometer Epics FC500 (Beckman Coulter).

CD86 mean fluorescence intensity (MFI) was determined on previously gated CD19⁺ cultured B cells using an anti-CD86 PE conjugated monoclonal antibody (Coulter Immunotech).

To evaluate proliferation, 5–10 $\times 10^6$ PBMC were labelled with 5 μm CFSE (CellTrace CFSE cell proliferation kit, Molecular Probes), washed and cultured with the stimuli above described. After 4 days, cultured cells were harvested, stained with anti-CD19 PCy5 labelled monoclonal antibody and analyzed. B cells were gated on a side vs. CD19 dot plot and CFSE was measured on a FL-1 histogram. To calculate the proliferation index (PI) the sum of cells in each generation was divided by the number of original parent cells as previously described [18].

2.5. Statistical analysis

All results are expressed as mean \pm SEM. Mann–Whitney tests were used to assess the statistical significance between groups. A p -value lower than 0.05 was considered statistically significant.

Table 1

Age, gender, immunoglobulin levels before starting replacement therapy and B lymphocyte subpopulations of CVID patients.

	Age (years)	Sex (male/female)	IgG (mg/dl)	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	CD19 ⁺ a (%)	CD19 ⁺ a (%)		
							IgD ⁺ CD27 ⁻	IgD ⁺ CD27 ⁺	IgD ⁻ CD27 ⁺
1	54	M	77	<6	<4	2	88	7	1
2	24	F	351	20	<6	9	87	2	2
3	56	M	316	9	12	6	96	3	0
4	39	F	288	32	14	16	86	2	1
5	62	F	445	16	6	12	76	15	5
6	56	F	475	42	35	19	84	5	5
7	41	F	490	27	21	10	75	17	5
8	62	F	480	52	55	8	75	6	8
9	24	M	229	<6	12	6	93	1	0
10	59	M	453	26	25	7	82	1	1
11	56	F	112	<6	<5	5	95	1	1
12	24	M	82	<6	5	15	95	0	0
13	20	F	62	<6	<4	5	96	1	0
14	69	F	323	98	<6	27	72	27	0
Normal range			500–1400	50–260	50–200	9.6 \pm 0.9 ^b	70 \pm 2.8 ^b	8.1 \pm 1.0 ^b	10 \pm 1.3 ^b

N.D., Non determined.

^a B cells and B cell subpopulations were evaluated as percentage of lymphocytes and percentage of total B cells respectively.

^b Normal values expressed as mean \pm SEM.

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (Graph-Pad software, San Diego, California, USA).

3. Results

3.1. CD86 induction after stimulation with TLR9 ligand

Stimulation with either anti-IgM or CpG-ODN increased the expression of CD86 on peripheral blood B cells (Fig. 1a). B cells from CVID patients tended toward lower levels of CD86 expression when compared to controls after anti-IgM (12 ± 2.1 vs. 14 ± 1.8 MFI, respectively) or CpG-ODN stimulation (13 ± 1.9 vs. 14 ± 1.6 MFI) however, differences did not reach statistical significance (Fig. 1b). A synergic effect was observed when both stimuli were used together (Fig. 1a). In this case B cells from CVID patients showed significantly reduced CD86 up-regulation compared to controls (34 ± 5.2 vs. 48 ± 4.6 MFI; $p < 0.05$), indicating abnormal activation (Fig. 1b).

3.2. CD86 induction after stimulation with *S. pneumoniae* and *H. influenzae* extracts

S. pneumoniae and *H. influenzae* extracts barely induced up-regulation of CD86 on B cells when used alone (Fig. 2a). In controls, *H. influenzae* extracts alone were more efficient than those from *S. pneumoniae* at achieving this effect (8.9 ± 1.7 vs. 3.8 ± 0.43 MFI; $p < 0.05$, respectively) and this was also true when anti-IgM was added as a costimulus (46 ± 6.7 vs. 21 ± 2.8 MFI; $p < 0.05$) (Fig. 2b).

No differences were found between CVID patients and controls after stimulation with *S. pneumoniae* or *H. influenzae* (4.8 ± 1.2 vs. 3.8 ± 0.43 and 6.5 ± 1.1 vs. 8.9 ± 1.7 MFI, respectively). However, when used in combination with anti-IgM, known to increase TLR expression on B cells, both stimuli were able to induce the expression of CD86 (Fig. 2a). The response of B cells from CVID patients was significantly reduced when compared to controls after stimulation with anti-IgM and *S. pneumoniae* (16 ± 3.9 vs. 21 ± 2.8 MFI; $p < 0.05$) or *H. influenzae* (26 ± 6.5 vs. 46 ± 6.7 MFI; $p < 0.05$) (Fig. 2b).

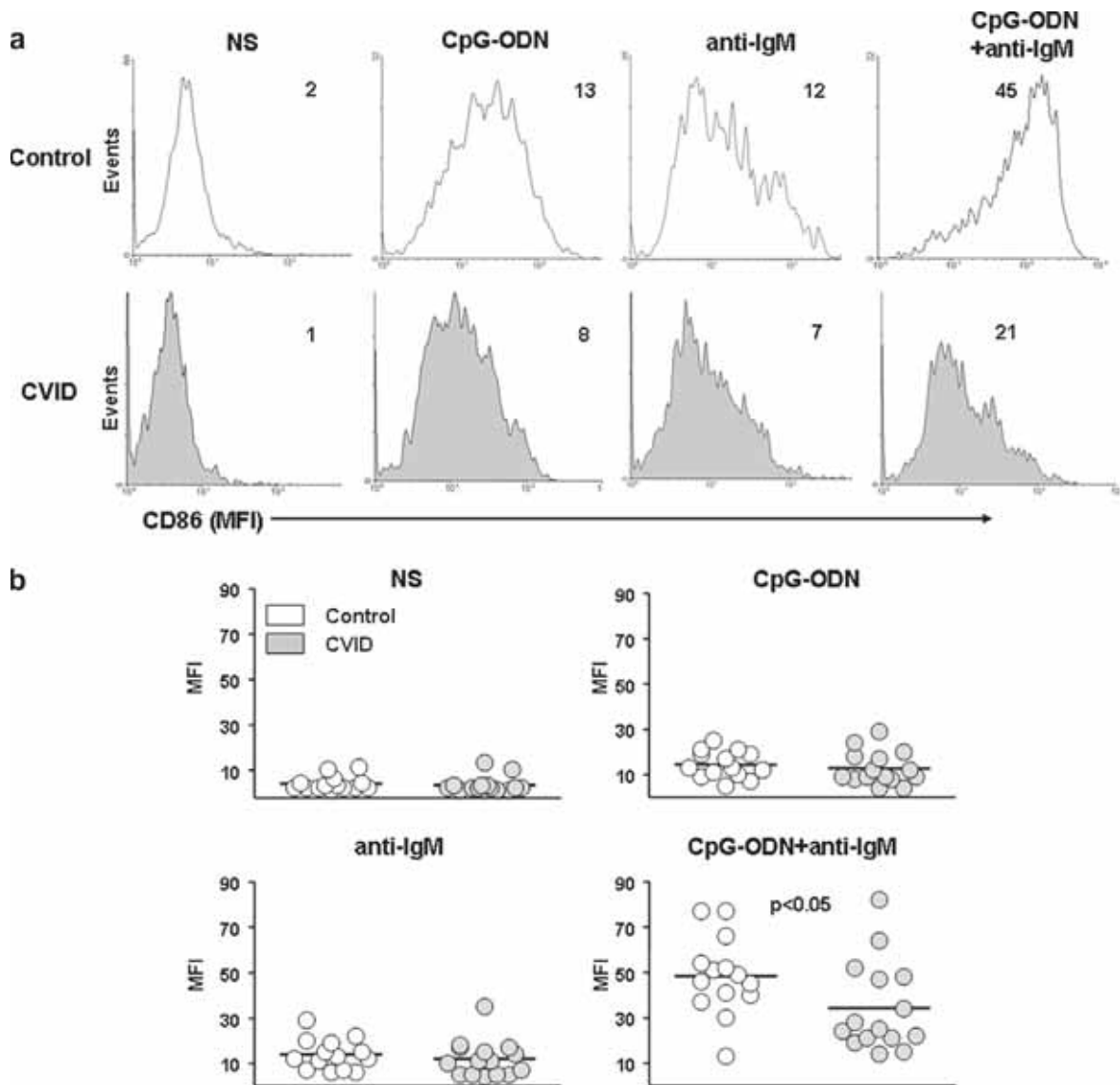


Fig. 1. Expression of CD86 on non stimulated (N.S.) CD19⁺ gated B lymphocytes and after stimulation with CpG-ODN, anti-IgM and CpG-ODN plus anti-IgM. Panel a shows representative histograms and MFI from a CVID patient (grey histograms) and a control (white histograms). Numbers in top right corners indicate MFI of each histogram. Panel b shows the expression of CD86 (MFI) on B lymphocytes from CVID patients (closed circles) and controls (open circles).

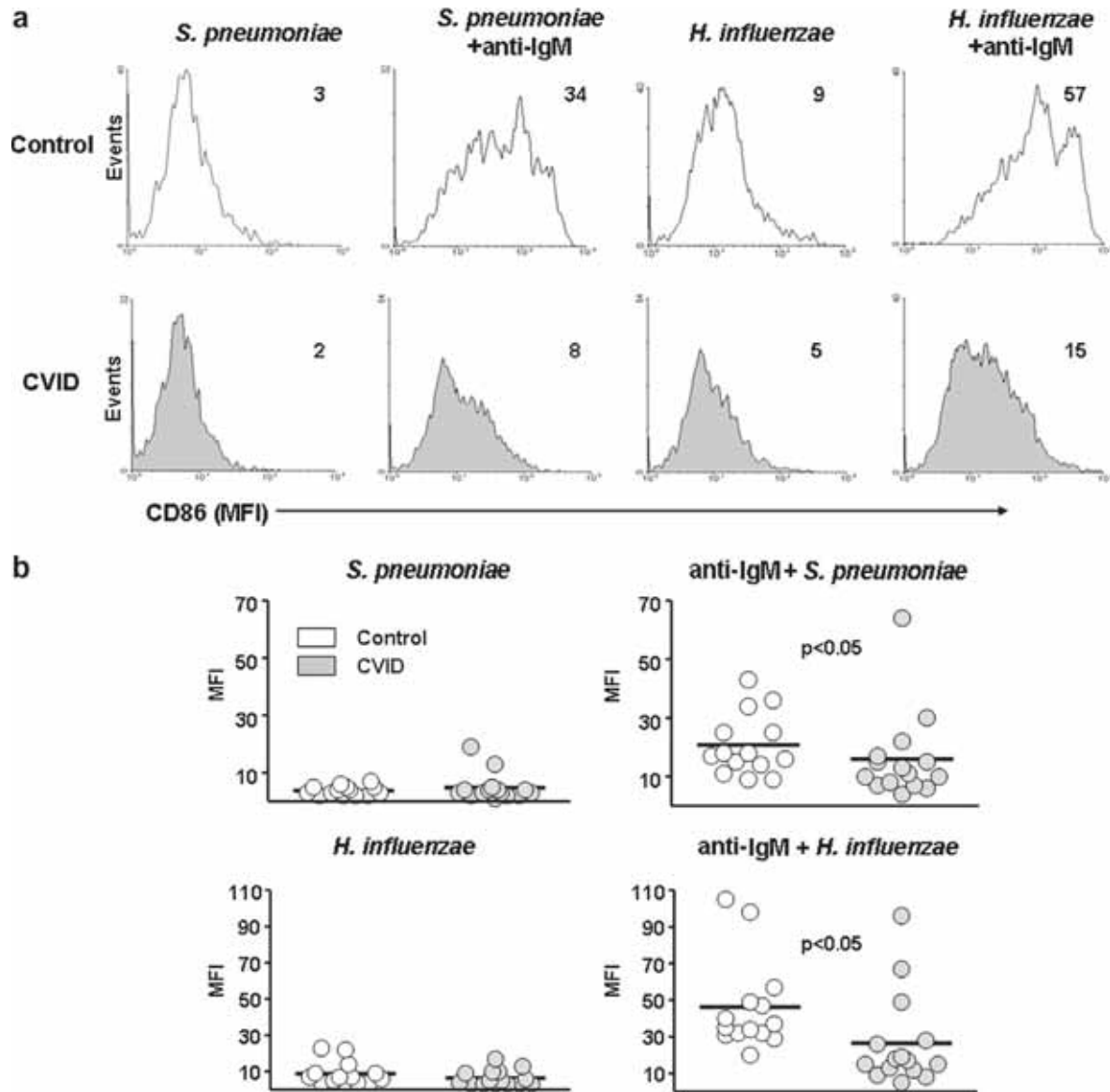


Fig. 2. Expression of CD86 on CD19⁺ gated B cells after stimulation with *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae* plus anti-IgM, *H. influenzae* and *H. influenzae* plus anti-IgM. Panel a shows representative histograms and MFI from a CVID patient (grey histograms) and a control (white histograms). Numbers in top right corners indicate MFI of each histogram. Panel b shows the expression of CD86 (MFI) on B lymphocytes from CVID patients (closed circles) and controls (open circles).

3.3. B cell proliferation after stimulation with TLR9 ligand

CFSE labelled cells were harvested after four days of culture with CpG-ODN, anti-IgM or CpG-ODN plus anti-IgM. Fig. 3 shows that we did not find differences in the proliferation index (PI) between CVID patients and controls after stimulation with CpG-ODN (1.1 ± 0.03 vs. 1.3 ± 0.08) or anti-IgM (1.1 ± 0.01 vs. 1.1 ± 0.02). In contrast to CD86 expression, we did not find differences in B lymphocyte PI between the two groups after stimulation with anti-IgM and CpG-ODN (1.4 ± 0.12 vs. 1.5 ± 0.07). However, it is noteworthy that, except for one patient, the B lymphocyte PI of all patients was below the mean of the control group.

3.4. B cell proliferation after stimulation with *S. pneumoniae* and *H. influenzae* extracts

We found a lower PI in B cells from CVID patients when compared to controls after stimulation with *S. pneumoniae* extracts

(1.0 ± 0.02 vs. 1.1 ± 0.03 ; $p < 0.05$) or *S. pneumoniae* extracts plus anti-IgM (1.05 ± 0.02 vs. 1.12 ± 0.03 ; $p < 0.05$) (Fig. 4).

Similar results were found when B cells from CVID patients and controls were stimulated with *H. influenzae* alone (1.05 ± 0.01 vs. 1.11 ± 0.03 ; $p < 0.05$) or *H. influenzae* plus anti-IgM (1.06 ± 0.02 vs. 1.15 ± 0.02 ; $p < 0.05$) (Fig. 4).

4. Discussion

CVID disease includes hypogammaglobulinaemia, recurrent sinopulmonary infections and impaired functional antibody responses to protein and/or polysaccharide vaccines. Other clinical findings are autoimmunity, granulomatous disease and neoplasia [2,19]. An unknown B cell maturation and differentiation defect leads to abnormal distribution of memory B cells subpopulations and diminished antibody production in the patients.

We have found that B cells from CVID patients have a poor response to TLR9 ligand CpG-ODN and to bacterial extracts from *S. pneumoniae* and *H. influenzae*. This includes: (a) lower induction

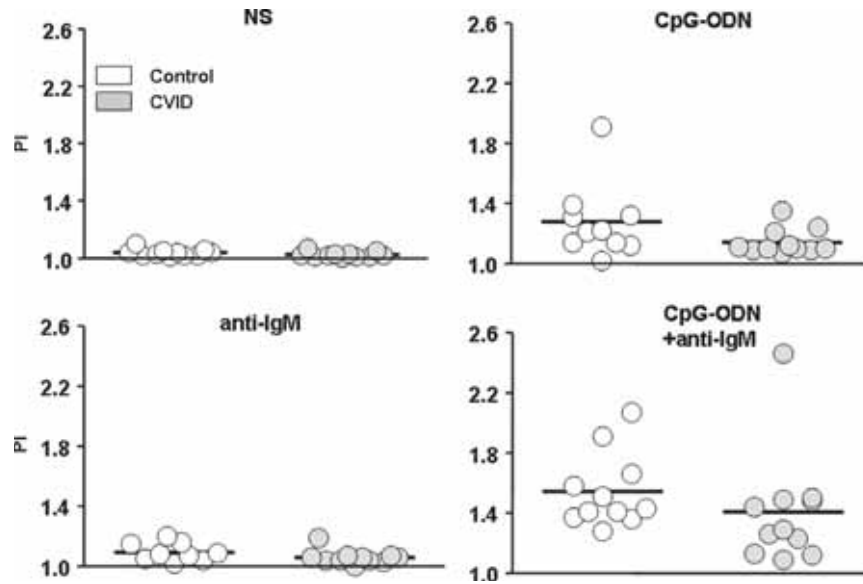


Fig. 3. Proliferative index (PI) of non stimulated (N.S.) B lymphocytes and after stimulation with CpG-ODN, anti-IgM and CpG-ODN plus anti-IgM from CVID patients (closed circles) and controls (open circles).

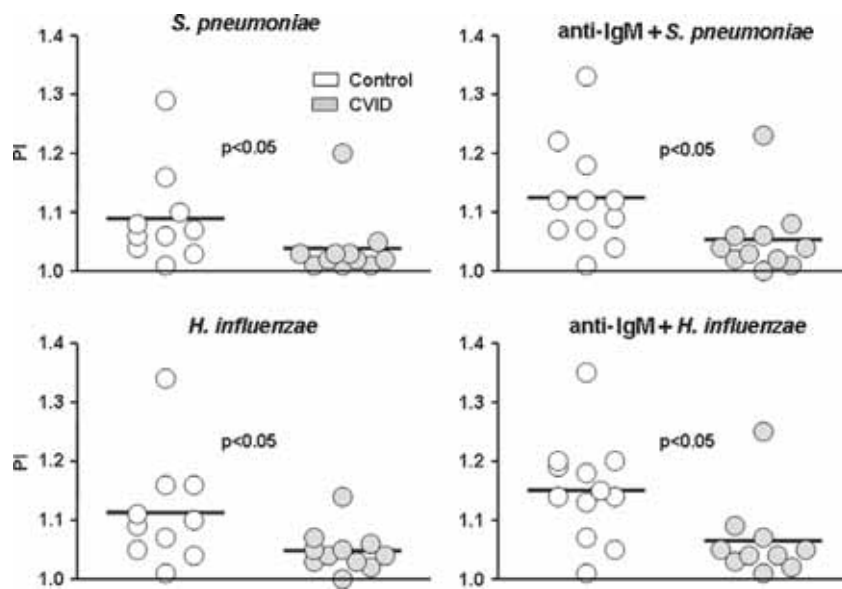


Fig. 4. Proliferative index (PI) of B lymphocytes stimulated with *S. pneumoniae*, *S. pneumoniae* plus anti-IgM, *H. influenzae* and *H. influenzae* plus anti-IgM from CVID patients (closed circles) and controls (open circles).

of expression of the costimulatory molecule CD86 after stimulation with CpG-ODN, *S. pneumoniae* or *H. influenzae* plus anti-IgM and (b) diminished B cell proliferation after stimulation with *S. pneumoniae* or *H. influenzae* alone or combined with anti-IgM. None of these defects correlated with the percentages of different memory B cell subpopulations when patients were stratified according to Piqueras et al. [20].

Serological memory is maintained by specific and aspecific recall [21]. Antigenic stimulation through recurrent infection or booster immunization drives specific recall responses with production of antibodies of unique specificity, while continuous TLR9 stimulation by bacterial DNA is thought to be one of the aspecific recall mechanisms responsible for the production of antibodies of all isotypes and specificities.

A requirement for TLR engagement, together with BCR activation, has been described for autoantibody production; synergistic

engagement of TLR9 and BCR in response to DNA containing antigens has been implicated in the activation of autoimmune B cells [22,23]. To what extent this model applies to other stimulating antigens is currently under investigation.

Previous reports on CVID patients have shown a broad TLR9 defect consisting in lack of TLR9 and defective TLR9 function in B cells (low induction of CD86 expression and production of IL10 and IL6) and plasmacytoid dendritic cells. This defect did not correlate with the number of memory B cells and no mutations in TLR9 gene were demonstrated [15]. In keeping with this, B cells from our CVID patients also show lower induction of expression of the costimulatory molecule CD86 that links innate and adaptive immune responses. The defect reaches statistical significance when CpG-ODN is combined with anti-IgM stimulation. Furthermore, we extend the study to the fact that B cells from our CVID patients show diminished proliferation in response to TLR9 stimulation with CpG-

ODN as well. In a more recent paper Yu et al. [24] demonstrated that PBL from CVID patients produced little IgG or IgA when stimulated with TLR7, TLR7/8 and TLR9 ligands. Purified B cells from CVID patients proliferated less than control B cells. However, proliferation was evaluated after stimulation through TLR7 and not through TLR9. Our results can indicate either deficiencies in TLR9 signalling or a defect in the induction of expression of TLR9 induced by BCR stimulation. Human naïve B cells express low levels of TLR, but this expression increases after stimulation through the BCR [12]. Signalling through TLR9 is not dependent on BCR ligation, but there is synergy between both receptors. Recently, Chaturvedi et al. [25] have demonstrated that after antigen binding and internalization, BCR recruits TLR9-containing endosomes into autophagosomes, and this leads to B cell hyperresponses. This is a new mechanism underlying the synergism between the signalling receptors of innate and adaptive immunity. According to our results, we cannot exclude that this process is also altered in the CVID patients.

Our findings also extend to other microbial antigens. The use of bacterial extracts represents a more clinical condition because of the tendency to autolysis of some bacteria in vivo [26] that presumably exposes several TLR ligands simultaneously or sequentially to the host immune system. In this sense, we consider that they are a more physiological stimulus than the use of isolated CpG-ODN. B cells from CVID patients do not optimally respond to bacterial extracts from *S. pneumoniae* and *H. influenzae* with or without anti-IgM. As these are the two more frequent bacteria responsible of respiratory infections in CVID patients, the lack of response may explain the poor vaccine response of our patients to *S. pneumoniae* and *H. influenzae* and their susceptibility to infection.

Polysaccharides from *S. pneumoniae* can crosslink BCR and activate B cells in the absence of T cells. Innate immunity to *S. pneumoniae* depends on TLR signalling and a role for TLR2 [27–29] and TLR4 has been demonstrated [30–32]. Recently, TLR9 has been shown to play an important protective role in the lungs at an early stage of host defence against pneumococcal infection [33]. Live *S. pneumoniae* activates the transcription factor NF- κ B and expression of IL-8 in human embryonic kidney 293 cell lines overexpressing TLR2 and TLR9 and *H. influenzae* activates TLR2 and TLR4 in these cells. These results were confirmed in human PBMC [34]. Blocking antibody cultures have demonstrated that our *H. influenzae* extract signals through both TLR2 and TLR4 and that the *S. pneumoniae* strain used expresses pneumolysin and lipopeptides, signalling through TLR4 and TLR2, respectively (data not shown). Purified genomic DNA from *S. pneumoniae* and *H. influenzae* is equally able to stimulate TLR9 [34]. Thus, the fact that in our cultures *H. influenzae* extracts were a more efficient stimulus than those from *S. pneumoniae* can be attributed to differential stimulation of other B cell TLR distinct from TLR9.

The importance of TLR in vaccine responses is controversial. Pneumococcal polysaccharides included in vaccine preparation, contain TLR agonists essential for their capacity to induce antibody secretion. Sen et al. [35] demonstrated that in vivo humoral immune response to isolated pneumococcal polysaccharides (PPS) is dependent on the presence of associated TLR ligands: commercial 23-valent PPS vaccine (Pneumovax 23) contained TLR2 and TLR4 ligands and the commercial pneumococcal conjugate vaccine (Prenar) contained TLR2 ligands that were important for anti-PPS responses in mice. They also demonstrated that inclusion of CpG-containing ODN improves the response to pneumococcal conjugate vaccine in mice [36].

The effect of TLR ligands on B cell responses may be direct, through stimulation of B cell TLR or indirect through the action of cytokines produced by other immune cells (monocytes, dendritic cells, etc.) after TLR ligand recognition. Our work was done

stimulating PBL instead of purified B cells and, although we cannot completely exclude the influence of other populations present in culture, several facts point to an intrinsic defect of B cells. First, results were evaluated directly on B cells by means of gating CD19 cells. Second, our previous published data demonstrate that T cells from our cohort of patients preserve all their B cell cooperative functions [37]. Finally, the fact that the monocytes of our patients respond optimally to bacterial extracts (manuscript in preparation) both in the induction of costimulatory molecules and secretion of cytokines, argues against an indirect mechanism as responsible of B cell deficiencies in CVID patients. Alternatively, our results point to a direct TLR ligand recognition/stimulation defect in CVID B cells. Thus, the poor response of CVID patients to vaccination may be not only due to a low response to polysaccharidic or proteic antigens, but also to a deficient response to contaminant TLR ligands present in vaccine preparations.

In summary, our results demonstrate that B cells from CVID patients are deficient in their response to specific TLR9 ligands (CpG-ODN) and also to *S. pneumoniae* and *H. influenzae* extracts. This failure may underly the hypogammaglobulinaemia and the poor vaccine responses characteristic of these patients. A better understanding of the B cell deficiencies in CVID patients could help to better classify this patients and also to design better vaccination strategies to achieve the production of protective antibodies.

Acknowledgments

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 05/0779 and FIS 08/0362). A. Clemente is a recipient of a Grant from Conselleria d'Economia, Hisenda i Innovació (Govern de les Illes Balears).

References

- [1] P. Wood, S. Stanworth, J. Burton Recognition, et al., Clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 410–423.
- [2] C. Cunningham-Rundles, C. Bodian, Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients, *Clin. Immunol.* 92 (1999) 34–48.
- [3] C. Bacchelli, S. Buckridge, A.J. Thrasher, H.B. Gaspar, Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 401–409.
- [4] J. Iglesias, N. Matamoros, S. Raga, J.M. Ferrer, J. Mila, CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis, *Clin. Exp. Immunol.* 117 (1999) 138–146.
- [5] M.E. North, A.D. Webster, J. Farrant, Defects in proliferative responses of T cells from patients with common variable immunodeficiency on direct activation of protein kinase C, *Clin. Exp. Immunol.* 85 (1991) 198–201.
- [6] J.M. Ferrer, J. Iglesias, M. Hernandez, N. Matamoros, Alterations in interleukin secretion (IL-2 and IL-4) by CD4 and CD4 CD45RO cells from common variable immunodeficiency (CVI) patients, *Clin. Exp. Immunol.* 102 (1995) 286–289.
- [7] N. Martinez-Pomar, S. Raga, J.M. Ferrer, et al., Elevated serum interleukin (IL)-12p40 levels in common variable immunodeficiency disease and decreased peripheral blood dendritic cells: analysis of IL-12p40 and interferon-gamma gene, *Clin. Exp. Immunol.* 144 (2006) 233–238.
- [8] C. Wehr, T. Kivioja, C. Schmitt, et al., The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency, *Blood* 111 (2008) 77–85.
- [9] R. Carsetti, M.M. Rosado, S. Donnanno, et al., The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (2005) 412–417.
- [10] S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 675–680.
- [11] C.A. Janeway, R. Medzhitov, Innate immune recognition, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 197–216.
- [12] N.L. Bernasconi, N. Onai, A. Lanzavecchia, A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells, *Blood* 101 (2003) 4500–4504.
- [13] C.R. Ruprecht, A. Lanzavecchia, Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 810–816.
- [14] E. Bource, D. Bosisio, J. Golay, N. Polentarutti, A. Mantovani, The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells, *Blood* 102 (2003) 956–963.

- [15] C. Cunningham-Rundles, L. Radigan, A.K. Knight, L. Zhang, L. Bauer, A. Nakazawa, TLR9 activation is defective in common variable immune deficiency, *J. Immunol.* 176 (2006) 1978–1987.
- [16] T. Koga, J.H. Lim, H. Jono, et al., Tumor suppressor cylindromatosis acts as a negative regulator for *Streptococcus pneumoniae*-induced NFAT signaling, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 12546–12554.
- [17] A. Imasato, C. Desbois-Mouthon, J. Han, et al., Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced expression of toll-like receptor 2, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 47444–47450.
- [18] B.J. Quah, H.S. Warren, C.R. Parish, Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 2049–2056.
- [19] C. Cunningham-Rundles, Immune deficiency: office evaluation and treatment, *Allergy Asthma Proc.* 24 (2003) 409–415.
- [20] B. Piqueras, C. Lavenu-Bombled, L. Galicier, et al., Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects, *J. Clin. Immunol.* 23 (2003) 385–400.
- [21] N.L. Bernasconi, E. Traggiai, A. Lanzavecchia, Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells, *Science* 298 (2002) 2199–2202.
- [22] E.A. Leadbetter, I.R. Rifkin, A.M. Hohlbaum, B.C. Beaudette, M.J. Shlomchik, A. Marshak-Rothstein, Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors, *Nature* 416 (2002) 603–607.
- [23] G.A. Viglianti, C.M. Lau, T.M. Hanley, B.A. Miko, M.J. Shlomchik, A. Marshak-Rothstein, Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA, *Immunity* 19 (2003) 837–847.
- [24] J.E. Yu, A.K. Knight, L. Radigan, et al., Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (2009) 349–356.
- [25] A. Chaturvedi, D. Dorward, S.K. Pierce, The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens, *Immunity* 28 (2008) 799–809.
- [26] B. Wang, D.J. Lim, J. Han, Y.S. Kim, C.B. Basbaum, J.D. Li, Novel cytoplasmic proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* up-regulate human MUC5AC mucin transcription via a positive p38 mitogen-activated protein kinase pathway and a negative phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 949–957.
- [27] H. Echchannaoui, K. Frei, C. Schnell, S.L. Leib, W. Zimmerli, R. Landmann, Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation, *J. Infect. Dis.* 186 (2002) 798–806.
- [28] U. Koedel, B. Angele, T. Rupprecht, et al., Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis, *J. Immunol.* 170 (2003) 438–444.
- [29] K.S. Lee, C.A. Scanga, E.M. Bachelder, Q. Chen, C.M. Snapper, TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*, *Cell. Immunol.* 245 (2007) 103–110.
- [30] R. Malley, P. Henneke, S.C. Morse, et al., Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 1966–1971.
- [31] A. Srivastava, P. Henneke, A. Visintin, et al., The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease, *Infect. Immun.* 73 (2005) 6479–6487.
- [32] J. Branger, S. Knapp, S. Weijer, et al., Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice, *Infect. Immun.* 72 (2004) 788–794.
- [33] B. Albiger, S. Dahlberg, A. Sandgren, et al., Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection, *Cell. Microbiol.* 9 (2007) 633–644.
- [34] T.H. Mogensen, S.R. Paludan, M. Kilian, L. Ostergaard, Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns, *J. Leukocyte Biol.* 80 (2006) 267–277.
- [35] G. Sen, A.Q. Khan, Q. Chen, C.M. Snapper, In vivo humoral immune responses to isolated pneumococcal polysaccharides are dependent on the presence of associated TLR ligands, *J. Immunol.* 175 (2005) 3084–3091.
- [36] G. Sen, Q. Chen, C.M. Snapper, Immunization of aged mice with a pneumococcal conjugate vaccine combined with an unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotide restores defective immunoglobulin G antipolysaccharide responses and specific CD4⁺-T-cell priming to young adult levels, *Infect. Immun.* 74 (2006) 2177–2186.
- [37] J. Pons, J.M. Ferrer, N. Martinez-Pomar, J. Iglesias-Alzueta, N. Matamoros, Costimulatory molecules and cytokine production by T lymphocytes in common variable immunodeficiency disease, *Scand. J. Immunol.* 63 (2006) 383–389.



B cells from common variable immunodeficiency patients fail to differentiate to antibody secreting cells in response to TLR9 ligand (CpG-ODN) or anti-CD40 + IL21

Antonio Clemente, Jaime Pons, Nuria Matamoros, Julio Iglesias, Joana M. Ferrer*

Servei d'Immunologia, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2010

Accepted 19 January 2011

Available online 22 January 2011

Keywords:

Common variable immunodeficiency

B lymphocytes

TLRs

CpG-ODN

IL21

ABSTRACT

Common variable immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency characterised by hypogammaglobulinaemia and antibody deficiency to T dependent and independent antigens. Patients suffer from recurrent respiratory infections and poor response to vaccination. Although the underlying molecular defect is unknown, most CVID patients show impaired late B cell differentiation. We investigated B cell differentiation and immunoglobulin secretion induced by two different stimuli: TLR9 specific ligand (CpG-ODN) and anti-CD40 combined with IL21. The contribution of BCR signalling (anti-IgM stimulation) was also evaluated. B cells from CVID patients produced low levels of IgG and IgA in response to both kinds of stimuli that was not restored by anti-IgM. Production of IgM was conserved when cells were stimulated with anti-CD40 and IL21. These results point to a wide signalling defect in B lymphocytes from CVID patients that may be related to their hypogammaglobulinaemia and poor response to vaccination.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) includes a heterogeneous group of disorders of unknown aetiology characterised by deficient antibody production and recurrent respiratory infections by encapsulated bacteria, mostly *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* and poor response to vaccination. CVID is the most frequent symptomatic primary humoral immunodeficiency and patients benefit from substitutive gammaglobulin therapy [1,2]. The molecular defect underlying this pathology remains obscure, although several genetic mutations and polymorphisms (ICOS, TNFRS13B/TACI, CD19 and Msh5, CD20, CD81) associated with CVID have been described in 10% of the patients [3–5]. As a result of the heterogeneity of the syndrome, a vast array of defects have been described in CVID patients: low numbers and impaired functionality of T cells [6], decreased proliferative response to antigens and mitogens [7], diminished cytokine production [8], altered interactions between T and B cells [9] and even dendritic cell disturbances [10]. However, most CVID patients show abnormal late B cell differentiation to CD27⁺ memory B cells, switched memory B cells and plasma cells, in spite of having normal numbers of B lymphocytes. Memory B cell deficiencies have been associated with a worse clinical presentation and poor response to vaccines [11,12]. Previous functional in vitro studies have shown that B cells

from CVID patients undergo class switch recombination and produce immunoglobulins (Igs) if appropriately stimulated with combinations of anti-CD40, IL10 and/or IL4 [13–15].

The immune response to different pathogens depends on the production of distinct Ig isotypes and several human immunodeficiency diseases are associated with a dysregulated isotype switch. Isotype switching by antigen primed B cells requires two signals: a costimulatory signal from CD4⁺ T cells (e.g. CD40L) and the contribution of cytokines [16]. Several cytokines like IL4, IL10, IL13, IL21 and TGFβ have been demonstrated as switch factors for the in vitro production of IgG, IgA and IgE by activated B cells [17–19]. Furthermore, following antigenic stimulation, TLR can provide an additional signal for the differentiation of B cells and, for several stimuli even substitute for T cells [20].

IL21 is a type I cytokine that belongs to a family that uses the common cytokine receptor γ-chain as a component of their receptors. IL21 is produced mainly by activated CD4⁺ T cells [21]. In vitro, IL21 can have positive or negative effects on B cells depending on the presence or absence of other signals. In humans, IL21 was found to be the most potent T cell derived cytokine to induce B cell proliferation and is a potent inducer of plasma cell differentiation if combined with anti-CD40 or anti-CD40 and anti-IgM stimulation [22]. In contrast with IL2 and IL10 that induce plasma cell differentiation of memory B cells stimulated with anti-CD40 [23], IL21 is able to induce plasma cell differentiation and Ig production by naive B cells [22]. IL21 and anti-CD40 induce class switch recombination and secretion of IgG and IgA in pre-switched IgM memory B cells [24,25]. In contrast, stimulation with IL21 and anti-IgM re-

* Corresponding author. Address: Servei d'Immunologia, Hospital Universitari Son Dureta, Andrea Doria 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain. Fax: +34 971 175 698.

E-mail address: juanam.ferrer@ssib.es (J.M. Ferrer).

Table 1
Characteristics of the CVID patients included in the study.

Patient	Age (years)	Sex (male/female)	CD19 ⁺ a (%)	CD19 ⁺ a (%)		
				IgD ⁺ CD27 ⁻	IgD ⁺ CD27 ⁺	IgD-CD27 ⁺
1	40	M	5	94	5	0
2	73	F	27	72	27	0, 5
3	59	M	8	96	3	0
4	26	M	15	95	0,5	0, 5
5	26	F	9	87	1,9	1, 7
6	58	F	19	84	5	5
7	64	F	7	73	18	5
8	43	F	16	77	20	1
9	56	F	5	95	1	1
10	40	F	20	86	2	1
11	55	M	2	83	15	0
12	44	F	9	75	17	5
13	26	F	9	84	8	4
14	26	M	18	90	1	2
15	31	F	16	70	2	3
Normal values	–	–	10.7 ± 0.8 ^b	61 ± 4.5 ^b	10.8 ± 2.8 ^b	14.7 ± 2.2 ^b

^a B cells and B cell subpopulations were evaluated as percentage of lymphocytes and percentage of total B cells respectively.

^b Normal values expressed as mean ± SEM.

sults in B cell death [22]. Recently, Borte et al. [26] demonstrated that a combination of IL21, IL4 and anti-CD40 is able to induce class-switch recombination to IgG and IgA and differentiation of Ig-secreting cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from CVID and IgA deficient patients. No mutations in IL21 gene were found. Interestingly, CD138⁺ defined plasma cells accounted for only a small fraction of overall IgG or IgA production [26]. CD38⁺ is upregulated during the germinal centre process of B cell stimulation and differentiation induced by T lymphocytes and soluble mediators. Both plasmablasts and plasma cells express CD38 although their expression of CD138 is heterogeneous [27].

In this study we evaluated B cell differentiation and Ig production by purified B cells from CVID patients stimulated with two kinds of stimuli: IL21 in combination with anti-CD40 (simulating T cell dependent stimulation) or CpG-ODN (simulating T cell independent stimulation). The contribution of BCR signalling (anti-IgM stimulation) was also evaluated. We found that purified B cells from CVID patients show a defective response to both kinds of stimuli. Irrespectively of their degree of differentiation, secretion of IgG and IgA was diminished in B cells from CVID patients compared to controls, whatever the stimulus used. Production of IgM was conserved when cells were stimulated with anti-CD40 and IL21.

2. Materials and methods

2.1. Patients

Fifteen CVID patients were selected according to diagnostic criteria of the International Union for Immunological Societies scientific group for primary immunodeficiency diseases. Patients received intravenous gammaglobulin therapy every 21 days with the exception of two patients: patient 14 had not received substitutive therapy during the last year and patient 15 had not begun the treatment when the study was started. Patients did not suffer from infections at the time of the study. Peripheral blood samples were collected before gammaglobulin replacement after informed consent. Table 1 summarises patients present age, gender and percentage of total B cells and B cell subpopulations. Sixteen age and sex matched healthy blood donors were included as controls.

2.2. B lymphocyte purification and cell culture

B cells were obtained from PBMC by negative selection using the Dynabeads UntouchedTM human B cells separation kit (Dyna-

Invitrogen) according to manufacturer instructions. The purity of B cells (median and interquartile range-IQR) was similar in CVID patients and controls (93 IQR: 79–95.5% vs. 90 IQR: 85–95%, respectively). Purified B cells were resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat inactivated foetal calf serum (FCS), glutamine (2 mM), Hepes (200 mM), and antibiotics (penicillin and streptomycin).

Purified B lymphocytes (1×10^5 cells) were added to 96-well plates and stimulated with CpG-ODN2006 (0.6 µg/ml; CpG oligonucleotide type B; InvivoGen), F(ab)2 goat anti-human IgM (5 µg/ml; Jackson ImmunoResearch), recombinant human IL21 (100 ng/ml; Biosource), anti-human CD40/TNFRSF5 antibody (1 µg/ml; R&D Systems) at different combinations.

Cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere during 11 days. Supernatants were collected and frozen at –70 °C to measure IgM, IgG and IgA. CD38 membrane expression was evaluated in cultured B cells.

2.3. Flow-cytometry

Purity of B cells was evaluated using a combination of anti-CD45FITC and anti-CD19PCy5 labelled monoclonal antibodies (both from Coulter Immunotech). To assess the maturation of 11 days cultured B cells, a combination of anti-CD45FITC, anti-CD19PCy5 and anti-CD38PE labelled monoclonal antibodies (all from Coulter Immunotech) was used. Differentiation of B cells was evaluated as the percentage of CD19⁺ gated B cells in culture that developed a CD38⁺ phenotype. Flow cytometry analysis was performed with an Epics FC500 using the CXP software (Beckman Coulter).

2.4. Immunoglobulin quantification

IgM, IgG and IgA were quantified in 11 days culture supernatants by BD Cytometric Bead Array Human Igs Flex Set (BD Biosciences) according to manufacturer instructions. The lower limits of detection were 0.06, 0.34 and 7.35 ng/ml for IgM, IgG and IgA, respectively. The assay was performed on an Epics FC500 flow cytometer and the data were analysed using the FCAP array software version 1.0.1 (BD Biosciences).

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (San Diego, California). Data are expressed as median

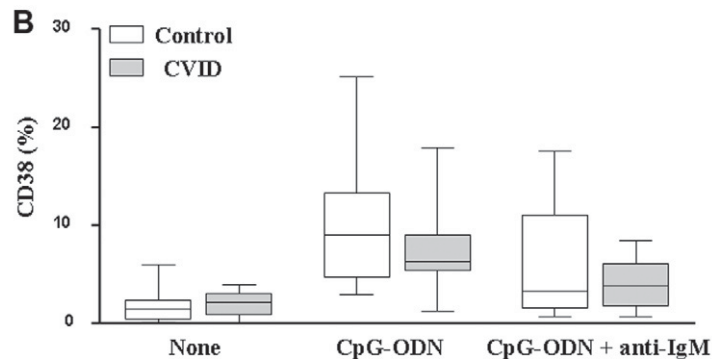
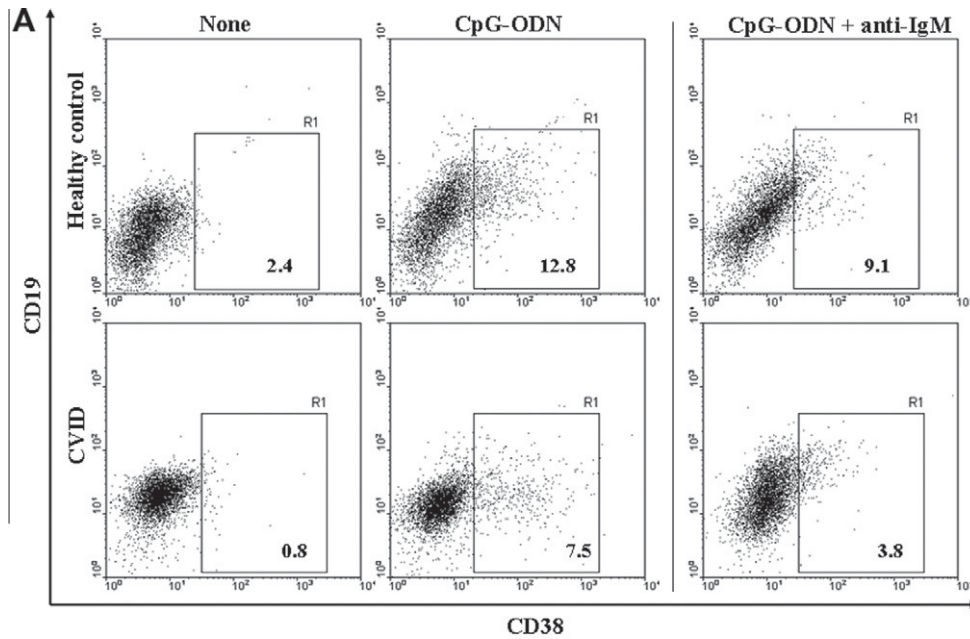


Fig. 1. Differentiation of CD38⁺ expressing B cells from CVID patients and controls stimulated with CpG-ODN with and without anti-IgM. (A) Shows representative dot-plots with the percentage of CD38⁺ expressing B cells (boxes) from a healthy control (upper row) and a CVID patient (lower row). (B) Shows the percentage of CD38⁺ expressing B cells on CVID patients ($n = 15$; grey boxes) and controls ($n = 16$; white boxes).

and percentiles 25th and 75th (interquartile range-IQR). The Mann–Whitney test was used to compare differences between CVID patients and controls. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Differentiation of purified B cells after stimulation with CpG-ODN with or without anti-IgM

After 11 days in culture, the percentage of unstimulated B cells from CVID patients expressing CD38 was not different from that of controls (2.12 IQR: 0.91–3.029% vs. 1.45 IQR: 0.45–2.35%). Stimulation with CpG-ODN alone or in the presence of anti-IgM induced the differentiation of purified B cells into cells CD38⁺ expressing cells in patients and controls (Fig. 1A). Although the percentage of B cells that differentiate to CD38⁺ expressing cells was lower in anti-CpG-ODN CVID stimulated B cells than in controls (6.33 IQR: 5.40–8.96% vs. 9.07 IQR: 4.65–13.24%), the differences were not significant. When anti-IgM was added to the culture, we did not find significant differences between patients and controls, either (3.83 IQR: 1.81–6.07% vs. 3.24 IQR: 1.54–11.09%) (Fig. 1B).

3.2. Differentiation of purified B cells after stimulation with anti-CD40 + IL21 with or without anti-IgM

No differentiation to CD38⁺ expressing cells was induced by stimulation with anti-CD40 alone or anti-CD40 and anti-IgM (Fig. 2A). This is consistent with the fact that stimulation through CD40 or BCR alone or in combination is able to induce activation of B cells, but not their final differentiation into immunoglobulin secreting cells. Stimulation with IL21 in the presence of anti-CD40 or anti-CD40 and anti-IgM induced the differentiation of purified B cells into CD38⁺ expressing cells in patients and controls (Fig. 2A). Although the percentage of B cells that differentiated into CD38⁺ expressing cells was lower in anti-CD40 + IL21 CVID stimulated B cells than in controls (11.35 IQR: 5.62–20.14% vs. 20.10 IQR: 11.56–26.16%), the differences were not significant. In contrast, when anti-IgM was added to the culture, significant differences were found between patients and controls (9.36 IQR: 6.12–13.39% vs. 22.76 IQR: 13.87–29.16%; $p < 0.05$) (Fig. 2B).

3.3. IgM secretion after stimulation with CpG-ODN or with anti-CD40 + IL21

Purified B lymphocytes from CVID patients stimulated with CpG-ODN produced lower levels of IgM than B cells from normal

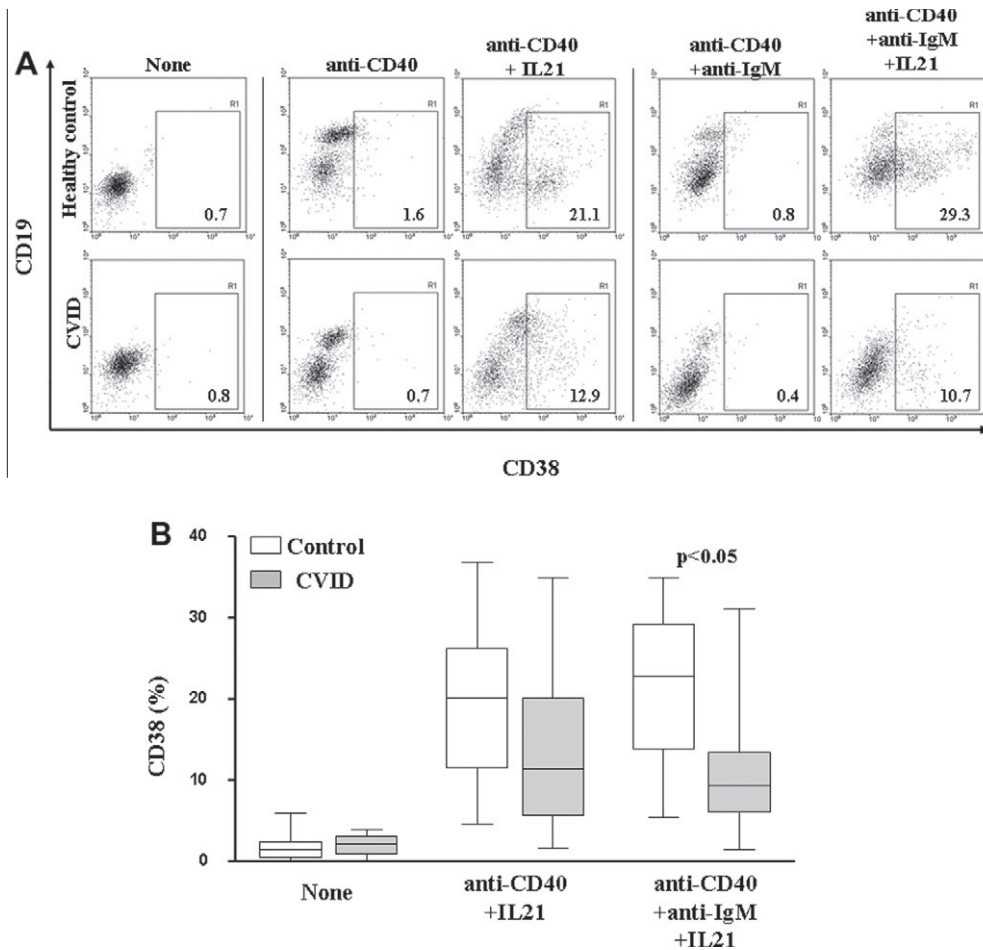


Fig. 2. Differentiation of CD38⁺ expressing B cells from CVID patients and controls stimulated with combinations of anti-CD40, IL21 and anti-IgM. (A) Shows representative dot-plots with the percentage of CD38⁺ expressing B cells (boxes) from a healthy control (upper row) and a CVID patient (lower row). Stimulation with anti-CD40 or anti-CD40 and anti-IgM did not induce the expression of CD38 without IL21. (B) Shows the percentage of CD38⁺ expressing B cells on CVID patients ($n = 15$; grey boxes) and controls ($n = 16$; white boxes) B cells after stimulation with anti-CD40 and IL21 or anti-CD40, IL21 and anti-IgM.

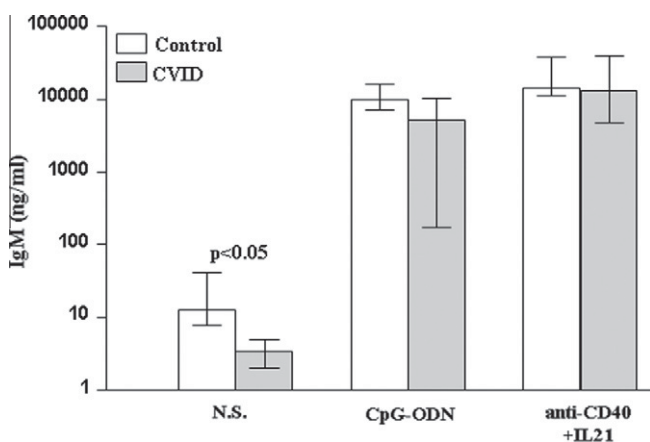


Fig. 3. Production of IgM (ng/ml) by purified B cells from CVID patients ($n = 15$; grey bars) and controls ($n = 16$; white bars) stimulated with CpG-ODN or anti-CD40 and IL21.

controls (5215 IQR: 174–10387 vs. 10049 IQR: 7057–15824 ng/ml), although the differences were not significant. However, purified B lymphocytes from CVID patients stimulated with anti-CD40 + IL21 produced similar levels of IgM than those of normal controls (13024 IQR: 4797–39996 vs. 14226 IQR: 11374–38289 ng/ml) (Fig. 3). Production of IgM in cultures stimulated

with CpG-ODN or with anti-CD40 + IL21 in the presence of anti-IgM could not be evaluated due to interferences with the detection system.

3.4. IgG and IgA secretion after stimulation with CpG-ODN with or without anti-IgM

Purified B lymphocytes from CVID patients stimulated with CpG-ODN produced significantly lower levels of IgG than those of normal controls (93 IQR: 66–1658 vs. 2082 IQR: 1218–6388 ng/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4, upper left panel) and also lower levels of IgA (281 IQR: 38–7183 vs. 5865 IQR: 3004–9325 ng/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4, lower left panel).

The differences between CVID B lymphocytes from patients and controls were maintained when anti-IgM was added to the culture system both for IgG (267 IQR: 99–667 vs. 2249 IQR: 1090–4845 ng/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4, upper left panel) and IgA (32 IQR: 21–5353 vs. 5309 IQR: 3922–10224 ng/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4, lower left panel).

3.5. IgG and IgA secretion after stimulation with anti-CD40 + IL21 with or without anti-IgM

Purified B lymphocytes from CVID patients stimulated with CD40 + IL21 produced significantly lower levels of IgG than these of normal controls (2026 IQR: 955–9421 vs. 34912 IQR: 8149–72204 ng/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4, upper right panel) and also lower

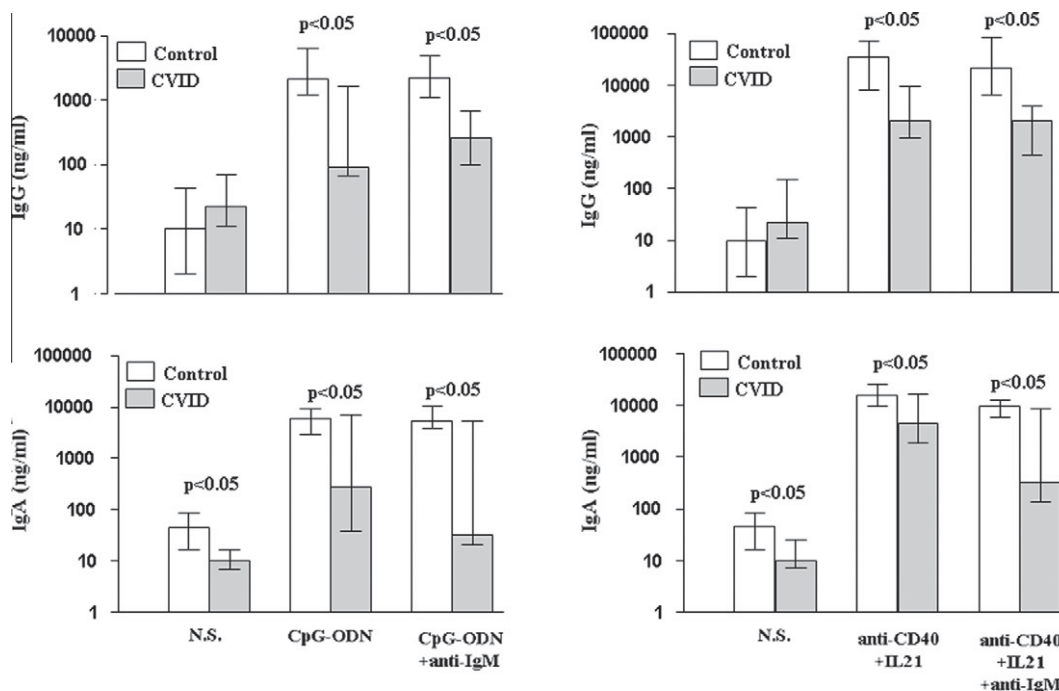


Fig. 4. Production of IgG (upper panels) and IgA (lower panels), both in ng/ml, by purified B cells from CVID patients ($n = 15$; grey bars) and controls ($n = 16$; white bars) stimulated with CpG-ODN with or without anti-IgM (left panels) or anti-CD40 and IL21 with or without anti-IgM (right panels).

levels of IgA (4403 IQR: 1873–16295 vs. 15918 IQR: 9791–24989 ng/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4, lower right panel).

The differences between CVID B lymphocytes from patients and controls were maintained when anti-IgM was added to the culture system both for IgG (2034 IQR: 449–4036 vs. 21606 IQR: 6535–83821 ng/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4, upper right panel) and IgA (322 IQR: 138–8434 vs. 9722 IQR: 5892–13071 ng/ml; $p < 0.05$) (Fig. 4, lower right panel).

4. Discussion

An unknown B cell maturation and differentiation defect leads to abnormal distribution of memory B cells subpopulations and diminished antibody production in CVID patients. In this study we report that purified B cells from CVID patients show an impaired differentiation in response to two distinct stimulating combinations: CpG-ODN signalling through TLR9 (simulating T independent activation) vs. IL21 stimulation in combination with anti-CD40 (simulating T dependent activation). Simultaneous activation through BCR (stimulation with anti-IgM) does not correct the deficiencies. Two findings supported this conclusion: (a) CVID B cell differentiation to plasma cells was lower than that of controls with all the stimuli used, although differences were significant only when cells were stimulated with anti-CD40, IL21 and anti-IgM and (b) the production of IgG and IgA was significantly lower than that of controls whatever the stimuli used and irrespectively of the differentiation to plasma cells.

Isotype switching is a critical step in the differentiation of B lymphocytes and the generation of protective humoral immune responses. Different isotypes are related to the immune response to distinct pathogens and are generated after antigen exposure in normal individuals [28–30]. Accordingly, several immunodeficiency conditions are related to the lack of specific isotypes like selective IgA deficiency [31], IgG subclass deficiency [29,30] or hyper-IgM syndromes [32]. Common variable immunodeficiency patients have reduced serum levels of IgG with reduced IgA and/or

IgM and suffer from recurrent sinopulmonary infections [31,33,34]. Isotype switching by antigen primed B cells requires two signals: a costimulatory signal from CD4⁺ T cells (e.g. CD40L) and the contribution of cytokines. Several cytokines like IL4, IL10, IL13, IL21 and TGF β have been demonstrated as switch factors for the in vitro production of IgG, IgA and IgE by activated B cells. However, there is still controversy regarding the specific role of every cytokine to direct B cells to the production of different Ig isotypes. On the other hand, some stimuli like CpG-ODN are able to induce isotype switch and differentiation to plasma cells and immunoglobulin production by B cells [35–37] and this effect can be modulated by BCR stimulation [38,39].

We have demonstrated in this study that purified B cells from CVID patients have an impaired differentiation (Fig. 2) and secrete lower levels of IgG and IgA than normal controls in response to anti-CD40 and IL21 (simulating T dependent activation) (Fig. 4). This is in contrast with a recent paper by Borte et al. that suggests IL21 restoration of Ig production in CVID patients [26]. Several reasons can explain these discrepancies. First, we have used purified B cells instead of PBMC in our cultures, what avoids the influence of other lymphocyte populations present in culture in the final level of Ig secretion. However, primary T cell defects affecting the process of B cell maturation can not be excluded as a cause of the observed B cell failure [40–41]. Second, we have used IL21 as the only cytokine switch factor (instead of a combination of IL4 and IL21) to avoid interferences of other cytokines in the final differentiation of B cells. Avery et al. [42] have demonstrated that there is a dynamic interplay between IL4 and IL21 in regulating the production of IgG subclasses and IgA: although individually both ILs induce preferential switch to different IgG subclasses by CD40L stimulated B cells, IL4 and IL21 synergistically increase the generation of IgG1, but IL4 abolishes IL21 induced switch to IgA. For this reason, we decided to use purified B cells and evaluate the direct and only effect of IL21 on their differentiation into Ig secreting cells in CVID patients. Third, the methodology used to evaluate Ig production by B cells was also different and can contribute to the found discrepancies. We used a Cytometric Bead Array method that quantifies the total

amount of Igs produced in supernatant cultures, while Borte et al. used an Elispot method and converted the results into arbitrary units. The fact that, in contrast with IgG and IgA, the secretion of IgM was similar in stimulated B cells from patients and controls suggest that there may be a switch defect in the B cells from CVID patients (Fig. 3). In spite of that, the switch machinery may be partially active, because even B cells from patients who lack memory B cells were able to produce IgG and IgA in culture.

Ig production depends both on the number of Ig producing cells and the secretion rate of each cell. Recently, Henn et al. have demonstrated that stimulation with CpG-ODN and cytokines induces heterogeneous secretion rates on B cells. In contrast, stimulation with anti-CD40 and IL21 induces the appearance of a high-rate IgG secreting cell population in B cells with otherwise low per-cell IgG secretion rates [39]. For this reason we investigated IgG and IgA production by purified B cells from CVID patients stimulated with CpG-ODN (as a T independent stimulus) and compared it to anti-CD40 and IL21 stimulation. We have recently described that B cells from CVID patients show impaired activation and proliferation in response to CpG-ODN and *S. pneumoniae* and *H. Influenzae* extracts [43]. Yu et al. have demonstrated that production of IgG and IgA after stimulation with TLR7 or TLR9 agonists is impaired in CVID patients, but their experiments were also done using PBL instead of purified B cells [44]. In our hands, CpG-ODN stimulation was less efficient than anti-CD40 and IL21 at inducing plasma cell differentiation and Ig secretion by purified B cells from both controls and patients. Using purified B cells from CVID patients, we demonstrated that differentiation to plasma cells induced by CpG-ODN, although lower than that of controls, is not significantly different (Fig. 1). In spite of this fact, production of IgG and IgA was also severely impaired in patients (Fig. 4) compared to controls and again, the addition of anti-IgM to the culture did not correct the deficiencies. In contrast with results obtained with anti-CD40 and IL21, secretion of IgM after stimulation with CpG-ODN is impaired in B cells from patients (although the differences are not significant) suggesting a more profound defect of this signalling pathway not restricted to switch activity (Fig. 3).

In summary, our results indicate that, although acting through different pathways, neither CpG-ODN nor anti-CD40 and IL21 stimulation are able to induce B cells from CVID patients to produce normal levels of Igs, and this defect is not corrected by the addition of anti-IgM. This may imply a signalling defect in both pathways or alternatively it may indicate that B cells from CVID patients die in culture after stimulation. We conclude that B cells from CVID patients have a generalised response defect to different stimuli. This failure may underlie the hypogammaglobulinaemia and the poor vaccine responses characteristic of these patients. A better understanding of the B cell deficiencies in CVID patients could help to better classify these patients and also to design vaccination strategies to achieve the production of protective antibodies.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Fernando Díaz-Espada for kindly revising this manuscript, Guillem Frontera for statistical advice and Cristina Martínez and Mónica Portell for their technical assistance.

This work has been supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 08/0362). The work of A.C. has been supported by a grant (CEB08/001) from the "Conselleria d'Economia i Innovació, Govern de les Illes Balears", Spain, and the European Social Fund (ESF).

References

- [1] P. Wood, S. Stanworth, J. Burton, et al., Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 410–423.
- [2] C. Cunningham-Rundles, C. Bodian, Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients, *Clin. Immunol.* 92 (1999) 34–48.
- [3] C. Bacchelli, S. Buckridge, A.J. Thrasher, H.B. Gaspar, Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 401–409.
- [4] T.W. Kuijpers, R.J. Bende, P.A. Baars, et al., CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 214–222.
- [5] M.C. Van Zelm, J. Smet, B. Adams, et al., CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1265–1274.
- [6] J. Iglesias, N. Matamoros, S. Raga, J.M. Ferrer, J. Mila, CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis, *Clin. Exp. Immunol.* 117 (1999) 138–146.
- [7] M.E. North, A.D. Webster, J. Farrant, Defects in proliferative responses of T cells from patients with common variable immunodeficiency on direct activation of protein kinase C, *Clin. Exp. Immunol.* 85 (1991) 198–201.
- [8] J.M. Ferrer, J. Iglesias, M. Hernandez, N. Matamoros, Alterations in interleukin secretion (IL-2 and IL-4) by CD4 and CD4 CD45RO cells from common variable immunodeficiency (CVI) patients, *Clin. Exp. Immunol.* 102 (1995) 286–289.
- [9] N. Rezaei, J.B. Wing, A. Aghamohammadi, et al., B-cell-T-cell activation and interaction in common variable immunodeficiency, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 355–362.
- [10] N. Martinez-Pomar, S. Raga, J.M. Ferrer, et al., Elevated serum interleukin (IL)-12p40 levels in common variable immunodeficiency disease and decreased peripheral blood dendritic cells: analysis of IL-12p40 and interferon-gamma gene, *Clin. Exp. Immunol.* 144 (2006) 233–238.
- [11] C. Wehr, T. Kivioja, C. Schmitt, et al., The EURO class trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency, *Blood* 111 (2008) 77–85.
- [12] R. Carsetti, M.M. Rosado, S. Donnanno, et al., The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (2005) 412–417.
- [13] J. Punnonen, L. Kainulainen, O. Ruuskanen, J. Nikoskelainen, H. Arvilommi, IL-4 synergizes with IL-10 and anti-CD40 MoAbs to induce B-cell differentiation in patients with common variable immunodeficiency, *Scand. J. Immunol.* 45 (1997) 203–212.
- [14] S. Zielen, P. Bauscher, D. Hofmann, S.C. Meuer, Interleukin 10 and immune restoration in common variable immunodeficiency, *Lancet* 342 (1993) 750–751.
- [15] E.M. Eisenstein, K. Chua, W. Strober, B cell differentiation defects in common variable immunodeficiency are ameliorated after stimulation with anti-CD40 antibody and IL-10, *J. Immunol.* 152 (1994) 5957–5968.
- [16] R.L. Coffman, D.A. Leberman, P. Rothman, Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching, *Adv. Immunol.* 54 (1993) 229–270.
- [17] D. Konforte, N. Simard, C.J. Paige, IL-21: an executor of B cell fate, *J. Immunol.* 182 (2009) 1781–1787.
- [18] R.L. Coffman, D.A. Leberman, B. Shrader, Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes, *J. Immunol.* 182 (2009) 8–13.
- [19] L.K. Poulsen, L. Hummelshoj, Triggers of IgE class switching and allergy development, *Ann. Med.* 39 (2007) 440–456.
- [20] C.R. Ruprecht, A. Lanzavecchia, Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 810–816.
- [21] R. Spolski, W.J. Leonard, Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity, *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 57–79.
- [22] R. Ettinger, G.P. Sims, A.M. Fairhurst, et al., IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells, *J. Immunol.* 175 (2005) 7867–7879.
- [23] S.G. Tangye, D.T. Avery, E.K. Deenick, P.D. Hodgkin, Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses, *J. Immunol.* 170 (2003) 686–694.
- [24] R. Ettinger, G.P. Sims, R. Robbins, et al., IL-21 and BAFF/BlyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells, *J. Immunol.* 178 (2007) 2872–2882.
- [25] V.L. Bryant, C.S. Ma, D.T. Avery, et al., Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells, *J. Immunol.* 179 (2007) 8180–8190.
- [26] S. Borte, Q. Pan-Hammarstrom, C. Liu, et al., Interleukin-21 restores immunoglobulin production ex vivo in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency, *Blood* 114 (2009) 4089–4098.
- [27] M. Perez-Andres, B. Paiva, W.G. Nieto, et al., Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic, *Cytometry part B. 78B (suppl. 1)* (2010) S47–S60.
- [28] C.M. Snapper, J.J. Mond, Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching, *Immunol. Today* 14 (1993) 15–17.
- [29] R. Jefferis, D.S. Kumararatne, Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance, *Clin. Exp. Immunol.* 81 (1990) 357–367.
- [30] T.F. Smith, IgG subclasses, *Adv. Pediatr.* 39 (1992) 101–126.
- [31] L. Hammarstrom, I. Vorechovsky, D. Webster, Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID), *Clin. Exp. Immunol.* 120 (2000) 225–231.
- [32] A. Durandy, P. Revy, K. Imai, A. Fischer, Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects, *Immunol. Rev.* 203 (2005) 67–79.

- [33] M. Di Renzo, A.L. Pasqui, A. Auteri, Common variable immunodeficiency: a review, *Clin. Exp. Med.* 3 (2004) 211–217.
- [34] C. Cunningham-Rundles, P.P. Ponda, Molecular defects in T- and B-cell primary immunodeficiency diseases, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 880–892.
- [35] C.D. Landers, S. Bondada, CpG oligodeoxynucleotides stimulate cord blood mononuclear cells to produce immunoglobulins, *Clin. Immunol.* 116 (2005) 236–245.
- [36] J.A. Hanten, J.P. Vasilakos, C.L. Riter, et al., Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists, *BMC Immunol.* 9 (2008) 39.
- [37] J. Huggins, T. Pellegrin, R.E. Felgar, et al., CpG DNA activation and plasma-cell differentiation of CD27- naive human B cells, *Blood* 109 (2007) 1611–1619.
- [38] L. Rui, C.G. Vinuesa, J. Blasioli, C.C. Goodnow, Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 594–600.
- [39] A.D. Henn, J. Rebhahn, M.A. Brown, et al., Modulation of single-cell IgG secretion frequency and rates in human memory B cells by CpG DNA, CD40L, IL-21, and cell division, *J. Immunol.* 183 (2009) 3177–3187.
- [40] N. Pozzi, L. Gaetaniello, B. Martire, et al., Defective surface expression of attracting on T cells in patients with common variable immunodeficiency (CVID), *Clin. Exp. Immunol.* 123 (2001) 99–104.
- [41] A. Giovannetti, M. Pierdominici, F. Mazzetta, et al., Unravelling the complexity of T cell abnormalities in common variable immunodeficiency, *J. Immunol.* 178 (2007) 3932–3943.
- [42] D.T. Avery, V.L. Bryant, C.S. Ma, M.R. de Waal, S.G. Tangye, IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4, *J. Immunol.* 181 (2008) 1767–1779.
- [43] D. Escobar, J. Pons, A. Clemente, et al., Defective B cell response to TLR9 ligand (CpG-ODN), *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* extracts in common variable immunodeficiency patients, *Cell. Immunol.* 262 (2010) 105–111.
- [44] J.E. Yu, A.K. Knight, L. Radigan, et al., Toll-like receptor 7 and 9 defects in common variable immunodeficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (2009) 349–356.

CD27⁺ B cells from a subgroup of common variable immunodeficiency patients are less sensitive to apoptosis rescue regardless of interleukin-21 signalling

A. Clemente,^{*†} J. Pons,^{*†} N. Lanio,^{*†}
N. Matamoros^{*†} and J. M. Ferrer^{*†}

^{*}Department of Immunology, Hospital
Universitari Son Espases and [†]Fundació
d'Investigació Sanitària de les Illes Balears
(FISIB), Palma de Mallorca, Spain

Accepted for publication 30 May 2013
Correspondence: J. M. Ferrer, Hospital
Universitari Son Espases, Carretera Valldemossa
79, 07010 Palma de Mallorca, Spain.
E-mail: juanam.ferrer@ssib.es

Summary

Common variable immunodeficiency (CVID) is a primary immunodeficiency characterized by hypogammaglobulinaemia and recurrent infections. Although the underlying cause is unknown, B cells from most CVID patients fail to differentiate to memory or plasma cells. We investigated if increased apoptosis could influence the fate of B cells. For this purpose we activated purified B lymphocytes of CVID patients with a surrogate T-dependent (anti-CD40) or T-independent [cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) or anti-immunoglobulin (IgM)] stimulus with or without interleukin (IL)-21. We found that CD27⁺ B cells were more sensitive than CD27⁻ B cells to spontaneous apoptosis and less sensitive to rescue from apoptosis. The addition of IL-21 down-modulated the protective effect of all the stimuli on CD27⁻ B cells and the protective effect of CpG-ODN and anti-IgM on CD27⁺ B cells. In contrast, IL-21 rescued unstimulated CD27⁻ B cells and improved the rescue of anti-CD40-stimulated CD27⁺ B cells. When we compared patients and controls, mainly CD27⁺ B cells from MB0 patients were less sensitive to rescue from apoptosis than those from MB1 patients and controls after activation, irrespective of the IL-21 effect. Increased apoptosis during an immune response could result in lower levels of immunoglobulin production in these patients.

Keywords: apoptosis, CD27⁺ B cells, CVID, IL-21, TRAIL

Introduction

Common variable immunodeficiency (CVID) is the most frequent symptomatic primary humoral immunodeficiency. It includes a heterogeneous group of disorders of unknown aetiology characterized by deficient antibody production, recurrent respiratory infections by encapsulated bacteria, mainly *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*, and poor response to vaccination. Patients benefit from immunoglobulin replacement therapy [1–4]. Several genetic mutations and polymorphisms [inducible T cell co-stimulator (ICOS), tumour necrosis factor receptor superfamily, member 13b (TNFRS13B/TACI), CD19, CD20, CD81, B cell-activating factor receptor (BAFF-R) and CD21] have been described in fewer than 10% of CVID patients, while the underlying molecular defect remains unknown for most of them [5–7]. A vast array of immunological defects have been described in CVID patients, of which the most outstanding is abnormal late B cell differentiation to CD27⁺ memory B cells, switched-memory B cells

and plasma cells. Accordingly, patients have been classified depending on their number of naive, memory and switched-memory B cells [8,9]. Furthermore, a low percentage of memory B cells in CVID patients has been associated with a worse clinical presentation and poor response to vaccines [10–12]. Loss of memory B cells also occurs from the onset of acute HIV infection. Recently, low frequencies of CD27⁺ memory B cells and decreased production of antibodies have been described in successfully treated HIV patients in spite of drug-suppressed viraemia. Surface expression levels of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) on memory B cells correlated negatively with their peripheral blood frequency [13].

The generation of memory B cells and plasma cells is essential to establish efficient humoral immune responses. Co-operation of B cell receptor (BCR)-activated B cells with helper T cells is relevant and occurs through contact between T cell membrane molecules (CD40L, ICOS, etc.) and their corresponding B cell ligands [14]. The importance of several of these components of the immune system has

been exemplified by naturally occurring immunodeficiencies [15]. Furthermore, secretion of cytokines by T cells also instruct the differentiation of B cells, including interleukin (IL)-21 as one of the more potent cytokines for human B cell proliferation and differentiation [16–20]. Following antigenic stimulation, Toll-like receptor (TLR) can provide an additional signal for the differentiation of B cells and even substitute T cell-derived signals [21,22].

Apart from their effect on proliferation and differentiation, several of these stimuli also influence B cell survival. BCR activation has been shown to induce B cell apoptosis in the absence of survival signals such as that provided through CD40. Mainly produced by activated CD4⁺ follicular T cells [19,23,24], IL-21 is a type I cytokine that belongs to a family that uses the common cytokine receptor γ -chain as a component of their receptors [25,26]. The stimulatory or inhibitory effect of IL-21 depends on the maturation and activation status of the B cell, the co-stimulatory accompanying signal and the presence of other cytokines. In humans, IL-21 is a potent inducer of plasma cell differentiation if combined with anti-CD40 [16], induces class-switch recombination and secretion of immunoglobulin (Ig)G and IgA in pre-switched IgM memory B cells [19,27] and is able to induce plasma cell differentiation and immunoglobulin production even by naive B cells [16]. However, IL-21 triggers B cell death when BCR is ligated [16,28]. A balance between apoptosis-inducing and survival signals must exist to preserve B cell homeostasis.

We have shown previously that, although acting through different pathways, neither cytosine–phosphate–guanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) nor anti-CD40 with IL-21 stimulation are able to induce B cells from CVID patients to produce normal levels of immunoglobulins, and this defect is not corrected by the addition of anti-IgM [29]. This could imply a signalling defect in both pathways or, alternatively, it could indicate that B cells from CVID patients die in culture after stimulation. In this study we evaluated the effect of IL-21 on spontaneous and TLR-9-, CD40- or BCR-induced apoptosis or proliferation of CD27⁻ and CD27⁺ B cells from CVID patients. The aim of the study was to ascertain if differences in response between controls and patients could determine a different fate of CD27⁻ and CD27⁺ B cells and explain the imbalanced B cell homeostasis and finally immune deficiency in CVID patients.

Methods

Patients

Twenty-two CVID patients were selected according to diagnostic criteria of the International Union for Immunological Societies scientific group for primary immunodeficiency diseases. Patients were classified into three groups according

to Piqueras *et al.* [8]: (i) CVID patients with a low percentage of CD27⁺ (memory phenotype) B cells or MB0; (ii) patients with normal IgD⁺CD27⁺ (non-switched-memory phenotype) and a low percentage of IgD⁻CD27⁺ (switched-memory phenotype) B cells or MB1; and (iii) patients with normal percentages of CD27⁺ B cells or MB2. Patients received intravenous gamma globulin therapy every 21 days and did not suffer from infections at the time of the study. Peripheral blood samples were collected before gamma globulin replacement. Table 1 summarizes the patients' age, gender and percentages of B cell subpopulations. Twenty-two age- and sex-matched healthy blood donors were included as controls. The study was conducted according to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and approved by CEIC (Balearic Islands Clinical Research Ethics Committee; IB 1564/11 PI). Informed consent was obtained from all subjects.

B lymphocyte purification, CD27⁻ and CD27⁺ B cell sorting and cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 40 ml of heparinized blood by density gradient centrifugation. B lymphocytes were obtained from PBMC by negative selection using the Dynabeads Untouched™ human B cells separation kit (Dyna; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. CD27⁻ and CD27⁺ B cells were sorted from 4×10^6 purified B cells using a Coulter Epics Altra Hypersort™ system (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Purified B cells or sorted CD27⁻ and CD27⁺ B cells were resuspended in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS), glutamine (2 mM) and antibiotics (penicillin and streptomycin). Purified B cells (1×10^6 /ml) were labelled during 5 min at room temperature (RT) (25°C) with 1 μ g carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

CFSE-free purified B cells, 5×10^4 , or sorted CD27⁻ and CD27⁺ B cells and CFSE-labelled purified B cells were cultured in 96-well plates and stimulated with CpG-ODN (0.6 μ g/ml; CpG-ODN type B; InvivoGen, San Diego, CA, USA), F(ab)₂ goat anti-human IgM (5 μ g/ml; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), anti-human CD40/TNFRSF5 antibody (1 μ g/ml; R&D Systems, Abingdon, UK) without or with human recombinant IL-21 (100 ng/ml; Biosource, Cambridge, MA, USA). Cultures were maintained for 3 days at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Flow cytometry

B cell purity, apoptosis, proliferation and surface marker expression were analysed by flow cytometry using an Epics FC500 flow cytometer and the CXP software (Beckman Coulter).

Table 1. Age, gender and B lymphocyte subpopulations of common variable immunodeficiency (CVID) patients.

Patient	Age (years)	Gender (male/female)	CD19 (%)	CD19 ⁺ (%)			Group
				Naive IgD ⁺ CD27 ⁻	Unswitched memory IgD ⁺ CD27 ⁺	Switched memory IgD ⁻ CD27 ⁺	
1	43	M	5	94	5	<1	MB0
2	61	M	8	96	3	<1	MB0
3	29	M	15	95	<1	<1	MB0
4	29	F	9	87	6	2	MB0
5	61	F	19	84	5	5	MB0
6	60	F	5	95	1	1	MB0
7	60	M	2	92	3	<1	MB0
8	67	F	5	96	3	<1	MB0
9	34	F	16	70	2	3	MB0
10	38	M	4	90	5	1	MB0
11	23	M	14	91	4	<1	MB0
12	27	F	8	97	2	<1	MB0
13	73	F	27	72	27	<1	MB1
14	67	F	14	64	25	4	MB1
15	67	F	7	73	18	5	MB1
16	46	F	16	77	20	1	MB1
17	47	F	9	75	17	5	MB1
18	33	F	9	84	8	4	MB1
19	60	F	26	76	7	6	MB1
20	67	F	16	84	12	1	MB1
21	82	F	2	39	14	33	MB2
22	44	F	20	52	10	20	MB2

Current age (years), gender (M: male, F: female); percentage of peripheral blood B lymphocytes (CD19⁺) and percentages of naive [immunoglobulin (Ig)D⁺CD27⁻], memory unswitched (IgD⁺CD27⁺) and memory-switched (IgD⁻CD27⁺) B cell subpopulations (referred to total CD19⁺ B lymphocytes) and Piqueras classification of CVID patients.

Cell purity was assessed using the following monoclonal antibody combinations: anti-CD45 fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD19 phycoerythrin cyanin 5 (PCy5) (both from Coulter Immunotech) and anti-CD3 phycoerythrin (PE) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) for purified B cells and anti-CD19 PCy7 plus anti-CD27 PCy5 (both from Coulter Immunotech) for sorted CD27⁻ and CD27⁺ B cells. Purity was always superior to 95%.

Annexin V and propidium iodide staining protocol (Becton Dickinson) was performed to evaluate apoptosis of CFSE-free purified (Fig. 1a) and sorted CD27⁻ and CD27⁺ B cells (Fig. 1b,c), following the manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^5 cultured CFSE-free cells were harvested, stained with anti-CD19 PCy7 and anti-CD27 PCy5, washed with cold phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in 100 μ l binding buffer and stained with 5 μ l of a 1.2 μ g/ml solution of annexin V-FITC and 5 μ l of a 50 μ g/ml solution of propidium iodide. Cells were incubated for 15 min at RT (25°C) in the dark, resuspended in 400 μ l of binding buffer and analysed. Propidium iodide positivity was used to exclude necrotic CD19⁺ cells and percentage of apoptotic cells (annexin V-FITC-positive) was calculated from the resulting population. Rescue from apoptosis was expressed as [(% baseline apoptosis - % post-stimulation apoptosis)/

% baseline apoptosis] \times 100, to indicate the decrease in apoptosis induced by each stimulus related to baseline apoptosis.

A CFSE dilution protocol was used to evaluate the proliferation of CFSE-labelled cultured purified B cells. Proliferation index was calculated on CD19⁺CD27⁻ or CD19⁺CD27⁺ stained B cells attending to the number of divisions and the percentages of cells in each round of division, as described previously by Quah *et al.* [30].

TRAIL expression was evaluated in whole blood samples stained with anti-CD19 energy-coupled dye (ECD), anti-CD27 PCy7 (both from Coulter Immunotech) and anti-TRAIL-PE (Becton Dickinson)-conjugated monoclonal antibodies. TRAIL median fluorescence intensity (MFI) was measured in previously gated CD19⁺CD27⁻ and CD19⁺CD27⁺ B cells.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 4.0 software (San Diego, CA, USA). Data are expressed as median and 25th and 75th percentiles. The Mann-Whitney *U*-test was used to compare differences between B cells subpopulations. The Kruskal-Wallis test was used to compare differences between CVID patients

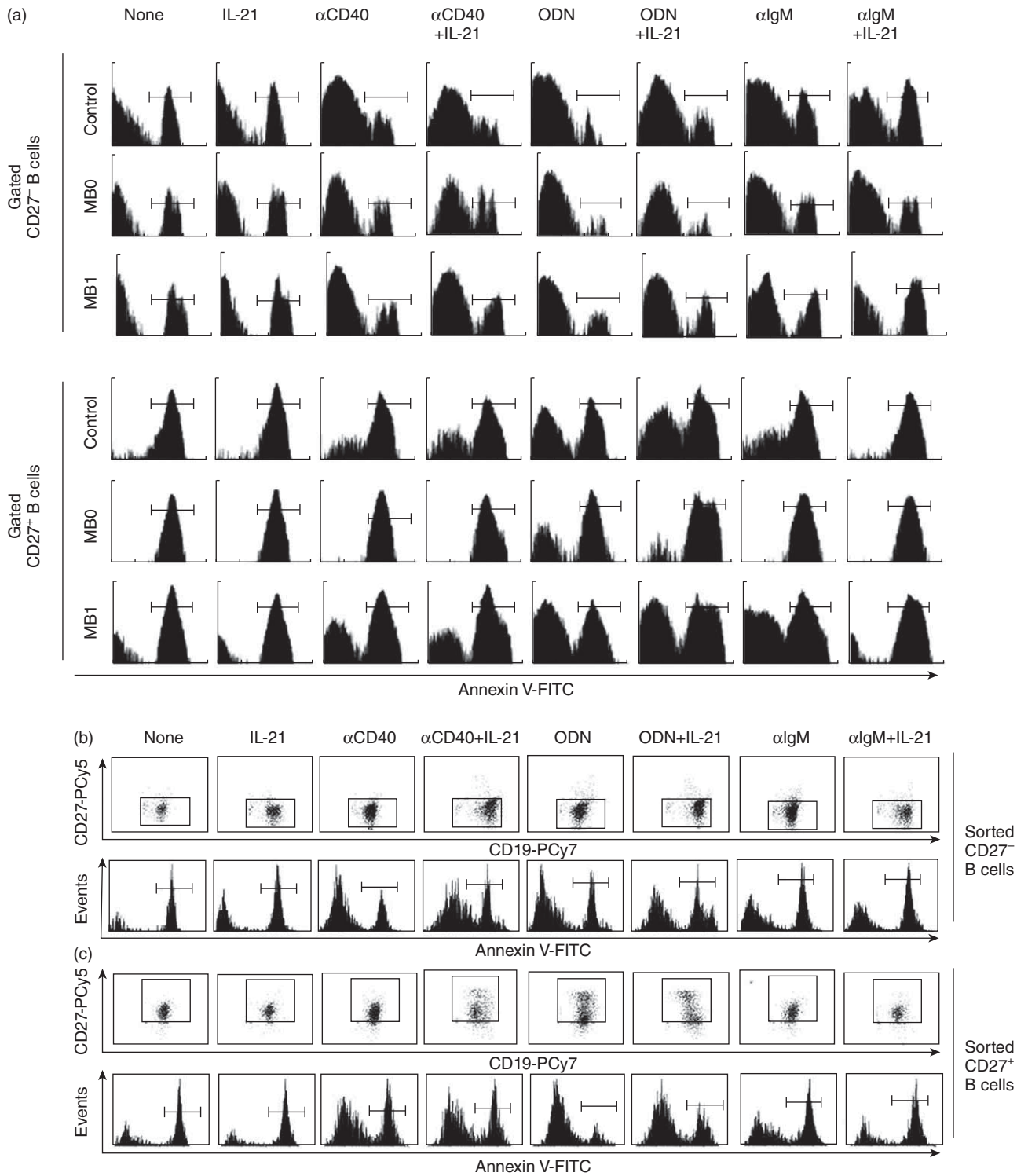


Fig. 1. Representative experiments of spontaneous and post-activation apoptosis of CD27⁻ and CD27⁺ B cells. Purified B cells from common variable immunodeficiency (CVID) patients and controls or sorted CD27⁻ and CD27⁺ B cells from controls were stimulated with different combinations of CD40, Toll-like receptor (TLR)-9, B cell receptor (BCR) ligands or interleukin (IL)-21. (a) Purified B cells: markers in histograms differentiate apoptotic [annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)-positive] from viable (annexin V-FITC-negative) cells on propidium iodide-free CD27⁻ (upper panel) or CD27⁺ (lower panel) gated cells. Histograms show a representative experiment from a healthy control (upper row) and CVID MB0 (middle row) and CVID MB1 (lower row) patients. (b–c) Sorted cells: CD27 expression (upper dot-plots rows) and apoptosis (lower histograms rows) of propidium iodide-free CD27⁻ (b) or CD27⁺ (c) sorted B cells. Dot plots and histograms are representative from three independent experiments performed on healthy controls.

groups and controls. The Wilcoxon test was used to compare differences between two paired groups of treatments (each stimulus with or without IL-21). A statistical test based on measures of central tendency comparison was not applicable to the particular case of anti-IgM combined with IL-21. A *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

CD27⁺ B cells are less sensitive to apoptosis rescue by single stimulus than CD27⁻ B cells

B cells die from apoptosis if maintained unstimulated in culture [31]. After 3 days, spontaneous apoptosis was higher in CD27⁺ than in CD27⁻ B cells (79.2 versus 57.6%, *P* < 0.001) (Fig. 2a).

When B cells are stimulated, they are rescued from apoptosis. The effectiveness of the rescue depends upon both the kind of stimulus used and the subpopulation of B cells. For CD27⁻ B cells, the strongest rescue effect was induced by anti-CD40 followed by CpG-ODN and to a lesser extent by anti-IgM, whereas for CD27⁺ B cells, CpG-ODN appeared to be the strongest rescue stimulus (Fig. 2b). Nevertheless, all the stimuli evaluated were more efficient in the CD27⁻ than in the CD27⁺ population: anti-CD40 (77.9 versus 23.9%, *P* < 0.001), CpG-ODN (71.4 versus 57.3%, *P* < 0.01) and anti-IgM (52.7 versus 36.9%; *P* < 0.01) (Fig. 2b).

Proliferation was evaluated simultaneously. Anti-CD40 and anti-IgM did not induce proliferation of either CD27⁻ or CD27⁺ B cells while CpG-ODN induced proliferation of both subpopulations (Table 2). Although CpG-ODN induced a lower level of proliferation on CD27⁻ than CD27⁺ B cells (PI = 0.1 versus PI = 1.8, respectively; *P* < 0.001) (Table 2), it induced higher rescue from apoptosis in the CD27⁻ population (Fig. 2b). These aforementioned results suggest that proliferation and rescue from apoptosis are two independent processes.

CD27⁻ and CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients are less sensitive to apoptosis rescue by single stimulus

CD27⁻ B cells from CVID MB0 patients were less sensitive to rescue from apoptosis when stimulated with a T-dependent stimulus (anti-CD40) than control subjects (65.4 versus 77.9%, *P* < 0.05) (Fig. 3a). They were also less sensitive to rescue from apoptosis when stimulated with a T-independent stimulus (CpG-ODN) than control subjects or CVID MB1 patients, although differences did not reach statistical significance (58.8 versus 71.4 and 63.0%, respectively, *P* = 0.075). CD27⁻ B cells from CVID MB1 patients were rescued from apoptosis similarly to controls, regardless of the stimulus used (Fig. 3a). After BCR engagement with anti-IgM CD27⁻ B cells from both CVID MB0 and MB1 patients were rescued equally from apoptosis than healthy controls.

Fig. 2. Spontaneous apoptosis and anti-CD40, cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) or anti-immunoglobulin (Ig)M activation-induced rescue from apoptosis of peripheral CD27⁻ and CD27⁺ B cells from healthy controls. (a) Percentage of apoptotic [annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)-positive/propidium iodide (PI)-negative] CD27⁻ (white bars) and CD27⁺ (grey bars) unstimulated B cells. (b) Percentage of rescued CD27⁻ and CD27⁺ B cells upon stimulation with anti-CD40, CpG-ODN or anti-IgM. Data are given as median and 25th to 75th percentiles from 22 independent experiments (Mann-Whitney *U*-test *P*-values: *P* < 0.01**, *P* < 0.001***).

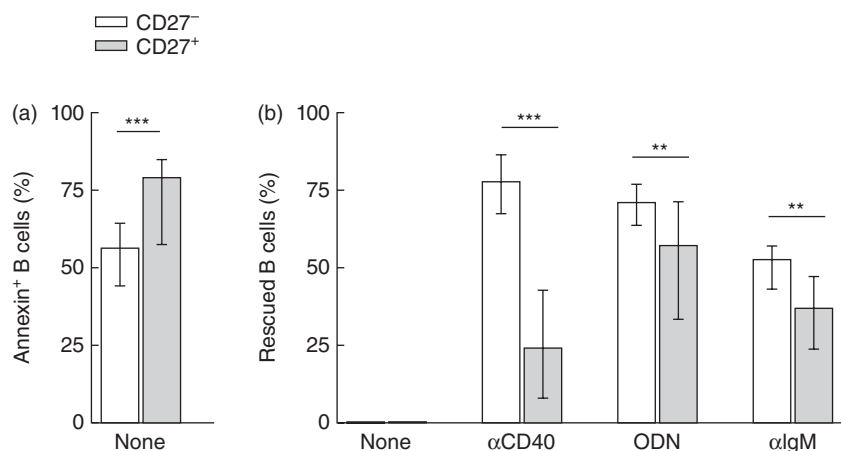


Table 2. Effect of interleukin (IL)-21 on CD27⁻ and CD27⁺ B cell proliferative responses.

	CD27 ⁻ B cells			CD27 ⁺ B cells			CD27 ⁻ versus CD27 ⁺ P-value	
	Lone	+ IL-21	P-value	Lone	+ IL-21	P-value	Lone	+ IL-21
Anti-IgM	0.0	0.0	n.s.	0.0	0.0	n.s.	n.s.	n.s.
Anti-CD40	0.0	0.4	***	0.0	1.0	***	n.s.	###
CpG-ODN	0.1	0.2	**	1.8	1.1	***	###	###

Proliferation index after anti-immunoglobulin (Ig)M, anti-CD40 or cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) activation with or without IL-21 co-stimulation in CD27⁻ and CD27⁺ B cells from healthy controls ($n = 19$). Proliferation index was calculated as described in the flow cytometry section and takes into account both the number of divisions and the percentage of cells in each round of division. Wilcoxon's test (left grid) was applied to evaluate the effect of IL-21 addition to each stimulus on CD27⁻ or CD27⁺ B cells (P values: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; n.s.: not significant). Mann-Whitney test (right grid) was used to compare differences between B cell subpopulations proliferative responses to single or IL-21-combined stimuli (P -values: ### $P < 0.001$; n.s.: not significant).

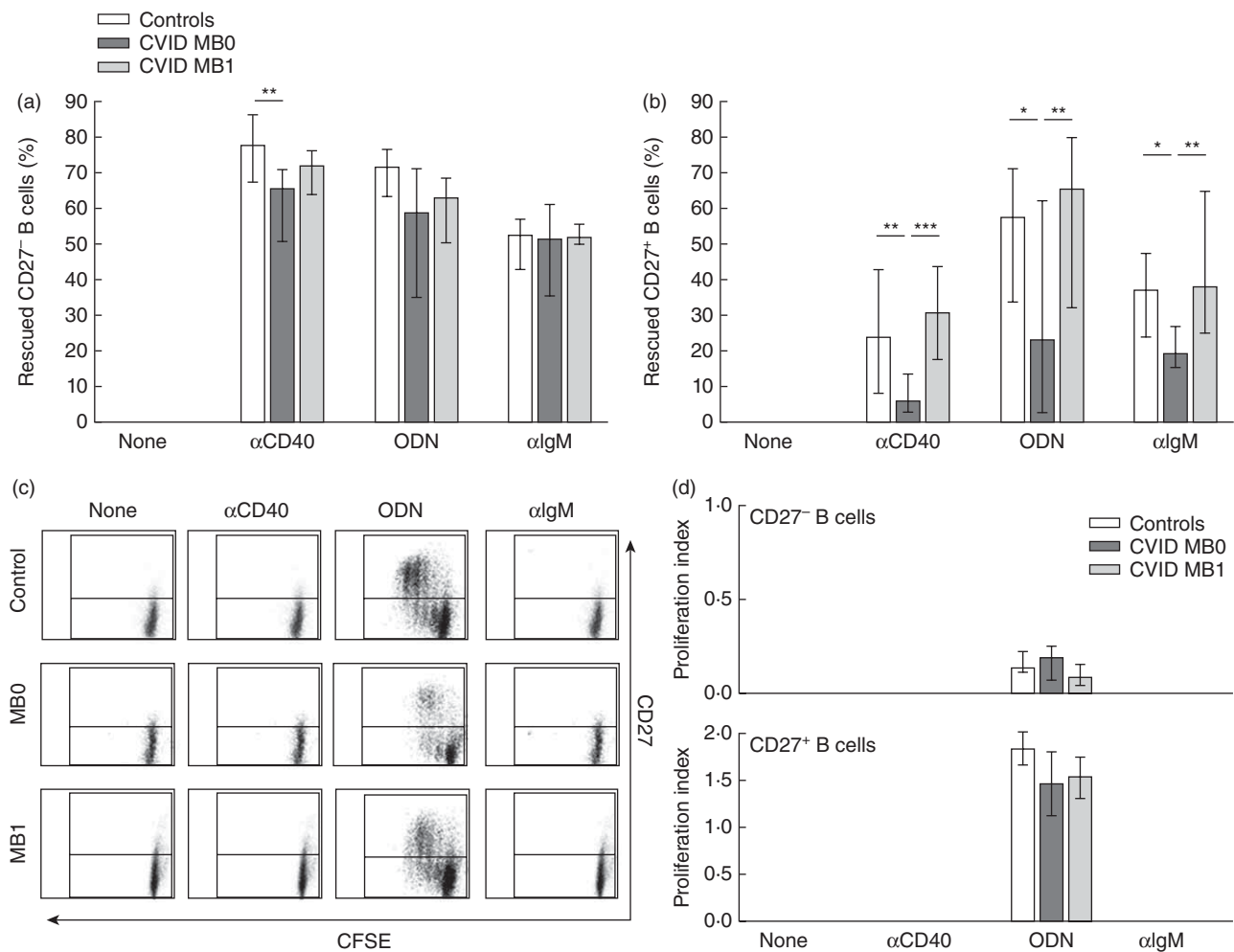


Fig. 3. Activation-induced rescue from apoptosis and proliferation of peripheral CD27⁻ and CD27⁺ B cells from common variable immunodeficiency (CVID) patients and healthy controls. (a) Percentage of rescued CD27⁻ and (b) CD27⁺ B cells upon stimulation with anti-CD40, cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) or anti-immunoglobulin (Ig)M in healthy controls ($n = 22$; white bars), CVID MB0 patients ($n = 12$; dark grey bars) and CVID MB1 patients ($n = 8$; light grey bars). (c) Representative dot-plots with dividing and non-dividing CD19⁺CD27⁻carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)⁺ (lower quadrants) and CD19⁺CD27⁺CFSE⁺ (upper quadrants) B cells from a healthy control (upper row), one CVID MB0 patient (middle row) and one CVID MB1 patient (lower row) after stimulation with anti-CD40, CpG-ODN or anti-IgM. (d) Proliferation index after anti-CD40, CpG-ODN or anti-IgM activation of CFSE-labelled CD27⁻ (upper panel) and CD27⁺ (lower panel) B cells from healthy controls ($n = 19$; white bars), CVID MB0 patients ($n = 8$; dark grey bars) and CVID MB1 patients ($n = 6$; light grey bars). No proliferation was detected with anti-CD40 and anti-IgM. Data are given as median and 25th to 75th percentiles (Kruskal-Wallis test P -values: $P < 0.05^*$; $P < 0.01^{**}$; $P < 0.001^{***}$).

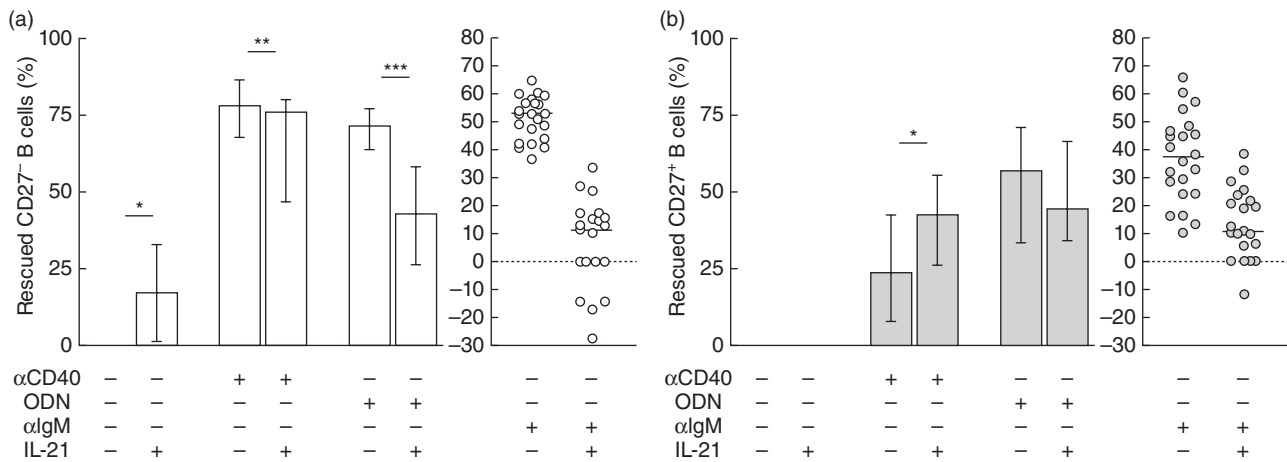


Fig. 4. Interleukin (IL)-21 effect on spontaneous apoptosis and activation-induced rescue from apoptosis of peripheral CD27⁻ and CD27⁺ B cells from healthy controls. (a) Percentage of rescued CD27⁻ and (b) CD27⁺ B cells upon stimulation with IL-21 alone or in combination with anti-CD40, cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) or anti-immunoglobulin (IgM). Data are given as median and 25th to 75th percentiles from 22 independent experiments (Wilcoxon's test P -values: $P < 0.05^*$; $P < 0.01^{**}$; $P < 0.001^{***}$).

CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients, stimulated with either a T-dependent (anti-CD40) or a T-independent stimulus (CpG-ODN), were less sensitive to apoptosis rescue than control subjects (6.0 versus 23.9%, $P < 0.01$; and 23.2 versus 57.3%, $P < 0.05$, respectively) and CVID MB1 patients (6.0 versus 30.6%, $P < 0.001$; and 23.2 versus 65.7%, $P < 0.01$, respectively). They were also less sensitive to rescue from apoptosis after BCR engagement with anti-IgM than control subjects (19.2 versus 36.9%, $P < 0.05$) or CVID MB1 patients (19.2 versus 38.2%, $P < 0.01$) (Fig. 3b). With either stimulus CD27⁺ B cells from CVID MB1 patients were rescued from apoptosis similarly to controls (Fig. 3b).

Thus, CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients appear to be resistant to apoptosis rescue irrespective of the stimulus. This was not linked to differences in proliferation because both CD27⁻ and CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients proliferated similarly to controls and CVID MB1 patients (Fig. 3c,d).

IL-21 modulates apoptosis rescue of co-stimulated CD27⁻ and CD27⁺ B cells

IL-21 alone was able to rescue CD27⁻ (16.9%) but not CD27⁺ B cells from spontaneous apoptosis (Figs 1a and 4). In spite of this, the addition of IL-21 down-modulated the protective effect of anti-CD40 (77.9 versus 75.9%, $P < 0.01$) and CpG-ODN (71.4 versus 42.7%, $P < 0.001$) on CD27⁻ B cells.

In CD27⁺ B cells IL-21 tended to reduce the CpG-ODN rescue effect but increased the protective effect of anti-CD40 significantly (23.9 versus 42.8%, $P < 0.05$) (Figs 1a and 4b).

IL-21 not only reverted the protective effect of anti-IgM on CD27⁻ and CD27⁺ B cells, but in some cases even

increased apoptosis above spontaneous baseline values (Fig. 1a and scatter-plots in Fig. 4).

Similar results were obtained when we evaluated activation induced rescue from apoptosis on sorted CD27⁻ and CD27⁺ B lymphocytes stimulated with the same stimuli (histograms in Fig. 1b,c). Moreover, we did not find increased CD27 expression when we stimulated CD27⁻ B cells with any of the stimuli (dot-plots in Fig. 1b), which validates the gating strategy when using purified total B cells.

Effect of IL-21 on apoptosis is not linked to proliferation

IL-21 modulates proliferation induced by co-stimulation on CD27⁻ and CD27⁺ B cells. This effect has to be taken into account when analysing the apoptosis rate.

Neither CD27⁻ nor CD27⁺ B cells proliferated in response to anti-IgM combined with IL-21 (Table 2). However, both subpopulations proliferated in response to IL-21 with anti-CD40, although the proliferation index was higher in CD27⁺ B cells. Remarkably, IL-21 increased proliferation of CpG-ODN-activated CD27⁻ B cells but decreased proliferation of CpG-ODN-activated CD27⁺ B cells (Table 2).

In CD27⁺ B cells, IL-21 reduction of CpG-ODN apoptosis rescue is accompanied by a reduction in the proliferative response. In contrast, the increase in anti-CD40 apoptosis rescue is accompanied by a proliferation enhancement (Fig. 4b and Table 2). However, IL-21 reduction in apoptosis rescue induced by anti-CD40 or CpG-ODN on CD27⁻ B cells is not due to a negative effect on proliferation (Fig. 4a and Table 2). Furthermore, in spite of the higher proliferative response induced by IL-21 combined with anti-CD40 or CpG-ODN on CD27⁺ versus CD27⁻ B cells

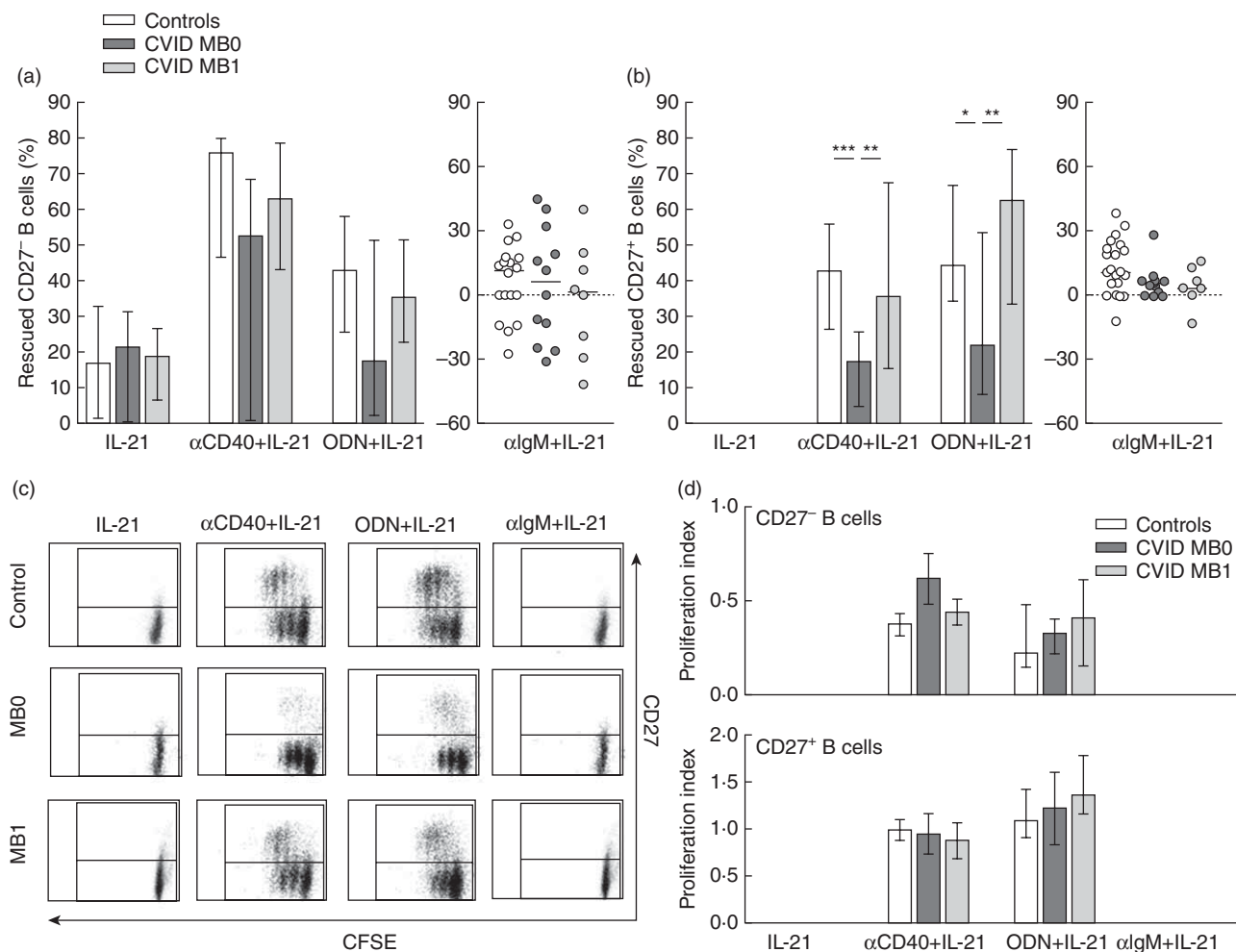


Fig. 5. Interleukin (IL)-21 effect on apoptosis rescue and proliferation of activated peripheral CD27⁻ and CD27⁺ B cells from common variable immunodeficiency (CVID) patients. (a) Percentage of rescued CD27⁻ and (b) CD27⁺ B cells upon stimulation with IL-21 alone or in combination with anti-CD40, cytosine–phosphate–guanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) or anti-immunoglobulin (Ig)M in healthy controls ($n = 22$; white bars/dots), CVID MB0 patients ($n = 12$; dark grey bars/dots) and CVID MB1 patients ($n = 8$; light grey bars/dots). (c) Representative dot-plots of dividing and non-dividing CD19⁺CD27⁻carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)⁺ (lower quadrants) and CD19⁺CD27⁺CFSE⁺ (upper quadrants) B cells from a healthy control (upper row), one CVID MB0 (middle row) and one MB1 (lower row) patient, after stimulation with IL-21 alone or in combination with anti-CD40, CpG-ODN or anti-IgM. (d) Proliferation index of CFSE-labelled CD27⁻ (upper panel) and CD27⁺ (lower panel) B cells from healthy controls ($n = 19$; white bars), CVID MB0 ($n = 8$; dark grey bars) and MB1 ($n = 6$; light grey bars) patients after stimulation with IL-21 alone or in combination with anti-CD40, CpG-ODN or anti-IgM. No proliferation was detected with IL-21 and anti-IgM + IL-21. Data are given as median and 25th to 75th percentiles (Kruskal–Wallis test P -values: $P < 0.05^*$; $P < 0.01^{**}$; $P < 0.001^{***}$).

(Table 2), the rescue from apoptosis is not higher in CD27⁻ B cells for any of the stimulus (Fig. 4). Thus, although we cannot rule out that the effect of IL-21 on apoptosis is linked to proliferation, our results support the independence of these processes.

CD27⁻ and CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients are less sensitive to apoptosis rescue by IL-21 combined with a single stimulus

IL-21 alone rescued both CVID MB0 and MB1 CD27⁻ B cells similar to controls. CD27⁻ B cells from CVID MB0 were less sensitive to apoptosis rescue

by anti-CD40 plus IL-21 or CpG-ODN plus IL-21 than controls or CVID MB1 patients, although these differences were not statistically significant (Fig. 5a).

CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients were less sensitive to apoptosis rescue when stimulated with anti-CD40 and IL-21 or CpG-ODN and IL-21 than control subjects (17.6 versus 42.8%, $P < 0.001$; and 21.9 versus 44.4%, $P < 0.05$, respectively) and CVID MB1 patients (17.6 versus 35.8%, $P < 0.01$; and 21.9 versus 62.5%, $P < 0.01$, respectively).

CD27⁻ and CD27⁺ B cells from CVID MB1 (Fig. 5b) patients were rescued from apoptosis similarly to controls.

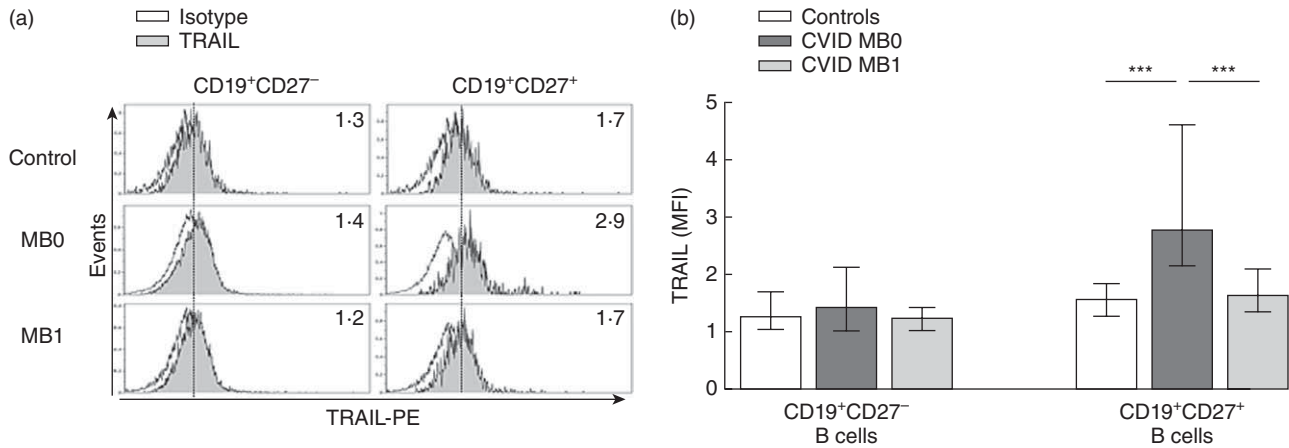


Fig. 6. Tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) surface expression on peripheral blood B cells from common variable immunodeficiency (CVID) patients and healthy controls. (a) Representative histograms of TRAIL expression (grey) on CD19⁺CD27⁻ (left columns) and CD19⁺CD27⁺ (right columns) B cells from a healthy control (upper row), one CVID MB0 (middle row) and one CVID MB1 (lower row) patients. Numbers indicate TRAIL median fluorescence intensity (MFI) evaluated on a 3-decade log scale. (b) TRAIL MFI of CD19⁺CD27⁻ and CD19⁺CD27⁺ B cells from healthy controls ($n = 18$; white bars), CVID MB0 ($n = 9$; dark grey bars) and MB1 ($n = 6$; light grey bars) patients. Data are given as median and 25th to 75th percentiles (Kruskal–Wallis test P -values: $P < 0.001^{***}$).

IL-21 not only abrogated the protective effect induced by anti-IgM, but increased the percentage of apoptotic B cells both in controls and CVID patients irrespective of their group (Fig. 5a,b).

When we evaluated the proliferation index, we did not find differences between CVID patients and controls (Fig. 5c,d). Thus, again, differences of apoptosis rescue between CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients and controls cannot be attributed to differences on B cell proliferation (Fig. 5).

CD27⁺ B cells from MB0 patients show higher TRAIL expression than controls and MB1 patients

Higher expression of TRAIL has been related to apoptosis and loss of peripheral memory B cells (identified as CD27⁺) in successfully treated aviraemic HIV patients. We evaluated if differences in TRAIL expression on CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients could explain the observed resistance to apoptosis rescue. CD27⁻ B cells from CVID MB0 and MB1 patients showed similar TRAIL expression than controls (Fig. 6). However, CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients showed higher TRAIL expression than controls (2.8 *versus* 1.6 MFI; $P < 0.001$) or MB1 patients (2.8 *versus* 1.7 MFI, $P < 0.001$). We did not find differences in CD27⁺ B cells from CVID MB1 when compared to controls (Fig. 6).

Discussion

The B cell fate is determined by the nature of the antigen encountered and a combination of signals provided through membrane co-receptors or by secreted interleukins

encountered in the lymphoid compartment. Unsuccessfully stimulated B cells die from apoptosis. Survival, growth and differentiation signals are required to maintain B cell homeostasis and to induce their differentiation into effector subsets.

In this study, we show that CD27⁺ B cells are less sensitive to rescue from apoptosis than CD27⁻ B cells, irrespective of the stimulus used. Although IL-21 rescues unstimulated CD27⁻ B cells from spontaneous apoptosis and increases the protective effect of anti-CD40 in CD27⁺ B cells, it reduces the protective effect of most stimuli used in both CD27⁻ and CD27⁺ B cells. When we evaluate CVID patients, we observe that CD27⁺ B cells from MB0 patients are less sensitive to rescue from apoptosis than B cells from MB1 patients and normal controls after anti-CD40 or CpG-ODN stimulation. These differences are not restored by the addition of IL-21. This is in agreement with the higher TRAIL expression observed in CVID MB0 patients.

The effect of IL-21, one of the most important cytokines for B cell differentiation, depends upon the subset of B cell studied and accompanying co-stimulus [28]. Jin *et al.* [32] demonstrated that besides strain differences in mice, the context in which B cells were activated influenced their fate. IL-21-driven apoptosis and inhibition of proliferation were dominant when B cells were activated through TLR-4 and TLR-9. Co-stimulation and low apoptosis were observed in B cells stimulated with anti-IgM or anti-IgM plus anti-CD40, whereas both apoptosis and co-stimulation were detected when IL-21 acted on anti-CD40 previously activated B cells. This raised the possibility that different subsets of B cells responded differentially to IL-21. In our hands, although IL-21 rescues unstimulated CD27⁻ B cells

from spontaneous apoptosis, it reduces the protective effect of most of the stimuli both in CD27⁻ and CD27⁺ B cells. On the contrary, IL-21 increases the protective effect of anti-CD40 in CD27⁺ B cells. This suggests that IL-21 *per se* increases survival of CD27⁻ (mostly naive and transitional) B cells, but this effect is lost after these cells are activated. However, CD27⁺ B cells become sensitive to rescue from apoptosis if they are prestimulated with a surrogate T-dependent stimulus (anti-CD40). Stimulation through the BCR or with a T-independent stimulus (CpG-ODN) renders CD27⁺ B cells insensitive to the protective effect of IL-21. IL-21 acts as a checkpoint for a productive B cell response. Only memory and marginal zone B cells (contained in the CD27⁺ population) that receive cognate T cell help in the presence of IL-21 would be protected from apoptosis and directed to proliferation and eventually differentiation to antibody secreting cells. We also report that rescue from apoptosis is independent of proliferation. This is particularly evident with anti-CD40 that, although it does not induce proliferation, it rescues most CD27⁻ B cells from apoptosis.

Our present results support that the inability of CVID B cells to produce normal levels of immunoglobulins *in vitro* (and *in vivo*) can be the consequence of an increased susceptibility to apoptosis upon stimulation. That would result in a reduced number of cells during an immune response. CD27⁻, but particularly CD27⁺ B cells, from our CVID MB0 patients are less sensitive to rescue from apoptosis than MB1 patients and controls.

Moreover, CD27⁺ B cells from CVID MB0 patients showed significantly higher expression of TRAIL than controls or CVID MB1 patients. TRAIL is a member of the TNF superfamily of cytokines able to induce programmed cell death in tumour cells. Different subpopulations of B cells show distinct sensitivity to TRAIL-mediated apoptosis. BCR triggering sensitizes peripheral blood memory, but not naive human B cells, to TRAIL-mediated apoptosis [33] and TRAIL promotes death of normal plasma cells [34]. In agreement with our results, van Grevenynghe *et al.* [13] demonstrated that memory B cell survival was decreased significantly in aviraemic successfully treated (ST) HIV subjects compared with uninfected controls. Memory B cells (identified as CD19⁺CD27⁺) from ST subjects showed specifically higher expression levels of TRAIL that correlated negatively with the frequency of these cells. Production of immunoglobulins was lower in ST subjects as a result of reduced survival and not lower proliferation of B cells.

Increased apoptosis of B cells in the MB0 group can result in fewer cells developing into antibody-secreting cells upon stimulation, hypogammaglobulinaemia and poor humoral response to antigens. For CVID MB1 patients a different mechanism should be responsible, because their B cells behave like control B cells in their sensitivity to apoptosis. This holds true for the two evaluated CVID MB2

patients. Their B cell apoptosis rescue was similar to CVID MB1 patients and controls (data not shown). In a recent paper, Borte *et al.* [35] suggested that IL-21 restores immunoglobulin production in patients with CVID. Using purified B cells, they found that IL-21 reduced apoptosis from naive and memory B cells from 14 CVID patients. However, no CVID group distinction was made; stimulation with anti-CD40 and IL-21 also included IL-4, and they considered only the CD27⁻ naive and CD27⁺ IgD⁻ memory B cell populations (excluding CD27⁺IgD⁺). The proportion of MB1/MB2 to MB0 patients in their studied cohort might have influenced the final result and explain the apparently distinct conclusions.

We cannot exclude the possibility that the peripheral blood B cells with increased apoptosis found in CVID MB0 could be the result of incomplete activation by follicular CD4⁺ T cells. In keeping with this, Hagn *et al.* [36] have demonstrated that human B cells co-cultured with incompletely activated CD4 T cells that secrete IL-21, but do not express CD40L, differentiate into granzyme B (GzmB)-secreting and potentially cytotoxic cells, able to induce slowly developing apoptosis of several cell lines. Activation of human B cells by IL-21 and BCR engagement in the absence of CD40 ligation results in their differentiation into GzmB-secreting cytotoxic cells rather than into plasma cells.

In summary, our findings reinforce the fact that (in humans) the net effect of different stimuli on B cells depends upon both the B cell subpopulation studied and the activation status of the B cell and underscore the relevance of these features in CVID physiopathology. We suggest that higher levels of apoptosis of CVID MB0 CD27⁺ B cells during an immune response can result in lower levels of immunoglobulin production, irrespective of their proliferation. The results highlight the heterogeneity among CVID patients, where distinct molecular mechanisms underlie common clinical symptoms, and highlight the need to classify and study CVID patients separately when evaluating B cell responses.

Acknowledgements

A.C., J.P., N.L. and J.M.F. designed and performed the experiments and analysed the data. N.M. and J.P. contributed to patient selection. All authors contributed to writing the manuscript. We thank Guillem Frontera for his helpful statistical support, Catalina Crespí for her sorting technical support and Cristina Martínez and Mónica Portell for their technical assistance. We are also grateful to the Hospital Universitari Son Espases Ambulatory Care Unit nursing staff for their continued support and to the patients for their generous collaboration. This work has been supported by the Fondo de Investigación Sanitaria from the Spanish Government (grants FIS PI08/0362 and FIS PI11/0160).

Disclosure

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

References

- Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol* 1999; **92**:34–48.
- Wood P, Stanworth S, Burton J *et al.* Recognition, clinical diagnosis and management of patients with primary antibody deficiencies: a systematic review. *Clin Exp Immunol* 2007; **149**:410–23.
- Salzer U, Unger S, Warnatz K. Common variable immunodeficiency (CVID): exploring the multiple dimensions of a heterogeneous disease. *Ann NY Acad Sci* 2012; **1250**:41–9.
- Salzer U, Warnatz K, Peter HH. Common variable immunodeficiency – an update. *Arthritis Res Ther* 2012; **14**:223.
- Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2007; **149**:401–9.
- Kuijpers TW, Bende RJ, Baars PA *et al.* CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest* 2010; **120**:214–22.
- van Zelm MC, Smet J, Adams B *et al.* CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest* 2010; **120**:1265–74.
- Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L *et al.* Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol* 2003; **23**:385–400.
- Warnatz K, Denz A, Drager R *et al.* Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)/IgM(-)/IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 2002; **99**:1544–51.
- Carsetti R, Rosado MM, Donnanno S *et al.* The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2005; **115**:412–7.
- Alachkar H, Taubenheim N, Haeney MR, Durandy A, Arkwright PD. Memory switched B cell percentage and not serum immunoglobulin concentration is associated with clinical complications in children and adults with specific antibody deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2006; **120**:310–8.
- Wehr C, Kivioja T, Schmitt C *et al.* The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008; **111**:77–85.
- van Grevenynghe J, Cubas RA, Noto A *et al.* Loss of memory B cells during chronic HIV infection is driven by FoxP3a- and TRAIL-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 2011; **121**:3877–88.
- Bishop GA, Hostager BS. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2001; **13**:278–85.
- Davies EG, Thrasher AJ. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *Br J Haematol* 2010; **149**:167–80.
- Ettinger R, Sims GP, Fairhurst AM *et al.* IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol* 2005; **175**:7867–79.
- Good KL, Bryant VL, Tangye SG. Kinetics of human B cell behavior and amplification of proliferative responses following stimulation with IL-21. *J Immunol* 2006; **177**:5236–47.
- Kuchen S, Robbins R, Sims GP *et al.* Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell generation during CD4⁺ T cell-B cell collaboration. *J Immunol* 2007; **179**:5886–96.
- Bryant VL, Ma CS, Avery DT *et al.* Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5⁺ T follicular helper cells. *J Immunol* 2007; **179**:8180–90.
- Recher M, Berglund LJ, Avery DT *et al.* IL-21 is the primary common γ chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation *in vivo*. *Blood* 2011; **118**:6824–35.
- Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003; **101**:4500–4.
- Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 2006; **36**:810–6.
- Chtanova T, Tangye SG, Newton R *et al.* T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* 2004; **173**:68–78.
- Rasheed AU, Rahn HP, Sallusto F, Lipp M, Muller G. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *Eur J Immunol* 2006; **36**:1892–903.
- Asao H, Okuyama C, Kumaki S *et al.* Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 2001; **167**:1–5.
- Spolski R, Leonard WJ. IL-21 and T follicular helper cells. *Int Immunol* 2010; **22**:7–12.
- Ettinger R, Sims GP, Robbins R *et al.* IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *J Immunol* 2007; **178**:2872–82.
- Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE. The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease. *Immunol Rev* 2008; **223**:60–86.
- Clemente A, Pons J, Matamoros N, Iglesias J, Ferrer JM. B cells from common variable immunodeficiency patients fail to differentiate to antibody secreting cells in response to TLR9 ligand (CpG-ODN) or anti-CD40+IL21. *Cell Immunol* 2011; **268**:9–15.
- Quah BJ, Warren HS, Parish CR. Monitoring lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2007; **2**:2049–56.
- Husain Z, Holodick N, Day C, Szymarnski I, Alper CA. Increased apoptosis of CD20⁺ IgA⁺ B cells is the basis for IgA deficiency: the molecular mechanism for correction *in vitro* by IL-10 and CD40L. *J Clin Immunol* 2006; **26**:113–25.
- Jin H, Carrio R, Yu A, Malek TR. Distinct activation signals determine whether IL-21 induces B cell costimulation, growth arrest, or Bim-dependent apoptosis. *J Immunol* 2004; **173**:657–65.
- Guerreiro-Cacais AO, Levitskaya J, Levitsky V. B cell receptor triggering sensitizes human B cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Leukoc Biol* 2010; **88**:937–45.

A. Clemente *et al.*

- 34 Ursini-Siegel J, Zhang W, Altmeyer A *et al.* TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. *J Immunol* 2002; **169**:5505–13.
- 35 Borte S, Pan-Hammarstrom Q, Liu C *et al.* Interleukin-21 restores immunoglobulin production *ex vivo* in patients with common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Blood* 2009; **114**:4089–98.
- 36 Hagn M, Sontheimer K, Dahlke K *et al.* Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help. *Immunol Cell Biol* 2012; **90**:457–67.

ANEXO II

Otras formas de difusión

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Escobar D, Pons J, **CLEMENTE A**, Iglesias J, Matamoros N and Ferrer JM. **Deficient toll like receptor (TLR) B-cell activation and proliferation in common variable immunodeficiency disease (CVID)**. *XIII ESID Meeting, Netherlands. Clin Exp Immunol* 154, Suppl. 1 (2008). **Póster.**
- **CLEMENTE A**, Pons J, Matamoros N, Iglesias J, Martínez C, y Ferrer JM. **Los linfocitos B de pacientes con inmunodeficiencia variable común producen niveles reducidos de inmunoglobulinas en respuesta a ligandos de TLR9 (CpG-ODN) o anti-CD40+IL-21**. *XXXV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología, San Sebastián. Inmunología* 29, supl. 1 (2010): 0-086. **Oral.**
- **CLEMENTE A**, Pons J, Lanio N, Matamoros N, and Ferrer JM. **TLR9, CD40 or BCR stimulated human naïve and memory B cells exhibit differential responsiveness to the survival effect of IL-21**. *3rd European Congress of immunology, Glasgow. Immunology* 137, suppl. 1 (2012): P0481. **Póster.**
- **CLEMENTE A**, Pons J, Lanio N, Matamoros N and Ferrer J. **Dividing and non-dividing CD27^{low} and CD27^{high} human memory B-cells are differently induced depending on the stimulus**. *15th International Congress of Immunology. Front Immunol*, doi:10.3389/conf.fimmu.2013.02.00079. **Póster.**
- **CLEMENTE A**, Pons J, Lanio N, Matamoros N and Ferrer JM. **Increased apoptosis of CD27⁺ B cells in CVID patients regardless IL-21 signalling**. *XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología, Salamanca 2013. Inmunología* 32 (2013): S03-C001. **Oral.**

