

Modulació del canvi d'isotip de les immunoglobulines per senyals del sistema immunitari innat

Irene Puga,¹ Andrea Cerutti^{1,2,3} i Montserrat Cols Vidal²

¹ IMIM-Hospital del Mar, Parc de Recerca Biomèdica

² Immunology Institute, Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, EUA

³ Institut Català de Recerca i Estudis Avançats (ICREA)

Adreça per a la correspondència: Irene Puga. IMIM-Hospital del Mar, Parc de Recerca Biomèdica. Av. del Dr. Aiguader, 88. 08003 Barcelona. Tel.: 933 160 457. Adreça electrònica: irene.puga@gmail.com.

DOI: 10.2436/20.1501.02.146

ISSN (ed. impresa): 0212-3037

ISSN (electrònic): 2013-9802

<http://revistes.iec.cat/index.php/TSCB>

Rebut: 02/02/2014 Acceptat: 15/03/2014

Resum

Els limfòcits B madurs emergeixen del moll de l'os i continuen diversificant el seu repertori genètic d'immunoglobulines a través de dos processos que depenen de la presència d'antigen, la hipermutació somàtica (SHM), per les seves sigles en anglès) i el canvi d'isotip (CSR). Ambdós processos requereixen AID, un enzim capaç d'editar el DNA, i tenen lloc predominantment als centres germinals, on els limfòcits B interaccionen amb antígens peptídics presentats per limfòcits T (respostes dependents de limfòcits T, TD). Estudis recents demostren com els limfòcits B reben ajuda addicional de cèl·lules del sistema immunitari innat, com són cèl·lules NKT, cèl·lules dendrítiques, i granulòcits, com neutròfils, eosinòfils i basòfils. Aquestes cèl·lules del sistema immunitari innat milloren les respostes TD, ja que aporten senyalització que ajuda als limfòcits B en diferents compartiments, com el centre germinal, centres postgerminals o el moll de l'os. A més de complementar l'activitat dels limfòcits B en respostes TD, les cèl·lules del sistema immunitari innat poden iniciar respostes independents de T en zones específiques com la mucosa i la zona marginal de la melsa. En aquests casos els limfòcits B inicien respostes que donen lloc a una ràpida generació d'anticossos. En aquesta revisió discutirem els avenços recents en la modulació del canvi d'isotip en limfòcits B produïts per cèl·lules del sistema immunitari innat.

Paraules clau: limfòcits B, immunoglobulina, canvi d'isotip, sistema immunitari innat, TLR, BAFF, APRIL.

Introducció

El sistema immunitari de mamífers es compon de dues branques, conegudes com a sistema innat i adaptatiu. Aquest últim és capaç de construir respostes protectores integrades per fer front a patògens invasors. El sistema immunitari innat inclou cèl·lules dendrítiques (DC, de l'anglès), macròfags, granulòcits i cèl·lules NK (*natural killer*), les quals donen lloc a respostes ràpides en reconèixer estructures microbianes genèriques, a través de receptors de patrons de reconeixement, els quals inclouen els receptors de tipus Toll (TLR) (Medzhitov, 2001). El sistema immunitari adaptatiu inclou limfòcits T i B, els quals són capaços de donar lloc a respostes altament específiques, però temporalment retardades. Aquests limfòcits són capaços de reconèixer epítips antigènics a través de receptors altament diversificats gràcies a recombinacions somàtiques (Cooper i Alder, 2006).

Els limfòcits B confereixen protecció en produir anticossos, també coneguts com a immunoglobulines (Ig), les quals són capaces de reconèixer antígens a través de dominis d'unió, que poden ser de baixa o alta afinitat

Modulation of immunoglobulin isotype change by innate immune system signals

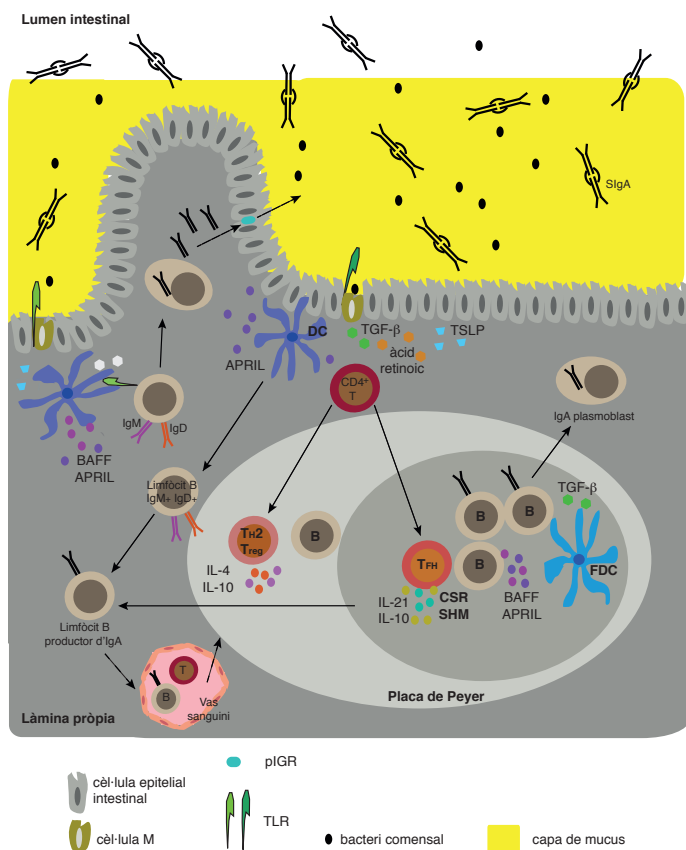
Summary

Mature B cells emerging from bone marrow further diversify their Ig genes through two antigen-dependent processes known as *somatic hypermutation* (SHM) and *class switch recombination* (CSR). These processes require AID, a DNA-editing enzyme. B cells are engaged in a T-cell-dependent (TD) antibody response against protein antigens predominantly in germinal centres. Recent evidence shows that B cells receive additional help from invariant natural killer T cells, dendritic cells and various granulocytes, including neutrophils, eosinophils and basophils. These innate immune cells enhance T-cell-dependent antibody responses by delivering B-cell helper signals both in the germinal centre and at postgerminal centre lymphoid sites such as the bone marrow. In addition to enhancing and complementing the B-cell helper activity of canonical T cells, invariant natural killer T cells, dendritic cells and granulocytes can deliver T-cell-independent B-cell helper signals at the mucosal interface and in the marginal zone of the spleen to initiate rapid innate-like antibody responses. In this paper we discuss recent advances in the role of innate cells in B-cell helper signals and in antibody diversification and production.

Key words: B cells, immunoglobulin, class switch recombination, innate immune system, TLR, BAFF, APRIL.

(Batista *et al.*, 2001; Lanzavecchia, 1985). Els precursors de limfòcits B al moll de l'os generen Ig altament diversificades per un procés de recombinació gènica dels fragments V(D)J. Aquest procés és independent d'antigen i el du a terme una endonucleasa anomenada RAG (*recombination activating gene*), la qual juxtaposa fragments no contigus de tipus variable (V), diversos (D) i d'unió (J, de *join* en anglès), els quals conformen les regions variables de les immunoglobulines on s'unirà l'antigen (Bassing *et al.*, 2002). Després de diversos processos de maduració, diferents subgrups de limfòcits B madurs, els quals coexpressen els isotips IgM i IgD a la seva superfície, emergeixen del moll de l'os i colonitzen diferents compartiments limfoides, on s'iniciarà la fase dependent d'antigen del desenvolupament dels limfòcits B.

Els limfòcits B residents als fol·licles limfoides, també anomenats *limfòcits B-2*, participen fonamentalment en respostes d'anticossos dependents del timus (TD), les quals s'associen a antígens altament específics, normalment vinculats a proteïnes microbianes (MacLennan, 1994). La reacció del centre germinal en fol·licles limfoides genera anticossos d'alta afinitat en



← **Figura 1.** Xarxes cel·lulars en les respostes IgA de mucosa. Les cèl·lules epitelials intestinals «condicionen» cèl·lules dendrítiques (DC) alliberant TSLP (de l'anglès *thymic stromal lymphopoietin*) i àcid retinoic en resposta a l'activació dels seus TLR feta per bacteris comensals. Diferents subgrups de DC intestinals, discutits en el text, alliberen TGF-β, IL-10, àcid retinoic i òxid nítric (NO), els quals promouen les respostes IgA en les plaques de Peyer i en els ganglis limfàtics mesentèrics (MLN). A la vegada, les diferents poblacions de DC poden induir limfòcits T reguladors (T_{REG}) i *T-helper* (T_H), fins i tot T_{FH}, les quals deriven en si mateixes de T_{REG}. Els limfòcits T_{FH} activen al seu torn cèl·lules B fol·liculars via CD40L, TGF-β, IL-4, IL-10 i IL-21. Per la seva banda, les DC fol·liculars augmenten la producció d'IgA en alliberar factors activadors de cèl·lules B que pertanyen a la família dels TNF (BAFF i APRIL). D'altra banda, quan DC fol·liculars són activades per lligands TLR i àcid retinoic secreten TGF-β, que també promou l'augment de la producció d'IgA en fol·licles intestinals. Així mateix, hi ha subgrups de DC intestinals capaços d'induir la producció d'IgA de manera independent de timus, ja sigui en ganglis limfàtics mesentèrics o a la làmina pròpia, en alliberar BAFF, APRIL, àcid retinoic i òxid nítric en resposta a lligands TLR de bacteris comensals o TFN-β de cèl·lules estromatòmiques. En humans aquests senyals independents de timus podrien induir canvi d'isotip d'IgM o d'IgA1 a IgA2. Els anticossos IgA sorgits de totes aquestes reaccions travessen les cèl·lules epitelials intestinals per un procés de transcosi vehiculat pel receptor polimèric d'Ig.

exemple BAFF i APRIL (Balázs *et al.*, 2002; He *et al.*, 2010; He *et al.*, 2007; Litinskiy *et al.*, 2002; Puga *et al.*, 2012; Scapini *et al.*, 2003; Bulow *et al.*, 2001).

En aquesta revisió repassarem la literatura publicada recentment i duta a terme en part en terres catalanes, i també discutirem els nous avenços que han ampliat el nostre coneixement dels mecanismes pels quals el sistema immunitari innat aporta senyals d'ajuda als limfòcits B.

respostes TD i està estretament regulada per limfòcits T col·laboradors de fol·licle (T_{FH}). Aquest subtipus de limfòcits T té com a característiques fonamentals l'expressió del receptor induïble i coestimulador de limfòcits T (ICOS), el receptor de quimiocina CXCR5, el receptor d'inhibició de resposta de mort cel·lular programada (PD-1), i el factor de transcripció Bcl-6 (Crotty, 2011; Leonardo *et al.*, 2012). Els limfòcits T_{FH} proveeixen de senyals d'ajuda als limfòcits B del fol·licle via CD40L (l·ligand de CD40), i les citocines IL-21, IL-4 i IL-10 (Crotty, 2011; Leonardo *et al.*, 2012). Estudis recents han demostrat la participació d'altres subtipus molt especialitzats de limfòcits T en respostes d'anticòs fol·liculars. Aquests subtipus inclouen els limfòcits T reguladors de fol·licle (T_{FR}) i les cèl·lules iNKT (Chang *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2011; King *et al.*, 2012; Leonardo *et al.*, 2012; Linterman *et al.*, 2011).

En aquests últims anys s'ha posat de manifest l'existència de diversos subgrups de limfòcits B amb la característica fonamental de ser capaços de generar respostes d'anticossos ràpides i independents de cèl·lules T (TI). Aquests subtipus extrafol·liculars de limfòcits B es coneixen com a limfòcits B-1, limfòcits de la zona marginal de la melsa (o limfòcits IgM de memòria en humans) i limfòcits B perisinusoidals del moll de l'os (Cariappa *et al.*, 2005; Cerutti *et al.*, 2013; Choi i Baumgarth, 2008; Martin i Kearney, 2002; Weill *et al.*, 2009). Aquests es caracteritzen per respondre i generar anticossos contra antígens carbohidrats i glicolípidis altament conservats associats a microbis. Es coneix que les respostes d'anticossos TI es donen generalment en interfases de mucosa o en la zona marginal de la melsa. Alhora, se sap que aquestes respostes generen anticossos poliespecífics i de baixa afinitat, i que estan mitjançades per la interacció de limfòcits B amb DC, macròfags i granulòcits (Balázs *et al.*, 2002; Colino *et al.*, 2002; Karlsson *et al.*, 2003; Macpherson *et al.*, 2000; Macpherson i Uhr, 2004; Puga *et al.*, 2012). Aquestes cèl·lules del sistema immunitari innat aporten senyals d'activació per a la generació d'anticossos via citocines de la família del lligand de CD40 (CD40L), com per

DC i cèl·lules epitelials aporten senyals de canvi d'isotip a limfòcits B

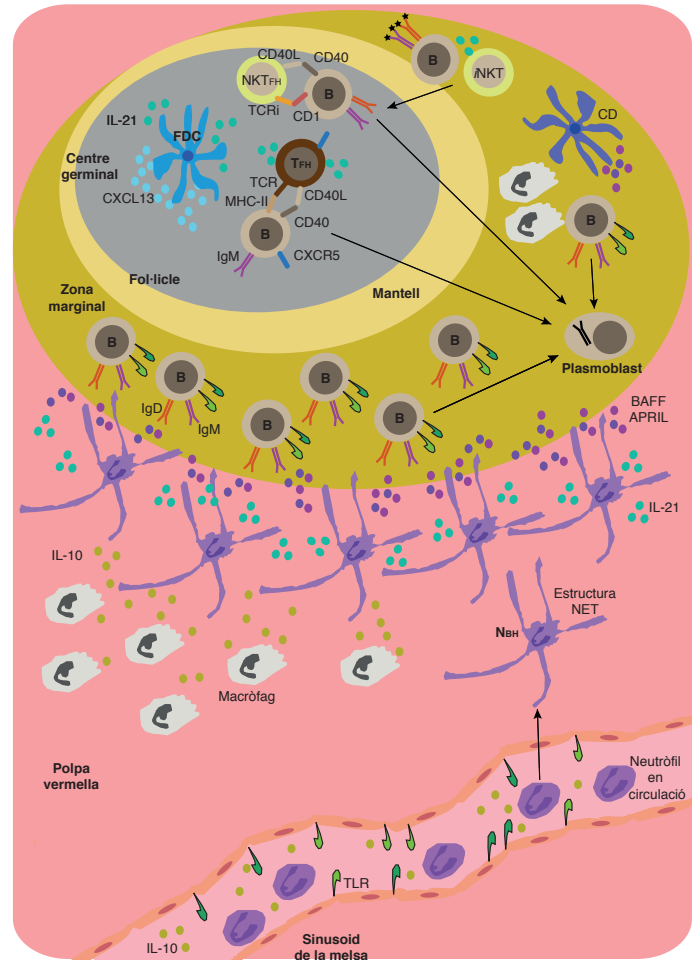
Les DC, després de rebre un estímul a través dels seus receptors de TLR, poden activar altres DC alliberant BAFF i APRIL, així com àcid retinoic (un metabòlit de la vitamina A) (Suzuki *et al.*, 2010). Al mateix temps, aquestes citocines actuen en cèl·lules del sistema immunitari innat, com macròfags, granulòcits i cèl·lules epitelials de mucosa, les quals també alliberen BAFF i APRIL. Aquestes molècules pertanyents a la superfamília dels TNF cooperen amb lligands dels TLR per induir CSR en limfòcits B de mucosa de l'intestí. La mucosa intestinal és habitada per grans comunitats de bacteris comensals, els quals es mantenen separats de la resta del sistema a través de diverses estratègies, i generen protecció sense causar inflamació. Una de les estratègies principals per aconseguir un estat no inflamatori inclou la producció de manera TI d'anticossos IgA feta per limfòcits B residents en fol·licles en les denominades *plaques de Peyer* i zones extrafol·liculars (Dullaers *et al.*, 2009). La IgA neutralitza toxines, bacteris patògens, així com molècules inflamatòries d'origen microbià, com pot ser el lipopolisacàrid (LPS) (Cerutti i Rescigno, 2008). Alhora, la IgA impedeix la unió de bacteris comensals a la superfície epitelial mitjançant l'impediment estèric, per inducció d'aglutinació bacteriana, per emmascarament d'epítops d'adhesió, i per interaccions amb la capa de mucus a través del component secretor de la IgA (Cerutti, 2008). Una altra de les funcions fonamentals de la IgA és la interacció amb receptors de DC per facilitar el mostreig d'antígens intestinals (Cerutti *et al.*, 2011).

En ambients fol·liculars intestinals les cèl·lules dendrítiques residents alliberen altres citocines que indueixen els limfòcits B a produir grans quantitats d'IgA, com és el cas de TGF-β, mentre que els limfòcits T col·laboradors de fol·licle intestinal alliberen citocines com CD40L, IL-21 i TGF-β, que milloren la producció d'IgA no inflamatòria, i alhora disminueixen la producció d'IgG proinflamatòria (Dullaers *et al.*, 2009). Els limfòcits B de les plaques de

Peyer i ganglis limfàtics mesentèrics poden ser induïts a CSR d'IgA d'una manera TI en resposta a senyals emergents de cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDC), les quals són capaces d'alliberar grans quantitats de BAFF i APRIL en resposta a l'interferó de tipus I generat per cèl·lules estromàtiques de l'intestí (Tezuka *et al.*, 2011). Una altra localització intestinal on es produeix el canvi d'isotip són els fol·licles limfoides aïllats. Aquests fol·licles contenen cèl·lules del tipus *lymphoid tissue-inducer* (LTi), les quals es caracteritzen per alliberar un altre membre de la família dels TNF, la limfotoxina- β , després de rebre senyals via TLR de bacteris comensals (Tsuji *et al.*, 2008). La interacció de la limfotoxina- β amb el seu receptor a la membrana en les cèl·lules estromàtiques fa que aquestes LTi alliberin TNF α i quimiocines que atrauen les DC, com són la CCL19 i la CCL21 (Tsuji *et al.*, 2008). La funció del TNF en cèl·lules dendrítiques fa que aquestes estimulin la producció de TGF- β , el qual és capaç d'induir CSR a IgA de manera TI, en cooperació amb BAFF i APRIL també alliberat per DC en ser activades per lligands específics de TLR (Tsuji *et al.*, 2008).

Una altra zona intestinal, a més dels fol·licles limfoides aïllats, on hi ha producció d'IgA, és la làmina pròpia intestinal, on es poden trobar limfòcits B dispersos (Cerutti *et al.*, 2011; Fagarasan *et al.*, 2010). La producció d'IgA en aquesta zona específica rep el suport de múltiples subtipus de cèl·lules dendrítiques residents a la làmina pròpia mateixa, que aporten senyals activadors als limfòcits B de manera TI. Un subtipus de DC que participa en processos d'activació de CSR i residents tant al fol·licle com a la làmina pròpia es coneix com a TipDC (Tezuka *et al.*, 2007). Aquest subtipus de DC produeixen iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) després de rebre senyals a través de TNF, i ajuden a l'inici de la producció d'IgA incrementant l'expressió del receptor de TGF- β en limfòcits B via òxid nítric, de manera que els limfòcits B responen a senyals induïbles provinents de TGF- β per començar a produir IgA (Tezuka *et al.*, 2007). Una altra manera que tenen les TipDC d'activar-se és després de rebre senyals microbians a través de TLR, cosa que provoca un augment de producció de BAFF i APRIL. Un altre subtipus de DC residents a la làmina pròpia expressen constitutivament el receptor de flagel·lina (TLR5) (Ueda *et al.*, 2007). Aquests subtipus de DC tenen una expressió de TLR4 molt baixa o no detectable i s'ha demostrat que són capaces d'induir el canvi d'isotip a IgA de manera TI, a més d'alliberar àcid retinoic i IL-6 quan els bacteris comensals compostos de flagel·lina activen els TLR5 (Ueda *et al.*, 2007).

Alhora, les cèl·lules epitelials poden alliberar senyals com BAFF i APRIL, que indueixen al canvi d'isotip a IgA, en reconèixer bacteris per a múltiples TLR (He *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). Aquesta via epitelial contribueix a la generació d'anticossos IgA2, els quals són més resistents a la degradació (He *et al.*, 2007). Les cèl·lules epitelials poden, a més, ampliar les funcions d'activació de les cèl·lules dendrítiques veïnes alliberant la citocina TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) (He *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). TSLP és una citocina pertanyent a la família de la IL-7, i s'ha descrit que pot augmentar la producció de BAFF i APRIL en DC estimulades per TLR (He *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). Una altra manera que tenen d'actuar les cèl·lules dendrítiques, a més de proporcionar factors que ajuden els limfòcits B a fer canvi d'isotip, és presentant directament antígens TI intactes als limfòcits B mateixos (Macpherson i Uhr, 2004). S'ha demostrat l'existència d'un subtipus de DC dedicades a reconèixer bacteris directament en el lumen intestinal, ja que contenen projeccions dendrítiques que travessen les unions hermètiques o els porus transcel·lulars formats per cèl·lules epitelials especialitzades, les anomenades *cèl·lules M* (Chieppa *et al.*, 2006; Lelouard *et al.*, 2012; Niess *et al.*, 2005). Altres tipus de DC de mucosa són capaces de capturar antígens de baix pes molecular, els quals travessen la barrera epitelial de mucosa a través de passatges formats per cèl·lules caliciformes (McDole *et al.*, 2012). Tots aquests tipus especialitzats de DC podrien reciclar antígens TI no pro-



† Figura 2. Respostes dependents i independents de timus en els fol·licles i la zona marginal de la melsa en humans. En el fol·licle, els limfòcits B s'activen mitjançant l'acció dels limfòcits T_{FH} i les cèl·lules dendrítiques fol·liculars (FDC). Després d'interaccionar amb els limfòcits B, els limfòcits iNKT es diferencien en limfòcits NKT_{TH}. Mitjançant l'expressió de CD40L, IL-21 i altres factors activadors de limfòcits B, les T_{FH} indueixen la formació del centre germinal, el canvi d'isotip d'IgM a IgG i la hipermutació somàtica. Aquestes reaccions generen limfòcits B de memòria i cèl·lules plasmàtiques d'alta afinitat. Els limfòcits NKT_{TH} indueixen una reacció de centre germinal caracteritzada per la producció d'IgG sense pràcticament maduració de l'afinitat. A la zona marginal els neutròfils N_{BH} indueixen la producció d'anticossos feta pels limfòcits B de la zona marginal, mitjançant la secreció de BAFF, APRIL i altres molècules estimuladores. Les estructures semblants als NET que formen poden ajudar a l'activació dels limfòcits B de la zona marginal. Macròfags i cèl·lules endotelials de les sinusoides de la melsa activades per senyals TLR poden ajudar a la formació de N_{BH}. La interacció dels N_{BH} i els limfòcits B de la zona marginal permet la formació d'un repertori innat d'IgM, IgG i IgA que pot actuar com a ràpida barrera protectora davant la invasió sistèmica de microbis.

cessats, i presentar-los directament a la superfície del limfòcits B (Bergtold *et al.*, 2005). Si es té en compte que tant BAFF com APRIL són citocines que activen vies de supervivència en cèl·lules plasmàtiques, la combinació d'estímul provinents de DC com de cèl·lules epitelials pot crear una via alternativa per a la producció contínua d'anticossos IgA, fonamentals per a una bona defensa contra els patògens i control de comensals en la mucosa de l'intestí. Recentment, la interacció entre el mucus intestinal i subtipus de cèl·lules dendrítiques s'ha explorat amb detall, i s'ha comprovat que la capa de moc intestinal és capaç d'enviar senyals tolerògens a les cèl·lules dendrítiques de la

mucosa, per tal de mantenir l'homeòstasi intestinal (Shan *et al.*, 2013). Aquest estudi demostra una vegada més l'elevada complexitat i el fràgil equilibri que suposa l'ecosistema intestinal.

iNKT proporcionen senyals reguladors de limfòcits B

Com s'ha esmentat anteriorment, la regulació de les respostes dels limfòcits B fol·liculars no es restringeix a cèl·lules T_{FH} , però implica senyals addicionals que poden provenir d'altres subconjunts de limfòcits T, com ara les cèl·lules iNKT. Aquestes cèl·lules expressen un receptor de limfòcits T (TCR) invariament $V\alpha 24^+$ en humans i $V\alpha 14^+$ en ratolins que reconeix antigens glicolípidics presentats per la molècula no polimòrfica similar a MHC-I, el CD1d (Barral *et al.*, 2010; Silk *et al.*, 2004). Les cèl·lules iNKT s'activen després de reconèixer el glicolípid α -galactosilceramida en cèl·lules dendrítiques o macròfags subcapsulars, la qual cosa provoca que les iNKT secretin CD40L i IFN- α . Aquesta secreció fa que les cèl·lules dendrítiques madurin a un estat òptim per convertir-se en cèl·lules presentadores d'antigen (Barral *et al.*, 2010; Silk *et al.*, 2004). Posteriorment, l'expansió de cèl·lules T_{FH} condueix a la formació d'una reacció de centre germinal que indueix la producció d'IgG moderada, la maduració d'afinitat a través de la SHM, i la memòria immunitària (Galli *et al.*, 2007).

Estudis més recents han demostrat que les cèl·lules iNKT també ajuden de manera directa als limfòcits B. En efecte, una subpoblació de cèl·lules iNKT regula l'expressió de CXCR5 després d'interactuar amb glicolípidics presentats pels limfòcits B que expressen CD1d (King *et al.*, 2012). Posteriorment, l'entrada al fol·licle estimula les cèl·lules iNKT que activen el programa vehiculat per BCL6 i la diferenciació a cèl·lules NKT_{FH} que expressen CD40L, IL-21 i altres molècules de coestimulació com són ICOS i PD-1 (Chang *et al.*, 2012; King *et al.*, 2012). La reacció posterior del centre germinal indueix una forta producció primària d'IgG, però no indueix maduració d'afinitat o memòria immunitària (Chang *et al.*, 2012; King *et al.*, 2012). En la zona extrafol·licular també es pot donar la interacció dependent de CD1d entre limfòcits B i les cèl·lules iNKT, però indueix predominantment IgM i certa producció d'IgG (Barral *et al.*, 2008). Similar a les vies de TI, aquestes cèl·lules iNKT permeten muntar una onada ràpida d'anticossos IgG i IgM contra els patògens.

Activació dels limfòcits B mitjançant l'acció dels granulòcits

Els granulòcits són cèl·lules del sistema immunitari innat caracteritzades per la presència d'un nucli multilobulat i una varietat de grànuls citoplasmàtics que permeten la identificació de tres poblacions de granulòcits morfològicament i funcionalment diferents: neutròfils, eosinòfils i basòfils (Iwasaki i Akashi, 2007). Igual que d'altres cèl·lules immunitàries innates, els granulòcits detecten la presència de microbis mitjançant receptors de reconeixement de signatures moleculars microbianes altament conservades, incloent-hi els TLR. Aquests sensors microbianos no específics proporcionen senyals d'activació que estimulen les funcions fagocítiques i citotòxiques dels granulòcits, i promouen així la contenció inicial i l'eliminació dels microbis invasors (Medzhitov, 2001). A més de contenir compostos citotòxics i inflamatoris, els granulòcits alliberen citocines, quimiocines i altres mediadors immunitaris que promouen el reclutament i l'activació de monòcits i DC (Karasuyama *et al.*, 2011; Mantovani *et al.*, 2011; Rothenberg i Hogan, 2006). Els granulòcits poden, a més, modular la resposta immunitària adaptativa mitjançant l'alliberament de citocines que promouen directament l'activació i diferenciació dels limfòcits T (Karasuyama *et al.*, 2011; Rothenberg i Hogan, 2006). El paper dels granulòcits en les respostes de limfòcits B és menys conegut, però estudis recents han posat de manifest diferents mecanismes pels quals certs subtipus de granulòcits poden donar senyals a limfòcits B i cèl·lules plasmàtiques.

Els basòfils. Durant anys, els basòfils han estat unes cèl·lules enigmàtiques que representen menys de l'1 % de leucòcits en sang en condicions normals. Són la font principal d'histamina i altres compostos vasoactius alliberats durant els processos al·lèrgics, i són també clau en la defensa d'infeccions per paràsits (Karasuyama *et al.*, 2011). Recentment s'ha demostrat la participació dels basòfils en les respostes d'anticossos de limfòcits B. A més de presentar complexos antígen-MHC-II en limfòcits T $CD4^+$, els basòfils alliberen IL-4 i IL-6, que indueixen la formació de limfòcits T_{H2} amb capacitat d'activar limfòcits B (Denzel *et al.*, 2008).

Els basòfils poden capturar eficientment antigens solubles mitjançant els anticossos IgE units als receptors de superfície $Fc\epsilon RI$. El reconeixement d'antigens fet per la IgE de baixa afinitat no causa l'alliberament d'histamina, sinó més aviat la regulació positiva de l'expressió de CD40L i l'alliberament d'IL-4 i IL-6 feta pels basòfils. Aquests factors milloren les respostes d'anticossos mitjançant la inducció de limfòcits T_{H2} que secreten citocines activadores de limfòcits B com ara IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 (Sullivan *et al.*, 2011). Sorprenentment, els basòfils també poden activar els limfòcits B directament, com s'exemplifica per la seva capacitat de desencadenar el canvi d'isotip d'IgM a IgE i IgG4 en estimular els limfòcits B a través d'IL-4, IL-13 i CD40L (Gauchat *et al.*, 1993).

A més de la IgE, els basòfils també uneixen a la seva superfície IgD, encara que el receptor d'IgD segueix sent desconegut. La IgD és un isotip enigmàtic que s'ha conservat al llarg de l'evolució des dels peixos fins als humans (Chen i Cerutti, 2011). Limfòcits B madurs i transicionals que surten del moll de l'os expressen receptors IgM i IgD en la seva superfície, però l'expressió d'IgD generalment disminueix en contacte amb l'antigen. No obstant això, alguns limfòcits B activats en la mucosa del tracte respiratori superior poden donar lloc a cèl·lules plasmàtiques secretores d'IgD mitjançant un procés no convencional de canvi d'isotip d'IgM a IgD (Arpin *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2009). Tot i estar fortament hipermutats, els anticossos IgD produïts per les cèl·lules plasmàtiques del tracte respiratori superior són en gran part polireactius i poden enllaçar múltiples determinants antigènics de comensals i patògens, i promouen així la protecció de la mucosa (Arpin *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2009; Koelsch *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 1996). A més de travessar la barrera epitelial per arribar a la superfície de la mucosa, la IgD entra a la circulació per interactuar amb els basòfils, els monòcits i els neutròfils (Chen *et al.*, 2009). En els basòfils la unió d'IgD indueix l'alliberament de pèptids antimicrobians (catelicidina), factors d'opsonització (pentraxina PTX3), citocines inflamatòries (TNF i IL-1 β), citocines que indueixen T_{H2} (IL-4 i IL-13), i factors estimulants de limfòcits B (BAFF i APRIL) (Chen *et al.*, 2009). Consistent amb aquesta recerca, l'activació de basòfils de la IgD incrementa en els trastorns d'autoinflamació associats a TNF i IL-1 β (Chen *et al.*, 2009).

Els eosinòfils. Presents entre un 1-4 % del total de leucòcits en sang, els eosinòfils estan principalment implicats en respostes contra paràsits i respostes al·lèrgiques (Rothenberg i Hogan, 2006). Tanmateix, estudis recents han demostrat que també poden modular la resposta adaptativa mitjançant l'expressió de molècules MHC-II i la secreció de citocines, quimiocines, mediadors lipídics i factors de creixement (Lacy i Moqbel, 1997; Rothenberg i Hogan, 2006). Mitjançant l'expressió en superfície de receptors $Fc\gamma RII$ els eosinòfils uneixen anticossos específics d'al·lèrgen IgG1 i IgG3 però no IgG4. També expressen $Fc\alpha RI$ (o CD89), que uneix IgA (Rothenberg i Hogan, 2006), cosa que indica una resposta que podria modular l'homeòstasi intestinal, tot i que aquesta hipòtesi s'ha de comprovar.

Estudis recents mostren que els eosinòfils són clau en la producció d'anticossos al moll de l'os. En efecte, els eosinòfils alliberen APRIL, que promou la supervivència a llarg termini de les cèl·lules plasmàtiques en nínxols especí-

fics del moll de l'os (Chu i Berek, 2012; Chu *et al.*, 2011). Atès que les cèl·lules plasmàtiques del moll de l'os en general sorgeixen de la reacció del centre germinal, l'activitat dels eosinòfils promovent la supervivència de les cèl·lules plasmàtiques és essencial per a l'alliberament continu d'anticossos d'alta afinitat a la circulació (Chu *et al.*, 2011). Eosinòfils de la medulla òssia també secreten IL-6, una altra citocina crítica en la diferenciació i la supervivència de cèl·lules plasmàtiques (Chu *et al.*, 2011). En presència d'antigen, els eosinòfils de la medulla òssia alliberen IL-4 i IL-10, que milloren l'estimulació de cèl·lules plasmàtiques i la seva supervivència (Chu i Berek, 2012; Chu *et al.*, 2011).

Els senyals de supervivència proporcionats pels eosinòfils són crítics per al manteniment de la població de cèl·lules plasmàtiques en el moll de l'os, atès que la depleció dels eosinòfils es tradueix en una ràpida apoptosi de cèl·lules plasmàtiques (Chu *et al.*, 2011). Sorprenentment, els eosinòfils del moll de l'os estan en contacte amb les cèl·lules de l'estroma que alliberen CXCL12, una quimiocina que s'uneix al receptor CXCR4 present en cèl·lules plasmàtiques (Chu *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2010). Els eosinòfils expressen també CXCR4, fet que proporciona una explicació mecanicista de la colocalització dels eosinòfils i cèl·lules plasmàtiques (Chu *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2010). Atès el paper clau dels eosinòfils en la migració de cèl·lules plasmàtiques i la seva retenció en el moll de l'os, no és sorprenent que la depleció dels eosinòfils augmenti el nombre de cèl·lules plasmàtiques tant en la melsa com els ganglis limfàtics (Chu *et al.*, 2011).

Els neutròfils. Són els granulòcits més abundants en sang i es mobilitzen ràpidament per eliminar patògens i cèl·lules necròtiques en àrees d'infecció o inflamació (Nathan, 2006). Després de migrar als teixits, els neutròfils activen programes de defensa que promouen la fagocitosis, la destrucció intracel·lular i la inflamació. Els neutròfils poden interaccionar amb cèl·lules del sistema innat i adaptatiu mitjançant l'alliberament de citocines, quimiocines i factors de creixement (Mantovani *et al.*, 2011; Nathan, 2006).

En relació amb les respostes de limfòcits B, els neutròfils poden augmentar la producció d'anticossos TD mitjançant la recopilació i transport d'antigen en llocs d'infecció o inflamació, augmentar la funció presentadora d'antígens de les DC i promoure el reclutament, l'activació i la diferenciació de limfòcits T CD4⁺ (Tani *et al.*, 2001). Els neutròfils també alliberen les molècules relacionades amb CD40L BAFF i APRIL, que faciliten la supervivència de les cèl·lules plasmàtiques que apareixen en respostes d'anticossos fol·liculars TD (Huard *et al.*, 2008; Scapini *et al.*, 2003). La producció de BAFF i APRIL dels neutròfils i altres tipus de cèl·lules innates com ara les cèl·lules epitelials també millora les respostes extrafol·liculars independents de cèl·lules T de limfòcits B situats a les mucoses i a la zona marginal de la melsa (MZ, per les seves sigles en anglès) (Huard *et al.*, 2008; Scapini *et al.*, 2003).

Els neutròfils poden colonitzar la MZ de la melsa en resposta a infeccions en la sang (Balázs *et al.*, 2002; Kesteman *et al.*, 2008). No obstant això, els nostres estudis han demostrat que els neutròfils ocupen àrees perifol·liculars de la MZ de la melsa en absència d'infecció o inflamació, mitjançant una via no inflamatòria que comença durant la vida fetal i s'accelera després del naixement, un moment que coincideix amb la colonització de les superfícies mucoses feta per bacteris comensals (Puga *et al.*, 2012). Aquests neutròfils esplènics, també presents en ratolins i primats, alliberen senyals inductors de les respostes d'anticossos dels limfòcits B de la MZ, i per tant s'han definit aquestes cèl·lules com a neutròfils *B-helper* o N_{BH} (Puga *et al.*, 2012). En comparació amb els neutròfils circulants, els N_{BH} expressen un fenotip activat i secreten més factors estimulants de limfòcits B com BAFF, APRIL, CD40L i IL-21 (Puga *et al.*, 2012). Aquestes característiques úniques probablement reflecteixen l'activació i la reprogramació de les cèl·lules N_{BH} per senyals microambientals locals en la melsa. Lligands de TLR microbians també poden

estimular la reprogramació dels neutròfils convencionals a N_{BH} mitjançant l'alliberament de citocines no inflamatòries, com ara IL-10, feta per les cèl·lules endotelials sinusoidals esplèniques i possiblement d'altres cèl·lules com els macròfags (Puga *et al.*, 2012).

Els N_{BH} induïen l'expressió d'AID, el canvi d'isotip a IgG i IgA, així com la formació de cèl·lules secretores d'anticossos (plasmoblasts), però també poden suprimir l'activació dels limfòcits T, si més no *in vitro* (Puga *et al.*, 2012). En exercir aquesta doble funció, els N_{BH} poden promoure respostes contra antígens extrafol·liculars TI i reduir al mínim les respostes de limfòcits B fol·liculars contra antígens TD. En conseqüència, els N_{BH} entrarien als fol·licles esplènics només sota condicions inflamatòries, potser per activar limfòcits T (Puga *et al.*, 2012). Consistent amb això, els pacients immunodeficients amb alteracions quantitatives o funcionals dels neutròfils (neutropènies) tenen un nombre menor de limfòcits B de la MZ i trobem reduïdes la presència d'IgG i IgA contra carbohidrats TI però no contra antígens de proteïnes TD en estat estacionari (Puga *et al.*, 2012).

El mecanisme pel qual els N_{BH} activen els limfòcits B de la MZ probablement implica la colonització de la mucosa efectuada pels bacteris (Puga *et al.*, 2012). Discretes quantitats de productes microbians, com ara el lipopolisacàrid (LPS), es troben presents en la zona peri-MZ poc després del naixement (Puga *et al.*, 2012). Els N_{BH} es caracteritzen per la presència d'unes estructures similars a les trapes extracel·lulars de neutròfils (conegudes com a NET, per l'acrònim en anglès), que de fet apareixen per atrapar els productes microbians, com ara RNA bacterià, i estableixen extenses interaccions amb els limfòcits B de la MZ (Puga *et al.*, 2012). En atrapar antígens comensals presents en la sang i possiblement procedents de les superfícies mucoses, o lligands de TLR, les estructures NET facilitarien l'activació o supervivència dels limfòcits B de la MZ en condicions d'homeòstasi (Garcia-Romo *et al.*, 2011; Lande *et al.*, 2011).

En general, la interacció entre els N_{BH} i els limfòcits B de la MZ pot ser un instrument per generar una segona línia de defensa innata (o natural) basada en la producció d'anticossos per a la defensa contra la invasió sistèmica d'antígens comensals i de microbis que trenquen la primera línia de defensa proporcionada per la barrera de la mucosa.

Conclusions

En els últims anys s'ha posat de manifest la gran interconnectivitat entre el sistema immunitari innat i adaptatiu a diferents nivells, en què s'ha demostrat que la plasticitat és fonamental per promoure respostes perdurables per fer front a patògens invasors. Els granulòcits estan prenent un paper central en aquestes respostes, i amb aquesta revisió posem de manifest que tenen un paper fonamental per promoure aquesta interconnectivitat entre les diferents branques del sistema immunitari. L'estudi de les respostes fomentades per granulòcits en l'activació de cèl·lules B pot ser beneficiós per a un desenvolupament millor de noves vacunes, així com per a la promoció sustentada de respostes immunitàries.

Agraïments

Voldríem donar les gràcies al Ministeri de Ciència i Innovació per la subvenció SAF 2011-25241 i el Programa Juan de la Cierva (IP), el suport de la European Research Council 2011 Advanced Grant 2011-0310 (AC), a les ajudes de recerca dels Instituts Nacionals de Salut (NIH) AI61093, AI057653, AI95613, AI96187 i AI07437 (AC). Així mateix, agraïm el suport incondicional de l'Alfie, Kira i Ruby Magee.

Bibliografia

- ARPIN, C. [et al.] (1998). «The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated IgVH gene, Cmu- Δ switch, and lambda light chain expression». *The Journal of Experimental Medicine*, 187: 1169-1178.
- BALÁZS, M. [et al.] (2002). «Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses». *Immunity*, 17: 341-352.
- BARRAL, P. [et al.] (2008). «B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 8345-8350.
- (2010). «CD169(+) macrophages present lipid antigens to mediate early activation of iNKT cells in lymph nodes». *Nature Immunology*, 11: 303-312.
- BASSING, C. H. [et al.] (2002). «The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination». *Cell*, 109 (supl.): S45-55.
- BATISTA, F. D. [et al.] (2001). «B cells acquire antigen from target cells after synapse formation». *Nature*, 411: 489-494.
- BERGTOLD, A. [et al.] (2005). «Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells». *Immunity*, 23: 503-514.
- BULOW, G. U. von [et al.] (2001). «Regulation of the T-independent humoral response by TACI». *Immunity*, 14: 573-582.
- CARIAPPA, A. [et al.] (2005). «Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes». *Immunity*, 23: 397-407.
- CERUTTI, A. (2008). «The regulation of IgA class switching». *Nature Reviews Immunology*, 8: 421-434.
- CERUTTI, A. [et al.] (2011). «Immunoglobulin responses at the mucosal interface». *Annual Review of Immunology*, 29: 273-293.
- (2013). «Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes». *Nature Reviews Immunology*, 13: 118-132.
- CERUTTI, A.; RESCIGNO, M. (2008). «The biology of intestinal immunoglobulin A responses». *Immunity*, 28: 740-750.
- CHANG, P. P. [et al.] (2012). «Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses». *Nature Immunology*, 13: 35-43.
- CHEN, K.; CERUTTI, A. (2011). «The function and regulation of immunoglobulin D». *Current Opinion in Immunology*, 23: 345-352.
- CHEN, K. [et al.] (2009). «Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils». *Nature Immunology*, 10: 889-898.
- CHIEPPA, M. [et al.] (2006). «Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement». *The Journal of Experimental Medicine*, 203: 2841-2852.
- CHOI, Y. S.; BAUMGARTH, N. (2008). «Dual role for B-1a cells in immunity to influenza virus infection». *The Journal of Experimental Medicine*, 205: 3053-3064.
- CHU, V. T. [et al.] (2011). «Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow». *Nature Immunology*, 12: 151-159.
- CHU, V. T.; BEREK, C. (2012). «Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival». *European Journal of Immunology*, 42: 130-137.
- CHUNG, Y. [et al.] (2011). «Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions». *Nature Medicine*, 17: 983-988.
- COLINO, J. [et al.] (2002). «Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms». *The Journal of Experimental Medicine*, 195: 1-13.
- COOPER, M. D.; ALDER, M. N. (2006). «The evolution of adaptive immune systems». *Cell*, 124: 815-822.
- CROTTY, S. (2011). «Follicular helper CD4 T cells (TFH)». *Annual Review of Immunology*, 29: 621-663.
- DENZEL, A. [et al.] (2008). «Basophils enhance immunological memory responses». *Nature Immunology*, 9: 733-742.
- DULLAERS, M. [et al.] (2009). «A T cell-dependent mechanism for the induction of human mucosal homing immunoglobulin A-secreting plasmablasts». *Immunity*, 30: 120-129.
- FAGARASAN, S. [et al.] (2010). «Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis». *Annual Review of Immunology*, 28: 243-273.
- GALLI, G. [et al.] (2007). «Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 3984-3989.
- GARCIA-ROMO, G. S. [et al.] (2011). «Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus». *Science Translational Medicine*, 3: 73ra20.
- GAUCHAT, J.-F. [et al.] (1993). «Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils». *Nature*, 365: 340-343.
- HE, B. (2007). «Intestinal bacteria trigger T cell-independent Immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL». *Immunity*, 26: 812-826.
- [et al.] (2010). «The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88». *Nature Immunology*, 11: 836-845.
- HUARD, B. [et al.] (2008). «APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa». *The Journal of Clinical Investigation*, 118: 2887-2895.
- IWASAKI, H.; AKASHI, K. (2007). «Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell». *Immunity*, 26: 726-740.
- KARASUYAMA, H. [et al.] (2011). «Nonredundant roles of basophils in immunity». *Annual Review of Immunology*, 29: 45-69.
- KARLSSON, M. C. [et al.] (2003). «Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone». *The Journal of Experimental Medicine*, 198: 333-340.
- KESTEMAN, N. [et al.] (2008). «Injection of lipopolysaccharide induces the migration of splenic neutrophils to the T cell area of the white pulp: role of CD14 and CXC chemokines». *Journal of Leukocyte Biology*, 83: 640-647.
- KING, I. L. [et al.] (2012). «Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner». *Nature Immunology*, 13: 44-50.
- KOELSCH, K. [et al.] (2007). «Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals». *The Journal of Clinical Investigation*, 117: 1558-1565.
- LACY, P.; MOQBEL, R. (1997). «Eokines: synthesis, storage and release from human eosinophils». *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92 (supl. 2): 125-133.
- LANDE, R. [et al.] (2011). «Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus». *Science Translational Medicine*, 3: 73ra19.
- LANZAVECCHIA, A. (1985). «Antigen-specific interaction between T and B cells». *Nature*, 314: 537-539.
- LELOUARD, H. [et al.] (2012). «Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores». *Gastroenterology*, 142: 592-601 e593.
- LEONARDO, S. M. [et al.] (2012). «Cutting edge: in the absence of regulatory T cells, a unique Th cell population expands and leads to a loss of B cell energy». *Journal of Immunology*, 188: 5223-5226.
- LINTERMAN, M. A. [et al.] (2011). «Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response». *Nature medicine*, 17: 975-982.
- LITINSKIY, M. B. [et al.] (2002). «DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL». *Nature Immunology*, 3: 822-829.
- LIU, Y. J. [et al.] (1996). «Normal human IgD+IgM- germinal center B cells can express up to 80 mutations in the variable region of their IgH transcripts». *Immunity*, 4: 603-613.
- MCDOLE, J. R. [et al.] (2012). «Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine». *Nature*, 483: 345-349.
- MACLENNAN, I. C. (1994). «Germinal centers». *Annual Review of Immunology*, 12: 117-139.
- MACPHERSON, A. J. [et al.] (2000). «A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria». *Science*, 288: 2222-2226.
- MACPHERSON, A. J.; UHR, T. (2004). «Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria». *Science*, 303: 1662-1665.
- MANTOVANI, A. [et al.] (2011). «Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity». *Nature reviews Immunology*, 11: 519-531.
- MARTIN, F.; KEARNEY, J. F. (2002). «Marginal-zone B cells». *Nature reviews Immunology*, 2: 323-335.
- MEDZHITOV, R. (2001). «Toll-like receptors and innate immunity». *Nature Reviews Immunology*, 1: 135-145.
- NATHAN, C. (2006). «Neutrophils and immunity: challenges and opportunities». *Nature Reviews Immunology*, 6: 173-182.
- NIESS, J. H. [et al.] (2005). «CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance». *Science*, 307: 254-258.
- PUGA, I. [et al.] (2012). «B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen». *Nature Immunology*, 13: 170-180.
- ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. (2006). «The eosinophil». *Annual Review of Immunology*, 24: 147-174.
- SCAPINI, P. [et al.] (2003). «G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLYS». *The Journal of Experimental Medicine*, 197: 297-302.
- SHAN, M. [et al.] (2013). «Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals». *Science*, 342: 447-453.
- SILK, J. D. [et al.] (2004). «Utilizing the adjuvant properties of CD1d-dependent NK T cells in T cell-mediated immunotherapy». *The Journal of Clinical Investigation*, 114: 1800-1811.
- SULLIVAN, B. M. [et al.] (2011). «Genetic analysis of basophil function in vivo». *Nature Immunology*, 12: 527-535.
- SUZUKI, K. [et al.] (2010). «The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut». *Immunity*, 33: 71-83.
- TANI, K. [et al.] (2001). «The neutrophil granule protein cathepsin G activates murine T lymphocytes and upregulates antigen-specific Ig production in mice». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282: 971-976.
- TEZUKA, H. [et al.] (2007). «Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells». *Nature*, 448: 929-933.
- (2011). «Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction». *Immunity*, 34: 247-257.
- TSUI, M. [et al.] (2008). «Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut». *Immunity*, 29: 261-271.
- UEDA, Y. [et al.] (2007). «T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells». *Journal of Immunology*, 178: 3593-3601.
- WEILL, J. C. [et al.] (2009). «Human marginal zone B cells». *Annual Review of Immunology*, 27: 267-285.
- WINTER, O. [et al.] (2010). «Megakaryocytes constitute a functional component of a plasma cell niche in the bone marrow». *Blood*, 116: 1867-1875.
- XU, W. [et al.] (2007). «Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLP1». *Nature Immunology*, 8: 294-303.