

Inmunidad innata y autoinmunidad

Una mirada desde las secuencias CpG y su receptor TLR9

Soraya Zorro¹, Gloria Vásquez²

Resumen

Un hallazgo que caracteriza las enfermedades autoinmunes es la presencia de autoanticuerpos, que participan directamente en la lesión tisular. Los eventos que disparan la constante producción son aún desconocidos, es posible que en estas entidades se dé una presentación antigénica persistente, que active linfocitos T y B pero, puede ocurrir que los linfocitos B sufran procesos de activación timo independiente con producción incontrolada de autoanticuerpos.

Las sustancias o eventos que desencadenan estas situaciones involucran a las células presentadoras de antígeno ya sea macrófagos, células dendríticas o linfocitos B. Estas células son activadas por medio de los receptores de patrones moleculares, los cuales son el elemento fundamental de la inmunidad innata, si estos receptores son en realidad los iniciadores o perpetuadores de la activación de las células presentadoras, ellos explicarían la conexión entre la inmunidad innata y la autoinmunidad.

Palabras clave: Inmunidad innata, autoinmunidad.

Summary

A common finding that characterizes autoimmune diseases is the presence of auto-antibodies directly involved in tissue damage. The events that trigger their constant production are still unknown, it is possible that these entities have a persistent antigen presentation able to activate T and B cells, B cells may undergo a thymus-independent activation

processes leading to an uncontrolled production of auto-antibodies.

The substances or events able to trigger these situations involve antigen presenting cells including macrophages, dendritic or B cells. These cells are activated through recognition receptors of molecular patterns, which are fundamental elements of innate immunity, if these receptors are in fact initiators or enhancers of antigen presenting cells activation, they would explain a connection between the innate immunity and the autoimmunity.

Key words: Innate immunity, autoimmunity.

Un paso fundamental en la activación de la respuesta inmune es la presentación antigénica, proceso en el cual las células dendríticas (DCs), los monocitos-macrófagos o los linfocitos B (células presentadoras de antígenos-APCs), captan antígenos, los procesan y los presentan en pequeños péptidos a las células T. La razón de la obligatoriedad de esta etapa es que los linfocitos T, iniciadores de la respuesta inmune específica tanto celular como humoral y quienes perpetúan la actividad de las células efectoras en la respuesta de inmunidad innata, no reconocen antígenos en forma directa, sino que requieren de su fragmentación en péptidos unidos a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) para su reconocimiento y posterior proliferación y activación^{1,2}.

Las moléculas del MHC son heterodímeros presentes en la superficie de las células, que unen fragmentos

1 Estudiante Maestría Corporación Ciencias Básicas Biomédicas U de A.
2 Docente Investigadora Grupo GICIG, Grupo GRUA. U de A.

Enviado para publicación: Abril 10/2003
Aceptado en forma revisada: Mayo 28/2003

protéicos resultantes de la fagocitosis o de péptidos de síntesis endógena y de esta manera los presentan a los linfocitos T que poseen en su membrana un receptor de antígenos (TCR), molécula a través de la cual se reconocen los polipéptidos derivados del antígeno procesado. Las moléculas del MHC se subdividen en dos tipos: la clase I y la clase II. Las moléculas de la clase I de las APCs interactúan principalmente con los péptidos derivados de proteínas citosólicas y las de clase II con los generados de compartimentos endocíticos que son reconocidos de manera específica por los dos grandes grupos de linfocitos T: CD8+ y CD4+^{1,2}.

A través de todo este sistema, las APCs activan a los linfocitos T para que se dé una respuesta inmune efectiva ante las condiciones del medio ambiente extra e intracelular. Las APCs, por su capacidad de detectar en el medio extracelular cambios o alteraciones, constituyen entonces la conexión entre el sistema innato y el sistema inmune adaptativo^{1,2}.

Una de las capacidades de las APCs es la de captar una molécula extraña, procesarla, presentarla a los linfocitos T en el contexto de las moléculas del MHC clase II (primera señal) pero, adicionalmente, ellas son capaces de expresar moléculas auxiliares como, moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras y también secretar citoquinas, necesarias para una efectiva expansión y respuesta específica de las células T (segunda señal)^{1,2}.

En el grupo de las APCs, las DCs son las células más efectivas en la presentación de antígenos, derivadas de monocitos, ellas se encuentran en los órganos linfoides, en la epidermis (células de Langerhans) y circulando en el torrente sanguíneo en un número menor. Las DCs expresan constitutivamente altos niveles de moléculas del MHC y son responsables de iniciar la respuesta inmunitaria ante antígenos protéicos extracelulares, ellas pasan por diferentes estados de maduración; uno inmaduro, en el cual son buenas células fagocíticas, pero menos efectivas en el procesamiento de antígeno y un estado maduro que resulta de la estimulación por citoquinas como: el Interferón g (IFN- γ), uno de los más potentes inductores, la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral a (TNF- α), o de estímulos como las endotoxinas, el RNA de doble cadena (dsRNA), las células apoptóticas y bacterias Gram-negativas y Gram-positivas^{1,2}. Las DCs maduras son menos fagocíticas pero altamente efectivas en su pre-

sentación antigénica, esto debido al aumento en la expresión de moléculas del MHC II y moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) y a la capacidad de producción de citoquinas que constituyen la segunda señal necesaria para la activación efectiva de linfocitos T^{1,5}.

Los macrófagos se desempeñan como APCs, adicional a sus actividades fagocitocíticas y microbicidas y adicionalmente, a través de la secreción de citoquinas como la IL-12, IL-1 y TNF α regulan funciones en los linfocitos. Al igual que en las DCs, la expresión de moléculas del MHC clase I y II en los macrófagos es incrementada en presencia de IFN- γ ¹.

Otras células con capacidad de presentación antigénica son los linfocitos B, los cuales, a través de sus inmunoglobulinas (Igs) de superficie unen complejos que luego son internalizados, procesados como péptidos y presentados en sus moléculas MHC clase II a los linfocitos T CD4+, proceso en el cual la célula T se activa y produce citoquinas que actúan sobre los linfocitos B, generándose una activación recíproca, en la que se induce una producción de anticuerpos antígeno específicos por parte de las células B¹.

Aunque se ha considerado que la respuesta inmune se inicia con la participación de una respuesta innata y que esta es seguida por una respuesta adaptativa, hoy se piensa que más que fenómenos secuenciales son fenómenos paralelos. En la respuesta inmune adaptativa, denominada también respuesta de reconocimiento específico, se generan células T ayudadoras (Th), las cuales producen citoquinas efectoras. Células Th1 que secretan IFN γ , y participan en la inmunidad celular, o células Th2, que producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 y participan en la inmunidad humoral. Por lo tanto, el ambiente de citoquinas es crítico en el tipo de respuesta inmune generada. Adicional a estas citoquinas instructoras, las APCs utilizan moléculas coestimuladoras como el CD80 y CD86, para activar las células T e inducir su expansión clonal antígeno específica, en su ausencia se induce la anergia, adicionalmente la interacción aislada de las moléculas coestimuladoras en ausencia de MHC no induce activación. Para obtener una respuesta adecuada, todos estos estímulos deben ser simultáneos.

Unas de las sustancias que inducen en las APCs una capacidad mayor de presentación antigénica, la producción de citoquinas y la expresión de moléculas coesti-

muladoras son los adyuvantes. Los adyuvantes son casi siempre derivados de productos microbianos y en ellos se incluyen por ejemplo micobacterias muertas, como en el adyuvante de Freund's, la toxina de la *Bordetella pertussis*, extractos de *Toxoplasma gondii*, LPS o sus componentes y secuencias CpG. En la actualidad se conoce que el reconocimiento de estos componentes microbianos es mediado por los receptores tipo Toll que se expresan en las APC.

Los receptores tipo Toll se identificaron inicialmente como la molécula esencial para el patrón de desarrollo embrionario de *Drosophila*, posteriormente, se demostró que esta molécula es clave en la respuesta inmune antifúngica⁶. Existen homólogos por la similitud de su porción intra citoplasmática de la familia, en los mamíferos y se han denominado los "Toll like receptor" (TLR)⁷. Los TLRs se relacionan estructuralmente con los receptores de IL-1, sin embargo, las porciones extracelulares de los TLRs y de los IL-1Rs son muy diferentes, la porción extracelular de los TLRs contiene dominios ricos en leucina, por su lado los receptores de IL-1 contiene tres dominios del tipo de inmunoglobulinas. Más de 10 miembros de la familia TLRs pueden encontrarse en una búsqueda de las bases de datos públicas murinas o humanas⁸ y diez miembros han sido ya reportados⁹⁻¹³.

La expresión en superficie de los TLRs, medida por anticuerpos monoclonales, parece ser muy baja, ellos se expresan diferencialmente en las células del sistema inmune y así se observan algunas miles de moléculas en los macrófagos y unos cientos en las células dendríticas inmaduras.

Los diferentes TLRs se comportan como receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) y poseen entonces la capacidad de unirse a diferentes patrones moleculares asociados a los patógenos (PAMPs), es así como TLR4 reconoce el lipopolisacárido (LPS)¹⁴, el TLR2 reconoce lipoproteínas y glicolípidos¹⁵, el TLR5 reconoce la flagelina¹⁶ y el TLR9 reconoce las secuencias CpG^{12, 17}.

El estudio de las señales generadas a partir de los TLR ha evidenciado que estos receptores se asocian a la proteína adaptadora MyD88, por una interacción homofílica de sus dominios tipo TIR, en forma similar al receptor de IL-1. MyD88 posee un dominio de muerte, el cual media su asociación con una serina-treonina kinasa, IRAK. Subsecuentemente, otra molécula

adaptadora, TRAF6 es activada y esta a su vez activa las MAPK kinasas (MKKs) y el complejo IKK. MKK puede conducir a la activación de AP-1 a través de JNK. El complejo IKK induce fosforilación de IκB, lo que lo conduce a la ubiquitinización y degradación. La degradación de IκB libera a NF-κB y permite que este se transloque al núcleo en donde participa en la inducción de algunos genes.

Estudios realizados utilizando ratones deficientes en los receptores TLR2 y 4 que no dependen de la vía de MyD88, demostraron que estos responden normalmente a las CpG. De otro lado, ratones deficientes en MyD88, no respondían a estas secuencias, lo que sugiere la participación de un TLR diferente dependiente de MyD88 como el TLR9¹⁸. De otro lado, ratones deficientes en TLR9, no responden al estímulo de las CpG, estas secuencias no inducen producción de citoquinas por los macrófagos, los linfocitos B no proliferan y no se induce maduración de las células dendríticas, lo cual evidencia la función esencial del TLR9 en la respuesta inducida por estas secuencias¹². Una característica de la señalización inducida por TLR9 es su dependencia del procesamiento endo/lisosomal, evidenciado por la sensibilidad de esta vía a la inhibición por cloroquina o por otros inhibidores de la acidificación del endo/lisosoma¹⁸.

Los motivos CpG constituyen unos de los estímulos bacterianos que inducen la activación de las células presentadoras de estos motivos, secuencias cortas de DNA de 6 bases las cuales poseen una estructura general de dos purinas en el extremo 5', dos pirimidinas en el extremo 3' y un motivo central no metilado, CpG¹⁹⁻²⁰. En ratones la secuencia inmunoestimuladora específica corresponde al oligonucleótido GACGTT²¹ y en los humanos el motivo GTCGTT^{19, 22}. Estas secuencias CpG son prevalentes en bacterias y virus pero no en vertebrados ya que en éstos últimos se da el fenómeno conocido como supresión CpG donde la citosina está comúnmente metilada en esta posición²⁰ y aunque los DNA bacterianos difieren de los vertebrados por la ausencia de metilación, el DNA de los vertebrados no es completamente metilado, existiendo un 20-30% de las secuencias CpG en el genoma de los vertebrados no metiladas.²³

El DNA bacteriano juega un papel importante como inmunógeno, actúa como adyuvante, posee secuencias repetitivas y tiene la capacidad de producir entre cruzamiento de receptor²⁴. Estas secuencias de DNA estimu-

lan la captación del antígeno por parte de las células dendríticas y además aumentan la expresión de moléculas MHC II y coestimuladoras^{25, 26}. También se observó que las secuencias CpG inducen la proliferación de linfocitos B y su diferenciación a células secretoras de IgG e igualmente, se ha descrito que en monocitos y macrófagos estimulan la producción de Interleuquina 12 (IL-12)^{25, 27-29}. Las CpG constituyen también un factor de diferenciación para las células T CD4+ favoreciendo la formación de células Th1³⁰.

Las secuencias CpG se han relacionado con enfermedades autoinmunes, se ha descrito en modelos murinos la inducción de miocarditis autoinmune por secuencias CpG³¹. Existen también ensayos en los que el tratamiento con CpG activó células Th1 efectoras específicas para mielina, disparando el desarrollo de encéfalo mielitis autoinmune experimental³².

En los pacientes con lupus se han encontrado niveles incrementados de fragmentos de DNA en suero comparado con individuos normales³³, adicionalmente, los ácidos nucleicos de estos pacientes presentan una disminución de la metilación por baja actividad de la metiltransferasa, lo que podría semejarse a lo observado en las secuencias CpG bacterianas. En algunos estudios, se ha mostrado que los inhibidores de la metilación como el 5-aza-deoxicitidina (5-aza C) inducen reactividad y producción de autoanticuerpos *in vivo*.³⁴⁻³⁶ Parece entonces posible que las secuencias CpG no-metiladas, como islas de CpG, puedan ser los causantes de fenómenos de activación celular en los vertebrados. La metilación del DNA se ha encontrado disminuida en las células de modelos murinos de autoinmunidad y de pacientes con enfermedades autoinmunes³⁷. Estos hallazgos sugieren que el auto-DNA pueda entonces desempeñar un papel como factor patogénico de la autoinmunidad³⁸.

La exposición de las diferentes APCs a secuencias CpG, induce en general una mayor capacitación en su función de presentación antigénica. Por ejemplo, en las células dendríticas las secuencias sintéticas CpG ODN inducen maduración, un incremento transitorio en el procesamiento de antígenos y en la vida media de los complejos MHC clase II-péptido, con la consecuente presentación antigénica sostenida. Los mecanismos de presentación que requieren moléculas MHC clase II recién sintetizadas se pierden, pero persiste la función de presentación antigénica, ya que esta célula dendrítica

madura recicla sus moléculas clase II³⁹. En células dendríticas primarias, aisladas de sangre humana, la inducción de la maduración, medida como expresión de CD83 y expresión de las MHC clase II, CD40, CD54 y CD86 fue superior con la estimulación con CpG, que con el estímulo con el factor estimulante de colonias de los granulocitos y monocitos (GMCSF). Comparado con el estímulo con GMCSF, las células dendríticas tratadas con CpG, mostraron un aumento en la actividad funcional en el cultivo mixto de linfocitos e indujeron a las células T a aumentar la secreción de citoquinas Th1. Estos hallazgos demuestran la habilidad de las secuencias CpG para activar las células dendríticas y promover la respuesta tipo Th1²⁶. En un modelo experimental de ratones, la inyección de CpG condujo al desarrollo de una linfadenopatía local, caracterizada por el mantenimiento de la composición celular con tendencia a una población predominante de células dendríticas. Se observó además, que estas células dendríticas y las células T presentaban una producción local y sostenida de IL-12 e IFN γ . La inyección de CpG generó una predisposición local para una respuesta de linfotoxicidad celular (CTL) intensa, respuesta de tipo Th1.

En células B de origen tumoral, los CpG ODN, incrementaron la expresión de las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86, CD54) y aumentaron la expresión de las moléculas MHC clase I y II⁴⁰.

Adicionalmente, el tratamiento de macrófagos con CpG ODN disminuyó la expresión en superficie de las MHC clase II, evaluadas por citometría de flujo, además el análisis con Northern-Blot reveló que el tratamiento con CpG ODN disminuía el mRNA para I-A^k. Después del tratamiento con CpG ODN no se observó en ningún momento, aumento en el procesamiento del antígeno por parte del macrófago, contrastando con los estudios en células dendríticas. Así, la exposición de macrófagos a CpG resulta en una disminución del procesamiento y presentación del antígeno, lo cual se debe, en su mayor parte, a una reducción en la síntesis de los MHC clase II⁴¹. Estos hallazgos sugieren que existe una regulación diferencial por parte de las secuencias CpG en las diferentes APC, siendo deactivadora en el macrófago pero activadora de las DCs y de los linfocitos B.

Una mayor eficiencia en la presentación antigénica mediada por los estímulos de secuencias CpG, llevaría a una activación persistente de células T, que podrían ser de tipo autoreactivas y, por ende, a la activación de los

linfocitos B, producción de autoanticuerpos y manifestaciones clínicas como las observadas en las diferentes enfermedades autoinmunes. Pero también podría ocurrir, que la secreción de autoanticuerpos se dé, de una manera no dependiente de linfocitos T, denominada activación timo-independiente de linfocitos B, en donde los microorganismos serían una fuente de inductores de este fenómeno, pero en enfermedades autoinmunes como el LES, los hallazgos de hipermutación en anticuerpos dirigidos contra el DNA, sumado a las evidencias de la ocurrencia de autoinmunidad en modelos murinos libres de gérmenes, hacen pensar que la enfermedad autoinmune sea más posiblemente desencadenada por auto antígenos, como el DNA propio con secuencias CpG. Aún más, como se dijo anteriormente, estos pacientes tienen aumento en la cantidad de CpG no metiladas, posiblemente debido a defectos en la maquinaria metiladora de DNA, y pacientes con LES han demostrado defectos en la capacidad de remoción de células muertas o cuerpos apoptóticos que contienen fragmentos de DNA, aumentando su disponibilidad como activadores.

Así pues, un sistema de reconocimiento innato como los Toll, activado por compuestos ya sea bacterianos o endógenos, puede ser el responsable del desarrollo del fenómeno de autoinmunidad.

Referencias

1. Austen F, Frank MM, Atkinson JP, Cantor H. Samter's Immunologic diseases. 6th ed. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. 2001.
2. Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15: 821-850.
3. Verhasselt V, Goldman M. New concepts on the Pathogenesis of Autoimmune Disease. *IMAJ* 2001; 3: 599-602.
4. Reid S.D, Penna G. and Adorini L. The control of T cell responses by dendritic cells subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 114-121.
5. Reis e Sousa, C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity.* 2001; 14: 495-498.
6. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll*/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86(6): 973-983.
7. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2(2): 253-258.
8. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2(8): 675-680.
9. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(2): 588-593.
10. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11(4): 443-451.
11. Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11(3): 362-71.
12. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408(6813): 740-745.
13. Chuang T, Ulevitch RJ. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1518(1-2): 157-161.
14. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189(11): 1777-1782.
15. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999; 285(5428): 736-739.
16. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410(6832): 1099-1103.
17. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16): 9237-9242.
18. Hacker G, Redecke V, Hacker H. Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology* 2002; 105(3): 245-251.
19. Krieg Arthur. CpG Motifs in Bacterial DNA and their Immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 709-760.
20. Pisetsky D. Immune Response to DNA in Systemic lupus Erythematosus. *IMAJ* 2001; 3: 850-853.
21. Chuang T, Lee J, Kline L. Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 71: 538-545.
22. Segal BM, Klinman DM, Shevach EM. Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway. *J. Immunol.* 1997; 158: 5087-5090.
23. Krieg AM. A role for Toll in autoimmunity. *Nat Immunol* 2002; 3(5): 423-424.
24. Segal BM, Chang JT, Shevach EM. CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J Immunol* 2000; 164(11): 5683-5688.
25. Bohle B, Janh-Schmid B, Maurer D. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and INF- γ production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2344-2353.
26. Hartman G, Weiner G, Krieg AM. CpG DNA as a signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9305-9310.
27. Shirota H, Sano K, Hirasawa N. Novel roles of CpG oligodeoxynucleotides as a leader for the sampling and presentation of CpG-Tagged antigen by dendritic cells. *The J Immunol* 2001; 167: 66-74.
28. Beg A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *TRENDS in immunology* 2002; 23-11: 509- 512.

29. Krieg AK, Yi A-K, Matson S. CpG motif in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-549.
30. Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157: 2116-2122.
31. Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM. Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 1999; 283: 1335-1339.
32. Krieg AM. From A to Z on CpG. *Trends Immunol* 2002; 23(2): 64-65.
33. Tuetken RS, Yi A-K, Krieg AM. The immune effects of bacterial DNA and their possible role in the pathogenesis of lupus. In Tsokos GC, Krammer G. Totowa, NJ. *Lupus. Molecular and Cellular Pathogenesis*. Humana Press, 1999: 79-100.
34. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Lupus*.2001; 10: 517-518.
35. Yung LR, Qudus J, Chrip CE. Mechanisms of drug-induced lupus. I . Cloned Th2 cells modified with DNA methylation inhibitors in vitro cause autoimmunity in vivo. *J. Immunol* 1995; 154: 3025-3035.
36. Richardson B, Yung R, Role of DNA methylation in the regulation of cell function. *J Lab Clin Med* 1999; 134: 333-340.
37. Richardson B, Scheinbart L, Strahler J, Gross L, Hanash S, Johnson M. Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33(11): 1665-1673.
38. Krieg AM. CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol* 1995; 15(6): 284-292.
39. Askew D, Chu RS, Krieg AM, Harding CV. CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. *J Immunol* 2000; 165(12): 6889-6895.
40. Jahrsdorfer B, Hartmann G, Racila E, et al. CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol* 2001; 69(1): 81-88.
41. Chu RS, Askew D, Noss EH, Tobian A, Krieg AM, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides down-regulate macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol* 1999; 163(3): 1188-1194.