

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Facultad de Medicina Dpto. de Biología Molecular

"Papel de BAMBI en la regulación de la respuesta inmune humoral"

Director: Dr. Ramón Merino Pérez Codirector: Dr. Jesús Merino Pérez

Tesis doctoral presentada por Juan Jesús Augustín Rodríguez para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria Santander, Abril 2017







INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGIA DE CANTABRIA

DERCON

Ramón Merino Pérez, Científico Titular del CSIC, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria-Sodercan, Profesor Asociado del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria,

CERTIFICA: que D. Juan Jesús Augustín Rodríguez, Licenciado en Farmacia ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado "Papel de BAMBI en la regulación de la respuesta inmune humoral", cuya parte experimental se ha realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y en el Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria.

Considero que los objetivos planteados están razonablemente desarrollados y fundamenta las conclusiones a las que se llega. Por lo tanto, el trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación como memoria de doctorado por el interesado, al objeto de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Santander, 21 de abril de 2017

Fdo: Ramón Merino Pérez

Ramón Merino Pérez Científico Titular CSIC Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria merinor@unican.es Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria Calle Albert Einstein, 22 39011 SANTANDER ESPAÑA TEL.: 942 206855



Jesús Merino Pérez Catedrático de Inmunología Dpto Biología Molecular (Facultad de Medicina) Universidad de Cantabria - IDIVAL Tf: 942 201956 Fax: 942 201945 e-mail: merinoj@unican.es

Jesús Merino Pérez, Catedrático de Inmunología de la Universidad de Cantabria y Coordinador del grupo de investigación "Inmunopatología"

EXPONE:

Que ha llevado a cabo las funciones de CODIRECTOR DE TESIS del Licenciado en Farmacia Juan Jesús Augustín Rodríguez durante todos los periodos de su programa de DOCTORADO en el Programa Interdepartamental "Biología Molecular y Biomedicina". Durante este periodo ha desarrollado el proyecto de investigación titulado: "Papel de BAMBI en la regulación de la respuesta inmune humoral" bajo la dirección científica del Dr Ramón Merino Pérez, Científico Titular del CSIC, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, y Profesor Asociado del Dpto de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria.

Lo que hace constar, a efectos de admisión de la Tesis Doctoral, en Santander a veintiuno de abril de dos mil diecisiete.

Fdo: Jesús Merino Pérez

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría poder agradecer a todas las personas que a lo largo de este camino, de un modo u otro, han contribuido a que pueda encontrarme en este momento escribiendo estas palabras.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Ramón Merino, tanto por su incalculable ayuda durante todo este proceso como por sus ánimos cuando uno ve el vaso medio vacío, y al Dr. Jesús Merino, por darme la oportunidad de empezar a trabajar en este laboratorio y contar siempre con su apoyo. Muchísimas gracias a los dos.

Gracias a Eli, Carol y David, del servicio de citometría del IDIVAL, por el esfuerzo en conseguir los millones de células deseados y por recibir de buen grado alguna citometría imprevista.

Agradecer al equipo del animalario por cuidar tan bien de nuestros ratones.

Al servicio de radioterapia del HUMV, por sacar un hueco de su tiempo para nuestras "muestras".

Y como no agradecer a mis compañeros de laboratorio, por acogerme tan bien y haber creado un ambiente en el que se ha trabajado tan a gusto, sois lo mejor que me llevo de aquí. Los que ya no están: Inés, Maigüi, Fer, Jorge. A Natalia, por tu buen humor y por haberme ayudado siempre con el "tema ratonil". Thays, como se echan de menos tus ingeniosas salidas!! Me gustaría agradecer especialmente a Marcos, por tener tanta paciencia en mis inicios, por estar siempre dispuesto a echar una mano (incluso en la distancia), por poner siempre la nota de buen humor y saber reírse hasta de su sombra y sobre todo por ser tan buena persona, como se te ha echado de menos!! A los que aún comparten conmigo laboratorio: A Marta y a Mariana. A Iván, por tener con quien comentar la jornada futbolística y entender mis peculiares números, hay que echar revancha al ping pong!! Esther, que bueno que viniste!! Gracias por tu simpatía y tu inmensa generosidad, no importa lo que tengas encima, siempre dispuesta a ayudar. María, que hubiera sido de mí sin tí!! Gracias por poner un poquitín de orden en mis cosas o intentarlo por lo menos, por tanta ayuda prestada y porque aunque pensemos tan diferente en algunos aspectos, sé que me llevo una buena amiga de aquí. Y finalmente, Pilar, todo lo que diga se me va a quedar corto... gracias por hacerme saber que siempre he podido contar contigo, por tu involucración, por las risas, conversaciones absurdas, porque todo este camino ha sido más fácil contigo al lado, "en pack"; por todo gracias, esta tesis también es tuya.

También me gustaría agradecer a toda la gente de la Facultad y del IBBTEC, en especial al laboratorio de los Pieros: Lore, Paula, Iñaki, Berta, Marta, Rocío, Vincenzo,...siempre recibiéndome con una sonrisa aunque vaya a pedir o a dar guerra con los dichosos WB (especialmente Lore).

A mis compañeras de máster, Coral y Maite, por todo el apoyo recibido en mis comienzos, gracias. Tenemos que vernos pronto!!

Agradecer todo esto a mi familia del sur, que aunque estáis lejos os siento tan cerca. A mis abuelos, que están y estarían tan orgullosos de mí. A todos mis tíos, en especial mi tío Juanje y mi tía Jacin, siempre pendientes. A mis primos casi hermanos, Maria, Pilar, Juanje, Matías y Jesús; y a los que sois como primos, Jose, Martín y M. Carmen.

Gracias a mi hermano Curro, porque aunque nunca te lo diga, eres mi hermano preferido, y a su novia Laura, porque me hace feliz ver lo feliz que lo haces.

A mis padres, por darme siempre todo vuestro apoyo de principio a fin y porque todo lo que soy os lo debo a vosotros.

A la nueva familia que he formado. A mi hijo, que aunque no es muy consciente de todo esto, le tengo que agradecer el ser capaz de sacarme una sonrisa hasta en el peor momento. Y que no podrá decir que no esperé para que estuviera presente en este momento ;) Y finalmente Belén, GRACIAS por toda la paciencia que has mostrado siempre sin poner ninguna mala cara, por todo el apoyo que me has dado, por quererme tanto, por hacerme feliz... por TODO!!!

MUCHÍSIMAS GRACIAS A TODOS!!

A mis padres y mi mujer

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	V
ABREVIATURAS	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Linfocitos T	
1.1. Linfocitos T CD8 $^+$	4
1.2. Linfocitos T CD4 $^+$	5
2. Linfocitos B	23
2.1 Células B-1	
2.2 Células B-2	
2.3 Células B reguladoras	25
2.4 Ontogenia de las células B convencionales	25
3. Respuesta humoral	28
3.1 Respuesta TI	28
3.2 Respuesta TD	29
4. Superfamilia del TGF β	
4.1. Síntesis	
4.2. Unión a sus receptores	35
4.3. Señalización	
4.4. Superfamilia del TGF eta en el sistema inmune	39
4.5. Moduladores de la señalización de la superfamilia de TGF eta	
4.6. BAMBI	
II. OBJETIVOS	47
III. MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. Ratones	53
1.1. Ratones consanguíneos	53
1.2. Ratones deficientes (gene knock-out)	53
1.3. Ratones transgénicos	54

1.4. Ratones híbridos generados en el animalario de la Universidad de Cantabria	. 54
1.5. Otros ratones	. 54
2. Mantenimiento y manipulación de los animales	. 55
3. Caracterización fenotípica y genotípica	. 55
3.1. Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo	. 55
3.2. Caracterización genotípica mediante PCR	. 57
4. Obtención de muestras sanguíneas y suspensiones celulares	. 59
4.1. Suero	59
4.2. Sangre	59
4.3. Suspensiones celulares	. 60
5. Purificación de linfocitos B del bazo	. 60
6. Cultivos celulares	. 61
6.1. Cultivos de activación de linfocitos B	. 61
6.2. Cultivos de proliferación de linfocitos B	. 61
7. Estudio de la expresión de BAMBI por qPCR	. 62
8. Caracterización de las poblaciones linfocitarias en los órganos linfoides	. 63
9. Inmunizaciones	. 66
9.1. TNP-Ficoll (trinitrofenol conjugado a aminoetil carboximetil-Ficoll)	. 67
9.2. HSA (seroalbúmina humana)	. 67
9.3. OVA-TNP ₁₁ (ovoalbúmina conjugada a 11 moléculas de TNP)	. 67
9.4. AHGG (gamma globulina humana agregada por calor)	. 67
9.5. OVA (ovoalbúmina)	. 68
10. Cuantificación de Acs mediante ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)	. 68
11. Determinación del número de CPs secretoras de Acs por ELISPOT	. 70
12. Procesamiento y estudio histológico de los tejidos	. 71
13. Estudios de transferencia celular	. 72
14. Generación de ratones quiméricos	. 73
15. Producción y Purificación de AcMs	. 73
15.1. Producción	. 73
15.2. Purificación de ascitis. Método del ácido caprílico	. 73
16. Tratamiento con Acs	. 74
17. Tratamiento con 5Z-7-oxozeanol (5ZOX)	. 74
18. Reactivos	. 74

18.1. Tampones
18.2. Soluciones
18.3. Medios de cultivo
19. Análisis Estadístico
IV. RESULTADOS77
1. Expresión e inducción de BAMBI en los linfocitos B79
2. Caracterización de las subpoblaciones de linfocitos B en el ratón BAMBI-KO
3. El ratón BAMBI-KO presenta una respuesta potenciada frente a Ags de tipo TI
4. Caracterización de la respuesta del ratón BAMBI-KO frente a Ags TDs
4.1. La deficiencia en BAMBI provoca un aumento en la producción de Acs frente a Ags TDs 83
4.2. Análisis de la posible influencia del alotipo de las Igs de los ratones WT y BAMBI-KO en las respuestas humorales TDs
4.3. La deficiencia en BAMBI potencia las respuestas TDs de alta y baja afinidad
4.4. Los ratones BAMBI-KO generan respuesta TD en ausencia de adyuvantes
4.5. La inmunización vía intranasal produce un aumento en la producción de Acs en el ratón BAMBI-KO tanto a nivel sistémico como a nivel de la propia mucosa nasal
5. Los ratones BAMBI-KO presentan cambios en las poblaciones celulares implicadas en la respuesta humoral frente a un Ag TD con respecto a los ratones WT
6. La deficiencia en BAMBI provoca un defecto intrínseco en los linfocitos B responsable de la potenciación de las respuestas inmunes humorales en los ratones BAMBI-KO
7. Estudio molecular de los linfocitos B en el ratón BAMBI-KO96
7.1. Los linfocitos B deficientes en BAMBI en estado basal presentan un aumento en la expresión de moléculas relacionadas con la activación y supervivencia
7.2. Los linfocitos B deficientes en BAMBI exhiben una mayor inducción de moléculas implicadas en activación y supervivencia tras una estimulación <i>in vitro</i>
8. Aumento de la capacidad proliferativa en los linfocitos B BAMBI-KO
9. Implicación selectiva de TGF eta en el control de la respuesta inmune humoral TD en el ratón BAMBI- KO100
10. La señalización de TGF eta a través de TAK1 potencia la producción de Acs en el ratón BAMBI-KO 101
11. Los ratones deficientes en BAMBI no desarrollan lesiones autoinmunes mediadas por autoanticuerpos (autoAcs)
V. DISCUSIÓN 105
VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFÍA	123
ANEVO, DUDUCACIONES DEL DEDIODO DOCTODAL	465
ANEXU: PUBLICACIONES DEL PERIODO DOCTORAL	155

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Diferenciación funcional de las células T-CD4 ⁺ <i>naïve</i> tras el contacto con el antígeno	6
Figura 2. Diferenciación Th1	7
Figura 3. Diferenciación Th2	9
Figura 4. Diferenciación Th17	. 11
Figura 5. Diferenciación a células pTregs	. 15
Figura 6. Inicio de la diferenciación a célula T _{FH.}	. 18
Figura 7. Diferenciación secuencial de las células T _{FH}	. 20
Figura 8. Desarrollo de los linfocitos B	. 27
Figura 9. Activación de los linfocitos B en una respuesta frente a un Ag TD	. 30
Figura 10. Centro germinal	. 33
Figura 11. Esquema de la señalización a través de los miembros de la superfamilia de TGF eta	. 36

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 1. Disrupción dirigida del gen Bambi por recombinación homóloga53
Figura 2. Análisis de la expresión de las subunidades V $lpha$ 2 y V eta 5 que componen el TCR de las células T
CD4 ⁺ de los ratones OT-II en leucocitos sanguíneos por citometría de flujo
Figura 3. Análisis de la expresión del Igh de los linfocitos B de la sangre por citometría de flujo 57
Figura 4. Caracterización de los ratones BAMBI-KO 58
Figura 5. Caracterización de los ratones CD3-KO 58
Tabla 1. Secuencias de los diferentes primers utilizados en PCR para identificar regiones específicas de
la mutación de cada ratón a caracterizar 59
Tabla 2. Secuencias de los diferentes primers utilizados en la qPCR para el estudio de la expresión de
BAMBI
Tabla 3. AcMs utilizados para fenotipado, caracterización de poblaciones linfocitarias y expresión de
moléculas de superficie por citometría de flujo 66
Tabla 4. Diferentes coatings y Acs secundarios utilizados en las distintas determinaciones realizadas
mediante ELISA
Figura 6. Eficacia de la purificación de células T CD4 ⁺ de ganglios de ratones WT.OT-II y BAMBI-KO.OT-
II

IV. RESULTADOS

Figura 1. Expresión de mRNA de BAMBI en linfocitos B
Figura 2. Estudio de las subpoblaciones de linfocitos B en médula ósea, bazo y cavidad peritoneal en
ratones WT y BAMBI-KO
Figura 3. Producción de Acs frente a Ags TIs
Figura 4. Producción de Acs frente a un Ag TD
Figura 5. Producción de Acs de ratones WT y BAMBI-KO con el mismo alotipo
Figura 6. Estudio de la producción de Acs de alta y baja afinidad
Figura 7. Estudio de la respuesta frente a un Ag TD en ausencia y presencia de adyuvante
Figura 8. Estudio de la respuesta humoral sistémica y local tras una inmunización por vía intranasal. 87
Figura 9. Estudio de las poblaciones implicadas en el desarrollo de la respuesta humoral TD
Figura 10. Expansión de CPs secretoras de Acs tras inmunización con Ags TDs
Figura 11. Estudio de la respuesta humoral anti-OVA en ratones CD3-KO normales o deficientes en
BAMBI tras la transferencia pasiva de células T CD4 $^{\scriptscriptstyle +}$ OT-II deficientes o no en BAMBI y posterior
inmunización
Figura 12. Esquema explicativo de los posibles efectos observados sobre la diferenciación de las
células T_{FH} y B CG en los ratones DQ mixtos, en función del subtipo celular afectado por la
deficiencia en BAMBI:
Figura 13A. Estudio de la respuesta humoral en ratones quiméricos tras una inmunización con HSA-
CFA95
Figura 13B. Estudio de la respuesta humoral en ratones quiméricos tras una inmunización con HSA-
CFA
Figura 14. Expresión incrementada a nivel basal de diferentes moléculas de superficie en los linfocitos
B de los ratones BAMBI-KO
Figura 15. Comparación de la inducción de la expresión de diferentes moléculas de superficie entre
los linfocitos B de ratones WT y BAMBI-KO tras su estimulación <i>in vitro</i> con anti-IgM y anti-CD40. 98
Figura 16. Inducción de la expresión de ICOSL tras estimulación in vitro con anti-CD40
Figura 17. Estudio de la proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos B procedentes de ratones WT y BAMBI-KO.
Figura 18. Efecto de la neutralización de TGF β sobre la respuesta inmune humoral en los ratones
ВАМВІ-КО
Figura 19. Efecto de la inhibición de TAK1 sobre la producción de Acs frente a HSA 102
Figura 20. Estudio de la aparición de autoinmunidad mediada por autoAcs

V. DISCUSIÓN

Figura	1.	Modelo	hipotético	de	la	influencia	de	BAMBI	sobre	la	señalización	por	tgfβ	у	sus
cons	ecu	iencias so	obre la activ	ació	n d	le los linfoc	itos	В							116

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	Concepto
Ac	Anticuerpo
AcM	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
AHGG	Gamma globulina humana agregada por calor
АР	Fosfatasa alcalina
АРС	Aloficocianina
ΑΡϹ-Ϲγ7	Aloficocianina-cianina 7
AutoAc	Autoanticuerpo
BAFFR	Receptor del factor activador de linfocitos B perteneciente a la familia del
	TNF
BAMBI	BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor
ВАМВІ-КО	Ratones deficientes en BAMBI
BBS	Tampón borato salino
B CG	Células B del centro germinal
Bcl-6	Proteína 6 del linfoma de células B
BCR	Receptor antigénico del linfocito B
B Fol	Células B foliculares
B Inm	Células B inmaduras
Blimp-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
B Mad	Células B maduras
B Mem	Células B memoria
ВМР	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Seroalbúmina bovina
B ZM	Células B de la zona marginal
CCR7	C-C chemokine receptor type 7
CD3-KO	Ratones deficientes en CD3
cDNA	DNA complementario
CFA	Adyuvante completo de Freund
CG	Centro germinal

X Abreviaturas

CIA	Artritis inducida por Colágeno (Collagen-induced arthritis)
СР	Célula plasmática
СРА	Célula presentadora de antígeno
c.p.m.	Cuentas por minuto
CTLA-4	Antígeno leucocitario asociado a función citotóxica
CXCR5	C-X-C chemokine receptor type 5
DC	Célula dendrítica
DN	Timocito doble negativo
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DP	Timocito doble positivo
DQ	Dobles quimeras
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ELISPOT	Ensayo de inmunospot conjugado a actividad enzimática
EMT	Transición epitelio mesénquima
ERK	Extracellular signal–regulated kinases
FBS	Suero fetal bovino
FDC	Célula dendrítica folicular
FITC	Fluoresceína isotiocianato
Foxp3	Forkhead box p3
GATA-3	GATA binding protein 3
HMS	Hipermutación somática
HSA	Seroalbúmina humana
³ H-TdR	(Metil- ³ H)-timidina
ICOS	Inducible T-cell costimulator
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
IFA	Adyuvante incompleto de Freund
IFN	Interferón
lg	Inmunoglobulina

Igh	Alotipo
Ig _H	Cadena pesada de las inmunoglobulinas
lg∟	Cadena ligera de las inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
ЛИК	c-Jun N-terminal kinases
LAP	Latency associated peptide
LES	Lupus eritematoso sistémico
LLC	Large latent complex
LPS	Lipopolisacárido
LTBPs	Proteínas de unión al TGFβ latente
мнс	Complejo mayor de histocompatibilidad
mRNA	RNA mensajero
NFrB	Factor nuclear kanna B
NK	
OLS	Órganos linfoides secundarios
OLS OVA	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina
OLS OVA pb	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases
OLS OVA pb PB	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico
OLS OVA pb PB PBS	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato
OLS OVA pb PB PBS PCR	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa
OLS OVA pb PB PBS PCR PCSK	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa <i>Proprotein convertase subtilisin/kesin</i>
OLS OVA pb PB PBS PCR PCSK PD-1	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa <i>Proprotein convertase subtilisin/kesin</i> <i>Programmed death 1</i>
OLS OVA pb PB PBS PCR PCSK PD-1 PE	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa <i>Proprotein convertase subtilisin/kesin</i> <i>Programmed death 1</i> Ficoeritrina
OLS OVA pb PB PBS PCR PCSK PD-1 PE PerCp	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa <i>Proprotein convertase subtilisin/kesin</i> <i>Programmed death 1</i> Ficoeritrina Peridin-clorofila α-proteína
OLS OVA pb PB PBS PCR PCSK PD-1 PE PerCp PFA	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa Proprotein convertase subtilisin/kesin Programmed death 1 Ficoeritrina Peridin-clorofila α-proteína Paraformaldehído
OLS OVA pb PB PBS PCR PCSK PD-1 PE PerCp PFA PI3K	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa Proprotein convertase subtilisin/kesin Programmed death 1 Ficoeritrina Peridin-clorofila a-proteína Paraformaldehído Fosfoinositol 3-kinasa
OLS OVA pb PB PBS PCR PCSK PD-1 PE PerCp PFA PI3K pTregs	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa <i>Proprotein convertase subtilisin/kesin</i> <i>Programmed death 1</i> Ficoeritrina Peridin-clorofila a-proteína Paraformaldehído Fosfoinositol 3-kinasa Células T reguladoras periféricas
OLS OVA pb PB PBS PCR PCR PCSK PD-1 PE PerCp PFA PI3K pTregs	Órganos linfoides secundarios Ovoalbúmina Pares de bases Azul pacífico Tampón salino fosfato Reacción en cadena de la polimerasa Proprotein convertase subtilisin/kesin Programmed death 1 Ficoeritrina Peridin-clorofila α-proteína Paraformaldehído Fosfoinositol 3-kinasa Células T reguladoras periféricas

RII	Respuesta inmune innata
RNA	Ácido ribonucleico
RORγt	RAR-related orphan receptor gamma
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente
SAP	Proteína asociada a SLAM
SARA	Smad anchor for receptor activation
SAS	Sulfato amónico saturado
SBE	Smad binding element
SI	Sistema Inmune
SLAM	Signaling lymphocyte activation molecule
SLC	Small latent complex
SP	Timocito simple positivo
SQ	Simples quimeras
ssDNA	DNA de cadena sencilla
STAT	Signal transducer and activator of transcription family protein
TAK1	Transforming growth factor beta activated kinase 1
TAK1 TBE	<i>Transforming growth factor beta activated kinase 1</i> Tampón Tris-borato-EDTA
TAK1 TBE T-bet	Transforming growth factor beta activated kinase 1 Tampón Tris-borato-EDTA T-box transcription factor
TAK1 TBE T-bet TCR	<i>Transforming growth factor beta activated kinase 1</i> Tampón Tris-borato-EDTA <i>T-box transcription factor</i> Receptor antigénico de los linfocitos T
TAK1 TBE T-bet TCR TD	<i>Transforming growth factor beta activated kinase 1</i> Tampón Tris-borato-EDTA <i>T-box transcription factor</i> Receptor antigénico de los linfocitos T Timo-dependiente
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ	Transforming growth factor beta activated kinase 1 Tampón Tris-borato-EDTA T-box transcription factor Receptor antigénico de los linfocitos T Timo-dependiente Transforming growth factor β
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FH}	Transforming growth factor beta activated kinase 1 Tampón Tris-borato-EDTA T-box transcription factor Receptor antigénico de los linfocitos T Timo-dependiente Transforming growth factor β Células T foliculares
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FH}	Transforming growth factor beta activated kinase 1 Tampón Tris-borato-EDTA T-box transcription factor Receptor antigénico de los linfocitos T Timo-dependiente Transforming growth factor β Células T foliculares Células T foliculares reguladoras
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FH} T _{FR}	Transforming growth factor beta activated kinase 1 Tampón Tris-borato-EDTA T-box transcription factor Receptor antigénico de los linfocitos T Timo-dependiente Transforming growth factor β Células T foliculares Células T foliculares reguladoras Linfocitos T CD4 ⁺ colaboradores o helper
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FH} T _{FR} Th TI	Transforming growth factor beta activated kinase 1 Tampón Tris-borato-EDTA T-box transcription factor Receptor antigénico de los linfocitos T Timo-dependiente Transforming growth factor β Células T foliculares Células T foliculares reguladoras Linfocitos T CD4 ⁺ colaboradores o <i>helper</i> Timo-independiente
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FR} Th TI TLR	Transforming growth factor beta activated kinase 1Tampón Tris-borato-EDTAT-box transcription factorReceptor antigénico de los linfocitos TTimo-dependienteTransforming growth factor βCélulas T folicularesCélulas T foliculares reguladorasLinfocitos T CD4 ⁺ colaboradores o helperTimo-independienteReceptor tipo-Toll
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FR} Th TI TLR TNF	Transforming growth factor beta activated kinase 1Tampón Tris-borato-EDTAT-box transcription factorReceptor antigénico de los linfocitos TTimo-dependienteTransforming growth factor βCélulas T folicularesCélulas T foliculares reguladorasLinfocitos T CD4 ⁺ colaboradores o helperTimo-independienteReceptor tipo-TollFactor de necrosis tumoral
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FR} Th TI TLR TNF TNP	Transforming growth factor beta activated kinase 1Tampón Tris-borato-EDTAT-box transcription factorReceptor antigénico de los linfocitos TTimo-dependienteTransforming growth factor βCélulas T folicularesCélulas T foliculares reguladorasLinfocitos T CD4 ⁺ colaboradores o helperTimo-independienteReceptor tipo-TollFactor de necrosis tumoralTrinitrofenol
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FH} Th TI TLR TNF TNP Treg	Transforming growth factor beta activated kinase 1Tampón Tris-borato-EDTAT-box transcription factorReceptor antigénico de los linfocitos TTimo-dependienteTransforming growth factor βCélulas T folicularesCélulas T foliculares reguladorasLinfocitos T CD4 ⁺ colaboradores o helperTimo-independienteReceptor tipo-TollFactor de necrosis tumoralTrinitrofenolCélula T reguladora
TAK1 TBE T-bet TCR TD TGFβ T _{FH} T _{FR} Th TI TLR TNF TNP TSLP	Transforming growth factor beta activated kinase 1Tampón Tris-borato-EDTAT-box transcription factorReceptor antigénico de los linfocitos TTimo-dependienteTransforming growth factor βCélulas T folicularesCélulas T foliculares reguladorasLinfocitos T CD4 ⁺ colaboradores o helperTimo-independienteReceptor tipo-TollFactor de necrosis tumoralTrinitrofenolCélula T reguladoraLinfopoyetina estromal tímica

- U Unidades de titulación
- UV Ultravioleta
- VIH Virus de la inmunodeficiencia humana
- **WT** Cepa silvestre (*wild type*)
- 5ZOX 5Z-7-oxozeanol

I. Introducción

Introducción 3

I. INTRODUCCIÓN

El organismo está continuamente expuesto a múltiples agentes externos responsables de producir diferentes enfermedades. La defensa frente a estos agentes externos está mediada por un sistema formado por distintos tipos de células, capaces de reconocer situaciones de peligro y establecer interacciones entre ellas para dar lugar a una respuesta eficaz y específica frente a un determinado agente agresor, sin afectar al propio organismo. A este sistema se le conoce como sistema inmunitario (SI).

El SI ejerce su función mediante la acción combinada de dos compartimentos celulares y moleculares diferentes conocidos como respuesta inmune innata (RII) y respuesta inmune adaptativa (RIA). Mientras que la RII actúa como primera línea de defensa rápida pero inespecífica, la RIA proporciona una respuesta más específica, además de protección frente a una nueva exposición.

La RII está formada por diferentes poblaciones celulares que se activan mediante el reconocimiento de patrones moleculares altamente conservados en patógenos y de diferentes señales de peligro relacionadas con daño celular. Son respuestas rápidas, poco específicas, y recientemente se ha descrito que tienen capacidad de aumentar su respuesta ante una segunda exposición al patógeno, proceso denominado como memoria inmune innata (Netea et al., 2016). Las funciones de estas células son tanto combatir al agente invasor, mediante una acción fagocítica (macrófagos y neutrófilos) y otra acción citotóxica [basófilos, mastocitos, eosinófilos y células natural killer (NK)], como activar a la RIA mediante la presentación antigénica [macrófagos y células dendríticas (DC)].

La RIA es llevada a cabo por linfocitos que tienen la capacidad de reconocer de manera específica cualquier antígeno (Ag) gracias a la amplia variabilidad en el receptor antigénico que estas células expresan. Esta enorme variabilidad en el reconocimiento de los Ags condiciona la aparición de un sofisticado sistema de control que impida la activación de aquellos clones celulares que reconozcan Ags propios. Por otro lado, los linfocitos en su activación, además del contacto con el Ag a través de su receptor antigénico, requieren recibir señales coestimuladoras proporcionadas por células especializadas. Tras la activación se produce una expansión clonal de los linfocitos específicos del Ag, llevándose a cabo una respuesta adaptada al patógeno en cuestión y la generación de memoria inmunológica, que permitirá montar una respuesta más rápida y eficaz ante posteriores exposiciones. La RIA emplea dos brazos efectores en la defensa

4 Introducción

del organismo, por un lado ejerce una respuesta celular o citotóxica, mediada por linfocitos T, y por otro una respuesta humoral, mediada por linfocitos B.

1. Linfocitos T.

Los linfocitos T son células generadas en el timo caracterizadas por la expresión de un receptor antigénico (TCR) que es capaz de reconocer diferentes determinantes antigénicos presentados en moléculas del complejo mayor de histocompatibiidad (MHC). Existen dos grandes poblaciones de linfocitos T con funciones muy diferentes en la respuesta inmune y caracterizadas por la expresión del correceptor CD4 o del correceptor CD8.

1.1. Linfocitos T CD8⁺.

Los linfocitos T CD8⁺ son las células encargadas de llevar a cabo la respuesta celular de la RIA mediante mecanismos de citotoxicidad, permitiendo la eliminación de células infectadas por microorganismos intracelulares y de células tumorales. Se caracterizan por reconocer Ags citosólicos presentados en MHC de tipo I (MHC-I), de modo que cuando se encuentran con células infectadas que presentan en su superficie moléculas MHC-I unidas al Ag específico que reconocen, los linfocitos T CD8⁺ son capaces de detectarlas y de eliminarlas.

Su activación requiere la interacción con una célula presentadora de Ag (CPA), la cual además de presentarle el Ag en una molécula MHC-I, le proporciona las señales coestimuladoras necesarias a través de la interacción de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) presentes en las CPAs con la molécula CD28 en el linfocito T CD8⁺ y mediante la secreción de diversas citocinas necesarias para su activación y proliferación como la IL-2, IL-6, IL-12 o IFNγ. La necesidad de ser activadas por una CPA a través de MHC-I (presentación de Ags intracelulares) podría plantear un problema ante un patógeno que no infecta a las CPA o ante un Ag tumoral no expresado en estas CPA. Estas situaciones son resueltas gracias a la capacidad de las DCs de fagocitar estas células infectadas y llevar los Ags ingeridos hacia la vía citosólica de presentación de antigénica. Este proceso se conoce como presentación cruzada (Albert et al., 1998). En ocasiones la presentación de los linfocitos T CD4⁺. Esta implicación de los linfocitos T CD4⁺ se puede producir de dos maneras diferentes, por una parte pueden secretar citocinas necesarias para la activación de los linfocitos T CD4⁺ o IFNγ, y por otra parte pueden aumentar la eficacia de las CPA a la hora de activar a los linfocitos T CD8⁺ mediante la unión CD40-CD40L, que produce aumento de expresión

de moléculas coestimuladoras y secreción de citocinas que favorecen la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ como la IL-12 (Zhang et al., 2009). Este fenómeno se conoce como autorización de la CPA (Lanzavecchia, 1998).

Una vez activadas, las células T CD8⁺ se unen a las células diana mediante interacción entre su TCR y el Ag presentado en MHC-I, provocando una reorientación del citoesqueleto que permite que los gránulos líticos, donde se encuentran las moléculas citotóxicas, se orienten hacia la zona donde está la célula diana (Anikeeva and Sykulev, 2011). El contenido de estos gránulos son proteínas que una vez liberadas van a provocar efectos citotóxicos en la célula diana. Por un lado están las granzimas, que son unas serina-proteasas que ponen en marcha diferentes programas de muerte celular activando directamente a caspasa 3 o a través de la unión a la molécula proapoptótica Bid (Sutton and Trapani, 2010). Las granzimas se translocan a las células diana gracias a la acción de otro tipo de proteína contenida en los gránulos, como es la perforina. Esta proteína forma un complejo junto con granzimas y serglicinas, el cual penetra en la célula diana por endocitosis. Una vez dentro, la perforina facilita la liberación de las granzimas al citoplasma de la célula diana (Metkar et al., 2002). Otra manera de inducir muerte celular es mediante la expresión de FasL, el cual es capaz de activar la cascada de caspasas e inducir apoptosis en la célula diana al unirse a Fas (Shresta et al., 1998).

1.2. Linfocitos T CD4⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ o colaboradores (Th) son células que tienen la capacidad de organizar y dirigir la respuesta inmunológica más eficaz frente al tipo de patógeno que la desencadena. Esto es posible debido a que durante su activación por parte de una CPA, estas células van a sufrir un proceso de diferenciación funcional dando lugar a distintas subpoblaciones caracterizadas por la producción y secreción de un patrón de citocinas característico. En este proceso, las CPA, además de presentar el Ag a las células T CD4⁺ *naïve*, en este caso en moléculas MHC-II, y de suministrar las señales coestimuladoras necesarias para su activación, van a producir citocinas que regulan el programa de diferenciación funcional del linfocito T CD4⁺. Cada una de las subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4⁺ va a estar especializada en combatir un tipo particular de patógenos, como comentaremos a continuación (Figura 1).



Figura 1. Diferenciación funcional de las células T CD4⁺ *naïve* tras el contacto con el antígeno. En función del ambiente de citocinas presente durante el momento de la activación por parte del Ag, las células T CD4⁺ *naïve* se diferencian hacia células Th1, Th2, Th17, Th9, Treg y T_{FH}. Estas subpoblaciones tienen un patrón de expresión de citocinas característico que les permite desarrollar sus funciones en la respuesta inmune.

1.2.1. Células Th1.

Se encargan de neutralizar infecciones por bacterias intracelulares y virus mediante la secreción de IFN γ , TNF α e IL-2. Estas citocinas participan en la activación de células fagocíticas y citotóxicas como macrófagos, células NK y células T CD8⁺, que se encargarán de eliminar a las células infectadas (Nathan et al., 1983; Britton et al., 1998; Trinchieri, 2003; Zhang et al., 2009). Por el contrario, la activación aberrante de las células Th1 puede contribuir al desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la enfermedad de Crohn, diabetes tipo 1 y esclerosis múltiple (Lazarevic and Glimcher, 2011).

La diferenciación hacia células Th1 está regulada por el factor de transcripción T-bet, siendo necesaria la presencia de IFN γ e IL-12 durante la activación de la célula T CD4⁺ *naïve* para su expresión (Wenner et al., 1996). La IL-12 producida por las CPAs tras el contacto con el patógeno induce la secreción de IFN γ por parte de las células NK (Orange and Biron, 1996). La

célula T CD4⁺ *naïve* es estimulada a través del TCR en presencia de este IFN γ , el cual señaliza a través de IFN γ R y STAT-1, generando una primera inducción del factor de transcripción T-bet independiente de IL-12, la cual induce la expresión de IFN γ . Esta inducción de T-bet junto con el cese de la estimulación antigénica a través del TCR y el efecto de la IL-2 vía STAT-5, producen un aumento en la expresión de la subunidad específica del receptor de la IL-12 (IL-12R β_2), haciendo sensible a la célula a los efectos de la IL-12. La señalización de la IL-12 vía STAT-4 origina una segunda inducción de T-bet, lo cual es requerido para la estabilización del fenotipo (Thieu et al., 2008; Schulz et al., 2009; Liao et al., 2011; Lazarevic et al., 2013) (Figura 2).



Figura 2. Diferenciación Th1. La IL-12 producida por las CPAs tras el contacto con bacterias intracelulares y virus induce la producción de IFN γ por parte de las células NK. La estimulación de la célula T CD4⁺ *naïve* a través del TCR y la señalización de IFN γ vía IFN γ R y STAT-1 induce una primera inducción de T-bet que da inicio a la diferenciación Th1 mediante la producción de IFN γ . Además T-bet junto con la señalización de la L-2 vía STAT-5, induce la expresión de IL-12R β_2 haciendo sensible a la célula a los efectos de la IL-12, que a través de STAT-4 produce una segunda inducción de T-bet que da lugar a la estabilización del fenotipo.

1.2.2. Células Th2.

Son células implicadas en combatir infecciones por helmintos mediante la secreción de citocinas como la IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Tradicionalmente se han asociado a una respuesta de tipo humoral, aunque se ha descrito que son las células T foliculares (T_{FH}) y no las células Th2 las encargadas de entrar al folículo y ayudar a las células B en la formación de los centros germinales (Breitfeld et al., 2000).

La diferenciación de las células Th2 requiere la interacción con poblaciones específicas de DCs que favorecen su diferenciación. Estas DCs expuestas a Ags helmínticos y a alarminas como la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) sufren un aumento en la expresión de los factores de transcripción STAT-5 e IRF4, responsables de la regulación de la expresión de diferentes moléculas en las DCs con el fin de favorecer la diferenciación Th2. Se produce un aumento en la expresión de CD40, que conduce a un aumento en la expresión de OX40L, se induce una disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras, que provoca una estimulación más débil del TCR, y también se inhibe la secreción de IL-12, la cual induce diferenciación Th1. Todas estas señales provenientes de las DCs favorecen la diferenciación Th2 (Hussaarts et al., 2014; Tjota and Sperling, 2014). Durante la activación por parte de la DC también es importante la presencia de las citocinas IL-4 e IL-2 (Le Gros et al., 1990; Swain et al., 1990). La IL-4 a través de la fosforilación de STAT-6, permite la expresión del factor de transcripción GATA-3, el cual es indispensable para la generación de estas células Th2 y la producción de su patrón de citocinas característico (Zhou and Ouyang, 2003). La fuente inicial de IL-4 son basófilos activados que van a los ganglios linfáticos y producen grandes cantidades de esta citocina (Sokol et al., 2008), aunque también se ha visto que células T CD4⁺ naïve pueden producir IL-4 tras estimulación antigénica en ausencia de señalización a través del receptor de la IL-4 (IL-4R) (Noben-Trauth et al., 2000). La IL-2 ejerce sus efectos a través de la activación de STAT-5, necesario también para la diferenciación hacia esta población (Zhu et al., 2003) (Figura 3).



Figura 3. Diferenciación Th2. La estimulación de una célula T $CD4^+$ *naïve* a través del TCR por una CPA que ha estado en contacto con Ags helmínticos junto con la IL-4 producida por basófilos activados, que señaliza a través de IL-4R-STAT-6, dan lugar a la expresión del factor de transcripción GATA-3, el cual induce la síntesis del patrón de citocinas característico de las células Th2. La IL-2 también induce la producción de IL-4 a través de STAT-5.

En el transcurso de una respuesta polarizada hacia el tipo Th2, la IL-4 induce el cambio de isotipo en las células B hacia IgG1 e IgE (Zhu, 2015). La IgE unida a antígenos polivalentes es reconocida por receptores FccRI de basófilos y mastocitos, produciendo entrecruzamientos de estos receptores y llevando a la activación de estas células, las cuales liberan citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, histamina y otros mediadores vasoactivos contenidos en sus gránulos. La degranulación de estas células provoca un aumento del flujo sanguíneo y un aumento de la permeabilidad vascular que va a facilitar el reclutamiento de células inflamatorias, también se produce un aumento de la producción del moco por parte de las células epiteliales que favorece la inmovilización del parásito y la protección del tejido, y por último se produce contracción del IL-5 favorece el reclutamiento, supervivencia y función efectora de los eosinófilos (Yamaguchi et al., 1988). Por el contrario, una actividad excesiva de estas células Th2 se relaciona con la aparición de enfermedades alérgicas (Barrett and Austen, 2009).

1.2.3. Células Th17.

Son células que se caracterizan por la secreción de IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-10 y GM-CSF, que les permite actuar frente a infecciones por bacterias extracelulares y hongos. Por un lado, inducen la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 o G-CSF por parte de células residentes en los tejidos, como fibroblastos y células endoteliales (Martinez et al., 2008), y por otro lado, favorecen la proliferación y reclutamiento de neutrófilos al foco inflamatorio (Mantovani et al., 2011). Un exceso de respuesta de estas células Th17 se asocia con la aparición enfermedades inflamatorias autoinmunes como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y psoriasis (Toh and Miossec, 2007; Aranami and Yamamura, 2008; Di Cesare et al., 2009; Neurath, 2014).

Recientemente se ha demostrado la existencia de diferentes subpoblaciones de células Th17 en función del ambiente de citocinas en el que se generan y de la capacidad para inducir inflamación (Lee and Kuchroo, 2015). Por un lado, están las células generadas en presencia de TGFβ1 e IL-6, denominadas células Th17 no patogénicas, las cuales no producen inflamación e incluso inhiben el desarrollo de autoinmunidad mediante la producción de IL-10 (McGeachy et al., 2007), y por otro lado están las células Th17 patogénicas, las cuales se generan en presencia de IL-23, donde se inhibe la producción de IL-10 y se induce la secreción de GM-CSF e IL-22 (Kreymborg et al., 2007; Codarri et al., 2011; Lee and Kuchroo, 2015).

La diferenciación hacia células Th17 requiere durante el reconocimiento antigénico inicial la presencia de TGF β 1 e IL-6 (Veldhoen et al., 2006). Además de su capacidad para inducir la expresión de Foxp3 y su papel en la diferenciación de células T reguladoras (Tregs, ver más adelante), TGF β 1 induce la expresión de ROR γ t, factor de transcripción característico de esta población (Zhou et al., 2008). Por su parte la IL-6 mediante la activación del factor de transcripción STAT-3, participa en la inducción de la expresión de ROR γ t e inhibe la expresión de Foxp3 inducida por TGF β 1 (Yang et al., 2007; Yang et al., 2008). El TGF β 1 también actúa de manera indirecta impidiendo la diferenciación hacia células Th1 y Th2 mediante la inhibición de los factores de transcripción STAT-4 y GATA-3 respectivamente (Das et al., 2009). La IL-21, producida en gran cantidad por las células Th17, es capaz de inducir la diferenciación hacia células Th17 en ausencia de IL-6, evidenciando un papel en la amplificación de esta población (Korn et al., 2007). Recientemente se ha discutido el papel del TGF β 1 en la diferenciación a células Th17 debido a que se puede inducir esta población en ausencia de TGF β 1 y en presencia
bien de IL-1 β , IL-6 e IL-23 o de TGF β 3 e IL-6. En estas dos últimas condiciones de diferenciación las células Th17 que se generan presentan un incremento en su potencial patogénico en asociación con la expresión de un perfil de expresión génico diferente (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012). La activación de STAT-3 por parte de la IL-6, IL-1 β e IL-21 induce la expresión del receptor de la IL-23 (IL-23R), citocina clave para la expansión, mantenimiento y como se dijo anteriormente, la adquisición de un fenotipo más patogénico (Ghoreschi et al., 2010). La IL-23 a través de la activación de STAT-3 y de la producción de TGF β 3, provoca un aumento en la expresión de IL-23R, creando un bucle de amplificación que permite el mantenimiento de la población (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012) (Figura 4).



Figura 4. Diferenciación Th17. Tras el contacto de las CPAs con bacterias extracelulares y hongos, las células T $CD4^+$ *naïve* son activadas en presencia de TGF β e IL-6 dando lugar a la diferenciación a células Th17. La señalización a través de TGF β y la activación de STAT-3 por parte de la IL-6 induce la expresión del factor de transcripción ROR γ t, el cual promueve la expresión de las citocinas características de esta subpoblación. La activación de STAT-3 induce la expresión de IL-23R, haciendo a la célula sensible a los efectos de la IL-23 y permitiendo la estabilización del fenotipo.

1.2.4. Células Th9.

Es una población celular descrita recientemente y caracterizada por la producción de IL-9. Está implicada en la eliminación de parásitos (Veldhoen et al., 2008). La secreción de IL-9 por parte de estas células induce la producción de citocinas tipo Th2 como la IL-5 y la IL-13 lo que promueve un aumento en el número de basófilos y de mastocitos (Licona-Limon et al., 2013). Se ha descrito también una actividad protectora frente a tumores sólidos por parte de estas células Th9, principalmente en melanoma, mediante la activación de mastocitos y el reclutamiento al tejido tumoral de DCs que permiten la activación de células T CD8⁺ citotóxicas (Lu et al., 2012; Purwar et al., 2012). Como contrapunto, esta células se han visto implicadas en el desarrollo de enfermedades atópicas, enfermedad inflamatoria intestinal y esclerosis múltiple (Kaplan et al., 2015).

La diferenciación hacia esta población requiere la presencia de IL-4, TGF β e IL-2. La IL-4 actúa a través de la fosforilación del factor de transcripción STAT-6, el cual por un lado inhibe a los factores de transcripción Foxp3 y T-bet, inhibidores de la producción de IL-9, y por otro lado induce la expresión de IRF4, BATF y GATA-3, factores de transcripción implicados en la expresión de IL-9 (Dardalhon et al., 2008; Staudt et al., 2010; Goswami et al., 2012; Jabeen et al., 2013). El TGF β favorece la diferenciación a células Th9 mediante la activación de las proteínas Smad2/3, las cuales forman un complejo con IRF4 en el promotor de la IL-9, necesario para su expresión (Tamiya et al., 2013). TGF β también actúa mediante la inducción de PU.1, que es un factor de transcripción que induce la expresión de IL-9 (Chang et al., 2010). El efecto de la IL-2 sobre la diferenciación a esta población celular es dependiente de STAT-5, el cual es capaz de unirse al promotor de la IL-9 y activarlo compitiendo además por la unión al promotor con Bcl-6, inhibidor de la expresión de IL-9 (Liao et al., 2014).

1.2.5. Células T reguladoras.

El SI en su lucha constante frente a todo tipo de agentes externos puede dar lugar a situaciones potencialmente peligrosas en las que es necesario regular su respuesta. Para ello el SI cuenta con diversos mecanismos reguladores englobados bajo el término de tolerancia inmunológica. Estos mecanismos son necesarios para el control de la respuesta frente a elementos contra los que no nos interesa actuar como antígenos propios, antígenos ambientales, antígenos alimentarios o microorganismos comensales, previniendo estados de autoinmunidad, inflamación y daño tisular. Uno de estos mecanismos es la existencia de células con actividad

supresora entre las que se encuentran las células Tregs, caracterizadas por la expresión del factor de transcripción Foxp3 y de la cadena α del receptor de la IL-2, el CD25 (Sakaguchi et al., 1995; Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003).

La actividad supresora de estas células tiene lugar a través de distintos mecanismos que implican a diferentes moléculas. La expresión de altos niveles de CD25 provoca un alto consumo de IL-2, citocina necesaria para la supervivencia y proliferación de células T efectoras (Pandiyan et al., 2007). CD39 y CD73 son ectoenzimas que se encargan de hidrolizar ATP a adenosina, la cual tiene efectos inhibitorios en células T activadas (Deaglio et al., 2007). La modulación de la actividad de las CPAs es otro mecanismo de supresión de las células Tregs, el cual requiere la expresión de diferentes moléculas. CTLA-4 es una molécula de superficie expresada por las células Tregs que está implicada en su función supresora debido a que produce una disminución de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en las DCs mediante endocitosis (Qureshi et al., 2011). Así mismo, la interacción entre CTLA-4 y CD80 y CD86 promueve la producción en las DCs de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), la cual interviene en el catabolismo del triptófano produciendo kinureninas y otros metabolitos con un potente efecto inmunosupresor en las células de su entorno (Fallarino et al., 2003; Fallarino et al., 2006). LAG-3 es una molécula expresada en la superficie de las células Tregs que se une al MHC-II de las DCs suprimiendo su maduración y sus efectos coestimuladores (Liang et al., 2008), mientras que la neuropilina-1 facilita el establecimiento de contactos de larga duración con la CPA permitiendo la ejecución de sus funciones supresoras (Sarris et al., 2008) y su interacción con sus receptores específicos incrementa la estabilidad fenotípica de las células Tregs (Delgoffe et al., 2013). La secreción de citocinas inmunosupresoras como IL-10, IL-35 o TGF β , es otro mecanismo de actuación de las células Tregs (von Boehmer, 2005; Collison et al., 2007). Por último, otro mecanismo por el cual las células Tregs regulan la respuesta inmunológica es mediante la inducción de muerte en las células efectoras a través de la liberación de granzima B (Gondek et al., 2005).

Las células Tregs en función del lugar donde se generen se pueden clasificar en células Tregs tímicas (tTregs) y en células Tregs periféricas (pTregs), poblaciones con diferentes funciones en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica. Las células tTregs se generan en el timo recibiendo una señal a través del TCR de mayor afinidad que la requerida para la diferenciación de las células T convencionales. Esta autorreactividad controlada les permite prevenir estados de autoinmunidad, suprimiendo la respuesta frente a Ags propios (Jordan et al., 2001; Samy et al., 2006). Se ha descrito que las señales a través del TCR llevan a un aumento en la expresión de CD25, lo que conlleva un incremento en la señalización por IL-2 y la inducción del factor de transcripción Foxp3, clave para la función de las células Tregs (Lio and Hsieh, 2008). La coestimulación a través del CD28 también tiene relevancia en la generación de esta población, ya que la ausencia de CD28 produce una reducción considerable de las mismas (Salomon et al., 2000) y su activación induce la expresión de Foxp3 en timocitos (Tai et al., 2005). El TGF β no tiene un papel tan importante como en la generación de células Tregs en la periferia, pero sí se ha visto que contribuye a la supervivencia de los timocitos tras el fuerte reconocimiento del Ag regulando la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 (Ouyang et al., 2010).

Las células pTregs son generadas en la periferia con el objetivo de inducir tolerancia frente a Ags externos (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009; Lee et al., 2011), aunque también funcionan como una segunda oportunidad de las células T autorreactivas que escapan de la selección tímica de convertirse en células Tregs (Lathrop et al., 2008). La diferenciación hacia esta población se ve favorecida con la estimulación a través del TCR con Ags de alta afinidad a bajas dosis (Gottschalk et al., 2010) y en condiciones de exposición continuada al Ag (Apostolou and von Boehmer, 2004). La presencia de las citocinas TGF β e IL-2 inducen su diferenciación mediante la inducción de Foxp3 (Chen et al., 2003; Davidson et al., 2007) (Figura 5). TGF β induce la fosforilación de las proteínas Smad2/3, las cuales se unen a la secuencia conservada no codificante CNS1, cuya eliminación produce provoca la pérdida selectiva de estas células pTregs, demostrando la importancia del TGF β en la inducción de esta población (Zheng et al., 2010). La estabilidad del fenotipo se ve favorecida por la hipometilación de la secuencia conservada no codificante CNS2, lugar de unión para factores de transcripción importantes en esta población como son STAT-5 y el propio Foxp3 (Kanamori et al., 2016).



Figura 5. Diferenciación a células pTregs. Las células T $CD4^+$ *naïve* tras el contacto con un Ag en la periferia en presencia de TGF β e IL-2 se diferencia a células pTregs. TGF β a través de la ruta canónica Smad dependiente e IL-2 mediante la activación de STAT-5 inducen la expresión del factor de transcripción Foxp3, el cual va a promover la producción del patrón de citocinas característico de esta población.

1.2.6. Células T foliculares (T_{FH}).

Es una población de células T CD4⁺ especializada en proveer ayuda a las células B, permitiéndoles llevar a cabo la formación de centros germinales (CGs), estructuras microanatómicas situadas en los folículos de los órganos linfoides secundarios donde las células B sufren los procesos de hipermutación somática (HMS), maduración de la afinidad y cambio de isotipo, necesarios para la formación de anticuerpos (Acs) de alta afinidad.

La existencia de ayuda de las células T CD4⁺ a las células B en la producción de Acs fue descubierta en los años 60 al observarse que para producir Acs tras una inmunización con eritrocitos de oveja era necesaria la presencia tanto de células derivadas de la médula ósea como del timo. En este escenario, las células que provenían del timo no eran capaces de producir Acs pero eran necesarias para inducir la producción de Acs por parte de las células derivadas de la médula ósea (Miller and Mitchell, 1968; Mitchell and Miller, 1968). Años más tarde se descubrió el papel de la IL-4 como factor de crecimiento para las células B (Howard et al., 1982) y tras el descubrimiento de las células T CD4⁺ Th1-Th2, se asignó a las células Th2 productoras de IL-4 el papel de células que ayudan a las células B a producir Acs (Mosmann et al., 1986). Con el tiempo fueron apareciendo estudios que ponían en duda esta función de las células Th2 ya que la

deficiencia en IL-4 no reducía la generación de CGs (Kopf et al., 1995). El descubrimiento de la importancia de las interacciones entre CD40 en la célula B y CD40L en la célula T CD4⁺ en la formación de CGs evidenció la necesidad de un contacto directo entre ambas poblaciones (Foy et al., 1994). En este sentido se definió también la importancia de la expresión de las moléculas ICOS y SAP en las células T CD4⁺ para la formación de los CGs (Dong et al., 2001; Crotty et al., 2003). En el año 2000 aparecieron estudios proponiendo la existencia de una subpoblación de células T CD4⁺ especializada en proveer ayuda a las células B en la producción de Acs, denominadas células T CD4⁺ foliculares (T_{FH}), caracterizadas por la expresión del receptor de quimiocinas CXCR5, el cual se une a CXCL13 permitiendo su localización en el folículo, además de altos niveles de CD40L e ICOS (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000; Kim et al., 2001). Más tarde se describió la presencia de PD-1 en las células T CD4⁺ del CG, definiéndose como un marcador adicional de esta población (Iwai et al., 2002; Haynes et al., 2007). La existencia de las células T_{FH} como población T CD4⁺ independiente no fue totalmente aceptada hasta el año 2009 con el descubrimiento del factor de transcripción Bcl-6 necesario y suficiente para su diferenciación (Johnston et al., 2009; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009).

La generación de células T_{FH} es un proceso secuencial en la que intervienen distintos tipos celulares y que tiene lugar en diferentes zonas de los órganos linfoides secundarios (Crotty, 2014). Esta diferenciación a T_{FH} y la consecuente migración hacia el folículo, en lugar de completar otros programas de diferenciación que determinan salir del tejido linfoide hacia focos de infección e inflamación, es decidida en las primeras rondas de división tras el encuentro con el antígeno (Choi et al., 2013). Se inicia en las regiones T del órgano linfoide secundario con la activación de las células T CD4⁺ naïve por parte de las DCs en presencia de citocinas como la IL-6 y la IL-21 y de diferentes moléculas de coestimulación. La IL-6 producida por las DCs en respuesta a estímulos microbianos es uno de los factores iniciadores de la diferenciación a células T_{FH} (Qi, 2016). Este efecto está mediado por la inducción de Bcl-6 a través de la activación de los factores de transcripción STAT-3 y STAT-1 (Nurieva et al., 2008; Choi et al., 2013) y de la inducción de la expresión de IL-21, otra citocina implicada en la diferenciación y mantenimiento de esta población (Eto et al., 2011). En la diferenciación de las células T_{FH} la IL-21, producida de manera autocrina, promueve la expresión de Bcl-6 a través de la activación de STAT-3 (Nurieva et al., 2008; Vogelzang et al., 2008) (Figura 6). Estudios en humanos han demostrado que aparte de las citocinas mencionadas anteriormente, la IL-12, IL-23 e incluso TGF β , el cual en ratones tiene un efecto inhibidor, están también implicadas en la diferenciación a células T_{FH} (Vinuesa et al., 2016). La señalización a través de diferentes moléculas de coestimulación también es importante en el

inicio de la diferenciación a células T_{FH}. La interacción entre ICOS en la célula T CD4⁺ *naïve* e ICOSL en la DC induce la expresión de Bcl-6 (Choi et al., 2011), la cual es mediada por la activación de la vía fosfoinositol 3-kinasa (PI3K) que reprime la expresión del factor de transcripción Foxo-1, un inhibidor de la expresión de Bcl-6 (Stone et al., 2015). La señalización a través de CD28 en la célula T CD4⁺ y de CD40 en la DC es necesaria para la migración de las células T CD4⁺ hacia el folículo, permitiendo la interacción entre OX40 y OX40L, lo cual induce la expresión de CXCR5 en la célula T CD4⁺ (Walker et al., 1999; Fillatreau and Gray, 2003; Boettler et al., 2012).

Las citocinas e interacciones mencionadas anteriormente conducen a la expresión de Bcl-6, el factor de transcripción característico de las células T_{FH}. Las funciones de Bcl-6 en la diferenciación a esta población están relacionadas con la regulación de moléculas implicadas en la migración hacia el folículo y con la represión de otros destinos de diferenciación (Qi, 2016). Bcl-6 reprime la expresión de moléculas relacionadas con el posicionamiento fuera del folículo, como son CCR6, CCR7, PSGL1, EBI2 y S1P1 (Hatzi et al., 2015), mientras que induce la expresión de CXCR5, receptor de quimiocinas necesario para la migración hacia el folículo (Yu et al., 2009) (Figura 6). Existe una relación de antagonismo recíproco entre Bcl-6 y Blimp-1, factor de transcripción inducido por la IL-2 e implicado en la diferenciación hacia las poblaciones efectoras Th1, Th2 y Th17 (Johnston et al., 2009; Crotty et al., 2010; Johnston et al., 2012). Además Bcl-6 reprime directamente la expresión o función de mediadores de la diferenciación hacia estas poblaciones efectoras como IFN γ R1, T-bet y STAT-4 (Th1), GATA-3 (Th2) y ROR γ t, ROR α e IL-17 (Th17) (Kusam et al., 2003; Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009; Hatzi et al., 2015). Se han descrito otros factores de transcripción implicados en la diferenciación a células T_{FH} mediante la inducción de Bcl-6 (BATF, TCF-1, LEF-1, EGR2 y EGR3), ICOS (TCF-1 y LEF-1), CXCR5 (ASCL2) e IL-21 (c-MAF y BATF) (Vinuesa et al., 2016). A nivel postranscripcional también existe una regulación de la diferenciación a esta población a través de proteínas de unión a RNA y de microRNAs, que actúan tanto potenciándola (miR-17~92 y miR-155) como reprimiéndola (Roquin y miR-146a) (Vinuesa et al., 2016) (Figura 6).



Figura 6. Inicio de la diferenciación a célula T_{FH.} En la zona T de los órganos linfoides secundarios las células T CD4⁺ *naïve* activadas por las DCs en presencia de IL-6 e interacciones ICOS-ICOSL comienzan su diferenciación hacia células T_{FH}. La IL-6 producida por las DCs induce la síntesión de IL-21 y el factor de transcripción Bcl-6, a través de la activación de STAT-1 y STAT-3. Bcl-6 activa la expresión de CXCR5, que en respuesta a la quimiocina CXCL13 provoca la migración de las células hacia la zona T-B. La producción autocrina de IL-21 permite la estabilización del fenotipo mediante la activación de STAT-3.

Una vez las células T CD4⁺ expresan el receptor de quimiocinas CXCR5 tras el contacto con la DC, adquieren un fenotipo de células pre- T_{FH} y entre las 24 y 48 horas posteriores empiezan a migrar hacia el folículo. En la frontera entre la zona T y el folículo (frontera T-B), los linfocitos pre-T_{FH} se encuentran con las células B activadas por el antígeno, las cuales se localizan en esta zona tras inducirse en ellas la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, lo que les permite abandonar la región folicular (Reif et al., 2002; Kerfoot et al., 2011). Se establecen interacciones T-B antígeno específicas de larga duración que permiten la completa diferenciación a células T_{FH} (Okada et al., 2005; Haynes et al., 2007). La interacción entre las células pre-T_{FH} y las células B es estabilizada por la presencia de la proteína adaptadora SAP, presente en las células T CD4⁺ y en las células B, siendo su expresión en las células T CD4⁺ imprescindible para la formación de los CGs (Crotty et al., 2003; Qi et al., 2008). SAP se une a proteínas de la familia SLAM (CD84, Ly108), receptores expresados por las células T y B, que mediante asociaciones homofílicas cooperan en la estabilización de los conjugados T-B. SAP actúa tanto promoviendo señales positivas en la célula T CD4⁺ mediante la unión a CD84 que permiten la adhesión T-B, como evitando señales negativas desencadenadas por Ly108 en la célula T CD4⁺, compitiendo con la fosfatasa SHP-1 por la unión a la misma (Cannons et al., 2010; Kageyama et al., 2012). La interacción de las células pre-T_{FH} con células B antígeno específicas promueve la producción de IL-21 y una segunda inducción de Bcl-6 que permite la expansión y estabilización de la población (Baumjohann et al., 2011; Goenka et al., 2011) (Figura 7). La señalización a través de ICOS además de tener importancia en favorecer la diferenciación hacia célula T_{FH}, se ha visto que tiene un papel en la migración de las células T_{FH} hacia el folículo, promoviendo la motilidad de las células mediante la generación coordinada de pseudópodos. Esta función de ICOS requiere la unión con ICOSL procedente de células B antígeno inespecíficas (Xu et al., 2013).

Las células T_{FH} en la frontera T-B inducen la proliferación extrafolicular de las células B antígeno específicas con las que interaccionan, las cuales pueden seguir una ruta extrafolicular, productoras de Ac de baja afinidad y vida media corta, o folicular, dando lugar a la formación de los CGs, donde se convertirán en células productoras de Ac de alta afinidad y vida media larga (De Silva and Klein, 2015). Las células T_{FH} migran hacia el folículo junto con las células B con destino folicular pasando a formar parte del CG, donde van a adquirir un fenotipo más maduro con los niveles de expresión más altos de Bcl-6, CXCR5, PD-1, ICOS y SAP, así como la secreción de moléculas como CXCL13, IL-21 e IL-4 principalmente (Crotty, 2014) (Figura 7).

Una vez en el CG, las células T_{FH} siguen requiriendo contacto con las células B del centro germinal (B CG) para el mantenimiento del fenotipo, estando la frecuencia de ambas poblaciones positivamente correlacionada (Rolf et al., 2010). En esta fase sigue siendo imprescindible la expresión de SAP, necesaria para el reclutamiento y mantenimiento en el CG de las células T_{FH} (Qi et al., 2008). Al contrario que en la frontera T-B, las interacciones entre la célula T_{FH} y la célula B CG son de corta duración (Allen et al., 2007). Sin embargo presentan un área de contacto elevado, proporcional al nivel de presentación antigénica y a la coestimulación mediada por ICOSL, que producen un aumento en la liberación de calcio intracelular en la célula T_{FH} (Shulman et al., 2014; Liu et al., 2015). La interacción ICOS-ICOSL además de permitir estos contactos funcionales también induce la movilización de CD40L a la superficie de la célula T_{FH}, señal de supervivencia para las células B CG y que a su vez induce más expresión de ICOSL en las mismas, estableciéndose una retroalimentación positiva entre ambas poblaciones (Liu et al., 2015).



Figura 7. Diferenciación secuencial de las células T_{FH}. En la zona T de los OLS las DCs activan a las células T CD4⁺ *naïve*, las cuales en presencia de IL-6 y de interacciones entre diferentes moléculas coestimuladoras como ICOS-ICOSL, expresan el factor de transcripción Bcl-6 y el receptor de quimiocinas CXCR5, que les permite migrar hacia la zona T-B, denominándose células pre-T_{FH}. En la frontera T-B las células pre-T_{FH} se encuentran con células B activadas por el mismo Ag que han migrado desde el folículo, produciéndose una interacción Ag específica, la cual es estabilizada mediante interacciones entre proteínas de la familia SLAM. La producción de IL-21 por las células T CD4⁺ por un lado induce la diferenciación de las células B a células B CG, y por otro lado promueve una segunda inducción de Bcl-6 en las células pre-T_{FH} que permite la estabilización del fenotipo y la migración junto con estas células B CG al folículo, donde se formará el CG. Una vez allí, las células T_{FH} proporcionan señales de supervivencia a las células B CG con mayor afinidad por el Ag, mediante interacciones CD40-CD40L y la secreción de IL-21.

Las células T_{FH} se sitúan en la zona clara del CG con la función de seleccionar aquellas células B CG que tras haber sufrido mutaciones en las regiones variables de su receptor antigénico (HMS), presenten mayor afinidad por el Ag frente al que se está desarrollando la respuesta, proceso que se conoce como maduración de la afinidad. La selección consiste en proveer señales de supervivencia a aquellas células B CG que consigan interaccionar con ellas, las cuales serán las de mayor afinidad por el Ag. Esto es debido a que las células B CG de mayor afinidad tienen ventaja a la hora de captar el Ag presente en las células dendríticas foliculares (FDCs) y por tanto expresan mayor cantidad de moléculas MHC-II presentando el Ag a las células T_{FH}, las cuales actúan como factor limitante (Victora et al., 2010). Las interacciones de corta duración entre las células T_{FH} y las células B CG permiten a las células T_{FH} poder interaccionar con muchas células B CG y así seleccionar aquellas con mayor afinidad. PD-1 tiene un papel importante en la función de las células T_{FH}. Por una parte actúa limitando la proliferación de las células T_{FH}, permitiendo que actúen como factor limitante, y por otro lado actúa favoreciendo las

interacciones de corta duración mediante la inhibición de las señales de restricción del movimiento inducidas tras la estimulación del TCR (Sage and Sharpe, 2016). Las señales de supervivencia están mediadas por CD40L, IL-4 e IL-21, necesarias para la supervivencia de las células B CG y su diferenciación a células plasmáticas productoras de Ac de alta afinidad y células B memoria de vida media larga o para recircular hacia la zona oscura y sufrir más rondas de proliferación e HMS (Crotty, 2011; Vinuesa et al., 2016). Las células T_{FH} también participan en el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, proceso que determina su función efectora, mediante la expresión de CD40L y la secreción de diferentes citocinas que dirigen el cambio a un determinado subtipo (Reinhardt et al., 2009). De este modo, la IL-4 secretada por las células T_{FH} induce preferentemente el cambio a lgG1 e IgE, IFN γ a IgG2a y TGF β a IgG2b e IgA (Bossie and Vitetta, 1991; McIntyre et al., 1993; Cerutti, 2008; Reinhardt et al., 2009; Kashiwada et al., 2010).

Recientemente se ha descrito la existencia de diferentes poblaciones o estadios de células T_{FH} con funciones y localizaciones diferentes dentro del CG en función de la secreción de IL-21 o IL-4. De este modo las células T_{FH} secretoras de IL-21 tienen una localización más próxima a la zona oscura, participando en la selección de las células B CG de mayor afinidad e induciéndoles la expresión de Bcl-6. Por su parte las células T_{FH} secretoras de IL-4 se encuentran en una zona más alejada de la zona oscura participando en la inducción del cambio de isotipo, de acuerdo a la mayor expresión de CD40L, y en la diferenciación de las células B CG a células B CG a células plasmáticas mediante la inducción del factor de transcripción Blimp-1 (Weinstein et al., 2016).

Una vez que las células T_{FH} han seleccionado a las células B CG de mayor afinidad, estas no se quedan confinadas en el CG. Pueden salir del CG y entrar en otros CGs diferentes, favoreciendo de esta forma la diversificación de la respuesta humoral (Shulman et al., 2013). Otro destino posible es convertirse en células T_{FH} memoria regulando negativamente la expresión de Bcl-6, CXCR5 y PD-1. Estas células recuperan rápidamente el fenotipo ante una re-exposición al Ag (Weber et al., 2012).

La desregulación de las células T_{FH} está relacionada con el desarrollo de diferentes enfermedades. Las células T_{FH} son inducidas tras procesos infecciosos, siendo importantes para el desarrollo de Acs y el aclaramiento del patógeno. Por tanto, una disminución de la frecuencia de esta población está relacionada con fallos en el control de la infección (Harker et al., 2011). En la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) las células T_{FH} están relacionadas con la generación de Acs neutralizantes (Locci et al., 2013). Sin embargo, no siempre existe una fuerte correlación entre estos parámetros, esto es debido a que las células T_{FH} de los pacientes con VIH tienen un defecto la producción de IL-21, importante para la selección de células B CG de alta afinidad (Cubas et al., 2013). La importancia de las células T_{FH} en procesos infecciosos las ha llevado a convertirse en una diana a estudiar para la mejora de la eficacia de las vacunas, mediante el aumento de su frecuencia o de su función (Linterman and Hill, 2016). Por el contrario, un aumento descontrolado en el número de células T_{FH} está asociado con la aparición de enfermedades autoinmunes mediadas por Acs tales como el lupus eritematoso sistémico, la dermatomiositis juvenil, el síndrome de Sjögren y la diabetes tipo 1, cuyos pacientes presentan niveles aumentados de células T_{FH} y de IL-21 (Scherm et al., 2016). La implicación de las células T_{FH} en autoinmunidad fue demostrada por primera vez en el ratón sanroque, el cual tiene una mutación en la proteína de unión a RNA roquin que le impide inhibir la expresión de ICOS, causando un exceso en la generación de células T_{FH} y en la producción de IL-21 (Vinuesa et al., 2005; Linterman et al., 2009).

1.2.7. Células T foliculares reguladoras (T_{FR}).

Recientemente se ha descrito la existencia de una subpoblación de células T reguladoras presente en el CG especializada en suprimir respuestas mediadas por células B, denominada células T_{FR} (Chung et al., 2011; Linterman et al., 2011; Wollenberg et al., 2011). Se caracterizan tanto por la expresión de moléculas características de células Tregs (Foxp3, CD25, GITR y CTLA-4) como de células T_{FH} (Bcl-6, CXCR5, PD-1 y ICOS) (Linterman et al., 2011). Su origen son células Tregs de origen tímico que tras la presentación antigénica por parte de las DCs en los órganos linfoides secundarios expresan moléculas que les permiten migrar hacia el folículo, donde adquieren el fenotipo completo de células T_{FR} tras interaccionar con células B CG de manera muy similar a las células T_{FH} (Sage and Sharpe, 2016).

Las células T_{FR} ejercen su función de supresión tanto sobre las células T_{FH} como sobre las células B CG. En las células T_{FH} inhiben la secreción de citocinas como IL-21 e IL-4 además de impedir su expansión mediante la inhibición de Ki67, aunque sin afectar a la expresión de Bcl-6 y CXCR5 (Sage et al., 2014). En las células B CG disminuyen la expresión de GL7 y de CD80, además de inhibir la HMS y el cambio de isotipo (Sage et al., 2014; Sage and Sharpe, 2016). Estos efectos sobre las células T_{FH} y B CG están mediados por la expresión de CTLA-4 ya que su ausencia en las células T_{FR} les hace perder su capacidad de supresión (Sage et al., 2014).

Introducción 23

2. Linfocitos B.

Las células B son los linfocitos responsables de la producción de Acs durante la respuesta humoral. Reconocen Ags en su forma nativa a través de su receptor antigénico (BCR), lo que les permite activarse y producir Acs frente a ese mismo Ag. Existen diferentes tipos de células B en función de su origen, localización y función.

2.1 Células B-1.

Es una población con características tanto de células de la respuesta inmune adaptativa como de la innata que se encarga de responder rápidamente a infecciones, estando limitada a un determinado rango de Ags timo-independientes (TIs) (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2006). Está situada principalmente en la cavidad peritoneal y pleural, siendo minoritaria en los órganos linfoides secundarios (Kantor and Herzenberg, 1993). Su origen y desarrollo tiene lugar de manera temprana en el hígado fetal principalmente, aunque también se ha visto que pueden ser generadas minoritariamente en la médula ósea del adulto (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2006). Por este motivo, su principal mecanismo de mantenimiento es la autorrenovación. Estas células tienen una proliferación limitada para reemplazar a las células que se mueren y así poder mantener una población estable en el tiempo (Baumgarth, 2011).

Se distinguen dos poblaciones de células B-1 (B220^{-/lo}CD19⁺CD43⁺IgM⁺) en función de la expresión de CD5: las células B-1a (CD5⁺) y las células B-1b (CD5⁻) (Kantor and Herzenberg, 1993). Las células B-1a están implicadas en la generación de Acs naturales, generados sin necesidad de haber estado expuesto al patógeno, que son importantes en los estadios tempranos de la infección (Haas et al., 2005). Estos Acs naturales se unen también a Ags propios, por lo que estas células están asociadas al desarrollo de patologías autoinmunes (Viau and Zouali, 2005). En cambio, las células B-1b producen Acs de tipo IgM tras exposición al patógeno y también son responsables de la generación de células B memoria de vida media larga de tipo TI, confiriendo protección de larga duración (Alugupalli et al., 2004; Haas et al., 2005).

2.2 Células B-2.

Son denominadas también como células B convencionales, siendo la población de células B mayoritaria en los órganos linfoides secundarios y sangre. Se empiezan a desarrollar al final del periodo neonatal en la médula ósea (Herzenberg and Tung, 2006). Dentro de las células B convencionales se distinguen dos poblaciones con función y localización diferente, las células B de la zona marginal (B ZM) y las células B foliculares.

2.2.1. Células B ZM.

Esta población está localizada en el bazo, más concretamente en la zona marginal, situada entre el tejido linfoide de la pulpa blanca y la circulación sanguínea, lo que le permite estar expuesta a una gran cantidad de Ags procedentes de la sangre, y por tanto ser la primera línea de defensa frente a patógenos circulantes (Cerutti et al., 2013). Gran parte de estas células se caracterizan por presentar menor diversidad de reconocimiento antigénico, expresando BCRs polirreactivos que son capaces de unirse a múltiples patrones moleculares microbianos. Además, tienen una elevada expresión de TLRs, por lo que el reconocimiento a través del BCR y de los TLRs de moléculas microbianas permite la activación y producción de Acs de baja afinidad de manera temprana que confieren protección cuando aún no se han generado respuestas de alta afinidad (Cerutti et al., 2013). Al igual que las células B-1, las células B ZM también se caracterizan por la producción de Acs naturales en condiciones homeostáticas (Martin and Kearney, 2002). Aunque tradicionalmente han estado asociadas a respuestas innatas, las células B ZM también responden frente a Ags timo-dependientes (TDs), siendo capaces de presentar Ags y activar a células T CD4⁺ naïve (Attanavanich and Kearney, 2004). Forman parte tanto de la respuesta extrafolicular, dando lugar a plasmablastos de vida media corta que secretan Acs de baja afinidad (Chappell et al., 2012), como de la formación de CGs, sometiéndose a HMS y cambio de isotipo, y dando lugar a plasmablastos de vida media larga productores de Acs de alta afinidad y a células B memoria (Song and Cerny, 2003). Otra manera de favorecer la respuesta folicular es mediante el depósito de Ags sanguíneos en las FDCs del folículo, mediante la disminución de la expresión de los receptores S1P1 y S1P3, responsables de su localización en la zona marginal, haciendo que predominen las señales provenientes de CXCR5, que favorece la migración al folículo (Cinamon et al., 2008).

2.2.2. Células B foliculares.

Es la población de células B más importante y mayoritaria en los órganos linfoides secundarios y en la sangre. Se caracteriza por poseer una gran diversidad de BCRs capaces de reconocer de manera específica un amplio repertorio de Ags, estando especializada en la respuesta frente a Ags TDs, dando lugar a células de vida media larga productoras de Acs de alta afinidad y a células B memoria. Al contrario que las células B ZM, se encuentran continuamente

recirculando a través de la circulación sanguínea a los folículos de los diferentes órganos linfoides secundarios en constante búsqueda de Ag (Allman and Pillai, 2008).

2.3 Células B reguladoras.

Es una población heterogénea que se caracteriza por poseer una actividad supresora importante en el freno de la inflamación proveniente de procesos autoinmunes o infecciones sin resolver (Mauri and Bosma, 2012). Ejercen su actividad supresora principalmente mediante la secreción de IL-10 y TGF β . La secreción de estas citocinas tiene efectos inhibitorios sobre poblaciones efectoras como las células Th1 y Th17 (Carter et al., 2012), y favorece la diferenciación de las células T CD4⁺ hacia células Tregs (Amu et al., 2010). Las células B reguladoras controlan también la respuesta inmune mediante la expresión de ligandos que inducen apoptosis en las células diana como FasL, TRAIL o PD-1L (Berthelot et al., 2013).

2.4 Ontogenia de las células B convencionales.

Las células B convencionales se desarrollan primero en la médula ósea donde adquieren la capacidad de expresar un BCR funcional, migrando posteriormente al bazo, donde completan su diferenciación y maduración. Durante este proceso atraviesan una serie de estadios definidos por los reordenamientos génicos de las inmunoglobulinas (Ig) del BCR y por la expresión de diferentes moléculas en su superficie.

En la médula ósea se encuentran las células madre hematopoyéticas pluripotentes, donde residen a lo largo de toda la vida del organismo dando lugar al progenitor linfoide común, a partir del cual se genera la célula pro-B (Melchers, 2015). La célula pro-B se caracteriza por la expresión de moléculas específicas de las células B como el B220 y el CD19 (Hardy et al., 2007), además de por el reordenamiento de las regiones variables de la cadena pesada de las Igs (Ig_H). Se denomina célula pro-B temprana cuando ha reordenado D_H-J_H, y célula B tardía cuando realiza el reordenamiento V_H-DJ_H (Busslinger, 2004). Cuando el reordenamiento ha sido productivo, la Ig_H con una región constante μ se asocia a una pseudo cadena ligera (V_{pre}B o λ 5), formando el denominado pre-BCR, el cual se expresa en la superficie junto con las moléculas de señalización Ig α e Ig β . Este estadio de desarrollo, denominado célula pre-B grande constituye un punto de control en el desarrollo de las células B, ya que si no hay señalización a través del pre-BCR las células sufren apoptosis al no recibir señales de supervivencia (Herzog et al., 2009). Esta señalización a través del pre-BCR impide que se reordene el segundo alelo de la Ig_H (exclusión alélica) mediante la inhibición de la expresión de la maquinaria de recombinación (RAG1-RAG2), asegurando la expresión de una Ig_H única (Grawunder et al., 1995). Por otra parte, también induce proliferación celular y el paso a célula pre-B pequeña donde ya no hay expresión del pre-BCR y se produce el reordenamiento de la cadena ligera (Ig_L) (Geier and Schlissel, 2006). Cuando la célula B reordena de manera productiva la Ig_L y expresa en su superficie una Ig completa (BCR), en este caso una IgM, se le denomina célula B inmadura. En caso de no conseguir reordenamientos productivos y ser incapaz de formar un BCR, las células mueren mediante apoptosis (Lu and Osmond, 2000) (Figura 8).

La recombinación aleatoria que sufren los genes de las Igs conduce a la creación de un amplio repertorio de células B con gran diversidad de reconocimiento antigénico. Sin embargo, esta aleatoriedad puede desencadenar la generación de células B con BCRs que reconocen Ags del propio organismo. Con el objetivo de evitar la presencia de células B autorreactivas, los precursores B inmaduros son sometidos en la médula ósea a un proceso de selección negativa donde van a ser seleccionados en función de la ausencia de reconocimiento de Ags propios. En este punto, aquellas células que reconocen Ags propios pueden tener diferentes destinos en función de la fuerza de reconocimiento. Cuando una célula B reconoce un Ag con gran avidez, se le da la oportunidad de volver a reordenar las regiones variables de la Ig_L, proceso que se conoce como edición del receptor, con el objetivo de producir un BCR no autorreactivo (Tiegs et al., 1993). Sin embargo, si esta célula agota todas sus posibilidades de recombinación sin haber podido generar un BCR no autorreactivo va a sufrir eliminación clonal, mediante apoptosis (Nemazee and Burki, 1989; Pelanda and Torres, 2012). Cuando el reconocimiento del Ag es débil, las células B entran en un estado de no respuesta denominado anergia. Estas células disminuyen la expresión de IgM, migran a la periferia y sufren un acortamiento de su vida media (Goodnow et al., 1988; Benschop et al., 2001), aunque también se ha visto que pueden sufrir edición del BCR (Hippen et al., 2005). Por último, las células B que no reconocen Ags propios continúan con el proceso de maduración, aunque para ello necesitan tener una señalización a través del BCR independiente de Ag, conocida como señalización tónica, con el objetivo de probar la funcionalidad del receptor ante un futuro encuentro con un Ag en la periferia (Wang et al., 2004; Pelanda and Torres, 2012). También se ha visto la importancia de la señalización a través de BAFFR en la selección de estas células B inmaduras mediante la aportación de señales de supervivencia (Rowland et al., 2010). Finalmente estas células B inmaduras seleccionadas positivamente en la médula ósea se dirigen al bazo donde van a completar el proceso de maduración.



Figura 8. Desarrollo de los linfocitos B. En la médula ósea el progenitor linfoide común (PLC) da lugar a las células pro-B, las cuales reordenan la Ig_H dando lugar a la expresión del pre-BCR (células pre-B). Las células pre-B pequeñas reordenan la Ig_L permitiendo la expresión del BCR completo y convirtiéndose en células B inmaduras. Estas células se dirigen al bazo, donde pasan por unos estadios de maduración denominados transicionales (B T1 y B T2) que dan lugar a las células B de la zona marginal (B ZM) y a las células B foliculares (B FOL), pudiendo estas últimas recircular hacia otros órganos linfoides secundarios (OLS).

Las células B inmaduras en el bazo pasan por unos estadios de maduración donde se denominan como células transicionales y donde van a seguir sufriendo mecanismos de selección negativa y positiva antes de dar lugar a las células B foliculares y a las células B ZM. Las células en el primer estadio (T1) se caracterizan por ser IgM^{hi}CD21⁻CD23⁻, localizarse fuera del folículo y ser susceptibles a sufrir selección negativa, ya que estas células tras la unión de un Ag al BCR no proliferan y son eliminadas mediante apoptosis (Monroe and Dorshkind, 2007). Las células que no son eliminadas sufren un aumento de la señalización tónica a través del BCR, que provoca un aumento en la expresión de BAFFR y de correceptores del BCR permitiendo la diferenciación a células T2 (Khan, 2009). Estas células son IgM^{hi}CD21⁺CD23⁺, se localizan en el folículo y tras la estimulación a través del BCR pueden sufrir apoptosis o pueden ser rescatados mediante la expresión de moléculas antiapoptóticas como BCL2A1 o BCLX_L o mediante señales de supervivencia a través de BAFFR (Chung et al., 2002; Su and Rawlings, 2002; Khan, 2009). Las células T2 dan lugar a las células B foliculares y a las células B ZM. La diferenciación hacia una u otra población está determinada por la fuerza de la señal a través del BCR y por la señalización a

través del receptor Notch2. La diferenciación hacia las células B foliculares se ve favorecida por una señalización fuerte a través del BCR dependiente de BTK, la cual inhibe la diferenciación hacia las células B ZM mediada por Notch2. En cambio ante una estimulación débil a través del BCR, las señales procedentes de BTK son insuficientes para bloquear la señalización de Notch2 permitiendo de este modo la diferenciación hacia células B ZM (Cerutti et al., 2013) (Figura 8).

3. Respuesta humoral.

Es la respuesta del sistema inmune basada en la producción de Acs, moléculas solubles capaces de reconocer de manera específica a un Ag, encargándose de neutralizar y marcar a agentes potencialmente peligrosos para que sean eliminados. En función de la naturaleza del Ag y del tipo de activación del linfocito B se pueden diferenciar dos tipos de respuesta, timoindependiente (TI) y timo-dependiente (TD).

3.1 Respuesta TI.

La respuesta TI es aquella en la que el linfocito B es capaz de activarse sin necesidad de interaccionar con una célula T CD4⁺. Dentro de la respuesta TI se distinguen dos tipos de Ags, los de tipo 1 (TI-1), como el LPS, el DNA bacteriano o el RNA viral, y los de tipo 2 (TI-2), polisacáridos multivalentes de alto peso molecular.

Los Ags TI-1 son capaces de activar tanto a células B maduras como inmaduras mediante la unión a BCRs y TLRs, siendo incluso capaces de activar a células B de manera policional prescindiendo de la unión a los BCRs (Mosier et al., 1977; Vinuesa and Chang, 2013). Existe controversia con respecto a la generación de memoria en la respuesta frente a este tipo de Ags, ya que hay estudios donde la reinmunización con DNP-KLH en ratones previamente inmunizados con DNP-LPS no genera aumento de la respuesta (Braley-Mullen, 1978), en cambio en otros estudios sí se ha observado un aumento de la producción de Acs anti-TNP tras una segunda reinmunización con TNP-LPS estando implicadas en esta tarea las células B ZM y las células B-1b (Zhang et al., 1988; Alugupalli et al., 2004).

Los Ags TI-2 gracias a su estructura altamente repetitiva activan a las células B maduras mediante la unión a múltiples BCRs provocando el entrecruzamiento de los mismos, siendo esta activación dependiente de BTK (Vinuesa and Chang, 2013). Al contrario que los de tipo 1, requieren de cierta ayuda proveniente de células T CD4⁺ en forma de citocinas como la IL-2 o el IFN_Y (Mond et al., 1980; Griffioen et al., 1992). La respuesta frente a este tipo de Ags también es

capaz de inducir memoria inmunológica y cambio de isotipo (Mond et al., 1995; Obukhanych and Nussenzweig, 2006).

3.2 Respuesta TD.

Las respuestas TDs son llevadas a cabo principalmente por las células B foliculares frente a Ags proteicos, dando lugar a la formación de los CGs, donde se seleccionan las células B de mayor afinidad que dan lugar a células B memoria de vida media larga y células plasmáticas productoras de Acs (CPs).

En los órganos linfoides secundarios los linfocitos se encuentran organizados en compartimentos donde existen zonas ricas en células T y zonas ricas en células B, denominadas estas últimas folículos. Por lo tanto, la activación de las células B requiere que el Ag se localice en el folículo. Los Ags solubles de bajo peso molecular difunden a través de poros para llegar al folículo (Pape et al., 2007). En cambio los Ags de mayor de tamaño precisan de otros mecanismos para poder acceder a dicha localización. Existe una población de macrófagos que se localizan en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos o en el seno marginal del bazo que tienen una capacidad fagocítica limitada, siendo capaces de unir Ags opsonizados por el complemento a través del receptor CR3 y presentarlos en su forma nativa a las células B en el folículo (Szakal et al., 1983; Phan et al., 2007). Las DCs además de presentar el Ag procesado en moléculas MHC-II a las células T CD4⁺ también se encargan de presentar Ags a las células B (Qi et al., 2006). Para ello capturan el Ag en forma de inmunocomplejo a través de receptores FcγRIIB y lo internalizan hacia un compartimento intracelular no degradativo, pudiendo de esta manera presentar el Ag intacto a las células B (Bergtold et al., 2005).

Una vez la célula B ha sido activada por el Ag sufre un aumento en la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, que hace que migren hacia la zona T, donde están sus ligandos CCL19 y CCL21 (Reif et al., 2002). En la frontera T-B se encuentran con las células pre-T_{FH} previamente mencionadas, donde tras el contacto Ag específico sufren procesos de proliferación y diferenciación pudiendo tomar un destino extrafolicular o folicular. Esta decisión está determinada por la fuerza de reconocimiento antigénico por parte del BCR. De este modo, las células B de mayor afinidad siguen la ruta extrafolicular, donde se diferencian a CPs tempranas que actúan en el inicio de la respuesta. En cambio aquellas con menor afinidad pasan a formar parte de los CGs, donde se someterán a los procesos de HMS y maduración de la afinidad con el

fin de generar y seleccionar los clones con una afinidad aún mayor que actuarán en las fases más avanzadas de la respuesta (O'Connor et al., 2006; Paus et al., 2006) (Figura 9).

Como se menciona anteriormente, el destino extrafolicular del linfocito B supone su diferenciación a CPs de vida media corta que producen Acs de una relativa baja afinidad, las cuales se encargan de combatir las primeras fases de la infección, siendo posteriormente reemplazadas de manera progresiva por las CPs productoras de Acs de mayor afinidad generadas en los CGs (Zhang et al., 2016). Estas células al no haber formado parte del CG se caracterizan por tener bajos niveles de mutaciones en las regiones variables del BCR, aunque sí se ha visto que pueden llevar a cabo cambio de isotipo de sus Igs (Toellner et al., 2002; Pape et al., 2003). También se ha descrito la existencia de una población de células B memoria independiente del CG que aparece de manera temprana y que son capaces de generarse en ausencia de células T_{FH} (Kaji et al., 2012).



Figura 9. Activación de los linfocitos B en una respuesta frente a un Ag TD. Las células B naïve son activadas tras el reconocimiento de un Ag, induciendo su migración hacia la zona T-B donde van a interactuar con células pre-T_{FH} activadas por el mismo Ag. Dicha interacción induce un foco de proliferación fuera del folículo, donde las células B pueden tomar un destino extrafolicular, diferenciándose a CPs de vida media corta secretoras de Acs de baja afinidad o a células B memoria de baja afinidad. También pueden volver al folículo para formar un CG.

Las células B que no van a seguir la ruta extrafolicular van a comenzar su diferenciación hacia células B CG. Durante la interacción con las células pre-T_{FH} en la frontera T-B, la presencia de la IL-21 producida por las células pre-T_{FH} promueve el inicio de la diferenciación hacia célula B CG mediante la inducción de Bcl-6, factor de transcripción necesario para el desarrollo de esta población (Nurieva et al., 2009; Linterman et al., 2010). Asimismo, la expresión de Bcl-6 en las células B favorece una interacción de larga duración con estas células pre-T_{FH} (Kitano et al., 2011). Por otro lado, se ha visto que la IL-21 también promueve la diferenciación hacia CP mediante la inducción de Blimp-1, ejerciendo por tanto un papel dual en la diferenciación de las células B (Ozaki et al., 2004).

La expresión de Bcl-6 en las células B de la frontera T-B va a promover la migración de estas células hacia el folículo donde van a empezar a dar lugar al CG. Esta migración tiene lugar mediante la pérdida de la expresión de CCR7 y EBI2 y la inducción de CXCR4, CXCR5 y S1P2 (Gatto et al., 2009; Pereira et al., 2010; Kitano et al., 2011; Zhang et al., 2016). Una vez en el folículo, las células B se diferencian hacia células B blásticas, que se empiezan a dividirse alrededor de la red de FDCs desplazando a las células B foliculares, las cuales van a formar la zona del manto alrededor del CG. Este CG no estará completamente establecido o maduro hasta que se puedan diferenciar dos zonas, la zona clara y la zona oscura (De Silva and Klein, 2015) (Figura 10).

La zona oscura está formada por células B en proliferación, también denominadas centroblastos, situadas dentro de una red de células reticulares productoras de la quimiocina CXCL12. Esta quimiocina es reconocida por el receptor de quimiocinas CXCR4, expresado por los centroblastos, reteniéndolos de esta manera en la zona oscura (Bannard et al., 2013). Las células B en la zona oscura son sometidas al proceso de HMS, que consiste en la introducción de mutaciones puntuales aleatorias en regiones hipervariables de las Igs, dando lugar a cambios en la especificidad del BCR hacia el Ag (Figura 10). Estas mutaciones se producen debido a la acción de la enzima desaminasa inducida tras activación (AID), la cual retira un grupo amino en citosinas presentes en el DNA convirtiéndolas en uracilos, generando de esta forma desapareamientos U:G. Estos desapareamientos son reconocidos por proteínas implicadas en la reparación del DNA y reparados por polimerasas propensas a error, dando lugar a estas mutaciones (Maul and Gearhart, 2010; Mesin et al., 2016).

Los diferentes clones con distintas afinidades por el Ag generados tras las rondas de proliferación y mutación en la zona oscura del CG tienen que ser seleccionados de acuerdo a su afinidad por el Ag, proceso conocido como maduración de la afinidad. Para ello migran a la zona clara del CG mediante la disminución de la expresión de CXCR4, siendo atraídos ahora por la quimiocina CXCL13 producida por las FDCs de la zona clara en base a la expresión de CXCR5 (Allen et al., 2004). Las células B CG en la zona clara, denominadas también centrocitos, captan el Ag presente en la superficie de las FDCs, de manera que aquellas que reconocen el Ag con mayor afinidad unen mayor cantidad de Ag y por tanto procesan y expresan mayor cantidad de moléculas MHC-II cargadas con el Ag (MHC-II-Ag). El nivel de expresión de MHC-II-Ag es clave a la hora de competir por establecer contacto con las células T_{FH} y recibir señales de supervivencia (Victora et al., 2010). En este contexto, las células B CG con menor afinidad por el Ag, y que por tanto tienen una menor probabilidad de interaccionar con las células T_{FH}, sufren apoptosis y son eliminadas por los macrófagos presentes en la zona clara del CG (Victora and Nussenzweig, 2012). En cambio, las células B CG de mayor afinidad recibirán por parte de las células T_{FH} señales de supervivencia a través de CD40L, BAFF, IL-4 e IL-21 (Goenka et al., 2014; Liu et al., 2015; Vinuesa et al., 2016) (Figura 10).

Las células B CG seleccionadas positivamente en la zona clara por las células T_{FH} vuelven a expresar el receptor CXCR4 para retornar a la zona oscura y sufrir diversas rondas de proliferación e HMS (Allen et al., 2007; Schwickert et al., 2007). Además se ha visto que la tasa de proliferación de las células B CG que vuelven a la zona oscura es proporcional a la densidad de MHC-Ag que fueron capaces expresar y por tanto del nivel de interacción con las células T_{FH}, permitiendo así que los clones de mayor afinidad tengan una ventaja proliferativa que permite su expansión en el CG (Gitlin et al., 2014). Las células B CG son sometidas a repetitivos ciclos de proliferación, mutación y selección, donde la afinidad por el Ag va aumentando progresivamente (De Silva and Klein, 2015). Durante la reentrada de las células B CG a la zona oscura, todas sus moléculas MHC-II son degradadas para evitar interferencias en la posterior selección en base a su afinidad (Bannard et al., 2016). Otro mecanismo que participa en el aumento de afinidad de las células B CG es la entrada de Acs producidos previamente por CPs, los cuales unen el Ag depositado en las FDCs. En el transcurso de la respuesta estos Acs van a ser cada vez de mayor afinidad, lo que exige a su vez una mayor afinidad de los nuevos clones de células B CG que se están generando (Zhang et al., 2013).

Durante los ciclos de recirculación entre la zona clara y la zona oscura las células B CG pueden ser sometidas a cambios en el isotipo de sus Igs. Este proceso ocurre en la zona clara, siendo inducido tras el contacto con las células T_{FH} e influenciado por el ambiente de citocinas presente en el medio (apartado 1.2.6 Células T_{FH}).



Figura 10. Centro germinal. Las células B que retornan al folículo sufren un proceso de proliferación donde tiene lugar la HMS, produciendo cambios aleatorios en la especificidad de reconocimiento del BCR. Los diferentes clones con diferentes afinidades por el Ag migran hacia la zona clara, donde serán seleccionados en base a su afinidad mediante la competición por la unión al Ag presente sobre las FDCs. Los clones con menor afinidad por el Ag no son capaces de captarlo y presentarlo en moléculas MHC-II a las células T_{FH}, por lo que no reciben las señales de supervivencia suministradas por estas células y sufren apoptosis. Las células con mayor afinidad captan el Ag e interaccionan con las células T_{FH}, recibiendo así estas señales de supervivencia. Las células seleccionadas positivamente pueden recircular a la zona oscura para sufrir más rondas de proliferación, HMS y selección, produciéndose así un aumento progresivo en la afinidad. Finalmente las células B CG seleccionadas se diferencian hacia CPs de vida media larga productoras de Acs de alta afinidad o hacia células B memoria de alta afinidad.

El destino final de las células B CG seleccionadas positivamente en la zona clara del CG es salir de esta estructura como CPs productoras de Acs de alta afinidad o como células B memoria, las cuales ante una reexposición al Ag se convierten rápidamente en células productoras de Acs de alta afinidad (Figura 10). No están muy claros los mecanismos que definen el destino hacia un fenotipo u otro aunque sí se ha visto que las células B CG de mayor afinidad se diferencian preferencialmente a CPs (Smith et al., 1997; Phan et al., 2006). En cambio los clones con menor afinidad son más proclives a recircular hacia la zona oscura o a diferenciarse a célula B memoria (Victora and Nussenzweig, 2012; Shinnakasu et al., 2016). También se ha descrito una separación temporal en la generación de estos dos tipos celulares, siendo las células B memoria generadas en el inicio de la reacción del CG y las CPs generadas en fases más tardías (Weisel et al., 2016), lo

cual va en concordancia con la mayor afinidad de las CPs por los mecanismos expuestos anteriormente. A nivel molecular la diferenciación hacia CPs se induce mediante la expresión del factor de transcripción Blimp-1 (Shaffer et al., 2002). Además las interacciones CD40-CD40L inducen a través de NFκB la expresión de IRF4, el cual inhibe la expresión de Bcl-6, represor a su vez de Blimp-1 (Saito et al., 2007). En el caso de las células B memoria no se conoce un factor de transcripción en su diferenciación tan claro como Blimp-1 en las CPs, pero se ha observado una mayor expresión del factor de transcripción Bach2 en las células B memoria de baja afinidad, las cuales desaparecen en ausencia del mismo (Shinnakasu et al., 2016).

4. Superfamilia del TGFβ.

La superfamilia del TGF β está compuesta por un conjunto de proteínas secretadas con estructura y forma de señalización análogas, entre las que se encuentran los propios TGF β s, los BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*), las activinas y distintos factores de diferenciación y crecimiento (Chen and Ten Dijke, 2016). Regulan procesos de proliferación, diferenciación, migración, adhesión y muerte celular. En base a esto, estas proteínas juegan un papel importante en procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la cicatrización y la respuesta inmune, siendo su desregulación responsable de la aparición de enfermedades como el cáncer, la fibrosis y enfermedades vasculares e inmunológicas (Letterio and Roberts, 1998; Gordon and Blobe, 2008; Chen and Ten Dijke, 2016). Los diferentes miembros de la superfamilia pueden tener funciones superpuestas, otras más específicas e incluso antagónicas, en función del ambiente y de la diana celular (Massague, 2012).

4.1. Síntesis.

Los miembros de la superfamilia del TGF β son sintetizados en forma de grandes precursores homodiméricos, los cuales son procesados por la familia de proteínas PCSK (*Proprotein convertase subtilisin/kesin*), dando lugar a un fragmento N terminal de gran tamaño (pro-dominio) y a un pequeño fragmento C terminal que constituye la forma activa de la proteína (Harrison et al., 2011). Las formas activas forman un dímero unido por enlaces disulfuro, el cual se une de forma no covalente al homodímero formado por los pro-dominios, en el caso del TGF β 1 denominados LAP (*Latency associated peptide*), formando el complejo SLC (*Small latent complex*), el cual impide la unión de la forma activa a sus receptores (Travis and Sheppard, 2014). En el caso del TGF β 1 el complejo SLC se une a través de LAP a proteínas LTBP (*Latent TGF\beta binding protein*), formando el complejo LLC (*Large latent complex*), el cual por un lado mejora la secreción del TGF β (Miyazono et al., 1991), y por otro lado se une a través de LTBP a proteínas de la matriz extracelular que actúan como depósito regulando su biodisponiblidad (Shi et al., 2011). Otros miembros de la familia como algunos BMPs o factores de diferenciación y crecimiento también se unen a unas proteínas homólogas a LTBP, denominadas fibrilinas, que forman parte de la matriz extracelular (Sengle et al., 2008).

La activación de los complejos SLC o LLC es un paso importante en la regulación de la actividad de las proteínas de esta familia, teniendo que escindirse la forma activa de su prodominio para poder unirse a sus receptores. Esta escisión puede llevarse a cabo de diferentes maneras. Una forma es mediante la unión de integrinas presentes en superficies celulares, las cuales se unen a LAP y mediante un movimiento de tracción entre la matriz extracelular y la célula se produce la liberación del TGF β activo (Wipff and Hinz, 2008). Por otra parte estudios *in vitro* han demostrado la intervención de proteasas como la plasmina, la catepsina-D, la calpaína o diferentes metaloproteasas en la liberación del TGF β (Robertson and Rifkin, 2016).

4.2. Unión a sus receptores.

Los miembros de la superfamilia del TGF β señalizan a través de la unión a un complejo heterotetramérico formado por receptores con actividad serina treonina kinasa, de los cuales dos son de tipo I, también denominados ALK, responsables de la propagación de la señal y dos son de tipo II, responsables de la activación del tipo I. Existen varios tipos de estos receptores tipo I y II, encargados de unir a los diferentes miembros de la superfamilia. De este modo, TGFβ señaliza a través de TGF β RI (ALK5) y TGF β RII, las activinas señalizan a través de ACTRIb (ALK4) y ACTRII y ACTRIIb, y los BMPs a través de BMPRI, ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6 como tipo I y a través de BMPRII y ACTRII como tipo II (Chen and Ten Dijke, 2016). Con la excepción de BMP2 y BMP4, los cuales se unen al receptor de tipo I y señalizan a través del tipo II (Wang et al., 2014), el resto de miembros se unen a un homodímero del receptor de tipo II constitutivamente activo, el cual se autofosforila y recluta a un homodímero del receptor de tipo I. Este receptor tipo I tiene una región rica en glicina y serina (dominio GS) donde es fosforilado por el receptor de tipo II, permitiéndole transducir la señal al interior de la célula (Chen and Weinberg, 1995; Wakefield and Hill, 2013). Algunos ligandos precisan de la presencia de un correceptor que regula su afinidad por el complejo de receptores tipo I-II, como es el caso del TGF β 2, el cual necesita la presencia del TGF β RIII o betaglicano para transducir la señal (Cheifetz et al., 1990).

4.3. Señalización.

La señalización ejercida por los miembros de la superfamilia del TGF β puede ser transducida a través de la ruta canónica, mediada por las proteínas Smad, y a través de rutas no canónicas (Figura 11).



Figura 11. Esquema de la señalización a través de los miembros de la superfamilia de TGF β . La unión de TGF β , BMPs y activinas a los receptores de tipo II (RTII), conlleva la formación del complejo heterotetramérico junto con el receptor de tipo I (RTI), donde el RTII fosforila al RTI, transduciendo la señal a través de rutas canónicas y no canónicas. En la ruta canónica, los R-Smad son fosforilados por el RTI, formando un complejo con un Co-Smad, el cual va al núcleo para unirse a los SBE, regulando así la expresión de sus genes diana. La activación de las rutas no canónicas conlleva la activación de las MAPK ERK, p38 y JNK, estando mediada la activación de las dos últimas a través de TAK1, implicada también en la activación de NF κ B. El complejo de receptores también induce por un lado la activación de AKT a través de la unión de PI3K y por otro lado una activación rápida de RhoA, siendo posteriormente inhibida a través del complejo Par6-Smurf1.

4.3.1. Ruta canónica: Señalización por Smads (SMA/MAD).

Esta familia de proteínas se encarga de transducir señales procedentes de los receptores de la superfamilia del TGF β desde la membrana hacia el núcleo donde regulan la transcripción génica. En base a su función las proteínas Smad se pueden dividir en tres subtipos. Los R-Smads

(Smad1, 2, 3, 5 y 8) son los encargados de interaccionar con los receptores tipo I. Por regla general TGF_βs y activinas señalizan a través de Smad2 y 3 mientras que los BMPs lo hacen a través de Smad1, 5 y 8 (Feng and Derynck, 2005), aunque también se ha visto que en algunas células los TGF β s también señalizan a través de Smad1 y 5 (Daly et al., 2008). Los R-Smads son fosforilados por el receptor de tipo 1 en dos residuos de serina en el extremo C terminal que provoca el cese de la interacción entre los dominios MH1 y MH2 de los R-Smads, permitiendo la unión a través de estos dominios MH2 al siguiente subtipo de la familia, los co-Smads. Los co-Smads (Smad4 y 10) como se menciona anteriormente forman un complejo trimérico con dos R-Smads, permitiendo su translocación al núcleo donde van a regular la trascripción génica (Chen and Ten Dijke, 2016). Esta regulación pueden llevarla a cabo directamente mediante la unión a secuencias específicas de DNA denominadas Smad binding element (SBE), aunque estas uniones son generalmente de baja afinidad, requiriendo la unión a otros factores de transcripción que van a aumentar la afinidad de unión al DNA, pudiendo ser a su vez activadores o represores de la expresión del gen diana (Ross and Hill, 2008). Por último el tercer subtipo de la familia son los I-Smads (Smad6 y 7), los cuales tienen una función inhibitoria que ejercen mediante competición con los R-Smads por la unión a los receptores de tipo I y a los co-Smads (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997). También inhiben la señal de TGF β s mediante la asociación a la ubiquitín ligasa Smurf1, la cual degrada a los receptores de tipo I (Ebisawa et al., 2001).

4.3.2. Rutas no canónicas.

Además de la ruta mediada por las proteínas Smad, la superfamilia de TGFβ también transduce la señal a través de otras rutas independientes de Smad, pudiendo tener importancia a la hora de ejercer diferentes efectos biológicos en función del contexto celular (Weiss and Attisano, 2013). Entre estas rutas no canónicas se encuentran la vía de las MAP Kinasas (MAPKs) (ERK y JNK/p38), la vía de las GTPasas tipo Rho y la via PI3K/AKT.

4.3.2.1. Señalización a través de ERK.

Los receptores TGF β RI y II se caracterizan por su actividad serina treonina kinasa, sin embargo se ha descrito que también pueden ser autofosforilados en residuos de tirosina tras la unión de TGF β , aunque a menor nivel que en los residuos de serina y treonina. Esto permite el reclutamiento en residuos de tirosina y serina de la proteína Shc-A, encargada a su vez de reclutar al complejo Grb2-SOS que permite la activación de Ras en la membrana citoplasmática. Esto conlleva la activación secuencial de c-Raf, MEK y ERK (Lee et al., 2007). La activación de esta

ruta tiene importancia en la transición epitelio mesénquima (EMT), una de la funciones del TGFβ importante en el desarrollo embrionario pero que también está asociado al desarrollo de metástasis y fibrosis (Zhang, 2009). Otro efecto de la activación de ERK es la inhibición de Smad2 y 3 mediante la fosforilación en sitios diferentes a donde actúa el TGFβRI (Kretzschmar et al., 1999).

4.3.2.2. Señalización a través de JNK/p38.

JNK y p38 son activadas por las *MAP kinase kinases* (MKKs) MKK4 y MKK3/6 respectivamente, las cuales a su vez son activadas por las MAP3Ks, siendo una de estas *transforming growth factor beta activated kinase 1* (TAK1). La importancia de TAK1 en esta activación mediada por TGF β queda reflejada por el defecto en la activación de JNK y NF κ B en ausencia de TAK1 (Shim et al., 2005). La activación de TAK1 por el TGF β está mediada por la proteína TRAF6, la cual se une al complejo activado de receptores de TGF β . Esta interacción induce una poliubiquitinación de TRAF6, permitiéndola asociarse con TAK1 y mediar la poliubiquitinación de la misma (Sorrentino et al., 2008).

La señalización a través de esta ruta, junto con la señalización Smad dependiente, participa en la inducción de apoptosis mediada por el TGF β , importante en la supresión de tumores mediada por TGF β . La activación de esta ruta por TGF β también tiene importancia en la EMT (Zhang, 2009).

Como se menciona anteriormente la activación de TAK1 además de activar la señalización a través JNK/p38 también participa en la activación de NF κ B. Este efecto es mediado a través de la fosforilación del complejo IKK, el cual a su vez fosforila e induce la degradación de I κ B α , permitiendo la translocación al núcleo de NF κ B (Arsura et al., 2003). Se ha descrito que esta activación de NF κ B mediada por TGF β induce proliferación celular en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, efecto contrario al observado a través de la ruta canónica de TGF β (FreudIsperger et al., 2013). También se ha observado una cooperación entre esta vía y la ruta canónica en la supervivencia de osteoclastos libres de células estromales (Gingery et al., 2008).

4.3.2.3. Señalización a través de GTPasas tipo Rho.

Las GTPasas tipo Rho, incluyendo RhoA, Rac y Cdc42, juegan un papel importante en la organización del citoesqueleto y en la motilidad celular. Además RhoA está implicada en el efecto de TGFβ sobre la EMT. La activación rápida de RhoA por parte de TGFβ induce la formación de

fibras de estrés y características mesenquimales en células epiteliales (Bhowmick et al., 2001). Por otra parte, la disolución de las uniones estrechas necesaria para la EMT requiere de la disminución de los niveles de RhoA en las mismas. Par6, que es una proteína de andamiaje, interacciona con el complejo de receptores activos de TGF β y es fosforilada en un residuo de serina. Tras la fosforilación recluta a Smurf1, mediando este complejo la ubiquitinación de RhoA y permitiendo así la disolución de las uniones estrechas (Ozdamar et al., 2005).

4.3.2.4. Señalización a través de PI3K/AKT.

TGF β induce la activación de PI3K y de su efector AKT. Esta activación precisa de la unión de la subunidad p85 de PI3K al complejo activo de receptores de TGF β (Yi et al., 2005). De manera indirecta TGF β también activa esta ruta mediante la inducción de la expresión de TGF α , el cual activa a los receptores EGF con la consecuente activación de PI3K y AKT (Vinals and Pouyssegur, 2001). Por otro lado, TGF β también puede inhibir esta señalización por un mecanismo Smad dependiente mediante la activación de la fosfatasa SHIP1 (Valderrama-Carvajal et al., 2002).

La señalización PI3K/AKT participa en la EMT mediada por TGFβ mediante su implicación en la reorganización de filamentos de actina y en la migración celular. Estos efectos sobre la EMT están mediados por la activación de mTOR (Lamouille and Derynck, 2007). Por otra parte, PI3K/AKT también están implicados en antagonizar respuestas mediadas por la ruta Smad dependiente como son la apoptosis y la inhibición de la proliferación. Estos efectos están mediados por la capacidad de AKT de unirse a Smad3 e impedir su translocación al núcleo, así como por su capacidad de fosforilar al factor de transcripción Foxo inhibiendo su localización nuclear, y por tanto impidiendo el efecto anti-proliferativo del complejo Smad3-Smad4-Foxo mediado por la inducción de p15^{ink4b} y p21^{Cip1} (Conery et al., 2004; Seoane et al., 2004).

4.4. Superfamilia del TGF β en el sistema inmune.

Los diferentes miembros de la superfamilia del TGF β ejercen múltiples efectos sobre los diferentes componentes del SI. En este apartado nos vamos a centrar en el papel de TGF β , BMPs y activinas sobre las células de la RIA.

4.4.1. TGFβ.

Los TGF β desempeñan múltiples funciones en el control de la RIA tanto a nivel de los linfocitos T como de los B. Está descrito el efecto anti-proliferativo del TGF β sobre las células T mediante la supresión de la producción de la IL-2, la disminución de la expresión de c-Myc o la inducción de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas como p15, p21 o p27 (Brabletz et al., 1993; Li et al., 2006). Sin embargo, se ha visto que en células T activadas hay un bloqueo de esta inhibición mediada por TGF β a través de la coestimulación ejercida por CD28 (Sung et al., 2003).

Como se trató anteriormente (apartado 1.2. Linfocitos T CD4⁺) TGF β participa en la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia distintas subpoblaciones funcionales. Así, promueve el desarrollo y diferenciación de las células Tregs, las células Th17 y las células Th9, además de controlar la actividad supresora de las células Tregs (Fahlen et al., 2005). Por el contrario, TGF β ejerce un papel inhibidor de la diferenciación de las células Th1 y Th2 mediante la disminución de la expresión del IL-12R β_2 y de GATA-3 respectivamente (Gorham et al., 1998; Gorelik et al., 2000).

En las células T CD8⁺ además de su efecto sobre la proliferación celular, TGF β también está implicado en la supresión de las funciones efectoras de estas células a través de la inhibición de la expresión de perforina e IFN γ (Smyth et al., 1991; Bonig et al., 1999). Por otra parte, TGF β promueve el desarrollo en el timo y mantenimiento de las células T CD8⁺ a través de la inducción de la expresión de IL-7R (Ouyang et al., 2013). Así mismo, TGF β promueve la inducción de la expresión de Bcl-2 o el aumento de Bim (Sanjabi et al., 2009; Tinoco et al., 2009). En otros contextos, se ha visto que TGF β reduce la muerte tras activación mediante el bloqueo de apoptosis a través de FasL (Cerwenka et al., 1996), y se ha descrito que la ausencia de TGF β provoca un aumento en la apoptosis de células T tanto en el timo como en la periferia (Chen et al., 2001).

En las células B TGF β inhibe la proliferación de sus precursores en la médula ósea así como la producción de IL-7 por parte de las células estromales, la cual promueve la proliferación y supervivencia de los mismos (Tang et al., 1997). También inhibe la expresión de la cadena κ en las células pre-B impidiendo su progresión al estadio de células B inmadura (Lebman and Edmiston, 1999) y en las células B maduras actúa como inhibidor de la proliferación celular mediante la disminución de la expresión de c-Myc y ciclina A y el aumento de la expresión de p21

y p27 (Li et al., 2006). En términos de supervivencia TGF β es un inductor de apoptosis en células B inmaduras y maduras en reposo mediante la inducción de Bim y la disminución de c-Myc y NF κ B (Li et al., 2006).

TGF β es un regulador de la activación y diferenciación de las células B, con un perfil inhibidor de la producción de Acs por parte de las mismas con la excepción de los de isotipo IgA. Por un lado, se ha visto que atenúa los efectos activadores mediados por la IL-4 disminuyendo la fosforilación de STAT-6, y promueve la expresión de las moléculas CD72 y SHIP-1, las cuales forman un complejo que inhibe la activación de la célula B a través del BCR (Roes et al., 2003). Por otro lado, TGF β actúa inhibiendo el cambio de isotipo hacia la mayoría de las subclases de IgG, mientras que promueve el cambio hacia IgA e IgG2b, siendo esta función fundamental en la prevención de infecciones a nivel de mucosas (Li et al., 2006).

Por último destacar que la deficiencia en TGF β 1 provoca un síndrome inflamatorio multifocal con manifestaciones autoinmunes que incluyen la producción de autoanticuerpos (autoAcs) (Shull et al., 1992; Yaswen et al., 1996). La eliminación del TGF β RII en los linfocitos T produce un fenotipo similar aunque menos severo mientras que en los linfocitos B produce un aumento en la producción de Acs con la excepción de la IgA, indicando que la función principal de TGF β en el SI es la inhibición (Cazac and Roes, 2000; Gorelik and Flavell, 2000).

4.4.2. BMPs.

Se han implicado a los BMPs, y en particular a BMP2 y BMP4, en los procesos de diferenciación de los linfocitos T en el timo. Así se ha descrito que estos factores favorecen el desarrollo de un tamaño correcto así como la colonización del mismo por los precursores T (Bleul and Boehm, 2005; Gordon et al., 2010). Así mismo, BMP2 y BMP4 regulan negativamente la diferenciación de los timocitos impidiendo su transición desde el estadio doble negativo (DN) a doble positivo (DP) (Hager-Theodorides et al., 2002).

A nivel de las células T CD4⁺ maduras la señalización a través de BMPs también afecta a la diferenciación funcional de las mismas. En este sentido, utilizando dosomorfina, un inhibidor de la señalización de BMPs, se observó un efecto positivo de los BMPs en la diferenciación hacia células Th17 y Tregs, además de inducir un aumento en la producción de IL-2 por las células T CD4⁺ *naïve* mediante la fosforilación de RUNX1 (Yoshioka et al., 2012).

Por último, se ha observado que *in vitro* los BMPs tiene un efecto inhibitorio sobre la producción de Acs de tipo IgM, IgG e IgA, en asociación con la disminución de la expresión del factor de transcripción XBP1, el cual es inducido en presencia de CD40L e IL-21 favoreciendo la diferenciación a CPs (Huse et al., 2011).

4.4.3. Activinas.

Al igual que los BMPs, las activinas participan en el desarrollo de las células T en el timo, siendo expresados sus receptores en el estadio de DN promoviendo la transición desde el estadio DN3 al DN4 además de favorecer la diferenciación a células SP CD8⁺ (Licona-Limon et al., 2009). Así mismo, se ha descrito que activina A favorece la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia células Th9 de manera similar al TGF β (Jones et al., 2012). Además, sinergiza con el TGF β en la diferenciación hacia células Tregs, aunque en ausencia de este último activina A no promueve la diferenciación de esta población (Huber et al., 2009).

En los linfocitos B la activina A regula el desarrollo de estas células en la médula ósea debido al antagonismo que ejerce sobre la IL-6, inhibiendo así la proliferación celular y promoviendo la apoptosis (Zipori and Barda-Saad, 2001). De esta forma actúa como una señal de freno al desarrollo y diferenciación de las células B mientras que en situaciones de inflamación, el IFNγ o el LPS disminuyen su expresión en la médula ósea permitiendo la expansión y diferenciación de las células B (Aleman-Muench and Soldevila, 2012). Por otro lado, también se ha visto que la activina A promueve el cambio de isotipo hacia IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA (Ogawa et al., 2008; Lee and Kim, 2009).

4.5. Moduladores de la señalización de la superfamilia de TGFβ.

La señalización a través de los miembros de la superfamilia de TGF β está altamente regulada a distintos niveles. A nivel extracelular la disponibilidad del ligando se ve influenciada por el nivel de escisión de la forma activa de su prodominio a través de proteasas e integrinas (Gordon and Blobe, 2008). Una vez liberada la forma activa existen moléculas solubles que se encargan de inhibir a los ligandos mediante su unión a los mismos o por competición por la unión a los receptores. Entre las proteínas de unión a ligando encargadas de antagonizar a los BMPs se encuentran *noggin, chordin, gremlin* o *twisted gastrulation,* inhibiendo al TGF β actúan *decorin* y α 2-macroglobulina, mientras que como inhibidor de activinas encontramos a *follistatin* (Miyazono, 2000; Shi and Massague, 2003). Algunos moduladores actúan mediante competición por la unión a los receptores entre los que encontramos a dos inhibidores de activinas: inhibinas y lefty (Miyazono, 2000; Shi and Massague, 2003). En la membrana se encuentran correceptores o pseudo-receptores que se encargan de modular la intensidad de la señalización. El betaglicano o TGFβRIII como se mencionó anteriormente, aumenta la afinidad del ligando por el complejo de receptores, siendo especialmente importante en el caso del TGF β 2 (Cheifetz et al., 1990). Como regulador negativo de la señalización por TGFB, BMPs y activinas nos encontramos al pseudoreceptor BAMBI (BMP and Activin Membrane Bound Inhibitor), el cual será descrito en el siguiente apartado. A nivel intracelular también están presentes diferentes moléculas implicadas en la regulación de la señalización. Como regulador positivo nos encontramos a la proteína adaptadora SARA (Smad anchor for receptor activation), la cual se encarga de facilitar la unión entre los receptores de tipo I y los R-Smads favoreciendo la fosforilación de estos últimos (Tsukazaki et al., 1998). Por el contrario, existen distintos reguladores negativos como es el caso de la molécula FKBP12, que se une al dominio GS de los receptores tipo I impidiendo la fosforilación mediada por el tipo II (Chen et al., 1997). Los I-Smads, mencionados anteriormente, también inhiben la señalización mediante competición con los R-Smads por la unión tanto a los receptores tipo I como a los co-Smads (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997), y mediante el reclutamiento de las proteínas Smurf, las cuales ubiquitinizan a los receptores de tipo induciendo su degradación (Ebisawa et al., 2001).

4.6. BAMBI.

BAMBI es una proteína transmembrana de 260 aminoácidos con un dominio extracelular similar al de los receptores de la superfamilia del TGF β tipo I pero con un dominio intracelular sin actividad serina treonina kinasa. BAMBI interacciona con los receptores de la superfamilia TGF β , tanto con los de tipo I como con los de tipo II, impidiendo por lo tanto la unión de estos con sus respectivos ligandos. De este modo, BAMBI actúa como un pseudorreceptor incapaz de transducir la señal, ejerciendo así un papel inhibidor de la señalización a través de los miembros de esta superfamilia (Onichtchouk et al., 1999). Además de interferir en la formación del complejo de receptores-ligando, BAMBI también es capaz de formar un complejo ternario con Smad7 y con el receptor de tipo I impidiendo la fosforilación de los R-Smads (Yan et al., 2009). BMP4 y TGF β inducen la expresión de BAMBI durante el desarrollo embrionario de diferentes especies (Onichtchouk et al., 1999; Tsang et al., 2000; Grotewold et al., 2001) y en células de carcinoma hepático (Sekiya et al., 2004), respectivamente, sugiriendo la existencia de un mecanismo de autorregulación. Por otra parte, también se ha descrito una regulación negativa de la expresión de BAMBI en presencia de TGF β en odontoblastos, indicando que en función del

contexto TGF β puede inducir o inhibir la expresión de este pseudorreceptor (Gonzales et al., 2010).

Además de modular la señalización de los miembros de la superfamilia de TGF β , se ha observado que BAMBI es capaz de activar la ruta de transducción de Wnt/ β -catenina, la cual es importante en procesos de embriogénesis y proliferación celular, además de estar desregulada en la mayoría de cánceres colorrectales. BAMBI activa esta ruta mediante la unión al receptor *Frizzled5* y a la proteína *Dishevelled*, facilitando la interacción entre ambas, lo que conduce a la liberación de β -catenina (Lin et al., 2008). BAMBI a su vez también es inducido por β -catenina en células de cáncer colorrectal (Sekiya et al., 2004). En base a esto en este tipo de cáncer BAMBI podría estar por un lado bloqueando los efectos anti-proliferativos de TGF β , y por otro lado induciendo la proliferación celular a través de la activación de Wnt/ β -catenina (Togo et al., 2008). También se le ha atribuido a BAMBI un papel como inhibidor de la adipogénesis mediante la activación de los adipocitos así como una disminución de la expresión de BAMBI en la diferenciación de los adipocitos así como una disminución de la acumulación de lípidos en células que sobreexpresan BAMBI (Mai et al., 2014).

Se ha descrito la implicación de BAMBI en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. La deficiencia en BAMBI provoca una menor sensibilidad al dolor mediada por un aumento de la liberación de péptidos opioides endógenos, cuya transcripción está regulada por la superfamilia del TGF β (Lantero et al., 2012). BAMBI también protege frente al efecto profibrótico del TGF β en el remodelado ventricular en respuesta a sobrecarga de presión y en la piel, protegiendo así de fallo cardiaco y del desarrollo de queloides respectivamente (Villar et al., 2013; Lin et al., 2015). En el cáncer de pulmón la disminución de BAMBI se correlaciona con una mayor capacidad de invasión debido al aumento en la EMT mediada por TGF β (Marwitz et al., 2016). En un modelo experimental de fibrosis hepática inducido por LPS, se ha observado que la señalización por TLR4 produce una disminución de la expresión de BAMBI causando un aumento en las señales profibróticas mediadas por TGF β (Seki et al., 2007). Así mismo, la disminución de la expresión de BAMBI se ha asociado con un aumento en la EMT mediada por TGF β en las células epiteliales de la próstata, favoreciendo el desarrollo de hiperplasia prostática benigna (He et al., 2016).

En los últimos años en nuestro laboratorio hemos comenzado a caracterizar el posible papel de BAMBI en la regulación del SI. Nuestros resultados muestran que la expresión de BAMBI se induce en células T CD4⁺ tras su activación *in vitro* con Acs anti-CD3 y anti-CD28, siendo esta

expresión mayor en presencia de TGFβ. La ausencia de BAMBI en los linfocitos T CD4⁺ potencia las rutas de señalización por TGF β dependientes e independientes de Smads, indicando que este pseudorreceptor actúa como un regulador de la intensidad de señalización de TGF β en estas células. En consonancia con estas observaciones, BAMBI juega un papel preponderante en los procesos de diferenciación funcional de los linfocitos T CD4⁺ tanto in vitro como in vivo. Así, la deficiencia en BAMBI o su inhibición con un anticuerpo monoclonal (AcM) anti-BAMBI desarrollado en nuestro laboratorio, en linfocitos T CD4⁺ procedentes de ratones BAMBI-KO o normales, respectivamente, incrementa la diferenciación a células Tregs mientras que inhibe la diferenciación hacia células Th17, además de no modificar la diferenciación a Th1 y Th2. Los efectos sobre la diferenciación CD4⁺ mencionados anteriormente están mediados a través de la potenciación de la señalización por IL-2. La deficiencia en BAMBI o su inhibición con AcMs incrementa la expresión de CD25 en linfocitos T CD4⁺ tras su activación y en células Tregs, por un mecanismo dependiente de Smad3, e incrementa la señalización por la IL-2 en estas células. En correlación con estos hallazgos, los ratones BAMBI-KO están protegidos frente al desarrollo de artritis inducida por colágeno (CIA) por un mecanismo dependiente de linfocitos Treg y de TGF β (Postigo et al., 2016). Todo esto nos ha permitido postular que BAMBI juega un papel de reóstato molecular de la señalización por TGF β en los linfocitos T CD4⁺ durante su diferenciación funcional. Recientemente, otros autores han visto un incremento en la expresión de BAMBI en células T CD4⁺ humanas de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en correlación con un aumento del ratio Th17/Treg en la sangre de estos pacientes (Zhang et al., 2016).

Los estudios sobre BAMBI en la biología de los linfocitos T CD4⁺, nos han llevado a ampliar la caracterización del papel de este pseudorreceptor en otras poblaciones de la RIA y constituyen la base del presente trabajo de Tesis Doctoral.
II. Objetivos

II. OBJETIVOS

Estudios previos en nuestro laboratorio demuestran el papel de BAMBI en la regulación de la diferenciación funcional de los linfocitos T $CD4^+$ y en el desarrollo de autoinmunidad (Postigo et al., 2016). Como se ha comentado anteriormente, BAMBI es un regulador negativo de la señalización de TGF β , BMPs y activinas, los cuales ejercen diversos efectos sobre los linfocitos B, centrados principalmente en inhibir la proliferación celular y en regular de distinta forma la producción de las diferentes subclases de Acs (Li et al., 2006; Chen and Ten Dijke, 2016). Por este motivo, en este trabajo planteamos el estudio de la implicación de BAMBI en el control de la respuesta inmune humoral.

Los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

- 1. Analizar la expresión de BAMBI en los linfocitos B tanto en reposo como tras activación.
- Caracterizar las diferentes poblaciones de linfocitos B en los ratones deficientes en BAMBI.
- 3. Estudiar el papel de BAMBI en la respuesta frente a Ags de tipo TI-1 y TI-2.
- Evaluar el efecto de la deficiencia en BAMBI sobre la respuesta humoral frente a diferentes Ags de tipo TDs administrados a través de diferentes vías y en presencia o ausencia de adyuvante.
- Determinar la frecuencia de las poblaciones celulares implicadas en la respuesta humoral de tipo TD (células T_{FH}, T_{FR} y B CG) en ausencia y presencia de BAMBI.
- 6. Analizar el origen celular y los mecanismos moleculares implicados en las alteraciones en las respuestas inmunes humorales en ausencia de BAMBI.

III. Material y métodos

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ratones.

Para la realización del presente trabajo se emplearon las siguientes estirpes de ratones:

1.1. Ratones consanguíneos:

- C57BL/6 (WT). Harlan-Olac (Barcelona). Utilizados como controles, con fondo genético no predispuesto al desarrollo de autoinmunidad. El alotipo de sus Igs (Igh) es Igh^b.
- B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ (WT.CD45.1). Son ratones congénicos a los C57BL/6 diferenciados en la expresión del antígeno panleucocitario CD45. Los ratones WT expresan la variante alélica Ptprc^b (CD45.2) mientras que los ratones WT.CD45.1 expresan Ptprc^a (CD45.1).

1.2. Ratones deficientes (gene knock-out):

C57BL/6 deficientes en BAMBI (BAMBI-KO). Cedidos generosamente por el Dr. Juan Carlos Izpisúa-Belmonte en el Salk Institute for Biological Studies (La Jolla, California, USA). Los ratones fueron generados por recombinación homóloga en células madre embrionarias para crear la línea 129SvJ x C57BL/6 en la que los exones 2 y 3 del gen BAMBI fueron eliminados y sustituidos con un marcador de resistencia a neomicina. El exón 1 restante contiene la región 5' no traducida y los primeros 14 aminoácidos que son parte del péptido señal característico de proteínas de membrana o solubles. Los ratones mutantes fueron cruzados con C57BL/6 durante más de 12 generaciones para transferir la mutación a este fondo genético. (Tramullas et al., 2010). En estos ratones BAMBI-KO se mantuvo el Igh característico de los ratones 129SvJ, el Igh^a.



Figura 1. Disrupción dirigida del gen Bambi por recombinación homóloga. Arriba el locus WT de BAMBI con los 3 exones (recuadros 1-3). Abajo, vector en el que se han reemplazado los exones 2 y 3 con el marcador de resistencia a neomicina (neo). Las flechas indican la posición de los *primers* usados para el genotipado. Imagen tomada de (Tramullas et al., 2010). C57BL/6 deficientes en CD3ε (CD3-KO). Cedidos generosamente por el Dr. Balbino Alarcón en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid, España). Tienen eliminado el exón 5 del gen de Cd3ε, el cual está sustituido por un marcador de resistencia a neomicina (Malissen et al., 1995). Esta modificación provoca la ausencia total de células T en estos ratones.

1.3. Ratones transgénicos:

 B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J (WT.OT-II). Cedidos generosamente por el Dr. Balbino Alarcón en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid, España). Estos ratones transgénicos se caracterizan por la expresión en todas sus células T CD4⁺ de un TCR específico que reconoce el péptido 323-339 de ovoalbúmina (OVA).

1.4. Ratones híbridos generados en el animalario de la Universidad de Cantabria:

- C57BL/6 deficientes en BAMBI y en CD3ε (BAMBI-KO.CD3-KO). Se generaron en nuestro laboratorio mediante el cruce de ratones BAMBI-KO y ratones CD3-KO. Los ratones heterocigotos para BAMBI y CD3ε se usaron para obtener los dobles mutantes caracterizados por ser deficientes en BAMBI y no tener células T.
- C57BL/6 deficientes en BAMBI y que sobreexpresan el TCR específico de OVA (BAMBI-KO.OT-II). Se generaron en nuestro laboratorio mediante el cruce de ratones BAMBI-KO y ratones WT.OT-II. Los ratones heterocigotos para BAMBI y transgénicos para el TCR específico de OVA se cruzaron para obtener ratones deficientes en BAMBI en el que todas sus células T CD4⁺ reconocían el péptido 323-339 de OVA.
- C57BL/6 de lgh^a (WT^a). Se generaron en nuestro laboratorio mediante el cruce de ratones
 WT y BAMBI-KO. Los ratones heterocigotos BAMBI^{+/-} de lgh^{a/b} se cruzaron hasta obtener ratones WT de lgh^a.

1.5. Otros ratones:

 Nu/Nu: denominados Nude. Portan una mutación que afecta al desarrollo del epitelio cortical del timo, por lo que no generan linfocitos T.

2. Mantenimiento y manipulación de los animales.

Todos los animales empleados en el presente trabajo fueron mantenidos y manipulados en instalaciones del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. Las cepas convencionales de ratones se mantuvieron en cuartos con sistemas de ventilación y renovación de aire no estéril. Los animales inmunodeficientes (por ej. CD3-KO) se alojaron en cuartos libres de patógenos, con agua y comida esterilizados. La manipulación se realizó siguiendo en todo momento la normativa del Real Decreto 53/2013, recogida en el BOE nº34, de 8 de febrero de 2013. Cuando fue necesaria una anestesia ligera, los ratones fueron introducidos en una cámara con éter dietílico (Panreac), dentro de una campana de extracción de gases.

3. Caracterización fenotípica y genotípica.

3.1. Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo.

La identificación de los ratones transgénicos para el TCR específico de OVA (WT.OT-II y BAMBI-KO.OT-II) así como el Igh de los ratones WT^a se realizó mediante citometría de flujo de linfocitos de sangre periférica.

3.1.1. Ratones OT-II.

A las 5-6 semanas de vida de los animales, se extrajeron 100 µl de sangre en tubos que contenían 100 µl de heparina sódica (Heparina Mayne 5%, 50 mg/ml, Mayne Pharma) diluída a 1 mg/ml en PBS (ver apartado 18.1). Las células (aprox. 10⁶) se lavaron con PBS a 2000 rpm, 3' y 4°C, y se incubaron con 30 µl de una dilución 1:100 del sobrenadante de cultivo IgG2b de rata anti-FcγRII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2) diluido 1/100 en medio RPMI incompleto para bloquear uniones inespecíficas a receptores Fc (FcRs). Posteriormente, sin lavar, se añadieron los siguientes Acs monoclonales (AcM). IgG2b de rata anti-CD4-PerCp (peridín-clorofila a-proteína) para marcar los linfocitos T CD4⁺ e IgG2a de rata anti-Vα2-FITC (fluoresceína isotiocianato) e IgG1 de ratón anti-Vβ5-PE (ficoeritrina) que reconocen las cadenas α2 y β5, respectivamente, presentes en el TCR sobreexpresado (Tabla 3). Tras una incubación de 30' a 4°C y oscuridad, y dos lavados con PBS para eliminar el exceso de Ac, se procedió a la fijación de los linfocitos y lisis de los glóbulos rojos mediante la adición a la suspensión celular de paraformaldehido (PFA) a una concentración final del 1% durante 8' a temperatura ambiente (RT), y posterior lavado con PBS-0.03% saponina (Sigma). Finalmente las células fueron resuspendidas en 250 µl de PBS para ser analizadas en un citómetro de flujo FacsCanto, utilizando el FacsDiva como programa de análisis

(Beckton-Dickinson, Palo alto, CA, USA). Durante el análisis, las células muertas se excluyeron siguiendo los parámetros de tamaño y granularidad, y la expresión de las cadenas $\alpha 2$ y $\beta 5$ constituyentes del TCR específico de OVA se determinó por comparación de la señal de fluorescencia obtenida en los linfocitos T CD4⁺ de un ratón control WT tal y como se muestra en la Figura 2.



Figura 2. Análisis de la expresión de las subunidades V α 2 y V β 5 que componen el TCR de las células T CD4⁺ de los ratones OT-II en leucocitos sanguíneos por citometría de flujo. En los histogramas se muestra la expresión de V α 2 y V β 5 en linfocitos T CD4⁺ de sangre. El panel de la izquierda corresponde a un ratón WT y el de la derecha a un ratón OT-II.

3.1.2. Ratones WT^a.

A las 5-6 semanas de vida de los animales, se extrajeron 100 µl de sangre en tubos que contenían 100 μl de heparina sódica (Heparina Mayne 5%, 50 mg/ml, Mayne Pharma) diluída a 1 mg/ml en PBS. Las células, (aprox. 10⁶) se lavaron con PBS a 2000 rpm, 3' y 4 °C, y se incubaron con 30 µl de una dilución 1:100 del sobrenadante de cultivo IgG2b de rata anti-FcyRII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2) diluido 1/100 en medio RPMI incompleto para bloquear uniones inespecíficas a FcRs. Posteriormente, sin lavar, se añadieron los siguientes AcMs. IgG2a de rata anti-B220-PerCp para marcar los linfocitos B, IgG1 de ratón anti-IgM-Igh^a-Biotina que reconoce las IgM de Igh^a e IgG1 de ratón anti-IgM-Igh^b-FITC que reconoce las IgM de Igh^b (Tabla 3). Tras una incubación de 30' a 4°C y oscuridad, y dos lavados con PBS para eliminar el exceso de Ac, se procedió al marcaje con estreptavidina-APC (Tabla 3), que reconoce la biotina conjugada al anti-IgM-Igh^a, también durante 30' a 4°C y oscuridad. Tras realizar dos lavados con PBS se procedió a la fijación de los linfocitos y lisis de los glóbulos rojos mediante la adición a la suspensión celular de PFA a una concentración final del 1% durante 8' a RT, y posterior lavado con PBS-0.03% saponina (Sigma). Finalmente las células fueron resuspendidas en 250 μl de PBS para ser analizadas en un citómetro de flujo FacsCanto, utilizando el FacsDiva como programa de análisis (Beckton-Dickinson, Palo alto, CA, USA). Durante el análisis, las células muertas se excluyeron siguiendo los parámetros de tamaño y granularidad, y la expresión de IgM de Igh^a o Igh^b se determinó por comparación de la señal de fluorescencia obtenida en los linfocitos B de un ratón control WT (Igh^b) y un ratón control BAMBI-KO (Igh^a) tal y se muestra en la Figura 3.



Figura 3. Análisis de la expresión del Igh de los linfocitos B de la sangre por citometría de flujo. En la figura se muestra la expresión del Igh^a y Igh^b en las células B220⁺ de ratones WT (izquierda), BAMBI-KO (centro) y WT^a (derecha).

3.2. Caracterización genotípica mediante PCR.

Para identificar los ratones deficientes en BAMBI y en CD3ε se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de DNA genómico, el cual se extrajo de una muestra de 0.3-0.5 cm de la cola de los ratones anestesiados de 4-5 semanas de edad utilizando el protocolo del *"High Pure PCR Template preparation kit"* (Roche).

3.2.1. Ratones BAMBI-KO.

Se utilizaron 2 µl de DNA por reacción en un volumen final de 25 µl, y las siguientes concentraciones finales de reactivos: 0.02 U de *Biotaq DNA pol* (Bioline), 2 mM de MgCl₂ (Bioline), 0.2 mM dNTPs (Bioline) y 1 µM de cada uno de los cuatro *primers* cuya secuencia se muestra en la Tabla 1. Las muestras se sometieron al siguiente protocolo de amplificación: 94°C-3'; los *primers* 1 y 2, 40 ciclos (95°C-30″; 62°C-30″; 72°C-30″) y los *primers* 3 y 4, 40 ciclos (95°C-30″; 58°C-30″; 72°C-30″); 72°C-30″); 72°C-10′ y mantenerlo a 4°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% [diluída en TBE-0,5% que contenía un volumen 1:20.000 de una solución marcadora de ácidos nucleicos (*RedSafe*, Intron Biotechnology)] en presencia de un marcador de peso molecular (*GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*, ThermoFisher scientific). Al someter al gel a radiación ultravioleta (UV) en un equipo documentador de imágenes (*Gel Doc*, BioRad), en los ratones WT se observó una banda de 398 pares de bases (pb) y en los BAMBI-KO una de 524 pb (Figura 4).



Figura 4. Caracterización de los ratones BAMBI-KO (KO). Calle 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, ThermoFisher scientific); calles 2-4: PCR con *primers* 1 y 2; calles 5-7: PCR con *primers* 3 y 4. El orden de los DNAs se indica en la figura.

3.2.2. Ratones CD3-KO.

Se utilizó 1 µl de DNA por reacción en un volumen final de 25 µl, y las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1 U de *Biotaq DNA pol* (Bioline), 1.5 mM de MgCl₂ (Bioline), 0.2 mM dNTPs (Bioline), 0.15 µM de los *primers* 1 y 2 y 0.08 µM de los primers 3 y 4, cuya secuencia se muestra en la Tabla 1. Las muestras se sometieron al siguiente protocolo de amplificación: 94°C-5'; 35 ciclos (94°C-1'; 57°C-1'; 72°C-2'); 72°C-5' y mantenerlo a 4°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% [diluída en TBE-0,5% que contenía un volumen 1:20.000 de una solución marcadora de ácidos nucleicos (*RedSafe*, Intron Biotechnology)] en presencia de un marcador de peso molecular (*GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*, ThermoFisher scientific). Al someter al gel a radiación UV en un equipo documentador de imágenes (*Gel Doc*, BioRad), en los ratones WT se observó una banda de 693 pb y en los CD3-KO una de 411 pb (Figura 5).



Figura 5. Caracterización de los ratones CD3-KO (KO). Calle 1: marcador de peso molecular (*GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*, ThermoFisher scientific); calle 2: PCR con DNA de un ratón WT; calle 3: PCR con DNA de un ratón KO; calle 4: PCR control sin DNA.

	Primer	Secuencia		
	1	5'-TGTGATAGCGGTTCCCATTGC-3'		
ВАМВІ	2	5'-CCAGATAAAAGTGCTCCTGTCAGC-3'		
	3	5'-TTCGCCAATGACAAGACGCTGG-3'		
	4	5'-GGACACAAAGAACCCTGGGAAAG-3'		
CD38	1	5'-GGCTACTACGCTTGCTACACACCAGCC-3'		
	2	5'-CCCCAGGCCCTTGGTATCTGAGGCATGT-3'		
	3	5'-CCTGCCGAGAAAGTATCCA-3'		
	4	5'-ACCGTAAAGCACGAGGAA-3'		

Tabla 1. Secuencias de los diferentes *primers* utilizados en PCR para identificar regiones específicas de la mutación de cada ratón a caracterizar. En la PCR utilizada para genotipar a los ratones BAMBI-KO, los *primers* 1 y 2 reconocen una región específica del DNA eliminada en el ratón BAMBI-KO, amplificando un fragmento de 398 pb, mientras que el 3 y 4 se utilizan para identificar una región del *casette* de resistencia a neomicina que reemplaza a los exones 2 y 3 del gen *Bambi*, y amplifican un fragmento de 524 pb. En el caso de la PCR para identificar los ratones CD3-KO, los *primers* 1 y 2 amplifican un fragmento de 693 pb específico del DNA eliminado en el ratón CD3-KO, mientras que los *primers* 3 y 4 amplifican un fragmento de 411 pb que reconoce el *casette* de resistencia a neomicina que reemplaza al exón 5 del gen *Cd3ε*.

4. Obtención de muestras sanguíneas y suspensiones celulares.

4.1. Suero.

Tras anestesiar a los ratones con éter dietílico (Panreac) se extrajeron unos 200 µl de sangre mediante la punción con un capilar en el seno retroorbitario. Esta sangre se mantuvo durante toda la noche a 4°C, o durante unas horas a RT para permitir la retracción del coágulo, obteniendo posteriormente el suero por centrifugación de la misma durante 5' a 6500 rpm. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

4.2. Sangre.

Para estudios de citometría de flujo en sangre, se recogieron aproximadamente unos 200 μ l en tubos que contenían 100 μ l de heparina sódica (Heparina Mayne 5%, 50 mg/ml, Mayne Pharma) a una concentración de 1 mg/ml. Tras un lavado con 2 ml PBS/tubo, se descartó el sobrenadante y se tomaron 75 μ l del pellet de células (aprox. 10⁶ cls) para pasarlos a tubos de citometría.

4.3. Suspensiones celulares.

Cuando se realizaron estudios de citometría de flujo o cultivos celulares de órganos linfoides (bazo, ganglios y médula ósea), se utilizaron suspensiones celulares de los mismos obtenidas siguiendo el protocolo descrito a continuación:

Tras sacrificar al ratón por dislocación cervical, los bazos y los ganglios fueron extraídos y sumergidos en PBS a 4°C. A continuación se procedió a su maceración en PBS y las suspensiones celulares se lavaron en PBS mediante centrifugación a 2000 rpm, 3' y 4°C. En el caso de suspensiones obtenidas del bazo, se lisaron los eritrocitos mediante su tratamiento con una solución de lisis Tris-NH₄Cl pH 7.5 (ver apartado 18.1) durante 5' a RT, y tras dos lavados, las células se resuspendieron en PBS para su recuento.

Para la obtención de suspensiones celulares de la médula ósea, primeramente se extrajeron las tibias y fémures del ratón, seccionando el extremo distal de las epífisis para trabajar con la diáfisis. Con ayuda de una jeringa de 5 ml (BD Plastipack[™]) y una aguja de 25G (BD Microlance[™] 3) se extrajo la médula ósea perfundiendo PBS frío a presión por la cavidad medular. La médula ósea se disgregó con la jeringa y las células se recogieron en tubos Falcon de 15 ml en hielo para ser contadas.

Finalmente se contaron las células vivas con una cámara de Neubauer, descartando las muertas por tinción con Azul Tripán (Sigma).

5. Purificación de linfocitos B del bazo.

La purificación de linfocitos B se llevó a cabo a partir de una suspensión celular obtenida del bazo. Para ello, las suspensiones fueron incubadas durante 30' a 4°C con 25 μ l/10⁷ células de sobrenadante de cultivo del AcM AT-83 que reconoce la molécula Thy1.2 (CD90.2) presente en todos los linfocitos T. Tras un lavado con PBS, las células fueron resuspendidas en medio *c-kill* (ver apartado 18.3) en una proporción de 1 ml/20x10⁶ células e incubadas con complemento (*low Tox-M rabbit complement*, CEDARLANE) en relación 1:15 con el volumen de medio *c-kill* durante 30' a 37°C. Tras la incubación se realizaron dos lavados con PBS. La eficacia del tratamiento fue verificada mediante citometría de flujo.

6. Cultivos celulares.

6.1. Cultivos de activación de linfocitos B.

En los estudios de expresión de BAMBI por qPCR, de expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo y de producción de Acs frente a Ags TI-1 mediante ELISA, se cultivaron linfocitos B purificados según el apartado 5 en condiciones de esterilidad, utilizando medio DMEM suplementado (ver apartado 18.3) en un incubador a 37°C con una atmósfera controlada de 5% de CO₂. Las condiciones en cada estudio fueron las siguientes:

• Expresión de BAMBI.

- 15x10⁶ células/ml en placa de 12 pocillos.
- 10 µg/ml de IgG1 de rata anti-IgM (clon B7.6, purificado en el laboratorio) y 10 µg/ml de IgG2a de rata anti-CD40 murino (clon 3/23, BD Pharmingen) en presencia o ausencia de 3 ng/ml de TGFβ humano (Peprotech).
- Duración de 24 y 48 horas.

• Expresión de moléculas de superficie.

- 1x10⁶ células/ml en placa de 48 pocillos.
- 10 μg/ml de anti-IgM y 10 μg/ml de anti-CD40 o solamente 10 μg/ml de anti-CD40.
- Duración de 24 horas.

• Producción de Acs frente a Ags TI-2.

- 0.05x10⁶ células/ml en placa de 96 pocillos.
- 10 μg/ml de LPS (Sigma).
- Duración de 6 días.

6.2. Cultivos de proliferación de linfocitos B.

Los estudios de proliferación de linfocitos B purificados se realizaron sembrando en placas de 96 pocillos (CytoOne) 0.15×10^6 células por pocillo en 250 µl de medio DMEM suplementado, en presencia de 10 µg/ml anti-IgM y anti-CD40 o de 10 µg/ml de LPS (Sigma). Las células se cultivaron durante 4 días en un incubador a 37°C y 5% de CO₂, añadiendo las últimas 16 horas 1 µCi/ml de ³H-TdR [(metil-³H)-timidina, Amersham, GE Healthcare].

Para determinar la proliferación de los linfocitos B, se evaluó la incorporación de ³H-TdR. Al finalizar los 4 días de cultivo, las células fueron recogidas sobre un filtro especial (*Printed Filtermat A, 90x120 mm*, PerkinElmer) con ayuda del equipo *FilterMate Harvester* (PerkinElmer), haciendo varios lavados para descartar la ³H-TdR no adquirida; y a continuación se empapó el mismo con líquido de centelleo (*Optiphase superMix*, PerkinElmer), y se determinó la emisión de radiación utilizando el equipo *1450 LSC & Luminiscence counter, MicroBeta TriLux*, (PerkinElmer) que proporcionó los datos en cuentas por minuto (c.p.m.), cuyo número fue proporcional a la proliferación celular en cada una de las condiciones.

7. Estudio de la expresión de BAMBI por qPCR.

El estudio de la expresión de BAMBI en linfocitos B fue realizado mediante qPCR. Se extrajo RNA a partir de 15x10⁶ linfocitos B purificados en reposo o estimulados como se describe en el apartado 6.1. Para ello, se lisaron las células mediante sonicación (80% de amplitud, pulso ciclo 0.9, 3 pulsos), realizándose la extracción del RNA siguiendo el protocolo recomendado en el kit de Qiagen *"RNeasy Plus Mini Kit"*. Su concentración se determinó midiendo la densidad óptica a 230 nm con un espectrofotómetro (*Nanodrop 2000*, Thermo Scientific).

El RNA se utilizó como molde para conversión en cDNA mediante retrotranscripción inversa siguiendo el protocolo aconsejado en el kit de Bio Rad *"iScript cDNA Synthesis kit"*.

A partir del cDNA obtenido se realizó el estudio de expresión de BAMBI mediante qPCR. Para llevar a cabo el análisis, se utilizaron *primers* diseñados para amplificar un fragmento entre los exones 2 y 3 de *Bambi*, como control se amplificó el gen del *18s* ribosómico. Se utilizaron, por reacción, en un volumen final de 22 µl: 1 µl de cDNA (50 ng), 11 µl de SYBR Premix Ex Taq, 1 µl de *primers* (0.5 mM; ver Tabla 2) alcanzando los 22 µl con H₂O miliQ estéril. A partir de este pool, se cargaron duplicados de 10 µl en placas de 96 pocillos (*Thermo-Fast® 96 Semi-Skirted plates*, Thermo Scientific) que se cubrieron con una cubierta adhesiva transparente (*ABsolute QPCR Seal*, Thermo Scientific). Utilizando un equipo detector de fluorescencia para qPCR (*StepOnePlus*, Applied Biosystem) se sometieron al siguiente protocolo de amplificación: 15'-95°C; 40 ciclos (30''-95°C, 45''-63°C, 30''-72°C); 1 ciclo (15''-95°C, 1'-60°C, 15''-95°C). Los resultados se analizaron utilizando el programa *StepOne Software v2.1* con el método del ΔΔCt, representando la expresión génica relativa de *Bambi*, normalizada con la del *18s*.

Gen	Secuencia			
Bambi	F: CCACTCCAGCTACTTCTTCATC			
Bambi	R: GTAGCATCTGATCTCTCCTTTGG			
18s	F: GTAACCCGTTGAACCCCATT			
	R: CCATCCAATCGGTAGCG			

Tabla 2. Secuencias de los diferentes primers utilizados en la qPCR para el estudio de la expresión de BAMBI.

8. Caracterización de las poblaciones linfocitarias en los órganos linfoides.

Las poblaciones linfocitarias en los órganos linfoides de ratones de todas las estirpes estudiadas se analizaron mediante citometría de flujo. 10⁶ células de las diferentes suspensiones celulares (ver apartado 4.2) fueron incubadas durante 10' a RT con 30 µl de una dilución 1:100 del sobrenadante de cultivo IgG2b de rata anti-FcyRII (hibridoma H2B4, clon 2.4G2), con el objetivo de bloquear los FcRs. Posteriormente, sin lavar, se añadieron 50 µl de las diluciones apropiadas (en PBS) de los diferentes AcMs que reconocían moléculas de la superficie celular (Tabla 3) conjugados a biotina o a diferentes fluorocromos: FITC (fluoresceína isotiocianato), PE (ficoeritrina), PerCP (peridín-clorofila a-proteína), APC (aloficocianina), APC-Cy7 (aloficocianinacianina 7), Alexa Fluor 647 o PB (azul pacífico). Tras una incubación de 30' a 4°C en oscuridad, las células se lavaron dos veces con PBS a 2000 rpm durante 3'. En los casos donde se utilizaron AcMs conjugados a biotina, se realizó una segunda incubación con estreptavidina conjugada a APC o a APC-Cy7 diluida en PBS durante 30' a 4°C en oscuridad. En el caso del marcaje de proteínas intracelulares (Foxp3), las células, tras el marcaje de superficie, fueron incubadas con 200 µl de una solución fijadora/permeabilizadora [(mezcla de diluyente y concentrado (Fixation/permeabilization diluent and concentrate, eBioscience) en relación 3:1] a 4°C durante 30' o durante toda la noche (o/n). Tras un lavado con 2ml de buffer de permeabilización (10X permeabilization buffer, eBioscience; diluído a 1X en dH₂O) las suspensiones celulares fueron incubadas con 25 μl del AcM anti-Foxp3 diluído en buffer de permeabilización durante 30' a 4°C.

Después del marcaje (extracelular, intracelular o ambos), las células fueron resuspendidas en 250 µl de PBS y conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis, que fue realizado con un citómetro de flujo FACScanto (Becton-Dickinson, Palo Alto, CA, USA). En general se adquirieron 3-4x10⁴ células en la región de células mononucleares viables acotada en base a los parámetros de tamaño (FSC) y complejidad (SSC). El estudio fenotípico de las poblaciones linfocitarias se realizó

64 Material y métodos

utilizando el programa FACS Diva, en base al perfil de expresión simultánea de un conjunto de marcadores.

Las poblaciones analizadas fueron las siguientes:

- Médula ósea:
 - Células Pro-B (B220^{lo}IgM⁻CD43⁺)
 - Células Pre-B (B220^{lo}lgM⁻CD43⁻)
 - Células B inmaduras (B220⁺IgM⁺IgD⁻)
 - Células B maduras (B220⁺IgM⁺IgD⁺)
- Bazo:
 - Células B T1 (B220⁺IgM⁺CD23⁻CD21⁻)
 - Células B T2 (B220⁺lgM^{hi}CD23⁺CD21⁺)
 - Células B ZM (B220⁺lgM⁺CD23⁻CD21⁺)
 - Células B Foliculares (B220⁺IgM^{int}CD23⁺CD21^{int})
 - Células plasmáticas (B220^{-/lo}CD138⁺)
 - Células B Memoria (B220⁺IgM⁻IgD⁻CD138⁻)
 - Células B-1a (B220^{-/lo}CD19⁺CD43⁺lgM⁺CD5⁺)
 - Células B-1b (B220^{-/lo}CD19⁺CD43⁺lgM⁺CD5⁻)
 - Células T_{FH} (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺)
 - Células B CG (B220⁺PNA⁺FAS⁺)
- Cavidad peritoneal:
 - Células B-1a (B220^{-/lo}CD19⁺IgM⁺CD5⁺)
 - Células B-1b (B220^{-/lo}CD19⁺IgM⁺CD5⁻)
- Ganglios poplíteos:
 - Células T_{FH} (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺)
 - Células B CG (B220⁺PNA⁺FAS⁺)
 - Células T_{FR} (CD4⁺CXCR5⁺PD-1⁺Foxp3⁺)

Cuando fue necesario determinar el número total de células de una determinada subpoblación de un órgano concreto, se calculó extrapolando el porcentaje de dicha población, obtenido mediante citometría de flujo, al número total de células viables contadas en dicho órgano utilizando una cámara de Neubauer.

La citometría de flujo también nos permitió realizar el estudio del nivel de expresión de diferentes moléculas de superficie (IgM, IgD, MHC-II, CD80, CD86, ICOSL y BAFFR) en los linfocitos B (células B220⁺).

AcM	Isotipo	Clon	Fluorocromo	Laboratorio
Anti-CD3ε murino	lgG1, κ de hámster	145-2C11	APC	Tonbo
Anti-CD4 murino	lgG2a, к de rata	RM4-5	PerCp	Biolegend
Anti-CD4 (L3T4) murino	lgG2b, к de rata	GK1.5	PE	BD Pharmingen
Anti-CD5 murino	lgG2a, к de rata	53-7.3	PE	BD Pharmingen
Anti-CD8 murino	lgG2a, к de rata	53-6.7	PE	BD Pharmingen
Anti-CD11b murino	lgG2b, к de rata	M1/70	PE	eBioscence
Anti-CD11c murino	lgG de hámster	N418	PE	Biolegend
	lgG2a, к de rata	1D3	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD19 murino		6D5	APC	Biolegend
Anti-CD21/CD35 murino	lgG2b, к de rata	7G6	FITC	BD Pharmingen
Anti-CD23 murino	lgG2a, к de rata	B3B4	PE	BD Pharmingen
Anti-CD43 murino	lgG2a, к de rata	1B11	FITC	Biolegend
Anti-CD45R/B220 murino/humano	lgG2a, к de rata	RA3-6B2	PE/PerCp	Biolegend
Anti-CD45.1 murino	lgG2a, к de rata	A20	РВ	Biolegend
Anti-CD45.2 murino	lgG2a, к de ratón	104	APC-Cy7	Biolegend
	lgG de hámster	16-10A1	PE	Tonbo
Anti-CD80 murino			APC	eBioscence
	lgG2a, к de rata	GL-1	FITC	Biolegend
Anti-CD86 murino			PE	BD Pharmingen
Anti-CD95/FAS murino	lgG2, λ2 de hámster	Jo2	PE	BD Pharmingen

AcM	Isotipo	Clon	Fluorocromo	Laboratorio
Anti-CD138 murino	lgG2a, к de rata	281-2	PE	BD Pharmingen
Anti-CD268/BAFFR murino	lgG1, k de rata	7H22-E16	Alexa Fluor 647	Biolegend
Anti-CD275/ICOSL murino	lgG2a, к de rata	НК5.3	Biotina	Biolegend
Anti-CD279/PD-1 murino	lgG2a, к de rata	29F.1A12	FITC	Biolegend
Anti-CXCR5 murino	lgG2a, к de rata	2G8	Biotina	BD Pharmingen
Estreptavidina			APC/APC-Cy7	Biolegend
Anti-Foxp3 de ratón	lgG1, к de ratón	3G3	PE	Tonbo
Anti la ^b murina	lgG2a, к de ratón	25-9-17	FITC	BD Pharmingen
			Biotina	Biolegend
	lgG2a, к de rata	11-26c.2a	FITC	BD Pharmingen
Anti-IgD murina			РВ	Biolegend
Anti-IgM Igh ^a murina	lgG1 de ratón	DS-1	Biotina	BD Pharmingen
Anti-IgM Igh ^b murina	IgG1 de ratón	AF6-78	FITC	BD Pharmingen
	lgG2a, к de rata	R6-60.2	Biotina	BD Pharmingen
Anti-IgM murina		RMM-1	APC-Cy7	Biolegend
ΡΝΑ	PNA		Fluoresceína	Vector
Anti-Va2 murino	lgG2a, λ de rata	B20.1	FITC	Biolegend
Anti-Vβ5 murino	lgG1 de ratón	MR9-4	PE	Biolegend
Anti-Ly6G/Ly-6C (Gr-1) IgG2b, к de rata		RB6—8C5	FITC	Biolegend

Tabla 3. AcMs utilizados para fenotipado, caracterización de poblaciones linfocitarias y expresión de moléculas de superficie por citometría de flujo.

9. Inmunizaciones.

El estudio de los diferentes aspectos de la respuesta humoral se llevó a cabo mediante la inmunización de los ratones con diferentes Ags, en presencia o ausencia de adyuvante y a través de diferentes vías de administración.

9.1. TNP-Ficoll (trinitrofenol conjugado a aminoetil carboximetil-Ficoll).

En la caracterización de las respuesta frente a Ags TI-2 se inmunizaron a los ratones por vía intravenosa con 2.5 µg de TNP-Ficoll (Sigma) disueltos en 200 µl de PBS. Se obtuvo suero de los ratones antes de la inmunización y 7 y 14 días después, donde se cuantificaron los Acs IgM anti-TNP.

9.2. HSA (seroalbúmina humana).

Este Ag fue utilizado en el estudio tanto de la producción de Acs anti-HSA como de la expansión de las células implicadas en la respuesta humoral (células T_{FH} , T_{FR} y B CG). Para ello, se preparó una emulsión fría elaborada con HSA (Grifols) disuelta en salino (2 mg/ml) y adyuvante completo de Freund (CFA; 1 mg/ml; Sigma) en proporción 1:1. Los ratones fueron inmunizados en las almohadillas plantares de las patas traseras con 50 µl de la emulsión (50 µg de HSA) en cada pata. 7 y 14 días después de la inmunización se obtuvieron sueros para la determinación de Acs IgG, IgG1 e IgG2a anti-HSA y se extrajeron los ganglios poplíteos para el estudio de la frecuencia de las células T_{FH} , T_{FR} y B CG. A los 14 días también se extrajo el bazo de los ratones para el estudio histológico de los CGs.

9.3. OVA-TNP₁₁ (ovoalbúmina conjugada a 11 moléculas de TNP).

En el estudio de respuestas de alta y baja afinidad los ratones fueron inmunizados con una emulsión que contenía el Ag OVA-TNP₁₁ (Biosearch Technologies) disuelto en PBS (1 mg/ml) y CFA en proporción 1:1. Los ratones fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 100 µl de la emulsión (50 µg de OVA-TNP₁₁) obteniéndose sueros de estos ratones antes y 10, 20 y 30 días después para la valoración de los Acs IgG1 e IgG2a anti-TNP de alta y baja afinidad.

9.4. AHGG (gamma globulina humana agregada por calor).

Este Ag fue utilizado en el estudio de la respuesta humoral TD en ausencia de adyuvante, administrándose por vía intravenosa 400 µg de AHGG disueltos en PBS. La AHGG se obtuvo calentando la gamma globulina humana (Grifols) a 63°C durante 25'. Como control positivo se inmunizaron ratones con 100 µl de una emulsión preparada a partes iguales con AHGG disuelta en PBS (20 mg/ml) y CFA, administrando 1 mg de AHGG por ratón. Los ratones fueron sangrados antes y 10, 20 y 30 días después de dicha inmunización para la obtención de suero donde cuantificar los Acs IgG anti-AHGG.

9.5. OVA (ovoalbúmina).

Este Ag fue utilizado en los estudios de inmunización en la mucosa nasal, en los estudios de transferencia celular y en la inmunización para la determinación del número de CPs secretoras de Acs. En el primer caso se realizaron 3 inmunizaciones (días 0, 21 y 35) con 10 µg de OVA (Sigma) y 1 µg de LT κ 63 (cedida por el Dr. Giuseppe del Giudice) disuelto en 30 µl de PBS, administrando 15 µl en cada fosa nasal. Los ratones fueron sangrados los días 0, 20, 34 y 57, siendo éste último el día del sacrificio, donde se realizó un lavado intranasal con 500 µl de PBS. En los sueros de estos ratones se cuantificaron los Acs IgG e IgA anti-OVA mientras que en el PBS de los lavados intranasales fueron cuantificados los de isotipo IgA.

En los estudios de transferencia celular y en la determinación de CPs secretoras de Acs se preparó una emulsión fría a partir de OVA disuelta en PBS (1 mg/ml) y CFA en proporción 1:1, siendo inmunizados los ratones por vía intraperitoneal con 100 µl de esta emulsión (50 µg de OVA). A los 14 días, en el caso de la transferencia celular los ratones fueron sacrificados para el estudio de la expansión de células T_{FH} y B CG en bazo mediante citometría de flujo, la presencia de Acs anti-OVA en suero por ELISA y la aparición de CGs en el bazo por histología. En el estudio de la presencia de CPs secretoras de Acs los ratones fueron reinmunizados con 50 µg de OVA en una emulsión con adyuvante incompleto de Freund (IFA; Sigma), siendo sacrificados 14 días después para la realización del ELISPOT a partir de células del bazo.

10. Cuantificación de Acs mediante ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas).

La valoración de los niveles de Acs presentes en suero, en sobrenadantes de cultivo o en el PBS procedente de lavados intranasales se realizó mediante la técnica de ELISA. Para ello, placas de ELISA (*Maxisorb*; Nunc, Wiesbaden, Germany) fueron incubadas o/n a 4°C con un *coating* específico en función de la determinación (Tabla 4). Tras realizar 3 lavados con PBS, las placas fueron incubadas durante al menos 1 hora con 100 µl de solución de bloqueo (PBT) para saturar los sitios de uniones inespecíficas. A continuación se añadieron las muestras experimentales (50 µl/pocillo) que fueron testados por duplicado en un rango de diluciones apropiado. Como control positivo y para la realización de la curva patrón se utilizó un pool de sueros testado previamente con niveles elevados de los Acs sometidos a estudio. Tras una incubación a 4°C o/n, las placas, previamente lavadas, fueron incubadas durante 3 horas a RT u o/n a 4°C con Acs específicos frente a los distintos tipos de lgs murinas conjugados a fosfatasa

alcalina (AP) (Tabla 4). La reacción enzimática se valoró tras añadir 50 µl/pocillo de una dilución de pNPP (*4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate*, Sigma) como sustrato para la fosfatasa alcalina (ver apartado 18.1) utilizando un equipo *Multiskan® FC* (Thermo Scientific) con un filtro de 405 nm. Los datos obtenidos, a los que se les restó el blanco, fueron representados en unidades de titulación en referencia a la curva estándar elaborada con sueros con valores positivos de Ac o en unidades de densidad óptica (D.O.).

Coating	Concentración	Buffer	Muestra	Ac secundario
LPS (Sigma)	10 μg/ml	PBS	Sobrenadante	IgG de cabra anti-IgM murina conjugado a AP (Sigma)
lgG de cabra anti- lgM murina (Jackson ImmunoResearch)	10 μg/ml	BBS	Sobrenadante	IgG de cabra anti-IgM murina conjugado a AP (Sigma)
BSA-TNP ₁₈ (Biosearch Technologies)	10 μg/ml	BBS	Suero	IgG de cabra anti-IgM murina conjugado a AP (Sigma)
HSA (Grifols)	5 μg/ml	BBS	Suero	IgG de conejo anti-IgG1 murina conjugado a AP (Sigma)
				lgG1 de rata anti-lgG2a murina conjugado a AP (BD Pharmingen)
				Anti-IgG murino producido en cabra y conjugado a AP (Sigma)
				Anti-IgG2a Igh ^b murino producido en ratón y conjugado a AP (cedido por el Dr. Shozo Izui y conjugado a AP en el laboratorio)
				Anti-IgG2a murino producido en cabra y conjugado a AP (Jackson ImmunoRresearch)(no reconoce Igh ^b)
BSA-TNP ₃ y BSA- TNP ₁₈ (Biosearch Technologies)	10 μg/ml	BBS	Suero	IgG de conejo anti-IgG1 murina conjugado a AP (Sigma)
				lgG1 de rata anti-lgG2a murina conjugado a AP (BD Pharmingen)
AHGG (Grifols)	10 μg/ml	BBS	Suero	Anti-IgG murino producido en cabra y conjugado a AP (Sigma)
OVA (Sigma)	60 μg/ml	BBS	Lavado intranasal	IgG de cabra anti-IgA murina conjugado a AP (SouthernBiotech)

Coating	Concentración	Buffer	Muestra	Ac secundario
OVA (Sigma)	60 μg/ml	BBS	Suero	IgG de cabra anti-IgA murina conjugado a AP (SouthernBiotech)
				Anti-IgG murino producido en cabra y conjugado a AP (Sigma)
				lgG1 de rata anti-lgG2a murina conjugado a AP (BD Pharmingen)
ssDNA (Worthington)	50 μg/ml	BBS	Suero	Anti-IgG murino producido en cabra y conjugado a AP (Sigma)
				IgG de cabra anti-IgA murina conjugado a AP (SouthernBiotech)

Tabla 4. Diferentes *coatings* y Acs secundarios utilizados en las distintas determinaciones realizadas mediante ELISA.

11. Determinación del número de CPs secretoras de Acs por ELISPOT.

El estudio de la presencia de CPs secretoras de Acs frente a un Ag determinado se realizó mediante el ensayo de *inmunospot* conjugado a actividad enzimática (ELISPOT), una variante de la técnica de ELISA que está diseñada para cuantificar células individuales que están secretando una proteína concreta *in vitro*.

Con el objetivo de determinar el número de CPs secretoras de Acs IgG anti-OVA, se inmunizaron ratones como se describe en el apartado 9.5. A partir del bazo de estos ratones se obtuvieron suspensiones celulares (ver apartado 4.3), a partir de las cuales se realizó una citometría de flujo para determinar el número de células B totales (células B220⁺). Finalmente las células fueron resuspendidas en medio DMEM suplementado a una concentración de 10x10⁶ células/ml para su cultivo en placas de microtitulación *Multiscreen HA* de nitrocelulosa (Milipore, Bedford, MA).

El día anterior al ensayo, se añadieron en estas placas de microtitulación 50 μl de una solución de OVA en PBS estéril a una concentración de 60 μg/ml, dejándose incubar toda la noche a 37°C. Pasado este tiempo, las placas fueron lavadas 3 veces con PBS estéril, y se saturaron añadiendo 200 μl de la solución de bloqueo (medio DMEM suplementado). Tras una hora a 37°C se agregaron, por duplicado, diluciones seriadas de cada suspensión celular,

partiendo de una concentración celular de 10⁶ células/pocillo. Adicionalmente, se utilizaron como controles negativos 2 pocillos sin suspensión celular. Transcurridas 5 horas de incubación a 37°C, se descartaron las células del cultivo y se realizaron 5 lavados con PBS-0.1%Tween-20. Posteriormente, se añadieron 50 µl de IgG de cabra anti-IgG murina conjugado a AP (Southern Biotech) diluido en PBS-0.1%Tween-20. Tras la incubación o/n a 4°C, y el lavado de las placas para eliminar el conjugado no unido a las Igs, se revelaron añadiendo 100 µl/pocillo de una solución sustrato compuesta de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP; Promega, Madison, WI) y nitroazul tetrazolium (NBT; Promega, Madison, WI) en un buffer 100 mM Tris-HCl (pH 9), 150 mM NaCl y 1 mM Cl₂Mg. El sustrato, al ser metabolizado por la enzima AP produjo un cambio de color, de forma que, cada punto azul correspondió al lugar donde una célula individual había producido Acs IgG anti-OVA. Transcurridos 30′, la reacción colorimétrica se detuvo mediante su lavado con agua destilada y, finalmente, las placas se dejaron secar al aire y en oscuridad hasta su lectura. Los puntos, que representan CPs secretoras de Acs IgG anti-OVA, se contaron con la ayuda del equipo *"AID EliSpot Reader classic"*. Los resultados se expresaron como número de CPs secretoras de Acs por cada 10⁶ de linfocitos B.

12. Procesamiento y estudio histológico de los tejidos.

Para el análisis tanto de la presencia de lesiones glomerulares como de la aparición de CGs en el bazo de ratones inmunizados se realizaron estudios histológicos de riñón y bazo. Estos órganos se fijaron en formol tamponado al 4% (ver apartado 18.1) durante 24 horas a RT. A continuación fueron deshidratados en baños de alcoholes y xiloles a concentraciones crecientes del 70% al 100%, y finalmente se incluyeron en parafina. A partir de estos bloques se realizaron secciones de 3-4 µm, que fueron procesadas para tinción con hematoxilina y eosina. Para valorar el estado de los glomérulos, dichas secciones fueron analizadas con un microscopio óptico (Nikon, Eclipse E400), tomando fotografías con el objetivo de 20X. En el estudio de los CGs del bazo, las muestras fueron escaneadas en el equipo *Zeiss Axio Scan.Z1*, procediendo a la medida del área de los mismos con el programa *ImageJ*. Los resultados se muestran como porcentaje de área ocupado por los CGs sobre el área total de bazo analizado.

13. Estudios de transferencia celular.

Para la purificación de células T CD4⁺ procedentes de ratones WT.OT-II y BAMBI-KO.OT-II se obtuvieron suspensiones celulares de ganglios según lo descrito en el apartado 4.3 en condiciones estériles. Estas células fueron incubadas con los AcMs anti-B220-PE, anti-CD11b-PE, anti-CD11c-PE, anti-CD8-PE y anti-GR1-FITC (Tabla 3) durante 30' a 4°C con el objetivo de marcar todas las poblaciones a excepción de las células T CD4⁺. Posteriormente se realizó un lavado con PBS para eliminar el exceso de Ac y se resuspendió el pellet en PBS a una concentración aproximada de 20x10⁶ células/ml. A continuación se procedió a la separación de la población negativa con ayuda de un citómetro y separador celular FACSaria (Becton Dickinson, Palo Alto, CA, USA), siendo recogidas en medio RPMI suplementado (ver apartado 18.3) para evitar su muerte durante el proceso de purificación. Finalmente se comprobó la eficacia de la separación mediante citometría de flujo, donde tal y como se muestra en la Figura 6, el porcentaje de células T CD4⁺ en ambos casos fue superior al 95%.



Figura 6. Eficacia de la purificación de células T CD4⁺ de ganglios de ratones WT.OT-II y BAMBI-KO.OT-II. Tras la separación, 0.5x10⁶ células de ambos orígenes fueron marcadas con un AcM anti-CD4-PerCp. Como se observa en los histogramas, la mayoría de las células son CD4⁺.

A continuación, las células T CD4⁺ purificadas (WT.OT-II y BAMBI-KO.OT-II) se pusieron a una concentración de 0.25×10^6 células/ml de medio RPMI suplementado, inyectándose 200 µl (0.05×10^6 células T CD4⁺) a los ratones WT.CD3-KO y BAMBI-KO.CD3-KO previamente anestesiados con éter dietílico a través del seno retroorbitario. Finalmente, 24 horas más tarde estos ratones fueron inmunizados con OVA-CFA, tal y como se describe en el apartado 9.5.

14. Generación de ratones quiméricos.

A partir de los ratones donantes se obtuvieron suspensiones celulares de médula ósea tal y como se describe en el apartado 4.3, dejando las células resuspendidas en medio RPMI suplementado a 4ºC. A continuación, se procedió a la irradiación de los ratones receptores en el servicio de radioterapia del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla con el objetivo de eliminar todas las células del SI, recibiendo una dosis de 950 rads. Antes de la reconstitución de los ratones receptores, las células de los donantes fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5' para resuspenderlas en PBS a una concentración de 50x10⁶ células/ml, inyectándose 200 µl (10x10⁶ células) a través del seno retroorbitario. Los ratones se alojaron durante dos meses en cuartos libres de patógenos con comida y agua esterilizada suplementada con antibióticos [10% soltrim (Almofarma), 2% ciprofloxacino (Normon) y 5% gentamicina (Normon)]. Pasados estos dos meses, los ratones con el SI regenerado a partir de las células donantes, fueron inmunizados con HSA-CFA según se describe en el apartado 9.2.

15. Producción y Purificación de AcMs.

Se produjeron y purificaron AcMs a partir de las siguientes líneas de hibridomas secretores: 1B7.11 (IgG1 murino anti-TNP) y 1D11 (IgG1 murino anti-TGFβ1, 2 y 3 murino).

15.1. Producción.

Las células se expandieron mediante cultivo en DMEM suplementado (ver apartado 18.3). En ratones atímicos *Nude*, previamente estimulados con pristano (2, 6, 10, 14–tetrametilpentadecano, Sigma), se inyectaron las células del hibridoma por vía intraperitoneal, a razón de 5-10x10⁶ células/ratón. Cuando fue evidente la existencia de ascitis, por observación del volumen abdominal, se extrajo mediante punción peritoneal bajo anestesia. Se hizo un pool con la ascitis recogida, se centrifugó a 3000 rpm durante 10', se filtró y se conservó a -20°C hasta el momento de su purificación y uso.

15.2. Purificación de ascitis. Método del ácido caprílico.

El protocolo se inició añadiendo tampón acetato-acético 60 mM, pH 4 (ver apartado 18.1) en un volumen 4:1 en relación a la cantidad de ascitis de la que se partía y se ajustó el pH a 4.5. A continuación se añadió goteando ácido caprílico (*Octanoic acid*, Sigma) a razón de 25 µl por cada ml de la solución anterior y se sometió a agitación magnética 30' a RT, consiguiendo de esta forma que se rompiese la emulsión de los lípidos (la solución tomó un aspecto blanquecino con micelas). Tras centrifugar 30' a 12000 rpm y 4°C, se recogió el sobrenadante en un vaso de precipitados, se añadió sobre este PBS 10X en relación 1:9 y se ajustó el pH a 7.4. En este punto se procedió a precipitar el Ac añadiendo lentamente y en agitación el mismo volumen de sulfato amónico saturado (SAS) filtrado a pH 7 (ver apartado 18.2) agitando durante 30'-o/n a 4°C. Tras una centrifugación de 30' a 12000 rpm y 4°C se desechó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en PBS en el volumen deseado. Dicha disolución fue dializada contra PBS en membranas de diálisis (*Dialysis tubing, high retention, 40 mm x 25 mm*; Sigma) durante 3 días. Finalmente se determinó la concentración de Ac calculando la densidad óptica a 260 nm con un espectrofotómetro (*Nanodrop 2000*, Thermo Scientific), y se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

16. Tratamiento con Acs.

Para bloquear *in vivo* la acción del TGFβ, se administró el AcM IgG1 murino anti-TGFβ (1D11) murino, utilizando como isotipo control el AcM IgG1 murino anti-TNP (1B7.11). Se inyectaron por vía intraperitoneal 1 mg/ratón/semana divididos en 3 dosis en días alternos desde un mes antes de la inmunización hasta el momento del sacrificio.

17. Tratamiento con 5Z-7-oxozeanol (5ZOX).

En los experimentos de inhibición de TAK1 los ratones fueron tratados con 5ZOX (Sigma). Dicho compuesto fue resuspendido en DMSO al 5% (Sigma) y en salino quedando a una concentración de 50 μ g/ml. Se administraron 30 μ g/ratón/semana repartidos en 3 dosis de 200 μ l por vía intraperitoneal. Los ratones controles fueron tratados con la misma cantidad de DMSO.

18. Reactivos.

18.1. Tampones.

- PBS-1X (PBS): Tampón fosfato salino al 1X, y pH 7.2. Contiene por litro de dH₂O: 0.8 g de NaCl (Panreac), 0.2 g de KCl (Panreac), 0.2 g de KH₂PO₄ (Panreac), 1.15 g de Na₂HPO₄ (Panreac).
- PBS-10X: Contiene por litro de dH₂O: 8 g de NaCl, 2 g de KCl, 2 g de KH₂PO₄, 11.5 g de Na₂HPO₄.
- *PBT*: PBS con 2% BSA y 0.05% Tween 20.

- TBE 5X. Para 1I: 54 g de Tris, 27.5 g de ácido bórico, 0.5M de EDTA pH 8, y enrasar con dH₂O.
- Solución de lisis de Eritrocitos: Es un tampón de Tris-NH₄Cl a pH 7.5. Está compuesto por un volumen de una solución de Trizma base y nueve volúmenes de Cloruro amónico disuelto al 0.83% (peso/volumen) en agua destilada. La primera solución contiene Trishidroximetil-aminometano (2.06 g en 100 ml de agua destilada, a pH 7.5).
- Tampón borato salino (BBS). Para 11: 6.18 g de ácido bórico, 4.38 g NaCl, 9.54 g Bórax, completando hasta 1 l con dH₂O y llevando a pH 8.3-8.5.
- Tampón sustrato para el ELISA convencional: constituye el medio de reacción para la fosfatasa alcalina, y está compuesto por una disolución acuosa de 9.7% en volumen de dietanolamina (Panreac), 0.1 mg/ml de MgCl hexahidratado (Serva) y 0.2 mg/ml de azida sódica (Merk). El pH fue ajustado a 9.8 y el tampón fue conservado a oscuridad a temperatura ambiente. En el momento de uso se mezclaron 5 ml de este buffer con 5 mg de pNPP (4-nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate, Sigma).
- Tampón Acetato-acético 60mM, pH 4. Para 100 ml: mezclar 18 ml de acetato sódico 60 mM y 82 ml de ácido acético 60 mM.
- Formol tamponado al 4%. Para 11: 100 ml de Formaldehído 37% (Scharlau), 900 ml de dH₂O, 6.5 g de Na₂HPO₄ (Panreac) y 4 g de NaH₂PO₄.H2O (Merk). Llevar a pH 7-7.2.

18.2. Soluciones.

- PFA 2%: Contiene 2 g de paraformaldehído (Serva) disueltos con calor (65º aprox.), hasta un volumen total de 100 ml, en 5 ml de PBS-10X, agua destilada y 3 μl de NaOH. Esta solución fue filtrada y conservada a 4ºC o a temperatura ambiente.
- Saponina 3%. Para utilizarla como agente permeabilizante de membranas tisulares, se empleó Saponina al 0.03% en PBS. Esta disolución se preparó en el momento de uso, partiendo de un stock de saponina (Sigma) al 3% en PBS, conservado a 4ºC un máximo de una semana.
- Sulfato Amónico Saturado (SAS). Disolución de 540 g de sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄, Sigma) en 600 ml de dH₂O.

18.3. Medios de cultivo.

• Medio de cultivo Eagle de Dulbecco Modificado (DMEM, Gibco) suplementado. Se suplementó el medio DMEM con Hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina-

estreptomicina 10 μ g/ml, β -mercaptoetanol 10 μ M y 10% de suero fetal bovino (FBS) descomplementado por calor. Todos estos últimos reactivos fueron comprados a Sigma, St. Louis, MO.

- Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado. Se suplementó el medio RPMI 1640 con Hepes 10 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina-streptomicina 10 μg/ml, β-mercaptoetanol 10 μM, piruvato sódico 1% (v/v) (Lonza) y 10% suero fetal bovino (FBS) descomplementado por calor. Todos estos últimos reactivos fueron comprados a Sigma, St. Louis, MO.
- Medio c-kill. Compuesto por medio RPMI 1640 suplementado con 0.3% BSA y Hepes 2 mM.

19. Análisis Estadístico

En general, en el estudio de los títulos de Acs y el número de las diferentes poblaciones de células B, el grupo experimental fue comparado con el grupo control correspondiente mediante un test no paramétrico de *Mann Whitney*. Para comparar las variaciones en el porcentaje de diferentes poblaciones linfocitarias, la expresión de BAMBI y las diferentes moléculas de activación, se utilizó la *t de Student*, aplicando la corrección de *Welch* en caso de haber diferencias significativas entre las varianzas. Las diferencias fueron consideradas no significativas cuando p≥0,05 (ns), significativas cuando p<0,05 (*), muy significativas si p<0,01 (**) y altamente significativas cuando p<0,001 (***). Estos análisis se llevaron a cabo empleando el programa informático *GraphPad Prism*[®] 5.0.

IV. Resultados

IV. RESULTADOS

1. Expresión e inducción de BAMBI en los linfocitos B.

El primer objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de BAMBI en los linfocitos B tras la estimulación *in vitro* con Acs anti-IgM y anti-CD40 en presencia o ausencia de TGF β . Ante la imposibilidad de detectar la proteína mediante citometría de flujo se analizó su expresión mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR). Como control negativo se utilizaron linfocitos B de ratones deficientes en BAMBI (BAMBI-KO). En la Figura 1 se observa una cierta expresión basal de mRNA de BAMBI, la cual está claramente potenciada tras 48 horas de estimulación *in vitro*. Sin embargo y a diferencia de lo descrito en los linfocitos T CD4⁺ (Postigo et al., 2016), la expresión de BAMBI disminuye significativamente a las 48 horas tras la adición al cultivo de TGF β .



Figura 1. Expresión de mRNA de BAMBI en linfocitos B. 25 ng de cDNA procedentes de mRNA extraído de linfocitos B en reposo o activados con anti-CD40 (10 µg/ml) y anti-lgM (10 µg/ml) en presencia o ausencia de 2ng/ml de TGF β fueron amplificados mediante qPCR utlizando primers específicos del gen que codifica para BAMBI. En la gráfica se muestra la media±SD (desviación estándar) de la expresión relativa de mRNA de BAMBI normalizado respecto a la expresión del gen del 18s. Como controles negativos se utilizaron linfocitos B del ratón BAMBI-KO, que no expresa la proteína. Se muestran los resultados de un experimento representativo sobre un total de 3 experimentos. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de *student* se indican como: *(p<0.05) y **(p<0.01).

2. Caracterización de las subpoblaciones de linfocitos B en el ratón BAMBI-KO.

Para comenzar a estudiar el posible papel de BAMBI en la funcionalidad de los linfocitos B se analizó si su deficiencia producía cambios en la distribución de las diferentes subpoblaciones de los mismos en la médula ósea, bazo y cavidad peritoneal. Para ello, se caracterizaron las distintas subpoblaciones B en ratones C57BL/6 silvestres (WT) y en ratones BAMBI-KO de 2-3 meses de edad mediante citometría de flujo. En la médula ósea no se encontraron diferencias ni en el número total de células del linaje B ni en la distribución de las distintas subpoblaciones inmaduras y maduras (Figura 2A). En el bazo, el número de linfocitos B220⁺ totales fue similar en ambas cepas de ratones aunque en el ratón BAMBI-KO se observó un aumento del número de células B en el estadio T2 y de células B memoria sin estar afectadas el resto de subpoblaciones de células B-2 convencionales (Figura 2B). En cambio, los ratones BAMBI-KO mostraron un incremento notable en la población de las células B-1, tanto B-1a como B-1b, en el bazo y la cavidad peritoneal (Figura 2C).





Figura 2. Estudio de las subpoblaciones de linfocitos B en médula ósea, bazo y cavidad peritoneal en ratones WT y BAMBI-KO. Número de células de médula ósea y bazo y de las subpoblaciones de linfocitos B analizadas con diferentes AcMs mediante citometría de flujo. La identificación de las diferentes subpoblaciones se realizó de la siguiente manera: A) B220 (B220⁺), pro-B (B220^{lo}IgM⁻CD43⁺), pre-B (B220^{lo}IgM⁻CD43⁺), pre-B (B220^{lo}IgM⁻CD43⁺), pre-B (B220^{lo}IgM⁻CD43⁺), células B inmaduras (B Inm) (B220⁺IgM⁺IgD⁻) y células B maduras (B Mad) (B220⁺IgM⁺IgD⁺). **B)** B220 (B220⁺), B T1 (B220⁺IgM⁺CD23⁻CD21⁻), B T2 (B220⁺IgM^{hi}CD23⁺CD21⁺), B ZM (B220⁺IgM⁺CD23⁻CD21⁺), células B foliculares (B FoI) (B220^{-/Io}CD19⁺IgM⁺CD5⁺) y B-1b (B220^{-/Io}CD138⁺) y células B memoria (B Mem) (B220⁺IgM⁻IgD⁻) CD138⁻). **C)** B-1a (B220^{-/Io}CD19⁺IgM⁺CD5⁺) y B-1b (B220^{-/Io}CD19⁺IgM⁺CD5⁻). El número de células de cada subpoblación se obtuvo extrapolando el porcentaje de cada población al número total de células de su localización. Los resultados se expresan como media±SD (n=20 ratones/grupo). Las diferencias estadísticas calculadas mediante un test de *Mann Whitney* se indican como: *(p<0.05), **(p<0.01) y ***(p<0.001).

3. El ratón BAMBI-KO presenta una respuesta potenciada frente a Ags de tipo TI.

Como se describe en el apartado anterior, las células B-1a y B-1b se encuentran expandidas en el ratón BAMBI-KO, siendo estas células parte importante de la respuesta de tipo TI, especialmente las células B-1b. Por este motivo, se estudiaron las respuestas de tipo TI en los ratones BAMBI-KO.

Como se menciona en la introducción, existen dos tipos de Ags TIs, los TI-1, los cuales activan al linfocito B tanto a través del BCR como de los TLRs, siendo el LPS el ejemplo más característico, y los TI-2, donde se incluyen a los polisacáridos de alto peso molecular que activan al linfocito B debido a su estructura altamente repetitiva mediante entrecruzamiento de los BCRs.

Con el objetivo de evaluar la respuesta frente a un Ag TI-1 como el LPS se realizó el siguiente abordaje. Se purificaron linfocitos B del bazo de ratones WT y BAMBI-KO y se

estimularon *in vitro* con LPS, a los 6 días se recogió el sobrenadante donde se determinó mediante ELISA la cantidad de Acs de tipo IgM total así como los que reconocían al LPS de manera específica. Las células B del ratón BAMBI-KO produjeron mayor cantidad de Acs de tipo IgM total y específicos de LPS en comparación con las células B procedentes del ratón WT (Figura 3A).

Para evaluar la respuesta frente a Ags TI-2 se utilizó un modelo ampliamente usado en la caracterización de este tipo de respuesta. Este modelo consiste en la utilización del hapteno TNP (trinitrofenol) conjugado al polisacárido aminoetil carboximetil-Ficoll (TNP-Ficoll) como Ag, permitiéndonos evaluar la producción específica de Acs IgM anti-TNP activada por el polisacárido de alto peso molecular. Se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO por vía intravenosa con TNP-Ficoll para posteriormente determinar en suero la producción de Acs IgM anti-TNP mediante ELISA. Como se observa en la Figura 3B, los ratones BAMBI-KO presentaron niveles de Acs significativamente superiores a los ratones WT 7 y 14 días después de la inmunización.



Figura 3. Producción de Acs frente a Ags TIs. A) Nivel de IgM total (mg/ml) e IgM anti-LPS (densidad óptica (D.O.) medida a 405nm) en el sobrenadante de un cultivo de 6 días con linfocitos B estimulados con el Ag TI-1 LPS (10 µg/ml) analizado mediante ELISA. Los resultados se expresan como media±SD. Se muestran los resultados de un experimento representativo sobre un total de 3 experimentos. B) Nivel de IgM anti-TNP en el suero de ratones WT y BAMBI-KO (KO) antes y 7 y 14 días después de la inmunización por vía intravenosa con 2.5 µg del Ag TI-2 TNP-FicoII, evaluados mediante ELISA. Los niveles de Acs en ratones individuales se expresan en Unidades de Titulación en referencia a una curva estándar elaborada con un conjunto de sueros con valores de Ac anti-TNP positivos. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: *(p<0.05), **(p<0.01) y ***(p<0.001).
4. Caracterización de la respuesta del ratón BAMBI-KO frente a Ags TDs.

En vista del efecto de la deficiencia en BAMBI sobre la respuesta de tipo TI a continuación se estudió si también juega un papel en la respuesta frente a Ags donde se requiere la colaboración de las células T CD4⁺.

4.1. La deficiencia en BAMBI provoca un aumento en la producción de Acs frente a Ags TDs.

Con el objetivo de analizar el efecto de la deficiencia en BAMBI sobre este tipo de respuesta, se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO con el Ag TD HSA (seroalbúmina humana) en presencia del adyuvante CFA (adyuvante completo de Freund). El análisis de la producción de Acs de tipo IgG, IgG1 e IgG2a anti-HSA muestra que los ratones BAMBI-KO presentan un aumento en los niveles de Acs anti-HSA circulantes del isotipo IgG así como en las subclases IgG1 e IgG2a a día 14, siendo este aumento más evidente en la subclase IgG2a, donde ya existen diferencias a día 7 (Figura 4). Este resultado nos permite extender a los Ags TDs el efecto potenciador de la deficiencia en BAMBI sobre la respuesta humoral.



Figura 4. Producción de Acs frente a un Ag TD. Se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO (KO) en la almohadilla plantar con 100 μg de HSA emulsionada en CFA (50 μg en cada pata). Los Acs de tipo IgG, IgG1 e IgG2a anti-HSA de los sueros previos a la inmunización y de 7 y 14 días después de la misma fueron analizados mediante ELISA. Los niveles de Acs en ratones individuales se expresan en Unidades de Titulación en referencia a una curva estándar elaborada con un conjunto de sueros con valores de Ac anti-HSA positivos. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: ns (no significativo) y **(p<0.01).

4.2. Análisis de la posible influencia del alotipo de las Igs de los ratones WT y BAMBI-KO en las respuestas humorales TDs.

El alotipo (Igh) es un determinante antigénico polimórfico en la región constante de las Igs sin relevancia biológica pero que sí podría afectar a su detección en el ELISA. Debido a que los ratones WT son de Igh^b mientras que los ratones BAMBI-KO son de Igh^a, se comprobó si el aumento observado en la producción de Acs anti-HSA en los ratones BAMBI-KO era real o estaba relacionado con el hecho de que los Acs anti-IgG secundarios utilizados en el ELISA reconocían mejor las Igs de Igh^a que las de Igh^b. Para ello se entrecruzaron los ratones WT y BAMBI-KO para obtener ratones WT de Igh^a (WT^a). Posteriormente, los ratones WT^a y BAMBI-KO se inmunizaron con HSA en presencia de CFA para determinar el nivel de producción de Acs IgG2a anti-HSA. Como se observa en la Figura 5 los ratones BAMBI-KO siguen presentando mayor nivel de Acs IgG2a anti-HSA que los ratones WT^a, demostrando que este aumento en la producción de Acs no es debido al diferente Igh de los ratones.



Figura 5. Producción de Acs de ratones WT y BAMBI-KO con el mismo alotipo. Se inmunizaron ratones WT^a y BAMBI-KO con 100 μ g de HSA emulsionado en CFA por vía intraperitoneal. Los sueros de estos ratones previos a la inmunización y 10, 20 y 30 días después de la misma fueron testados para determinar el nivel de IgG2a anti-HSA mediante ELISA. Los valores en ratones individuales se expresan en D.O. medida a 405 nm. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: ns (no significativo) y *(p<0.05).

4.3. La deficiencia en BAMBI potencia las respuestas TDs de alta y baja afinidad.

A continuación se analizó si la potenciación de las respuestas TDs en el ratón BAMBI-KO era debida a un aumento en los Acs de alta y/o de baja afinidad. Con esta finalidad se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO de ambos sexos con el hapteno TNP conjugado a ovoalbúmina (OVA-TNP₁₁) emulsionado en CFA. Para discriminar entre Acs anti-TNP de alta y baja afinidad se realizó un ELISA utilizando como revestimiento (*coating*) BSA (seroalbúmina bovina) conjugada a 3 moléculas de TNP (BSA-TNP₃) y BSA conjugada a 18 moléculas de TNP (BSA-TNP₁₈). De este modo el uso de BSA-TNP₃ como *coating* permite principalmente la unión de Acs que reconozcan el TNP con una afinidad alta, mientras que el uso de BSA-TNP₁₈ permite la detección de Acs de baja afinidad.

Las hembras BAMBI-KO presentaron niveles de Acs circulantes IgG1 e IgG2a anti-TNP de alta y baja afinidad incrementados en todos los periodos testados tras la inmunización. En los machos BAMBI-KO los Acs anti-TNP de la subclase IgG2a de alta y baja afinidad también se encontraron incrementados en todos los periodos testados, mientras que los de la subclase IgG1 de alta y baja afinidad solamente estaban aumentados a día 10 tras la inmunización (Figura 6). Estos resultados indican que el aumento en la respuesta humoral frente a un Ag TD en los ratones BAMBI-KO no se circunscribe a un Ag en concreto y que es debido tanto a las respuestas de alta como de baja afinidad, siendo mayor estas diferencias en las hembras.



Figura 6. Estudio de la producción de Acs de alta y baja afinidad. Se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO de ambos sexos con 50 μg de OVA-TNP₁₁ emulsionado en CFA por vía intraperitoneal. En los sueros previos a la inmunización y de 10, 20 y 30 días después de la misma se determinaron los Acs IgG1 e IgG2a anti-TNP mediante ELISA. En la parte superior se muestran los Acs de alta afinidad, discriminados mediante el uso del *coating* BSA-TNP₃, y en la parte inferior los de baja afinidad, donde se utilizó BSA-TNP₁₈ como *coating*. Los niveles de Acs en ratones individuales se expresan en Unidades de Titulación en referencia a una curva estándar elaborada con un conjunto de sueros con valores de Ac anti-TNP positivos. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: ns (no significativo), *(p<0.05), **(p<0.01) y ***(p<0.001).

4.4. Los ratones BAMBI-KO generan respuesta TD en ausencia de adyuvantes.

Para profundizar en el estudio sobre el papel de BAMBI en el control de las respuestas humorales TDs, se estudiaron las respuestas frente al Ag gamma globulina

humana agregada por calor (AHGG). Este Ag tiene la particularidad de que los ratones con haplotipo H-2^b, el haplotipo de los ratones WT y BAMBI-KO, son bajo respondedores frente a él.

La baja respuesta frente a este Ag se manifiesta por la ausencia de Acs IgG anti-AHGG en los ratones WT inmunizados por vía intravenosa en ausencia de adyuvante, aunque estos ratones inmunizados intraperitonealmente en presencia de CFA sí son capaces de generar Acs frente a la misma (Figura 7) (Fossati et al., 1995). En cambio, los ratones BAMBI-KO generan Acs IgG anti-AHGG incluso en ausencia de adyuvante (Figura 7).



Figura 7. Estudio de la respuesta frente a un Ag TD en ausencia y presencia de adyuvante. En la figura se muestra el nivel de Acs IgG anti-AHGG en el suero de ratones WT y BAMBI-KO tras la inmunización con 200 µg de AHGG por vía intravenosa (iv) en ausencia de adyuvante (izquierda) o con 1 mg de AHGG por vía intraperitoneal en presencia de CFA (derecha). Los valores de los ratones individuales se expresan en D.O. medida a 405 nm. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: *(p<0.05), **(p<0.01) y ***(p<0.001).

4.5. La inmunización vía intranasal produce un aumento en la producción de Acs en el ratón BAMBI-KO tanto a nivel sistémico como a nivel de la propia mucosa nasal.

Una vez establecido el efecto de la deficiencia en BAMBI frente a un Ag TD inducido tras inmunizaciones por vía sistémica, se estudió su efecto sobre una inmunización a nivel de mucosas. Para ello se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO por vía intranasal con el Ag OVA en presencia de un mutante no tóxico de la toxina termolábil de *Escherichia coli* (LTκ63) como adyuvante, siendo reinmunizados a los 21 y 35 días.

Los niveles de IgG e IgA anti-OVA a nivel sistémico fueron estadísticamente superiores en los sueros de los ratones BAMBI-KO tras la segunda inmunización (día 34) en el caso de los de isotipo IgG y tras la tercera inmunización (día 57) en los de isotipo IgA (Figura 8A). En el día del sacrificio (día 57) se realizaron lavados intranasales evidenciándose un incremento en los niveles de Acs IgA anti-OVA significativamente superior en los ratones BAMBI-KO con respecto a los de los ratones WT (Figura 8B). Estos resultados muestran el efecto potenciador de la deficiencia en BAMBI en la respuesta humoral no solo a nivel sistémico, sino también a nivel de mucosas.



Figura 8. Estudio de la respuesta humoral sistémica y local tras una inmunización por vía intranasal. Se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO con 10 µg de OVA en presencia de 1 µg de LT κ 63 por vía intranasal, siendo reinmunizados con la misma dosis 21 y 35 días después de la primera inmunización. A) Se obtuvieron sueros de estos ratones antes y 20, 34 y 57 días tras la primera inmunización. B) Al momento del sacrificio (día 57) se realizaron lavados intranasales a los ratones inmunizados (Inm) y a ratones sin inmunizar (No Inm). El nivel de Acs IgG e IgA anti-OVA en los sueros y en los lavados intranasales fue analizado mediante ELISA y expresado (valores de ratones individuales) en Unidades de Titulación en referencia a una curva estándar elaborada con un conjunto de sueros con valores de Ac anti-OVA positivos. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: ns (no significativo), *(p<0.05) y **(p<0.01).

5. Los ratones BAMBI-KO presentan cambios en las poblaciones celulares implicadas en la respuesta humoral frente a un Ag TD con respecto a los ratones WT.

Una vez establecido el papel que tiene BAMBI sobre la respuesta humoral de tipo TD decidimos estudiar su efecto sobre las poblaciones celulares implicadas en la misma. Con este objetivo se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO en la almohadilla plantar con HSA emulsionada en CFA. A los 7 y 14 días se analizaron las poblaciones de linfocitos T_{FH} y las células B CG mediante citometría de flujo en los ganglios poplíteos como ganglios de drenaje. De acuerdo al aumento en la producción de Acs observado en los ratones BAMBI-KO, estos ratones presentaron una expansión de las células T_{FH} 7 días después de la inmunización significativamente superior a la de los ratones WT, diferencia que desaparece a los 14 días (Figura 9A). Como era de esperar debido a la correlación existente entre la diferenciación de las células T_{FH} y la de las células B CG, los ratones BAMBI-KO mostraron un aumento en estas últimas 14 días después de la inmunización también significativamente superior al observado en los ratones WT (Figura 9B). Además del aumento en estas poblaciones que contribuyen a mejorar la respuesta humoral, se encontró una disminución en los ratones BAMBI-KO de las células T_{FR}, población con función supresora sobre este tipo de respuesta (Figura 9A). Estos resultados en los diferentes subtipos celulares fueron corroborados mediante el análisis de la presencia de CGs en el bazo de estos ratones, encontrándose un mayor porcentaje de área de los mismos en los ratones BAMBI-KO que en los WT (Figura 9C).







Figura 9. Estudio de las poblaciones implicadas en el desarrollo de la respuesta humoral TD. Se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO (KO) en la almohadilla plantar con 100 µg de HSA emulsionada en CFA (50 µg en cada pata). A los 7 y 14 días se realizó el estudio por citometría de flujo de las siguientes poblaciones: A) A la izquierda se muestran dot plots representativos de las células T_{FH} (CXCR5⁺PD-1⁺) en la población de células T CD4⁺ y de células T_{FR} (Foxp3⁺) en la población de células T_{FH} en los ratones WT (paneles superiores) y BAMBI-KO (paneles inferiores) 7 días tras la inmunización. En los dot plots se indican los porcentajes de estas poblaciones. En la parte derecha se muestran los porcentajes de estas poblaciones a día 7 y 14 tras la inmunización en ratones individuales en un experimento representativo sobre un total de 4. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. B) A la izquierda, se muestran dot plots representativos de las células B CG (PNA⁺FAS⁺) en la población de células B220⁺ en los ratones WT (panel izquierdo) y BAMBI-KO (panel derecho) 14 días tras la inmunización. En los dot plots se indican los porcentajes de esta población en cada tipo de ratón. En la parte derecha se muestran los porcentajes de células B CG a día 14 tras la inmunización en ratones individuales en un experimento representativo sobre un total de 4. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. C) A la izquierda se muestran imágenes histológicas de los bazos de los ratones WT (panel izquierdo) y BAMBI-KO (panel derecho) 14 días después de la inmunización tras tinción con hematoxilina y eosina. A la derecha se muestran los porcentajes de las áreas ocupadas por los CGs sobre el área total del bazo en un experimento representativo sobre un total de 2. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de *student* se indican como: *(p<0.05) y ***(p<0.001).

Posteriormente, se analizó la presencia de CPs secretoras de Acs en respuesta a una inmunización TD en ambos tipos de ratones. Para ello, se detectaron las CPs secretoras de Acs IgG anti-OVA mediante ELISPOT en células de bazo procedentes de ratones WT y BAMBI-KO sin inmunizar o inmunizados con OVA-CFA (primera inmunización) y OVA-IFA (adyuvante incompleto de Freund) (segunda inmunización). Como se muestra en la Figura 10, se produce una expansión de estas células en los ratones inmunizados, la cual es significativamente superior en los ratones BAMBI-KO.



Figura 10. Expansión de CPs secretoras de Acs tras inmunización con Ags TDs. Se inmunizaron ratones WT y BAMBI-KO con 50 µg de OVA en presencia de CFA, los cuales fueron reinmunizados 14 días más tarde con 50 µg de OVA emulsionado en IFA. Se realizó un ELISPOT 28 días después de la primera inmunización con las células del bazo de estos ratones (Inm) y de ratones controles no inmunizados (No Inm), donde se detectaron células secretoras de Acs IgG anti-OVA. En la parte de la izquierda se muestran imágenes de pocillos representativos de cada grupo con diferentes concentraciones celulares, donde cada punto representa a una CP secretora de Acs. En la parte de la derecha se representa el número de CPs secretoras de Acs por cada 10^6 células B (B220⁺) expresados como media±SD. Se muestran los resultados de un experimento representativo sobre un total de 3 experimentos. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de *student* se indican como: *(p<0.05) y **(p<0.01).

En conjunto, estos resultados muestran un efecto de la deficiencia en BAMBI sobre la frecuencia de las distintas poblaciones que regulan la respuesta humoral, con un aumento en los subtipos celulares que favorecen a la misma (células T_{FH}, células B CG y CPs secretoras de Acs) y una disminución en aquellas que la suprimen (células T_{FR}).

6. La deficiencia en BAMBI provoca un defecto intrínseco en los linfocitos B responsable de la potenciación de las respuestas inmunes humorales en los ratones BAMBI-KO.

Los resultados anteriores muestran que diferentes poblaciones celulares están expandidas en el ratón BAMBI-KO en correlación con la potenciación de las respuestas humorales observadas en estos animales. Sin embargo, estos estudios no permiten identificar la/s población/es responsables directas de estas alteraciones. En el presente trabajo se han barajado tres opciones diferentes. En primer lugar, la deficiencia en BAMBI puede estar potenciando la capacidad de presentación antigénica de las DCs, favoreciendo de esta forma la diferenciación de los linfocitos T $CD4^+$ hacia células T_{FH} durante su activación y la expansión ulterior de las células B CG. La segunda posibilidad es que la deficiencia en BAMBI esté afectando de manera intrínseca al linfocito T $CD4^+$ potenciando su diferenciación hacia células T_{FH} , generando los mismos efectos que en el caso anterior. Por último, la tercera posibilidad es que la deficiencia en BAMBI esté afectando selectivamente al linfocito B, potenciando su capacidad para inducir la diferenciación de células T_{FH} y facilitando su diferenciación a células B CG. Estas tres posibilidades se analizaron mediante dos abordajes experimentales.

En primer lugar, se realizaron experimentos de transferencia celular. Para ello, se transfirieron células T CD4⁺ procedentes de ratones WT.OT-II o BAMBI-KO.OT-II, en los cuales todas sus células T CD4⁺ expresan un TCR específico de OVA, a ratones deficientes en CD3 (sin células T), en los cuales sus células B podían ser normales (WT.CD3-KO) o deficientes en BAMBI (BAMBI-KO.CD3-KO), generando por tanto los siguientes grupos experimentales: Un grupo de ratones con células T CD4⁺ normales y células B deficientes en BAMBI, otro grupo donde las células B son normales y las células T CD4⁺ no expresan BAMBI, y los grupos controles con células T CD4⁺ y células B normales y deficientes en BAMBI. Los animales fueron inmunizados 24 horas después de la transferencia celular con OVA-CFA y fueron sacrificados 14 días después. Se tomó una parte del bazo para analizar mediante citometría de flujo el desarrollo de células T_{FH} y B CG y la otra parte para realizar un estudio histológico de los CGs en el mismo. Además se obtuvieron sueros para analizar la producción de Acs en los distintos grupos de ratones. Como se observa en la figura 11A, existe una mayor expansión de células T_{FH} y B CG, así como una mayor producción de Acs IgG2a anti-OVA solamente en presencia de células B deficientes en BAMBI, independientemente del origen de las células T CD4⁺. Estos hallazgos fueron además corroborados en el estudio histológico de los bazos de estos ratones, donde el porcentaje del área ocupado por los CGs es significativamente superior en los grupos donde las células B son deficientes en BAMBI, sin importar el origen de las células T CD4 $^{\scriptscriptstyle +}$ (Figura 11B).



Figura 11. Estudio de la respuesta humoral anti-OVA en ratones CD3-KO normales o deficientes en BAMBI tras la transferencia pasiva de células T CD4⁺ OT-II, deficientes o no en BAMBI y posterior inmunización. 50x10⁵ células T CD4⁺ procedentes de ratones WT.OT-II o BAMBI-KO.OT-II (KO.OT-II) fueron transferidas por vía intravenosa a ratones WT.CD3-KO o BAMBI-KO.CD3-KO (KO.CD3-KO). Los animales fueron inmunizados 24 horas más tarde con 50 µg de OVA emulsionado en CFA y sacrificados 14 días después de la misma. **A)** Porcentaje de células T_{FH} (CXCR5⁺PD-1⁺, panel izquierdo) sobre células T CD4⁺ y células B CG (PNA⁺FAS⁺, panel central) sobre células B220⁺ en el bazo de ratones individuales, analizadas mediante citometría de flujo. En el panel derecho se muestran los niveles de Acs IgG2a anti-OVA en el suero de estos ratones analizados mediante ELISA y expresados en Unidades de Titulación. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. **B)** Estudio histológico de los CGs presentes en el bazo de los animales descritos anteriormente mediante una tinción con hematoxilina y eosina. A la izquierda se muestran imágenes histológicas del bazo de un ratón representativo de cada grupo. A la derecha se muestran los porcentajes de las áreas ocupadas por los CGs sobre el área total del bazo. Se muestran resultados representativos de un experimento sobre un total de 3. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: ns (no significativo), *(p<0.05), **(p<0.01) y *** (p<0.001).

Estos experimentos demuestran claramente que la deficiencia en BAMBI en los linfocitos T CD4⁺ no es la causa de los efectos observados en la respuesta inmune humoral en los ratones BAMBI-KO y sugieren que son secundarios a un defecto intrínseco en las células B. Sin embargo, los experimentos descritos anteriormente no permiten descartar

la posibilidad de que la deficiencia en BAMBI afecte a la funcionalidad de las DCs ya que en los ratones BAMBI-KO.CD3-KO estas células también son deficientes en BAMBI. Para abordar esta posibilidad, se realizaron experimentos en ratones dobles quimeras de médula ósea (DQ mixtos), portadores de SI procedentes de ratones WT y BAMBI-KO que pueden ser diferenciados por distintos marcadores alotípicos polimórficos. Para ello, ratones receptores WT o BAMBI-KO fueron irradiados con 950 rads con el objetivo de eliminar las células del SI, siendo posteriormente reconstituidos con una mezcla 1/1 de células de médula ósea procedentes de ratones WT y BAMBI-KO. Los donantes utilizados en estos experimentos difieren tanto en la molécula CD45, expresada por todas las células de origen hematopoyético (los ratones WT presentan el polimorfismo CD45.1 mientras que los ratones BAMBI-KO el CD45.2), como a nivel de alotipo de las Igs producidas por sus linfocitos B (los Acs producidos por las células B de los ratones WT son de Igh^b y los producidos por las células B de los ratones BAMBI-KO son de Igh^a). Este diseño experimental permite valorar el origen de las células inmunocompetentes que proliferan en el contexto de una respuesta inmune humoral y de los Acs específicos producidos tras la inmunización con un Ag TD. Como controles, se utilizaron por un lado simples quimeras (SQ) consistentes en receptores WT.CD45.1 y BAMBI-KO.CD45.2 irradiados reconstituidos con células procedentes de ratones de su mismo origen y por otro lado, ratones dobles quimeras donde los receptores WT.CD45.1 irradiados fueron reconstituidos con una mezcla 1/1 de células de médula ósea procedentes de ratones WT.CD45.2 de Igh^a y células de ratones WT.CD45.1 de Igh^b (DQ.WT-WT). Dos meses después de la reconstitución, los animales de los distintos grupos experimentales fueron inmunizados en la almohadilla plantar con HSA-CFA, para analizar en los ganglios poplíteos la frecuencia de las células T_{FH} (7 días después de la inmunización) y B CG (14 días después de la inmunización) deficientes en BAMBI (CD45.2) o no (CD45.1). Además, se obtuvieron sueros de los ratones 14 días después de la inmunización para analizar la presencia de Acs IgG2a anti-HSA de Igh^a (producidos por células B BAMBI-KO) y de Igh^b (producidos por células B WT).

En la Figura 12 se esquematizan los resultados previsibles en los ratones DQ mixtos en función de las tres hipótesis planteadas inicialmente. En el caso de que la deficiencia en BAMBI en las DCs fuese la responsable del fenotipo observado en el ratón BAMBI-KO, las DCs procedentes de ratones BAMBI-KO serían capaces de presentar el Ag por igual tanto a linfocitos T WT.CD45.1 como a los BAMBI-KO.CD45.2. En esta situación, cabría esperar una expansión similar de células T_{FH} y B CG de ambos orígenes así como un incremento similar de los Acs específicos de Ag de ambos Igh (Figura 12A). Aunque la posibilidad de que la deficiencia en BAMBI en los linfocitos T CD4⁺ sea la responsable de la potenciación de las respuestas inmunes humorales en los ratones BAMBI-KO fue descartada en los experimentos de transferencia pasiva descritos anteriormente, los estudios en los ratones DQ mixtos permiten validar esta afirmación. En este caso, tras la inmunización de las células T_{FH} BAMBI-KO.CD45.2 sobre las WT.CD45.1, sin encontrar diferencias en la expansión de las células B CG de ambos orígenes ni en los niveles de Acs específicos de Ag de ambos lgh, ya que las células T_{FH} BAMBI-KO.CD45.2 interaccionarían por igual con los linfocitos B de ambos orígenes (Figura 12B). Por último, si la deficiencia en BAMBI en los linfocitos B es la causa de las anomalías descritas anteriormente cabría esperar una mayor expansión de las células B CG BAMBI-KO.CD45.2 en detrimento de las WT.CD45.1 y de los Acs Igh^a sobre los de Igh^b, sin observarse diferencias en los porcentajes de células T_{FH} WT.CD45.1 y BAMBI-KO.CD45.2 (Figura 12C).



Figura 12. Esquema explicativo de los posibles efectos observados sobre la diferenciación de las células T_{FH} y B CG en los ratones DQ mixtos, en función del subtipo celular afectado por la deficiencia en BAMBI: A) DC, B) Linfocito T CD4⁺ y C) Linfocito B.

En la Figura 13A se muestra la frecuencia de células T_{FH} en los diferentes grupos experimentales, en la cual se observa que en los ratones donde hay presencia de células BAMBI-KO (SQ.KO y DQ mixtas) hay una mayor expansión de las células T_{FH} con respecto a los grupos reconstituidos únicamente con células WT (SQ.WT y DQ.WT-WT). Además en las DQ mixtas la expansión de las células T_{FH} WT.CD45.1 y BAMBI-KO.CD45.2 fue similar, confirmando que la deficiencia en BAMBI en el linfocito T CD4⁺ no está implicada en la potenciación de la respuesta humoral en el ratón BAMBI-KO. Así mismo, en las DQ mixtas, tanto las quimeras con receptores WT como BAMBI-KO, la frecuencia de células B CG BAMBI-KO.CD45.2 fue significativamente superior a la de las procedentes de los ratones WT.CD45.1 (Figura 13B). Además los niveles de Acs IgG2a anti-HSA procedentes de células B GMBI-KO (Igh^a) se encontraron aumentados con respecto a los procedentes de células B WT (Igh^b) (Figura 13B).



Figura 13A. Estudio de la respuesta humoral en ratones quiméricos tras una inmunización con HSA-CFA. Se irradiaron ratones WT.CD45.1 y BAMBI-KO.CD45.2 para ser reconstituidos posteriormente con distintas combinaciones de células de médula ósea (un total de 10^7 células) procedentes de ratones donantes WT.CD45.2 Igh^b, WT.CD45.1 Igh^b, WT.CD45.2 Igh^a y BAMBI-KO.CD45.2 Igh^a. Dos meses después de la reconstitución, los animales fueron inmunizados con 100 µg de HSA-CFA en la almohadilla plantar (50 µg en cada pata). 7 días después de la inmunización se analizó el porcentaje de células T_{FH} (CXCR5⁺PD-1⁺) CD45.1 y CD45.2 sobre células T CD4⁺ CD45.1 y CD45.2 respectivamente en los ganglios poplíteos mediante citometría de flujo. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de *student* se indican como: ns (no significativo) y *(p<0.05).



Figura 13B. Estudio de la respuesta humoral en ratones quiméricos tras una inmunización con HSA-CFA. 14 días tras la inmunización se analizó el porcentaje de células B CG (FAS⁺PNA⁺) CD45.1 y CD45.2 sobre células B220⁺ CD45.1 y CD45.2 respectivamente en los ganglios poplíteos mediante citometría de flujo y los niveles de Ac IgG2a anti-HSA de Igh^a e Igh^b mediante ELISA. Los niveles de Acs en ratones individuales se expresan en Unidades de Titulación en referencia a una curva estándar elaborada con un conjunto de sueros obtenidos tras la inmunización repetida de ratones WT de Igh^{a/b} con HSA-CFA. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: ns (no significativo), *(p<0.05) y **(p<0.01).

Considerando globalmente todos estos estudios, nuestros resultados indican que la deficiencia en BAMBI causa anomalías selectivas en los linfocitos B que son las responsables de la potenciación de las respuestas inmunes humorales en estos animales mutantes.

7. Estudio molecular de los linfocitos B en el ratón BAMBI-KO.

Una vez establecido el papel de los linfocitos B deficientes en BAMBI en el incremento de la respuesta humoral del ratón BAMBI-KO, se comenzó a analizar la naturaleza a nivel molecular de dicha alteración selectiva. Para ello, se comparó entre los linfocitos B WT y BAMBI-KO la expresión de diferentes moléculas de superficie relacionadas con su activación, supervivencia e interacción con los linfocitos T CD4⁺.

7.1. Los linfocitos B deficientes en BAMBI en estado basal presentan un aumento en la expresión de moléculas relacionadas con la activación y supervivencia.

Con el fin de caracterizar el estado de activación del linfocito B en estado basal, se realizó un estudio del nivel de expresión de una serie de moléculas implicadas en su activación e interacción con los linfocitos T CD4⁺ (IgM, IgD, MHC-II, CD80, CD86 y ICOSL) y en su supervivencia y capacidad de respuesta (BAFFR) (Mackay and Browning, 2002).

Como se observa en la Figura 14, los linfocitos B BAMBI-KO presentaron mayores niveles de expresión del BCR (IgM e IgD), ICOSL y BAFFR mientras que no se observaron cambios en las moléculas MHC-II, CD80 y CD86, indicando que ya a nivel basal los linfocitos B del ratón BAMBI-KO tienen un perfil de expresión de moléculas de superficie diferente a los del ratón WT.



Figura 14. Expresión incrementada a nivel basal de diferentes moléculas de superficie en los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO. Se analizó la expresión de IgM, IgD, MHC-II, CD80, CD86, ICOSL y BAFFR en células B220⁺ procedentes del bazo de ratones WT y BAMBI-KO mediante citometría de flujo. En los gráficos superiores se muestran dot plots representativos de las células B220⁺ donde se analizaron las diferentes moléculas de superficie. En los gráficos intermedios se muestran histogramas representativos de la expresión de las diferentes moléculas de superficie. En los gráficos intermedios se muestran histogramas representativos de la expresión de las diferentes moléculas de superficie en los linfocitos B de un ratón WT (color gris) y BAMBI-KO (color negro). En los histogramas se indica la intensidad media de fluorescencia (MFI). En la parte inferior se muestran los valores de MFI de estas moléculas en los linfocitos B de ratones individuales. Las barras representan el valor medio en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de *student* se indican como: *(p<0.05) y **(p<0.01).

7.2. Los linfocitos B deficientes en BAMBI exhiben una mayor inducción de moléculas implicadas en activación y supervivencia tras una estimulación *in vitro*.

Una vez establecido el perfil de expresión basal de moléculas de activación en los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO, se comparó la inducción de algunas de estas moléculas de superficie tras su activación *in vitro* a través del BCR (anti-IgM) y de CD40 (anti-CD40) durante 24 horas. De las moléculas cuya expresión a nivel basal era similar entre los linfocitos B de ambos orígenes (MHC-II, CD80 y CD86), la inducción de la expresión de CD86 fue significativamente superior en los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO, mientras que la inducción de la expresión de MHC-II y de CD80 fue similar en ambos tipos de células. Así mismo, se observó un mayor incremento en la expresión de BAFFR, pero no de ICOSL, en los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO tras su estimulación

con anti-IgM y anti-CD40 en comparación con la observada en las células B de los ratones WT (Figura 15).



Figura 15. Comparación de la inducción de la expresión de diferentes moléculas de superficie entre los linfocitos B de ratones WT y BAMBI-KO tras su estimulación *in vitro* con anti-IgM y anti-CD40. 0.5×10^6 linfocitos B purificados del bazo de estos ratones WT y BAMBI-KO se activaron *in vitro* con Acs anti-IgM (10 µg/ml) y anti-CD40 (10 µg/ml) durante 24 horas. La expresión de MHC-II, CD80, CD86, ICOSL y BAFFR en los linfocitos B activados (24 horas) y en reposo (0 horas) se analizó mediante citometría de flujo. En la parte izquierda se muestran histogramas representativos de la expresión de las diferentes moléculas de superficie en los linfocitos B de ratones WT (color gris) y BAMBI-KO (color negro) sin estimular (0 horas) y estimulados (24 horas). En los histogramas se indica la intensidad media de fluorescencia (MFI). En la parte de la derecha se muestran los valores de MFI relativizados con respecto a la expresión en los linfocitos B no estimulados y expresados como media±SD (n=3-6 experimentos) Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de *student* se indican como: *(p<0.05) y **(p<0.01).

Ha sido demostrado previamente que la estimulación a través del BCR tiene un efecto negativo sobre la expresión de ICOSL en linfocitos B (Liang et al., 2002). Por este motivo, se comparó la inducción de ICOSL en los linfocitos B de los ratones WT y BAMBI-KO tras estimulación con anti-CD40 solamente. En estas condiciones experimentales, se observó una fuerte inducción de la expresión de ICOSL en ambos tipos de linfocitos B aunque fue significativamente superior en los procedentes de los ratones BAMBI-KO (Figura 16).



Figura 16. Inducción de la expresión de ICOSL tras estimulación *in vitro* con anti-CD40. 0.5×10^6 linfocitos B WT y BAMBI-KO purificados se cultivaron en presencia de anti-CD40 (10 µg/ml) durante 24 horas. La expresión de ICOSL en los linfocitos B activados (24 horas) y en reposo (0 horas) se analizó mediante citometría de flujo. En la parte izquierda se muestran histogramas representativos de la expresión de ICOSL en los linfocitos B de ratones WT (color gris) y BAMBI-KO (color negro) sin estimular (0 horas) y estimulados (24 horas). En los histogramas se indica la intensidad media de fluorescencia (MFI). En la parte de la derecha se muestran los valores de MFI relativizados con respecto a la expresión en los linfocitos B no estimulados y expresados como media±SD (n=3-6 experimentos) Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de *student* se indican como: *(p<0.05) y **(p<0.01).

8. Aumento de la capacidad proliferativa en los linfocitos B BAMBI-KO.

Para profundizar en el estudio de las anomalías intrínsecas de los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO, se analizó su respuesta proliferativa *in vitro* en comparación con la de los procedentes de ratones WT. Para ello, linfocitos B WT y BAMBI-KO fueron estimulados con Acs anti-IgM y anti-CD40 o con LPS durante 4 días y la proliferación se evaluó mediante la incorporación de (metil-³H)-timidina (³H-TdR). Como se observa en la Figura 17, la proliferación de los linfocitos B BAMBI-KO fue significativamente superior tanto tras estimulación anti-IgM y anti-CD40 como con LPS.



Figura 17. Estudio de la proliferación *in vitro* **de linfocitos B procedentes de ratones WT y BAMBI-KO.** Se cultivaron 0.15×10^6 linfocitos B WT y BAMBI-KO purificados del bazo en presencia de Acs anti-IgM (10 µg/ml) y anti-CD40 (10 µg/ml), de LPS (10 µg/ml) y sin estímulos durante 4 días. La proliferación se valoró midiendo la incorporación de ³H-TdR. Los resultados de un experimento representativo sobre un total de 3 experimentos se muestran como media ± SD. Las diferencias estadísticas resultantes de un test t de *student* se indican como: *(p<0.05) y **(p<0.001).

En conjunto, estos estudios muestran que la deficiencia en BAMBI en los linfocitos B favorece su activación y proliferación, en correlación con el aumento en la funcionalidad de los mismos observado en los experimentos de inmunización.

9. Implicación selectiva de TGF β en el control de la respuesta inmune humoral TD en el ratón BAMBI-KO.

BAMBI es un regulador de la intensidad de señalización de TGF β , produciéndose un aumento en la misma en ausencia de BAMBI en linfocitos T CD4⁺ (Postigo et al., 2016). Sin embargo, tal y como se mencionó anteriormente, BAMBI también está implicado en la regulación de la señalización por BMPs, activinas y Wnt. Con el objetivo de estudiar la implicación de TGF β en los efectos observados en la respuesta inmune humoral del ratón BAMBI-KO, se analizaron estas respuestas en ratones WT y BAMBI-KO inmunizados con HSA-CFA tras el bloqueo selectivo de TGF β con un AcM anti-TGF β neutralizante. En los grupos controles se administró un AcM IgG1 anti-TNP (IgG1-C). La expansión de las células T_{FH} y B CG, y el incremento en la expresión de ICOSL en los linfocitos B y en la producción de Acs IgG anti-HSA observado en los ratones BAMBI-KO tratados con el IgG1-C desapareció tras la neutralización de TGF β (Figura 18). Estos resultados ponen en evidencia la implicación selectiva de TGF β en la alteración de la respuesta inmune humoral observada en el ratón BAMBI-KO.



Figura 18. Efecto de la neutralización de TGFβ sobre la respuesta inmune humoral en los ratones BAMBI-KO. Los ratones WT y BAMBI-KO (KO), tratados desde un mes antes de la inmunización hasta el día del sacrificio con 1 mg/semana de AcM IgG1 anti-TNP (IgG1-C) o de AcM IgG1 anti-TGFβ (anti-TGFβ), fueron inmunizados en la almohadilla plantar con 100 µg de HSA emulsionada en CFA (50 µg en cada pata). **A)** Porcentaje de células T_{FH} (CXCR5⁺PD-1⁺) sobre células T CD4⁺ y de células B CG (PNA⁺FAS⁺) sobre células B220⁺ en los ganglios poplíteos de ratones individuales 7 y 14 días después de la inmunización, respectivamente, analizados mediante citometría de flujo. **B)** Expresión de ICOSL (MFI) en células B220⁺ de ratones individuales 14 días después de la inmunización analizada mediante citometría de flujo. **C)** Niveles de Acs IgG anti-HSA en el suero de estos ratones antes y 14 días después de la inmunizados mediante ELISA y expresados en Unidades de Titulación. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas se indican como: *(p<0.05), **(p<0.01) y ***(p<0.001).

10. La señalización de TGF β a través de TAK1 potencia la producción de Acs en el ratón BAMBI-KO.

Como se describe en la introducción TGF β ejerce sus efectos a través de una ruta canónica (vía Smads) y de rutas no canónicas. Recientemente se ha descrito qu los ratones deficientes en TAK1, una proteína implicada en la ruta no canónica de TGF β (Shim et al., 2005), presentan defectos en la respuesta inmune humoral y en la proliferación *in vitro* de los linfocitos B (Shinohara and Kurosaki, 2016). Por ello, se analizó la posible implicación de TAK1 en la alteración de la respuesta inmune humoral encontrada en los ratones BAMBI-KO. Los ratones WT y BAMBI-KO inmunizados con HSA-CFA fueron tratados desde

2 semanas antes de la inmunización con un inhibidor farmacológico selectivo de TAK1, el 5Z-7-Oxozeanol (5ZOX). Como se observa en la Figura 19, el tratamiento con 5ZOX redujo el nivel de Acs IgG anti-HSA en los ratones BAMBI-KO, eliminando las diferencias observadas entre los ratones WT y BAMBI-KO controles.



IgG anti-HSA (U/ml x 10⁶)

Figura 19. Efecto de la inhibición de TAK1 sobre la producción de Acs frente a HSA. Los ratones WT y BAMBI-KO (KO) fueron inmunizados en la almohadilla plantar con 100 μg de HSA emulsionada en CFA (50 μg en cada pata), y tratados desde 14 días antes de la inmunización hasta el día del sacrificio con 30 μg/semana de 5ZOX (5% DMSO) o solo con DMSO al 5% (Vehículo). En la gráfica se muestran los niveles de Acs IgG anti-HSA en el suero de estos ratones antes y 14 días después de la inmunización analizados mediante ELISA y expresados en Unidades de Titulación. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. Las diferencias estadísticas resultantes de un test de *Mann Whitney* se indican como: *(p<0.05).

Estos resultados sugieren que los efectos producidos por la deficiencia en BAMBI sobre la respuesta humoral están mediados por la señalización a través de la ruta no canónica de TGFβ que señaliza a través de TAK1.

11. Los ratones deficientes en BAMBI no desarrollan lesiones autoinmunes mediadas por autoanticuerpos (autoAcs).

Por último, se analizó si la potenciación de las respuestas inmunes humorales observadas en los ratones BAMBI-KO en protocolo de inmunización se observaba también en respuestas autorreactivas, promoviendo el desarrollo de patologías autoinmunes de base humoral. Para ello, se analizó la presencia de autoAcs IgG e IgA anti-ssDNA en el suero de ratones WT y BAMBI-KO de ambos sexos de 12 meses de edad y el desarrollo de lesiones glomerulares características del Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Nuestros resultados muestran la ausencia de dichos autoAcs y de lesiones glomerulares en ambos tipos de ratones (Figura 20).



Figura 20. Estudio de la aparición de autoinmunidad mediada por autoAcs. A) Niveles de autoAcs IgG e IgA anti-ssDNA en el suero de ratones WT y BAMBI-KO (KO) de ambos sexos a los 12 meses de edad analizados mediante ELISA y expresados en Unidades de Titulación. Las barras representan los valores medios en cada grupo experimental. B) Imágenes histológicas representativas de los glomérulos renales (20x) de ratones WT (paneles izquierdos) y BAMBI-KO (paneles derechos) hembras (paneles superiores) y machos (paneles inferiores) a los 12 meses de edad tras tinción con hematoxilina y eosina. Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante el test de Mann-Whitney.

V. Discusión

V. DISCUSIÓN

Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que BAMBI desempeña un papel importante en la regulación de la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ hacia los subtipos funcionales Treg y Th17. Esta actividad la desempeña regulando directamente la intensidad de la señalización por TGF β e indirectamente la de la IL-2. En concordancia con estos hallazgos, los ratones deficientes en BAMBI presentaban una protección contra el desarrollo de CIA por un mecanismo dependiente de células Tregs (Postigo et al., 2016). En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos extendido nuestro análisis del papel de BAMBI en la inmunidad adaptativa, estudiando su posible participación en el control de la respuesta inmune humoral. Se muestra que la deficiencia en este pseudorreceptor potencia las respuestas humorales TDs y Tls. Estudios de transferencia celular y en doblequimeras de médula ósea indican que este efecto es secundario a la presencia de un defecto intrínseco en los linfocitos B caracterizado por un aumento en la expresión de distintas moléculas de activación, proliferación e interacción T-B. Además, se muestra la implicación selectiva de TGF β y de las rutas de transducción no canónicas que señalizan a través de TAK1 en estas alteraciones, debido a la reversión de las mismas tras su inhibición con un AcM anti-TGF β o un inhibidor selectivo de TAK1 (el 5ZOX), respectivamente. Por último, nuestro estudio muestra que la potenciación de la inmunidad humoral en los ratones BAMBI-KO no se asocia con la producción de autoAcs ni con la aparición de lesiones glomerulares tipo LES.

Utilizando un AcM anti-BAMBI desarrollado en nuestro laboratorio (clon B101.37), recientemente se caracterizó la expresión de BAMBI en los linfocitos T CD4⁺. Estos estudios demostraron que la expresión de BAMBI se inducía en dichas células tras la estimulación *in vitro* con Acs anti-CD3 y anti-CD28 y que TGF β potenciaba su expresión en células estimuladas, pero no en linfocitos *naïve*, tanto a nivel de proteína, analizada por citometría de flujo (Postigo et al., 2016), como en expresión génica, analizada mediante qPCR (Postigo, 2013, Tesis Doctoral). En este trabajo no se ha podido aún detectar la expresión de la proteína BAMBI en los linfocitos B mediante citometría de flujo o Western Blot (resultados no mostrados), aunque sí se ha detectado su expresión génica mediante qPCR. Al comparar los patrones de expresión de BAMBI entre los linfocitos T CD4⁺ y B a nivel basal y tras su activación se observan una serie de concordancias y discrepancias destacables. En primer lugar, nuestro estudio muestra la expresión de BAMBI a niveles

bajos en los linfocitos B naïve que no se observa en las células T CD4⁺ no estimuladas (tanto a nivel transcripcional como de proteína) y esto puede estar en relación con los defectos intrínsecos de las células B observados en los ratones BAMBI-KO incluso en condiciones homeostáticas (ver posteriormente). Al igual que en las células T CD4⁺, BAMBI se induce con una cinética similar (a las 48 hrs post estimulación) en los linfocitos B tras la activación, pero a diferencia de los primeros, TGF β es un regulador negativo de dicha expresión en las células B activadas. En este sentido, cabe destacar que TGF β puede tener diferentes efectos sobre la expresión de BAMBI en función del contexto celular que se estudie, induciendo su expresión en linfocitos T CD4⁺ y en células de carcinoma hepático (Sekiya et al., 2004; Postigo et al., 2016), o inhibiéndola en odontoblastos (Gonzales et al., 2010). Las razones por las que no hemos sido capaces de detectar BAMBI a nivel proteico en los linfocitos B, pero si en los T CD4⁺, son por el momento desconocidas. Una posibilidad es que la expresión de este pseudoreceptor en la membrana de las células B es mucho más transitoria que en las células T CD4 $^{\scriptscriptstyle +}$, restringiéndose a un periodo muy concreto y limitado tras su activación. Obviamente, para clarificar este aspecto importante se requieren experimentos adicionales, analizando la inducción de la proteína BAMBI en estas células por citometría de flujo y/o Western Blot a múltiples periodos de tiempo en torno a las 48 horas tras su estimulación.

A diferencia de lo observado en el timo durante el desarrollo de los linfocitos T (Postigo, 2013, Tesis doctoral), la deficiencia en BAMBI no afecta al desarrollo de los linfocitos B en la médula ósea. Aunque es un aspecto que queda por esclarecer, estas diferencias pueden estar en relación con la expresión diferencial de BAMBI en los precursores T y B durante su desarrollo. Sin embargo, sí se observa un aumento en el número de linfocitos B de las subpoblaciones T2 y B memoria del bazo y de las células B-1 del bazo y cavidad peritoneal. Como se describe en la introducción, las células B T2 representan un estadio inmaduro en el bazo proveniente de las células B T1 y precursor tanto de las células B ZM como de las células B foliculares (Pillai and Cariappa, 2009). La capacidad de supervivencia durante la transición desde el estadio T1 al T2 está fuertemente regulada a través de las señales recibidas por parte del BCR y de BAFFR (Castro et al., 2009), los cuales como se comentará posteriormente tienen aumentada su expresión en los linfocitos B deficientes en BAMBI, pudiendo ser la causa del aumento en esta subpoblación. La inducción de BAMBI tras estimulación en los linfocitos B y la

potenciación de las respuestas inmunes humorales TDs observada en los ratones BAMBI-KO, podría explicar el aumento observado en las células B memoria en estos animales.

Un hallazgo interesante en los ratones BAMBI-KO es el aumento en las células B-1a y B-1b no convencionales de bazo y cavidad peritoneal. Este aumento es en cierta forma un hallazgo inesperado ya que por un lado, las alteraciones en las respuestas inmunes humorales observadas en los ratones BAMBI-KO son dependientes de la actividad de TGF β y por otro lado, se ha descrito un incremento en las subpoblaciones B-1a y B-1b en los ratones deficientes en TGF β RII, que tienen inactivada la señalización por TGF β (Cazac and Roes, 2000). Sin embargo, también se ha descrito una disminución en las células B-1 en los ratones deficientes en TAK1 (Shinohara and Kurosaki, 2016) y un aumento en los deficientes en Smad2 (Klein et al., 2006), indicando que el papel de TGF β en la homeostasis de esta subpoblación de linfocitos B, y por extensión sobre las células B foliculares (ver posteriormente), es extraordinariamente complejo y está en gran medida condicionado por la ruta de transducción Smad-dependiente o independiente que se active preferentemente.

En correlación con el mayor número de células B-1b los ratones BAMBI-KO respondieron con mayor intensidad frente a Ags TIs. De igual modo, las respuestas humorales frente a Ags TDs, tanto las de alta como las de baja afinidad, se encuentran también potenciadas en estos animales mutantes. Estos incrementos fueron más notables en las hembras que en los machos, probablemente relacionado con la demostrada importancia que el género sexual tiene en el control de las respuestas humorales y en la susceptibilidad a desarrollar procesos autoinmunes (Ruggieri et al., 2016).

La potenciación de la respuesta humoral TD en ausencia de BAMBI va acompañada de un aumento en las poblaciones celulares implicadas en el desarrollo de la misma (células T_{FH}, células B CG y CPs secretoras de Acs) y de la disminución de una población con capacidad supresora sobre este tipo de respuesta, las células T_{FR}. Este hecho plantea varias posibilidades con respecto al nivel celular en el que la deficiencia en BAMBI puede estar actuando. Las DCs son las CPAs encargadas de activar al linfocito T CD4⁺ *naïve* y en el caso de las respuestas humorales TD, promover los primeros pasos para su diferenciación funcional en células T_{FH} (Qi, 2016). Posteriormente, las células pre-T_{FH} establecen contactos con los linfocitos B antígeno-específicos en la frontera entre las regiones T y los folículos. En estas interacciones, los linfocitos B presentan el Ag que desencadenó la respuesta a los linfocitos pre-T_{FH} y suministran las señales necesarias para completar su diferenciación a célula T_{FH}, mientras que a su vez, estas células T aportan las señales co-estimuladoras necesarias para la activación de las células B (Goenka et al., 2011). Así pues, la deficiencia en BAMBI puede afectar las respuestas humorales TDs actuando sobre una o varias de estas poblaciones celulares. Además, se ha descrito un papel para TGFeta en el control de la diferenciación y/o funcionalidad de todas ellas, aunque no siempre acorde al fenotipo observado en los ratones BAMBI-KO. En este sentido, se ha observado que por un lado la deficiencia selectiva de Smad7, que potencia la señalización por TGF β , en DCs genera células con potencial tolerogénico a través de la producción de IDO (Lukas et al., 2017), mientras que la de TAK1 a este mismo nivel suprime las respuestas inmunes humorales (Pan et al., 2016). En humanos se ha descrito que tanto TGF β como activina A potencian la diferenciación de las células T_{FH} (Schmitt et al., 2014; Locci et al., 2016), pero en ratones, TGF β tiene un papel inhibidor sobre esta subpoblación (McCarron and Marie, 2014). Además, la IL-2 inhibe la diferenciación T_{FH} de las células T CD4 $^{+}$ (Ballesteros-Tato et al., 2012), lo que sugiere que a priori la deficiencia en BAMBI, que potencia la señalización por IL-2 en las células T CD4⁺ (Postigo et al., 2016), debería ejercer un efecto negativo sobre dicha diferenciación. Por último, múltiples estudios han puesto en evidencia que tanto los TGF β como los BMPs y las activinas tienen funciones inhibidoras sobre la funcionalidad de los linfocitos B. Sin embargo, los ratones deficientes en Twisted Gastrulation (un inhibidor de BMPs) en los linfocitos B presentan un fenotipo parecido al del ratón BAMBI-KO, con un aumento en la proliferación y activación de los linfocitos B y un incremento de las respuestas TIs (Tsalavos et al., 2011). Así mismo, y tal y como se ha comentado anteriormente, los ratones deficientes en TAK1 en linfocitos B presentan un fenotipo totalmente antagónico al de nuestros ratones BAMBI-KO (Shinohara and Kurosaki, 2016).

Para caracterizar en detalle las bases celulares de la potenciación de la respuesta inmune humoral en los ratones BAMBI-KO se realizaron en primer lugar experimentos de transferencia adoptiva de células T CD4⁺ deficientes o no en BAMBI a ratones CD3-KO cuyos linfocitos B eran también deficientes o no en BAMBI. Estos experimentos mostraron de forma inequívoca que BAMBI no interviene de forma directa en la diferenciación de los linfocitos T_{FH}. Este hallazgo justifica el aumento de las células T_{FH} en el ratón BAMBI-KO a pesar del efecto negativo que ejercen TGF β e IL-2 sobre la diferenciación de esta subpoblación (Ballesteros-Tato et al., 2012; McCarron and Marie, 2014). Sin embargo, estos experimentos no permiten discernir entre la posibilidad de que la deficiencia en BAMBI afecte la funcionalidad de las DCs, por ejemplo potenciando su actividad presentadora de antígeno, o que el efecto se restrinja a los linfocitos B. Además, los resultados de los experimentos anteriores pueden verse en parte influidos por el entorno en donde los linfocitos T CD4⁺ transferidos van a actuar: un entorno WT u otro con una deficiencia generalizada en BAMBI en donde se pueden producir interferencias por múltiples poblaciones celulares inmunes y no inmunes. Para ello, se diseñaron experimentos con ratones DQ mixtas de médula ósea, en donde en un entorno uniforme y controlado van a co-existir todas las poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune humoral procedentes de ratones WT y BAMBI-KO y en donde utilizando marcadores polimórficos, podremos monitorizar el origen y naturaleza de las células que se expanden y el de las células productoras de Acs tras inmunización con un Ag TD.

Los estudios en los ratones DQ mixtas nos permite por un lado confirmar que BAMBI no afecta directamente la diferenciación funcional de los linfocitos T_{FH} y por otro, afirmar que la deficiencia en BAMBI en las DCs no es el único factor responsable de las alteraciones en la respuesta inmune humoral en los ratones mutantes, aunque no se puede descartar un papel complementario de las mismas. Sin embargo, utilizando mezclas de DCs y células T CD4⁺ *naïve* procedentes de ratones WT y BAMBI-KO en condiciones polarizantes a linfocitos Tregs, previamente hemos demostrado que la deficiencia en BAMBI en las DCs no afectaba la capacidad incrementada de las células T CD4⁺ de los ratones BAMBI-KO para diferenciarse en linfocitos Tregs (Postigo et al., 2016), lo que nos sugiere que la deficiencia en BAMBI en esta población de CPAs no está afectando a su funcionalidad. Por su parte, los estudios en los ratones DQ mixtas, junto con los de transferencia adoptiva comentados anteriormente, permiten concluir que la deficiencia en BAMBI genera alteraciones intrínsecas en los linfocitos B que son las principales responsables del fenotipo humoral observado en los ratones mutantes.

Varios grupos han demostrado el papel que juegan los linfocitos T_{FR} en la biología de las células T_{FH} y en el control de las respuestas inmunes humorales (Chung et al., 2011; Linterman et al., 2011; Wollenberg et al., 2011). Como el porcentaje de T_{FR} tras la inmunización con un Ag TD está disminuido en los ratones BAMBI-KO con respecto a los WT, una posibilidad adicional es que estas células participan en mayor o menor medida en las alteraciones humorales descritas en estos animales. Sin embargo, aunque en los

experimentos de DQ mixtas no se analizaron estas células, postulamos que no van a desempeñar un papel relevante en dichas anomalías, ya que la inducción deficiente de linfocitos T_{FR} procedentes de los ratones BAMBI-KO se vería compensada por la generación normal de células procedentes de los ratones WT que a su vez, serían capaces de suprimir por igual a los linfocitos T_{FH} y B CG de ambos orígenes. Puede resultar llamativa la reducción observada en las células T_{FR} en el ratón BAMBI-KO, debido al aumento descrito en el mismo de las células Tregs convencionales tras inmunización (Postigo et al., 2016). Sin embargo, las células T_{FR} provienen de las células tTregs de origen tímico (Linterman et al., 2011), las cuales no se encuentran aumentadas en el ratón BAMBI-KO tras inmunización (Postigo et al., 2016). Además hay que resaltar que el porcentaje de células T_{FR} que mostramos en la sección de resultados se ha calculado con respecto a la población de células T_{FH} , las cuales se encuentran aumentadas en el ratón BAMBI-KO. De hecho no existen diferencias entre los ratones WT y BAMBI-KO en la frecuencia de las células T_{FR} sobre las células T CD4⁺ totales (datos no mostrados).

Una vez definidas las bases celulares responsables del incremento en la intensidad de las respuestas inmune humorales en el ratón BAMBI-KO, el siguiente objetivo del presente estudio ha sido caracterizar a nivel molecular el/los defectos intrínsecos en los linfocitos B de los ratones mutantes. Nuestros resultados muestran que estas células presentan múltiples defectos con claras repercusiones funcionales. En este sentido, los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO expresan, incluso en estado basal, niveles más elevados de una serie de receptores de membrana implicados en su activación, supervivencia e interacción con los linfocitos T CD4⁺ que los de los ratones WT. Uno de estos receptores cuya expresión se encuentra incrementada en las células B naïve de los ratones mutantes es el BCR, tanto la IgM como la IgD de membrana, que mediante la unión al Ag promueven señales de activación y proliferación (Sieckmann, 1980). Así mismo, las células B *naïve* de los ratones BAMBI-KO expresan niveles elevados de ICOSL y de BAFFR que desempeñan un papel relevante en la interacción T-B y en la diferenciación de las células T_{FH} y B CG (Dong et al., 2001), así como en la supervivencia de las células B (Rowland et al., 2010), respectivamente. BAFFR también está implicado en la potenciación de la respuesta humoral, ya que la sobreexpresión de su ligando está relacionada con un aumento del número de CPs y de la producción de Acs frente a Ags TDs y TIs (Do et al., 2000). Cabe destacar que en las células B de los ratones BAMBI-KO la expresión incrementada de ICOSL podría estar en relación con el aumento en la de BAFFR, ya que se ha visto que este activa la ruta no convencional de NFkB a través de la fosforilación de NIK, dando lugar a la expresión de ICOSL en las células B y a la generación de células T_{FH} (Hu et al., 2011) mientras que a su vez la de BAFFR podría estar relacionada con el incremento en la señalización a través del BCR (Wensveen et al., 2016). A diferencia de las moléculas mencionadas anteriormente, la expresión de MHC-II, CD80 y CD86 no está alterada en las células B *naïve* de los ratones BAMBI-KO. Sin embargo, tras la estimulación *in vitro* a través del BCR y de CD40, los linfocitos B deficientes en BAMBI mostraron una mayor inducción en la expresión de CD86 que los linfocitos de los ratones WT. CD86 es una molécula coestimuladora importante en la interacción entre las células B y T CD4 $^{\scriptscriptstyle +}$ que favorece la diferenciación hacia células T_{FH} mediante la interacción con CD28 (Linterman et al., 2014). También se ha visto que CD86 tiene un efecto directo sobre las células B incrementando la producción de IgGs (Rau et al., 2009). La estimulación con anti-IgM y anti-CD40 también produjo un incremento en la inducción de la expresión de BAFFR en los linfocitos B deficientes en BAMBI, pero no de ICOSL, que de nuevo fue superior en los linfocitos B deficientes en BAMBI. La ausencia de inducción en la expresión de ICOSL en los linfocitos B estimulados con Acs anti-IgM y anti-CD40 puede estar en relación con el efecto negativo que la señalización a través del BCR ejerce sobre su expresión (Liang et al., 2002). En cambio ante una estimulación solamente con anti-CD40 sí se produce un aumento en la expresión de ICOSL, siendo más pronunciado en los linfocitos B procedentes del ratón BAMBI-KO. En resumen, tanto en condiciones basales como tras la activación, los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO tienen sobre-activado un programa molecular, organizado en un complejo circuito de interrelaciones moleculares encaminado a potenciar la funcionalidad de estas células.

Probablemente en relación con las anomalías descritas anteriormente, los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO presentan un incremento en su capacidad proliferativa *in vitro* tras la estimulación con Acs anti-IgM y anti-CD40 o con LPS. De nuevo, nuestros resultados contradicen los efectos que se han descrito en múltiples estudios en donde se muestra claramente el efecto negativo de TGF β sobre la proliferación de los linfocitos B (Kamesaki et al., 1998). De acuerdo con estas observaciones, cabe destacar que la adición de TGF β recombinante a los cultivos de estimulación mencionados, lejos de incrementar la proliferación de los linfocitos B deficientes en BAMBI, tiene un efecto inhibitorio de la misma similar al observado en las células B de los controles WT (resultados no mostrados). Esto abre la posibilidad de que los efectos sobre la inmunidad

humoral descritos en ausencia de BAMBI no sean dependientes de TGF β sino de otros miembros de la superfamilia de TGF β que también son regulados por BAMBI (ej: BMPs y/o Activinas) (Onichtchouk et al., 1999). En este sentido, las células B deficientes en el inhibidor extracelular de BMPs, Twisted Gastrulation, hiperproliferan in vitro tras estímulos a través del BCR y TLRs (Tsalavos et al., 2011). Para valorar esta posibilidad, se estudiaron los efectos de la inhibición selectiva de TGF β *in vivo*, utilizando un AcM neutralizante de TGF β 1, 2 y 3, en la respuesta humoral frente a Ag TD en los ratones BAMBI-KO. Los resultados obtenidos indican que las alteraciones en la inmunidad humoral observadas en los ratones mutantes son en gran medida dependientes de TGF β , ya que la inhibición prolongada y mantenida de estas citocinas, desde 1 mes antes de la inmunización con el Ag hasta el final del experimento, restaura la respuesta humoral TD, valorada por el incremento en la frecuencia de células T_{FH} y células B CG así como en la producción de Acs de tipo IgG, a los niveles observados en los ratones WT tratados de la misma forma. Así mismo, la expresión de ICOSL en los linfocitos B de los ratones BAMBI-KO se reduce a los niveles observados en los animales WT tras el tratamiento con el AcM anti-TGF β . Sin embargo, la administración del AcM anti-TGF β desde el momento de la inmunización hasta el final del experimento no produjo ningún efecto en la respuesta humoral de los ratones BAMBI-KO (datos no mostrados), sugiriendo que el efecto de la deficiencia en BAMBI sobre las células B aparece antes del estadio de célula B madura. Así, estas células podrían completar su maduración poseyendo un programa de hiperactivación relativamente estable que solamente sería revertido tras un periodo prolongado de inhibición de TGF β .

Para conciliar las sólidas evidencias existentes sobre los efectos de TGF β en la inmunidad humoral (Kamesaki et al., 1998; Cazac and Roes, 2000; Roes et al., 2003) con los resultados observados en el presente trabajo de Tesis Doctoral planteamos la siguiente hipótesis. El punto de partida es obviamente asumir como innegable que en una célula B normal y en condiciones fisiológicas los TGF β van a modular negativamente la actividad de estos linfocitos. Para ello, estas citocinas van a activar las distintas rutas de transducción de señal Smad-dependientes e independientes aunque de forma asimétrica; la activación relativa de las rutas Smad-dependientes, que ejercerían un papel mayoritariamente inhibidor sobre la funcionalidad de los linfocitos B, prevalecerían sobre las rutas Smadindepedientes, que son rutas que potencian la actividad de los mismos. BAMBI interviene

en la regulación de este proceso al inhibir también asimétricamente ambas rutas; de acuerdo con nuestra hipótesis en los linfocitos B normales, BAMBI sería capaz de inhibir de forma más intensa las rutas de transducción Smad-independientes. Planteamos que un nodo clave en la transducción Smad-independiente mediada por TGF β en los linfocitos B es la molécula TAK1, la cual participa en la activación de las MAPK JNK y p38 y de NFKB (Arsura et al., 2003; Shim et al., 2005). De hecho, y tal y como se ha comentado anteriormente en repetidas ocasiones, la deficiencia selectiva de TAK1 en los linfocitos B provoca exactamente el fenotipo humoral contrapuesto al observado en los ratones BAMBI-KO (Shinohara and Kurosaki, 2016). En este punto cabe así mismo destacar que además de por TGF β , TAK1 se activa a través de TLRs y del BCR (Szili et al., 2014), cuya expresión se encuentra incrementada en los ratones BAMBI-KO. En ausencia de BAMBI, y en concentraciones fisiológicas de estos factores de crecimiento, la señalización por los TGF β en los linfocitos B se va por lo tanto a modificar incrementándose más el brazo Smad-independiente que el Smad-dependiente. Si en el contexto de una estimulación antigénica la señalización incrementada a través del BCR y/o TLRs potencia aún más la activación de TAK1, la consecuencia final es una hiper-activación TGF β -dependiente de los linfocitos B y una potenciación de las respuestas humorales TDs y TIs (Figura 1). Este mecanismo podría no ser exclusivo de los linfocitos B, ya que se ha descrito que en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello la respuesta anti-proliferativa de TGF^β está atenuada en asociación con una activación TAK1-dependiente de NFκB, que a su vez promueve la inducción de Smad7, un inhibidor de las rutas canónicas de transducción de TGF β (Freudlsperger et al., 2013).



Figura 1. Modelo hipotético de la influencia de BAMBI sobre la señalización por TGF β y sus consecuencias sobre la activación de los linfocitos B. En condiciones fisiológicas (presencia de BAMBI en la membrana celular), los efectos inhibitorios Smad-dependientes de TGF β predominan sobre los efectos activadores Smad-independientes convergentes en TAK1. BAMBI participa en este estado de inactivación celular al inhibir de manera más intensa las rutas no canónicas que la ruta canónica. En cambio en ausencia de BAMBI, la señalización por TGF β se encuentra potenciada principalmente a través de las rutas no canónicas. Además, la mayor expresión de BCRs en ausencia de BAMBI, conduce a una activación de TAK1 aún mayor, dando lugar al predominio de los efectos activadores dependientes de esta ruta.

Para comenzar a valorar la validez de nuestra hipótesis se compararon las respuestas humorales TDs entre ratones WT y BAMBI-KO tras la inhibición selectiva y mantenida en el tiempo de TAK1 con 5ZOX, un inhibidor selectivo de esta kinasa (Wu et al., 2013; Zhang et al., 2015). Este tratamiento fue capaz de revertir el aumento en la producción de Acs observada en el ratón BAMBI-KO, lo que sugiere que los efectos producidos por la deficiencia en BAMBI en las células B son mediados por un aumento de la activación de TAK1. Sin embargo, para confirmar nuestra hipótesis son necesarios experimentos en donde se compare en detalle la bioquímica de la transducción por TGF β entre linfocitos B de ratones WT y BAMBI-KO tras activación, analizando la activación de Smad2 y Smad3, como marcadores de la ruta de transducción canónica, y de p38, JNK, TAK1 y NFkB, como marcadores de las rutas Smad-independientes y activadoras. Estos experimentos se encuentran en fase de realización.

Un hallazgo relevante de este trabajo es que la deficiencia en BAMBI incrementa las respuestas inmunes humorales a nivel de las mucosas. El aumento en la producción de IgA Ag-específica en la mucosa nasal del ratón BAMBI-KO va en correlación con la implicación de TGF β en la inmunidad en las mucosas favoreciendo el cambio de isotipo hacia IgA (Borsutzky et al., 2004). Este hallazgo puede ser de gran interés para el diseño de nuevas vacunas. En este sentido, la vía intranasal en vacunación posee un interés clínico evidente en países del tercer mundo al facilitar enormemente la administración de las mismas y al reducir el coste en el material necesario para ello (por ejemplo, no se requieren ni jeringuillas ni agujas). Además, al no ser necesaria una inyección, se reduce el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas (Lycke, 2012). A parte del efecto en las respuestas inmunes en mucosas, la deficiencia en BAMBI potencia respuestas inmunes humorales TD en ausencia de adyuvantes. Farmacológicamente, un adyuvante es una sustancia que aumenta los efectos de un medicamento: en el caso de las vacunas la inmunogenicidad de un Ag. Se han utilizado como adyuvantes diversas clases de compuestos, entre los que se encuentran: productos microbianos, sales minerales, emulsiones, micropartículas y liposomas (Fraser et al., 2007). Sin embargo, la toxicidad de la mayoría de ellos desaconseja su uso en seres humanos. Recientemente, se ha descrito una nueva entidad clínica denominada ASIA caracterizada por aparición de manifestaciones de tipo autoinmune secundarias al uso de adyuvantes (Guimaraes et al., 2015). Además, existe una corriente social contraria a la vacunación y que, entre otros argumentos, postula que los adyuvantes utilizados en las vacunas son los responsables de algunos de los efectos secundarios más graves de las mismas. Remarcablemente, la potenciación de las respuestas inmunes humorales en los ratones BAMBI-KO se producen en ausencia de alteraciones autoinmunes y tras un seguimiento largo de estos animales, no se detectó la presencia de autoAcs circulantes ni se apreciaron lesiones glomerulares características del LES.

En conclusión, en el presente trabajo de Tesis demostramos que BAMBI controla la intensidad de la respuesta humoral a través de la regulación de la activación de los linfocitos B. Esta regulación de la respuesta humoral es dependiente de TGF β , y más concretamente, de las rutas no canónicas de TGF β que señalizan a través de TAK1. Los resultados mostrados en este trabajo señalan a BAMBI como una posible diana en el desarrollo de vacunas, debido al efecto adyuvante en ausencia de autoinmunidad observado en los ratones deficientes en BAMBI.
VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. Los linfocitos B en estado basal expresan niveles muy bajos de BAMBI. Dicha expresión aumenta considerablemente tras su estimulación *in vitro* a través del BCR y de CD40. A diferencia de las células T CD4⁺, TGF β regula negativamente la expresión de BAMBI en los linfocitos B activados.

2. La ausencia de BAMBI en los ratones BAMBI-KO no afecta el desarrollo de los linfocitos
B en la médula ósea. Sin embargo, promueve un incremento en las poblaciones T2 y B
memoria en el bazo y de las células B-1a y B-1b del bazo y cavidad peritoneal.

3. La deficiencia en BAMBI potencia la producción de Acs frente a distintos tipos de Ags TIs y TDs. El aumento en la respuesta humoral TD es observado tanto a nivel sistémico como en las mucosas, en Acs de alta y baja afinidad y en presencia o ausencia de adyuvantes.

4. En correlación con el aumento en la respuesta inmune humoral frente a Ags TDs, los ratones deficientes en BAMBI presentan una mayor frecuencia de las poblaciones celulares implicadas en su desarrollo (células T_{FH}, B CG y CPs secretoras de Acs), así como una disminución en aquellas que la inhiben (células T_{FR}).

5. La potenciación de la respuesta humoral del ratón BAMBI-KO es debida al efecto selectivo de la deficiencia en BAMBI en los linfocitos B.

6. Los linfocitos B deficientes en BAMBI tienen una expresión basal aumentada de moléculas de superficie relacionadas con su activación, supervivencia e interacción T-B, así como una mayor inducción de la expresión de las mismas tras una estimulación *in vitro*.

7. Los linfocitos B deficientes en BAMBI presentan una respuesta proliferativa *in vitro* aumentada.

8. BAMBI modula la intensidad de las respuestas inmunes humorales TDs regulando selectivamente la señalización por TGF β , a través de las rutas de transducción no canónicas mediadas por TAK1.

9. La deficiencia en BAMBI no desencadena la producción de autoAcs ni la aparición de lesiones glomerulares asociadas a patologías autoinmunes de base humoral.

VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj, 1998. "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." Nature 392(6671): 86-89.

Aleman-Muench, G. R. and G. Soldevila, 2012. "When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity." Immunol Cell Biol 90(2): 137-148.

Alugupalli, K. R., J. M. Leong, R. T. Woodland, M. Muramatsu, T. Honjo and R. M. Gerstein, 2004. **"B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity."** Immunity 21(3): 379-390.

Allen, C. D., K. M. Ansel, C. Low, R. Lesley, H. Tamamura, N. Fujii and J. G. Cyster, 2004. "Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5." Nat Immunol 5(9): 943-952.

Allen, C. D., T. Okada, H. L. Tang and J. G. Cyster, 2007. "Imaging of germinal center selection events during affinity maturation." Science 315(5811): 528-531.

Allman, D. and S. Pillai, 2008. "Peripheral B cell subsets." Curr Opin Immunol 20(2): 149-157.

Amu, S., S. P. Saunders, M. Kronenberg, N. E. Mangan, A. Atzberger and P. G. Fallon, 2010. "Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model." J Allergy Clin Immunol 125(5): 1114-1124 e1118.

Anikeeva, N. and Y. Sykulev, 2011. "Mechanisms controlling granule-mediated cytolytic activity of cytotoxic T lymphocytes." Immunol Res 51(2-3): 183-194.

Apostolou, I. and H. von Boehmer, 2004. "In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells." J Exp Med 199(10): 1401-1408.

Aranami, T. and T. Yamamura, 2008. "Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS)." Allergol Int 57(2): 115-120.

Arsura, M., G. R. Panta, J. D. Bilyeu, L. G. Cavin, M. A. Sovak, A. A. Oliver, V. Factor, R. Heuchel, F. Mercurio, S. S. Thorgeirsson and G. E. Sonenshein, 2003. "Transient activation of NF-kappaB through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF-beta1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: implications in liver tumor formation." Oncogene 22(3): 412-425.

Attanavanich, K. and J. F. Kearney, 2004. "Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells." J Immunol 172(2): 803-811.

Ballesteros-Tato, A., B. Leon, B. A. Graf, A. Moquin, P. S. Adams, F. E. Lund and T. D. Randall, 2012. "Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation." Immunity 36(5): 847-856.

Bannard, O., R. M. Horton, C. D. Allen, J. An, T. Nagasawa and J. G. Cyster, 2013. "Germinal center centroblasts transition to a centrocyte phenotype according to a timed program and depend on the dark zone for effective selection." Immunity 39(5): 912-924.

Bannard, O., S. J. McGowan, J. Ersching, S. Ishido, G. D. Victora, J. S. Shin and J. G. Cyster, 2016. "Ubiquitin-mediated fluctuations in MHC class II facilitate efficient germinal center B cell responses." J Exp Med 213(6): 993-1009.

Barrett, N. A. and K. F. Austen, 2009. "Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation." Immunity 31(3): 425-437.

Baumgarth, N., 2011. "The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions." Nat Rev Immunol 11(1): 34-46.

Baumjohann, D., T. Okada and K. M. Ansel, 2011. "Cutting Edge: Distinct waves of BCL6 expression during T follicular helper cell development." J Immunol 187(5): 2089-2092.

Benschop, R. J., K. Aviszus, X. Zhang, T. Manser, J. C. Cambier and L. J. Wysocki, 2001. "Activation and anergy in bone marrow B cells of a novel immunoglobulin transgenic mouse that is both hapten specific and autoreactive." Immunity 14(1): 33-43.

Bergtold, A., D. D. Desai, A. Gavhane and R. Clynes, 2005. "Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells." Immunity 23(5): 503-514.

Berthelot, J. M., C. Jamin, K. Amrouche, B. Le Goff, Y. Maugars and P. Youinou, 2013. **"Regulatory B cells play a key role in immune system balance."** Joint Bone Spine 80(1): 18-22.

Bhowmick, N. A., M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C. A. Lundquist, M. E. Engel, C. L. Arteaga and H. L. Moses, 2001. "Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism." Mol Biol Cell 12(1): 27-36.

Bleul, C. C. and T. Boehm, 2005. "**BMP signaling is required for normal thymus development.**" J Immunol 175(8): 5213-5221.

Boettler, T., F. Moeckel, Y. Cheng, M. Heeg, S. Salek-Ardakani, S. Crotty, M. Croft and M. G. von Herrath, 2012. **"OX40 facilitates control of a persistent virus infection."** PLoS Pathog 8(9): e1002913.

Bonig, H., U. Banning, M. Hannen, Y. M. Kim, J. Verheyen, C. Mauz-Korholz and D. Korholz, 1999. "Transforming growth factor-beta1 suppresses interleukin-15-mediated interferongamma production in human T lymphocytes." Scand J Immunol 50(6): 612-618.

Borsutzky, S., B. B. Cazac, J. Roes and C. A. Guzman, 2004. "**TGF-beta receptor signaling is critical for mucosal IgA responses.**" J Immunol 173(5): 3305-3309.

Bossie, A. and E. S. Vitetta, 1991. "IFN-gamma enhances secretion of IgG2a from IgG2acommitted LPS-stimulated murine B cells: implications for the role of IFN-gamma in class switching." Cell Immunol 135(1): 95-104. Brabletz, T., I. Pfeuffer, E. Schorr, F. Siebelt, T. Wirth and E. Serfling, 1993. "Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site." Mol Cell Biol 13(2): 1155-1162.

Braley-Mullen, H., 1978. "Antigen requirements for induction of B-memory cells: studies with dinitrophenyl coupled to T-dependent and T-independent carriers." J Exp Med 147(6): 1824-1831.

Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp and R. Forster, 2000. "Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production." J Exp Med 192(11): 1545-1552.

Britton, W. J., N. Meadows, D. A. Rathjen, D. R. Roach and H. Briscoe, 1998. "A tumor necrosis factor mimetic peptide activates a murine macrophage cell line to inhibit mycobacterial growth in a nitric oxide-dependent fashion." Infect Immun 66(5): 2122-2127.

Busslinger, M., 2004. "Transcriptional control of early B cell development." Annu Rev Immunol 22: 55-79.

Cannons, J. L., H. Qi, K. T. Lu, M. Dutta, J. Gomez-Rodriguez, J. Cheng, E. K. Wakeland, R. N. Germain and P. L. Schwartzberg, 2010. "Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84." Immunity 32(2): 253-265.

Carter, N. A., E. C. Rosser and C. Mauri, 2012. "Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis." Arthritis Res Ther 14(1): R32.

Castro, I., J. A. Wright, B. Damdinsuren, K. L. Hoek, G. Carlesso, N. P. Shinners, R. M. Gerstein, R. T. Woodland, R. Sen and W. N. Khan, 2009. **"B cell receptor-mediated sustained c-Rel activation facilitates late transitional B cell survival through control of B cell activating factor receptor and NF-kappaB2."** J Immunol 182(12): 7729-7737.

Cazac, B. B. and J. Roes, 2000. **"TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo."** Immunity 13(4): 443-451.

Cerutti, A., 2008. "The regulation of IgA class switching." Nat Rev Immunol 8(6): 421-434.

Cerutti, A., M. Cols and I. Puga, 2013. "Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibodyproducing lymphocytes." Nat Rev Immunol 13(2): 118-132.

Cerwenka, A., H. Kovar, O. Majdic and W. Holter, 1996. **"Fas- and activation-induced apoptosis are reduced in human T cells preactivated in the presence of TGF-beta 1."** J Immunol 156(2): 459-464.

Cinamon, G., M. A. Zachariah, O. M. Lam, F. W. Foss, Jr. and J. G. Cyster, 2008. "Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport." Nat Immunol 9(1): 54-62.

128 Bibliografía

Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter and B. Becher, 2011. "RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation." Nat Immunol 12(6): 560-567.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali, 2007. **"The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function."** Nature 450(7169): 566-569.

Conery, A. R., Y. Cao, E. A. Thompson, C. M. Townsend, Jr., T. C. Ko and K. Luo, 2004. "Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis." Nat Cell Biol 6(4): 366-372.

Crotty, S., 2011. "Follicular helper CD4 T cells (TFH)." Annu Rev Immunol 29: 621-663.

Crotty, S., 2014. **"T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease."** Immunity 41(4): 529-542.

Crotty, S., R. J. Johnston and S. P. Schoenberger, 2010. "Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation." Nat Immunol 11(2): 114-120.

Crotty, S., E. N. Kersh, J. Cannons, P. L. Schwartzberg and R. Ahmed, 2003. "SAP is required for generating long-term humoral immunity." Nature 421(6920): 282-287.

Cubas, R. A., J. C. Mudd, A. L. Savoye, M. Perreau, J. van Grevenynghe, T. Metcalf, E. Connick, A. Meditz, G. J. Freeman, G. Abesada-Terk, Jr., J. M. Jacobson, A. D. Brooks, S. Crotty, J. D. Estes, G. Pantaleo, M. M. Lederman and E. K. Haddad, 2013. "Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection." Nat Med 19(4): 494-499.

Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille, 2009. "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" Immunity 30(5): 626-635.

Chang, H. C., S. Sehra, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G. L. Stritesky, R. Jabeen, C. McKinley, A. N. Ahyi, L. Han, E. T. Nguyen, M. J. Robertson, N. B. Perumal, R. S. Tepper, S. L. Nutt and M. H. Kaplan, 2010. "The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation." Nat Immunol 11(6): 527-534.

Chappell, C. P., K. E. Draves, N. V. Giltiay and E. A. Clark, 2012. "Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses." J Exp Med 209(10): 1825-1840.

Cheifetz, S., H. Hernandez, M. Laiho, P. ten Dijke, K. K. Iwata and J. Massague, 1990. "Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms." J Biol Chem 265(33): 20533-20538.

Chen, F. and R. A. Weinberg, 1995. "Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth factor beta receptor kinases." Proc Natl Acad Sci U S A 92(5): 1565-1569.

Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl, 2003. "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGFbeta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med 198(12): 1875-1886.

Chen, W., W. Jin, H. Tian, P. Sicurello, M. Frank, J. M. Orenstein and S. M. Wahl, 2001. "Requirement for transforming growth factor beta1 in controlling T cell apoptosis." J Exp Med 194(4): 439-453.

Chen, W. and P. Ten Dijke, 2016. "Immunoregulation by members of the TGFbeta superfamily." Nat Rev Immunol 16(12): 723-740.

Chen, Y. G., F. Liu and J. Massague, 1997. "Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12." EMBO J 16(13): 3866-3876.

Choi, Y. S., D. Eto, J. A. Yang, C. Lao and S. Crotty, 2013. "Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation." J Immunol 190(7): 3049-3053.

Choi, Y. S., R. Kageyama, D. Eto, T. C. Escobar, R. J. Johnston, L. Monticelli, C. Lao and S. Crotty, 2011. **"ICOS receptor instructs T follicular helper cell versus effector cell differentiation via induction of the transcriptional repressor Bcl6."** Immunity 34(6): 932-946.

Choi, Y. S., J. A. Yang, I. Yusuf, R. J. Johnston, J. Greenbaum, B. Peters and S. Crotty, 2013. **"Bcl6** expressing follicular helper CD4 T cells are fate committed early and have the capacity to form memory." J Immunol 190(8): 4014-4026.

Chung, J. B., R. A. Sater, M. L. Fields, J. Erikson and J. G. Monroe, 2002. "CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals." Int Immunol 14(2): 157-166.

Chung, Y., S. Tanaka, F. Chu, R. I. Nurieva, G. J. Martinez, S. Rawal, Y. H. Wang, H. Lim, J. M. Reynolds, X. H. Zhou, H. M. Fan, Z. M. Liu, S. S. Neelapu and C. Dong, 2011. "Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions." Nat Med 17(8): 983-988.

Daly, A. C., R. A. Randall and C. S. Hill, 2008. "Transforming growth factor beta-induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth." Mol Cell Biol 28(22): 6889-6902.

Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka and V. K. Kuchroo, 2008. "IL-4 inhibits TGFbeta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." Nat Immunol 9(12): 1347-1355.

Das, J., G. Ren, L. Zhang, A. I. Roberts, X. Zhao, A. L. Bothwell, L. Van Kaer, Y. Shi and G. Das, 2009. "Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation." J Exp Med 206(11): 2407-2416.

Davidson, T. S., R. J. DiPaolo, J. Andersson and E. M. Shevach, 2007. "Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells." J Immunol 178(7): 4022-4026.

De Silva, N. S. and U. Klein, 2015. "Dynamics of B cells in germinal centres." Nat Rev Immunol 15(3): 137-148.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom and S. C. Robson, 2007. "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med 204(6): 1257-1265.

Delgoffe, G. M., S. R. Woo, M. E. Turnis, D. M. Gravano, C. Guy, A. E. Overacre, M. L. Bettini, P. Vogel, D. Finkelstein, J. Bonnevier, C. J. Workman and D. A. Vignali, 2013. "Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis." Nature 501(7466): 252-256.

Di Cesare, A., P. Di Meglio and F. O. Nestle, 2009. "The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis." J Invest Dermatol 129(6): 1339-1350.

Do, R. K., E. Hatada, H. Lee, M. R. Tourigny, D. Hilbert and S. Chen-Kiang, 2000. "Attenuation of apoptosis underlies B lymphocyte stimulator enhancement of humoral immune response." J Exp Med 192(7): 953-964.

Dong, C., U. A. Temann and R. A. Flavell, 2001. "Cutting edge: critical role of inducible costimulator in germinal center reactions." J Immunol 166(6): 3659-3662.

Ebisawa, T., M. Fukuchi, G. Murakami, T. Chiba, K. Tanaka, T. Imamura and K. Miyazono, 2001. "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation." J Biol Chem 276(16): 12477-12480.

Eto, D., C. Lao, D. DiToro, B. Barnett, T. C. Escobar, R. Kageyama, I. Yusuf and S. Crotty, 2011. "IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation." PLoS One 6(3): e17739.

Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell and F. Powrie, 2005. **"T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells."** J Exp Med 201(5): 737-746.

Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre and P. Puccetti, 2003. **"Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells."** Nat Immunol 4(12): 1206-1212.

Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B. C. McGrath, D. R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M. C. Fioretti and P. Puccetti, 2006. "The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell

receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells." J Immunol 176(11): 6752-6761.

Feng, X. H. and R. Derynck, 2005. "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads." Annu Rev Cell Dev Biol 21: 659-693.

Fillatreau, S. and D. Gray, 2003. "T cell accumulation in B cell follicles is regulated by dendritic cells and is independent of B cell activation." J Exp Med 197(2): 195-206.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky, 2003. **"Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells."** Nat Immunol 4(4): 330-336.

Fossati, L., M. Iwamoto, R. Merino and S. Izui, 1995. "Selective enhancing effect of the Yaa gene on immune responses against self and foreign antigens." Eur J Immunol 25(1): 166-173.

Foy, T. M., J. D. Laman, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, E. Claassen and R. J. Noelle, 1994. "gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory." J Exp Med 180(1): 157-163.

Fraser, C. K., K. R. Diener, M. P. Brown and J. D. Hayball, 2007. "Improving vaccines by incorporating immunological coadjuvants." Expert Rev Vaccines 6(4): 559-578.

Freudlsperger, C., Y. Bian, S. Contag Wise, J. Burnett, J. Coupar, X. Yang, Z. Chen and C. Van Waes, 2013. **"TGF-beta and NF-kappaB signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers."** Oncogene 32(12): 1549-1559.

Gatto, D., D. Paus, A. Basten, C. R. Mackay and R. Brink, 2009. "Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EBI2 shapes humoral immune responses." Immunity 31(2): 259-269.

Geier, J. K. and M. S. Schlissel, 2006. "Pre-BCR signals and the control of Ig gene rearrangements." Semin Immunol 18(1): 31-39.

Ghoreschi, K., A. Laurence, X. P. Yang, C. M. Tato, M. J. McGeachy, J. E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T. S. Davidson, N. Bouladoux, J. R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W. T. Watford, H. W. Sun, G. Eberl, E. M. Shevach, Y. Belkaid, D. J. Cua, W. Chen and J. J. O'Shea, 2010. "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." Nature 467(7318): 967-971.

Gingery, A., E. W. Bradley, L. Pederson, M. Ruan, N. J. Horwood and M. J. Oursler, 2008. "TGFbeta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival." Exp Cell Res 314(15): 2725-2738.

Gitlin, A. D., Z. Shulman and M. C. Nussenzweig, 2014. "Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation." Nature 509(7502): 637-640.

Goenka, R., L. G. Barnett, J. S. Silver, P. J. O'Neill, C. A. Hunter, M. P. Cancro and T. M. Laufer, 2011. "Cutting edge: dendritic cell-restricted antigen presentation initiates the follicular

helper T cell program but cannot complete ultimate effector differentiation." J Immunol 187(3): 1091-1095.

Goenka, R., A. H. Matthews, B. Zhang, P. J. O'Neill, J. L. Scholz, T. S. Migone, W. J. Leonard, W. Stohl, U. Hershberg and M. P. Cancro, 2014. "Local BLyS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation." J Exp Med 211(1): 45-56.

Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle, 2005. "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol 174(4): 1783-1786.

Gonzales, C. B., D. Simmons and M. MacDougall, 2010. "Competing roles of TGFbeta and Nma/BAMBI in odontoblasts." J Dent Res 89(6): 597-602.

Goodnow, C. C., J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, K. Raphael and et al., 1988. "Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice." Nature 334(6184): 676-682.

Gordon, J., S. R. Patel, Y. Mishina and N. R. Manley, 2010. "Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis." Dev Biol 339(1): 141-154.

Gordon, K. J. and G. C. Blobe, 2008. "Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease." Biochim Biophys Acta 1782(4): 197-228.

Gorelik, L., P. E. Fields and R. A. Flavell, 2000. "Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression." J Immunol 165(9): 4773-4777.

Gorelik, L. and R. A. Flavell, 2000. "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease." Immunity 12(2): 171-181.

Gorham, J. D., M. L. Guler, D. Fenoglio, U. Gubler and K. M. Murphy, 1998. **"Low dose TGF-beta attenuates IL-12 responsiveness in murine Th cells."** J Immunol 161(4): 1664-1670.

Goswami, R., R. Jabeen, R. Yagi, D. Pham, J. Zhu, S. Goenka and M. H. Kaplan, 2012. "STAT6dependent regulation of Th9 development." J Immunol 188(3): 968-975.

Gottschalk, R. A., E. Corse and J. P. Allison, 2010. "TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo." J Exp Med 207(8): 1701-1711.

Grawunder, U., T. M. Leu, D. G. Schatz, A. Werner, A. G. Rolink, F. Melchers and T. H. Winkler, 1995. "Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement." Immunity 3(5): 601-608.

Griffioen, A. W., E. A. Toebes, G. T. Rijkers, F. H. Claas, G. Datema and B. J. Zegers, 1992. "The amplifier role of T cells in the human in vitro B cell response to type 4 pneumococcal polysaccharide." Immunol Lett 32(3): 265-272.

Grotewold, L., M. Plum, R. Dildrop, T. Peters and U. Ruther, 2001. "Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis." Mech Dev 100(2): 327-330.

Guimaraes, L. E., B. Baker, C. Perricone and Y. Shoenfeld, 2015. "Vaccines, adjuvants and autoimmunity." Pharmacol Res 100: 190-209.

Haas, K. M., J. C. Poe, D. A. Steeber and T. F. Tedder, 2005. **"B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S. pneumoniae."** Immunity 23(1): 7-18.

Hager-Theodorides, A. L., S. V. Outram, D. K. Shah, R. Sacedon, R. E. Shrimpton, A. Vicente, A. Varas and T. Crompton, 2002. **"Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation."** J Immunol 169(10): 5496-5504.

Hardy, R. R., P. W. Kincade and K. Dorshkind, 2007. "The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage." Immunity 26(6): 703-714.

Harker, J. A., G. M. Lewis, L. Mack and E. I. Zuniga, 2011. "Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection." Science 334(6057): 825-829.

Harrison, C. A., S. L. Al-Musawi and K. L. Walton, 2011. "Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands." Growth Factors 29(5): 174-186.

Hatzi, K., J. P. Nance, M. A. Kroenke, M. Bothwell, E. K. Haddad, A. Melnick and S. Crotty, 2015. **"BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms."** J Exp Med 212(4): 539-553.

Hayashi, H., S. Abdollah, Y. Qiu, J. Cai, Y. Y. Xu, B. W. Grinnell, M. A. Richardson, J. N. Topper, M. A. Gimbrone, Jr., J. L. Wrana and D. Falb, 1997. "The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling." Cell 89(7): 1165-1173.

Haynes, N. M., C. D. Allen, R. Lesley, K. M. Ansel, N. Killeen and J. G. Cyster, 2007. "Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation." J Immunol 179(8): 5099-5108.

He, Y., Z. Ou, X. Chen, X. Zu, L. Liu, Y. Li, Z. Cao, M. Chen, Z. Chen, H. Chen, L. Qi and L. Wang, 2016. "LPS/TLR4 Signaling Enhances TGF-beta Response Through Downregulating BAMBI During Prostatic Hyperplasia." Sci Rep 6: 27051.

Herzenberg, L. A. and J. W. Tung, 2006. "B cell lineages: documented at last!" Nat Immunol 7(3): 225-226.

Herzog, S., M. Reth and H. Jumaa, 2009. **"Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling."** Nat Rev Immunol 9(3): 195-205.

Hippen, K. L., B. R. Schram, L. E. Tze, K. A. Pape, M. K. Jenkins and T. W. Behrens, 2005. "In vivo assessment of the relative contributions of deletion, anergy, and editing to B cell self-tolerance." J Immunol 175(2): 909-916.

Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi, 2003. "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science 299(5609): 1057-1061.

Howard, M., J. Farrar, M. Hilfiker, B. Johnson, K. Takatsu, T. Hamaoka and W. E. Paul, 1982. "Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2." J Exp Med 155(3): 914-923.

Hu, H., X. Wu, W. Jin, M. Chang, X. Cheng and S. C. Sun, 2011. "Noncanonical NF-kappaB regulates inducible costimulator (ICOS) ligand expression and T follicular helper cell development." Proc Natl Acad Sci U S A 108(31): 12827-12832.

Huber, S., F. R. Stahl, J. Schrader, S. Luth, K. Presser, A. Carambia, R. A. Flavell, S. Werner, M. Blessing, J. Herkel and C. Schramm, 2009. "Activin a promotes the TGF-beta-induced conversion of CD4+CD25- T cells into Foxp3+ induced regulatory T cells." J Immunol 182(8): 4633-4640.

Huse, K., M. Bakkebo, M. P. Oksvold, L. Forfang, V. I. Hilden, T. Stokke, E. B. Smeland and J. H. Myklebust, 2011. **"Bone morphogenetic proteins inhibit CD40L/IL-21-induced Ig production in human B cells: differential effects of BMP-6 and BMP-7."** Eur J Immunol 41(11): 3135-3145.

Hussaarts, L., M. Yazdanbakhsh and B. Guigas, 2014. "Priming dendritic cells for th2 polarization: lessons learned from helminths and implications for metabolic disorders." Front Immunol 5: 499.

Imamura, T., M. Takase, A. Nishihara, E. Oeda, J. Hanai, M. Kawabata and K. Miyazono, 1997. "Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily." Nature 389(6651): 622-626.

Iwai, Y., T. Okazaki, H. Nishimura, A. Kawasaki, H. Yagita and T. Honjo, 2002. "Microanatomical localization of PD-1 in human tonsils." Immunol Lett 83(3): 215-220.

Jabeen, R., R. Goswami, O. Awe, A. Kulkarni, E. T. Nguyen, A. Attenasio, D. Walsh, M. R. Olson, M. H. Kim, R. S. Tepper, J. Sun, C. H. Kim, E. J. Taparowsky, B. Zhou and M. H. Kaplan, 2013. **"Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network."** J Clin Invest 123(11): 4641-4653.

Johnston, R. J., Y. S. Choi, J. A. Diamond, J. A. Yang and S. Crotty, 2012. "STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation." J Exp Med 209(2): 243-250.

Johnston, R. J., A. C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A. L. Dent, J. Craft and S. Crotty, 2009. "Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation." Science 325(5943): 1006-1010.

Jones, C. P., L. G. Gregory, B. Causton, G. A. Campbell and C. M. Lloyd, 2012. "Activin A and TGF-beta promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology." J Allergy Clin Immunol 129(4): 1000-1010 e1003.

Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Naji and A. J. Caton, 2001. "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide." Nat Immunol 2(4): 301-306.

Kageyama, R., J. L. Cannons, F. Zhao, I. Yusuf, C. Lao, M. Locci, P. L. Schwartzberg and S. Crotty, 2012. "The receptor Ly108 functions as a SAP adaptor-dependent on-off switch for T cell help to B cells and NKT cell development." Immunity 36(6): 986-1002.

Kaji, T., A. Ishige, M. Hikida, J. Taka, A. Hijikata, M. Kubo, T. Nagashima, Y. Takahashi, T. Kurosaki, M. Okada, O. Ohara, K. Rajewsky and T. Takemori, 2012. "Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory." J Exp Med 209(11): 2079-2097.

Kamesaki, H., K. Nishizawa, G. Y. Michaud, J. Cossman and T. Kiyono, 1998. **"TGF-beta 1** induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mRNA and protein in murine B cells." J Immunol 160(2): 770-777.

Kanamori, M., H. Nakatsukasa, M. Okada, Q. Lu and A. Yoshimura, 2016. "Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications." Trends Immunol 37(11): 803-811.

Kantor, A. B. and L. A. Herzenberg, 1993. "Origin of murine B cell lineages." Annu Rev Immunol 11: 501-538.

Kaplan, M. H., M. M. Hufford and M. R. Olson, 2015. "The development and in vivo function of T helper 9 cells." Nat Rev Immunol 15(5): 295-307.

Kashiwada, M., D. M. Levy, L. McKeag, K. Murray, A. J. Schroder, S. M. Canfield, G. Traver and P. B. Rothman, 2010. **"IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching."** Proc Natl Acad Sci U S A 107(2): 821-826.

Kerfoot, S. M., G. Yaari, J. R. Patel, K. L. Johnson, D. G. Gonzalez, S. H. Kleinstein and A. M. Haberman, 2011. "Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone." Immunity 34(6): 947-960.

Khan, W. N., 2009. **"B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis."** J Immunol 183(6): 3561-3567.

Khattri, R., T. Cox, S. A. Yasayko and F. Ramsdell, 2003. **"An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells."** Nat Immunol 4(4): 337-342.

Kim, C. H., L. S. Rott, I. Clark-Lewis, D. J. Campbell, L. Wu and E. C. Butcher, 2001. "Subspecialization of CXCR5+ T cells: B helper activity is focused in a germinal centerlocalized subset of CXCR5+ T cells." J Exp Med 193(12): 1373-1381. Kitano, M., S. Moriyama, Y. Ando, M. Hikida, Y. Mori, T. Kurosaki and T. Okada, 2011. **"Bcl6** protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity." Immunity 34(6): 961-972.

Klein, J., W. Ju, J. Heyer, B. Wittek, T. Haneke, P. Knaus, R. Kucherlapati, E. P. Bottinger, L. Nitschke and B. Kneitz, 2006. **"B cell-specific deficiency for Smad2 in vivo leads to defects in TGF-beta-directed IgA switching and changes in B cell fate."** J Immunol 176(4): 2389-2396.

Kopf, M., G. Le Gros, A. J. Coyle, M. Kosco-Vilbois and F. Brombacher, 1995. "Immune responses of IL-4, IL-5, IL-6 deficient mice." Immunol Rev 148: 45-69.

Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka and V. K. Kuchroo, 2007. "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." Nature 448(7152): 484-487.

Kretzschmar, M., J. Doody, I. Timokhina and J. Massague, 1999. "A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras." Genes Dev 13(7): 804-816.

Kreymborg, K., R. Etzensperger, L. Dumoutier, S. Haak, A. Rebollo, T. Buch, F. L. Heppner, J. C. Renauld and B. Becher, 2007. **"IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis."** J Immunol 179(12): 8098-8104.

Kusam, S., L. M. Toney, H. Sato and A. L. Dent, 2003. "Inhibition of Th2 differentiation and GATA-3 expression by BCL-6." J Immunol 170(5): 2435-2441.

Lamouille, S. and R. Derynck, 2007. "Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway." J Cell Biol 178(3): 437-451.

Lantero, A., M. Tramullas, A. Diaz and M. A. Hurle, 2012. "Transforming growth factor-beta in normal nociceptive processing and pathological pain models." Mol Neurobiol 45(1): 76-86.

Lanzavecchia, A., 1998. "Immunology. Licence to kill." Nature 393(6684): 413-414.

Lathrop, S. K., N. A. Santacruz, D. Pham, J. Luo and C. S. Hsieh, 2008. "Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population." J Exp Med 205(13): 3105-3117.

Lazarevic, V. and L. H. Glimcher, 2011. "T-bet in disease." Nat Immunol 12(7): 597-606.

Lazarevic, V., L. H. Glimcher and G. M. Lord, 2013. **"T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity."** Nat Rev Immunol 13(11): 777-789.

Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman and W. E. Paul, 1990. "Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells." J Exp Med 172(3): 921-929.

Lebman, D. A. and J. S. Edmiston, 1999. "The role of TGF-beta in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes." Microbes Infect 1(15): 1297-1304.

Lee, H. J. and P. H. Kim, 2009. "Further Characterization of Activin A-induced IgA Response in Murine B Lymphocytes." Immune Netw 9(4): 133-137.

Lee, H. M., J. L. Bautista and C. S. Hsieh, 2011. "Thymic and peripheral differentiation of regulatory T cells." Adv Immunol 112: 25-71.

Lee, M. K., C. Pardoux, M. C. Hall, P. S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S. M. Smith and R. Derynck, 2007. **"TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA."** EMBO J 26(17): 3957-3967.

Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F. J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. A. Hafler, R. A. Sobel, A. Regev and V. K. Kuchroo, 2012. "Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells." Nat Immunol 13(10): 991-999.

Lee, Y. and V. Kuchroo, 2015. "**Defining the functional states of Th17 cells.**" F1000Res 4(F1000 Faculty Rev): 132.

Letterio, J. J. and A. B. Roberts, 1998. "Regulation of immune responses by TGF-beta." Annu Rev Immunol 16: 137-161.

Li, M. O., Y. Y. Wan, S. Sanjabi, A. K. Robertson and R. A. Flavell, 2006. **"Transforming growth factor-beta regulation of immune responses."** Annu Rev Immunol 24: 99-146.

Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes, 2008. "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol 180(9): 5916-5926.

Liang, L., E. M. Porter and W. C. Sha, 2002. "Constitutive expression of the B7h ligand for inducible costimulator on naive B cells is extinguished after activation by distinct B cell receptor and interleukin 4 receptor-mediated pathways and can be rescued by CD40 signaling." J Exp Med 196(1): 97-108.

Liao, W., J. X. Lin, L. Wang, P. Li and W. J. Leonard, 2011. "Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages." Nat Immunol 12(6): 551-559.

Liao, W., R. Spolski, P. Li, N. Du, E. E. West, M. Ren, S. Mitra and W. J. Leonard, 2014. "Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression." Proc Natl Acad Sci U S A 111(9): 3508-3513.

Licona-Limon, P., G. Aleman-Muench, J. Chimal-Monroy, M. Macias-Silva, E. A. Garcia-Zepeda, M. M. Matzuk, T. I. Fortoul and G. Soldevila, 2009. "Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development." Biochem Biophys Res Commun 381(2): 229-235.

Licona-Limon, P., J. Henao-Mejia, A. U. Temann, N. Gagliani, I. Licona-Limon, H. Ishigame, L. Hao, D. R. Herbert and R. A. Flavell, 2013. **"Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection."** Immunity 39(4): 744-757.

Lin, L., Y. Wang, W. Liu and Y. Huang, 2015. **"BAMBI inhibits skin fibrosis in keloid through suppressing TGF-beta1-induced hypernomic fibroblast cell proliferation and excessive accumulation of collagen I."** Int J Clin Exp Med 8(8): 13227-13234.

Lin, Z., C. Gao, Y. Ning, X. He, W. Wu and Y. G. Chen, 2008. "The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling." J Biol Chem 283(48): 33053-33058.

Linterman, M. A., L. Beaton, D. Yu, R. R. Ramiscal, M. Srivastava, J. J. Hogan, N. K. Verma, M. J. Smyth, R. J. Rigby and C. G. Vinuesa, 2010. "IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses." J Exp Med 207(2): 353-363.

Linterman, M. A., A. E. Denton, D. P. Divekar, I. Zvetkova, L. Kane, C. Ferreira, M. Veldhoen, S. Clare, G. Dougan, M. Espeli and K. G. Smith, 2014. "CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection." Elife 3.

Linterman, M. A. and D. L. Hill, 2016. "Can follicular helper T cells be targeted to improve vaccine efficacy?" F1000Res 5.

Linterman, M. A., W. Pierson, S. K. Lee, A. Kallies, S. Kawamoto, T. F. Rayner, M. Srivastava, D. P. Divekar, L. Beaton, J. J. Hogan, S. Fagarasan, A. Liston, K. G. Smith and C. G. Vinuesa, 2011. **"Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response."** Nat Med 17(8): 975-982.

Linterman, M. A., R. J. Rigby, R. K. Wong, D. Yu, R. Brink, J. L. Cannons, P. L. Schwartzberg, M. C. Cook, G. D. Walters and C. G. Vinuesa, 2009. **"Follicular helper T cells are required for systemic autoimmunity."** J Exp Med 206(3): 561-576.

Lio, C. W. and C. S. Hsieh, 2008. **"A two-step process for thymic regulatory T cell development."** Immunity 28(1): 100-111.

Liu, D., H. Xu, C. Shih, Z. Wan, X. Ma, W. Ma, D. Luo and H. Qi, 2015. **"T-B-cell entanglement and ICOSL-driven feed-forward regulation of germinal centre reaction."** Nature 517(7533): 214-218.

Locci, M., C. Havenar-Daughton, E. Landais, J. Wu, M. A. Kroenke, C. L. Arlehamn, L. F. Su, R. Cubas, M. M. Davis, A. Sette, E. K. Haddad, A. V. I. P. C. P. I. International, P. Poignard and S. Crotty, 2013. "Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses." Immunity 39(4): 758-769.

Locci, M., J. E. Wu, F. Arumemi, Z. Mikulski, C. Dahlberg, A. T. Miller and S. Crotty, 2016. "Activin A programs the differentiation of human TFH cells." Nat Immunol 17(8): 976-984. Lu, L. and D. G. Osmond, 2000. "Apoptosis and its modulation during B lymphopoiesis in mouse bone marrow." Immunol Rev 175: 158-174.

Lu, Y., S. Hong, H. Li, J. Park, B. Hong, L. Wang, Y. Zheng, Z. Liu, J. Xu, J. He, J. Yang, J. Qian and Q. Yi, 2012. **"Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo."** J Clin Invest 122(11): 4160-4171.

Lukas, D., N. Yogev, J. M. Kel, T. Regen, I. A. Mufazalov, Y. Tang, F. Wanke, B. Reizis, W. Muller, F. C. Kurschus, M. Prinz, I. Kleiter, B. E. Clausen and A. Waisman, 2017. **"TGF-beta inhibitor Smad7 regulates dendritic cell-induced autoimmunity."** Proc Natl Acad Sci U S A 114(8): E1480-E1489.

Lycke, N., 2012. "Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations." Nat Rev Immunol 12(8): 592-605.

Mackay, F. and J. L. Browning, 2002. "BAFF: a fundamental survival factor for B cells." Nat Rev Immunol 2(7): 465-475.

Mai, Y., Z. Zhang, H. Yang, P. Dong, G. Chu, G. Yang and S. Sun, 2014. "BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) inhibits the adipogenesis of porcine preadipocytes through Wnt/beta-catenin signaling pathway." Biochem Cell Biol 92(3): 172-182.

Malissen, M., A. Gillet, L. Ardouin, G. Bouvier, J. Trucy, P. Ferrier, E. Vivier and B. Malissen, 1995. "Altered T cell development in mice with a targeted mutation of the CD3-epsilon gene." EMBO J 14(19): 4641-4653.

Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini and S. Jaillon, 2011. "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nat Rev Immunol 11(8): 519-531.

Martin, F. and J. F. Kearney, 2002. "Marginal-zone B cells." Nat Rev Immunol 2(5): 323-335.

Martinez, G. J., R. I. Nurieva, X. O. Yang and C. Dong, 2008. "Regulation and function of proinflammatory TH17 cells." Ann N Y Acad Sci 1143: 188-211.

Marwitz, S., S. Depner, D. Dvornikov, R. Merkle, M. Szczygiel, K. Muller-Decker, P. Lucarelli, M. Wasch, H. Mairbaurl, K. F. Rabe, C. Kugler, E. Vollmer, M. Reck, S. Scheufele, M. Kroger, O. Ammerpohl, R. Siebert, T. Goldmann and U. Klingmuller, 2016. "Downregulation of the TGFbeta Pseudoreceptor BAMBI in Non-Small Cell Lung Cancer Enhances TGFbeta Signaling and Invasion." Cancer Res 76(13): 3785-3801.

Massague, J., 2012. "TGFbeta signalling in context." Nat Rev Mol Cell Biol 13(10): 616-630.

Maul, R. W. and P. J. Gearhart, 2010. "AID and somatic hypermutation." Adv Immunol 105: 159-191.

Mauri, C. and A. Bosma, 2012. "Immune regulatory function of B cells." Annu Rev Immunol 30: 221-241.

McCarron, M. J. and J. C. Marie, 2014. **"TGF-beta prevents T follicular helper cell accumulation and B cell autoreactivity."** J Clin Invest 124(10): 4375-4386.

McGeachy, M. J., K. S. Bak-Jensen, Y. Chen, C. M. Tato, W. Blumenschein, T. McClanahan and D. J. Cua, 2007. **"TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology."** Nat Immunol 8(12): 1390-1397.

McIntyre, T. M., D. R. Klinman, P. Rothman, M. Lugo, J. R. Dasch, J. J. Mond and C. M. Snapper, 1993. "Transforming growth factor beta 1 selectivity stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells." J Exp Med 177(4): 1031-1037.

Melchers, F., 2015. "Checkpoints that control B cell development." J Clin Invest 125(6): 2203-2210.

Mesin, L., J. Ersching and G. D. Victora, 2016. "Germinal Center B Cell Dynamics." Immunity 45(3): 471-482.

Metkar, S. S., B. Wang, M. Aguilar-Santelises, S. M. Raja, L. Uhlin-Hansen, E. Podack, J. A. Trapani and C. J. Froelich, 2002. "Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation." Immunity 16(3): 417-428.

Miller, J. F. and G. F. Mitchell, 1968. "Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes." J Exp Med 128(4): 801-820.

Mitchell, G. F. and J. F. Miller, 1968. "Cell to cell interaction in the immune response. II. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes." J Exp Med 128(4): 821-837.

Miyazono, K., 2000. "Positive and negative regulation of TGF-beta signaling." J Cell Sci 113 (Pt 7): 1101-1109.

Miyazono, K., A. Olofsson, P. Colosetti and C. H. Heldin, 1991. "A role of the latent TGF-beta 1binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1." EMBO J 10(5): 1091-1101.

Mond, J. J., A. Lees and C. M. Snapper, 1995. "T cell-independent antigens type 2." Annu Rev Immunol 13: 655-692.

Mond, J. J., P. K. Mongini, D. Sieckmann and W. E. Paul, 1980. "Role of T lymphocytes in the response to TNP-AECM-Ficoll." J Immunol 125(3): 1066-1070.

Monroe, J. G. and K. Dorshkind, 2007. **"Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development."** Adv Immunol 95: 1-50.

Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind, 2006. "New perspectives in B-1 B cell development and function." Trends Immunol 27(9): 428-433.

Mosier, D. E., J. J. Mond and E. A. Goldings, 1977. "The ontogeny of thymic independent antibody responses in vitro in normal mice and mice with an X-linked B cell defect." J Immunol 119(6): 1874-1878.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman, 1986. "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol 136(7): 2348-2357.

Nathan, C. F., H. W. Murray, M. E. Wiebe and B. Y. Rubin, 1983. "Identification of interferongamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." J Exp Med 158(3): 670-689.

Nemazee, D. A. and K. Burki, 1989. "Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes." Nature 337(6207): 562-566.

Netea, M. G., L. A. Joosten, E. Latz, K. H. Mills, G. Natoli, H. G. Stunnenberg, L. A. O'Neill and R. J. Xavier, 2016. "Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease." Science 352(6284): aaf1098.

Neurath, M. F., 2014. "Cytokines in inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol 14(5): 329-342.

Noben-Trauth, N., J. Hu-Li and W. E. Paul, 2000. "Conventional, naive CD4+ T cells provide an initial source of IL-4 during Th2 differentiation." J Immunol 165(7): 3620-3625.

Nurieva, R. I., Y. Chung, D. Hwang, X. O. Yang, H. S. Kang, L. Ma, Y. H. Wang, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian and C. Dong, 2008. "Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages." Immunity 29(1): 138-149.

Nurieva, R. I., Y. Chung, G. J. Martinez, X. O. Yang, S. Tanaka, T. D. Matskevitch, Y. H. Wang and C. Dong, 2009. **"Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells."** Science 325(5943): 1001-1005.

O'Connor, B. P., L. A. Vogel, W. Zhang, W. Loo, D. Shnider, E. F. Lind, M. Ratliff, R. J. Noelle and L. D. Erickson, 2006. "Imprinting the fate of antigen-reactive B cells through the affinity of the B cell receptor." J Immunol 177(11): 7723-7732.

Obukhanych, T. V. and M. C. Nussenzweig, 2006. "T-independent type II immune responses generate memory B cells." J Exp Med 203(2): 305-310.

Ogawa, K., M. Funaba and M. Tsujimoto, 2008. **"A dual role of activin A in regulating immunoglobulin production of B cells."** J Leukoc Biol 83(6): 1451-1458.

Okada, T., M. J. Miller, I. Parker, M. F. Krummel, M. Neighbors, S. B. Hartley, A. O'Garra, M. D. Cahalan and J. G. Cyster, 2005. "Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells." PLoS Biol 3(6): e150.

142 Bibliografía

Onichtchouk, D., Y. G. Chen, R. Dosch, V. Gawantka, H. Delius, J. Massague and C. Niehrs, 1999. "Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI." Nature 401(6752): 480-485.

Orange, J. S. and C. A. Biron, 1996. "Characterization of early IL-12, IFN-alphabeta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection." J Immunol 156(12): 4746-4756.

Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma and M. O. Li, 2010. "Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development." Immunity 32(5): 642-653.

Ouyang, W., S. A. Oh, Q. Ma, M. R. Bivona, J. Zhu and M. O. Li, 2013. "TGF-beta cytokine signaling promotes CD8+ T cell development and low-affinity CD4+ T cell homeostasis by regulation of interleukin-7 receptor alpha expression." Immunity 39(2): 335-346.

Ozaki, K., R. Spolski, R. Ettinger, H. P. Kim, G. Wang, C. F. Qi, P. Hwu, D. J. Shaffer, S. Akilesh, D. C. Roopenian, H. C. Morse, 3rd, P. E. Lipsky and W. J. Leonard, 2004. "Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6." J Immunol 173(9): 5361-5371.

Ozdamar, B., R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H. R. Wang, Y. Zhang and J. L. Wrana, 2005. "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity." Science 307(5715): 1603-1609.

Pan, Y., Z. Lei, X. Wei and W. Hao, 2016. **"TAK1 deficiency in dendritic cells inhibits adaptive immunity in SRBC-immunized C57BL/6 mice."** FEBS Open Bio 6(6): 548-557.

Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo, 2007. "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol 8(12): 1353-1362.

Pape, K. A., D. M. Catron, A. A. Itano and M. K. Jenkins, 2007. "The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles." Immunity 26(4): 491-502.

Pape, K. A., V. Kouskoff, D. Nemazee, H. L. Tang, J. G. Cyster, L. E. Tze, K. L. Hippen, T. W. Behrens and M. K. Jenkins, 2003. "Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response." J Exp Med 197(12): 1677-1687.

Paus, D., T. G. Phan, T. D. Chan, S. Gardam, A. Basten and R. Brink, 2006. "Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation." J Exp Med 203(4): 1081-1091.

Pelanda, R. and R. M. Torres, 2012. "Central B-cell tolerance: where selection begins." Cold Spring Harb Perspect Biol 4(4): a007146.

Pereira, J. P., L. M. Kelly and J. G. Cyster, 2010. "Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses." Int Immunol 22(6): 413-419.

Phan, T. G., I. Grigorova, T. Okada and J. G. Cyster, 2007. "Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells." Nat Immunol 8(9): 992-1000.

Phan, T. G., D. Paus, T. D. Chan, M. L. Turner, S. L. Nutt, A. Basten and R. Brink, 2006. "High affinity germinal center B cells are actively selected into the plasma cell compartment." J Exp Med 203(11): 2419-2424.

Pillai, S. and A. Cariappa, 2009. "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision." Nat Rev Immunol 9(11): 767-777.

Postigo, J., M. Iglesias, P. Alvarez, J. Jesus Augustin, L. Buelta, J. Merino and R. Merino, 2016. "Bone Morphogenetic Protein and Activin Membrane-Bound Inhibitor, a Transforming Growth Factor beta Rheostat That Controls Murine Treg Cell/Th17 Cell Differentiation and the Development of Autoimmune Arthritis by Reducing Interleukin-2 Signaling." Arthritis Rheumatol 68(6): 1551-1562.

Postigo, J., 2013. **"BAMBI, un inhibidor de la señalización de TGFβ, en la actividad biológica de los linfocitos T-CD4**⁺". Tesis Doctoral. Universidad de Cantabria.

Purwar, R., C. Schlapbach, S. Xiao, H. S. Kang, W. Elyaman, X. Jiang, A. M. Jetten, S. J. Khoury, R.
C. Fuhlbrigge, V. K. Kuchroo, R. A. Clark and T. S. Kupper, 2012. "Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells." Nat Med 18(8): 1248-1253.

Qi, H., 2016. "T follicular helper cells in space-time." Nat Rev Immunol 16(10): 612-625.

Qi, H., J. L. Cannons, F. Klauschen, P. L. Schwartzberg and R. N. Germain, 2008. "SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation." Nature 455(7214): 764-769.

Qi, H., J. G. Egen, A. Y. Huang and R. N. Germain, 2006. "Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells." Science 312(5780): 1672-1676.

Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker and D. M. Sansom, 2011. "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." Science 332(6029): 600-603.

Rau, F. C., J. Dieter, Z. Luo, S. O. Priest and N. Baumgarth, 2009. **"B7-1/2 (CD80/CD86) direct signaling to B cells enhances IgG secretion."** J Immunol 183(12): 7661-7671.

Reif, K., E. H. Ekland, L. Ohl, H. Nakano, M. Lipp, R. Forster and J. G. Cyster, 2002. "Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position." Nature 416(6876): 94-99.

Reinhardt, R. L., H. E. Liang and R. M. Locksley, 2009. "Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire." Nat Immunol 10(4): 385-393.

Robertson, I. B. and D. B. Rifkin, 2016. "Regulation of the Bioavailability of TGF-beta and TGFbeta-Related Proteins." Cold Spring Harb Perspect Biol 8(6).

Roes, J., B. K. Choi and B. B. Cazac, 2003. "Redirection of B cell responsiveness by transforming growth factor beta receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 100(12): 7241-7246.

Rolf, J., S. E. Bell, D. Kovesdi, M. L. Janas, D. R. Soond, L. M. Webb, S. Santinelli, T. Saunders, B. Hebeis, N. Killeen, K. Okkenhaug and M. Turner, 2010. "Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction." J Immunol 185(7): 4042-4052.

Ross, S. and C. S. Hill, 2008. "How the Smads regulate transcription." Int J Biochem Cell Biol 40(3): 383-408.

Rowland, S. L., K. F. Leahy, R. Halverson, R. M. Torres and R. Pelanda, 2010. **"BAFF receptor signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling."** J Immunol 185(8): 4570-4581.

Ruggieri, A., S. Anticoli, A. D'Ambrosio, L. Giordani and M. Viora, 2016. "The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination." Ann Ist Super Sanita 52(2): 198-204.

Sage, P. T., D. Alvarez, J. Godec, U. H. von Andrian and A. H. Sharpe, 2014. "Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties." J Clin Invest 124(12): 5191-5204.

Sage, P. T., A. M. Paterson, S. B. Lovitch and A. H. Sharpe, 2014. "The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells." Immunity 41(6): 1026-1039.

Sage, P. T. and A. H. Sharpe, 2016. "T follicular regulatory cells." Immunol Rev 271(1): 246-259.

Saito, M., J. Gao, K. Basso, Y. Kitagawa, P. M. Smith, G. Bhagat, A. Pernis, L. Pasqualucci and R. Dalla-Favera, 2007. "A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma." Cancer Cell 12(3): 280-292.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda, 1995. "Immunologic selftolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol 155(3): 1151-1164.

Salomon, B., D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe and J. A. Bluestone, 2000. **"B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes."** Immunity 12(4): 431-440.

Samy, E. T., Y. Y. Setiady, K. Ohno, P. Pramoonjago, C. Sharp and K. S. Tung, 2006. "The role of physiological self-antigen in the acquisition and maintenance of regulatory T-cell function." Immunol Rev 212: 170-184.

Sanjabi, S., M. M. Mosaheb and R. A. Flavell, 2009. "Opposing effects of TGF-beta and IL-15 cytokines control the number of short-lived effector CD8+ T cells." Immunity 31(1): 131-144.

Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr and A. G. Betz, 2008. "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." Immunity 28(3): 402-413.

Schaerli, P., K. Willimann, A. B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher and B. Moser, 2000. "CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function." J Exp Med 192(11): 1553-1562.

Scherm, M. G., V. B. Ott and C. Daniel, 2016. "Follicular Helper T Cells in Autoimmunity." Curr Diab Rep 16(8): 75.

Schmitt, N., Y. Liu, S. E. Bentebibel, I. Munagala, L. Bourdery, K. Venuprasad, J. Banchereau and H. Ueno, 2014. "The cytokine TGF-beta co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells." Nat Immunol 15(9): 856-865.

Schulz, E. G., L. Mariani, A. Radbruch and T. Hofer, 2009. "Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12." Immunity 30(5): 673-683.

Schwickert, T. A., R. L. Lindquist, G. Shakhar, G. Livshits, D. Skokos, M. H. Kosco-Vilbois, M. L. Dustin and M. C. Nussenzweig, 2007. "In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure." Nature 446(7131): 83-87.

Seki, E., S. De Minicis, C. H. Osterreicher, J. Kluwe, Y. Osawa, D. A. Brenner and R. F. Schwabe, 2007. **"TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis."** Nat Med 13(11): 1324-1332.

Sekiya, T., S. Adachi, K. Kohu, T. Yamada, O. Higuchi, Y. Furukawa, Y. Nakamura, T. Nakamura, K. Tashiro, S. Kuhara, S. Ohwada and T. Akiyama, 2004. "Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells." J Biol Chem 279(8): 6840-6846.

Sekiya, T., T. Oda, K. Matsuura and T. Akiyama, 2004. "**Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling.**" Biochem Biophys Res Commun 320(3): 680-684.

Sengle, G., N. L. Charbonneau, R. N. Ono, T. Sasaki, J. Alvarez, D. R. Keene, H. P. Bachinger and L. Y. Sakai, 2008. **"Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin."** J Biol Chem 283(20): 13874-13888.

Seoane, J., H. V. Le, L. Shen, S. A. Anderson and J. Massague, 2004. "Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation." Cell 117(2): 211-223.

Shaffer, A. L., K. I. Lin, T. C. Kuo, X. Yu, E. M. Hurt, A. Rosenwald, J. M. Giltnane, L. Yang, H. Zhao, K. Calame and L. M. Staudt, 2002. "Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program." Immunity 17(1): 51-62.

Shi, M., J. Zhu, R. Wang, X. Chen, L. Mi, T. Walz and T. A. Springer, 2011. "Latent TGF-beta structure and activation." Nature 474(7351): 343-349.

Shi, Y. and J. Massague, 2003. "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell 113(6): 685-700.

Shim, J. H., C. Xiao, A. E. Paschal, S. T. Bailey, P. Rao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto and S. Ghosh, 2005. **"TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo."** Genes Dev 19(22): 2668-2681.

Shinnakasu, R., T. Inoue, K. Kometani, S. Moriyama, Y. Adachi, M. Nakayama, Y. Takahashi, H. Fukuyama, T. Okada and T. Kurosaki, 2016. **"Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment."** Nat Immunol 17(7): 861-869.

Shinohara, H. and T. Kurosaki, 2016. "Negative role of TAK1 in marginal zone B-cell development incidental to NF-kappaB noncanonical pathway activation." Immunol Cell Biol 94(9): 821-829.

Shresta, S., C. T. Pham, D. A. Thomas, T. A. Graubert and T. J. Ley, 1998. "How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?" Curr Opin Immunol 10(5): 581-587.

Shulman, Z., A. D. Gitlin, S. Targ, M. Jankovic, G. Pasqual, M. C. Nussenzweig and G. D. Victora, 2013. **"T follicular helper cell dynamics in germinal centers."** Science 341(6146): 673-677.

Shulman, Z., A. D. Gitlin, J. S. Weinstein, B. Lainez, E. Esplugues, R. A. Flavell, J. E. Craft and M. C. Nussenzweig, 2014. "Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection." Science 345(6200): 1058-1062.

Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin and et al., 1992. "Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease." Nature 359(6397): 693-699.

Sieckmann, D. G., 1980. "The use of anti-immunoglobulins to induce a signal for cell division in B lymphocytes via their membrane IgM and IgD." Immunol Rev 52: 181-210.

Smith, K. G., A. Light, G. J. Nossal and D. M. Tarlinton, 1997. "The extent of affinity maturation differs between the memory and antibody-forming cell compartments in the primary immune response." EMBO J 16(11): 2996-3006.

Smyth, M. J., S. L. Strobl, H. A. Young, J. R. Ortaldo and A. C. Ochoa, 1991. "Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta." J Immunol 146(10): 3289-3297.

Sokol, C. L., G. M. Barton, A. G. Farr and R. Medzhitov, 2008. "A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses." Nat Immunol 9(3): 310-318.

Song, H. and J. Cerny, 2003. "Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen." J Exp Med 198(12): 1923-1935.

Sorrentino, A., N. Thakur, S. Grimsby, A. Marcusson, V. von Bulow, N. Schuster, S. Zhang, C. H. Heldin and M. Landstrom, 2008. "The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner." Nat Cell Biol 10(10): 1199-1207.

Staudt, V., E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, A. Ulges, C. Taube, N. Dehzad, M. Becker, M. Stassen, A. Steinborn, M. Lohoff, H. Schild, E. Schmitt and T. Bopp, 2010. "Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells." Immunity 33(2): 192-202.

Stone, E. L., M. Pepper, C. D. Katayama, Y. M. Kerdiles, C. Y. Lai, E. Emslie, Y. C. Lin, E. Yang, A. W. Goldrath, M. O. Li, D. A. Cantrell and S. M. Hedrick, 2015. **"ICOS coreceptor signaling inactivates the transcription factor FOXO1 to promote Tfh cell differentiation."** Immunity 42(2): 239-251.

Su, T. T. and D. J. Rawlings, 2002. "Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development." J Immunol 168(5): 2101-2110.

Sung, J. L., J. T. Lin and J. D. Gorham, 2003. **"CD28 co-stimulation regulates the effect of transforming growth factor-beta1 on the proliferation of naive CD4+ T cells."** Int Immunopharmacol 3(2): 233-245.

Sutton, V. R. and J. A. Trapani, 2010. "Proteases in lymphocyte killer function: redundancy, polymorphism and questions remaining." Biol Chem 391(8): 873-879.

Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English and G. Huston, 1990. "IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors." J Immunol 145(11): 3796-3806.

Szakal, A. K., K. L. Holmes and J. G. Tew, 1983. "Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology." J Immunol 131(4): 1714-1727.

Szili, D., Z. Banko, E. A. Toth, G. Nagy, B. Rojkovich, T. Gati, M. Simon, Z. Herincs and G. Sarmay, 2014. "TGFbeta activated kinase 1 (TAK1) at the crossroad of B cell receptor and Toll-like receptor 9 signaling pathways in human B cells." PLoS One 9(5): e96381.

Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum and A. Singer, 2005. **"CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2."** Nat Immunol 6(2): 152-162.

Tamiya, T., K. Ichiyama, H. Kotani, T. Fukaya, T. Sekiya, T. Shichita, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Nakao, S. Fukuyama, H. Inoue, M. Nomura and A. Yoshimura, 2013. "Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction." J Immunol 191(5): 2360-2371.

Tang, J., B. L. Nuccie, I. Ritterman, J. L. Liesveld, C. N. Abboud and D. H. Ryan, 1997. **"TGF-beta down-regulates stromal IL-7 secretion and inhibits proliferation of human B cell precursors."** J Immunol 159(1): 117-125.

Thieu, V. T., Q. Yu, H. C. Chang, N. Yeh, E. T. Nguyen, S. Sehra and M. H. Kaplan, 2008. "Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination." Immunity 29(5): 679-690.

Tiegs, S. L., D. M. Russell and D. Nemazee, 1993. "Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells." J Exp Med 177(4): 1009-1020.

Tinoco, R., V. Alcalde, Y. Yang, K. Sauer and E. I. Zuniga, 2009. "Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo." Immunity 31(1): 145-157.

Tjota, M. Y. and A. I. Sperling, 2014. "Distinct dendritic cell subsets actively induce Th2 polarization." Curr Opin Immunol 31: 44-50.

Toellner, K. M., W. E. Jenkinson, D. R. Taylor, M. Khan, D. M. Sze, D. M. Sansom, C. G. Vinuesa and I. C. MacLennan, 2002. "Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers." J Exp Med 195(3): 383-389.

Togo, N., S. Ohwada, S. Sakurai, H. Toya, I. Sakamoto, T. Yamada, T. Nakano, K. Muroya, I. Takeyoshi, T. Nakajima, T. Sekiya, Y. Yamazumi, T. Nakamura and T. Akiyama, 2008. "Prognostic significance of BMP and activin membrane-bound inhibitor in colorectal cancer." World J Gastroenterol 14(31): 4880-4888.

Toh, M. L. and P. Miossec, 2007. "The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets." Curr Opin Rheumatol 19(3): 284-288.

Tramullas, M., A. Lantero, A. Diaz, N. Morchon, D. Merino, A. Villar, D. Buscher, R. Merino, J. M. Hurle, J. C. Izpisua-Belmonte and M. A. Hurle, 2010. **"BAMBI (Bone Morphogenetic Protein and Activin Membrane-Bound Inhibitor) Reveals the Involvement of the Transforming Growth Factor-beta Family in Pain Modulation."** Journal of Neuroscience 30(4): 1502-1511.

Travis, M. A. and D. Sheppard, 2014. **"TGF-beta activation and function in immunity."** Annu Rev Immunol 32: 51-82.

Trinchieri, G., 2003. "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." Nat Rev Immunol 3(2): 133-146.

Tsalavos, S., K. Segklia, O. Passa, A. Petryk, M. B. O'Connor and D. Graf, 2011. "Involvement of twisted gastrulation in T cell-independent plasma cell production." J Immunol 186(12): 6860-6870.

Tsang, M., R. Kim, M. P. de Caestecker, T. Kudoh, A. B. Roberts and I. B. Dawid, 2000. "Zebrafish nma is involved in TGFbeta family signaling." Genesis 28(2): 47-57.

Tsukazaki, T., T. A. Chiang, A. F. Davison, L. Attisano and J. L. Wrana, 1998. "SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor." Cell 95(6): 779-791.

Urb, M. and D. C. Sheppard, 2012. "The role of mast cells in the defence against pathogens." PLoS Pathog 8(4): e1002619.

Valderrama-Carvajal, H., E. Cocolakis, A. Lacerte, E. H. Lee, G. Krystal, S. Ali and J. J. Lebrun, 2002. "Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP." Nat Cell Biol 4(12): 963-969.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger, 2006. "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity 24(2): 179-189.

Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm and B. Stockinger, 2008. "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." Nat Immunol 9(12): 1341-1346.

Viau, M. and M. Zouali, 2005. **"B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity."** Clin Immunol 114(1): 17-26.

Victora, G. D. and M. C. Nussenzweig, 2012. "Germinal centers." Annu Rev Immunol 30: 429-457.

Victora, G. D., T. A. Schwickert, D. R. Fooksman, A. O. Kamphorst, M. Meyer-Hermann, M. L. Dustin and M. C. Nussenzweig, 2010. "Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter." Cell 143(4): 592-605.

Villar, A. V., R. Garcia, M. Llano, M. Cobo, D. Merino, A. Lantero, M. Tramullas, J. M. Hurle, M. A. Hurle and J. F. Nistal, 2013. "BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF-beta signaling." Biochim Biophys Acta 1832(2): 323-335.

Vinals, F. and J. Pouyssegur, 2001. "Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling." Mol Cell Biol 21(21): 7218-7230.

Vinuesa, C. G., M. C. Cook, C. Angelucci, V. Athanasopoulos, L. Rui, K. M. Hill, D. Yu, H. Domaschenz, B. Whittle, T. Lambe, I. S. Roberts, R. R. Copley, J. I. Bell, R. J. Cornall and C. C.

Goodnow, 2005. "A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity." Nature 435(7041): 452-458.

Vinuesa, C. G. and P. P. Chang, 2013. "Innate B cell helpers reveal novel types of antibody responses." Nat Immunol 14(2): 119-126.

Vinuesa, C. G., M. A. Linterman, D. Yu and I. C. MacLennan, 2016. "Follicular Helper T Cells." Annu Rev Immunol 34: 335-368.

Vogelzang, A., H. M. McGuire, D. Yu, J. Sprent, C. R. Mackay and C. King, 2008. "A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells." Immunity 29(1): 127-137.

von Boehmer, H., 2005. "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nat Immunol 6(4): 338-344.

Wakefield, L. M. and C. S. Hill, 2013. "Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer." Nat Rev Cancer 13(5): 328-341.

Walker, L. S., A. Gulbranson-Judge, S. Flynn, T. Brocker, C. Raykundalia, M. Goodall, R. Forster, M. Lipp and P. Lane, 1999. "Compromised OX40 function in CD28-deficient mice is linked with failure to develop CXC chemokine receptor 5-positive CD4 cells and germinal centers." J Exp Med 190(8): 1115-1122.

Wang, L. D., J. Lopes, A. B. Cooper, M. Dang-Lawson, L. Matsuuchi and M. R. Clark, 2004. "Selection of B lymphocytes in the periphery is determined by the functional capacity of the B cell antigen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A 101(4): 1027-1032.

Wang, R. N., J. Green, Z. Wang, Y. Deng, M. Qiao, M. Peabody, Q. Zhang, J. Ye, Z. Yan, S. Denduluri, O. Idowu, M. Li, C. Shen, A. Hu, R. C. Haydon, R. Kang, J. Mok, M. J. Lee, H. L. Luu and L. L. Shi, 2014. "Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases." Genes Dis 1(1): 87-105.

Weber, J. P., F. Fuhrmann and A. Hutloff, 2012. "T-follicular helper cells survive as long-term memory cells." Eur J Immunol 42(8): 1981-1988.

Weinstein, J. S., E. I. Herman, B. Lainez, P. Licona-Limon, E. Esplugues, R. Flavell and J. Craft, 2016. **"TFH cells progressively differentiate to regulate the germinal center response."** Nat Immunol 17(10): 1197-1205.

Weisel, F. J., G. V. Zuccarino-Catania, M. Chikina and M. J. Shlomchik, 2016. **"A Temporal Switch in the Germinal Center Determines Differential Output of Memory B and Plasma Cells."** Immunity 44(1): 116-130.

Weiss, A. and L. Attisano, 2013. "The TGFbeta superfamily signaling pathway." Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2(1): 47-63.

Wenner, C. A., M. L. Guler, S. E. Macatonia, A. O'Garra and K. M. Murphy, 1996. "Roles of IFNgamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development." J Immunol 156(4): 1442-1447.

Wensveen, F. M., E. Slinger, M. H. van Attekum, R. Brink and E. Eldering, 2016. "Antigenaffinity controls pre-germinal centser B cell selection by promoting Mcl-1 induction through BAFF receptor signaling." Sci Rep 6: 35673.

Wipff, P. J. and B. Hinz, 2008. "Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship." Eur J Cell Biol 87(8-9): 601-615.

Wollenberg, I., A. Agua-Doce, A. Hernandez, C. Almeida, V. G. Oliveira, J. Faro and L. Graca, 2011. **"Regulation of the germinal center reaction by Foxp3+ follicular regulatory T cells."** J Immunol 187(9): 4553-4560.

Wu, J., F. Powell, N. A. Larsen, Z. Lai, K. F. Byth, J. Read, R. F. Gu, M. Roth, D. Toader, J. C. Saeh and H. Chen, 2013. "Mechanism and in vitro pharmacology of TAK1 inhibition by (52)-7-Oxozeaenol." ACS Chem Biol 8(3): 643-650.

Xu, H., X. Li, D. Liu, J. Li, X. Zhang, X. Chen, S. Hou, L. Peng, C. Xu, W. Liu, L. Zhang and H. Qi, 2013. "Follicular T-helper cell recruitment governed by bystander B cells and ICOS-driven motility." Nature 496(7446): 523-527.

Yamaguchi, Y., T. Suda, J. Suda, M. Eguchi, Y. Miura, N. Harada, A. Tominaga and K. Takatsu, 1988. "Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors." J Exp Med 167(1): 43-56.

Yan, X., Z. Lin, F. Chen, X. Zhao, H. Chen, Y. Ning and Y. G. Chen, 2009. **"Human BAMBI cooperates with Smad7 to inhibit transforming growth factor-beta signaling."** J Biol Chem 284(44): 30097-30104.

Yang, X. O., R. Nurieva, G. J. Martinez, H. S. Kang, Y. Chung, B. P. Pappu, B. Shah, S. H. Chang, K. S. Schluns, S. S. Watowich, X. H. Feng, A. M. Jetten and C. Dong, 2008. "Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs." Immunity 29(1): 44-56.

Yang, X. O., A. D. Panopoulos, R. Nurieva, S. H. Chang, D. Wang, S. S. Watowich and C. Dong, 2007. **"STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells."** J Biol Chem 282(13): 9358-9363.

Yaswen, L., A. B. Kulkarni, T. Fredrickson, B. Mittleman, R. Schiffman, S. Payne, G. Longenecker, E. Mozes and S. Karlsson, 1996. "Autoimmune manifestations in the transforming growth factor-beta 1 knockout mouse." Blood 87(4): 1439-1445.

Yi, J. Y., I. Shin and C. L. Arteaga, 2005. "Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase." J Biol Chem 280(11): 10870-10876.

Yoshioka, Y., M. Ono, M. Osaki, I. Konishi and S. Sakaguchi, 2012. "Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation." Eur J Immunol 42(3): 749-759.

Yu, D., S. Rao, L. M. Tsai, S. K. Lee, Y. He, E. L. Sutcliffe, M. Srivastava, M. Linterman, L. Zheng, N. Simpson, J. I. Ellyard, I. A. Parish, C. S. Ma, Q. J. Li, C. R. Parish, C. R. Mackay and C. G. Vinuesa, 2009. "The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment." Immunity 31(3): 457-468.

Zhang, D., H. Yan, H. Li, S. Hao, Z. Zhuang, M. Liu, Q. Sun, Y. Yang, M. Zhou, K. Li and C. Hang, 2015. "TGFbeta-activated Kinase 1 (TAK1) Inhibition by 5Z-7-Oxozeaenol Attenuates Early Brain Injury after Experimental Subarachnoid Hemorrhage." J Biol Chem 290(32): 19900-19909.

Zhang, J., Y. J. Liu, I. C. MacLennan, D. Gray and P. J. Lane, 1988. "B cell memory to thymusindependent antigens type 1 and type 2: the role of lipopolysaccharide in B memory induction." Eur J Immunol 18(9): 1417-1424.

Zhang, J. C., G. Chen, L. Chen, Z. J. Meng, X. Z. Xiong, H. J. Liu, Y. Jin, X. N. Tao, J. H. Wu and S. W. Sun, 2016. "TGF-beta/BAMBI pathway dysfunction contributes to peripheral Th17/Treg imbalance in chronic obstructive pulmonary disease." Sci Rep 6: 31911.

Zhang, S., H. Zhang and J. Zhao, 2009. **"The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation."** Biochem Biophys Res Commun 384(4): 405-408.

Zhang, Y., L. Garcia-Ibanez and K. M. Toellner, 2016. "Regulation of germinal center B-cell differentiation." Immunol Rev 270(1): 8-19.

Zhang, Y., M. Meyer-Hermann, L. A. George, M. T. Figge, M. Khan, M. Goodall, S. P. Young, A. Reynolds, F. Falciani, A. Waisman, C. A. Notley, M. R. Ehrenstein, M. Kosco-Vilbois and K. M. Toellner, 2013. **"Germinal center B cells govern their own fate via antibody feedback."** J Exp Med 210(3): 457-464.

Zhang, Y. E., 2009. "Non-Smad pathways in TGF-beta signaling." Cell Res 19(1): 128-139.

Zheng, Y., S. Josefowicz, A. Chaudhry, X. P. Peng, K. Forbush and A. Y. Rudensky, 2010. "Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate." Nature 463(7282): 808-812.

Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, Ivanov, II, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler and D. R. Littman, 2008. **"TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function."** Nature 453(7192): 236-240.

Zhou, M. and W. Ouyang, 2003. **"The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation."** Immunol Res 28(1): 25-37. Zhu, J., 2015. **"T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production."** Cytokine 75(1): 14-24.

Zhu, J., J. Cote-Sierra, L. Guo and W. E. Paul, 2003. "Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation." Immunity 19(5): 739-748.

Zipori, D. and M. Barda-Saad, 2001. "Role of activin A in negative regulation of normal and tumor B lymphocytes." J Leukoc Biol 69(6): 867-873.
Anexo: Publicaciones

del periodo doctoral

Modulation of autoimmune arthritis severity in mice by apolipoprotein E (ApoE) and cholesterol

P. Alvarez,* F. Genre,[†] M. Iglesias,[†]
J. J. Augustin,*[†] E. Tamayo,[†]
J. C. Escolà-Gil,[‡] B. Lavín,[§]
F. Blanco-Vaca,[‡] R. Merino*[†] and
J. Merino[†]
*Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander, Spain, [†]Departamento de Biología Molecular-IDIVAL Universidad de Cantabria, Santander, Spain, [‡]Institut

d'Investigacions Biomèdiques (IIB) Sant Pau, Barcelona, Spain, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, Barcelona, Spain, and [§]Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain

Accepted for publication 24 August 2016 Correspondence: J. Merino, Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Cardenal Herrera Oria s/n, 39011 Santander, Spain.

E-mail: merinoj@unican.es

Summary

Apolipoprotein E (ApoE) deficiency promoted an exacerbation of autoimmune arthritis in mice by inducing proinflammatory immune responses. In this study we analysed the contribution of hypercholesterolaemia and/or the absence of ApoE anti-inflammatory properties, unrelated to its function in the control of cholesterol metabolism, towards the acceleration of arthritis in these mutant animals. The induction and severity of collagen type II-induced arthritis (CIA) were compared for B10.RIII wild-type (WT), B10.RIII.Apo $E^{+/-}$, B10.RIII.ApoE^{-/-} and B10.RIII.low-density lipoprotein receptor (LDLR^{-/-}) mice with different concentrations of circulating ApoE and cholesterol. A 50-70% reduction in serum levels of ApoE was observed in heterozygous B10.RIII.ApoE^{+/-} mice in comparison to B10.RIII.WT, although both strains of mice exhibited similar circulating lipid profiles. This ApoE reduction was associated with an increased CIA severity that remained lower than in homozygous B10.RIII. Apo $E^{-/-}$ mice. An important rise in circulating ApoE concentration was observed in hypercholesterolaemic B10.RIII.LDLR^{-/-} mice fed with a normal chow diet, and both parameters increased further with an atherogenic hypercholesterolaemic diet. However, the severity of CIA in B10.RIII.LDLR^{-/-} mice was similar to that of B10.RIII.WT controls. In conclusion, by comparing the evolution of CIA between several strains of mutant mice with different levels of serum ApoE and cholesterol, our results demonstrate that both hypercholesterolaemia and ApoE regulate the intensity of in-vivo systemic autoimmune responses.

Keywords: ApoE, collagen type II-induced arthritis, hypercholesterolaemia, LDLR

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease resulting in joint inflammation and destruction. A strong association between RA and an increased risk of cardiovascular disease (CVD), due to accelerated atherosclerosis, has been established [1,2]. In this regard, different studies show that dyslipidaemia is highly prevalent in patients with RA and may be present at least 10 years before the onset of the disease [3–5]. However, a relationship between an altered lipid profile in plasma and the augmented incidence of CVD in RA patients has not been clearly proven and is still the subject of intense debate [6,7].

Conversely, dyslipidaemia can trigger or potentiate already existing inflammatory responses and thereby enhance the severity of RA. Oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) that accumulate in the macrophages of the arterial intima during hypercholesterolaemia are good activators of Toll-like receptor 4 (TLR-4), acting as endogenous danger-associated molecular patterns (DAMP) [8]. Also, it has been reported that, in T cells from systemic lupus erythematosus patients, dyslipidaemia may potentiate antigen receptor signalling through the increase of glycosphingolipid synthesis and their incorporation into membrane lipid rafts [9]. Accordingly, a relationship between hypercholesterolaemia and RA severity has been established [10], although it has not been confirmed by others [11].

Experimental animal models of RA in association with dyslipidaemia constitute excellent tools to explore some of above-mentioned questions. In this regard, we and others have shown recently that ApoE ($ApoE^{-/-}$) deficiency exacerbates the development of collagen type II (col II)-induced

autoimmune arthritis (CIA) in B10.RIII mice in association with enhanced T helper type 1 (Th1) and Th17 inflammatory responses [12] or the semi-chronic K/BxN serum transfer-induced inflammatory arthritis through the potentiation of innate immune responses [13]. Accordingly, these experimental models can be used to explore whether the accelerated arthritis observed in $ApoE^{-t-}$ is related to the hypercholesterolaemia characteristic of these mutant mice and/or to the lack of some of the previously identified anti-inflammatory properties of ApoE, that are unrelated to its function in the control of cholesterol metabolism [14]. In the present study, we have explored these questions comparing the severity of CIA between mice expressing different amounts of ApoE in the context of either normal or altered circulating cholesterol levels.

Materials and methods

Mice

C57BL/6.Apo $E^{-/-}$ (B6.Apo $E^{-/-}$, H-2^b) and B10.RIII (H-2^r) mice were purchased from Charles River (Barcelona, Spain) and Harlan Iberica (Barcelona, Spain), respectively. B6 mice deficient in LDL receptor (B6.LDLR^{-/-}) were kindly provided by Dr Jorge Joven, Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. B10.RIII. ApoE^{-/-} mice were obtained from our animal facilities as described recently [12] and intercrossed with B10.RIII wild-type (B10.RIII.WT) mice to obtain B10.RIII.*ApoE^{-/-}*, B10.RIII.*ApoE^{+/-}* and B10.RIII.WT littermates. B10.RIII.LDLR^{-/-}mice were produced in our animal facilities by back-crossing B6.LDLR^{-/-} mice with B10.RIII mice for seven back-cross generations. In the second backcross generation, H-2^{r/r} mice were selected by flow cytometry using specific monoclonal antibodies (mAbs) against H-2^b and H-2^r (BD Biosciences, Madrid, Spain). In the last back-cross generation, male and female heterozygous mice were intercrossed and B10.RIII.LDLR-/- and B10.RIII.WT littermates were selected by polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA extracted from mouse tails. Mice were fed ad libitum with a normal chow diet (NCD) or an atherogenic hypercholesterolaemic diet (HCD) (10.8% total fat, 0.75% cholesterol, S4892-E010; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) and bled from the retroorbital plexus 4 weeks after immunization. All animal care and experimental procedures were carried out according to institutional guidelines and approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee (ref. 2014/12).

Induction and assessment of arthritis

Bovine col II (MD Bioproducts, Zürich, Switzerland), dissolved at a concentration of 2 mg/ml in 0.05 M acetic acid, was emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA) containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* (MD Bioproducts). For the induction of CIA, 8–12-weekold male mice were immunized once at the base of the tail with 150 μ g of antigen in a final volume of 150 μ l. A clinical evaluation of arthritis severity was performed as described previously [15].

Radiological studies were performed using a CCX Rx ray source of 70 Kw with an exposition of 90 ms (Trophy Irix X-Ray System; Kodak Spain, Madrid, Spain) and the Trophy RVG Digital Imagining system, as described previously [15]. Radiological images were scale-graded according to the presence of four different radiological lesions (1: soft tissue swelling, 2: juxta-articular osteopenia due to alterations in bone density, 3: joint space narrowing or disappearance and 4: bone surface irregularities due to marginal erosions and/or periosteal new bone formation). The extension of every individual lesion in each paw (local: affecting one digit or one joint in the carpus; diffuse: affecting two or more digits and/or two or more joints in the carpus) was graded from 0 to 2 as follows: 0: absence; 1: local; 2: diffuse.

Flow cytometry studies

Spleen cells from B10.RIII.WT, B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ and B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice were stimulated *in vitro* with concanavalin A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at a concentration of 5 µg/ml or with plastic-bound anti-CD3 (1 µg/ well) and anti-CD28 (0.5 µg/well) mAbs (α CD3/ α CD28). The induction of the CD69 and CD25 activation markers in CD4⁺ cells was analysed after 3 and 12 h of stimulation by flow cytometry using commercially labelled antibodies (Biolegend, London, UK).

Two-month-old B10.RIII.WT, B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ and B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 10 µg of lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich) or with phosphate-buffered saline (PBS) as a control. Peritoneal cells were harvested 2 days later and the M1 [CD11b⁺ F4/80⁺ major histocompatibility complex (MHC)-II⁺] and M2 (CD11b⁺ F4/80⁺ CD206⁺) macrophages characterized by flow cytometry. Cells were analysed in a fluorescence activated cell sorter (FACS)Canto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences).

Serological studies

Total cholesterol (TC), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c), LDL/very low-density lipoprotein (VLDL)-c and triglyceride levels in serum samples were determined using an autoanalyser (Biosystems SA, Barcelona, Spain) following the manufacturer's instructions. Serum levels of immuno-globulin (Ig)G1 and IgG2a anti-col II antibodies were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described previously [12]. Results were expressed in titration units/ml (U/ml) in reference to a standard curve obtained

from a serum pool of col II-CFA-immunized dark brown Agouti (DBA)/1 mice. Circulating levels of ApoE were determined by ELISA, as described previously [16]. Briefly, microtitre plates (Maxisorp Nunc-immuno plates; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) were coated with 0·1 µg/ml of WUE-4 (mouse anti-human ApoE mAb; Novus Biologicals, Madrid, Spain) and the assay was developed with goat anti-mouse ApoE (Merck Millipore, Madrid, Spain), followed by a biotinylated rabbit anti-goat antibody (Vector Laboratories Burlingame, CA, USA) and streptavidin–alkaline phosphatase (BD Biosciences). Results were expressed in µg/ml in reference to a standard curve obtained with purified mouse ApoE (a kind gift of Dr Karl Weisgraber, Gladstone Institute of Neurological Disease, University of California San Francisco, CA, USA).

Mouse HDL from each group was isolated by sequential ultracentrifugation at 100 000 g for 24 h at a density of 1.063-1.21 g/ml. HDL composition, including total and free cholesterol, triglycerides and phospholipids, was determined by commercial methods adapted to the Hitachi 917 autoanalyser (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). HDL protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid method (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). The ability of HDL to protect against LDL oxidation was determined on an assay in which human LDL (0.1 mM phospholipids) was oxidized alone with $2.5 \ \mu M \ CuSO_4$ or in the presence of equal concentrations of HDL phospholipids from each experimental group (0.1 mM phospholipids). The oxidation kinetics were followed through continuous monitoring of the formation of conjugated diene at 37°C for 4 h [17]. The kinetics of LDL in the LDL + HDL incubations were calculated by subtracting the kinetics of HDL incubated without LDL. The lag phases were calculated and the results represented as relative lag phase to the LDL kinetics oxidized without HDL. [17]. Paraoxonase (PON)-1 was measured using phenylacetate as substrate [17].

Cytokine expression

The expression of mRNAs encoding for interleukin (IL)-1 β , tumour necrosis factor (TNF)- α , IL-6, transforming growth factor (TGF)- β and IL-10 cytokines was explored in the paws before col II immunization and 8 weeks after using quantitative real time reverse transcriptase PCR (RT–qPCR). After skin removal, the paws were kept frozen at -70° C until processing. Total RNA from powdered paws was obtained by TRIzol extraction (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). One µg of the isolated RNA was used for cDNA synthesis with a RT–PCR kit (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions. RT–qPCR was performed on a StepOne Plus real time PCR instrument (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) using specific *Taq*Man expression assays and an universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). Results (in triplicate) were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) expression and measured in parallel for each sample.

Statistical analysis

The differences between the two groups were analysed by a two-tailed Student's *t*- or two-sample Mann–Whitney *U*-tests. Probability values < 0.05 were considered significant.

Results

The severity of CIA in *ApoE* mutant mice correlates directly with the levels of circulating ApoE

We and others have reported recently the development of an exacerbated inflammatory arthritis in mice deficient in ApoE [12,13]. To analyse whether the enhanced disease in these mutant mice was related to the hypercholesterolaemia and/or to the absence of ApoE, we compared the development of CIA between B10.RIII.WT, B10.RIII.ApoE^{+/-} and B10.RIII.ApoE^{-/-} mice. Serum ApoE levels and lipid profiles were first analysed in the different experimental groups. The levels of circulating ApoE in heterozygous B10.RIII.ApoE^{+/-} mice were approximately one-third/half of those found in B10.RIII.WT, both before and after col II immunization (Fig. 1a). A significant reduction in the levels of circulating TC and HDL-c, but not of LDL/VLDL-c and triglycerides, was observed in B10.RIII.WT mice in association with the development of CIA (Fig. 1b; P < 0.05in both cases). Despite the reduced ApoE concentration, the levels of circulating TC, HDL-c, LDL/VLDL-c and triglycerides in B10.RIII.ApoE^{+/-} before immunization were normal and similar to those of non-immunized B10.RIII.WT mice (Fig. 1b). Again, reduced levels of circulating TC and HDL-c (P < 0.05 and P < 0.01, respectively) were detected in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ after immunization with col II, and these levels remained similar to those of immunized B10.RIII.WT controls (Fig. 1b). As expected, ApoE was undetectable in sera from non-immunized and col IIimmunized B10.RIII. ApoE^{-/-} mice, along with the presence of an abnormal lipid profile characterized by increased levels of triglycerides, TC and LDL/VLDL-c (P<0.001 in all cases) and normal levels of HDL-c (Fig. 1a,b), in comparison to both B10.RIII.WT and B10.RIII.ApoE^{+/-} mice.

As described previously [12], the severity of CIA in B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice was higher than in B10.RIII.WT mice (Fig. 2). In inverse correlation with serum levels of ApoE, the clinical severity of CIA in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice was also significantly higher than in B10.RIII.WT controls but lower than in B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice (Fig. 2a). This was confirmed by analysing different radiological signs associated with bone and cartilage damage. The extent of joint narrowing or disappearance of the interosseous spaces, reflecting cartilage loss, and of bone irregularities,



Fig. 1. Serum lipid profiles and apolipoprotein E (ApoE) levels in *ApoE* mutant mice during collagen type II-induced arthritis (CIA) development. (a) Serum levels of ApoE in B10.RIII.wild-type (WT), B10.RIII.*ApoE*^{+/-} and B10.RIII.*ApoE*^{-/-} mice before (NI) and 8 weeks after (Imm) induction of CIA determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (b) Serum levels of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDLc), very low-density lipoprotein/low-density lipoprotein cholesterol (VLDL/LDLc) and triglycerides in B10.RIII.wild-type (WT), B10.RIII.*ApoE*^{+/-} and B10.RIII.*ApoE*^{-/-} mice before (NI) and 8 weeks after (Imm) induction of CIA. Representative results of three independent experiments are expressed as the mean \pm standard deviation (eight to 10 animals/group). Statistical differences are indicated as follows: ****P* < 0.005.

secondary to periosteal new bone formation and/or marginal articular erosions, was higher in B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ than in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice (Fig. 2b,c). Although the degree of soft tissue swelling and of juxta-articular osteopenia was also slightly larger in B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ than in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice, these increases were not statistically significant. The severity of all radiological signs was significantly lower in B10.RIII.WT controls than in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ and B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice (Fig. 2b,c).

The accelerated disease in B10.RIII.*ApoE^{-/-}* mice was shown to correlate with qualitative changes in anti-col II humoral immune responses and with an enhanced gene expression of arthritogenic cytokines in the paws [12]. To explore whether similar abnormalities also accounted for the aggressive disease progression in heterozygous B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice, circulating levels of IgG1 and IgG2a anti-col II antibodies were first compared in the different experimental groups before CIA induction and 4 weeks after. As reported [12], the circulating levels of IgG1 anti-col II antibodies were reduced significantly in immunized B10.RIII.*A* $poE^{-/-}$ mice in comparison to both B10.RIII.WT and B10.RIII.*ApoE*^{+/-} mice (Fig. 3a). Although the levels of IgG1 anti-col II antibodies also tended to decrease in immunized B10.RIII.*ApoE*^{+/-} in comparison to B10.RIII.WT controls, these differences did not reach statistical significance (Fig. 3a; P = 0.07). No changes in the titres of serum IgG2a anticol II antibodies were observed between the different experimental groups (Fig. 3a).

A significantly increased expression of arthritogenic IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNAs was observed in the paws of B10.RIII.*ApoE^{-/-}* in comparison to B10.RIII.WT mice 8 weeks after immunization with col II-CFA (Fig. 3b). In B10.RIII.*ApoE^{+/-}* mice, the expression of IL-1 β and TNF- α , but not IL-6, mRNAs in the paws was also augmented during CIA in comparison to B10.RIII.WT mice (Fig. 3b). No changes in the expression of the anti-inflammatory



Fig. 2. Development of collagen type II-induced arthritis (CIA) in apolipoprotein E (*ApoE*) mutant mice; 8–12-week-old B10.RIII.wild-type (WT), B10.RIII.*ApoE^{+/-}* and B10.RIII.*ApoE^{-/-}* mice were immunized with collagen type II-complete Freund's adjuvant (col II-CFA). (a) Clinical severity of CIA in individual mice 8 weeks after immunization with col II. Bars represent the mean values. (b) Representative radiological images of the front paws from B10.RIII.WT, B10.RIII.*ApoE^{+/-}* and B10.RIII.*ApoE^{-/-}* mice before and 8 weeks after immunization with col II. (c) Severity score of individual radiological signs, expressed as the mean \pm standard deviation (seven to 10 mice/group), 8 weeks after immunization. Bars represent the mean values. Results from (a) to (c) are representative of four independent experiments. Statistical differences are indicated as follows: n.s. = non-significant; **P* < 0.05; ***P* < 0.005.

cytokines TGF- β and IL-10 were observed among the different groups of immunized mice (Fig. 3b).

Different studies have indicated that ApoE influenced the *in-vitro* activation of T cells and the macrophage polarization into proinflammatory M1 cells [18,19]. We then assessed whether the enhanced CIA observed in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ and B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice correlated with an abnormal T cell activation and/or an enhanced M1 macrophage polarization. No differences in the kinetics of CD69 and CD25 induction were observed in CD4⁺ cells from the different strains of mice after concanavalin A or α CD3/ α CD28 stimulation (Fig. 4a). However, an altered peritoneal macrophage polarization, characterized by an increased M1 polarization and a reduced M2 polarization, was observed in B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice 48 h after i.p. injection of LPS in comparison to B10.RIII.WT controls (Fig. 4b). Again, an intermediate phenotype was observed in heterozygous B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice after LPS treatment (Fig. 4b).

Functional properties of HDL in ApoE mutant mice

ApoE is a component of HDL particles [20]. In addition, chronic inflammation has been shown to alter the antiinflammatory properties of HDLs transforming them into proinflammatory molecules [20,21]. Therefore, we next explored whether the reduction or absence of ApoE and/or the exacerbated CIA observed in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ and B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice induced functional changes in these lipoproteins. An assessment of the lipid and protein



Fig. 3. Anti-collagen type II (col II) humoral responses and cytokine gene expression in apolipoprotein E (*ApoE*) mutant mice. (a) Serum levels of immunoglobulin (Ig)G1 and IgG2a anti-col II antibodies in individual mice before (NI) and 4 weeks after (Imm) immunization with col II. Bars represent the mean values. Results are representative of two independent experiments. (b) Analysis by reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction (RT–qPCR) of interleukin (IL)-1 β , tumour necrosis factor (TNF)- α and IL-6 gene expression in the paws of B10.RIII.wild-type (WT), B10.RIII.*ApoE^{+/-}* and B10.RIII.*ApoE^{-/-}* mice before (NI; closed bars) and 8 weeks after (Imm; open bars) immunization with col II. Representative results from one of three independent experiments (six to eight animals/group) are expressed as the mean \pm standard deviation fold change of each cytokine relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression measured in parallel in each sample. Statistical differences are indicated as follows: n.s. = non-significant; **P* < 0.05; ***P* < 0.01.

composition of HDLs obtained from each mouse genotype revealed significant increases in the distribution of free and esterified cholesterol as well as an increase in the percentage of proteins and a reduction in PON-1 activity in B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice (Table 1). With the exception of a moderate but significant increase in the percentage of proteins, the biochemical composition of HDLs from B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice was similar to that of B10.RIII.WT mice (Table 1).

The ability of HDLs, purified from serum pools of col II immunized B10.RIII.WT, B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ or B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice, to inhibit the oxidation of human LDLs in the presence of CuSO₄ was then analysed. Despite the biochemical differences in the composition of HDLs between B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice and B10.RIII.WT and B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice, these particles showed a similar antioxidant capacity in all the experimental groups (Table 1).

Lack of exacerbation of CIA in hypercholesterolaemic B10.RIII. $LDLR^{-/-}$ mice in association with the increase in serum ApoE levels

Although our present observations in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice are compatible with an immunosuppressive activity of ApoE *in vivo*, independently of its role in cholesterol

metabolism, these results cannot exclude formally the participation of hypercholesterolaemia in the aggravation of CIA in B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice. To explore this issue further we used B10.RIII.LDLR^{-/-} mice. As reported previously [22], these mice exhibited increased levels of TC and LDL/VLDL-c in sera when fed with a NCD and these levels were even higher under a HCD (Fig. 5a: P < 0.001 in all cases). These abnormal circulating lipid profiles of B10.RIII.LDLR^{-/-} mice were similar before and after CIA induction (Fig. 5a). In association with the presence of hypercholesterolaemia, very high levels of circulating ApoE were found in B10.RIII.LDLR^{-/-} mice fed with NCD and these levels increased with the HCD, both before and after CIA induction (Fig. 5b). A significant reduction in circulating TC and HDL-c but not LDL/VLDL-c concentrations was again observed in B10.RIII.WT mice fed with a NCD, but not with a HCD, during the development of CIA (Fig. 5a). In these WT mice, the type of diet had no effect on serum levels of ApoE either before or after col II immunization (Fig. 5b).

Regardless of the diet received, no significant differences in the severity of clinical and radiological signs were observed between B10.RIII.*LDLR*^{-/-} and B10.RIII.WT mice after CIA induction that were lower than in B10.RIII.*ApoE*^{-/-} mice



Fig. 4. Effects of apolipoprotein E (ApoE) deficiency on the activation of CD4⁺ cells and in M1/M2 macrophage polarization. (a) Spleen cells from B10.RIII.wild-type (WT), B10.RIII.*ApoE^{+/-}* and B10.RIII.*ApoE^{-/-}* mice were stimulated *in vitro* with concanavalin A or with α CD3/ α CD28, and the kinetics of CD69 and CD25 induction was analysed by flow cytometry 3 and 12 h afterwards. Results are expressed as overlapping representative histograms of B10.RIII.*MpoE^{+/-}* (dotted line) and B10.RIII.*ApoE^{-/-}* (thick line) mice in one of two independent experiments. (b) B10.RIII.WT, B10.RIII.*ApoE^{+/-}* mice were injected with phosphate-buffered saline (PBS) or lipopolysaccharide (LPS) and the percentages of M1 and M2 macrophages in the peritoneal cavity analysed by flow cytometry 48 h later. Representative results of two independent experiments are expressed as the mean ± standard deviation (three to four animals/group). Statistical differences are indicated as follows: n.s. = non-significant; **P* < 0.05.

(Fig. 6a–c). Similarly, paw expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNAs was significantly lower in B10.RIII.*LDLR*^{-/-} and B10.RIII.WT mice than in B10.RIII.*ApoE*^{-/-} mice 8 weeks after col II immunization (Fig. 6d). Again, the expression of TGF- β and IL-10 was similar in the different groups of mice after CIA induction (data not shown).

Discussion

The deficiency of ApoE has been shown recently to exacerbate disease severity in two experimental models of autoimmune arthritis in mice by inducing inflammatory immune responses [12,13]. However, the underlying mechanisms by which an ApoE deficiency promotes such immunological abnormalities have not been clarified. Using either normocholesterolaemic or hypercholesterolaemic mice with different concentrations of circulating ApoE, we have demonstrated here that both the hypercholesterolaemia and the deficiency in ApoE co-operate towards the worsening of CIA in B10.RIII.*ApoE^{-/-}* mice.

While a strong association between RA and increased risk of atherosclerosis and CVD has been established [1,2], there exist controversies regarding the importance of dyslipidaemia in this association [3–7]. Furthermore, some

Table 1. High-density lipoprotein (HDL) composition and anti-oxidant activity in ApoE mutant mice

HDL characteristic	B10.RIII.WT	B10.RIII.ApoE ^{+/-}	B10.RIII.ApoE ^{-/-}
Esterified cholesterol (%)	18.0 ± 3.5	15.4 ± 3.1	$9.8 \pm 3.4^{*\dagger}$
Free cholesterol (%)	2.6 ± 0.8	3.2 ± 0.8	$6.5 \pm 1.3^{\star \dagger}$
Phospholipids (%)	27.9 ± 6.2	$31 \cdot 1 \pm 4 \cdot 8$	$29{\cdot}6\pm5{\cdot}8$
Triglycerides (%)	$8 \cdot 1 \pm 3 \cdot 8$	5.3 ± 1.8	7.5 ± 1.5
Protein (%)	43.3 ± 0.4	$45.0 \pm 1.3^{*}$	$46.6 \pm 2.3^{*}$
PON1 activity (µmol/ml.min)	59.3 ± 1.7	58.8 ± 4.5	$45{\cdot}9\pm 4{\cdot}9^{\star\dagger}$
LDL oxidation protection (%)	$175{\cdot}2\pm8{\cdot}8$	$185{\cdot}1\pm49{\cdot}3$	$167{\cdot}9\pm12{\cdot}1$

HDL was isolated from plasma by sequential ultracentrifugation at 100 000 g for 24 h at a density of 1·063–1·21 g/ml, and lipids and protein were determined. Values are expressed as relative (%) chemical composition and correspond to HDL preparations isolated from four pooled samples of four to six mice in each group. Serum plasma arylesterase activity was measured using phenylacetate as substrate and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-sensitive plasma arylesterase (PON1) activity was calculated by subtracting the EDTA-resistant arylesterase (five animals/group). Human low-density lipoprotein (LDL) was incubated with 2·5 μ M CuSO4 in the presence or absence of purified HDLs (0·1 mM phospholipids) from each mouse strain (three purified pools of HDL/group). The percentage of protection of LDL oxidation is expressed as the mean ± standard deviation (s.d.). Values are mean ± s.d. **P* < 0·05 *versus* B10.RIII.WT mice. [†]*P* < 0·05 *versus* B10.RIII.ApoE^{+/-} mice. *ApoE* = apolipoprotein E.

studies indicate that abnormal lipid profiles in sera, defined as high levels of TC and triglycerides and lower HDL-c levels, were present in more than 50% of patients with RA before or after disease diagnosis [3–5]. In contrast, studies show that a significant fraction of RA patients exhibit decreased levels of TC and LDL-c and normal values of HDL-c, reflecting what has been called the lipid paradox in RA [6,7]. Although the reasons for these discrepancies have not been determined exactly, they can be related to differences in the inflammatory status of the patients and/or in their dietary habits among the different studies. In this regard, we show here that the development of CIA in both



Fig. 5. Serum lipid profiles and apolipoprotein E (ApoE) levels in B10.RIII. low-density lipoprotein receptor ($LDLR^{-/-}$) mice during collagen type II-induced arthritis (CIA) development. (a) Serum levels of total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) and very low-density lipoprotein/low-density lipoprotein cholesterol (VLDL/LDLc) in B10.RIII.wild-type (WT), B10.RIII. $LDLR^{-/-}$ and B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice fed with a normal chow diet (NCD) or an atherogenic hypercholesterolaemic diet (HCD) before and 8 weeks after induction of CIA. Representative results of two independent experiments are expressed as the mean \pm standard deviation (eight to 10 animals/group). (b) Serum levels of ApoE in B10.RIII.WT, B10.RIII. $LDLR^{-/-}$ and B10.RIII. $ApoE^{-/-}$ mice fed with an NCD or an HCD before and 8 weeks after induction of CIA determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Statistical differences are indicated as follows: n.s. = non-significant; *P < 0.05; **P < 0.01.

P. Alvarez et al.



Fig. 6. Lack of exacerbation of collagen type II-induced arthritis (CIA) in B10.RIII. low-density lipoprotein receptor ($LDLR^{-/-}$) mice; 8–12-weekold B10.RIII.wild-type (WT), B10.RIII. $LDLR^{-/-}$ and B10.RIII.apolipoprotein E ($ApoE^{-/-}$) mice fed with a normal chow diet (NCD) or an atherogenic hypercholesterolaemic diet (HCD) were immunized with collagen type II-complete Freund's adjuvant (col II-CFA). (a) Clinical severity of CIA in individual mice 8 weeks after immunization with col II. Bars represent the mean values. (b) Representative radiological images of the front paws from mice before immunization with col II and 8 weeks afterwards. (c) Severity score of individual radiological signs, expressed as the mean \pm standard deviation (n = 6-8 mice/group) 8 weeks after immunization. Bars represent the mean values. Results from (a) to (c) are representative of three independent experiments. (d) Expression of interleukin (IL)-1 β , tumour necrosis factor (TNF)- α and IL-6 mRNAs by reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction (RT–qPCR) in the paws of the mice fed with NCD (open bars) or HCD (closed bars) 8 weeks after (Imm) immunization with col II. For each cytokine analysis, a mixed group of non-immunized (NI) mice is included for comparison. Representative results from one of three independent experiments (five to nine animals/group) are expressed as mean \pm standard deviation fold change of each cytokine relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression measured in parallel in each sample. Statistical differences are indicated as follows: n.s. = non-significant; *P < 0.05; **P < 0.01; **P < 0.05.

B10.RIII.WT and B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice is associated with a reduction in serum levels of TC and HDL-c, but not of LDL/VLDL-c and triglycerides, when fed using NCD but not HCD. Furthermore, inflammation or infection has been reported to alter lipid profiles in sera, as observed in mice with sepsis [23].

Previous observations demonstrate that small amounts of ApoE are sufficient to normalize plasma cholesterol levels and to inhibit atherosclerosis in mice [24,25]. In our present study, we show an aggravation of CIA in B10.RIII.Apo $E^{+/-}$ mice having 30–50% of the circulating ApoE observed in WT mice but normal cholesterol profiles. Independently of these dose-dependent differences this may be related to the degree of systemic inflammation in each experimental model; both studies highlight the antiinflammatory role of ApoE in vivo that is unrelated to its activity in the control of cholesterol metabolism. The antiinflammatory activity of ApoE has been demonstrated in several studies. ApoE-containing lipoproteins are very efficient in suppressing mitogen-induced proliferative responses of T lymphocytes by reducing the production of IL-2 [18]. ApoE also regulates the TLR-4- and TLR-3mediated production of IL-12 [26] and prevents the LPSinduced production of cytokines and subsequent death in rodents [27]. Furthermore, an ectopic ApoE expression in macrophages and monocytes from ApoE^{-/-} mice suppresses nuclear factor-kB-mediated inflammation by enhancing miR-146a levels [28]. In this regard, our results indicate that the partial or total ApoE deficiency modifies the polarization of macrophages after a potent inflammatory insult *in vivo* but has no effect on the *in-vitro* activation of CD4⁺ cells. The anti-inflammatory capacity of ApoE appears to be isoform-dependent, and animals expressing the E4 allele have greater inflammatory responses [29]. Interestingly, one study has shown an association between the ApoE4 genotype and bone loss in human RA [30], although this has not been confirmed by other authors [31]. The similarities observed in the anti-col II antibody responses and in the pattern of cytokine expression in the paws during CIA development between B10.RIII.ApoE^{+/-} and B10.RIII.A*poE^{-/-}* mice suggest that common mechanisms are responsible for the accelerated diseases in both strains of mice.

We show here that the biochemical composition of HDL particles differs between B10.RIII.*ApoE^{-/-}* and WT controls, with an increase and reduction in the amount of free and esterified cholesterol in HDLs from mutant mice, respectively. Although the molecular basis of this alteration is unknown, it can be related to changes in the expression and/or function of the lecithin : cholesterol acyltransferase, an enzyme involved in the conversion of phosphatidylcholine and cholesterol into cholesteryl ester and lysophosphatidylcholine in plasma and other biological fluids [32]. However, these differences do not modify their ability to protect against LDL oxidation. This, together with the fact that the biochemical composition of HDLs and their *in*-

vitro anti-oxidant activity are similar in B10.RIII.*ApoE*^{+/-} and B10.RIII.WT mice, suggests strongly that the exacerbation of arthritis observed in ApoE mutant mice is largely independent of HDL function. However, as our HDL experiments have been performed in a cell-free system, we cannot completely rule out some direct proinflammatory effects of HDLs in B10.RIII.*ApoE*^{-/-} and B10.RIII.*ApoE*^{+/-} mice.

The link between cholesterol homeostasis and immune system activation has been documented extensively in recent years (reviewed in [33]). To analyse directly the importance of hypercholesterolaemia in the control of CIA severity, we have employed B10.RIII.LDLR-/- mice. However, the increase in the levels of circulating cholesterol in these mice also promotes an important rise in serum ApoE concentration that, according to previous studies, probably reflects a liver X receptor-dependent adaptive response to cholesterol overload [34]. In agreement with the observations in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice, the high levels of ApoE in B10.RIII. $LDLR^{-/-}$ mice could initially anticipate a reduction in the severity of CIA in these animals. Nevertheless, the absence of such protection is compatible with a role for hypercholesterolaemia as an additional worsening factor for CIA severity in B10.RIII.ApoE^{-/-} mice. In this regard, oxLDL and cholesterol crystals can act as DAMPs in the macrophages that infiltrate the arterial intima during hypercholesterolaemia, activating TLR-4 and NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome signalling pathways, respectively [8,35]. Also, hypercholesterolaemia can increase the content of lipid rafts in the plasma membrane, potentiating antigen receptor signalling in T cells [9].

ApoE binds to members of the LDLR family, including the LDLR, LDLR-related protein 1, VLDL receptor (VLDLR) and APOE receptor 2 [36] and several of these receptors have been involved in the anti-inflammatory effect of ApoE [19,37]. The fact that the severity of CIA in B10.RIII.*LDLR*^{-/-} mice is lower than in B10.RIII.*ApoE*^{-/-} mice indicates that LDLR is not the main receptor by which ApoE modulates CIA severity. Additional experiments are required to clarify the receptor/s involved in this protective activity of ApoE. In summary, our present results underline the important role played by ApoE and cholesterol in the regulation of inflammatory arthritis and highlight the importance of these factors as potential relevant targets for the control of autoimmune disorders.

Acknowledgements

We thank Dr Jorge Joven, Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain for the B6.LDLR^{-/-} mice and Dr Karl Weisgraber, Gladstone Institute of Neurological Disease, University of

P. Alvarez et al.

California San Francisco, CA, USA for the purified mouse ApoE. We also thank María Aramburu, Natalia Cobo and Iván Gómez for their technical assistance. This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad to J. M. (SAF2012-34059) and R. M. (SAF2014-55088-R), which were co-funded by the European Regional Development Fund. M. I. was supported partially by a grant from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (IPT2011-1527-010000) associated with fibrostatin SL.

Disclosure

The authors declare no disclosures.

Author contributions

P. A. performed the majority of experiments, analysed the data and wrote the manuscript, F. G. carried out arthritis experiments in B10.RIII. $ApoE^{+/-}$ mice, M. I., J. J. A. and E. T. performed the titration of anti-col II antibodies, the RNA isolation from the paws and the RT–qPCR studies, F. B.-V. and J. C. E.-G. purified HDL from serum pools and characterized their biochemical properties and anti-oxidative activities *in vitro*, B. L. performed the cholesterol profiles in sera and J. M. and R. M. conceived and designed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript.

References

- 1 John H, Kitas G. Inflammatory arthritis as a novel risk factor for cardiovascular disease. Eur J Intern Med 2012; 23:575–9.
- 2 Young A, Koduri G, Batley M *et al.* Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. Rheumatology 2007; **46**:350–7.
- 3 Dessein PH, Joffe BI, Veller MG *et al.* Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2005; **32**:435–42.
- 4 Park YB, Lee SK, Lee WK *et al.* Lipid profiles in untreated patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 1999; **26**:1701–4.
- 5 van Halm VP, Nielen MM, Nurmohamed MT *et al.* Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2007; **66**:184–8.
- 6 Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM *et al.* Lipid paradox in rheumatoid arthritis: the impact of serum lipid measures and systemic inflammation on the risk of cardiovascular disease. Ann Rheum Dis 2011; **70**:482–7.
- 7 Bag-Ozbek A, Giles JT. Inflammation, adiposity, and atherogenic dyslipidaemia in rheumatoid arthritis: is there a paradoxical relationship? Curr Allergy Asthma Rep 2015; **15**:497
- 8 Imai Y, Kuba K, Neely GG *et al.* Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. Cell 2008; **133**:235–49.

- 9 McDonald G, Deepak S, Miguel L *et al.* Normalizing glycosphingolipids restores function in CD4⁺ T cells from lupus patients. J Clin Invest 2014; **124**:712–24.
- 10 Lazarevic MB, Vitic J, Mladenovic V, Myones BL, Skosey JL, Swedler WI. Dyslipoproteinemia in the course of active rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum 1992; 22:172–8.
- 11 Daoussis D, Panoulas VF, Antonopoulos I *et al.* Cardiovascular risk factors and not disease activity, severity or therapy associate with renal dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 2010; **69**:517–21.
- 12 Postigo J, Genre F, Iglesias M *et al.* Exacerbation of type II collagen-induced arthritis in apolipoprotein E-deficient mice in association with the expansion of Th1 and Th17 cells. Arthritis Rheum 2011; **63**:971–80.
- 13 Archer AM, Saber R, Rose S *et al.* ApoE deficiency exacerbates the development and sustainment of a semi-chronic K/BxN serum transfer-induced arthritis model. J Transl Med 2016; **14**: 170.
- 14 Raffai RL. Apolipoprotein E regulation of myeloid cell plasticity in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 2012; 23:471–8.
- 15 González J, Tamayo E, Santiuste I *et al.* CD4⁺CD25⁺ T celldependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes. J Immunol 2007; 178:2778–86.
- 16 Hirsch-Reinshagen V, Donkin J, Stukas S *et al.* LCAT synthesized by primary astrocytes esterifies cholesterol on glia-derived lipoproteins. J Lipid Res 2009; **50**:885–93.
- 17 Escolà-Gil JC, Chen X, Julve J *et al.* Hepatic lipase- and endothelial lipase-deficiency in mice promotes macrophage-to-feces RCT and HDL antioxidant properties. Biochim Biophys Acta 2013; **1831**:691–7.
- 18 Kelly ME, Clay MA, Mistry MJ, Hsieh-Li H-M, Harmony JAK. Apolipoprotein E inhibition of proliferation of mitogenactivated T lymphocytes: production of interleukin 2 with reduced biological activity. Cell Immunol 1994; 159:124–39.
- 19 Baitsch D, Bock HH, Engel T *et al.* Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011; 31:1160–8.
- 20 Zhu X, Parks JS. New roles of HDL in inflammation and hematopoiesis. Annu Rev Nutr 2012; **32**:161–82.
- 21 McMahon M, Grossman J, FitzGerald J *et al.* Proinflammatory high-density lipoprotein as a biomarker for atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2006; **54**:2541–9.
- 22 Osuga J, Yonemoto M, Yamada N *et al.* Cholesterol lowering in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing apolipoprotein E. J Clin Invest 1998; **102**:386–94.
- 23 Alvarez C, Ramos A. Lipids, lipoproteins, and apoproteins in serum during infection. Clin Chem 1986; **32**:142–5.
- 24 Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. Science 1995; **267**:1034–7.
- 25 Zhu Y, Bellosta S, Langer C *et al.* Low-dose expression of a human apolipoprotein E transgene in macrophages restores cholesterol efflux capacity of apolipoprotein E-deficient mouse plasma. Proc Natl Acad Sci USA 1998; **95**:7585–90.
- 26 Ali K, Middleton M, Puré E, Rader DJ. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response *in vivo*. Circ Res 2005; 97:922–7.

- 27 Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES *et al.* Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. J Biol Chem 2001; **276**:8820–4.
- 28 Li K, Ching D, Luk FS, Raffai RL. Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor-κB-driven inflammation and atherosclerosis. Circ Res 2015; 117:e1–e11.
- 29 Lynch JR, Tang W, Wang H *et al.* APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. J Biol Chem 2003; **278**:48529–33.
- 30 Lee SI, Lee SY, Yoo WH. Association of apolipoprotein E polymorphism with bone mineral density in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. Rheumatology 2005; **44**: 1067–8.
- 31 Maehlen MT, Provan SA, de Rooy DP et al. Associations between APOE genotypes and disease susceptibility, joint

damage and lipid levels in patients with rheumatoid arthritis. PLoS One 2013; 8:e60970

- 32 Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. Biochim Biophys Acta 2000; **1529**:245–56.
- 33 Fessler MB. Regulation of adaptive immunity in health and disease by cholesterol metabolism. Curr Allergy Asthma Rep 2015; 15:48.
- 34 Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. Nature 2008; 454:470–7.
- 35 Duewell P, Kono H, Rayner KJ *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature 2010; **464**:1357–61.
- 36 Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. Neurobiol Dis 2014; **72**:3–12.
- 37 May P, Bock HH, Nofer JR. Low density receptor-related protein 1 (LRP1) promotes anti-inflammatory phenotype in murine macrophages. Cell Tissue Res 2013; 354:887–9.



Citation: Iglesias M, Augustin JJ, Alvarez P, Santiuste I, Postigo J, Merino J, et al. (2016) Selective Impairment of T_H17-Differentiation and Protection against Autoimmune Arthritis after Overexpression of BCL2A1 in T Lymphocytes. PLoS ONE 11(7): e0159714. doi:10.1371/journal. pone.0159714

Editor: Pierre Bobé, INSERM-Université Paris-Sud, FRANCE

Received: March 14, 2016

Accepted: July 6, 2016

Published: July 19, 2016

Copyright: © 2016 Iglesias et al. This is an open access article distributed under the terms of the <u>Creative Commons Attribution License</u>, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad to RM (SAF2011-22463 and SAF2014-55088-R) and JM (SAF2012-34059), which were co-funded by the European Regional Development Fund. MI was partially supported by a grant from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (IPT2011-1527-010000) associated with Fibrostatin SL. **RESEARCH ARTICLE**

Selective Impairment of T_H17-Differentiation and Protection against Autoimmune Arthritis after Overexpression of BCL2A1 in T Lymphocytes

Marcos Iglesias^{1¤a}, Juan Jesús Augustin^{1,2}, Pilar Alvarez², Inés Santiuste¹, Jorge Postigo^{1¤b}, Jesús Merino^{1‡*}, Ramón Merino^{1,2‡*}

1 Departamento de Biología Molecular-IDIVAL Universidad de Cantabria, Santander, Spain, 2 Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Cantabria, Santander, Spain

¤a Current address: Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, United States of America

¤b Current address: Department of Medical Sciences, Columbia Center for Translational Immunology & Naomi Berrie Diabetes Center, University of Columbia, New York, United States of America ‡ These authors are shared senior authors on this work.

* merinor@unican.es (RM); merinoj@unican.es (JM)

Abstract

The inhibition of apoptotic cell death in T cells through the dysregulated expression of BCL2 family members has been associated with the protection against the development of different autoimmune diseases. However, multiple mechanisms were proposed to be responsible for such protective effect. The purpose of this study was to explore the effect of the T-cell overexpression of BCL2A1, an anti-apoptotic BCL2 family member without an effect on cell cycle progression, in the development of collagen-induced arthritis. Our results demonstrated an attenuated development of arthritis in these transgenic mice. The protective effect was unrelated to the suppressive activity of regulatory T cells but it was associated with a defective activation of p38 mitogen-activated protein kinase in CD4⁺ cells after in vitro TCR stimulation. In addition, the in vitro and in vivo T_H17 differentiation were impaired in BCL2A1 controlling the activation of CD4⁺ cells and their differentiation into pathogenic proinflammatory T_H17 cells and identified BCL2A1 as a potential target in the control of autoimmune/inflammatory diseases.

Introduction

The inhibition of cell death in lymphocytes has been repeatedly linked with the development of systemic autoimmune diseases. Thus, mice and humans with mutations in *fas/fasL*, transgenic (Tg) mice overexpressing human BCL2 (hBCL2) in B lymphocytes or mice with a targeted



Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

disruption of *BIM*, a pro-apoptotic BCL2 relative, develop an autoimmune syndrome resembling systemic lupus erythematosus (SLE) in association or not with lymphoproliferation [$\underline{1}$ – $\underline{5}$]. Disease development in these situations is the consequence of the defective elimination of potentially harmful T and/or B cell clones either in primary lymphoid organs during development or in secondary lymphoid organs during or after lymphocyte activation [$\underline{6}$ –9].

In view of the above mentioned studies, a surprising observation was the protection against the development of autoimmune encephalomyelitis and diabetes in young BIM-deficient mice [10]. Similarly, the induction of graft-versus-host disease (GVHD) was impaired in these mutant mice [11]. In both studies, the protective effect was associated with a defective T-cell activation, that was manifested by a reduced activation of phospholipase C (PLC) $\gamma 1$ [11] or by the inhibition of BCL2 interaction with inositol triphosphate receptor resulting in an impaired activation of nuclear factor of activated T-cells (NFAT), but not of mitogen-activated protein kinases (MAPK) or nuclear factor-kappa B (NF- κ B) [10]. We also observed a protection against the development of collagen-induced arthritis (CIA) in mice overexpressing hBCL2 in T cells [12]. However, in these hBCL2 Tg mice the protection was mediated by regulatory T cells (Tregs) that showed an enhanced differentiation potential as well as an increased suppressive activity. Both phenomena were unrelated to the anti-apoptotic activity of BCL2, but dependent on its capacity to induce the T-cell expression of the cell cycle inhibitor p27^{kip1}, that in turn, augmented the strength of TGF β -signalling in these cells [12]. Other authors demonstrated that BCLX_L also promoted the development of Tregs, which ameliorate SLE following treatment with the hCDR1 tolerogenic peptide [13].

In this complex scenario, it seems that the consequences of inhibiting lymphocyte apoptosis, in terms of autoimmune disease development, may be determined by the lymphoid population in which the apoptotic program is disturbed, the age of the animal and/or the cell death regulator involved in the process. To further explore this problem, we study here the effects in the development of autoimmunity of the T-cell overexpression of BCL2A1 (also termed A1 or Bfl-1), another prosurvival member of the BCL2 family that together with MCL1 belongs to a different phylogenetic group than BCL2 and BCLX_L [6, 14]. Unlike BCL2 and BCLX_L, BCL2A1 does not retard the cell cycle progression of T cells and does not affect cellular proliferation [15, 16]. Also, while the hydrophobic region at the C-terminal end of BCL2 and BCLX_L targets them to cellular membranes [17, 18], BCL2A1 can be found at different locations including mitochondria and cytoplasm [19]. Our results demonstrate that BCL2A1 overexpression in T cells protects mice against the development of CIA in association with a defective $T_H 17$ differentiation and p38 MAPK activation.

Material and methods

Ethics Statement

All studies with live animals were approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee (refs 2014/12 and PI-02-15), carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and the European Communities Council Directive (86/ 609/EEC) and all efforts were made to minimize suffering.

Mice

C57BL/6 (B6) and DBA/1 mice were obtained from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain). C3H/ HeN-*lck-hBCL2* Tg mice [20] overexpressing hBCL2 selectively in T cells (BCL2-TgT) were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). The *Lck.hBCL2* transgene was transferred to B6 mice by backcross procedures as described previously [12]. B6-BCL2A1 Tg mice overexpressing BCL2A1a in T cells (B6-BCL2A1-TgT) have been described previously [<u>16</u>]. F1 hybrids between DBA/1 and B6 non-Tg (F1 non-Tg), B6-BCL2A1-TgT (F1-BCL2A1-TgT) or B6-BCL2-TgT (F1-BCL2-TgT) mice were bred in our animal facilities. B6-IL-17A-IRES-eGFP reporter mice (B6-IL-17/GFP) [<u>21</u>] were backcrossed with B6-BCL2A1-TgT mice in our animal facilities. Genotyping of mice was performed by PCR of genomic tail DNA.

Induction of CIA, treatments and immunizations

Ten weeks old F1-BCL2-TgT, F1-BCL2A1-TgT and control littermate F1 non-Tg females were immunized at the base of the tail with 150 μ g of bovine collagen type II (col II; MD Bioproducts, Zürich, Switzerland) emulsified with CFA containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* (MD Bioproducts). The clinical and radiological evaluation of arthritis was performed, as described previously [12, 22]. Mice were killed 8 weeks after immunization and the hind paws were fixed in 10% phosphate-buffered formaldehyde solution and decalcified in Parengy's decalcification solution overnight. The tissue was next embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin.

For in vivo CD4⁺CD25⁺ Treg depletion, mice were treated ip with 0.5 mg/week of anti-CD25 mAb (clone PC61) from day 15 after col II immunization up to the end of the experiment. The efficiency of the treatment was evaluated by flow cytometry. Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-col II antibodies were measured by ELISA 3 weeks after immunization. Briefly, microtiter plates (Maxisorp Nunc-immuno plates, ThermoFisher Scentific, Waltham, MA) were coated with col II (4 μ g/ml) and the assay was developed with alkaline phosphataseconjugated rat anti-mouse IgG1 or IgG2a (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Results were expressed in U/ml in reference to a standard curve obtained from a serum pool from col II-CFA immunized DBA/1 mice.

Mice were immunized with 400 µg of heat-aggregated human gammaglobulin (AHGG; Baxter S.L., Valencia, Spain) mixed with 1 mg of aluminum hydroxide (alum). Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-HGG Ab were measured by ELISA and expressed in U/ml, as described [23].

Gene expression analyses

The expression of mRNAs encoding for arthritogenic IL-1 β , TNF α , IL-6 and IL-17A cytokines was explored in the paws before and 8 weeks after col II immunization by quantitative real time RT-PCR. Total RNA was obtained by TRIzol extraction (Invitrogen, ThermoFisher Scentific). One μ g of the isolated RNA was used for cDNA synthesis with a RT-PCR kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), according to the manufacturer instructions. Quantitative real time PCR (RT-qPCR) was performed on a StepOne Plus real time PCR instrument (Applied Biosystems, ThermoFisher Scentific) using specific TaqMan expression assays and universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, ThermoFisher Scentific). Results (in triplicate) were normalized to *GAPDH* expression and measured in parallel in each sample.

Cell cultures

Naïve CD4⁺CD25⁻CD62L⁺CD44⁻ cells from the different mouse strains were purified (more than 99% purity in all cases) by sorting on a FACSaria (BD Biosciences). For the differentiation cultures, $5x10^5$ naïve CD4⁺ cells were stimulated during 5 days with plastic-bound anti-CD3 (1 µg/well) and anti-CD28 (0.5 µg/well) mAbs (anti-CD3/CD28) under different polarizing conditions, as described previously [24]. The percentages of CD4⁺IFN γ^+ (T_H1), CD4⁺GATA-3⁺ (T_H2), CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) and CD4⁺IL-17⁺ (T_H17) cells at the end of the culture period were evaluated by flow cytometry using commercially labeled antibodies (Biolegend, London, United Kingdom, and e-Bioscience Inc, San Diego, CA). CD4⁺ proliferation was measured

after stimulation of cells with plastic-bound anti-CD3/CD28 during 3 days. Cultures were pulsed with 1 μ Ci of ³H-methyl-thymidine (³H-TdR) for the final 6 h of culture, harvested and counted. The kinetics of CD25 and CD69 induction in the stimulated cells were evaluated by flow cytometry.

Apoptosis studies

Peripheral CD4⁺ cells were purified (97% purity) from the lymph nodes of the different groups of mice by magnetic beads and MACS (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain). Thymocytes and lymph node CD4⁺ cells were cultured at 37°C in DMEM supplemented with 2 mM L-glutamine, 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol, and 10% heat-inactivated FCS (<u>GE Healthcare Life Sciences</u>, Logan, UT) and stimulated or not with plastic-bound anti-CD3/CD28 mAbs. The viability of thymocytes was explored at different time points by trypan blue exclusion. The presence of lymph node CD4⁺ cells undergoing apoptosis at the indicated time points was assessed by annexinV staining (BD Biosciences). In some experiments mice were treated ip with 2 mg of dexamethasone sodium phosphate (American Regent Laboratories, Shirley, NY) and the number of CD4⁺CD8⁺ thymocytes was analyzed 48 h later by flow cytometry.

Western blotting

The expression levels of either dephosphorylated and phosphorylated NFATc2 (dNFAT and pNFAT) in comparison to those of β -actin and of phosphorylated I κ B (pI κ B), ERK-1/2 (pERK) and p38 (pp38) in comparison to those of total I κ B, ERK-2 and p38, respectively, were detected by Western blotting in cell lysates from purified CD4⁺ cells at different time points after in vitro stimulation with anti-CD3/CD28 mAbs, using specific antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). The relative band intensities of these proteins in comparison to their respective controls were determined by densitometry using ImageJ software.

Flow Cytometry

The percentages of T_H17 cells in the spleen of F1 non-Tg and F1-BCL2A1-TgT mice before and 21 days after col-II immunization and in the lamina-propria (LP) of non-immunized non-Tg-IL-17/GFP and BCL2A1-IL-17/GFP mice were determined by flow cytometry using commercially labeled antibodies (Biolegend and eBioscience). Intracellular cytokine staining was performed using an intracellular staining kit (BD Biosciences), as described previously [12]. Cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences).

Statistical analysis

Differences between 2 groups were analyzed by a 2-tailed Student's t or 2-sample Mann-Whitney U tests. Probability values <0.05 were considered significant.

Results

Overexpression of BCL2A1 in T cells inhibits the development of CIA

We first explored whether the T-cell overexpression of BCL2A1 changed the development of CIA. As previously described [12], F1-BCL2-TgT and non-Tg mice developed a mild or a severe CIA, respectively (Fig 1A). Interestingly, F1-BCL2A1-TgT mice also developed an attenuated CIA in comparison to F1 non-Tg controls (Fig 1A). The severity of different radiological signs associated with disease activity was clearly reduced in the joints of immunized F1-BCL2A1-TgT and F1-BCL2-TgT mice (Fig 1B and 1C). These radiological findings were



Fig 1. Protection against CIA in BCL2A1 Tg mice. Ten weeks-old F1-BCL2-TgT, F1-BCL2A1-TgT and control F1 non-Tg littermates, depleted or not of CD4⁺CD25⁺ Tregs after treatment with an anti-CD25 mAb, were immunized with col-II-CFA. (A) Clinical severity of arthritis in individual mice 8 weeks after col-II immunization. Bars represent mean values. (B) Representative radiological and histological (x10) images in the different experimental groups 8 weeks after immunization. (C) Radiological scores of different radiological signs associated with disease severity expressed as the mean \pm SD. Results from A to C are representative of five independent experiments. (D) Expression of mRNAs encoding for arthritogenic cytokines in the paws of non-immunized and untreated or anti-CD25 treated col-II-CFA immunized F1 non-Tg mice (closed bars) and F1-BCL2A1-TgT (open bars) 8 weeks after immunization analyzed by RT-qPCR. Results are expressed as the mean \pm SD fold change (n = 6–7 mice/group) of each cytokine relative to GAPDH expression measured in parallel in each sample. Statistic differences are indicated as follow: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001. When not indicated, differences did not reach statistical signification.

confirmed by histology, showing the presence of cartilage and bone destruction, synovitis and pannus formation in the joints of F1 non-Tg mice, but not of F1-BCL2A1-TgT and F1-BCL2-TgT mice (Fig 1B). A significant increase in the levels of mRNAs encoding for arthritogenic IL-1 β , TNF α , IL-6 and IL-17 cytokines was observed in the paws of F1 non-Tg mice, but not in those of F1-BCL2A1-TgT mice, 8 weeks after immunization with col-II (Fig 1D).

We have previously reported that Tregs were responsible for the protection against CIA in F1-BCL2-TgT mice [12]. In order to assess whether a similar mechanism operated in F1-BCL2A1-TgT mice, these animals were depleted in CD4⁺CD25⁺ Tregs with a cytotoxic anti-CD25 mAb. Unlike anti-CD25 treated F1-BCL2-TgT mice, the clinical, radiological and histological severity of CIA in F1-BCL2A1-TgT mice was not modified after this treatment (Fig 1A–1C), indicating that the protection was not mediated by Tregs. A significant exacerbation of CIA was also observed in anti-CD25 treated F1 non-Tg mice in association with an increased paw expression of IL-6 and IL-17 mRNAs but not of IL-1β and TNFα mRNAs

(Fig 1D). The reason for the discrepancy in the mechanism of CIA protection between both strains of Tg mice was not explained by differences in the capability of BCL2A1 and BCL2 to inhibit several forms of T-cell death. In fact, thymocytes and purified lymph node CD4⁺ cells from BCL2A1-TgT and BCL2-Tg mice showed an improved in vitro survival after culture in medium supplemented with 10% FCS compared with cells from non-Tg controls (Fig 2A and 2C; p<0.005). Furthermore, double positive thymocytes were almost entirely eliminated in non-Tg controls 48 hrs after ip injection of 2 mg of dexamethasone, whereas 84% and 75% of this population remained viable in BCL2-Tg and BCL2A1-TgT mice, respectively (Fig 2B). However, the death of lymph node CD4⁺ cells induced after anti-CD3/CD28 activation was not affected by BCL2A1 or BCL2 overexpression (Fig 2C; p>0.1).

The intensity and quality of anti-col II humoral immune responses were next compared between F1 non-Tg and F1-BCL2A1-TgT mice, treated or not with anti-CD25 mAb, by analyzing the levels of circulating IgG1 and IgG2a anti-col II antibodies. No differences in IgG1 anti-col II antibody responses were observed between the different experimental groups of immunized mice, independently of the treatment received (Fig 3). However, the circulating levels of IgG2a anti-col II antibodies were significantly decreased in F1-BCL2A1-TgT mice (Fig 3). To further confirm the effect of T-cell overexpression of BCL2A1 in IgG2a humoral immune responses, BCL2A1-TgT and non-Tg mice were immunized with the T-dependent antigen AHGG mixed with alum. Again, the levels of IgG2a anti-HGG antibodies, but not of IgG1 anti-HGG antibodies, were clearly reduced in BCL2A1-TgT mice in comparison to F1 non-Tg controls (Fig 3).

Activation status of CD4⁺ cells in BCL2A1-TgT mice

Based on previous observations in young BIM-deficient mice [10, 11], the in vitro activation of CD4⁺ cells was compared between BCL2A1-TgT and non-Tg mice. No differences in the anti-CD3/CD28-induced proliferation of CD4⁺ cells were observed between both strains of mice (³H-TdR counts in non-stimulated CD4⁺ cells from non-Tg mice: $0.3 \pm 0.1 \times 10^3$; from BCL2A1-TgT mice: $0.5 \pm 0.2 \times 10^3$; in anti-CD3/CD28 stimulated CD4⁺ cells from non-Tg mice: $12.8 \pm 3.2 \times 10^3$; from BCL2A1-TgT mice: $11.7 \pm 2.6 \times 10^3$). In addition, the kinetics of CD69 or CD25 induction in CD4⁺ cells after their activation were also similar in BCL2A1-TgT and non-Tg mice (Fig.4). We next studied the TCR-induced activation of MAPK, NF- κ B and NFAT pathways in CD4⁺ cells from BCL2A1-TgT and non-Tg mice. The activation-associated dephosphorylation of NFATc2 and phosphorylation of I κ B and ERK MAPK were similar in CD4⁺ cells from BCL2A1-TgT mice after anti-CD3/CD28 activation (Fig.5).

Selective in vitro and in vivo impairment of $T_{\rm H}17$ cell differentiation in BCL2A1-TgT mice

We explored whether the CD4⁺ activation defects observed in BCL2A1-TgT mice were associated with changes in their in vitro functional differentiation capability. To this end, naïve CD4⁺ cells from B6 non-Tg and BCL2A1-TgT mice were activated in vitro with anti-CD3/CD28 antibodies during 5 days under different polarization conditions [24]. No differences in the in vitro T_H1, T_H2 and Treg differentiation were observed between CD4⁺ cells from B6 non-Tg and BCL2A1-TgT mice (Fig 6A-6C). However, the in vitro T_H17 differentiation was significantly reduced in BCL2A1-TgT mice in comparison to non-Tg controls (Fig 6D).

We finally evaluated the $T_H 17$ differentiation/expansion in vivo. First, the percentages of $T_H 17$ cells were compared in the spleen of F1 non-Tg and F1-BCL2A1-TgT before (steady state) and after induction of CIA, a well-established model of $T_H 17$ -dependent autoimmune



Fig 2. Anti-apoptotic effects of T-cell overexpression of BCL2 and BCL2A1. (A) Overexpression of BCL2 or BCL2A1 increases thymocyte viability in vitro. Thymocytes from the different experimental groups were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. The percentage of viable thymocytes was assessed from day 0 to 3 by trypan blue exclusion. Results represent the mean of triplicate cultures ± SD for three independent experiments. (B) Overexpression of BCL2 or BCL2A1 blocks thymocyte dexamethasone-induced cell death in vivo. Mice were injected ip with 2 mg of dexamethasone and compared with control mice injected with PBS. Representative flow cytometry dot plots of CD4⁺CD8⁺ thymocytes 48 h after treatment. Mean values ± SD of this cell population in each experimental group (4 mice/group) from one out 3 independent experiments are indicated. (C) In vitro apoptosis of purified lymph node CD4⁺ cells from BCL2-TgT, BCL2A1-TgT and non-Tg mice stimulated (right) or not (left) with anti-CD3/CD28 mAbs. The percentage of annexinV⁺ apoptotic cells was assessed from day 0 to 3 by flow cytometry. Results represent the mean of triplicate cultures ± SD for three independent experiments.

PLOS ONE



Fig 3. Effect of T-cell overexpression of BCL2A1 in humoral immune responses. BCL2A1-TgT and non-Tg mice were immunized with col II-CFA or AHGG-alum. Serum levels of IgG1 and IgG2a anti-col II (upper panels) and anti-HGG antibodies (lower panels) were determined by ELISA before and after immunization. Results of individual mice and mean values in one of two independent experiments are represented. Statistic differences are indicated as follow: *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001. When not indicated, differences did not reach statistical signification.

disease [25, 26]. $T_H 17$ cells were barely detected before immunization with col-II emulsified with CFA in the spleen of both strains of mice but were significantly increased in F1 non-Tg mice after immunization (Fig 7A). This increase was even higher after depletion of CD4⁺CD25⁺ Tregs (Fig 7A). In correlation with the in vitro differentiation studies, the increase in $T_H 17$ cells after col-II immunization was more limited in F1-BCL2A1-TgT mice and was unaffected after anti-CD25 depletion (Fig 7A).

Because $T_H 17$ cells are almost undetectable in the spleen of non-immunized mice (Fig 7A), we further compare the percentages of $T_H 17$ cells in a location with a high representation of this cell population under homeostatic conditions. This is the case of the LP of the colon of non-manipulated mice [21]. To facilitate the detection of $T_H 17$ cells by flow cytometry, that normally requires the in vitro activation of T cells in the presence of a Golgi protein transport inhibitor [12], these experiments have been performed in IL-17/GFP reporter mice in which $T_H 17$ cells express GFP without the necessity of an additional in vitro activation (21). In these mice, the percentages of $T_H 17$ cells in the LP of the colon are significantly lower in BCL2A1-TgT mice than in non-Tg controls (Fig 7B).

Discussion

Natural or induced genetic mutations in cell death regulators or alterations in their expression pattern in immune cells have been associated with either the induction or the inhibition of



Fig 4. Effect of BCL2A1 overexpression in the kinetics CD69 and CD25 induction in activated CD4⁺ cells. Purified naïve CD4⁺ cells from BCL2A1-TgT and non-Tg mice were stimulated in vitro with anti-CD3/ CD28 mAbs and the kinetics of CD69 and CD25 induction in these cells were explored by flow cytometry. (A) Representative overlapping histograms of CD69 and CD25 expression in CD4⁺ cells from non-Tg (dotted line) and BCL2A1-TgT (solid line) at different time points after activation. (B) Mean ± SD of MFI values of CD69 and CD25 expression in CD4⁺ cells from non-Tg (open bars) and BCL2A1-TgT (closed bars) at different time points after activation. Results are representative of four independent experiments. When not indicated, differences did not reach statistical signification.

autoimmunity [1–5, 10, 11]. To gain insights into the potential mechanisms by which the inhibition of lymphocyte apoptosis conferred disease protection, in the present study we explored the effects of T-cell overexpression of BCL2A1 in the development of CIA. Our results demonstrated that BCL2A1-TgT mice developed an attenuated disease in association with an impaired differentiation of $T_H 17$ cells and a defective activation of p38 MAPK signaling pathway.

From previous studies and our present observation it can be inferred that the effects of dysregulating cell death in the control of lymphoid homeostasis are determined by the apoptotic pathway involved, by the cellular context where such defects occurs and by the age of the animal. Thus, the inhibition of the extrinsic apoptotic pathway results in the induction of autoimmunity [2, 3]. In contrast, the effects of inhibiting the intrinsic cell death pathway by the altered expression of BCL2 family members are clearly cellular dependent. Whereas the inhibition of B-cell apoptosis, observed in old BIM deficient mice or after the B-cell overexpression

PLOS ONE



Fig 5. Defective p38 MAPK activation in CD4⁺ cells from BCL2A1 Tg mice. CD4⁺ cells from BCL2A1-TgT and non-Tg mice were stimulated in vitro with anti-CD3/CD28 mAbs. The expression of dephosphorylated and phosphorylated NFATc2 (dNFAT and pNFAT, respectively) in comparison to that of β -actin, of phosphorylated IkB (pIkB) in comparison to total IkB and of phosphorylated ERK (pERK) and p38 (pp38) MAPKs in comparison to total ERK and p38 in CD4⁺ cells from BCL2A1-TgT and non-Tg mice at different time points after activation was determined by western blot (left panels). Right panels show mean ± SD of the relative band intensities of these proteins in comparison to their respective controls of three-five independent experiments. Statistic differences are indicated as follow: **p<0.01. When not indicated, differences did not reach statistical signification.

of BCL2, causes SLE in predisposed animals $[\underline{3}-\underline{5}]$, the dysregulation of this pathway in T cells blocks the development of autoimmune diseases in young BIM deficient mice or in BCL2- or BCLX-TgT mice $[\underline{10}-\underline{13}]$. Our present study showing that BCL2A1-TgT mice are protected against the development of CIA further support these observations. Although the consequences of BCL2A1 overexpression in B cells are still unknown, it has been reported that its expression is upregulated after BCR signaling and in patients with SLE $[\underline{27}, \underline{28}]$.

It was reported in a murine model of proteoglycan-induced arthritis that disease severity inversely correlated with the extent of activation-induced cell death (AICD) [<u>29</u>, <u>30</u>], an apoptotic process dependent on cell death receptor and extrinsic apoptotic pathways [<u>7</u>, <u>31</u>]. However, it should be remarked that AICD induction in peripheral CD4⁺ cells was not affected by BCL2 or BCL2A1 overexpression that otherwise efficiently inhibited other forms of T-cell

PLOS ONE



Fig 6. BCL2A1 selectively inhibits in vitro T_H17 differentiation. Naïve CD4⁺ cells from BCL2A1-TgT and non-Tg mice were stimulated under T_H1 (A), T_H2 (B), Treg (C) or T_H17 (C) polarization conditions. Representative flow cytometry dot plots or histograms and percentages of CD4⁺IFN⁺ (T_H1 ; A), CD4⁺GATA-3⁺ (T_H2 ; B) CD4⁺FoxP3⁺ (Treg; C) and CD4⁺IL-17⁺ (T_H17 ; D) cells after 5 days of culture. Cultures under T_H0 conditions are included for comparison. Results of multiple experiments are also plotted together. Mean values are indicated. Statistic differences are indicated as follow: **p<0.01. When not indicated, differences did not reach statistical signification.

death. These observations suggested that the cell death inhibitory activities of BCL2 and BCLA1 were not responsible for the protection against CIA development observed in both strains of Tg mice. Instead, the present and previous studies were compatible with a model in which disease protection could be mechanistically linked with the role that each particular BCL2 family member might play in the regulation of CD4⁺ cell activation and/or functional differentiation. While the protection against autoimmune diseases in mice overexpressing BCL2 in T cells was secondary to the capacity of this anti-apoptotic molecule to control the expression of the cell cycle inhibitor $p27^{kip1}$ that in turn, regulated the differentiation and activity of Tregs [12], the protection observed in young, but not old, BIM^{-/-} [5, 10, 11] and in BCL2A1 TgT mice was associated with defects in the activation at different levels ([10, 11] and the present study).

It has been clearly demonstrated the crucial role played by $T_H 17$ cells in the pathogenesis of inflammatory/autoimmune diseases [25, 26]. The combination of genome-wide transcription



Fig 7. Effect of T-cell overexpression of BCL2A1 in T_H17 induction under pro-inflammatory or homeostatic conditions. (A) Induction of T_H17 cells during CIA and effect of anti-CD25 treatment. BCL2A1-TgT and non-Tg mice were immunized with col-II-CFA and treated or not with an anti-CD25 mAb. The percentages of T_H17 in the spleen before and 3 weeks after immunization were determined by flow cytometry. (B) Percentages of TH17 cells in the LP of the colon of non-manipulated BCL2A1-TgT-IL-17/GFP and non-Tg-IL-17/GFP mice determined by flow cytometry. In A and B left panels show dot plots and percentages in one representative animal and right panels shows individual percentages of these cells in a group of mice from one of 3–4 independent experiments, respectively. Mean values are indicated. Statistic differences are indicated as follow: **p<0.01, ***p<0.001. When not indicated, differences did not reach statistical signification.

factor occupancy studies with gene expression profiles in both purified $T_{\rm H}17$ populations and single $T_H 17$ cells allow the characterization of a genetic regulatory network accounting for T_{H} 17 differentiation [32, 33]. One interesting observation of these studies is that the expression of BCL2A1 appears downregulated during $T_H 17$ differentiation [32, 33]. In addition, all-trans retinoic acid or retinoic X receptor agonists, that inhibit T_H17 differentiation [34-36], are potent transcriptional inducers of BCL2A1 expression [37-39]. However, the biological significance of such findings in terms of T_H17 differentiation is unknown. Our present study describes for the first time a functional role for BCL2A1 in the differentiation of $T_{\rm H}17$ cells. Thus, the in vitro $T_H 17$ differentiation of activated CD4⁺ cells is severely reduced in BCL2A1-TgT mice as well as their in vivo induction under homeostatic or inflammatory condition in the intestinal LP of non-manipulated mice and in the spleen of animals during CIA induction, respectively. Moreover, a selective impairment of IgG2a humoral immune responses, which have been associated with $T_H 17$ cells [40, 41], is observed in these Tg mice. This last aspect may be particularly relevant in our study since B cells and antibodies are involved in the development of CIA in mice [42, 43]. Also, it has been demonstrated that the capacity of IgG autoantibodies to promote tissue damage is greatly influenced by the IgG subclass. By comparing

the capacity to induce hemolytic anemia of several IgG isotype-switch variants of a pathogenic anti-red blood cell autoantibody, Fossati-Jimack et al have demonstrated in an elegant study that the IgG2a switch variant is about 20 times more pathogenic than the IgG1 variant [44], and that the distinct pathogenicity of these variants correlates with the different affinities of IgG2a and IgG1 antibodies for Fc γ receptors, promoting antibody-dependent cellular cytotoxicity [45], and with the higher capacity of IgG2a antibodies to activate the complement cascade [46]. Consistent with this, we propose here that through the inhibition of T_H17-associated cytokine production and their effects in the control of cellular inflammatory responses or bone remodeling [26, 47], and through the qualitative modulation of humoral immune responses, the reduced T_H17 differentiation can be responsible for the protection against CIA in BCL2A1 TgT mice.

Concerning the mechanism involved in the regulation of $T_H 17$ differentiation by BCL2A1, we demonstrate that the overexpression of this anti-apoptotic molecule affects the TCRinduced activation of p38 MAPK in CD4⁺ cells, but not of ERK MAPK or the NF- κ B and NFAT signaling pathways. Interestingly, different reports have demonstrated the importance of p38 MAPK for the differentiation and function of $T_{\rm H}17$ cells both in humans and mice [48– 50]. Although we have not clarified in our study how BCL2A1 may control p38 MAPK activation, we speculate that it may be related to its hypothetical capacity to directly or indirectly bind with or inhibit relevant intermediates required for the activation of this MAPK after TCR signaling. In this regard, BCL2A1 can be located in the cytosol of the cell and its expression is rapidly induced in CD4⁺ cells following TCR stimulation [19, 51]. This phenomenon, that has been initially proposed to be essential for the survival of $CD4^+$ cells after their activation [51], may also play a role modulating their capacity to differentiate into potentially harmful proinflammatory $T_H 17$ cells during an autoimmune response. In addition to the regulation of p38 MAPK activation, BCL2A1 could modulate the differentiation of T_H17 by other complementary mechanisms. In this regard, it can be mentioned that BCL2A1 interacts with the BH3-like protein Beclin-1, thus potentially contributing to the inhibition of autophagy [52] and that Beclin-1-deficient mice fail to mount autoreactive T-cell responses and are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis in association with a reduction in $T_H 17$ and $T_H 1$ cells [53]. Clearly, the characterization of the BCL2A1 interactome would help to elucidate the mechanism/s involved in the $T_H 17$ regulatory effect of BCL2A1 and to precisely identify this cell death regulator as a potential relevant target for the activation/differentiation of CD4⁺ cells and for the control of autoimmune diseases. Experiments are in progress to address these important questions.

Acknowledgments

We thank Dr M B. Prystowsky, Albert Einstein College of Medicine and Montefiore Medical Center, New York and Dr R. A. Flavell, Yale University School of Medicine, New Haven, for providing us with the B6-BCL2A1-TgT and B6-IL-17A-IRES-eGFP reporter mice, respectively. We also thank María Aramburu, Natalia Cobo and Iván Gómez for technical assistance and Dr E. Tamayo for critical comments.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RM JM. Performed the experiments: MI JJA PA IS JP. Analyzed the data: RM JM MI. Contributed reagents/materials/analysis tools: RM JM MI JJA. Wrote the paper: RM JM MI.

References

- 1. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. Immunol Today. 1995; 16: 39–43. PMID: 7533498
- Bidère N, Su HC, Lenardo MJ. Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. Annu Rev Immunol. 2006; 24: 321–352. PMID: 16551252
- Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S, et al. Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 8661–8665. PMID: <u>1924327</u>
- Marquina R, Diez MA, Lopez-Hoyos M, Buelta L, Kuroki A, Kikuchi S, et al. Inhibition of B cell death causes the development of an IgA nephropathy in (New Zealand white x C57BL/6)F(1)-bcl-2 transgenic mice. J Immunol. 2004; 172: 7177–7185. PMID: <u>15153542</u>
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC, Tarlinton DM, Kay TW, Köntgen F, et al. Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. Science. 1999; 286: 1735–1738. PMID: 10576740
- Marsden VS, Strasser A. Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 71–105. PMID: <u>12414721</u>
- Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. Nature. 1995; 373: 444–448. PMID: <u>7530337</u>
- Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, et al. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. Nature. 2002; 415: 922–926. PMID: <u>11859372</u>
- Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Bouillet P, Strasser A, Kappler J, et al. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. Immunity. 2002; 16: 759–767. PMID: <u>12121658</u>
- Ludwinski MW, Sun J, Hilliard B, Gong S, Xue F, Carmody RJ, et al. Critical roles of Bim in T cell activation and T cell-mediated autoimmune inflammation in mice. J Clin Invest. 2009; 119: 1706–1713. doi: <u>10.1172/JCI37619</u> PMID: <u>19411758</u>
- Yu Y, Yu J, Iclozan C, Kaosaard K, Anasetti C, Yu XZ. Bim is required for T-cell allogeneic responses and graft-versus-host disease in vivo. Am J Blood Res. 2012; 2: 77–85. PMID: 22432091
- Iglesias M, Postigo J, Santiuste I, González J, Buelta L, Tamayo E, et al. p27(Kip1) inhibits systemic autoimmunity through the control of Treg cell activity and differentiation. Arthritis Rheum. 2013; 65: 343–354. doi: <u>10.1002/art.37778</u> PMID: <u>23124840</u>
- Sharabi A, Lapter S, Mozes E. Bcl-xL is required for the development of functional regulatory CD4 cells in lupus-afflicted mice following treatment with a tolerogenic peptide. J Autoimmun. 2010; 34: 87–95. doi: 10.1016/j.jaut.2009.06.002 PMID: 19596183
- Lanave C, Santamaria M, Saccone C. Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. Gene. 2004; 333: 71–79. PMID: 15177682
- Greider C, Chattopadhyay A, Parkhurst C, Yang E. BCL-x(L) and BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. Oncogene. 2002; 21: 7765–7775. PMID: <u>12420213</u>
- Gonzalez J, Orlofsky A, Prystowsky MB. A1 is a growth-permissive antiapoptotic factor mediating postactivation survival in T cells. Blood. 2003; 101: 2679–2685. PMID: 12406903
- Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. Cancer Res. 1994; 54: 2468–2471. PMID: 8162596
- Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, Neubert K, Stein R, Borner C. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. J Cell Biol. 2003; 160: 53–64. PMID: 12515824
- Werner AB, de Vries E, Tait SW, Bontjer I, Borst J. Bcl-2 family member BfI-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit is collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax. J Biol Chem. 2002; 277: 22781–22788. PMID: 11929871
- Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. BCL2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. Cell. 1991; 67: 879–888. PMID: <u>1835668</u>
- 21. Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. Nature. 2011; 475: 514–518. doi: <u>10.1038/nature10228</u> PMID: <u>21765430</u>
- Postigo J, Genre F, Iglesias M, Fernández-Rey M, Buelta L, Carlos Rodríguez-Rey J, et al. Exacerbation of type II collagen-induced arthritis in apolipoprotein E-deficient mice in association with the expansion of Th1 and Th17 cells. Arthritis Rheum. 2011; 63: 971–980. doi: <u>10.1002/art.30220</u> PMID: <u>21225684</u>

- 23. Fossati L, Iwamoto M, Merino R, Izui S. Selective enhancing effect of the Yaa gene on immune responses against self and foreign antigens. Eur J Immunol. 1995; 25: 166–173. PMID: 7843228
- 24. Postigo J, Iglesias M, Álvarez P, Augustin JJ, Buelta L, Merino J, et al. Bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor, a transforming growth factor β rheostat that controls murine Treg cell/Th17 cell differentiation and the development of autoimmune arthritis by reducing interleukin-2 signaling. Arthritis Rheumatol. 2016; 68: 1551–1562. doi: 10.1002/art.39557 PMID: 26714180
- Röhn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, et al. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. Eur J Immunol. 2006; 36: 2857–2867. PMID: <u>17048275</u>
- Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renauld JC, et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. Arthritis Rheum. 2009; 60: 390–395. doi: <u>10.1002/art.24220</u> PMID: <u>19180498</u>
- Wen R, Chen Y, Xue L, Schuman J, Yang S, Morris SW, et al. Phospholipase Cgamma2 provides survival signals via Bcl2 and A1 in different subpopulations of B cells. J Biol Chem. 2003; 278: 43654–43662. PMID: 12928432
- Andre J, Cimaz R, Ranchin B, Galambrun C, Bertrand Y, Bouvier R, et al. Overexpression of the antiapoptotic gene Bfl-1 in B cells from patients with familial systemic lupus erythematosus. Lupus. 2007; 16: 95–100. PMID: 17402365
- Boldizsar F, Kis-Toth K, Tarjanyi O, Olasz K, Hegyi A, Mikecz K, et al. Impaired activation-induced cell death promotes spontaneous arthritis in antigen (cartilage proteoglycan)-specific T cell receptor-transgenic mice. Arthritis Rheum. 2010; 62: 2984–2994. doi: <u>10.1002/art.27614</u> PMID: <u>20564001</u>
- Olasz K, Boldizsar F, Kis-Toth K, Tarjanyi O, Hegyi A, van Eden W, et al. T cell receptor (TCR) signal strength controls arthritis severity in proteoglycan-specific TCR transgenic mice. Clin Exp Immunol. 2012; 167: 346–355. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04506.x PMID: 22236012
- Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. Curr Opin Immunol. 2002; 14: 354–359. PMID: <u>11973134</u>
- Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, Mace K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. Cell. 2012; 151: 289–303. doi: <u>10.1016/j.cell.2012.09.016</u> PMID: <u>23021777</u>
- Gaublomme JT, Yosef N, Lee Y, Gertner RS, Yang LV, Wu C, et al. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. Cell. 2015; 163: 1400–1412. doi: <u>10.1016/j.cell.2015.11</u>. 009 PMID: <u>26607794</u>
- Takeuchi H, Yokota-Nakatsuma A, Ohoka Y, Kagechika H, Kato C, Song SY, et al. Retinoid X receptor agonists modulate Foxp3⁺ regulatory T cell and Th17 cell differentiation with differential dependence on retinoic acid receptor activation. J Immunol. 2013; 191: 3725–3733. doi: <u>10.4049/jimmunol.</u> <u>1300032</u> PMID: <u>23980207</u>
- Chandraratna RA, Noelle RJ, Nowak EC. Treatment with retinoid X receptor agonist IRX4204 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. Am J Transl Res. 2016; 8: 1016–1026. PMID: 27158387
- **36.** Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science. 2007; 317: 256–260. PMID: 17569825
- Liu TX, Zhang JW, Tao J, Zhang RB, Zhang QH, Zhao CJ, et al. Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. Blood. 2000; 96: 1496– 1504. PMID: 10942397
- Jing Y, Wang L, Xia L, Chen GQ, Chen Z, Miller WH et al. Combined effect of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cells in vitro and in vivo. Blood. 2001; 97: 264–269.
 PMID: <u>11133770</u>
- Rasooly R, Schuster GU, Gregg JP, Xiao JH, Chandraratna RA, Stephensen CB. Retinoid x receptor agonists increase bcl2a1 expression and decrease apoptosis of naïve T lymphocytes. J Immunol. 2005; 175: 7916–7929. PMID: <u>16339527</u>
- Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. Nat Immunol. 2008; 9: 166–175. PMID: <u>18157131</u>
- Mitsdoerffer M, Lee Y, Jäger A, Kim HJ, Korn T, Kolls JK, et al. Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107: 14292–14297. doi: <u>10.1073/pnas.</u> <u>1009234107</u> PMID: <u>20660725</u>
- Yanaba K, Hamaguchi Y, Venturi GM, Steeber DA, St Clair EW, Tedder TF. B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. J Immunol. 2007; 179: 1369–1380. PMID: 17617630

- Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collageninduced arthritis (CIA). Clin Exp Immunol. 1998; 111: 521–526. PMID: <u>9528892</u>
- 44. Fossati-Jimack L, Ioan-Facsinay A, Reininger L, Chicheportiche Y, Watanabe N, Saito T, et al. Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fcγ receptor III. J Exp Med. 2000; 191: 1293–1302. PMID: <u>10770797</u>
- 45. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. Annu Rev Immunol. 2001; 19: 275–290. PMID: 11244038
- Neuberger MS, Rajewsky K. Activation mouse complement by monoclonal mouse antibodies. Eur J Immunol. 1981; 11: 1012–1016. PMID: <u>7327198</u>
- 47. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol. 2014; 32: 121– 155.
- Lu L, Wang J, Zhang F, Chai Y, Brand D, Wang X, et al. Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. J Immunol. 2010; 184: 4295–4306. doi: <u>10.4049/</u>jimmunol.0903418 PMID: <u>20304828</u>
- Noubade R, Krementsov DN, Del Rio R, Thornton T, Nagaleekar V, Saligrama N, et al. Activation of p38 MAPK in CD4 T cells controls IL-17 production and autoimmune encephalomyelitis. Blood. 2011; 118: 3290–3300. doi: <u>10.1182/blood-2011-02-336552</u> PMID: <u>21791428</u>
- Di Mitri D, Sambucci M, Loiarro M, De Bardi M, Volpe E, Cencioni MT, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase cascade modulates T helper type 17 differentiation and functionality in multiple sclerosis. Immunology. 2015; 146: 251–263. doi: <u>10.1111/imm.12497</u> PMID: <u>26095162</u>
- Verschelde C, Michonneau D, Trescol-Biemont MC, Berberich I, Schimpl A, Bonnefoy-Berard N. Overexpression of the antiapoptotic protein A1 promotes the survival of double positive thymocytes awaiting positive selection. Cell Death Differ. 2006; 13: 1213–1221. PMID: <u>16294210</u>
- 52. Kathania M, Raje CI, Raje M, Dutta RK, Majumdar S. Bfl-1/A1 acts as a negative regulator of autophagy in mycobacteria infected macrophages. Int J Biochem Cell Biol. 2011; 43: 573–585 doi: <u>10.1016/j.</u> <u>biocel.2010.12.014</u> PMID: <u>21167304</u>
- 53. Kovacs JR, Li C, Yang Q, Li G, Garcia IG, Ju S, et al. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. Cell Death Differ. 2012; 19: 144–152. doi: <u>10.1038/</u> <u>cdd.2011.78</u> PMID: <u>21660048</u>

Bone Morphogenetic Protein and Activin Membrane–Bound Inhibitor, a Transforming Growth Factor β Rheostat That Controls Murine Treg Cell/Th17 Cell Differentiation and the Development of Autoimmune Arthritis by Reducing Interleukin-2 Signaling

Jorge Postigo,¹ Marcos Iglesias,¹ Pilar Álvarez,² Juan Jesús Augustin,² Luis Buelta,¹ Jesús Merino,¹ and Ramón Merino²

Objective. Transforming growth factor β (TGF β) plays a prominent role in the establishment of immunologic tolerance, and mice lacking TGF β 1 die of multiorgan inflammation early in life. TGF β controls the differentiation of CD4+ lymphocytes into Treg cells or proinflammatory Th17 cells. Although this dual capacity is modulated by the presence of additional cytokines around the activated cells, TGF β also dissociates Th17/ Treg cell differentiation in a dose-dependent manner by mechanisms still unknown. The purpose of this study was to explore the contribution of bone morphogenetic protein and activin membrane–bound inhibitor (BAMBI) to the modulation of TGF β activity during the differentiation of CD4+ cells and in the control of immunologic tolerance in mice with collagen-induced arthritis (CIA).

Methods. The in vitro and in vivo Treg cell and Th17 cell differentiation and the development of CIA were compared in wild-type mice and BAMBI-deficient mice. *Results.* BAMBI was induced after activation by TGF β and fixed the appropriate intensity level of TGF β signaling in CD4+ cells. Its deficiency protected mice against the development of CIA by a Treg cell– and TGF β -dependent mechanism. Mechanistically, BAMBI was found to regulate CD25 expression and interleukin-2 (IL-2) signaling in Treg cells and in IL-2– and/or TGF β -activated CD4+ cells and modulated Treg cell and Th17 cell differentiation both in vitro and in vivo.

Conclusion. Taken together, the results indicate that BAMBI is a component of a rheostat-like mechanism that, through the control of TGF β and IL-2 signaling strength, regulates the differentiation of CD4+ lymphocytes and the development of autoimmune arthritis.

Members of the transforming growth factor β (TGF β) family are pleiotropic cytokines that have multiple activities on adaptive immunity (1). Although the development of an early, lethal inflammatory disease in mice deficient in TGF β 1 or with a T cell–specific deletion of TGF β receptor type II (2–5) clearly indicates that this growth factor is a potent negative regulator of T cell activity, TGF β is more than an immunosuppressive cytokine. It drives the conversion of CD4+ lymphocytes into either Treg cells or Th17 cells (6–10), two lymphoid subpopulations with opposing roles in the control of immunologic homeostasis and tolerance (11–13). The copresence of other cytokines around the activated CD4+ cells appears to be the major factor that modulates this apparent puzzling capacity of TGF β .

In the presence of interleukin-6 (IL-6), as well as IL-23, IL-1 β , and/or IL-21, TGF β promotes Th17 cell differentiation, whereas in the absence of such a

Supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-34059 to Dr. J. Merino and SAF2011-22463 and SAF2014-55088-R to Dr. R. Merino), which were cofunded by the European Regional Development Fund. Dr. Iglesias' work was supported in part by a grant from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (IPT2011-1527-010000) in association with FibroStatin SL.

¹Jorge Postigo, PhD, Marcos Iglesias, PhD, Luis Buelta, MD, PhD, Jesús Merino, MD: IDIVAL and Universidad de Cantabria, Santander, Spain; ²Pilar Álvarez, BS, Juan Jesús Augustin, BS, Ramón Merino, MD, PhD: IDIVAL and Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC, Universidad de Cantabria, Santander, Spain.

Address correspondence to Ramón Merino, MD, PhD, Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Universidad de Cantabria, Calle Albert Einstein 22, PCTCAN, 39011 Santander, Spain. E-mail: merinor@unican.es.

Submitted for publication June 1, 2015; accepted in revised form December 15, 2015.

proinflammatory milieu and together with IL-2, TGF β induces the production of Treg cells (6,8–10,14,15). However, it was recently demonstrated that at least in vitro, TGF β also dissociates Treg cell/Th17 cell differentiation in a dose-dependent manner (16). This observation is compatible with the existence in or around activated CD4+ cells of a molecular machinery that in addition to the cytokine environment, influences their Treg cell/Th17 cell differentiation capacity through the regulation of TGF β availability and/or signaling strength. The exact molecular composition and the mechanism of action of such machinery, however, remain unknown.

Members of the TGF β family signal through specific membrane-bound TGF β type I and type II receptors that, in the presence of a ligand, form heterocomplexes that transduce the signal through Smad-dependent and Smad-independent pathways (17). Among the molecules that modulate TGF^β signaling, bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), a transmembrane protein that is structurally similar to TGF β type I receptors but lacks the kinase domain required for signaling (18), antagonizes TGFB family signals by preventing the formation of active receptor complexes upon ligand binding. Although several reports have indicated that aberrant BAMBI expression can be involved in inflammatory responses associated with infection (19) and fibrosis (20), no data are currently available concerning the expression and function of BAMBI in immune cells.

In the present study, we characterized the expression pattern and activity of BAMBI in CD4+ cells from BAMBI-knockout (KO) mice (21). Our results demonstrated that BAMBI is a component of a rheostat-like machinery in CD4+ lymphocytes that, through the regulation of TGF β and IL-2 signaling strength, controls the differentiation of Treg cells and Th17 lymphocytes and the development of autoimmune diseases.

MATERIALS AND METHODS

Animals. C57BL/6 (B6) and B10.RIII mice were obtained from Charles River. The 129SvJ/B6 BAMBI-KO mice were generated as described previously (21) and backcrossed to the B6 strain up to the twelfth generation and to the B10.RIII strain up to the seventh generation. Genotyping of mice was performed by polymerase chain reaction (PCR) of genomic DNA from the tail. All animal care and experimental procedures were in accordance with institutional guidelines and were approved by the Universidad de Cantabria Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee (ref 2014/12).

Production of anti-BAMBI monoclonal antibodies (mAb). B6.BAMBI-KO mice were immunized intraperitoneally with the mouse BAMBI^{109–133} peptide conjugated to keyhole limpet hemocyanin (Eurogentec). Spleen cells from immunized mice were fused to the nonsecreting SP2/O-Ag14 myeloma cell line. The anti-BAMBI-secreting hybridomas B101.37 (mouse IgG1 κ) and B143.14 (mouse IgM κ) were selected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and their specificity was further evaluated by Western blotting using cell membrane lysates from the hearts of B6.WT mice and B6. BAMBI-KO mice.

Induction and assessment of collagen-induced arthritis (CIA) and in vivo treatments. Male B10RIII.WT and B10RIII.BAMBI-KO mice (8–12-weeks old) were immunized at the base of the tail with 150 μ g of bovine type II collagen (CII; MD Biosciences) emulsified with Freund's complete adjuvant containing 4 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* (MD Biosciences). Clinical, radiologic, and histologic evaluation of arthritis was performed as described previously (22,23). Before and 8 weeks after CII immunization, the expression of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor (TNF), IL-6, and IL-17A cytokines in the joint was explored by real-time quantitative reverse transcription–PCR as described previously (22). Results were normalized to GAPDH expression and were measured in parallel in each sample. Studies were performed in triplicate.

For CD4+CD25+ Treg cell depletion, mice were treated intraperitoneally with anti-CD25 mAb (clone PC61, 0.5 mg/week) from day 15 after CII immunization up to the end of the experiment, as described previously (23). For in vivo TGF β inhibition, mice were injected subcutaneously with 100 μ g of an anti-TGF β mAb (clone 1D11, mouse IgG1) in the right hind paws every 2 days from the time of CII immunization until the end of the experiment. The left hind paws were similarly treated with a mouse IgG1 anti-trinitrophenol isotype control mAb (IgG1-C).

IL-2/anti–IL-2 immune complexes (ICs) containing S4B6 or JES6-1A12 anti–IL-2 mAb were prepared as described previously (24). Two-month-old mice were treated for 3 consecutive days with 6 μ g of IL-2 ICs, and the effects on T cell populations in the spleen were evaluated 5 days later by flow cytometry.

Cell cultures. Naive CD4+CD25-CD62L+CD44cells and Treg cells obtained from the different strains of mice were purified by cell sorting with a FACSAria (BD Biosciences). Dendritic cells (DCs) from mouse spleens were digested with collagenase and DNase (Roche Life Sciences), labeled with anti-CD11c magnetic beads (Miltenyi Biotec), and purified by magnetic-activated cell sorting (>95% purity). Antigen-presenting cells were derived from irradiated spleen cells obtained from B6.WT mice.

For the differentiation cultures, 5×10^5 naive CD4+ cells were stimulated for 3 or 5 days with plastic-bound anti-CD3 mAb (1 µg/well) or anti-CD28 mAb (0.5 µg/well) under the following polarization conditions, using recombinant cytokines (PeproTech) and antibodies: for Th1 differentiation, 5 ng/ml of murine interferon- γ (IFN γ), 20 ng/ml of human IL-12, 1 ng/ml of murine IL-2, and 20 µg/ml of anti-mouse IL-4 mAb (clone 11B11); for Th2 differentiation, 5 ng/ml of murine IL-4, 1 ng/ml of murine IL-2, and 20 µg/ml of antimouse IFN γ mAb (clone R4-6A2); for Treg cell differentiation, 2 ng/ml of murine TGF β in the presence or absence of 1 ng/ml of murine IL-2, 20 ng/ml of human follistatin, 20 ng/ml of murine IgM (Sigma); and for Th17 cell differentiation, 1 ng/ml of murine TGF β , 10 or 50 ng/ml of murine IL-6, in the presence or absence of 20 ng/ml of human follistatin, 20 ng/ml of murine Noggin, 20 μ g/ml of anti–IL-2 (clone S4B6), or different concentrations of B143.14 mAb or murine IgM.

The percentages of CD4+IFN γ + or CD4+T-bet+ (Th1), CD4+IL-4+ or CD4+GATA-3+ (Th2), CD4+ Fox P3+ (Treg), and CD4+IL-17+ or CD4+ROR γ t+ (Th17) cells at the end of the culture periods were evaluated by flow cytometry using commercially labeled antibodies (BioLegend and eBioscience). In vitro Treg cell and Th17 cell polarization was further studied after the coculture of different combinations of B6.WT or B6.BAMBI-KO naive CD4+ cells (5 × 10⁵) and DCs (5 × 10⁵) stimulated for 5 days with soluble anti-CD3 (1 μ g/ well) under the above-described polarization conditions.

For the assessment of Treg cell activity, cell-sorted purified CD4+CD25- cells (5 \times 10⁴) from wild-type (WT) mice were cultured in triplicate over 3 days in complete RPMI 1640 medium and stimulated with 0.5 μ g/ml of anti-CD3 mAb in the presence of 5×10^4 WT antigen-presenting cells and decreasing ratios of B6.WT or B6.BAMBI-KO Treg cells. Cultures were pulsed with 1 μ Ci of ³H-thymidine for the final 6 hours of culture, harvested, and counted. For the induction of CD25, naive CD4+ cells from B6.WT and B6.BAMBI-KO mice were activated for 1, 3, or 5 days with anti-CD3/CD28 mAb under the above-described Treg cell/Th17 cell polarization conditions in the presence or absence of a 3 μM concentration of specific inhibitor of Smad-3 (SIS-3; Sigma) (25). The expression of CD25 was analyzed by flow cytometry. IL-2 production by CD4+ cells from B6.WT or B6.BAMBI-KO mice was measured by ELISA (BioLegend) in culture supernatants following stimulation for 24 hours with anti-CD3 or anti-CD3 and anti-CD28 mAb.

Assessment of TGFβ and IL-2 signaling. CD4+ cells from B6.WT and B6.BAMBI-KO mice were left unactivated or were activated with anti-CD3/CD28 mAb for 1 hour or 24 hours in the presence or absence of different combinations of TGFβ and IL-2. Levels of phosphorylated Smad-3 were assessed using an α-screen pSmad-3 (Ser⁴²³/Ser⁴²⁵) assay kit (PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions. Expression levels of pERK-1/2 (sc-7283) and p-p38 (sc-7975-R) in comparison to those of total ERK-2 (sc-154) and total p38 (sc-7149) MAPKs were detected by Western blotting using specific antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The expression of pSTAT-5 was measured by flow cytometry using Alexa Fluor 647–conjugated mouse anti–STAT-5 (pY694) antibody (BD Biosciences).

Flow cytometry. The percentages and numbers of the different T and B cell populations either in vitro or in vivo and the expression of CD25, neuropilin 1, CD122, and FoxP3 in Treg cells were explored in B6.WT and B6.BAMBI-KO mice by flow cytometry using commercially labeled antibodies (BioLegend and eBioscience). Intracellular cytokine staining was performed using an intracellular staining kit (BD Biosciences) as described previously (23). The expression of BAMBI in activated CD4+ cells from B6.WT mice was explored using biotinylated B101.37 mAb. Cells from B6. BAMBI-KO mice stained with biotinylated B101.37 and cells from B6.WT mice stained with a biotinylated mouse IgG1 isotype control were used as negative controls. Cells were analyzed in a FACSCanto II flow cytometer using FACSDiva software (BD Biosciences).

Statistical analysis. Differences between 2 groups were analyzed by Student's 2-tailed *t*-test or the Mann-

Whitney 2-sample U test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Characterization of BAMBI expression in CD4+ cells. The specificity of 2 mouse anti-mouse BAMBI mAb (clone B101.37 [IgG1] and clone B143.14 [IgM]) obtained from B6.BAMBI-KO mice immunized with the murine BAMBI^{109–133} peptide was evaluated by Western blotting. Both mAb recognized bands of ~27– 29 kd and 54 kd, which are compatible with BAMBI monomers and dimers resistant to sodium dodecyl sulfate and reducing conditions, respectively, as described previously (26), in heart cell membrane lysates from B6.WT mice, but not B6.BAMBI-KO mice (Figure 1A).

BAMBI expression was not detected by flow cytometry in naive CD4+ cells from B6 WT mice, but it was induced 48 hours after their activation in vitro with anti-CD3/CD28 antibodies (Figure 1B). TGF β , but not IL-2, further enhanced BAMBI expression only in activated lymphocytes (Figure 1B). As expected, similar negative labeling was observed in activated CD4+ cells from B6.BAMBI-KO mice stained with B101.37 and from B6.WT mice stained with a mouse IgG1 isotype control antibody, respectively (Figure 1B).

BAMBI deficiency and enhanced Smad-dependent and Smad-independent TGFB signaling pathways in CD4+ cells. Because BAMBI is expressed in activated CD4+ cells, we explored its potential functionality using BAMBI-KO mice. An initial comparison between B6. BAMBI-KO and B6.WT control mice showed a similar distribution of B and T lymphoid populations in secondary lymphoid organs (Supplementary Figure 1, available on the Arthritis & Rheumatology web site at http://online library.wiley.com/doi/10.1002/art.39557/abstract). It has been shown that TGFB activates Smad-dependent pathways involving Smad-2 and Smad-3 (17). CD4+ cells from B6.BAMBI-KO mice were stimulated with anti-CD3/28 antibodies in the presence of low doses or high doses of TGF β and exhibited higher levels of pSmad-3 than did CD4+ cells from B6.WT mice (Figure 2A), which indicates enhanced Smad-dependent TGFB signaling in these animals (17,21). TGF β has also been shown to signal through Smad-independent cascades that result in the activation of MAPK, among other signal transducers (17). In anti-CD3/28-stimulated CD4+ cells, TGF^β induced the activation of ERK and JNK but not p38 MAPKs (27). Consistent with this, anti-CD3/28 and TGF β stimulation of CD4+ cells resulted in higher levels of pERK, but not p-p38, in B6.BAMBI-KO than in B6.WT mice (Figure 2B).



Figure 1. Regulation of bone morphogenetic protein and activin membrane–bound inhibitor (BAMBI) expression in CD4+ cells. **A**, Specificity of B101.37 and B143.14 anti-mouse BAMBI monoclonal antibodies (mAb), as determined by Western blotting in cell membrane lysates from the heart of B6 wild-type (B6.WT) and B6 BAMBI–knockout (B6.BAMBI-KO) mice. **B**, Flow cytometry of CD4+ cells from B6.WT mice (solid lines) and B6.BAMBI-KO mice (dotted lines). Cells were left unactivated or were activated with transforming growth factor β 1 (TGF β 1; 0.5 μ *M* or 2 μ *M*), anti-CD3/CD28, either alone or in the presence of TGF β 1, interleukin-2 (IL-2), or both. At 48 hours after activation, cells were labeled with biotinylated B101.37 mAb (top), and the mean florescence intensity (MFI) was determined. The binding of B101.37 mAb to CD4+ cells from B6.BAMBI-KO mice was also compared to the binding of mouse IgG1 isotype control to CD4+ cells from B6.WT mice (bottom). Results are representative of 3 independent experiments.

BAMBI deficiency and protection against the development of CIA. We next compared the development of CIA in B10.RIII males deficient or not deficient in BAMBI. The incidence and severity of CIA were higher in B10RIII.WT mice than in B10RIII.-BAMBI-KO mice (Figure 3A). With the exception of



Figure 2. BAMBI regulation of TGF β signaling intensity in CD4+ cells. Purified naive CD4+ cells from B6.WT and B6.BAMBI-KO mice were stimulated in the presence or absence of TGF β , as indicated. **A**, Levels of pSmad-3 in triplicate cultures. Results are representative of 3 independent experiments. Values are the mean \pm SD of arbitrary α -screen counts. **B**, Expression of pERK and p-p38 in comparison to total ERK-2 and p38, as determined by Western blotting. Results are representative of 2 independent experiments. * = P < 0.05; *** = P < 0.001. See Figure 1 for definitions.



Figure 3. Protection of mice against collagen-induced arthritis by the absence of BAMBI through a Treg cell– and TGF β -dependent mechanism. Male B10RIII.WT and BAMBI-KO mice were immunized (imm) with bovine type II collagen in Freund's complete adjuvant. A, Incidence and severity of arthritis (top left), representative radiologic images (top right), and individual radiologic signs (bottom) 8 weeks after immunization. Values are the mean \pm SD of 7–10 mice per group. B, Representative histologic appearance of hematoxylin and eosin–stained joint sections 8 weeks after immunization. Original magnification \times 10. Results in A and B are representative of 5 independent experiments. C and D, Effect of treatment with anti-CD25 (C) or anti-TGF β (D) on individual clinical scores (left; horizontal lines show the mean) and radiologic lesions (right) in WT mice (\bigcirc) and BAMBI-KO mice (\bigcirc) 8 weeks after immunization. Results are from 1 of 3 and from 1 of 2 independent experiments, respectively. * = *P* < 0.05; ** = *P* < 0.001; *** = *P* < 0.001. PBS = phosphate buffered saline (see Figure 1 for other definitions).

discrete soft tissue swelling, all the radiologic signs associated with severe arthritis we studied were clearly reduced in the joints of B10RIII.BAMBI-KO mice (Figure 3A). These radiologic findings were confirmed by histologic analysis, which showed the presence of cartilage and bone destruction, synovitis, and pannus formation in the joints of B10RIII.WT mice, but not B10RIII.BAMBI-KO mice (Figure 3B). The protection against CIA in B10RIII.BAMBI-KO mice was accompanied by a diminished joint expression of IL-1 β , TNF, IL-6, and IL-17A transcripts (Supplementary Figure 2, online at http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art. 39557/abstract).

To explore whether the protection against CIA in BAMBI-KO mice was mediated by CD4+CD25+ Treg cells, immunized animals were treated with a cytotoxic anti-CD25 mAb. Depletion of CD4+CD25+ Treg cells induced the development of CIA in B10RIII. BAMBI-KO mice to levels comparable to those in untreated or anti-CD25-treated B10RIII.WT mice (Figure 3C). In correlation with the loss of protection, the expression of arthritogenic cytokines in the joints of anti-CD25–treated B10RIII.BAMBI-KO mice was increased (Supplementary Figure 2).

In addition to TGF β , BAMBI has been shown to negatively regulate activin and BMP activities (18) and to potentiate Wnt signaling (28). We next studied the selective involvement of TGF β in the protection against CIA in BAMBI-KO mice. Both B10RIII.WT and mutant mice received a neutralizing anti-TGF β mAb in the right hind paws and an IgG1-C in the left hind paws from the time of CII immunization up to the end of the experiment. Whereas the IgG1-Ctreated paws from immunized B10RIII.BAMBI-KO and B10RIII.WT mice were protected or developed CIA, respectively, the inhibition of TGF β induced severe CIA in the paws of B10RIII.BAMBI-KO mice (Figure 3D). Again, the induction of CIA in the anti-TGF β -treated B10RIII.BAMBI-KO mouse paws was associated with increased joint expression of IL-1 β ,



Figure 4. Effect of BAMBI deficiency on the distribution of Treg cells and Th17 cells and on Treg cell phenotype during development of collagen-induced arthritis. B10RIII.WT and B10RIII.BAMBI-KO mice were immunized with bovine type II collagen (CII) in Freund's complete adjuvant (CFA). **A**, Representative dot plots (top left) and percentages (top right) of CD4+FoxP3+ cells (Treg cells) in draining lymph nodes obtained before and 14 days after immunization. Dot plot results are from 1 of 3 independent experiments. Each symbol in the right panel represents an individual mouse; horizontal lines show the mean. Percentages of neuropilin 1+ Treg cells (representative of thymus-derived and peripheral Treg cell distribution), and the expression of FoxP3, CD25, and CD122 in Treg cells from WT and BAMBI-KO mice before (nonimmunized [NI]) and 14 days after immunization (I) are also shown (bottom). Values are the mean ± SD. **B**, Representative dot plots (left) and percentages (right) of CD4+IL-17+ cells in draining lymph nodes from mice treated with phosphate buffered saline (PBS) or anti-CD25 mAb before (nonimmunized) and 21 days after immunization with CII in CFA. Each symbol in the right panel represents an individual mouse; horizontal lines show the mean. Results are from 1 of 2 or from 1 of 3 independent experiments. * = P < 0.05; ** = P < 0.01; *** = P < 0.001. See Figure 1 for other definitions.
TNF, IL-6, and IL-17A transcripts (Supplementary Figure 2).

The percentages of Treg cells and Th17 cells in the spleen of mutant and WT mice were compared after the induction of disease. A significant increase in Treg cells was observed in B10RIII.BAMBI-KO mice, but not in B10RIII.WT controls, 14 days after immunization with CII (Figure 4A). Using neuropilin 1 as a marker for thymic Treg cells (29), an augmented representation of peripheral neuropilin 1-negative Treg cells was observed in B10RIII.BAMBI-KO mice in comparison to B10RIII.WT mice before immunization with CII, and this increase was even higher 14 days after immunization with CII (Figure 4A). An additional comparison of the phenotype of Treg cells showed no changes in the expression levels of FoxP3 between both strains of mice (Figure 4A). However, the expression of CD25, but not CD122, was enhanced in BAMBI-KO mouse Treg cells both before and after CII immunization (Figure 4A). Although the percentages of Th17 cells were slightly larger in B10RIII.BAMBI-KO mice 21 days after immunization, the increase was not statistically significant, in clear contrast to the results observed in immunized B10RIII.WT mice (Figure 4B). However, in correlation with the loss of CIA protection, the depletion of CD4+CD25+ Treg cells in B10RIII.BAMBI-KO mice, but not WT controls, caused a significant increase in Th17 cells after CII immunization (Figure 4B).

BAMBI control of Treg cell/Th17 cell differentiation. To explore the involvement of BAMBI in the control of TGF_B-induced CD4+ cell differentiation in vitro, naive CD4+ cells from B6.WT and B6.BAMBI-KO mice were activated under different Th polarization conditions. Similar Th1 (Supplementary Figure 3A, online at http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/art.39557/abstract) and Th2 (Supplementary Figure 3B) differentiation, as assessed by the expression of either IFN γ or T-bet or either IL-4 or GATA-3, respectively, was observed between B6.WT and B6.BAMBI-KO mice. However, CD4+ cells from B6.BAMBI-KO mice activated in the presence of TGF β , but not TGF β plus IL-2, which promoted the Treg cell differentiation of >80% of the initially cultured CD4+ cells, exhibited an increased Treg cell differentiation capacity after 3 days and 5 days of culture as compared to cells from B6.WT controls (Figure 5A and Supplementary Figure 4A, online at http://onlinelibrary. wiley.com/doi/10.1002/art.39557/abstract). Unlike Treg cell differentiation, the in vitro differentiation of Th17 cells, as assessed by the expression of IL-17 or retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor γt (ROR γt), was reduced in B6.BAMBI-KO mice on days 3 and 5 of culture, even in the presence of high concentrations of IL-6 or after the addition of anti–IL-2 antibodies (Figure 5B and Supplementary Figures 4B and C).

Taken together, these results suggested a possible role of BAMBI as a rheostat-like regulator of TGF β signaling strength during the functional Treg cell/Th17 cell differentiation of CD4+ cells. To examine this possibility, we performed in vitro differentiation experiments with polarized CD4+ cells from WT mice in which BAMBI was gradually inhibited with an IgM anti-BAMBI mAb (clone B143.14 mAb). Addition of increased doses of this mAb, but not high doses of a murine IgM isotype control antibody, caused an anti-BAMBI dose-dependent increase and reduction of Treg cell and Th17 cells, respectively (P < 0.01 in both cases) (Figures 5C and D).

To analyze the potential contribution of BMP and activin to the CD4+ cell differentiation defects observed in B6.BAMBI-KO mice, Noggin and follistatin, acting as inhibitors of BMP and activin, respectively (30,31), were added together to the differentiation cultures. These inhibitors failed to modify the Treg cell (Supplementary Figure 5A, online at http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10. 1002/art.39557/abstract) and Th17 cell (Supplementary Figure 5B) differentiation profiles of polarized CD4+ cells from B6.WT or B6.BAMBI-KO mice. We then compared the capacity of DCs isolated from B6.WT or B6.BAMBI-KO mice to drive the in vitro Treg cell differentiation of CD4+ cells from both types of mice. Independently of the DC origin, the in vitro Treg cell differentiation of CD4+ cells from B6.BAMBI-KO mice was equally increased in comparison to that of control B6.WT cells (Supplementary Figure 5C). The effects of BAMBI deficiency on the suppressive activity of Treg cells was also investigated using a previously described in vitro assay (32). Treg cells from B6.BAMBI-KO mice were 3–4 times more effective (P < 0.001) than Treg cells from B6.WT mice in inhibiting the proliferation of anti-CD3-stimulated effector CD4+ cells (Supplementary Figure 5D).

BAMBI modulation of CD25 expression and IL-2 signaling in Treg cells and effector CD4+ cells. Because Treg cells from BAMBI-KO mice exhibited increased levels of CD25 in vivo (Figure 4A), we explored its regulation in in vitro–activated CD4+ cells under different polarization conditions. During Treg cell differentiation, a higher induction of CD25 was observed in CD4+ cells from BAMBI-KO mice than from WT mice 24 hours after activation with anti-CD3/28 antibodies in the presence of IL-2 and/or TGF β , but not in their absence (Figure 6A), and this was maintained on days 3 and 5 of culture (Figure 6B). This induction was inhibited in both mouse strains by the specific Smad-3 inhibitor SIS-3 (25) (Figure 6A). Although the induction of



Figure 5. Potentiation of in vitro Treg cell differentiation and inhibition of Th17 cell differentiation by the absence or the gradual inhibition of BAMBI. **A** and **B**, Naive CD4+ cells from B6.WT and B6.BAMBI-KO mice were stimulated under the indicated Treg cell (**A**) or Th17 cell (**B**) polarization conditions. Representative flow cytometry dot plots (top) and percentages (bottom) of CD4+FoxP3+ cells and CD4+IL-17+ cells after 5 days of culture are shown. Results of multiple experiments are plotted together. Each symbol in the bottom panels represents an individual mouse; horizontal lines show the mean. **C**, Effect of pharmacologic inhibition of BAMBI with 20 μ g/ml of B143.14 mAb on the in vitro Treg cell and Th17 cell differentiation of WT CD4+ cells. Representative dot plots of CD4+FoxP3+ (top) and CD4+IL-17+ (bottom) cells and the mean \pm SD percentages in gated populations from 3 independent experiments are shown. Cultures with an IgM isotype control or with CD4+ cells from BAMBI-KO mice are included for comparison. **D**, Effect of the dose-dependent inhibition of BAMBI with B143.14 mAb in the Treg cell and Th17 cell differentiation of WT CD4+ cells. Values are the mean \pm SD of triplicate cultures from 1 of 3 independent experiments. * = *P* < 0.05; ** = *P* < 0.01; *** = *P* < 0.001. Statistical differences in the WT mouse groups in **D** compare the untreated versus the anti-BAMBI-treated groups. See Figure 1 for definitions.

CD25 was lower under Th17 polarization conditions, the levels of this molecule were higher in cells from BAMBI-KO mice than from WT mice on day 3 of differentiation but not on day 5, when they were severely reduced (Figure 6B).

Unlike CD25 expression, the production of IL-2 by anti-CD3/28 activated CD4+ cells in the presence or absence of TGF β was similar in the WT and BAMBI-

KO mouse strains, with a mean \pm SD of 2.9 \pm 0.5 and 2.46 \pm 0.6 pg/ml, respectively, in unstimulated cells, 1,343.1 \pm 76.7 and 1,454.3 \pm 205.9 pg/ml, respectively, in anti-CD3/28–stimulated cells, and 929.1 \pm 69.5 and 832.8 \pm 32.5 pg/ml, respectively, in anti-CD3/28 plus TGF β -stimulated cells (P > 0.1 for all comparisons). In association with the increased expression of CD25, IL-2 signaling, as manifested by the higher percentages of



Figure 6. BAMBI regulation of CD25 expression and IL-2 signaling in effector CD4+ cells. **A**, Induction of CD25 expression in CD4+ cells from WT and BAMBI-KO mice stimulated for 24 hours with anti-CD3/28 antibodies in the presence or absence of different combinations of TGF β 1, IL-2, and specific inhibitor of Smad-3 (SIS-3). Values are the mean ± SD MFI from 1 of 3 independent experiments. **B**, Kinetics of CD25 induction in CD4+ cells stimulated under different Treg cell (left) or Th17 cell (right) polarization conditions on day 3 and day 5. Values are the mean ± SD MFI from 1 of 2 independent experiments. **C**, Dot plots with mean ± SD percentages of CD4+pSTAT-5+ cells (from 3 independent experiments) 1 hour after activation with anti-CD3/28 antibodies in the presence or absence of IL-2 and TGF β . **D**, Effects of IL-2/anti-IL-2 immune complexes (ICs) containing either S4B6 (left) or JES6-1A12 (right) mAb on peripheral T cell populations (percentages) in individual WT and BAMBI-KO mice. Results are from 1 of 3 independent experiments. Each symbol represents an individual mouse; horizontal lines show the mean. ** = *P* < 0.001; *** = *P* < 0.001. See Figure 1 for other definitions.

pSTAT-5–expressing cells after their in vitro activation with anti-CD3/28 antibodies in the presence of IL-2 plus TGF β , was potentiated in CD4+ cells from BAMBI-KO mice as compared to WT mice (P < 0.001 for each comparison) (Figure 6C).

Two types of IL-2 receptor (IL-2R) can be distinguished: the high-affinity IL-2R, which contains CD25, CD122, and CD132, and the low-affinity IL-2R, which contains CD122 and CD132 (33). Because our previous results indicated that the absence of BAMBI selectively enhances the expression of the high-affinity IL-2R in Treg cells, we explored the in vivo effects of IL-2 in T cell populations expressing either the high-affinity or the low-affinity IL-2R (24). Treatment with IL-2 ICs containing the anti–IL-2 mAb S4B6, which binds T cells that express the low-affinity IL-2R (24), resulted in a similar expansion of CD8+ T cells and a concomitant reduction in CD4+ T cells in the spleen of B6.BAMBI-KO and B6.WT mice (Figure 6D). In contrast, injection of IL-2 ICs containing the JES6-1A12, which binds T cells that express CD25 (24), promoted a greater increase in Treg cells in B6.BAMBI-KO mice than in B6.WT mice (Figure 6D).

DISCUSSION

It has been demonstrated that the capacity of TGF β to induce the differentiation of tolerogenic Treg cells or proinflammatory Th17 cells is modulated by the presence or absence of additional cytokines around activated lymphocytes (2–10,14,15). However, upon initial sensing of TGF β , in vitro–activated CD4+ cells upregulate both FoxP3 and ROR γ t transcription factors, with the subsequent Treg cell/Th17 cell differentiation

determined by the concentration of TGF β (16). These results suggest that the control of TGF β availability and/ or TGF β signaling strength in these lymphocytes is also an essential event that governs the dual activity of this growth factor during their functional differentiation.

Here, we identified BAMBI as a molecule induced in CD4+ cells during their activation and further regulation by TGF β . BAMBI seemed to function as a rheostat-like component of a molecular machinery that fixed the appropriate intensity level of TGF β (directly) and IL-2 (indirectly) signaling required for appropriate Treg cell and Th17 cell differentiation. Accordingly, the dose-dependent inhibition of BAMBI gradually regulated Treg cell and Th17 cell differentiation. In addition, the activity of BAMBI during these differentiation processes appeared to be restricted to CD4+ cells, since its absence in DCs did not affect the ability of this antigen-presenting cell population to regulate Treg cell differentiation.

Considering the complexity of the mechanisms that regulate the signaling transduction cascades activated by TGF β molecules (17), it can be expected that in addition to BAMBI, other molecules may play a role in the proposed molecular rheostat for TGF β signaling in CD4+ cells. In this regard, we recently demonstrated that the cell cycle inhibitor p27^{Kip1} enhances both TGF β signaling in CD4+ cells and their Treg cell differentiation and activity in vitro and in vivo (23). However, unlike BAMBI, p27^{Kip1} does not affect CD25 expression in Treg cells. Thus, multiple molecules controlling TGF β signaling strength in CD4+ cells may be a component of this sensor machinery, affecting Treg cell biology by diverse mechanisms.

BAMBI was initially described as a pan-TGF β superfamily inhibitor that, in addition to its modulatory activity on TGFB signaling, regulates activin and BMP activities (18). In this regard, different BMPs and activin A can be produced by activated CD4+ cells and can regulate Treg cell/Th17 cell differentiation in vitro (34-39). BAMBI also potentiates Wnt-β catenin signaling (28), and this pathway acts as a negative regulator of Treg cell function (40). Thus, the phenomena observed in BAMBI-KO mice can be partially or completely attributed to increased activin or BMP signaling and/or to deficient Wnt activation, instead of augmented TGF β signaling. However, our findings contradict these possibilities. First, the inhibition of activins and BMPs with follistatin and Noggin, respectively, fails to modify the in vitro Treg cell/Th17 cell differentiation pattern observed with polarized CD4+ cells from WT and BAMBI-KO mice. Second, the selective in vivo inhibition of TGF β with a specific mAb, which has no effects

on activin, BMP, or Wnt- β catenin signaling pathways, induces the development of CIA in B10RIII.BAMBI-KO mice.

We propose a mechanism that explains the role of BAMBI in Treg cell/Th17 cell differentiation. IL-2 signaling, through high-affinity IL-2R, is essential for the induction/maintenance of Treg cells, as documented by the development of autoimmunity associated with defects in Treg cell number and activity in mice deficient in IL-2 or CD25 (41–43). In contrast, IL-2 inhibits Th17 cell differentiation (14).

We demonstrated herein that TGF β -activated CD4+ cells from BAMBI-KO mice exhibited increased levels of pSmad-3 that resulted in enhanced CD25 expression and IL-2 signaling strength in these cells and that these abnormalities were linked to the altered Treg cell/Th17 cell differentiation pattern observed in these animals. In this regard, it has been demonstrated that TGF β cooperates with TCR signaling to up-regulate CD25 expression in murine CD4+ cells and that the regulatory region of the CD25 gene contains a Smad-3 binding site that is required for its TGF β -mediated up-regulation (44).

In addition to this Smad-dependent effect, BAMBI can affect Treg cell differentiation through the control of Smad-independent TGF β signal pathways. Thus, pERK, the levels of which are increased in anti-CD3/28– and TGF β -activated BAMBI-deficient CD4+ cells, positively regulates Treg cell differentiation (27). Similarly, IL-2 enhances Th1 and Th2 cell differentiation (33). These two CD4+ cell subpopulations, however, are not affected in BAMBI-KO mice. The requirement of the TGF β /Smad-3 axis to the abnormal regulation of CD25 expression observed in CD4+ cells from BAMBI-KO mice may explain the selective role of BAMBI in the control of those CD4+ cell subpopulations that are directly dependent on TGF β activity.

The control of BAMBI expression in activated CD4+ cells may therefore serve to define the appropriate initial threshold level of both TGF β and IL-2 signaling required for their differentiation into Treg cell or Th17 cells, together with the copresence of other cytokines. However, the fact that CD4+ cells from BAMBI-KO mice also exhibited reduced in vitro Th17 cell differentiation in the presence of anti–IL-2 antibodies indicates that in addition to its control of IL-2 signaling, BAMBI affects Th17 cells by additional unknown mechanisms. Because signaling through the high-affinity IL-2R regulates Treg cell activity (41), the increase in CD25 expression by Treg cells from BAMBI-KO mice may also be responsible for their enhanced suppressive activity in vitro.

Finally, we demonstrated that the absence of BAMBI prevents the development of CIA, a very well documented experimental model of Th17-dependent autoimmune disease (13,45-47), by a Treg cell- and TGF_β-dependent mechanism. An intriguing observation in the present study is the lack of exacerbation of CIA in B10RII.WT mice after anti-CD25 treatment, which is in clear contrast to our previous results in DBA/1 mice where this treatment aggravated the course of the disease (23). Although we do not have an exact explanation for this phenomenon, it may possibly be related to the fact that DBA/1 mice have a slightly increased susceptibility to the development of CIA after bovine CII immunization, in terms of incidence and severity, than B10RIII mice (48,49). Independently of these discrepancies, our results identify BAMBI as a potential new target in rheumatoid arthritis and further highlight the importance of this TGF β signaling rheostat-like machinery in the maintenance of immune homeostasis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. J. C. Izpisua-Belmonte (Salk Institute, La Jolla, CA) for the BAMBI-KO mice, María Aramburu, Natalia Cobo, and Iván Gómez (Universidad de Cantabria) for technical assistance, Dr. I. Arechaga (Universidad de Cantabria) for help with the design of the BAMBI^{109–133} peptide, and Dr. E. Tamayo (Universidad de Cantabria) for critical comments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. R. Merino had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. J. Merino, R. Merino.

Acquisition of data. Postigo, Iglesias, Álvarez, Augustin, Buelta, J. Merino, R. Merino.

Analysis and interpretation of data. Postigo, Iglesias, Álvarez, Augustin, Buelta, J. Merino, R. Merino.

REFERENCES

- Travis MA, Sheppard D. TGF-β activation and function in immunity. Annu Rev Immunol 2014;32:51–82.
- 2. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature 1992;359:693–9.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, et al. Transforming growth factor β1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:770–4.
- Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-β controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. Immunity 2006;25:455–71.

- Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-β receptor. Immunity 2006;25:441–54.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature 2006; 441:235–8.
- 7. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral $CD4^+CD25^-$ naive T cells to $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. J Exp Med 2003;198:1875–86.
- Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. Annu Rev Immunol 2012; 30:531–64.
- Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science 2007;317:256–60.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity 2006;24:179–89.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. Nat Immunol 2003;4:330–6.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 2003; 299:1057–61.
- Rohn TA, Jennings GT, Hernandez M, Grest P, Beck M, Zou Y, et al. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. Eur J Immunol 2006;36:2857–67.
- Kryczek I, Wei S, Vatan L, Escara-Wilke J, Szeliga W, Keller ET, et al. Opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17⁺ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. J Immunol 2007;179:1423–6.
- 15. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. Nature 2007;448:480–3.
- 16. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits T_H17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. Nature 2008;453:236–40.
- Massague J. TGFβ signaling in context. Nat Rev Mol Cell Biol 2012;13:616–30.
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, et al. Silencing of TGF-β signaling by the pseudoreceptor BAMBI. Nature 1999;401:480–5.
- Dromann D, Rupp J, Rohmann K, Osbahr S, Ulmer AJ, Marwitz S, et al. The TGF-β-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable Haemophilus influenzae. Respir Res 2010;11:67.
- Seki E, De Minicis S, Oesterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF-β signaling and hepatic fibrosis. Nat Med 2007;13:1324–32.
- Tramullas M, Lantero A, Diaz A, Morchon N, Merino D, Villar A, et al. BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-β family in pain modulation. J Neurosci 2010;30:1502–11.
- 22. Postigo J, Genre F, Iglesias M, Fernandez-Rey M, Buelta L, Rodriguez-Rey JC, et al. Exacerbation of type II collageninduced arthritis in apolipoprotein E-deficient mice in association with the expansion of Th1 and Th17 cells. Arthritis Rheum 2011;63:971–80.
- Iglesias M, Postigo J, Santiuste I, Gonzalez J, Buelta L, Tamayo E, et al. p27^{Kip1} inhibits systemic autoimmunity through the control of Treg cell activity and differentiation. Arthritis Rheum 2013;65:343–54.
- Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. Science 2006;311:1924–7.

- Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-β1-induced extracellular matrix expression. Mol Pharmacol 2006;69:597–607.
- Xavier S, Gilbert V, Rastaldi MP, Krick S, Kollins D, Reddy A, et al. BAMBI is expressed in endothelial cells and is regulated by lysosomal/autolysosomal degradation. PLoS One 2010;5:e12995.
- Lu L, Wang J, Zhang F, Chai Y, Brand D, Wang X, et al. Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. J Immunol 2010;184:4295–306.
- Lin Z, Gao C, Ning Y, He X, Wu W, Chen YG. The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/β-catenin signaling. J Biol Chem 2008;283: 33053–8.
- Yadav M, Louvet C, Davini D, Gardner JM, Martinez-Llordella M, Bailey-Bucktrout S, et al. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. J Exp Med 2012;209:1713–22.
- Walsh DW, Godson C, Brazil DP, Martin F. Extracellular BMPantagonist regulation in development and disease: tied up in knots. Trends Cell Biol 2010;20:244–56.
- Walton KL, Makanji Y, Harrison CA. New insights into the mechanisms of activin action and inhibition. Mol Cell Endocrinol 2012; 359:2–12.
- Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J Exp Med 1998;188:287–96.
- Malek TR. The biology of interleukin-2. Annu Rev Immunol 2008;26:453–79.
- 34. Kumar P, Natarajan K, Shanmugam N. High glucose driven expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine genes in lymphocytes: molecular mechanisms of IL-17 family gene expression. Cell Signal 2014;26:528–39.
- 35. Lu L, Ma J, Wang X, Wang J, Zhang F, Yu J, et al. Synergistic effect of TGF-β superfamily members on the induction of Foxp3⁺ Treg. Eur J Immunol 2010;40:142–52.
- Mausner-Fainberg K, Urshansky N, Regev K, Auriel E, Karni A. Elevated and dysregulated bone morphogenic proteins in immune cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2013;264:91–9.
- Ogawa K, Funaba M, Chen Y, Tsujimoto M. Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages. J Immunol 2006;177:6787–94.

- Semitekolou M, Alissafi T, Aggelakopoulou M, Kourepini E, Kariyawasam HH, Kay AB, et al. Activin-A induces regulatory T cells that suppress T helper cell immune responses and protect from allergic airway disease. J Exp Med 2009;206:1769–85.
- Yoshioka Y, Ono M, Osaki M, Konishi I, Sakaguchi S. Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signaling on T-cell activation and differentiation. Eur J Immunol 2012;42:749–59.
- Van Loosdregt J, Fleskens V, Tiemessen MM, Mokry M, van Boxtel R, Meerding J, et al. Canonical Wnt signaling negatively modulates regulatory T cell function. Immunity 2013;39:298–310.
- Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4⁺ regulatory T cell function. J Exp Med 2002;196:851–7.
- 42. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4⁺ T cells. Eur J Immunol 1995;25:3053–9.
- Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor α chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. Immunity 1995;3:521–30.
- 44. Kim HP, Kim BG, Letterio J, Leonard WJ. Smad-dependent cooperative regulation of interleukin 2 receptor α chain gene expression by T cell receptor and transforming growth factor-β. J Biol Chem 2005;280:34042–7.
- 45. Fujimoto M, Serada S, Mihara M, Uchiyama Y, Yoshida H, Koike N, et al. Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. Arthritis Rheum 2008;58:3710–9.
- 46. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. Immunol Rev 2008;226:57–79.
- 47. Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renauld JC, et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. Arthritis Rheum 2009;60:390–5.
- Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, Larsson E. Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis. Immunology 1988;65:305–10.
- 49. Blom AB, van Lent PL, Holthuysen AE, van den Berg WB. Immune complexes, but not streptococcal cell walls or zymosan, cause chronic arthritis in mouse strains susceptible for collagen type II auto-immune arthritis. Cytokine 1999;11:1046–56.