

# TESIS DOCTORAL

Caracterización fenotípica del ratón transgénico 116-NOD,  
y aproximación a la identificación del antígeno  
reconocido por el anticuerpo monoclonal H116

Jorge Carrascal Sánchez

Dept: Biología celular, Fisiología e Inmunología

UAB, 27-04-2012

## **PRÓLOGO, 5**

## **I INTRODUCCIÓN, 6**

### **1. LINFOCITOS, 6**

#### **1.1. Desarrollo de linfocitos B, 6**

1.1.1. Primera etapa: Generación de linfocitos B, 6

1.1.2. Segunda etapa: Maduración de linfocitos B, 7

1.1.3. Tercera etapa: Activación de linfocitos B, T-dependiente, 9

1.1.3.1. Centro, 10

1.1.3.2. Maduración de la afinidad, 11

1.1.3.3. Cambio de isotipo, 12

1.1.3.4. Células plasmáticas, 13

1.1.3.5. Células memoria, 14

1.1.4. Tercera etapa: Activación de los linfocitos B, T-independiente, 14

1.1.4.1. Linfocitos B1, 15

1.1.4.2. Linfocitos B10, 16

1.2. El receptor de linfocito B, 16

1.3. Unión antígeno-anticuerpo, 18

1.4. Selección del repertorio de linfocitos B, 19

1.5. Generación de Tolerancia en linfocitos B, 19

1.5.1. Tolerancia central en linfocitos B, 20

1.5.2. Tolerancia periférica en linfocitos B, 20

### **2. AUTOINMUNIDAD Y DIABETES TIPO 1 (T1D), 21**

2.1. El páncreas, 22

2.2. Fisiopatología de la enfermedad, 24

2.3. Factores genéticos, 24

2.4. Factores ambientales, 25

2.5. Linfocitos T CD4+ como principales desencadenantes de la enfermedad, 26

2.6. Linfocitos T CD8+ como efectoras del ataque autoinmune, 26

### **3. LINFOCITOS B y T1D, 27**

### **4. MODELOS EXPERIMENTALES Y TRANSGÉNESIS, 29**

4.1. El Ratón NOD, 30

4.2. Transgénesis, 31

4.3. Modelos de Inmunoglobulina transgénica (Ig) de linfocitos B, 32

## **II MATERIAL Y METODOS**

### **1. RATONES 34**

1.1. Estabulación y mantenimiento, 34

- 2. TEJIDOS, 35
  - 2.1. Obtención de tejidos. Congelación en isopentano, 35
  - 2.2. Criosecciones de tejido, 35
  - 2.3. Tinción de Hematoxilina-Eosina, 35
  - 2.4. Tinción Inmunohistoquímica, 36
    - 2.4.1. Tinciones sobre tejido páncreatico, 36
      - 2.4.1.1. Tinción con el anticuerpo monoclonal AcMoH116, 36
      - 2.4.1.2. Tinción de infiltrado de islote pancreático, 37
    - 2.4.2. Tinciones sobre bazo, 37
      - 2.4.2.1. Tinción folicular con anticuerpo específico IgM<sup>a</sup> o IgM<sup>b</sup>, 37
      - 2.4.2.2. Tinción folicular de ratón quimera, 38
  - 2.5. Purificación de tejido exocrino. Aislamiento de islotes pancreáticos, 38
- 3. CÉLULAS, 39
  - 3.1. Cultivo celular, 39
  - 3.2. Citometría de flujo, 40
- 4. PROTEÓMICA, 41
  - 4.1. Extracción proteica a partir de cultivo de línea celular, 41
  - 4.2. Cuantificación de proteína, 42
  - 4.3. Electroforesis en geles de una dimensión (1-D), 42
  - 4.4. Electroforesis en geles de dos dimensiones (2-D), 43
    - 4.4.1. Preparación de las muestras proteicas, 43
    - 4.4.2. Primera dimensión: electroforesis por punto isoeléctrico (isoelectroenfoque), 44
    - 4.4.3. Segunda Dimensión: Electroforesis por peso molecular, 45
  - 4.5. Transferencia de proteína a membrana de nitrocelulosa, 46
    - 4.5.1. Tinción Rojo Ponceau, 46
    - 4.5.2. Western-Blot, 46
  - 4.6. Tinción con Coomassie, 47
  - 4.7. Tinción de Plata, 48
  - 4.8. Espectrometría de masas, 49
  - 4.9. Inmunoprecipitación, 49
- 5. GENERACION PROTEINA RECOMBINANTE VALOSIN CONTAININ PROTEIN, 50
  - 5.1. Extracción RNA, 50
  - 5.2. Generación de cDNA, 51
  - 5.3. Amplificación secuencia de DNA: generación del amplímero/inserto, 52
  - 5.4. Purificación DNA procedente de gel de agarosa, 53
  - 5.5. Digestión DNA: Inserto y Vector, 54
  - 5.6. Ligación, 54
  - 5.7. Transformación bacteriana por Choque Térmico, 55
  - 5.8. Extracción DNA plasmídico, 55

- 5.9. Secuenciación de Valosin Containin Protein, 56
- 5.10. Obtención de Valosin Containin Protein (de cuerpos de inclusión), 57
- 6. ANÁLISIS EXPRESIÓN GÉNICA, 59
  - 6.1. Obtención de la muestra, 59
  - 6.2. Expresión a tiempo real (RT-PCR) con sondas Taqman<sup>R</sup>, 59
- 7. ESTUDIOS *IN VITRO*, 61
  - 7.1. Proliferación celular, 61
    - 7.1.1. Purificación de linfocitos B (selección negativa de esplenocitos), 61
    - 7.1.2. Estimulación linfocitos B, 62
    - 7.1.3. Incorporación de Timidina tritiada, <sup>3</sup>[H]-TdR, 62
    - 7.1.4. Análisis de citoquinas: método CBA, 63
- 8. ESTUDIOS *IN VIVO*, 63
  - 8.1. Análisis de Vida Media de linfocitos B transgénicos, 63
    - 8.1.1. Marcaje de linfocitos B con CFSE, 64
    - 8.1.2. Transferencia de linfocitos B, 64
    - 8.1.3. Seguimiento de los linfocitos B marcados con CFSE, 64
  - 8.2. Tranplante de Médula Ósea. Producción de ratones quimeras, 65
    - 8.2.1. Acondicionamiento de los ratones receptores, 65
    - 8.2.2. Obtención de Médula Ósea, 65
    - 8.2.3. Transplante Médula Ósea, 66
    - 8.2.4. Seguimiento del transplante, 66

### **III HIPÓTESIS, 67**

### **IV OBJETIVOS, 67**

### **V RESULTADOS, 68**

- 1. ANTECEDENTES, 68
- 2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSGENES, 70
  - 2.1. Expresión de IgM, 70
  - 2.2. Expresión de IgD, 70
  - 2.3. Expresión de la cadena ligera (Kappa), 72
  - 2.4. Expresión de IgM<sup>a</sup>-IgD<sup>a</sup> en el ratón 116-NOD.RAG2<sup>-/-</sup>, 73
- 3. INCIDENCIA DE T1D, 73
- 4. ESTUDIO DEL INFILTRADO PANCREÁTICO, 76
  - 4.1. Grado de infiltración en islotes pancreáticos “*insulitis score*” en ratones 116C-NOD, 77
  - 4.2. Estudio fenotípico del infiltrado de islotes pancreáticos en ratones 116C-NOD, 77
- 5. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN BAZO DE RATONES 116C-NOD, 78

- 5.1. Distribución de los linfocitos B en bazo de ratones 116C-NOD, 79
- 5.2. Linfocitos B Foliculares, de Zona Marginal y estadios T1 y T2, 79
- 5.3. Análisis de los linfocitos B1a y B1b, 80
- 5.4. Análisis de los linfocitos B10, 81
- 5.5. Análisis de Células Plasmáticas, 82
- 6. ESTUDIOS *IN VITRO* DE LINFOCITOS B 116C-NOD, 83
  - 6.1. Proliferación celular, 83
  - 6.2. Producción de citoquinas, 84
- 7. TOLERANCIA CENTRAL Y PERIFÉRICA DE LINFOCITOS B EN RATONES 116C-NOD, 86
  - 7.1. Estudios de tolerancia periférica: Vida Media, 87
  - 7.2. Estudios de tolerancia central: Ratones quimera, 89
- 8. APROXIMACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN DEL ANTÍGENO RECONOCIDO POR EL cMoH116, 90
  - 8.1. Identificación de VCP, 90
    - 8.1.1. Reconocimiento de VCP mediante *Western-Blot* en geles 1D y 2D, 90
    - 8.1.2. Clonación y purificación de VCP, 92
    - 8.1.3. Nivel de expresión génica de VCP, 93
  - 8.2. Inmunoprecipitación de proteínas nativas con el AcMoH116, 94

## **VI DISCUSIÓN, 95**

## **VII CONCLUSIONES, 105**

## **VIII BIBLIOGRAFÍA, 107**

## PRÓLOGO

El sistema inmunitario está formado por un conjunto de tejidos, células y otras moléculas repartidas por todo el organismo que tienen como principal objetivo defender al individuo frente a microorganismos infecciosos y otras sustancias extrañas.

Esta función de defensa se lleva a cabo por dos tipos de respuesta inmunitarias. Por un lado, la respuesta innata (o natural) que actuaría como primera línea de defensa frente a estructuras comunes de los microorganismos y funcionaría de la misma forma ante infecciones repetidas por ese mismo microorganismo. Está formada por las barreras físicas y químicas, células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK); y proteínas de la sangre, entre las que se incluyen componentes del sistema del complemento y citoquinas.

Por otro lado, la respuesta adquirida (o específica) está formada por los linfocitos y sus productos y la característica que la define es una especificidad precisa contra distintas moléculas diana (antígenos) y una capacidad de recordar y responder con más intensidad a la exposición repetida a un mismo agente sea o no un microorganismo.

Si la respuesta adquirida está mediada por anticuerpos se habla de respuesta inmunitaria humoral y es el principal mecanismo de defensa contra microorganismos extracelulares y sus toxinas. Por el contrario, si la respuesta está mediada por linfocitos T, se habla de respuesta inmunitaria celular y es el principal mecanismo de defensa contra microorganismos intracelulares como virus.

La respuesta innata y la adquirida suelen funcionar de forma conjunta, de tal forma que, la respuesta innata frente a los microorganismos estimula la respuesta adaptativa e influye en la naturaleza de la misma, mientras que la respuesta adaptativa utiliza muchos de los mecanismos efectores de la inmunidad innata para eliminar a los patógenos.

Por último, la respuesta inmunitaria en condiciones normales es autolimitada, de forma que una vez que se ha eliminado el agente que la activa, el sistema inmunitario vuelve a su estado basal. Además, otra característica esencial del sistema inmunitario es la de no generar respuesta frente al propio organismo. Esta ausencia de respuesta inmunológica hacia estructuras propias se denomina tolerancia y la ruptura de la misma da lugar a los trastornos autoinmunitarios[1].

# I INTRODUCCIÓN

## 1. LINFOCITOS B

Mediante la hematopoyesis se generan células de diferentes estirpes a partir de un precursor común llamado célula hematopoyética pluripotencial, la cual se puede diferenciar por marcadores propios ausentes en células diferenciadas como CD34+, c-Kit y Sca-1 (del inglés, stem cell antigen-1)[2]. En la vida fetal la hematopoyesis tiene lugar en el hígado y posteriormente esta función es asumida por la médula ósea situada en el adulto en los huesos planos como son esternón, vértebras, huesos ilíacos y las costillas.

Esta célula madre hematopoyética en una primera fase de diferenciación da lugar al progenitor mieloide común (CMP) y al progenitor linfoide común (CLP). El progenitor mieloide común a su vez da lugar a: eritrocitos, monocitos (dendríticas y macrófagos), megacariocitos (plaquetas) y granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos) [3]. Por su parte, el progenitor linfoide común da lugar a las diferentes estirpes linfocitarias entre las que se encuentran los linfocitos B.

Los linfocitos B reciben este nombre porque en las aves se observó que se generaban en la bolsa de Fabricio. Tienen una semivida en ratones de 3 a 6 meses y de unos pocos años en humanos.

Los linfocitos vírgenes se encuentran en estadio G<sub>0</sub>, tienen un núcleo grande y poco citoplasma.

Una vez maduras, entran en circulación y se alojan en los órganos linfáticos periféricos.

Los principales órganos linfáticos son el bazo y los ganglios linfáticos. En el apartado siguiente se describirán brevemente cada uno de ellos.

### 1.1. Desarrollo del linfocito B

Se pueden definir tres etapas diferenciales en la generación y destino de los linfocitos B: la primera etapa es la generación que tiene lugar en mamíferos en médula ósea, la segunda etapa es la maduración que tiene lugar en un órgano linfático secundario, y la tercera etapa es la activación que también tiene lugar en un órgano linfático secundario.

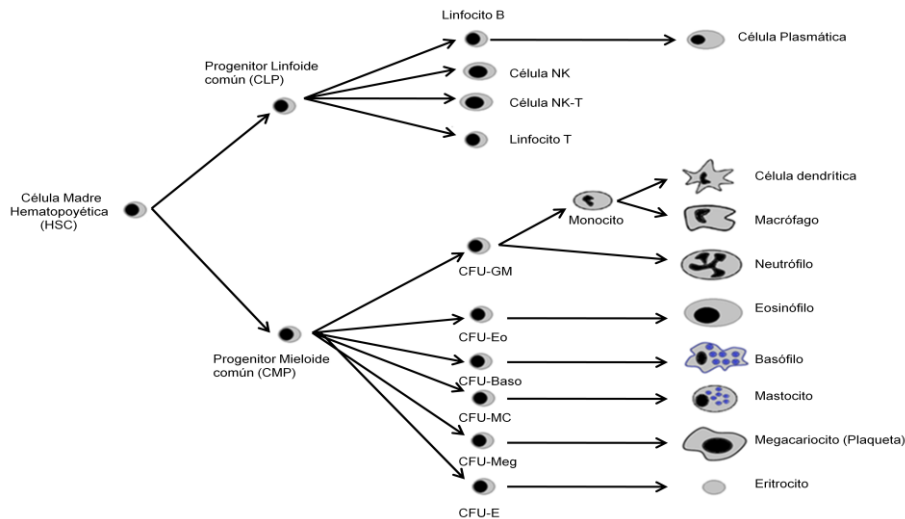
#### 1.1.1. Primera etapa: Generación de linfocitos B

La generación de linfocitos B se da a partir de progenitores hematopoyéticos en médula ósea tal y como se ha mencionado previamente (figura 1).

A partir del estadio de CLP, la diferenciación hacia linfocitos B se distingue por la expresión de la variante B220 del marcador de membrana CD45 y el marcador AA4.1 (CD93).

Esta etapa de maduración se caracteriza por una elevada actividad mitótica. Esta actividad mitótica es estimulada fundamentalmente por la interleucina 7 (IL-7) y la quimiocina CXCL12 sintetizadas fundamentalmente por las células del estroma de la médula ósea.[4] La actividad mediada por estas

citoquinas va siendo menos relevante a medida que los linfocitos B va expresando primero el pre-BCR y después el BCR (receptor antigénico) ya que a partir de estas fases esta función recae principalmente en la capacidad de estas moléculas de transmitir la señal. Los acontecimientos genéticos que tienen lugar se tratarán más adelante.



**Figura 1:** Diferenciación de las diferentes estirpes celulares. La célula madre hematopoyética (HSC) da lugar a dos grandes estirpes celulares: el progenitor linfoide común (CLP) y el progenitor mieloide común (CMP). A partir de los progenitores comunes se van originando todas las células sanguíneas. (Adaptado de Chaplin et al. 2010)

### 1.1.2. Segunda etapa: Maduración de los linfocitos B

Los linfocitos B que expresan en membrana el BCR completo, normalmente sólo IgM de membrana (mIgM) abandonan la médula ósea y se dirigen hacia los tejidos linfáticos secundarios para completar allí su desarrollo.

Los linfocitos B pasan por estadios de diferenciación intermedios llamados transicionales antes de alcanzar la madurez definitiva [5-6].

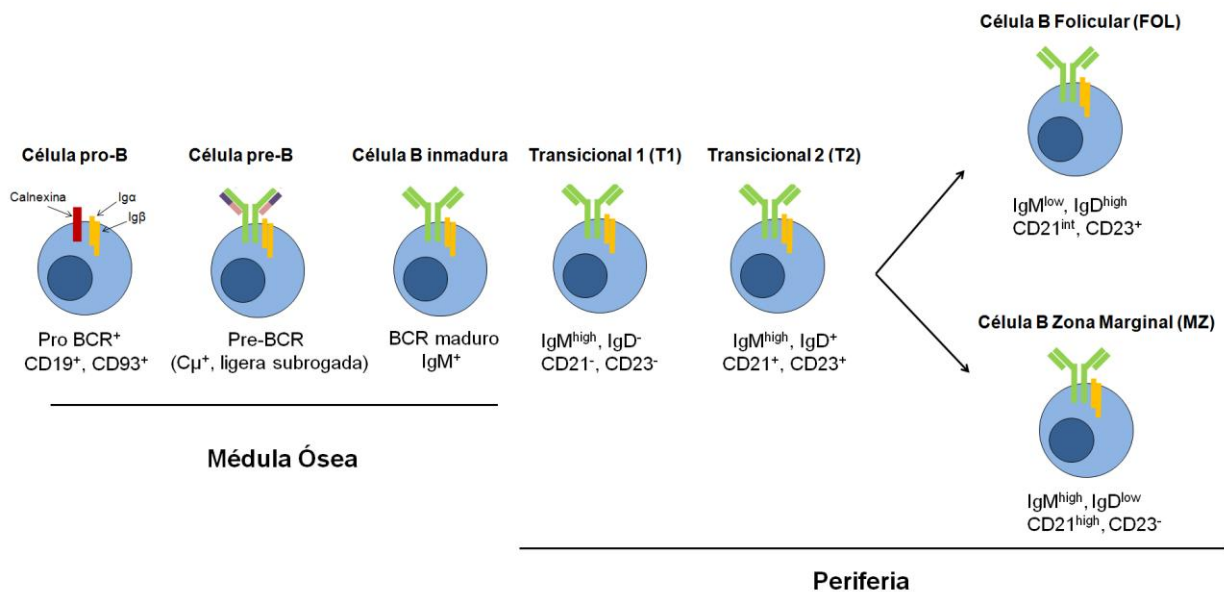
En el ratón sólo un 10% de los linfocitos B que se generan llegan a abandonar la médula ósea y de estos sólo una tercera parte progresa hacia células transicionales. Se han descrito 3 estadios transicionales T1, T2 y T3; aunque este último todavía está por dilucidar si se trata de un estadio madurativo o se trata de linfocitos B que entran en anergia [7].

Fenotípicamente se pueden distinguir las T1 por expresar en membrana únicamente la inmunoglobulina M ( $mIgM^{high}$ ,  $IgD^{-}$ ,  $CD21^{-}$ ,  $CD23^{-}$ ), mientras que el estadio T2 además de expresar la inmunoglobulina M expresa la inmunoglobulina D y los marcadores CD21 y CD23 ( $mIgM^{high}$ ,  $mIgD^{+}$ ,  $CD21^{+}$ ,  $CD23^{+}$ ), (figura 2)

De la fase transicional los linfocitos B pasan a los estadios madurativos definitivos de linfocitos B1 y B2. A su vez, los linfocitos B2, se dividen en linfocitos B foliculares y linfocitos B de la zona marginal. Parece que es la señalización principalmente a través del BCR la que marca el tipo de linfocito B maduro. Así, una señalización fuerte daría origen a los linfocitos B1, una señalización



intermedia a los linfocitos foliculares y una señalización más débil a los linfocitos de la zona marginal[8].



**Figura 2:** Estadios del desarrollo en la médula ósea y en la periferia (bazo) de los linfocitos B. Se indican los marcadores de diferenciación (CD) expresados en superficie así como el nivel de expresión de las inmunoglobulinas en cada etapa. (Adaptado de Monroe et al. 2007)

Además de la señalización a través del BCR también participan otras moléculas de membrana, en un caso activadoras como el CD19 y CD21, en otros casos inhibitoras como el CD22 y CD45 y en otro caso imprescindibles para la supervivencia del linfocito B, como es el BAFFR. Por su especial relevancia a continuación se describirá con mayor profundidad la señalización a través de BAFF y su receptor así como de algunos ligandos y receptores asociados.

Durante muchos años se creyó que la supervivencia de los linfocitos B recaía únicamente en las señales recibidas a través de su receptor[9]. Sin embargo, el descubrimiento BAFF (del inglés, *B-cell activating factor belonging to the TNF family*) o también conocido como BLyS (del inglés, *B-lymphocyte stimulator*) cambió este punto de vista radicalmente[10]. Se comprobó su importancia cuando en el ratón BAFF-deficiente o de su receptor BAFFR-deficiente, se observó que se producía una falta de la mayoría de linfocitos B periféricos maduros [10]. Además, los tratamientos con agentes neutralizantes de BAFF tanto en ratones como en humanos provocaban la pérdida de los linfocitos B maduros [11].

En los últimos años, BAFF ha emergido como un factor de supervivencia esencial para el linfocito B, permitiendo a los linfocitos B su maduración y su persistencia como linfocito B periférico. Así, el mantenimiento de la homeostasis de los linfocitos periféricos depende de dos elementos fundamentales, BAFF y un BCR funcional.

El defecto de la síntesis de BAFF en ratones deficientes afecta principalmente a la generación de los linfocitos B2. Así, su déficit afecta al desarrollo de los linfocitos B en la etapa T1 produciéndose

una carencia de linfocitos B Foliculares y Zona Marginal. Sin embargo, los linfocitos B1 no requieren BAFF para su supervivencia y por tanto se desarrollan normalmente[10].

Por otro lado, el ligando APRIL (del inglés, *proliferation inducing ligand*), es un ligando miembro de la familia de TNF[12]. Es una proteína de membrana, que contiene una porción extracelular de 201 aminoácidos, una porción transmembrana hidrofóbica y una región citoplasmática[13]. APRIL es procesada intracelularmente por acción enzimática obteniéndose una forma secretada que es la que ejerce la función de estimulación de la proliferación tanto en células normales como tumorales. Este ligando comparte un gran grado de homología con BAFF, cosa que explica que ambos se puedan unir en cierta medida a los mismos receptores.

Principalmente BAFF es producido por células dendríticas, neutrófilos, monocitos, células estromales, células T activadas, células B malignas y células epiteliales [14].

BAFF se une a su receptor BAFFR con alta afinidad y además comparte con APRIL (del inglés, *proliferation inducing ligand*) su unión a dos receptores más. Uno de ellos es TACI (del inglés, *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*) y el otro es BCMA (del inglés, *B cell maturation Ag*).

La expresión de BAFFR en linfocitos B, comienza en el estadio de linfocito B inmaduro (ya que en las etapas que tienen lugar en médula ósea los linfocitos B no lo expresan y son BAFF-independientes) y continúa a lo largo de su proceso madurativo. Sin embargo, hay que remarcar que a lo largo de este proceso son necesarias tanto la señal producida por el complejo BAFF/BAFFR como las señales generadas por el BCR para generar linfocitos B maduros desde los estadios transicionales T1 y T2 del bazo [15], [16].

TACI es considerado como un regulador negativo de la supervivencia de los linfocitos B dado que en el ratón TACI<sup>-/-</sup> muestra hiperplasia de linfocitos B, autoinmunidad y linfomas [17],[18]. En particular, los linfocitos de la Zona Marginal y los B1 se encuentran expandidos en proporción al resto.

Además, TACI es necesario para realizar el cambio de isotipo y en particular, para la producción de IgA [17]. La señal que se genera a través de este receptor parece que complementa a la que se genera a través de BAFFR.

Una vez llegada la señal a la célula, mientras que la estimulación de BAFFR activa fuertemente el factor nuclear alternativo kB2 (NF-kB2) y débilmente el factor nuclear clásico (NF-kB1) [19]. Ambos factores nucleares son necesarios para la supervivencia del linfocito B.

### 1.1.3. Tercera etapa: Activación de linfocitos B, T-dependiente (T-D)

Durante esta etapa, y después de su activación, los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpos o células de memoria. Para ello es indispensable la interacción con el antígeno específico para el BCR y se postula que podría interactuar con él principalmente de tres formas: en forma soluble en el interior del folículo linfático[20], en forma

soluble a lo largo de su trayecto por el sistema circulatorio o reconociendo el antígeno en la superficie de otras células como células dendríticas y/o FDC en su forma nativa.[21]

Una vez el antígeno es reconocido por el BCR, este es interiorizado junto con el receptor en vesículas endosómicas. Después, el antígeno es procesado en pequeños fragmentos peptídicos que son presentados en la membrana en el contexto de las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II para que puedan ser reconocidos por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los cuales han sido previamente activados por ese mismo antígeno, principalmente a través de una célula dendrítica.

El agrupamiento de los BCR tras la unión con el antígeno, hace posible la generación de las primeras señales de activación de linfocitos B. Como las colas citoplasmáticas de las moléculas de IgM e IgD están formadas sólo por tres aminoácidos la transducción de señales al interior celular la llevan a cabo dos moléculas que se expresan asociadas al BCR denominadas Igα y Igβ y que poseen dominios tipo ITAM (motivos de activación del inmunoreceptor basados en tirosina).

La respuesta humoral frente antígenos proteicos requiere de la colaboración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y se conoce como respuesta T-dependiente y es el tipo de respuesta predominante en los linfocitos B foliculares.

Los primeros contactos entre los linfocitos B y T estimulados por el antígeno se producen en la interfase entre los folículos y las zonas T. Para que todo esto suceda, se producen cambios en la expresión de receptores de quimiocinas (ejemplo CCR7) que facilitan el encuentro en esta localización.

Una vez próximos los linfocitos B y T expresan moléculas coestimuladoras que inducen una mayor activación mutua, proceso conocido como segunda señal. Las principales moléculas coestimuladoras que expresan los linfocitos B son por un lado CD80 y CD86 y por otro lado CD40 que se unen a CD28 y a CD40L respectivamente, las cuales se expresan en linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras su activación por el antígeno.

Además de las moléculas coestimuladoras, los linfocitos T activados secretan citoquinas como IL-2, IL-4, IL-5 e IL-6 que actúan como terceras señales y que son necesarias para la plena activación de los linfocitos B.

Es importante destacar que un único linfocito B que se une y endocita una proteína puede presentar varios péptidos junto con moléculas del MHC de clase II a diferentes linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, pero la respuesta humoral resultante es específica para la proteína nativa original.

Como resultado de la activación, algunos linfocitos B migran a los folículos linfáticos para desarrollar la reacción de centro germinal.[22-23]

#### 1.1.3.1. Centro germinal

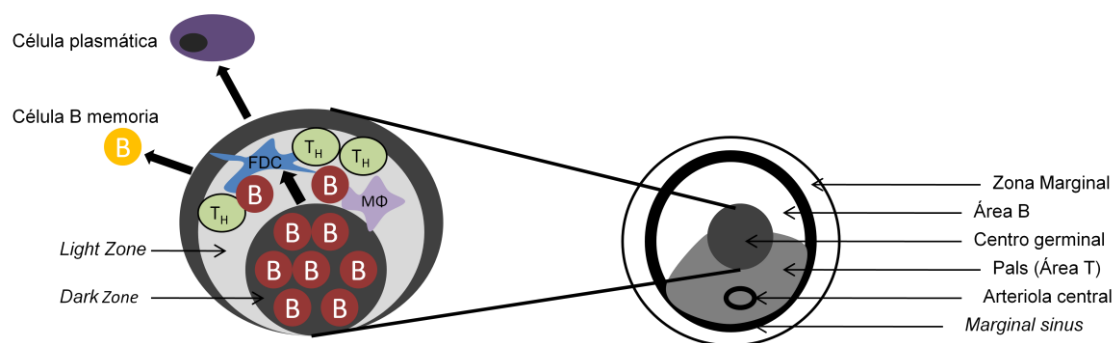
Durante el proceso que tiene lugar en el centro germinal, los linfocitos B se expanden clonalmente, cambian de isotipo de inmunoglobulina, sufren hipermutación somática para incrementar su afinidad por el antígeno y se diferencian finalmente a células plasmáticas o en células de memoria.

Los folículos linfáticos están constituidos principalmente por linfocitos B de tipo folicular aunque la arquitectura de los folículos linfáticos y las reacciones de los centros germinales situados en su interior depende de la presencia de las FDC. Estas células sólo se encuentran en los folículos linfáticos y son de origen fibroblástico[24]. Expresan receptores de Fc así como receptores de complemento CR1, CR2 y CR3. Estas células tienen largas proyecciones citoplasmáticas que forman una trama alrededor de la cual se disponen los centros germinales.

La migración de linfocitos B junto con linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno específicos hacia el folículo linfático anexo desde la zona B-T, desplaza la población de linfocitos B preexistentes del folículo hacia el polo apical del mismo constituyendo así el manto.

Los linfocitos B en división recién inmigrados al folículo reciben el nombre de centroblastos y son células con una tasa de división mitótica de 12 horas. A medida que se van dividiendo van formando la llamada zona oscura del centro germinal situada en la zona basal del mismo. A medida que se van dividiendo, una parte de la progenie se transforma en centrocitos que se van disponiendo en la zona apical donde constituyen la zona clara del mismo (figura 3). Estas células se encuentran en contacto con las células dendríticas foliculares y con linfocitos T situados en la zona apical[25].

En la formación del centro germinal, también intervienen quimiocinas. Así, en la zona oscura se produce CXCL12 hacia la cual son atraídos los centroblastos ya que poseen altos niveles de receptor CXCR4. Por el contrario, en la zona clara se produce la quimiocina CXCL13 hacia la cual son atraídos los centrocitos gracias a que poseen el receptor para esa quimiocina (CXCR5).



**Figura 3:** A la izquierda, ampliación del centro germinal donde se muestra un esquema de la reacción que tiene lugar en su interior. A la derecha, se muestra una sección de bazo donde se indican los diferentes compartimentos que forman un folículo linfático. T<sub>H</sub>: célula T colaboradora, B: célula B, MΦ: macrófago, FDC: Célula Folicular dendrítica. (Adaptado de Goetz et. al 2008)

### 1.1.3.2. Maduración de la afinidad

Definimos maduración de la afinidad como aquel proceso dirigido a aumentar la afinidad de los anticuerpos por un antígeno concreto conforme evoluciona la respuesta humoral dependiente de

linfocitos T y tiene lugar en los centroblastos en división situados en la zona oscura del centro germinal.

En estas células los genes de la región variable de las inmunoglobulinas experimentan una serie de mutaciones puntuales (hipermutación somática) a una velocidad extremadamente elevada de tal forma que la secuencia de nucleótidos puede variar hasta en un 5% de la secuencia original. Estas mutaciones se concentran generalmente en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), y mayoritariamente en el CDR3.

Las mutaciones no son introducidas de forma aleatoria sino que se acumulan en unas regiones denominadas “*Hot spot*” [26]. Las mutaciones transicionales son más frecuentes que las transversionales. Las mutaciones transicionales consisten en el cambio de una base pirimidínica por otra (Citosina/Timina) o una base purínica por otra (Adenina/guanina).

Las mutaciones transversionales consisten en el cambio de una base purínica por una pirimidínica o viceversa.

La hipermutación somática depende la enzima AID (del inglés, *Activation Induced Deaminase*) [27]. Esta enzima también se ha visto que está involucrada en el cambio de isotipo. La AID actúa preferentemente sobre la hebra de DNA no transcrita [28]. Por la acción de la AID se produce la deaminación de una citosina dando lugar a un Uracilo. A partir de aquí, el uracilo que ha sido cambiado en una de las hebras puede ser tratado como una timina en las sucesivas replicaciones dando lugar en la célula a la pareja A/T mientras que la otra célula transmitirá la pareja G/C original. Por este mecanismo se generan mutaciones de tipo transicionales. Por otro lado, el uracilo generado por la AID, puede ser reconocido y eliminado por la enzima Uracil-DNA glicosilada (UNG) generándose así un hueco que luego puede ser rellenado por cualquiera de los cuatro nucleótidos. Por esta vía se pueden producir mutaciones transicionales y transversales. Estas dos situaciones explicarían los cambios que se producen en C/G.

Para explicar los cambios que se producen en A/T se cree que intervienen la exonucleasa I y la polimerasa  $\eta$ . La repolimerización a cargo de la polimerasa  $\eta$  puede ser con cualquiera de los cuatro nucleótidos ya que tiene una baja fidelidad de copia[29].

Mientras que algunas de estas mutaciones provocan el aumento de la afinidad por el antígeno, hay otras que pueden provocar una disminución. Se sabe que en la selección de los clones de mayor afinidad juegan un papel relevante los complejos antígeno-complemento presentes en la membrana de las FDC así como los linfocitos T CD4 antígeno-específicos localizados en la zona clara del centro germinal.

Como resultado de esta interacción los linfocitos B que se unen con mayor afinidad a los complejos antígeno-complemento unidos a las FDC sobreviven.

Los linfocitos que se han seleccionado positivamente pueden abandonar el centro germinal y convertirse en células plasmáticas o pueden volver a la zona oscura y comenzar otra ronda de proliferación y de maduración de la afinidad[25].

### 1.1.3.3. Cambio de isotipo

El cambio de isotipo es un proceso que permite que una inmunoglobulina, respetando la misma especificidad antigénica, pueda cambiar a un isotipo IgG, IgA o IgE y por tanto pueda desempeñar una función diferente.

Es un proceso que se desencadena en linfocitos activados. Además, es dependiente de transcripción y de la acción de la enzima AID.

El cambio de isotipo se da sobre unas regiones determinadas de las inmunoglobulinas situadas en posición 5' de cada gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, denominadas regiones S [30],[31]. Estas regiones de 1-12 Kb tienen secuencias muy repetitivas y caracterizadas en las que la cadena que no se transcribe es rica en G.

Durante la transcripción, la hebra de RNAm naciente se empareja con el DNA, quedando la otra hebra, rica en G, en forma de cadena simple sobre la cual puede actuar la AID. Para producir el corte en la otra hebra de DNA, la AID podría actuar sobre la cadena molde antes de que esta se asociara con el RNAm o después de que la RNasaH degradase el RNA asociado al DNA. En este proceso podría intervenir también la maquinaria enzimática UNG+APE1, que eliminaría los uracilos y fragmentaría el DNA. Después de producirse el corte en las dos hebras de DNA se produce el empalme uniendo la región VDJ a la nueva cadena pesada, creándose un círculo de excisión con el trozo de DNA intermedio que queda de forma episómica.

El proceso de cambio de isotipo se ha relacionado con la estimulación del CD40 a través de su ligando en la célula T (CD40L) aunque recientemente se ha relacionado también con la señalización a través de BAFF y APRIL [32].

En este proceso las citoquinas desempeñan una función esencial en la regulación del cambio a algunos isotipos concretos. Por ejemplo, la IL-4 es el principal factor del cambio al isotipo IgE, mientras que la síntesis de IgG2a en ratones depende del IFN- $\gamma$ .

#### 1.1.3.4. Células plasmáticas

En el paso a célula plasmática o a célula de memoria no están aún definidos los distintos mecanismos implicados, aunque por ejemplo se sabe que para dar lugar a una célula plasmática es necesario el factor de transcripción BLIMP1 (del inglés, *B-lymphocyte-induced maturation protein 1*) y la interleucina IL-21 [23, 33]

Se pueden producir dos tipos de células plasmáticas: las de vida corta y las de vida larga. Se sabe que ambos procesos tienen lugar en el centro germinal, y que la generación de células B memoria es necesaria para producir células plasmáticas de vida larga.

Ambas poblaciones de células plasmáticas expresan el marcador CD138 (Syndecan-1), no se dividen y ya no expresan los marcadores típicos de linfocitos B CD19 y B220. Además expresan moléculas de adhesión como son el ligando de la selectina E y P, CD11a, CD18 y CD44. También expresan CXCR4 el ligando del cual se encuentra en los cordones medulares de los ganglios, en la pulpa roja del bazo y en médula ósea. Por lo contrario, dejan de expresar CXCR5 y CCR7.

El 0,1-1% de la médula ósea podría ser ocupada por células plasmáticas de vida larga, esto significa que en ratones alrededor de  $10^6$  células de médula ósea son células plasmáticas, mientras que en humanos podrían suponer  $10^9$  células.

#### 1.1.3.5. Células memoria

Algunos de los linfocitos B activados por sus antígenos no se convierten en células secretoras de anticuerpos. En vez de esto, adquieren la capacidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo sin proliferar y aparentemente sin estimulación antigénica. Son generadas en los centros germinales y son capaces de organizar una respuesta rápida a una nueva exposición al mismo antígeno. Generalmente han sufrido cambio de isotipo, el receptor es de alta afinidad y pueden recircular entre los tejidos linfáticos.

Estadio madurativo	Marcadores
<b>Transicionales</b>	
Transicionales 1	CD19 <sup>+</sup> IgMhigh IgD <sup>-</sup> CD21 <sup>-</sup> CD23 <sup>-</sup>
Transicionales 2	CD19 <sup>+</sup> IgMhigh IgD <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup> CD23 <sup>+</sup>
<b>Maduras</b>	
Foliculares	CD19 <sup>+</sup> IgMlow IgDhigh CD21intermediate CD23high
Zona marginal	CD19 <sup>+</sup> IgMhigh IgDlow CD21high CD23 <sup>-</sup>
B1a	CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> IgMhigh IgDlow CD43 <sup>+</sup>
B1b	CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> IgMhigh IgDlow CD43 <sup>+</sup>
Plasmáticas	CD19 <sup>-</sup> FcγRII <sup>+</sup> CD138 <sup>+</sup> CD93 <sup>-</sup>
B10	CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD1d <sup>+</sup>

**Tabla 1:** Resumen de los marcadores presentes en las etapas transicionales y maduras de la célula B

#### 1.1.4. Tercera etapa: Activación de linfocitos B, T- independientes (T-I)

Los linfocitos B con respuesta T-independiente (TI) son típicamente los linfocitos de la zona marginal y los linfocitos B1. Son capaces de generar una respuesta secundaria intensa y duradera, cuando tiene lugar una exposición secundaria a los antígenos que reconocen, típica de los linfocitos de memoria (aunque presentan cambio de isotipo y maduración de la afinidad limitados).

Este tipo de respuesta es el mecanismo principal de defensa del huésped frente a las infecciones por bacterias encapsuladas.

Los antígenos implicados en respuestas TI independientes en la mayoría de casos son polivalentes, es decir, están compuestos de múltiples epítopos antigénicos idénticos los cuales son

generalmente polisacáridos, glucolípidos y ácidos nucleicos. La unión de la Ig de membrana a estos antígenos provoca el agrupamiento de los receptores lo que origina la activación del linfocito sin necesidad de la presencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Esto es debido en parte a que por ejemplo, los antígenos polisacáridos pueden activar el sistema del complemento por la vía alternativa generándose segundas señales para activar finalmente a los linfocitos B. Esta segunda señal también podría provenir a través de los TLRs tras la unión con ligandos bacterianos y/o por la interacción con células dendríticas o macrófagos, mediante el sistema de señalización de BAFF[34]. A los tres días de la exposición al antígeno en las condiciones mencionadas los linfocitos B2 de la zona marginal se transforman en plasmablastos que producen IgM específicas (característica que comparten con los linfocitos B1)[35]

#### 1.1.4.1. Linfocitos B1

Como se indicó previamente, los linfocitos B1 son de respuesta también tipo TI y dan lugar a los anticuerpos conocidos como “naturales” los cuales están presentes en la circulación de los individuos sanos sin que se haya producido una exposición evidente al antígeno.

Los linfocitos B1 tienen el mismo origen que el resto de linfocitos B, originándose en la etapa pre-natal en el hígado fetal, aunque en la etapa post-natal va disminuyendo su producción a medida que la hematopoyesis va dando lugar a linfocitos B foliculares o de la zona marginal (considerados en su conjunto como linfocitos B2).

Los linfocitos B1 no han podido ser identificados en el hombre aunque se cree que la población de linfocitos B de memoria de la zona marginal podrían desarrollar su función[6] , se han identificado sólo en el ratón. Fenotípicamente son IgM<sup>++</sup>, IgD<sup>low</sup>, CD11b<sup>+</sup> y se localizan en la peritoneo, pleura y en bazo. Se caracterizan por producir anticuerpos de forma espontánea, también conocidos como anticuerpos naturales, por lo que se les considera que se sitúan como una población de linfocitos intermedia entre la inmunidad innata y la adaptativa. El mantenimiento de estos linfocitos es a partir de los linfocitos B1 pre-existentes mediante autodivisión.

Los linfocitos B1 se subdividen en dos poblaciones distintas en función de la expresión del marcador CD5. Los linfocitos B1a son CD5<sup>+</sup>, mientras que los linfocitos B1b son CD5<sup>-</sup>.

Hay dos hipótesis que explican la generación de linfocitos B1. Por un lado está la hipótesis del linaje, la cual defiende que las poblaciones B1 y B2 provienen de un precursor distinto. Esta teoría se basa en que la reconstitución de la médula ósea en ratones a partir de células de hígado fetal da lugar a linfocitos B1, mientras que la reconstitución con médula ósea adulta da lugar principalmente a linfocitos B2[36]

Por otro lado, la hipótesis de la selección defiende que es la unión fuerte al BCR de ciertos antígenos, en su fase inmadura, la que da lugar a los linfocitos B1.

Por último, hay autores que defienden la coexistencia de ambas teorías por lo cual sería necesario un precursor diferente a ambos tipos de linfocitos pero también una señalización fuerte por el BCR.



#### 1.1.4.2. Linfocitos B10

La primera vez que se reportó la existencia de este subtipo de célula B fue en el modelo murino de esclerosis múltiple EAE (encefalomielitis autoinmune experimental)[37].

Estudios recientes indican la existencia de distintos subtipos de células B capaces de suprimir la progresión de la enfermedad o capaces de mediar la recuperación de una situación de inflamación a través de un mecanismo que incluye la producción de las citoquinas IL-10 y TGF-beta, mediante presentación antigénica o la interacción con otras células del sistema inmune bien de forma directa o a través de la secreción de anticuerpos.

Se han propuesto dos subtipos de célula Breg en base a ser un “fenotipo adquirido” o un fenotipo innato. Por una lado, el fenotipo adquirido de célula B reguladora se produciría a partir de células B de bazo a través de la interacción CD40-CD40L o través del propio BCR. Por otro lado, el fenotipo innato de célula Breg se generaría a partir de células B de la Zona Marginal (del inglés, *Marginal Zone B cell*)[38].

La producción de la IL-10 por parte de la célula Breg sólo aparecería bajo condiciones inflamatorias[39]. Esta producción se ha observado *in vivo* en diferentes modelos experimentales como son el de EAE, Artritis o lupus. Asimismo la producción de la IL-10 *in vitro* se puede dar tras la activación de las células B con LPS, CpG o la proteína HSP-60 (del inglés, *heat shock protein-60*), situación que ha sido observada también en humanos[40].

Tanto en la EAE como en los modelos de artritis, ambas situaciones caracterizadas por poseer un respuesta mediada a través de célula T donde se ha observado que las células B reguladoras pueden restablecer el balance de las respuestas Th1/Th2. Además, se ha propuesto en el modelo EAE que la célula Breg limitaría la expansión de las células T que tiene lugar en los nódulos linfáticos[41].

Recientemente se ha propuesto que el fenotipo de las células Breg esplénicas productoras de IL-10 vendría marcado por la expresión de las moléculas CD1d y CD5. Esta característica sería compartida tanto por las células de la Zona Marginal, del precursor T2-MZ y las células B1a. Aunque esta producción de IL-10, motivo por el cual se propone llamarlas células B10, sólo se observa en un único subtipo celular que expresa un nivel alto de la molécula CD1d, CD1d<sup>high</sup>[42].

#### 1.2. El receptor de linfocitos B

El receptor de linfocitos B o BCR está compuesto por una molécula de inmunoglobulina de membrana (mIg), expresada exclusivamente por este tipo celular la cual se asocia a las cadenas accesorias Ig $\alpha$  y Ig $\beta$  y al complejo del correceptor formado por CD19, CD21 y CD81.

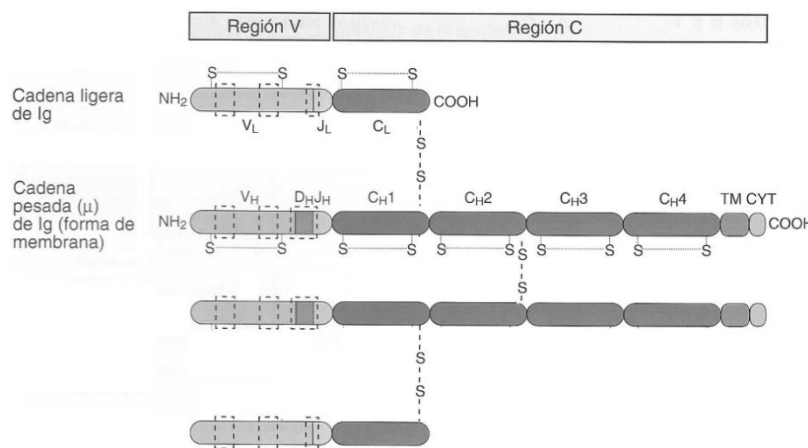
El BCR tiene una estructura simétrica formada por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas dos a dos, dos de ellas son las cadenas pesadas y las otras dos las cadenas ligeras de la Ig. Cada una de las cadenas pesada y ligera están formadas por unidades que se pliegan de forma globular dando lugar a los llamados dominios Ig.

Las cadenas pesadas oscilan entre 55-70 KDa y las ligeras unos 24 KDa. Mientras que existe un único locus que codifica para las cadenas pesadas, para las cadenas ligeras existen dos locus que dan origen a dos tipos de cadena ligera diferente la cadena  $\kappa$  y la cadena  $\lambda$ . En humanos, hay un 60% de los anticuerpos formados con cadenas  $\kappa$  y un 40% formados por cadenas  $\lambda$ . En ratones, esta proporción aumenta hasta un 95% de anticuerpos con cadenas  $\kappa$  y solo un 5% para cadenas  $\lambda$ . En el ratón, el *locus* de la cadena pesada está situado en el cromosoma 12, el de la cadena ligera  $\kappa$  está situado en el cromosoma 6 y el de la cadena ligera  $\lambda$  está en el cromosoma 16, mientras que en ser humano, el *locus* de la cadena pesada se localiza en el cromosoma 14, el de la cadena ligera  $\kappa$  se localiza en el cromosoma 2 y el de la cadena ligera  $\lambda$  en el cromosoma 22.

La unión de las cuatro cadenas es mediante enlaces tipo puentes disulfuro (covalente) donde una cadena ligera está unida a una cadena pesada que a su vez se une a otra cadena pesada y ligera idénticas. Esto hace que cada molécula de anticuerpo tenga dos puntos de unión al antígeno.

En cada una de las cadenas de un anticuerpo se distinguen dos partes, una región variable situada en el extremo aminoterminal y una región constante situada en el extremo carboxiterminal.

La región variable de una cadena pesada ( $V_H$ ) está yuxtapuesta a la región variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) (figura 4). Las regiones variables son las responsables del reconocimiento de los antígenos y las regiones constantes de las cadenas pesadas son las responsables de mediar las funciones efectoras. Además, dependiendo de si poseen el dominio de unión a membrana, situado en la región constante de la cadena pesada, la inmunoglobulina permanecerá en membrana o será secretada (sIg) dando lugar así a los anticuerpos.



**Figura 4:** Estructura de la inmunoglobulina de membrana IgM. Se muestran las regiones variables y constantes de las cadenas pesadas y ligeras así como los puntos de unión, mediante enlace disulfuro, entre las diferentes cadenas. (adaptado de Abbas et al. 2005)[1]

Los anticuerpos pueden reconocer a casi todos los tipos de moléculas biológicas, tales como metabolitos intermediarios simples, azúcares, lípidos y hormonas además de moléculas como hidratos de carbono, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. La unión antígeno-anticuerpo es

reversible y se da habitualmente por enlaces tipo puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas.

Los anticuerpos se diferencian entre ellos principalmente por las diferencias en las zonas hipervariables situadas dentro de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, llamadas zonas determinantes de la complementariedad o CDR. Existen tres regiones CDR: CDR1, CDR2 y CDR3. Las tres regiones variables de la cadena pesada están juntas a las tres regiones variables de las cadenas ligeras y forman la superficie de unión al antígeno. De las tres, la más variable y la que lleva a cabo el contacto más amplio con los antígenos es la CDR3.

Según la estructura de la cadena constante los anticuerpos se pueden dividir en diferentes clases (o isotipos) que son designadas como IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A su vez algunas de estas clases se pueden subdividir en subclases como la IgA y la IgG, dando lugar a las subclases IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en humanos; y las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3 en ratón. Aunque no todas las cepas de ratón tienen todas las subclases. Por ejemplo, el ratón NOD y el ratón C57BL/6 no tienen el gen para la IgG2a, mientras que el ratón Balb/c no tiene el IgG2c.

Tal y como se ha comentado previamente, los anticuerpos pueden estar asociados a la membrana (mIg) o pueden ser secretados (sIg). Los que se encuentran unidos a membrana conservan un dominio de unos 26 aminoácidos más en el extremo carboxiterminal que se unen a la membrana y dependiendo de la clase de anticuerpo tiene una cola de aminoácidos intracitoplasmática más o menos larga.

Todas las inmunoglobulinas de membrana son monoméricas mientras que las formas secretadas pueden diferir unas de otras. Las IgG, IgE son también secretadas de forma monomérica igual que la IgA circulante. Mientras que las IgM secretadas son pentaméricas y la IgA de mucosas son diméricas.

### 1.3. Unión antígeno-anticuerpo

La alta especificidad de los anticuerpos les hace capaces de distinguir entre dos epítomos que difieren incluso en un único aminoácido.

La afinidad del anticuerpo se representa por la constante de disociación,  $K_d$ , situada entre  $10^{-7}$  y  $10^{-11}$  M, que indica la concentración de antígeno necesaria para ocupar la mitad de las moléculas de anticuerpos. Valores de  $K_d$  más pequeños indican una afinidad más alta.

Por otro lado, cabe destacar el concepto de avidéz, el cual tiene en cuenta los diversos sitios de unión que pueden tener algunas moléculas de anticuerpo como la IgM secretada sobre un mismo antígeno. La avidéz, al tener en cuenta las diversas uniones es siempre mayor que la afinidad.

Los epítomos formados por varios residuos de aminoácidos adyacentes reciben el nombre de determinantes lineales. En muchos casos los epítomos lineales sólo aparecen cuando la proteína está desnaturalizada ya que la conformación tridimensional hace que no puedan acceder los anticuerpos. Por el contrario, otros anticuerpos reconocen epítomos conformacionales los cuales

sólo aparecen cuando la proteína se encuentra en la conformación nativa y no cuando está desnaturalizada.

Mientras que los anticuerpos pueden reconocer epítomos conformacionales de macromoléculas grandes, el TCR sólo puede reconocer péptidos pequeños lineales en el contexto de las moléculas del MHC.

Excepto para la IgE, las funciones efectoras llevadas a cabo por la región Fc solo se activan sobre aquellos que han reconocido y unido antígenos y no por aquellos que se encuentran libres.

#### 1.4. Selección del repertorio de linfocitos B

El linfocito B, de forma similar a lo que ocurre con linfocitos T en el timo, necesita del contacto de una forma débil (baja afinidad) con los antígenos presentes en médula ósea para su maduración. Este proceso se llama de selección positiva. Sin embargo si el encuentro del receptor con un antígeno es de alta afinidad en la médula ósea se induce la muerte de la célula por apoptosis. Este proceso se define como selección negativa y asegura que no aparezcan linfocitos autoreactivos, y con ello que se mantenga la tolerancia a lo propio.

Existe un proceso que puede rescatar al linfocito de la apoptosis conocido como edición del receptor. Este proceso consiste en recombinaciones adicionales de segmentos VJ de las cadenas ligeras para que de esta manera la reactividad contra autoantígenos desaparezca. Con el mismo objetivo también se puede reordenar el alelo para la otra cadena ligera. Este proceso está mediado por una reactivación de los genes RAG.

Sobre la cadena pesada también puede haber edición del receptor aunque es más infrecuente.

Un proceso similar a la edición del receptor es la revisión del receptor la cual tiene lugar fuera de médula ósea y durante el proceso de activación del linfocito B en los centros germinales. Este proceso puede tener lugar cuando hay una señalización débil a través del BCR como consecuencia de un proceso de hipermutación somática que diera lugar a un BCR de baja afinidad, un cambio de especificidad del receptor, o porque la hipermutación somática genere un codón stop en la proteína.

Igual que sucedía en la edición del receptor este proceso tiene lugar gracias a que se reactivan los genes RAG.

#### 1.5. Generación de Tolerancia en linfocitos B

Tanto el receptor de célula B (BCR) como el de célula T (TCR) son generados inicialmente de forma aleatoria. Esto confiere al sistema inmunitario la capacidad de reaccionar contra prácticamente cualquier sustancia extraña del organismo y por extensión también contra estructuras propias si no fuera porque existen mecanismos de tolerancia que regulan tanto a nivel central como periférico la presencia de linfocitos T y B autoreactivos, es decir con BCRs y TCRs capaces de reconocer autoantígenos.

Dado que este estudio está focalizado en linfocitos B, en este apartado sólo se hará referencia a los mecanismos de tolerancia que tienen lugar en estas células.

#### 1.5.1. Tolerancia central en linfocitos B

Los mecanismos de tolerancia central que controlan la presencia de células B autoreactivas son la delección clonal, la edición del receptor y la anergia. Aunque inicialmente se creyó que la delección clonal era el mecanismo más importante en la eliminación de células B autoreactivas, actualmente se sabe que el mecanismo principal es la edición del receptor. Ésta consiste en una nueva reordenación de la región variable V(D)J para evitar la autoreactividad del BCR. La delección clonal, actuaría en un segundo lugar tras el fracaso de la edición del receptor [43].

Por su parte, la delección clonal consiste en la eliminación por apoptosis de aquellos linfocitos cuyo BCR reconoce a antígenos de membrana con alta afinidad. La activación de estos linfocitos B inhibe la expresión del factor de supervivencia BAFF lo que lleva a la célula a la apoptosis [44]. Además también se da una hiperexpresión del factor pro-apoptótico BIM [45].

Tanto la edición del receptor como la delección clonal tienen lugar cuando el linfocito B inmaduro reconoce un antígeno particulado, por ejemplo en la membrana de una célula.

Sin embargo, cuando el autoantígeno reconocido por el BCR se encuentra en forma soluble, el linfocito inmaduro puede entrar en estado de anergia. Este estado se caracteriza por la disminución de la expresión del BCR de membrana que produce que el linfocito autoreactivo, una vez en la periferia, sea incapaz de responder a dicho antígeno [46].

#### 1.5.2. Tolerancia periférica en linfocitos B

Una vez los linfocitos B pasan a circulación general, son también controlados por mecanismos de tolerancia que impiden su activación. Los principales mecanismos de tolerancia que actúan durante este periodo de tiempo son, la inducción de anergia, delección clonal, revisión del receptor o la ignorancia (figura 5).

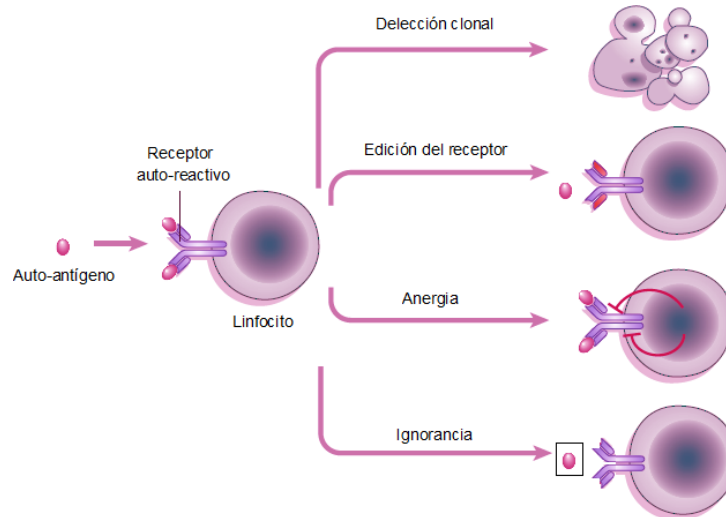
De forma general, la activación de los linfocitos B, requiere la participación de linfocitos T previamente activados. En ausencia de ayuda de un linfocito T específico activado, el linfocito B pasa a un estado de anergia que se ve reflejado por la bajada de expresión de su receptor [47].

También, la molécula de membrana CD5 puede transmitir señalización inhibitoria al linfocito B tras interactuar este con su autoantígeno pudiendo llevarle a un estado de anergia [48].

Otro mecanismo de tolerancia es la delección clonal. Así, la interacción entre linfocitos B y T activados específicos para un autoantígeno puede causar la apoptosis del linfocito B a través de la vía de FAS.

Por último, otro mecanismo de tolerancia periférica consiste en la Ignorancia clonal consiste en que algunos linfocitos autoreactivos no son capaces de encontrar el autoantígeno por su baja

concentración o porque este está inaccesible. Esta situación sucede en ciertas regiones anatómicas que son consideradas como “inmunoprivilegiadas”. Es un ejemplo de ello, el sistema nervioso central donde la barrera hematoencefálica hace de barrera física para el paso de linfocitos en condiciones fisiológicas. Hay que añadir que en esta zona inmunoprivilegiada no hay presencia de células presentadoras de antígeno y, además, en condiciones normales las neuronas no expresan moléculas de clase I o en todo caso a niveles muy bajos [49].



**Figura 5:** Mecanismos de tolerancia que tienen lugar en linfocitos B. Si el receptor generado es autoreactivo puede darse delección clonal que consiste en la muerte de la célula por apoptosis. Como alternativa, el linfocito B puede reordenar de nuevo la cadena ligera para evitar la autoreactividad. Si el linfocito B expresa un BCR autoreactivo, puede entrar en estado de anergia en el cual la célula no responde aunque interaccione con el antígeno. La ignorancia clonal se produce cuando el BCR autoreactivo es incapaz de interaccionar con su autoantígeno. (Adaptado de Goodnow et al. 2005)[50]

## 2. AUTOINMUNIDAD Y DIABETES TIPO I (T1D)

El fenómeno de la autoinmunidad fue descrito por Paul Ehrlich en 1899. Por aquella época propuso que había receptores preformados en las células que eran liberados como anticuerpos circulantes, que se dirigían hacia el reconocimiento antigénico [51].

Hoy día se sabe que la enfermedad autoinmune es el resultado de un conjunto de fallos genéticos, ambientales y patogénicos que llevan a una disfunción de sistema inmunitario caracterizado por una inflamación y un ataque hacia los propios tejidos, órganos y células. Esta disfunción puede ser consecuencia de una actividad aberrante de linfocitos T o por la proliferación y mantenimiento de algunos linfocitos B, los cuales dan lugar a una producción desregulada de anticuerpos autoreactivos.

Las enfermedades autoinmunitarias se pueden clasificar clásicamente en dos grupos: enfermedades que afectan a múltiples órganos las cuales son definidas actualmente como enfermedades autoinmunitarias sistémicas reumáticas (SARD, del inglés *Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases*) o enfermedades donde solo se afecta un único órgano o tejido en cuyo caso reciben el nombre de enfermedades autoinmunitarias órgano-específicas (tabla 2).

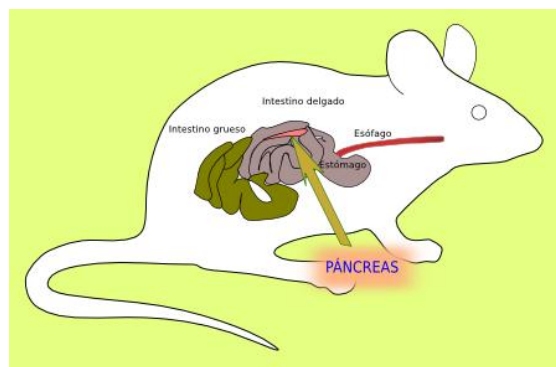
Enfermedades autoinmunitarias órgano-específicas	Órgano afectado
Tiroiditis autoinmune	Tiroides
Gastritis autoinmune	Estómago
Enfermedad celíaca	Intestino delgado
Enfermedad de Graves	Tiroides
Vitíligo	Melanocitos
Diabetes tipo I (T1D)	Célula beta pancreática
Esclerosis Múltiple	Cerebro/Médula espinal
Pénfigo	Piel
Hepatitis (autoinmune)	Hígado
Miastenia Gravis	Músculo
Cirrosis biliar primaria	Conductos biliares hepáticos
Anemia hemolítica autoinmunitaria	Sangre (eritrocitos)
Púrpura trombocitopénica autoinmunitaria	Sangre (plaquetas)
Granulomatosis de Wegener	Sangre (neutrófilos)
Síndrome Goodpasture	Colágeno tipo IV
Fiebre reumática aguda	Miocardio
Anemia perniciosa	Células parietales gástricas
Síndrome de Guillain Barré	Mielina del sistema nervioso periférico
Espondilitis anquilosante	Tendón, ligamento
Enfermedades autoinmunitarias sistémicas	
Artritis Reumatoide	
Lupus Eritematoso Sistémico	
Polimiositis/Dermatomiositis	
Escleroderma	
Vasculitis	

**Tabla 2:** Algunas de las enfermedades autoinmunitarias órgano-específicas y su órgano diana. También se muestran las enfermedades autoinmunitarias sistémicas más comunes. (Adaptado de Mahler et al. 2010 y Marrack et al. 2001 ) [51], [52]

La diabetes tipo I es una enfermedad autoinmunitaria que se caracteriza por la pérdida selectiva de las células beta pancreáticas productoras de insulina. Como en todas las enfermedades autoinmunitarias se debe a un trastorno autoreactivo de linfocitos T y B contra autoantígenos. El presente estudio tiene como objetivo el análisis de la función de un grupo de linfocitos B autoreactivos implicados en la respuesta autoinmune de la T1D. Por ello, en este apartado se discuten los aspectos más importantes relacionados con la enfermedad.

## 2.1. El páncreas

En este apartado se hace una breve descripción del órgano diana de la enfermedad haciendo hincapié en la porción endocrina que es la que se ve afectada por el ataque autoinmunitario. El páncreas es un órgano glandular impar con forma alargada. Está localizado transversalmente en la parte dorsal del abdomen en el que ocupa una posición profunda (figura 6).



**Figura 6:** Dibujo esquemático donde se muestra la ubicación del páncreas en el ratón así como los órganos anexos.

Contiene un conducto que lo recorre longitudinalmente llamado conducto pancreático o de *Wirsung* el cual comienza en la cola y continúa recorriendo todo el órgano. Cuando llega a la cabeza del páncreas se conecta al intestino a través de la ampolla de Vater, lugar donde se une al conducto colédoco procedente del hígado.

El páncreas es un tejido glandular formado por dos partes: el tejido endocrino, encargado de secretar hormonas, y el tejido exocrino que se encarga de secretar el jugo pancreático que contiene enzimas digestivas que digieren carbohidratos, lípidos y proteínas.

La porción endocrina del páncreas supone un 1-2% del total del órgano. La constituyen los **islotes pancreáticos o de Langerhans** los cuales se sitúan de forma dispersa dentro de la porción exocrina (acinos exocrinos).

A su vez los islotes pancreáticos están formados por cuatro tipos de células secretoras de hormonas (figura 7):

**Células beta:** son las encargadas de producir la insulina y constituyen el 70% de las células del islote. En el ratón se disponen formando un núcleo alrededor del cual se sitúan el resto de células.

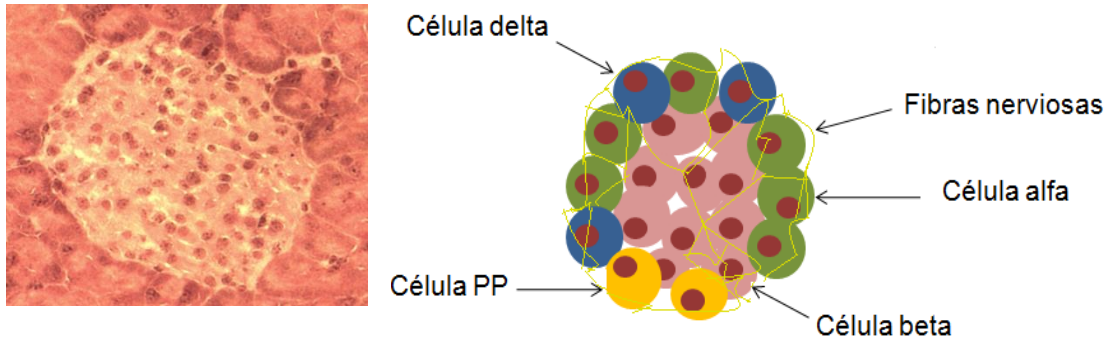
**Células alfa:** son las encargadas de secretar el glucagón y representan un 20% de las células del islote.

**Células delta:** son las encargadas de producir somatostatina y representan alrededor de un 5-10% de células del islote.

**Células PP:** son las encargadas de producir el polipéptido pancreático y representan aproximadamente un 2% del total de células del islote.

Los islotes están altamente vascularizados e inervados. Esta inervación está compuesta por nervios simpáticos, parasimpáticos y sensoriales además de células gliales que forman una compleja red que envuelve y penetra en los islotes [53].





**Figura 7:** Islote pancreático. A la izquierda, fotografía de un islote tomada sobre una sección de tejido teñida con hematoxilina-eosina. A la derecha, esquema del islote donde se identifican los diferentes tipos celulares que lo conforman.

## 2.2. Fisiopatología de la enfermedad

La T1D es una enfermedad autoinmunitaria organoespecífica, caracterizada por la destrucción de las células beta pancreáticas productoras de insulina [54]. Existe un primer periodo subclínico durante el cual se produce una infiltración linfocitaria progresiva de los islotes, que se denomina insulinitis, que destruye la masa celular beta [55], con la consiguiente disminución en la producción de insulina.

La aparición de la enfermedad clínica se produce cuando se ha destruido un 80-90% de la masa celular beta [56]. El debut clínico se caracteriza por la aparición de hiperglucemia, cetoacidosis, glucosúria, poliúria y polidipsia.

## 2.3. Factores genéticos

Estudios en ratones y humanos han aportado que la susceptibilidad a padecer la enfermedad es multigenética donde se han observado que se encuentran implicados un conjunto amplio de genes aunque de momento sólo unos pocos parecen que tienen un efecto realmente relevante. Por otro lado, muchos de los genes implicados no se conocen con certeza.

La terminología usada en humanos para designar los *loci* genéticos de susceptibilidad se designa con las siglas IDDM y un número a continuación (ejemplo IDDM1, IDDM2,...). De forma similar, en el caso de las regiones genéticas involucradas en la T1D en ratones se designan con las siglas *idd*. Igual que sucede en humanos, el MHC de clase II (*Idd1*) en ratones, es el factor genético más importante de predisposición a la enfermedad. Este puede suponer hasta un 40-50% de riesgo de padecer T1D. Dentro del MHC humano (HLA), los genes que se asocian principalmente con la enfermedad son los genes del MHC de clase II, DRB1 y DQB1. Cabe destacar que los genes de MHC de clase I también parecen tener un papel relevante. Además, se han propuesto unos 20 *loci* más no relacionados con el MHC involucrados en la enfermedad en el ratón NOD y unos 24 *loci* en humanos ([www.t1dbase.org](http://www.t1dbase.org)). Algunos de estos *loci* están presentes tanto en humanos como en ratones. Son ejemplo de ello, la molécula CTLA4 (*Idd5.1*), la vía de señalización de la IL-2 (*Idd3*) o

PTPN22 (Ptpn8, en ratón). Por su asociación relevante con la enfermedad, a continuación se describirá brevemente el papel que juegan cada uno de ellos.

En lo que respecta a la molécula CTLA-4 (antígeno linfocítico-T citotóxico 4), las variaciones alélicas que producen una reducción de la forma soluble de esta molécula inhibidora dan lugar a un descenso de la actividad de las células Treg, las cuales lo expresan constitutivamente. Este descenso de la capacidad de inhibición provoca que puedan escapar clonas de células T autoreactivas.

El gen PTPN22 o Ptp8 en ratón no sólo es relevante en la aparición de T1D, sino que además está implicado en otras enfermedades autoinmunitarias. Este gen codifica para una tirosina-fosfatasa en linfocitos relacionada con la regulación negativa de la activación de la célula T. En este caso las variantes alélicas que provocan una ganancia de función de este gen afectan al desarrollo y función de células Treg [57] provocando un descenso de su capacidad inhibidora.

Relacionado con éste, el gen PTPN2, también codifica para una tirosina-fosfatasa, que actúa como regulador negativo de la activación de la célula T y además participa en la señalización a través del IL2R (CD25). En este caso, receptor y ligando están asociados con la T1D.

#### 2.4. Factores ambientales

Aún siendo portador de alelos genéticos de riesgo, parecen necesarios la presencia de unos factores ambientales apropiados para que se desencadene la enfermedad. Entre estos factores se destacan los siguientes como más relevantes:

En primer lugar, se han propuesto los virus como factores ambientales de riesgo a padecer T1D. Parece establecido que la infección vírica por sí misma no puede ser la causa de la enfermedad. Sin embargo, el hecho de que en sueros de pacientes de debut diabéticos se han encontrado un alto título de anticuerpos contra enterovirus y específicamente a los del tipo coxackie parece indicar su implicación con la T1D. Además, cabe destacar un posible papel de mimetismo molecular entre el virus coxackie y la molécula GAD (descarboxilasa del ácido glutámico), la cual es uno de los autoantígenos considerado mayores en la T1D.

Por otro lado, otro agente ambiental altamente estudiado en relación a la T1D son las bacterias. Respecto a ellas, hay evidencias directas de que en roedores bajo condiciones de estabulación libre de patógenos o la administración de antibióticos, la aparición de la enfermedad está favorecida. Este punto estaría estrechamente relacionado con la “hipótesis de la higiene” la cual defiende que se da una presencia mayor de enfermedades autoinmunitarias y alérgicas en países desarrollados debida a un descenso de las infecciones causadas por unas mejores condiciones sanitarias[58-59].

Por último, existen otros factores no infecciosos que se relacionan con la T1D: Uno de ellos, es la ingesta de leche de vaca. Esta relación es debida básicamente a que se ha encontrado reactividad cruzada entre la albúmina presente en la leche de vaca con los anticuerpos anti-citoplasma de islote (ICA69), los cuales aparecen también en el debut de la enfermedad.

Menos extendido que la leche de vaca está el posible papel que juega la proteína del trigo, en concreto en el gluten. Frente a esta proteína, se ha observado una fuerte respuesta T en el inicio de la T1D aunque la respuesta desaparece con la evolución de la enfermedad[59]. Apoyando esta hipótesis está el hecho de que se ha observado una mayor incidencia de la enfermedad en ratones NOD cuya dieta es rica en gluten.

Otros factores que pueden afectar al menos en ratones NOD son temperaturas de la sala de estabulación bajas y estériles (SPF) que incrementan la incidencia y aceleran el debut de la enfermedad[60],[61]. Además otros factores de tipo estocástico parecen ser también determinantes para el desarrollo de la enfermedad. Algunos de estos últimos están asociados a la edad y al sexo (e.j., hormonas) y otros al estado de maduración del sistema inmune (e.j., repertorio de linfocitos T y B).

## 2.5. Linfocitos T CD4<sup>+</sup> como principales desencadenantes de la enfermedad

La diabetes tipo 1 tanto en humanos como en roedores, incluido el ratón NOD y la rata BB, es el resultado de la destrucción de las células beta pancreáticas mediada principalmente por linfocitos T. Según los últimos conocimientos sobre la enfermedad, para su inicio son necesarias tanto linfocitos T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Se cree que inicialmente actuarían los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, las cuales serían activadas en el nódulo linfático regional mediante la presentación de un autoantígeno por una APC procedente del islote pancreático; sería en segundo lugar, cuando los linfocitos T CD8<sup>+</sup> viajarían al islote para destruir a las células beta pancreáticas [62].

No se sabe con certeza cuál es el autoantígeno reconocido inicialmente. Sin embargo existen evidencias que refuerzan que, dentro de la cadena de sucesos que dan lugar a la T1D, es la propia insulina la primera molécula reconocida por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> autoreactivos y más concretamente contra la región B:9-23 de la insulina en estudios realizados con NOD.

La hipótesis que se baraja es la siguiente: La autoreactividad se daría como consecuencia de un fallo en la tolerancia central donde los linfocitos T CD4<sup>+</sup> autoreactivos no serían capaces de reconocer el péptido presentado por las células epiteliales medulares[63].

Igual que sucede en el ratón NOD, en pacientes que padecen la enfermedad ha sido descrita la existencia de células T CD4<sup>+</sup> insulino-autoreactivas [64] cuyo origen podría ser explicado también como un fallo de la expresión tímica de la insulina o directamente por defectos en el gen AIRE. Esta hipótesis se basa en el hecho de que el déficit de AIRE da lugar a la enfermedad conocida como APS (del inglés, síndrome poliglandular autoinmune).

La insulina no es la única molécula hacia la cual se ha observado autoreactividad. Es más, en lo que respecta a la T1D en el ratón NOD, la insulina no es la principal diana de muchas de las clonas de linfocitos T autoreactivos observados en el infiltrado pancreático [63].

## 2.6. Linfocitos T CD8<sup>+</sup> como efectores del ataque autoinmune

Aunque se ha observado la presencia de células T CD8<sup>+</sup> insulina-específicas, frente al epítipo B:15-23, en islotes de ratones NOD de 3 semanas de edad estas aparecen junto con otras clonas de células T CD8<sup>+</sup> [65]. Además, estas células T insulino-específicas van disminuyendo con la edad y van siendo substituidas por otras especificidades de células T CD8<sup>+</sup>, cuyo TCR está formado inicialmente por el CDR3-invariante V $\alpha$ 17<sup>+</sup>J $\alpha$ 42<sup>+</sup>, el cual reconoce la proteína IGRP [66].

A medida que progresa la enfermedad, las células CD8<sup>+</sup> que reconocen con una mayor avidez al autoantígeno van desplazando a las que no tienen tan buen reconocimiento progresando de esta forma más eficazmente el ataque autoinmunitario [67].

Las células beta pancreáticas no expresan moléculas coestimuladoras ni moléculas de MHC clase II, por ello, se cree que no pueden iniciar la respuesta autoinmunitaria. Probablemente se requiere algún tipo de alteración (sea inflamación, virus,..) capaz de hacer emerger los antígenos procedentes de las células beta los cuales serían captados y presentados por células APC.

Una vez se han reconocido los antígenos presentados por la célula presentadora, principalmente una célula dendrítica, las células T adquieren la habilidad de sobrevivir fuera de los tejidos linfáticos gracias a la presencia del autoantígeno que reconocen.

### 3. LINFOCITOS B Y T1D

Aunque los linfocitos T son los más importantes efectores del daño, es también necesaria la cooperación de otras células del sistema inmune para la iniciación y posterior desarrollo de la enfermedad. Este grupo de células que incluye las células dendríticas, los macrófagos, y los linfocitos B [68], comparten la función común de presentar antígenos a linfocitos T en el contexto del MHC y activarlos. Para activarlos, los antígenos (autoantígenos) deben ser presentados al menos con una señal de coestimulación adicional vía receptores de membrana (CD28/B7) y normalmente en presencia de citocinas activadoras (ej., IL-2, IL-4). El primer contacto entre las APCs y los linfocitos T tiene lugar en los ganglios linfáticos regionales, donde los autoantígenos y células APCs vigilantes procedentes del tejido (e.j., páncreas) son llevados a través del sistema linfático [69]. Normalmente, las APCs presentan antígenos propios (procedentes del catabolismo celular) o procedentes del propio medio tisular. Esta presentación se realiza en la ausencia de señales coestimuladoras adicionales, de manera que aquellos linfocitos T que supuestamente reconocen autoantígenos son anergizados. Por el contrario si la APC está activada, muy probablemente inducirá la activación de linfocitos T autoreactivos contra los propios autoantígenos tisulares. El por qué se produce esta activación frente a autoantígenos propios y se desarrollan las enfermedades autoinmunitarias, sigue siendo desconocido. Se sabe que los autoantígenos procedentes del metabolismo celular son presentados a través de MHC de clase I a linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Por el contrario, la presentación de antígenos exógenos se realiza en el contexto de las moléculas de MHC de clase II a linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Sin embargo se ha observado que en ocasiones, antígenos exógenos pueden también ser presentados por moléculas de clase I, por un proceso conocido como "presentación cruzada"[70],[71]. En ocasiones la presentación cruzada resulta en

tolerancia mientras que en otras se produce la activación de los linfocitos T [71],[72]. Entre otros factores que estarían implicados en esta decisión destacan la dosis de antígeno, el estado de activación de la APC, y la presencia de células T CD4+ helper en el medio. Se ha sugerido que este mecanismo de presentación cruzada podría ser un mecanismo general implicado en la iniciación de las enfermedades autoinmunitarias[70],[71].

Se creó que los linfocitos B tienen una acción clave en la iniciación y/o progresión de la T1D[68],[73],[74]. La depleción de esta población celular en ratones NOD wild-type o NOD.*IgM<sup>null</sup>* [75],[76] resulta en resistencia a desarrollar T1D y/o retraso en la edad de debut de la enfermedad. A pesar de que los mecanismos por los cuales los linfocitos B contribuyen al desarrollo de la diabetes no son conocidos, se ha propuesto que capturan autoantígenos de células beta mediante BCRs (inmunoglobulinas de membrana) autoreactivos, los procesan, y los presentan a linfocitos T CTLs, en ganglios regionales [77],[78]. Además, existen indicios de que los anticuerpos podrían también contribuir al desarrollo de la T1D. En primer lugar, tanto en humanos como en ratones NOD, el desarrollo de T1D está asociado casi siempre a la presencia de autoanticuerpos circulantes contra distintos autoantígenos de células beta [79],[80]. En segundo lugar, se ha observado que la transmisión placentaria de autoanticuerpos reactivos contra antígenos de células beta, contribuye a la progresión de la diabetes en los descendientes [81].

Al igual que los linfocitos T, los linfocitos B migran a los islotes pancreáticos durante el desarrollo de la enfermedad, tanto en pacientes diabéticos como en el ratón NOD, sugiriendo que llevan a cabo una función clave *in situ*. De hecho, diferentes estudios [82],[83] han indicado que estos linfocitos B tendrían la habilidad de activar los linfocitos T que infiltran los islotes, y por ello una función relevante en el desarrollo de la T1D.

En la actualidad, nuestro conocimiento sobre el repertorio antigénico de los linfocitos B autoreactivos durante la T1D, viene mayormente de estudios de la especificidad antigénica de los autoanticuerpos contra célula beta circulantes [79], y del análisis de la especificidad antigénica de hibridomas de linfocitos B periféricos (e.j., de sangre de pacientes diabéticos [84],[85] o de bazo de roedores[86],[87],[88]). En general, estos estudios han mostrado la existencia, tanto en individuos diabéticos como prediabéticos, de una importante respuesta de linfocitos B autoreactiva contra una amplia variedad de autoantígenos de células beta, entre los cuales destacan GAD, IA-2, insulina, carboxipeptidasa H, ICA69, periferina, y gangliósido GM2-1 (tabla 3) .

<b>Autoantígeno</b>	<b>Localización</b>
Insulina	Célula beta, timo
GAD 65	Célula beta, testículo, ovario y neuronas
IA2	Neuroendocrino: célula beta, alfa, y delta pancreática. Pituitaria y glándula adrenal
ICA 69	Neuroendocrina. Timo
Carboxipeptidasa H	Neuroendocrina
Gangliósido GM2-1	Islote pancreático
Imogen 38	Mitocondria
Glima 38	Neuronas. Islote pancreático
HSP 60 y HSP 70	Ubicua
ICA 12 (SOX13)	Ubicua
52 kDa	Islote
IGRP	Célula beta
Periferina	Células neuronales del Sistema Nervioso Periférico

**Tabla 3:** Algunos de los autoantígenos identificados en la T1D

#### 4. MODELOS EXPERIMENTALES Y TRANSGENESIS

Los modelos animales son herramientas indispensables para el estudio de los mecanismos fisiológicos y patológicos que se dan en el ser humano. Dos de los modelos más utilizados en el estudio de la autoinmunidad son el ratón NOD (Non-Obese diabetic) y la rata BB (BioBreeding). Ambos que no sólo muestran características fisiopatológicas comunes con las distintas enfermedades autoinmunes humanas, sino que en muchos casos comparten una predisposición genética en la que coinciden incluso los mismos genes de susceptibilidad a padecer la enfermedad. Ambos modelos experimentales fueron originados a principios de los años 80 mediante la selección a partir de líneas consanguíneas de individuos hiperglucémicos. A partir de entonces, estos dos modelos y en especial el ratón NOD han sido la base para el estudio de la etiopatogenia de la diabetes autoinmunitaria.

Dado que el estudio realizado se centra en el modelo NOD, en este apartado se describirá este modelo animal exclusivamente.

#### 4.1. El ratón NOD

La cepa murina NOD ha sido el modelo animal más ampliamente utilizado en el estudio de la T1D ya que desarrolla insulinitis y diabetes de forma espontánea, con una patología similar a la que se observa en humanos (presencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> autorreactivas, autoanticuerpos antislote, etc.). Como pasa en humanos, estos animales desarrollan otros síndromes autoinmunitarios dirigidos contra otros órganos (como glándulas salivales, tiroides, sistema nervioso y próstata), lo que refleja, al igual que en el caso de algunos pacientes con T1D, un fallo en la tolerancia/regulación del sistema inmunitario multiórgano.

En el modelo de ratón NOD el infiltrado leucocitario comienza a invadir los islotes pancreáticos a partir de las 3-5 semanas de edad, aunque los efectos clínicos de la enfermedad (hiperglucemia) se manifiestan entre las 12 y las 30 semanas. Pese a ser una cepa congénita (ratones genéticamente idénticos), no todos acaban presentando diabetes. Así, aproximadamente el 60-90% de las hembras y un 10-40% de los machos alcanzan este estadio.

Una de las ventajas de este modelo es que se conoce en qué momento se inicia la respuesta autoinmunitaria, y que se dispone de una amplia ventana de tiempo durante la cual la insulinitis se desarrolla de forma subclínica. Además, este modelo de diabetes autoinmunitaria espontánea ha servido y está sirviendo para estudiar diferentes aspectos de la enfermedad como son: identificación de los *loci* génicos que confieren resistencia/susceptibilidad a la diabetes, factores endógenos y ambientales que modulan la aparición de la enfermedad, análisis de los mecanismos inmunológicos implicados en la respuesta autoinmunitaria contra las células beta, autoantígenos contra los que se dirigen, etc.

El principal locus de susceptibilidad a la diabetes, el Idd1, se encuentra en los genes que codifican para las moléculas del MHC: la presencia de un aminoácido serina en la posición 57 de la cadena I-Ab en el ratón, así como en la cadena DQb en humanos, origina un alelo que confiere susceptibilidad a la diabetes, mientras que un aminoácido aspártico en esta posición confiere resistencia.

Se han descrito una veintena de Idds en ratón, aunque no se ha encontrado un análogo en humanos.

Además, el ratón NOD presenta varias características en su sistema inmunitario: se han descrito deficiencias en la capacidad coestimuladora de las células presentadoras de antígeno; también se ha observado una disminución en el número y función de las células NK T y células T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> con función reguladora, linfopenia en la periferia, así como defectos en la señalización mediada por TCR que repercuten en una disminución en la respuesta por parte de las células T. Este conjunto de factores, además de otros defectos descritos en el timo, son posiblemente los responsables de los fallos en la tolerancia central y periférica en estos animales.

Además, el ratón NOD presenta peculiaridades en el desarrollo de la T1D que no se observan en humanos: mayor incidencia de la diabetes en hembras, insulinitis de grado moderado e incluso severo en los islotes, baja diversidad de autoanticuerpos antislote detectables en suero en otros.

## 4.2. Transgénesis

Un transgén podría definirse como una secuencia génica que se utiliza para transformar un organismo, que de forma habitual, proviene de una especie distinta a la del organismo receptor.

Los animales transgénicos han sido extensamente utilizados para estudiar la función de genes *in vivo* y para producirlos una de las técnicas más comunes es la inyección del transgén en pronúcleos de oocitos fertilizados.

Esta técnica fue descrita por Gordon y colaboradores en 1980 [89]. Generalmente se basa en la construcción de un plásmido en donde el gen o cDNA de interés se sitúa bajo el control de un promotor cuya elección depende de dónde o cuándo se desee que el transgén se exprese.

La adición de un intrón en el extremo 5' o 3' genera un mRNA más estable y una translocación del gen del núcleo a citoplasma más eficiente que permite al transgén expresarse mejor. Con esta misma finalidad, se suele adicionar una cola poli-A en el extremo 3' y colocar un potenciador ( "enhancer") simulando los elementos que portan los genes de forma natural.

Como no hay un alelo correspondiente en el cromosoma homólogo se dice que el ratón es hemizigoto en vez de heterocigoto.

El DNA exógeno se integra de forma aleatoria y generalmente en forma de conquetámeros los cuales contienen múltiples copias del fragmento original. Además, el número de genes integrados es inversamente proporcional a la longitud del transgén. Por consiguiente, los transgenes más grandes tienen más dificultad de integración y muestran menos copias integradas.

Cuando se inyectan múltiples fragmentos de DNA simultáneamente, hay una tendencia a la integración conjunta en un punto único resultando en un hibridismo conquetamérico que contiene una representación proporcional de cada fragmento.

Debido a la naturaleza aleatoria de la integración, la posición que este ocupe en el genoma puede alterar su propia expresión así como la expresión de los genes endógenos. Por ello, en la práctica habitual de esta técnica se suelen analizar diversas líneas de ratón generadas a partir de diversos animales fundadores.

La identificación y análisis de los ratones transgénicos se efectúa generalmente a partir de una biopsia de un pequeño corte de tejido de la cola o de la oreja de los cuales se extrae el DNA. Posteriormente se analiza mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y/o bien por la técnica de *Southern* aunque esta última es más laboriosa. El transgén puede ser también ser visualizado al microscopio usando la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente o FISH.

Para determinar el número de copias integradas puede utilizarse la técnica de RT-PCR (del inglés, Real Time PCR").

Finalmente la caracterización del ratón debe incluir el análisis del producto proteico y su nivel de expresión, que debería correlacionarse con alguna característica distinguible a nivel fenotípico o molecular entre el ratón portador del transgén y un hermano de camada no transgénico [90].



## 6.1. Modelos de Inmunoglobulina (Ig) transgénica de linfocitos B

Durante el curso normal de generación del repertorio de linfocitos B, se producen células autoreactivas (Su-jean Seo. B Cell anergy and systemic lupus erythematosus). Una de las aproximaciones al estudio de la autoreactividad de estos linfocitos B, es mediante la generación de modelos de ratón transgénicos de linfocitos B. Estos modelos, son portadores del transgén pero su expresión sólo se da en los linfocitos B. Habitualmente, la expresión del transgén suele llevar a exclusión alélica de los genes endógenos que dan lugar a la inmunoglobulina y por tanto un elevado número de linfocitos B expresan el receptor transgénico en su superficie. Esto posibilita el estudio concreto de la especificidad del BCR así como las características del linfocito B que es portador.

Existen diversas posibilidades de generar modelos de linfocitos B con BCR transgénicos. Por un lado, se puede generar un BCR transgénico tanto para la cadena pesada del receptor como para la cadena ligera lo que implica que el ratón transgénico ha de llevar los transgenes que codifican para la cadena pesada y ligera. Pero también, existen modelos de ratón transgénicos que únicamente expresan en el BCR una de las cadenas y por lo tanto la otra cadena del BCR es producida de forma endógena.

Una de las situaciones habituales que se dan en estos ratones portadores por transgénesis en sus linfocitos B de receptores transgénicos autoreactivos es la anergia ya que dependiendo de las características del antígeno o como se presente, como por ejemplo unido a membrana como ocurre en el modelo de HEL [91] los linfocitos son delecionados a nivel central y por lo tanto no salen a periferia. No es de extrañar que aquellos linfocitos B que están en periferia, que han superado la deleción clonal pero que teóricamente son autoreactivos, muestren unas características peculiares peculiares en periferia y estas puedan variar dependiendo del fondo genético que tenga el ratón.

A continuación, se muestra una tabla con alguno de los modelos transgénicos más estudiados de anergia y algunas de las características fenotípicas que presentan.

Modelo de ratón	Especificidad antigénica	Estado de desarrollo	Tiempo de vida	Fenotipo en estado basal	Ref
MD4 x ML5	HEL	Bloqueado en estadio T3	Acortado	IgM <sup>low</sup> , CD86 <sup>low</sup> , alta movilidad de Ca <sup>2+</sup> , y alta actividad de ERK	[92],[93],[94],[95]
V <sub>H</sub> 3H9 X V <sub>κ</sub> 2	dsDNA	Bloqueo en estadio inmaduro	Acortado	IgM <sup>med</sup> , CD80 <sup>-</sup> , CD86 <sup>-</sup> , altos niveles de HSA, CD44 y MHC de clase II	[96],[97]
V <sub>H</sub> 3H9 x V <sub>κ</sub> 8	ssDNA	No	Normal	Normal	[96],[98]
V <sub>H</sub> 125 x V <sub>κ</sub> 125	Insulina	No	Normal	Normal	[99],[100]
V <sub>H</sub> 2-12	ssDNA, Sm*	Sí. En estadio pre-célula plasmática	Normal o acortado	Niveles elevados de CD80, CD40, ligero aumento de actividad ERK	[101],[102]
V <sub>H</sub> 2-12 x V <sub>κ</sub> 8	Sm	No	Normal	IgM <sup>med</sup> , aumento de MHC clase II y CD95	[103],[104]
Ars/A1	ssDNA	Bloqueado en estadio T3	Acortado ( <i>in vitro</i> )	IgM <sup>mid</sup> , elevados niveles de: CD80, CD95, MHC clase II. Alta movilidad de Ca <sup>2+</sup> y elevada actividad de ERK	[105],[106]
An	Mixed	Bloqueado en estadio T3	Acortado	Sin datos	[7]

**Tabla 4:** Principales modelos de anergia y sus características fenotípicas. \*Sm, Smith antigen. Adaptado (*John C. Cambier et al 2007*) [107]

## II MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. RATONES

#### 1.1. Estabulación y mantenimiento

Los ratones NOD (Non-Obese Diabetic) y NOR (Non-Obese Resistant) procedieron de *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine).

El ratón 116HL-NOD es un ratón NOD portador de un doble transgén. Uno de los transgenes codifica la región variable de la cadena pesada y el otro la región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina procedente de un linfocito B autoreactivo contra célula beta pancreática.

Los ratones C57BL/6J fueron obtenidos de los laboratorios Charles River, Francia. En el presente estudio han servido como modelo control de la enfermedad.

Los ratones NOD.RAG-2<sup>-/-</sup> y NOD.IgMnull<sup>-/-</sup> fueron proporcionados por el Dr. Pere Santamaría (Calgary, Canadá). El primero de ellos, es portador de una mutación en los genes *recombination activating genes-2* que impide la recombinación de las regiones variables del BCR y el TCR y con ello la generación de linfocitos B y T. El segundo, el NOD.IgMnull<sup>-/-</sup>, es portador en homocigosis de una mutación que afecta a la región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas que impide la maduración exclusiva de linfocitos B no afectando a la estirpe de células T.

El agua y la comida fueron suministradas *ad libitum*. Para el seguimiento de la Diabetes Mellitus tipo I se utilizaron tiras reactivas colorimétricas para la detección de glucosa en orina (Chroma2, CK105, Menarini Diagnostics). La positividad de las tiras (>250 mg/100 mL) en dos determinaciones positivas consecutivas fue considerada como diagnóstico de debut clínico de diabetes.

Los animales fueron mantenidos en condiciones SPF, Unidad Libre de Patógenos (*specific pathogen free*). Para ello, las salas de estabulación dispusieron de presión positiva y la ropa de trabajo fue autoclavada, al igual que todo aquel material introducido en las mismas. Para el material no autoclavable se usó un agente bactericida, fungicida y virucida (Virkon, 132035, Bayer). Asimismo, el agua de bebida fue también autoclavada y el alimento fue adquirido irradiado (Dieta global 2918 irradiada, Harlan). Los procedimientos siguieron las máximas condiciones de esterilidad.

El diseño experimental y el mantenimiento de los ratones, siguieron las directrices publicadas en el Decreto de Regulación de la Utilización de Animales para la Experimentación de la Generalitat de Catalunya, en el marco de las Directivas de Consejo Europeo.

## 2. TEJIDOS

### 2.1. Obtención de los tejidos. Congelación en isopentano

Los ratones fueron anestesiados por inhalación del agente Isoflorano (B506; Forane, Abbott). Una vez anestesiados se sacrificaron mediante dislocación cervical. A continuación, se realizó una incisión a lo largo de la línea media del animal (laparoscopia) para dejar al descubierto la cavidad abdominal. Con la ayuda de unas pinzas y unas tijeras pequeñas se extrajeron los órganos internos e inmediatamente se sumergieron en isopentano enfriado previamente en un baño que contenía acetona con hielo seco. Transcurridos 5 minutos fueron recogidos y trasladados en hielo seco hasta el congelador de -70°C donde fueron guardados hasta el momento de ser procesados.

### 2.2. Criosecciones de tejido

Para realizar las secciones de tejido (criosecciones) se utilizó el criostato Leica CM1900 de Leica Microsistemas, s.a. Este instrumento de precisión permite realizar cortes de tejido muy finos, de 5 micras de grosor con el tejido congelado, en nuestro caso ajustado a una temperatura a -20°C.

Los tejidos se sacaron del congelador de -70 °C, para que su temperatura se situará a -20 °C, antes de proceder a cortarlos. Para unir el tejido al portamuestras se utilizó CRYO-M-BED (Bright Instrument Company Limited) el cual se mantiene en estado de gel a temperatura ambiente pero solidifica a la temperatura de trabajo; propiedad que se utiliza para fijar el tejido al portamuestras.

Se utilizaron 2 tipos de portaobjetos según la técnica a utilizar posteriormente: Para las tinciones con Hematoxilina-Eosina se usaron portaobjetos esmerilados (LineLAB). Para las tinciones por Inmunofluorescencia se usaron portaobjetos Multispot Microscope Slides (pH-005, Hendley-Essex).

Una vez realizadas las crio-secciones, los tejidos se secaron mediante la acción de un ventilador durante 30 minutos (alternativamente se congelaron a -70 °C para su posterior procesamiento)

### 2.3. Tinción de Hematoxilina-Eosina

Para el desarrollo de la tinción, en primer lugar se sumergieron los portaobjetos con los tejidos en una cubeta que contenía hematoxilina (1092532500; Solución de Papanicolaou 1ª según Harris, Merck) durante 2 minutos aplicando agitación suave. A continuación se pasaron a otra cubeta que contenía agua destilada para lavar el exceso de hematoxilina. Después se sumergieron en otra cubeta que contenía una dilución de 0,62 g de eosina (1159350100; eosina amarillenta, Merck), en 100 ml de tampón compuesto de 18,32 ml de agua destilada, 81,05 ml de etanol y 0,62 ml de ácido

acético durante 30 segundos. Posteriormente, los portas se sometieron a una deshidratación progresiva: primero se sumergieron en una cubeta con etanol 70% durante 10 segundos; en segundo lugar, se sumergieron en una cubeta con etanol al 95% durante 10 segundos más, y por último, se sumergieron en etanol absoluto durante 2 minutos. Finalmente se sumergieron en una cubeta con xilol durante 1 minuto.

Una vez acabada la tinción se añadió medio de montaje DPX (360294H, BDH Prolabo) hasta cubrir todo el portaobjetos y encima se colocó un cubreobjetos.

## 2.4. Tinciones Inmunohistoquímicas

El microscopio utilizado para observar las tinciones por Inmnuhstoquímica tanto de tejido de páncreas como de tejido de bazo fue el AxioObserver.Z1, Zeiss y el software utilizado para analizar las imágenes fue el AxioVision Rel. 4.8

### 2.4.1. Tinciones sobre tejido pancreático

#### 2.4.1.1. Tinción con anticuerpo monoclonal AcMoH116

Para realizar esta tinción se utilizó tejido procedente del ratón inmunodeficiente NOD.RAG2<sup>-/-</sup>. Se utilizó el tejido de este ratón porque tiene los islotes sin infiltrar.

Antes de realizar esta tinción los portaobjetos fueron tratados con poli-lisina (Poly-L-Lysine hydrobromide, P1524-25MG, Sigma-Aldrich) de la siguiente manera:

- Disolver la poli-lisina a una concentración de 1mg/mL con agua destilada.
- Poner 50 µL de la la solución en cada pocillo del porta.
- Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
- Sumergir el porta en un recipiente con agua destilada momentáneamente.
- Secar al ventilador durante un mínimo de 30 minutos. Pasado este tiempo se pueden usar o se pueden guardar en el congelador de -70°C.

Para llevar a cabo la tinción, primero se hidrataron los tejidos con PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se decantó el PBS y se añadieron 50 µL de una dilución 1/200 del anticuerpo primario Mo116 purificado (concentración stock 13 mg/mL) y se incubó en cámara oscura humedecida o/n a 4°C. Transcurrida la incubación se decantó el anticuerpo y se añadieron 100 µL de PBS 1X y se dejó en oscuridad a temperatura ambiente 5 minutos. Se repitió este último paso pero dejando esta vez el PBS 1X durante 10 minutos. A continuación se añadieron 50 µL de una dilución 1/300 del anticuerpo secundario Goat anti-mouse IgG<sub>1</sub>A488 (A21121, Invitrogen) y se incubó durante 40 minutos. Después se hicieron dos lavados con PBS 1X de 5 y 10 minutos respectivamente (tal y como se había lavado el anticuerpo primario). Finalmente se añadió una gota

de Fluoroprep (75521, bioMérieux<sup>R</sup>), se puso un cubreobjetos encima y se selló con esmalte de uñas.

#### 2.4.1.2. Tinción de infiltrado de islote pancreático

Para llevar a cabo estas tinciones se utilizaron ratones 116HL-NOD línea C y ratones no transgénicos NOD (littermates) de 5 y 12 semanas. Los tejidos fueron obtenidos tal como se describe en el punto 2.1. y fueron cortados como se describe en el punto 2.2. Se utilizaron los marcadores: de linfocitos B, CD19; de linfocitos T, CD3. También se utilizó DAPI para teñir los núcleos.

El protocolo que se utilizó se describe más extensamente en el apartado anterior, por tanto aquí únicamente se destacan las características del marcaje específico utilizado:

- Anticuerpo primario: Rat anti CD19Pe\*(553786, BD) dilución 1/100, incubación en una cámara oscura humedecida o/n a 4°C.
- Anticuerpos secundarios: Hámster anti CD3FITC (HM3401, Invitrogen) dilución 1/50 y Goat anti-RatTRITC (112-025-102, Jackson Immunoresearch) dilución 1/200, incubación 1 hora a temperatura ambiente
- En esta caso se añadió medio de montaje específico para teñir núcleos con DAPI (P36935, INVITROGEN)

\*El fluorocromo con el que está conjugado este anticuerpo primario no fue tenido en cuenta

#### 2.4.2. Tinciones sobre bazo

##### 2.4.2.1. Tinción folicular con anticuerpo específico IgM<sup>a</sup> o IgM<sup>b</sup>

Para llevar a cabo estas tinciones se usaron tejidos de ratones 116C-NOD y tejidos no transgénicos *littermates* de 12 semanas de edad. Se utilizaron como marcadores: de linfocitos B general CD19, de linfocitos B transgénicos IgM<sup>a</sup> y de linfocitos B no transgénicos IgM<sup>b</sup>. También se tiñeron los núcleos con DAPI

El protocolo que se utilizó se describe más extensamente en el punto 2.4.1.1., por tanto aquí únicamente se destacan las características del marcaje específico utilizado:

- Anticuerpo primario: Rat anti CD19Pe dilución 1/100, incubación en una cámara oscura humedecida o/n a 4°C
- Anticuerpo secundario: Goat anti-RatTRITC dilución 1/200, incubación 1 hora a temperatura ambiente
- Anticuerpo terciario: Mouse anti-mouse IgM<sup>a</sup>-biotina (553515, BD) dilución 1/100 ó Mouse anti-mouse IgM<sup>b</sup>-biotina (553519, BD) dilución 1/100, incubación 1 hora a temperatura ambiente

- Cuaternario: SA-A488 (S-11223, Molecular Probes) dilución 1/200, incubación 30 minutos a temperatura ambiente
- En esta caso se añadió medio de montaje específico para teñir núcleos con DAPI (P36935, INVITROGEN)

#### 2.4.2.2. Tinción folicular de ratón quimera

Esta tinción se realizó sobre tejido de ratón quimera (transplantado con médula ósea procedente de ratón transgénico 116 y de ratón NOD) a los 30 días post- trasplante. El ratón fue transplantado a las 5 semanas de edad y sacrificado a las 9 semanas.

- Anticuerpo primario: Rat anti mouse CD45R/B220 (553088, BD) dilución 1/100, incubación en una cámara oscura humedecida o/n a 4°C
- Anticuerpo secundario: Goat anti-RatFITC (3010-02 Southern Biotech) dilución 1/200, incubación 1 hora a temperatura ambiente
- Anticuerpo terciario: Goat anti-moma-biotina dilución 1/50 y mouse anti-mouse IgM<sup>a</sup>Pe (46025, BD) dilución 1/50, incubación 1 hora a temperatura ambiente
- Cuaternario: SA-A350, dilución 1/300, incubación 30 minutos a temperatura ambiente

#### 2.5. Purificación de tejido exocrino. Aislamiento de islotes pancreático

Para obtener islotes purificados (aislados del tejido exocrino) se realizó la técnica que se describe a continuación.

En primer lugar, se diluyó la colagenasa (Colagenasa tipo 4, ref: S3E6346, Worthington) que viene liofilizada, en HBSS 1X (Hank's balanced salt solution: 14060, Gibco), al que hay que añadir 0,175 g de NaHCO<sub>3</sub>). La concentración de uso fue 235 U/mL (la equivalencia entre Unidades de enzima por miligramos en este caso era de 291 U/mg). Para preparar 50 mL de colagenasa se pesaron 40,38 mg de enzima. Una vez preparada la enzima hay que mantenerla a 4°C.

Una vez preparada la colagenasa se cargó en una jeringa de 2 mL y con una aguja de 30 G.

Posteriormente, se sacrificó al ratón y con la ayuda de material quirúrgico se separó la piel del abdomen y se abrió el peritoneo para dejar al descubierto las vísceras.

A continuación, con la ayuda de 3 pinzas tipo "kocher", se pinzó la ampolla de vater (situada en el duodeno), la vesícula biliar (situada en el hígado) y el lóbulo hepático donde se encuentra la ramificación del conducto colédoco. Una vez hecho los pinzamientos, se procedió a introducir la enzima a través del conducto colédoco. Si el procedimiento ha funcionado el páncreas se debería de hinchar con la entrada de la colagenasa.

Inmediatamente con la ayuda de unas tijeras curvas se separó el páncreas del resto de vísceras y se puso en un tubo de 50 mL (tipo Falcon) a 4°C ya que a esta temperatura la enzima no actúa.

Posteriormente, se puso en un baño a 37°C durante 30 minutos para proceder a la digestión del tejido exocrino. Transcurrido este tiempo, se añadieron 25 mL de HBSS a 4°C para neutralizar la

acción de la enzima y se procedió a realizar una digestión mecánica con la ayuda de una pipeta de 10 mL, subiendo y bajando el páncreas, ya digerido, de forma enérgica unas 10 veces. A continuación, se dejó sedimentar durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, con una pipeta se aspiró la parte no sedimentada ya que la parte sedimentada se pasó a una placa de petri. A partir de aquí, con la ayuda de una lupa binocular, se fueron adquiriendo los islotes y dejando en una placa nueva de petri que contenía HBSS 1X. Una vez cogidos todos los islotes y pasados a la placa nueva, se volvió a repetir el procedimiento de recogida desde la placa nueva pero esta vez fueron pasados a microtubo de 1,5 el cual contenía PBS 1X.

Cuando ya estuvieron todos los islotes en PBS se centrifugó el microtubo a 400 xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se volvieron a resuspender los islotes en 1 mL de PBS y se centrifugó de nuevo a 400 xg durante 5 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante mirando de no dejar líquido en el microtubo (sólo dejar los islotes) y se pusieron en hielo seco para que se congelaran de forma inmediata.

Transcurridos 5 minutos, se guardaron en el congelador de -70°C.

### 3. CÉLULAS

#### 3.1. Cultivo celular

En el presente estudio se ha utilizado la línea celular procedente de insulinooma murino, NIT-1 (ATCC:CRL-2263)

El medio de cultivo completo (MCC) utilizado de forma estándar en los cultivos celulares contenía los reactivos que se indican en la siguiente tabla (se han añadido los volúmenes utilizados para preparar 50 mL de MCC)

Medio/Reactivo, casa comercial	Conc. Stock	Conc. trabajo	Volumen para 50 mL
RPMI (E15-039, PAA)	-	-	43,45 mL
Suero Fetal Bovino (10270, Gibco)	-	10%	5 mL
Piruvato de Sodio, ref.:11360, Gibco	100 mM	1 mM	0,5 mL
Streptomycina (7568-01, lab Reig Jofré)	10 mg/mL	100 µg/mL	0,5 mL
Penicilina (602896.4, lab. Normon)	10000 U/mL	100 U/mL	0,5 mL
L-Glutamina (G8540-100G, Sigma)	200 mM	2 mM	0,5 mL
β-mercaptoetanol, ref.: M-6250, Sigma	50 mM	50µM	0,050 mL
<b>Volumen total</b>			<b>50 mL</b>

**Tabla 1:** Reactivos y concentraciones utilizados para preparar medio de cultivo completo (MCC). Se indican las concentraciones stock y de trabajo. En la columna de la derecha se indican los volúmenes utilizados de cada uno de ellos para preparar 50 mL



### 3.2. Citometría

Para realizar las tinciones por citometría de flujo se utilizó una suspensión celular procedente de medio bazo, la otra mitad se utilizó para realizar estudios histológicos. En primer lugar se disgregó el bazo haciendo presión con la zona esmerilada de dos portaobjetos. La suspensión celular resultante fue centrifugada a 400 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se decantó el sobrenadante y se realizó el lisado de los hematíes añadiendo 2 ml del siguiente tampón de lisis,

Reactivo	Volumen/Peso
Trizma <sup>R</sup> hydrochloride, ref.:T3253, Sigma	1,0297 g
Cloruro de amonio, ref.: 141121, Panreac	3,735 g
Agua destilada	500 mL

**Tabla 2:** Tampón de lisis. Reactivos para preparar 500 mL de solución

El tampón de lisis se dejó actuar durante 8 minutos. Transcurrido este tiempo se neutralizó la lisis añadiendo 15 ml de tampón de citometría (PBS 1X, con 1% FCS) y se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 3 ml de tampón de citometría. Posteriormente, se realizó un conteo celular en la cámara de Neubauer para coger un volumen de suspensión que contuviera trescientas mil células. A continuación se pasó a un tubo de citometría y se centrifugó a 400xg. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en un volumen final de 50 µL de tampón de citometría el cual contenía la mezcla de anticuerpos (ver dilución en la tabla) correspondiente para cada tipo de tinción.

Anticuerpos Primarios	Nºcat. y casa comercial	Dilución
Anti CD19-V450	560375, BD	1/100
Anti IgMa; IgMb-Biotina*	553515; 553519, BD	1/100
anti-IgDa; IgDb-FITC	553507; 553510, BD	1/100
Anti CD21-PE	552957, BD	1/100
Anti CD23-PE-Cy7	101614, Biolegend	1/100
Anti CD5-FITC	553021, BD	1/100
Anti CD43-PE	553271, BD	1/100
Anti CD1d-PerCP-Cy5.5	123514, Biolegend	1/100
Anti CD16/32-PE	553145, BD	1/100
Anti CD138-APC	558626, BD	1/100

**Tabla 3:** Casas comerciales de los anticuerpos utilizados y las diluciones de trabajo para cada uno de ellos. Se indica también el fluorocromo con el que están conjugados. BD, Becton Dickinson

La incubación de los anticuerpos primarios se realizó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se realizó un lavado con 1 mL de tampón de citometría y se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos. Después, se realizó un segundo lavado con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en 150  $\mu$ L de PBS y se adquirieron por el citómetro de flujo FacsCantoll de BD.

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa FacsDiva de BD.

\*Para los anticuerpos primarios IgM<sup>a</sup> e IgM<sup>b</sup> biotinilados se hizo un segundo marcaje. Para ello, después del primer marcaje, se lavaron las células con 1 mL de tampón de citometría y se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos. A continuación, se resuspendieron en 50  $\mu$ L de tampón de citometría, el cual contenía estreptavidina unida al fluorocromo APC (554067, BD) a una dilución 1/800 y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. A partir de aquí se prosiguió tal como se indica en el apartado anterior.

## 4. PROTEÓMICA

### 4.1. Extracción proteica a partir de cultivo de línea celular

Se realizó la extracción de proteínas de las células NIT-1 utilizando el Kit ProteoExtract Subcelular Proteome Extraction Kit (539790, Calbiochem) que permite separar el extracto proteico celular según el compartimento en el que se encuentre.

Antes de empezar con el fraccionamiento, se recogieron las células que se encontraban en cultivo de forma adherente (aproximadamente 10 millones de células totales) y se procedió a obtener el botón seco celular (*dry pellet*) tal como se describe a continuación:

- Se tripsinizó el cultivo celular (tripsina ref.: 25300, tripsyn EDTA, Gibco) y recogieron las células en un tubo de 50 mL. Centrifugar a 400 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante.
- A continuación se añadieron 50 ml de PBS 1X (para lavar las células) y se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos.
- Repetir los dos pasos anteriores una vez más.
- Después se resuspendió en 1 mL de PBS 1X y pasar la suspensión celular a un microtubo de 1,5 mL (eppendorf). Centrifugar a 400 xg durante 5 minutos.
- Por último, se descartó el sobrenadante por completo con la ayuda de una pipeta,

Una vez eliminado todo el PBS 1X se obtuvo el botón seco celular (*dry pellet*) que inmediatamente se sumergió en hielo seco durante al 5 minutos.

El botón seco celular fue resuspendido en 1 mL de Extraction Buffer I (solución hipotónica) al cual se le añadieron 10  $\mu$ L de Protease inhibitor Cocktail y fue incubado 10 minutos a 4°C en continuo movimiento rotatorio. Transcurrido este tiempo, fue centrifugado a 1000 xg durante 10 minutos a

4°C. Después de la centrifugación se recuperó el sobrenadante que contenía las proteínas de citosol celular (Fracción I). La muestra restante fue resuspendida en 1 mL de Extraction Buffer II (el cual contiene detergentes no iónicos), al que se añadieron también 10 µL de Cocktail inhibidor de Proteasas y se incubó 30 minutos a 4°C y en rotación continua. Después se centrifugó a 6000 xg y 4°C durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, que contenía las proteínas de membrana (Fracción II). La muestra restante se resuspendió en 0,5 mL de Extraction Buffer III, al cual se le añadieron 10 µL de Cocktail Inhibidor de Proteasas y 1,5 µL de Benzoasa, con acción DNAsa. Después se incubó esta reacción enzimática durante 10 minutos a 4°C en agitación y se centrifugó la muestra a 6800 xg a 4°C durante 10 minutos. Tras la centrifugación, se recuperó el sobrenadante que contenía las proteínas nucleares (Fracción III). La muestra restante, fue resuspendida en 300 µL de Extraction Buffer IV, el cual contiene detergentes iónicos desnaturalizantes, como SDS para solubilizar proteínas pertenecientes al citoesqueleto (Fracción IV).

#### 4.2. Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de proteínas presente en cada extracto proteico se utilizó el método BCA (Bicinchoninic acid, Pierce, 23227). El rango de detección es de 20 a 200 mg/mL. Se siguió el protocolo que recomienda el fabricante para cuantificar proteína en placa de 96 pocillos.

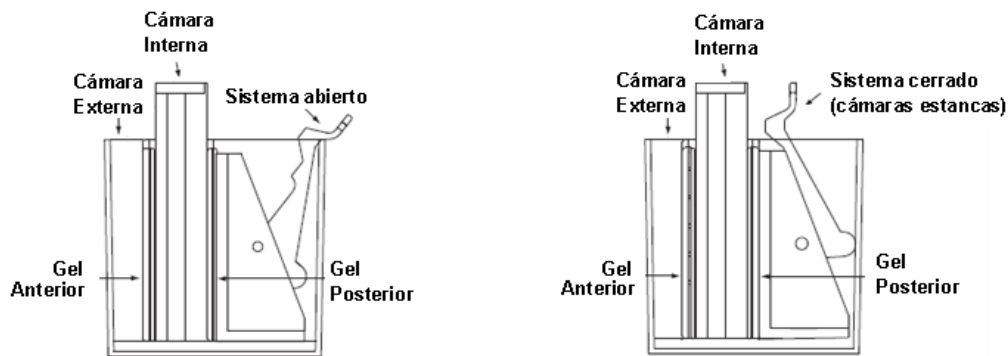
Se diseñó una curva estándar utilizando la concentración conocida de 2 mg/mL de BSA sobre la cual se hicieron diluciones de: 1,5, 1, 0,5, 0,25 y 0,125 mg/mL.

En cada pocillo se aplicaron 25 µL de cada una de las diluciones de la curva estándar o 25 µL de las muestras problema y se añadieron 200 µL del revelado BCA. A continuación, se incubó la placa durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se realizó la lectura a una longitud de onda de 540 nm con el lector Stat Fax-2100 de Awareness Technology Inc

#### 4.3. Electroforesis en geles de una dimensión (1-D)

Para realizar la electroforesis de proteínas, se utilizaron geles de poliacrilamida comerciales del tipo Nupage Novex 4-12% Bis-Tris Gel de 12 pocillos (NP0321, Invitrogen). Estos geles estaban compuestos por un gradiente creciente del 4 al 12% de poliacrilamida que permiten separar un amplio rango de proteínas.

Los geles fueron montados en la cubeta de electroforesis X Cell Surelock Mini-cell (EI0001, Invitrogen) la cual disponía de 2 compartimentos: uno de ellos, la cámara externa fue rellena con 250 mL de tampón MOPS-SDS 1X (NuPage Running Buffer 20X, NP0001, Invitrogen). El segundo compartimento, el que se encontraba en contacto con el gel y las muestras, cámara interna, fue rellena con 200 mL de tampón MOPS 1X al que se añadieron 0,5 ml de agente antioxidante Nupage Antioxidant (NP0005, Invitrogen).



**Figura 1:** Esquema de la cubeta utilizada para la electroforesis de una dimensión: A la izquierda se muestra el sistema abierto. A la derecha se muestra el sistema cerrado, una vez que se han colocado los geles. En esta disposición (cerrada) se pueden cargar los tampones que van en la cámara interna y externa ya que no se comunican.

En cada pocillo se aplicaron 18  $\mu\text{L}$  de muestra. Este volumen contenía la proteína diluída en agua destilada, 1,8  $\mu\text{L}$  de agente reductor (Nupage Sample Reducing Agent 10X; NP0004, Invitrogen) y 3,6  $\mu\text{L}$  de tampón de carga (Nupage SDS Sample Buffer 5X; NP0007, Invitrogen).

Una vez aplicados estos reactivos a la muestra, ésta fue calentada a 95°C durante 3 minutos para favorecer su desnaturalización antes de ser cargada en el gel.

Como marcador de peso molecular se utilizaron 8  $\mu\text{L}$  de *SeeBlue Plus II pre-Stained Standard* (LC5925, Invitrogen).

Finalmente, la cubeta fue conectada a la fuente de voltaje (Standard Power Pack P25, 040-800, Biometra) que fue ajustada a un voltaje constante de 180 V durante un periodo de tiempo de 50 minutos.

#### 4.4. Electroforesis en geles de 2 dimensiones (2-D)

##### 4.4.1. Preparación de las muestras proteicas

Para separar correctamente las proteínas en geles bidimensionales, es necesario que la muestra proteica se encuentre libre de iones, DNA y otros solutos no proteicos que puedan interferir en la migración de las proteínas según punto isoeléctrico. Para conseguirlo, se realizó el siguiente método de precipitación de proteínas.

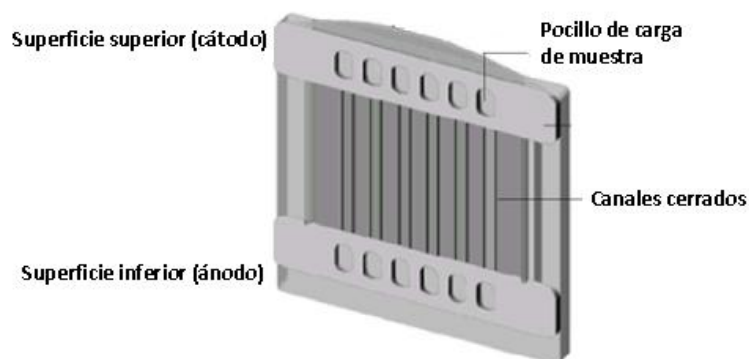
En primer lugar se añadió a la muestra proteica agua destilada hasta obtener un volumen final de 400  $\mu\text{L}$ . Después se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de metanol absoluto y 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo y se agitó bien. Inmediatamente, se centrifugó a 1000  $\times g$  durante 5 minutos. A continuación, se extrajo el agua destilada y el metanol situado en la parte superior. Posteriormente, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de metanol absoluto (para precipitar las proteínas situadas en la interfase), y se agitó bien. Inmediatamente se centrifugó a 16000  $\times g$  durante 10 minutos a 4°C. A continuación, se extrajo con una pipeta el sobrenadante.

Una vez precipitada la muestra, se resuspendió en 173,5  $\mu\text{L}$  de tampón de rehidratación Protein Solubilizer 1 (ZS 10001, Invitrogen), compuesto por urea, tiourea y CHAPS (son tampones que contribuyen a la solubilización de la proteína). A estos 173,5  $\mu\text{L}$  se añadieron 0,9  $\mu\text{L}$  de Ampholytes de pH 4 a 7 (ZM0021, Zoom carrier ampholytes, Invitrogen), necesarios para dar movilidad a las proteínas; 0,9  $\mu\text{L}$  de Dithiothreitol 2 Molar (15508-013, Invitrogen), que es un agente reductor y trazas de azul de bromofenol (18030, Fluka chimika), que actúa como marcador de paso de corriente a través de la muestra.

#### 4.4.2. Primera dimensión: electroforesis por punto isoeléctrico (isoelectroenfoco)

Para separar las proteínas según su punto isoeléctrico, se usaron tiras IPG (Immobilized pH Gradient, ZM0012, Invitrogen) de 7 cm de longitud y pH de 4-7.

Se aplicaron 140  $\mu\text{L}$  de muestra proteica (resuspendida tal como se describe en el apartado anterior) sobre unos de los canales del cassette (ZM0003, Zoom IPG Runner cassette, Invitrogen) previsto para dicho efecto. Seguidamente se introdujo la tira IPG de pH 4-7 por ese mismo canal y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para que estas últimas se hidrataran e incorporaran las proteínas y los diferentes componentes del tampón.



**Figura 2:** Detalle del casete utilizado para la electroforesis bidimensional. Se muestra el lugar de aplicación de la muestra que además es también donde se inserta la tira IPG

Transcurrida una hora, se pegaron en la parte superior e inferior del casete los electrodos (un recorte de fibra de celulosa de 2x6 cm, suministrado con los casetes, sobre los que se aplicaron 600  $\mu\text{L}$  de agua desionizada que ayudan a transmitir la corriente). Después se introdujo el cassette en la cubeta de tipo IPG para enfoque isoeléctrico (ZM0001, Zoom IPGRunner, invitrogen) y se conectó a la fuente de alimentación PowerPac<sup>™</sup> HV (164-5056, Bio-Rad).

Esta se programó la fuente en tres etapas con los siguientes parámetros:

### **1era etapa. Tiempo de duración 20 minutos**

Voltaje constante: 175 V

Límite de Watios: 0,2 W

Límite de Amperios: 0,1 mA

### **2ª etapa. Tiempo de duración 1 hora y 30 minutos**

Voltaje: Siguió una rampa de voltaje de 175-2000 V

Límite de Watios: 0,2 W

Límite de Amperios: 0,1 mA

### **3era. Etapa. Tiempo de duración 20 minutos**

Voltaje: 2000 V constante.

Límite de Watios: 0,2 W

Límite de Amperios: 0,1 mA

Una vez realizada la primera dimensión, se procedió a realizar la segunda dimensión. Alternativamente los casetes se congelaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.4.3. Segunda dimensión: electroforesis por peso molecular**

Las tiras fueron extraídas del casete y pusieron en carriles individuales adecuados ya que necesitan de un tratamiento previo de equilibrado y alcalinizado. En primer lugar, se prepararon 10 ml del tampón LDS 1X (NP0008, LDS Sample Buffer 4X, Invitrogen) diluyendo 2,5 ml de este tampón en 7,5 ml de agua destilada.

El tampón de equilibrado se obtuvo añadiendo 0,5 ml de Reducing Agent 10X a 4,5 ml de LDS 1X preparado previamente y el tampón de alcalinizado se obtuvo también añadiendo 116 mg de iodoacetamida (I1149-5G, Invitrogen) a 5 ml al tampón LDS 1X.

Una vez preparados estos tampones, se incubaron las tiras durante 15 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente con el tampón de equilibrado y, posteriormente, se incubaron en el tampón de alcalinizado durante otros 15 minutos en agitación suave a temperatura ambiente.

A continuación, las tiras fueron colocadas de forma horizontal en el gel IPG Nupage 4-12% Bis-Tris Zoom Gel (NP0330BOX, Invitrogen), teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire entre la tira y el gel. Una vez colocadas, se aplicaron 400  $\mu\text{L}$  de un gel de agarosa que contenía 0,05% de agarosa y 0,25% de antioxidante (Nupage Antioxidant) diluidos en tampón MOPS SDS (MOPS SDS Running Buffer 1X, ver geles de una dimensión)

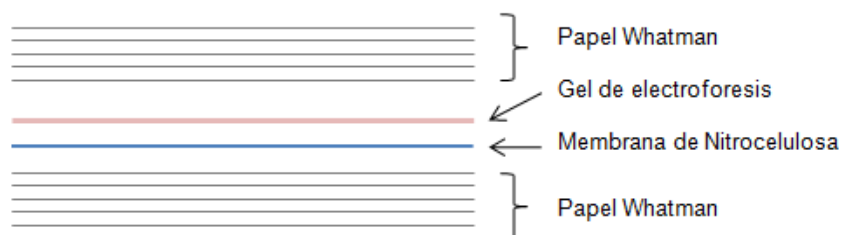
#### 4.5. Transferencia de proteína a membrana de nitrocelulosa

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas contenidas en los geles de poliacrilamida fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, RPN 3030, Amersham), recortada con unas dimensiones de 7x8 cm.

Antes de proceder a la transferencia, se pre-humedeció la membrana en agua destilada momentáneamente y posteriormente se equilibró durante 10 minutos con 30 ml de tampón de transferencia compuesto de 5% de tampón de transferencia (NP0006, "Transfer Buffer" 20X, Invitrogen), 10% metanol y 0,1% de Nupage Antioxidant (NP0005, Invitrogen).

A un lado de la membrana se colocaron apiladas 5 hojas de papel watmann (Blot Papers GB002, 10426693, Schleider-Schuell) humedecidas en tampón de transferencia y recortadas con un tamaño igual al de la membrana (7 x 8 cm). Al otro lado de la membrana se puso el gel y en contacto con éste se pusieron 5 hojas más de papel watmann humedecidas también en el buffer de transferencia. Este "sándwich" se colocó entre los electrodos del FastBlot B31 (014-800, Whatman Biometra,) de forma que el electrodo negativo quedó debajo de la membrana y el positivo por encima del gel.

Posteriormente, se procedió a conectar el sistema de refrigeración del FastBlot que consiste en hacer pasar agua corriente fría de forma constante para evitar el sobrecalentamiento del sistema. Una vez montado, se conectó el FastBlot a la fuente de alimentación y se programó a 280 mA durante 30 minutos. Al generarse el campo eléctrico se induce a las proteínas a viajar hacia el ánodo, situado en la parte inferior del FastBlot, dejando retenidas las proteínas en la membrana de nitrocelulosa.



**Figura 3:** Disposición de los diferentes elementos para hacer la transferencia a la membrana de nitrocelulosa. El gel de acrilamida queda por encima de la membrana de nitrocelulosa y ambos quedan flanqueados por cinco hojas de papel whatman.

##### 4.5.1. Tinción Rojo Ponceau

La tinción de Ponceau se utiliza para detectar la presencia de proteína en la membrana de nitrocelulosa aunque de baja sensibilidad (del orden de microgramos de proteína).

Para llevar a cabo esta tinción se diluyeron 0,1% de Rojo Ponceau (P3504-10G, Ponceau S, Sigma) en agua destilada a la que se añadió un 5% de ácido acético. La membrana fue incubada en esta solución durante 5 minutos, tras los cuales se aplicaron sucesivos lavados con agua destilada para ir decolorando el exceso de tinción de la membrana y de esta manera visualizar las proteínas.

#### 4.5.2. Western-blot

La detección inmunoquímica se realizó sobre la membrana de nitrocelulosa que contenía las proteínas trotransferidas.

El primer paso fue proceder al bloqueo de la membrana con 50 mL de PBS al que se añadió un 2,5% de leche en polvo desnatada (Sveltesse, Nestlé) y 0,1% de Tween 20 (P-7949, Sigma). El bloqueo se mantuvo durante toda la noche a 4°C y en agitación constante.

Al día siguiente se continuó la técnica, realizando dos lavados de 5 minutos con 0,1% de Tween 20 diluido en PBS. Después, la membrana fue recortada individualizando en los diferentes carriles donde estaban situadas las proteínas.

Como anticuerpos primarios se utilizaron: el anticuerpo H116 purificado; a una dilución 36 ug/ml o bien suero de ratón 116HL-NOD a una dilución 1/10. Ambos anticuerpos se diluyeron en PBS con 0,1% de Tween 20 y 1% de leche en polvo desnatada.

A continuación, se lavó 4 veces en una solución de PBS al 0,1% de Tween 20 durante 5 minutos cada lavado.

Posteriormente se procedió a la incubación con el secundario. Por un lado, se utilizó una dilución 1/1000 del anticuerpo Goat anti-mouse IgM biotinilado (1022-08, de BD) para detectar IgM en suero de ratón; y por otro lado, se utilizó una dilución 1/10000 de anticuerpo mouse anti-IgG<sub>1</sub> biotinilado (553441, Beckton Dickinson), para detectar IgG<sub>1</sub> secretadas por el hibridoma. Ambos anticuerpos fueron diluidos en una solución de PBS con 1% de leche desnatada y 0,1% de Tween 20 y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave.

A continuación, se hicieron 4 lavados de 5 minutos con una solución de PBS 1X con 0,1% de Tween 20. Posteriormente, se añadió 1ml de streptavidina unida al fluorocromo IRDye800 (S000-32, Rockland) a una dilución 1/60000 en PBS que contenía 0,1% de Tween 20 y 1% de leche en polvo desnatada. La incubación de la streptavidina unida al fluorocromo fue de 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara oscura para no degradar la fluorescencia del fluorocromo con la luz.

Posteriormente, se hicieron 4 lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS al 0,1% de Tween 20. Por último se lavó la membrana 2 veces más, esta vez sólo con PBS, y por un tiempo de 5 minutos por cada lavado.

La lectura de la membrana se realizó con el equipo Odyssey Imagen System (LI-COR Bioscience).

#### 4.6. Tinción con Coomassie



Las tinciones con Coomassie se realizaron con el reactivo comercial Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain (ref.: 161-0786, Bio-Rad). El protocolo utilizado fue el que se indicó por el fabricante y es el que se detalla a continuación:

- Lavar el gel con 50 mL de agua destilada durante 5 minutos, en agitación. Repetir este paso 3 veces.
- Vaciar el agua y añadir 50 mL de Bio-Safe™ Coomassie. Incubar durante 1 hora a temperatura en agitación suave.
- Lavar el gel con 50 mL de agua destilada durante 30 minutos, en agitación.
- **Nota:** Para fijar las proteínas, comenzar el protocolo cambiando el punto 1 por este:
  - Fijar el gel con 50 mL de una solución que contenga 40% de metanol y 10% de ácido acético. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente

#### 4.7. Tinción de plata

La tinción de plata es una técnica muy sensible, capaz de detectar cantidades muy pequeñas de proteína (incluso décimas de nanogramos). Además esta técnica es compatible con el análisis de proteínas por espectrometría de masas. Para llevar a cabo esta técnica se utilizó el Kit comercial (SilverQuest Staining Kit, LC6070, Invitrogen).

En primer lugar, el gel se extrajo del soporte plástico y fue lavado con 50 ml de agua destilada. A continuación, se fijaron las proteínas contenidas en el gel mediante 50 ml de un tampón que contenía un 40% etanol y un 10% de ácido acético; y se incubó durante 20 minutos en esta solución. Después se hizo un lavado con 50 ml de un tampón que contenía un 30% de etanol durante 10 minutos. Tras este lavado, se añadieron 50 ml de tampón de sensibilización, compuesto de 30% etanol y 10% "Sensitizer"; y se incubó durante 10 minutos. Posteriormente, el gel se lavó con 50 ml de un tampón que contenía un 30% etanol durante 10 minutos más. Después se lavó con 50 ml de agua destilada durante otros 10 minutos. A continuación, se tiñó el gel con 50 ml de tampón de teñido (Stainer 1% en agua destilada) durante 15 minutos. Tras este lavado, se incubó con un 1% de tampón de teñido (Stainer) durante 15 minutos. Posteriormente, el gel se lavó con 50 ml de agua destilada durante 30 segundos (ya que un tiempo superior a 1 minuto extraería los iones del gel reduciendo la sensibilidad de la técnica). Después, se aplicaron 50 ml de tampón de revelado compuesto por 10% de "Developer" y 1 gota de potenciador "enhancer" entre 3 y 5 minutos dependiendo del contraste deseado. Por último, el tampón de revelado fue neutralizado con 5 ml de la solución de parada durante 10 minutos, tras los cuales se retiró y se puso agua destilada durante 10 minutos más.

#### 4.8. Espectrometría de masas

El procesado de las muestras extraídas de los geles de 1D (en este caso bandas) o 2D (en este caso *spots*) consistió en una digestión durante toda la noche con 100-150 ng de Tripsina (Promega, Madison, WI) a 37°C utilizando un montaje de In-Gel Digest\_ZP (Millipore, Bedford, MA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los péptidos resultantes se secaron y se solubilizaron en agua 0.1% TFA. Medio microlitro de ellos se mezcló con un volumen igual de ácido  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic (3 mg/ml) y posteriormente fue analizado en un espectrómetro de masas MALDI-ToF Voyager DE Pro (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se analizó el espectro de 100 disparos láser mediante el MSFit software of Protein Prospector version v 3.2.1 y posteriormente se realizó la búsqueda en la base de datos Swissprot para la identificación de la proteína. Los péptidos con plata fue analizado mediante espectrometría de masas.

#### 4.9. Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación se realizó con el reactivo: Protein G-Sepharose 4 Fast Flow (ref.: 17-0618-01) utilizando muestra procedente de botón seco ("dry pellet") de 10 millones de células Nit-1 o a partir de botón seco de islote purificado procedente de entre 7-10 ratones NOD.RAG-/- (de entre 5 y 25 semanas de edad incluídos machos y hembras).

El protocolo utilizado fue el siguiente:

En primer lugar, se preparó el tampón de lisis tal como se indica en la siguiente tabla y se mantuvo a 4°C:

Reactivo	Conc. trabajo
Trizma <sup>R</sup> hydrochloride, ref.:T3253, Sigma	20 mM
Cloruro de sodio, ref.:1.06404.1000, Merck	150 mM
Nonidet, ref.:28324, Pierce	0,5%
Cocktail Inhibidor de proteasas (100X), ref.:78415, Thermo Scientific	1X

**Tabla 4:** Tampón de lisis utilizado para realizar la inmunoprecipitación.

En segundo lugar, se preparó la Proteína G-Sepharose ya que venía con un 20% de etanol como agente preservante. Para ello se pusieron 300  $\mu$ L de Proteína G-Sepharose en un tubo (tipo eppendorf) de 1,5 mL y se añadieron 300  $\mu$ L del tampón de lisis a 4°C preparado como se indica en la tabla anterior. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 20 segundos y se descartó el sobrenadante. Se añadieron de nuevo, 300  $\mu$ L de tampón de lisis a 4°C y se volvió a centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 20 segundos. Se repitió este paso una vez más. Por último, se descartó el sobrenadante y se añadió un volumen igual de tampón de lisis a 4°C, al botón de proteína G-Sepharose obtenido, para que quedara una mezcla al 50% y se mantuvo a 4°C.

El protocolo se siguió tal como se indica a continuación:

- Se lisaron los islotes con 600  $\mu$ L del tampón de lisis y se Incubó a 4°C durante 30'.
- A continuación se centrifugó la muestra a 4°C a máxima velocidad durante 5'.
- Después se pasó el sobrenadante a otro tubo de 1,5 mL y añadir 40  $\mu$ L de agarosa-proteína-G y se incubó durante 1 hora a 4°C en agitación suave. (Este paso sirve para que las bolitas de agarosa se unan a proteínas de forma inespecífica (pre-clean).
- A continuación se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 5'. Se Recogió el sobrenadante y se puso en otro tubo de 1,5 mL. Se añadieron 5  $\mu$ L de anticuerpo 116 purificado (concentración 19 mg/mL) y se Incubó o/n a 4°C en agitación suave.
- Al siguiente día, se añadieron 40  $\mu$ L de agarosa-proteína-G y se incubó 7 horas a 4°C en agitación suave.
- Posteriormente, se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 5', se descartó el sobrenadante, y se lavó el pellet con los siguientes tampones:
- Primer lavado: 1 mL de tampón que contenía: 20mM de Tris, 150mM NaCl, y Nonidet 0.5%. Centrifugar a 2500 rpm a 4°C durante 5'.
- Segundo lavado: 1 mL de Tampón que contenía: 20mM de Tris y 150mM NaCl,. Centrifugar a 2500 rpm a 4°C durante 5'.
- Tercer lavado: 1 mL de Tampón que contenía: 20mM de Tris. Centrifugar a 2500 rpm a 4°C durante 5'.
- Después, se resuspendió el pellet con 25  $\mu$ L de Tampón Citrato Sódico (70mM citrato sódico pH 5.5) y se procedió a incubar de 16 a 18 horas o/n a 37°C.
- Al siguiente día, se recuperó el sobrenadante y se añadieron 4  $\mu$ L del tampón reductor (sample reducig buffer 10X, Invitrogen) y 8  $\mu$ L de tampón de carga (sample ladder non-reducing, Pierce (5X).
- Finalmente la muestra se hirvió a 95°C durante 3 minutos.

Utilizando este protocolo la muestra quedó lista para cargar en un gel de 1D.

Para ser utilizada en geles 2-D, una vez se recuperado el sobrenadante, tras la incubación de 16-18 horas o/n a 37°C, se procedió a resuspenderla en el tampón de rehidratación para geles de 2-D, Protein solubilizer 2 (tal como se indica en el apartado 4.4.1, aunque en este caso usamos el Protein solubilizer 2 en vez del 1)

## 5. GENERACION PROTEINA RECOMBINANTE VALOSIN CONTAININ PROTEIN

### 5.1. Extracción RNA

Para la extracción de RNAm se utilizó el Kit RNAeasy Microkit (74004, Qiagen). Se extrajo el RNA de 6 millones de células Nit-1.

Primero se obtuvo el botón seco celular (dry pellet) tal como se describe en el apartado 4.1.

Antes de empezar con el protocolo, se prepararon los siguientes reactivos para tenerlos a punto en el momento de la extracción: se añadieron 44 mL de etanol 100% al tampón RPE del kit, se reconstituyó la DNAsa (proporcionada en el kit) con 550  $\mu$ L de agua libre de RNAsa y se añadieron 10  $\mu$ L de betamercaptoetanol 14,3 Molar por cada mililitro del tampón RLT del kit.

Por otro lado, se disolvieron 310  $\mu$ g de carrier en 1 mL de agua destilada y a partir de esta solución se obtuvo una solución de concentración 4 ng/ $\mu$ L utilizando el tampón RLT.

Una vez preparados estos reactivos, se resuspendió el botón celular en 350  $\mu$ L de tampón RLT al que se añadieron 3,5  $\mu$ L de betamercaptoetanol y 5  $\mu$ L de carrier (de las soluciones preparadas previamente). Esta mezcla se resuspendió vigorosamente haciendo pasar el contenido varias veces a través de una aguja de 20G conectada a una jeringa de 2 mL.

A continuación, se añadieron 350  $\mu$ L de etanol al 70% y todo el contenido se transfirió a una columna (MinElute Spin Column, suministrada con el Kit) y se hizo una centrifugación a 8000 xg durante 15 segundos, tras la cual se descartó el líquido que quedó en el tubo de recogida. Después, se añadieron 350  $\mu$ L del tampón RW1 a la columna y se volvió a centrifugar a 8000 xg durante 15 segundos; tras la cual se volvió a descartar el líquido contenido en el tubo de recogida. A continuación, se añadieron 80  $\mu$ L de un tampón que contenía 70  $\mu$ L del tampón RDD del kit y 10  $\mu$ L DNAsa I (reconstituida previamente) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 350  $\mu$ L del tampón RW1 del kit, a la columna y se centrifugó a 8000 xg durante 15 segundos. Inmediatamente, se cambió la columna a otro tubo de recogida de 2 mL nuevo y se añadieron 500  $\mu$ L de tampón RPE. A continuación, se centrifugó a 8000 xg durante 15 segundos y después; se añadieron 500  $\mu$ L de etanol al 80% y se centrifugó a 8000 xg durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo, se pasó la columna a un tubo nuevo de recogida de 2 mL y se centrifugó a 16100 xg durante 2 minutos con el tapón abierto. Posteriormente, se pasó la columna a microtubo de 1,5 mL ("eppendorf") y se añadieron al centro de la misma 14  $\mu$ L de agua destilada. Finalmente, se volvió a centrifugar a 16100 xg durante 1 minuto para eluir el RNA.

## 5.2. Generación de cDNA

A partir del RNA, extraído del apartado anterior, se procedió a retrotranscribir el RNA a cDNA. Para ello, se utilizó el Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (4374966, Applied Biosystems). La retrotranscripción se preparó según la siguiente reacción:

Reactivo	Volumen
Tampón de retrotranscripción 10X	2 $\mu$ L
dNTPs Mix 25X (100nM)	0,8 $\mu$ L
Primers aleatorios 10X	2 $\mu$ L
Enzima Retrotranscriptasa MultiScribe Reverse	1 $\mu$ L
Inhibidor de RNAsa	1 $\mu$ L
Agua destilada (libre de nucleasas)	3,2 $\mu$ L
Volumen Total de la reacción	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

**Tabla 5:** Reactivos para llevar a cabo la retrotranscripción. Se indican los volúmenes para una reacción de 10  $\mu$ L.

Este volumen de reacción fue añadido a 10  $\mu$ L de la muestra que contenía el RNA a una concentración de 1,9  $\mu$ g/ $\mu$ L y a continuación se programó el termociclador con los siguientes parámetros:

	Temperatura	Tiempo
<b>Primer paso</b>	25°C	10 minutos
<b>Segundo paso</b>	37°C	120 minutos
<b>Tercer paso</b>	85°C	5 minutos
<b>Cuarto paso</b>	4°C	10 minutos

**Tabla 6:** Programación del termociclador para llevar a cabo la retrotranscripción

### 5.3. Amplificación secuencia de DNA: generación del amplímero/inserto

Para generar el amplímero correspondiente a la proteína Valosin Containing protein se diseñaron los siguientes oligonucleótidos (*primers*). Fueron diseñados incorporando en los extremos las dianas para las enzimas de digestión BamHI (ref.: ER0051, Fermentas) y Not-I (ref.:ER0592, Fermentas) para posteriormente poder digerir el amplímero con estas mismas enzimas (ver apartado 5.5.)

Primer forward: VCP-L-FOR, 5'-TGGGTCGGATCCGAATGGCCTCTGGAGCCGATTC-3'

Primer Revers: VCP-C-REV, 5'-AAGCTTGCGGCCGCGCCATACAGGTCATCGTCATTG-3'

Para la reacción de amplificación (PCR) se utilizó la enzima Taq Polimerasa Phusion Hot-Start High Fidelity DNA polymerase (F-540L, Finnzymes) y se llevó a cabo la siguiente reacción de amplificación:

Reactivo	Volumen
Tampón de la enzima 5X (incluye magnesio)	5 µL
dNTPs Mix 25X (100nM)	2,5 µL
Primer Ter-A For	2,5 µL
Primer Ter-A Rev	2,5 µL
cDNA	1 µL
DMSO	0,5 µL
Agua destilada	10,5 µL
Taq polimerasa Phusion Hot Start	0,5 µL
Volumen Total de la reacción	<b>25 µL</b>

**Tabla 7:** Componentes para la reacción de PCR para un volumen final de 25 µL

Una vez preparada esta reacción, se programó el termociclador de la siguiente forma:

	Temperatura	Tiempo	
<b>Desnaturalización inicial</b>	98°C	3 minutos	
<b>Desnaturalización</b>	98°C	30 segundos	X 40 ciclos
<b>Hibridación</b>	60°C	30 segundos	
<b>Elongación</b>	72°C	2,30 minutos	
<b>Extensión final</b>	72°C	7 minutos	
<b>Enfriado</b>	4°C	10 minutos	

**Tabla 8:** Programación del termociclador para que tenga lugar la amplificación de DNA flanqueada por los "primers"

#### 5.4. Purificación DNA procedente de gel de agarosa

Para clonar el amplímero en el vector fue necesario hacer un paso previo de purificación del DNA para eliminar restos de enzima, sales,...que podían interferir en la clonación. Para ello, se utilizó el Kit GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit (27-9602-01, Amersham Bioscience).

En primer lugar se preparó un gel al 1% de agarosa (Agarosa estándar media EEO-AG-0220, Ecogen). Cuando estuvo solidificada la matriz de agarosa se cargaron 3 µL del producto de la PCR anterior en un pocillo y en el pocillo contiguo los 22 µL restantes. Una vez realizada la carrera, se realizó un corte longitudinal entre el pocillo donde se cargaron los 3 µL y el pocillo donde se cargaron los 22 µL. Los 3 µL sirven para identificar la banda de DNA amplificada la ayuda del transiluminador y en los 22 µL se encontraba la banda de DNA que fue extraída del gel (que no fue transiluminada para no dañar el DNA).

Al fragmento de gel recortado se le añadió un volumen en  $\mu\text{L}$  igual a su peso en mg de tampón de captura (del Kit), unos 300  $\mu\text{L}$  aproximadamente. Posteriormente se calentó a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos o hasta que se disolvió la agarosa. Una vez disuelta, se introdujo todo el volumen obtenido del paso anterior en una columna y se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 16,1 xg durante 30 segundos. Después se eliminó el líquido contenido en el tubo de recogida. Posteriormente, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado y se centrifugó de nuevo a 16,1 xg durante 30 segundos. Por último, se puso la columna sobre un microtubo de 1,5 mL y se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de agua destilada para eluir el DNA purificado.

### 5.5. Digestión del DNA: Inserto y Vector

Se utilizó el vector de expresión proteica pet21d, para clonar el DNA amplificado (inserto) con la secuencia que codifica la Valosin Containin Protein.

En primer lugar se produjo la digestión del amplímero y el vector con las mismas enzimas de restricción tal como se indica en la siguiente tabla

DNA	BamHI	Not1	Tampón (Tango)*	Agua	Volumen Final
Amplímero (1,3 $\mu\text{g}$ ) 25 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	-	30 $\mu\text{L}$
pet21d 1 $\mu\text{g}$ (0,5 $\mu\text{g}$ ) 21 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$
pet21d 1 $\mu\text{g}$ (0,5 $\mu\text{g}$ ) 21 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	0,5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$

**Tabla 9:** Reacción de digestión del inserto (amplímero) y vector. Del vector se hicieron dos digestiones porque estaba a una concentración muy diluida. \*Para la digestión se utilizó el tampón Tango (BY5, Fermentas), que era compatible para las dos enzimas.

Una vez hecha la reacción, se incubó durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se incubó 5 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$  para inactivar la enzimas.

A continuación, se cargó el resultado de las digestiones en un gel de agarosa. Después se purificaron las muestras de inserto y el vector (se juntaron el resultado de las 2 digestiones del vector para tener un único vector) a partir de las bandas recortadas del gel (ver anterior).

Se obtuvo una concentración de 11 ng/ $\mu\text{L}$  tanto del amplímero y 10 ng/ $\mu\text{L}$  del vector.

### 5.6. Ligación

Para realizar la ligación del vector con el amplímero se hizo la siguiente reacción para la cual también se realizó un control en el que se puso vector sin amplímero

Vector	Amplímero	Tampón (10X)	T4 ligasa*	agua
10 µL	10 µL	2,1 µL	1 µL	-
10 µL	- (control)	2,1 µL	1 µL	10 µL

**Tabla 10:** Reacción de ligación. Se utilizó la enzima DNA T4 Ligasa ref: GC-011-100, Gene Craft

La reacción de ligación se dejó incubando durante toda la noche

### 5.7. Transformación bacteriana por Choque Térmico

Una vez acabada la ligación se procedió a transformar las bacterias con el vector que contenía la VCP recombinante clonada. Para la transformación bacteriana se utilizaron las bacterias de expresión E. coli XL-1Blue.

En primer lugar, el vector se calentó en un baño a 68°C durante 10 minutos. Durante este tiempo se extrajeron las bacterias del congelador de -70°C y se pusieron a 4°C.

Una vez transcurridos este tiempo, se cogió el vector y se añadió a 100 µL de bacterias XL1-Blue con la precaución de no pipetear arriba y abajo nada más que una sola vez (justo para soltar el vector en el vial de las bacterias). Se incubó a 4°C durante 30 minutos.

Durante que esta incubación se preparó el medio de crecimiento de las bacterias que hacía falta para después y se pusieron en tubo para crecimiento bacteriano los siguientes reactivos:

- 1 mL de LB
- 10 µL de D-glucosa al 50%
- 10 µL de MgSO<sub>4</sub> 1 M
- 5 µL de MgCl<sub>2</sub> 1M

Para hacer el Choque Térmico a las bacterias, se pusieron 5 minutos a 37°C (procedían de 4°C) y después seguidamente se pusieron 2 minutos a 4°C.

A continuación, se añadieron las bacterias al medio preparado anteriormente y se pusieron a crecer en el incubador bacteriano durante 1 hora a 37°C y agitación (200 rpm). Después se sembraron 100 µL de la mezcla de transformación en placa de LB con ampicilina a una concentración de 50 µg/µL y se incubaron durante toda la noche a 37°C.

El día siguiente las colonias de bacterias que crecieron se pusieron a crecer en 6 mL de LB con una concentración de ampicilina de 50 µg/µL y se pusieron en el incubador bacteriano durante toda la noche a 37°C en agitación.

### 5.8. Extracción DNA plasmídico

Para la extracción del DNA plasmídico (vector) presente en las bacterias transformantes se utilizó el Kit de extracción Quiaprep<sup>R</sup> Spin Miniprep Kit (27106, Quiagen) y se siguieron las especificaciones del fabricante.



En primer lugar se repartieron las bacterias, procedentes de cada colonia, en 4 tubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 16,1 xg durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Después se decantó el sobrenadante de cada tubo y se recogieron todas las bacterias en un solo tubo de 1,5 ml y se volvió a centrifugar a 16,1 xg durante 10 minutos. A continuación, se resuspendieron las células en 250 µL de tampón P1 (suministrado por el kit). Después se añadieron 250 µL de tampón P2 (del kit) y se agitó el tubo invirtiéndolo 6 veces. Inmediatamente después, se añadieron 350 µL de tampón N3 (del kit), se agitó de nuevo invirtiendo el tubo 6 veces y se centrifugó a 16,1 xg durante 10 minutos. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante y se añadió a una columna para extracción de DNA plasmídico (del kit). Después se centrifugó a 16,1 xg durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. A continuación se aplicaron 500 µL de tampón PB del kit y se centrifugó a 16,1 xg durante 10 minutos. Después se tiró el sobrenadante y se aplicaron 750 µL de tampón PE. Se centrifugó a 16,1 xg y se descartó el sobrenadante. Por último, se centrifugó una vez más, para quitar el excedente del último tampón que pudiera haber quedado retenido en la membrana y se colocó la columna sobre un tubo de recogida de 1,5 ml limpio. A continuación, se añadieron 50 µL de agua destilada y se dejó reposar 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 16,1 xg durante 1 minuto para eluir el DNA plasmídico.

#### 5.9. Secuenciación del amplímero

Para verificar que la proteína recombinante clonada se correspondía con la que había descrita se procedió a secuenciar el DNA. Para ello, como se trataba de una proteína grande, se diseñaron varios oligonucleótidos que abarcaban toda la proteína:

- VCP-2 FOR: 5'-TAC-CTT-AAG-CCG-TAC-TTC-CTG-3'
- VCP-3 FOR: 5'-AAT-CAT-GAG-CAA-ATT-GGC-TGG-3'
- VCP-4 FOR: 5'-TAT-GTT-CAG-AGG-CTG-CTC-TG-3'
- VCP-5 FOR: 5'-GAA-TCT-GAG-GCC-AAT-GTC-CG-3'
- VCP-6 FOR: 5'-GCT-TGT-AAA-CTG-GCC-ATT-CG-3'

Para realizar la secuenciación se utilizó el kit de secuenciación BigDye<sup>R</sup> Terminator v1.1 de Applied Biosystems ref.:4336774.

Para realizar la reacción de secuenciación se utilizaron 500 ng de vector, 1 µL (de concentración 5 µM) y 3 µL de preparado procedente del kit (contiene la Taq polimerasa, Cl<sub>2</sub>Mg y el tampón): El volumen final de reacción fueron 10 µL.

A continuación, se programó el termociclador tal como indica la tabla para amplificar las secuencias:

	Temp.	Tiempo	
<b>Desnaturalización</b>	94°C	4 min	30 ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 segundos	
<b>Hibridación</b>	53°C	25 segundos	
<b>Extensión</b>	60°C	2 minutos	
<b>Finalización</b>	4°C	Hasta 7 días	

**Tabla 11:** Reacción de amplificación para los primers de secuenciación. A diferencia de la amplificación con PCR convencional aquí no hay extensión final tras acabar los ciclos de amplificación

Finalmente, se utilizó el secuenciador 3130 Genetic Analyzer de AppliedBiosystems para obtener la secuencia.

#### 5.10. Obtención de Valosin Containin Protein (de cuerpos de inclusión)

Para purificar la proteína se realizó el siguiente protocolo con el que se consiguió extraer la proteína de cuerpos de inclusión. Se dividió el protocolo en varios sub-apartados:

Producción de las bacterias inducidas con IPTG:

- Se pusieron a crecer las bacterias en 50 mL de LB y con una concentración de ampicilina de 50 µg/mL en agitación a 37°C durante toda la noche.
- Se centrifugaron las bacterias en un tubo de 50 mL (Falcon) a 2000 xg durante 10 minutos
- Se centrifugó el botón bacteriano en 50 mL de LB al que se añadieron IPTG a una concentración final de 1mM y 50 µg/mL de ampicilina. Se incubaron en agitación a 37°C durante 3 horas.
- Se centrifugaron las bacterias en un tubo de 50 mL a 2000 xg durante 10 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se sumergió el botón bacteriano en nieve carbónica hasta que estuvieron congeladas. (En este punto se pueden guardar las bacterias en el congelador)

Obtención de los cuerpos de inclusión:

- Se resuspendió el botón bacteriano en 2,5 mL de tampón de lisis: compuesto de:
  - 50 mM de Tris-Cl (T3253, Trizma<sup>R</sup> hydrochloride, Sigma)
  - 25% sacarosa (S-9378, Sigma)
  - 1 mM EDTA (E-5134, Sigma)
  - Inhibidor de proteasas 1X
  - Lisozima 2 mg/mL (62971-50G-F, Sigma)
  - Ph=8
- Se incubó durante 30 minutos en agitación a 4°C. Posteriormente se añadieron 50 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de MnCl<sub>2</sub> y 10µg/mL de DNAasa y se incubó 30 minutos en agitación a 4°C.
- A continuación se añadió el tampón detergente que estaba compuesto de:

- 20 mM de Tris-Cl
- 0,2 M de NaCl (1.06404.1000,Merck)
- 2 mM EDTA
- 1% ácido deoxicólico (D-6750, Sigma)
- 1% IGEPAL (I-3021, Sigma)
- Ph= 7.5
- Después de añadir este tampón se guardó a -20°C
- Para seguir el protocolo se procedió a descongelar la solución a 37°C
- Una vez estuvo descongelado, se centrifugó a 10000 rpm en la ultracentrífuga durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- A continuación, se resuspendió el *pellet* en 1 mL del tampón de lavado, compuesto de:
  - 50 mM Tris-Cl
  - 0,5% Tritón (93420, Fluka)
  - 1 mM EDTA
- Para ayudar a la disgregación de la solución bacteriana se pasó el contenido a través de una jeringa con una aguja de 20G (cogiendo y soltando la solución de forma enérgica varias veces)
- Los dos pasos anteriores se repitieron 2 veces más.

#### Solubilización de los cuerpos de inclusión:

Para solubilizar los cuerpos de inclusión se utilizó el siguiente procedimiento:

- Se resuspendió el pellet en 2,5 mL del siguiente tampón, el cual contenía urea:
  - 50 mM Tris-Cl
  - 500 mM NaCl
  - 1 M urea (131754, Panreac)
  - Ph=7.4
- Se incubó durante 10 minutos en agitación a 4°C y después centrifugar a 13000 rpm (ultracentrífuga) durante 10 minutos a 4°C
- Los dos pasos anteriores se repitieron 2 veces más
- Para solubilizar mejor los cuerpos de inclusión, se resuspendió el pellet en este último tampón pero esta vez con 8 M urea al que se le añadió también:
  - 2,5 mM imidazole (I-2399, Sigma)
  - 1% Tritón
  - 20 mM β-mercaptoetanol (M6250, Sigma)

#### Purificación con la resina Ni-Sepharose 6 Fast Flow (17-5318-01, Ge Healthcare)

- Se cogieron 2 mL de la resina en un tubo de 15 mL (tipo Falcon) y se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante.

- Se añadieron 5 mL de agua destilada y se agitó durante 3 minutos. A continuación, se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se añadieron 5 mL de tampón de unión (20 mM de tampón fosfato, 500 mM de cloruro de sodio, 2,5 mM de imidazol, 8 M de urea; a un ph=7.4). Se agitó durante 3 minutos y se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se añadieron los 2 mL de muestra (que se habían obtenido de la solubilización de los cuerpos de inclusión) y se incubó durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.
- Posteriormente, se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante
- Se añadieron 5 mL del tampón de unión para lavar la resina. Se agitó durante 3 minutos y después se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. (Este paso se repitió una vez más)
- Después, se añadió 1 mL de tampón de elución (20 mM de tampón fosfato, 500 mM de cloruro de sodio, 500 mM de imidazol, 8 M de urea; a un ph=7.4). Se agitó durante 3 minutos y se centrifugó a 500 xg durante 5 minutos
- A continuación, se recuperó el sobrenadante que es donde se encontraba la proteína purificada

## 6. ANALISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 6.1. Obtención de la muestra

El estudio de la expresión se realizó sobre tejido de páncreas obtenido de criosecciones del criostato, tal como se detalla en el apartado 2.2. Aunque en este caso realizamos las siguientes variantes:

- Los cortes fueron de 20  $\mu$ m de grosor
- Se separó en dos tubos diferentes, por un lado, los cortes de tejido que presentaran sólo tejido exocrino y por otro aquellos que presentaran una alta densidad de tejido de islotes.

Así, se garantizó que la muestra de tejido exocrino y la muestra de tejido exocrino más tejido endocrino tuviera el mismo tratamiento. Esto hecho es relevante tenerlo en cuenta dada la labilidad del RNA pudiendo garantizar que el punto de partida en cuanto a la obtención de muestra fue el mismo.

Para poder discriminar entre las dos clases de muestras se fue tiñendo el tejido pancreático con azul de metileno (41687655, Merck) durante el proceso de la adquisición de las criosecciones.

Una vez obtenida la muestra se procedió a extraer el RNA tal como se indica en el apartado 5.1. Posteriormente, se hizo la retrotranscripción para pasar a cDNA tal como se indica en el apartado 5.2.

### 6.2. Expresión a tiempo real con sondas Taqman<sup>R</sup>

Esta metodología permite saber la cantidad de RNAm expresado de un gen conocido. Consiste en una variante de la PCR convencional que sirve para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación.

En este caso, además de un juego de primers que se sitúan en dos exones contiguos del gen de interés (en este caso VCP), se utiliza una sonda que sólo hibrida con el DNA procedente de RNAm, ya que el DNA genómico al contener intrones, estos hacen que se divida la secuencia reconocida por la sonda y esta no hibrida.

Si la sonda encuentra su secuencia específica esta se une a ella. Por otro lado, de forma independiente a la sonda, los primers hacen de cebadores para que la polimerasa comience a amplificar el DNA. Cuando la reacción de amplificación llega a la sonda, esta es escindida y emite fluorescencia que es captada por el aparato.

Para referenciar la cantidad exacta de expresión de la Valosin Containin Protein independientemente de a la cantidad de DNA de la muestra, se utiliza un gen de expresión constitutiva. En nuestro caso, se eligió como gen de expresión constitutiva el GAPDH (Mm999999\_g1, Applied Biosystems).

Para llevar a cabo el ensayo se utilizó la sonda Taqman<sup>R</sup> VCP (Mm01702786\_gH, AppliedBiosystems) y el reactivo que contenía la MIX de la reacción fue el 4370048 Taqman<sup>R</sup> Gene Expression Master-Mix.

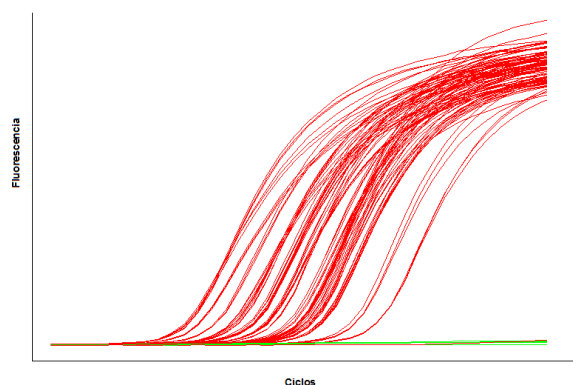
Para llevar a cabo la Real Time-PCR se utilizó la LightCycler LC480 de Roche

La reacción de amplificación se preparó tal como se muestra en la tabla:

Reactivo	Volumen
Taqman Gene expresión Assay (20X), sonda	1 µL
cDNA	2,8 µL
Taqman Gene expression Master Mix	10 µL
Agua destilada (libre de nucleasa)	6,2 µL
Volumen total de reacción	20 µL

**Tabla 12:** Reacción de amplificación de la Real Time PCR. Ejemplo de reacción para una muestra. Cada una de las muestras fue amplificada para el gen VCP y también para el gen control GAPDH

La fórmula que se utilizó para calcular la expresión relativa del gen de la valosin containin protein fue la siguiente:  $2^{-(Cp\ gen - Cp\ GapdH)}$



**Figura 4:** Ejemplo de diferentes curvas de *melting* donde se observa el ciclo en el que la amplificación comienza a ser exponencial

## 7. ESTUDIOS *IN VITRO*

### 7.1. Proliferación celular

Para llevar a cabo los estudios de proliferación se utilizaron esplenocitos de ratones 116C-NOD y *littermates* de 6 y 32 semanas de edad.

Estos estudios se realizaron cultivando los linfocitos B durante 48 horas

La purificación de linfocitos B se hizo utilizando selección negativa para garantizar su integridad.

La purificación se realizó con el separador celular FACSARIA II de BD

#### 7.1.1. Purificación de linfocitos B

En primer lugar se realizó la lisis de bazo tal como se describe en el apartado 3.2.

Sobre el botón celular obtenido después de realizar la lisis y centrifugar, se añadió la mezcla de anticuerpos que se detallan en la tabla siguiente diluidos previamente en un tampón que contenía PBS 1X con 1% de FCS hasta obtener un volumen final de reacción de 100  $\mu$ L.

Anticuerpo	Volumen de anticuerpo	marcaje
Anti CD3-FITC (HM3401, Invitrogen)	6 $\mu$ L	Linfocitos T
Anti CD49b-Pe (553858, BD)	4 $\mu$ L	Linfocitos NK
Anti CD11c-APC (17-0114-82, Ebioscience)	4 $\mu$ L	Células dendríticas
Anti CD11b-APC (Mac-1) (553312, BD)	4 $\mu$ L	Macrófagos/monocitos
Anti CD138-APC (558626, BD)	4 $\mu$ L	Células plasmáticas
Anti CD71-Pe (553267, BD)	4 $\mu$ L	Eritroblastos

**Tabla 13:** Volúmenes de anticuerpos utilizados. Nótese que algunos de ellos comparten fluorocromo, en este caso se pudo hacer porque la selección de linfocitos B es de forma negativa.

Tras añadir la dilución de anticuerpos, los esplenocitos se incubaron durante 25 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

A continuación, fueron lavados añadiendo 1 mL de PBS 1X con 1% de FCS y se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos. Después, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 3 mL de PBS para ser adquiridas por el separador celular (a partir de aquí las células se mantuvieron a 4°C).

### 7.1.2. Estimulación de linfocitos B

Tras la separación celular, los linfocitos B fueron recogidos en MCC a 4°C. Seguidamente fueron centrifugadas a 400 xg durante 5 minutos y se resuspendieron en MCC\* a una concentración de 1 millones/ML y se sembraron 200 µL en placa de 96 pocillos (167008, Nunclon™ Surface, Nunc) Paralelamente se prepararon los reactivos con los que fueron estimulados los linfocitos según se indica en la tabla siguiente

<b>Estímulo</b>	<b>Concentración Stock</b>	<b>Concentración trabajo*</b>
LPS (L-3012, Sigma)	5 µg/µL	10 µg/mL
Anti CD40+IL4(553787, BD)	1mg/mL	10 µg/mL
IL-4 (404-ML-005, R&D Systems)	1µg/mL	10 ng/mL
Anti-IgM (715-006-020, AffinitiPure F(ab') <sub>2</sub> , Jackson Immunoresearch)	1,2 mg/mL	5 µg/µL

**Tabla 14:** Concentraciones stock y de trabajo de los estímulos utilizados

\*En la práctica los linfocitos B fueron resuspendidos a una concentración de 2 millones/mL y los estímulos fueron preparados en MCC al doble de la concentración de trabajo. Así, al juntar volúmenes iguales de suspensión celular y de estímulos la concentración que se obtiene de ambos es la deseada.

Todas las estimulaciones se hicieron por triplicado

### 7.1.3. Incorporación de Timidina tritiada, <sup>3</sup>[H]-TdR

Para evaluar el nivel de proliferación de los linfocitos B a las 48 horas de cultivo, se añadió 1 µCi/pocillo de <sup>3</sup>[H]-TdR (Net 027Z001MCThymidine, [methyl-3H], PerkinElmer) 16 horas antes de proceder a su lectura. Transcurrido este tiempo se procedió a capturar los linfocitos B utilizando el Harvester (Harvester 96, Tomtec<sup>R</sup>) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se

analizaron las cuentas por minuto (cpm) emitidas por el líquido de centelleo utilizando el lector (I4150 Microbeta Wallac.Trilux).

#### 7.1.4. Análisis de citoquinas: método CBA

El análisis de citoquinas se realizó a las 32 horas de haber puesto los linfocitos B en cultivo en presencia de los estímulos LPS, anti CD40, anti-BCR o bien en linfocitos sin estimular.

La muestra utilizada fue el sobrenadante de los cultivos, obtenido justamente antes de añadir la  $^3\text{[H]}$ -TdR. Para el análisis se utilizó el Kit CBA (del inglés, Cytometric Bead Array), ref.: 560485 de BD; que incluía la detección de las citoquinas: IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17

Este kit se hizo servir para el doble de muestras ya que se diluyeron los reactivos a la mitad.

El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

- Antes de comenzar, se preparó la recta estándar. Para ello, se resuspendió el vial que contenía el estándar liofilizado usando 2 mL de “*Assay Diluent*” (suministrado por el fabricante). Se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente y se hicieron diluciones seriadas 1:2.
- También se preparó el anticuerpo de captura, juntando 5  $\mu\text{L}$  de cada anticuerpo de captura por cada muestra a analizar (total 35  $\mu\text{L}$  por muestra)
- En primer lugar, en un tubo de citometría se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de la mezcla de anticuerpos anterior
- A continuación, se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de muestra o de estándar
- Después, se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de detección. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad.
- Posteriormente, se añadieron 0,5 mL de tampón de lavado (suministrado por el fabricante) y se centrifugó a 200 xg durante 5 minutos
- Por último, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 100  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado.

La solución obtenida fue adquirida utilizando el citometro de flujo FacsCantoll de BD y el análisis de resultados se hizo con el programa FacsDiva.

## 8. ESTUDIOS *IN VIVO*

### 8.1. Análisis de la Vida Media de linfocitos B transgénicos

Para analizar la vida media de linfocitos B se utilizaron esplenocitos de ratones transgénicos y *littermates* de 5 semanas de edad. Como ratones receptores se utilizaron ratones NOD de 5 semanas de edad.



En primer lugar se hizo la purificación de los linfocitos B por selección negativa tal como se describe en el apartado 7.1.1. Sin embargo, en este caso no usamos PBS al 1X suplementado con 1% de FCS sino que se usó HBSS 1X (Hank's balanced salt solution), ref.: 14060, Gibco.

Sólo en este estudio puntual fue usado el HBSS 1X, evitándose así usar el suero fetal bovino (FCS) para descartar una posible alteración en la vida media de los linfocitos B debida a la presencia de citoquinas, factores de crecimiento,...

La recogida de los linfocitos B después de ser sorteados también fue en HBSS suplementado en cada caso con 5% de suero extraído de los propios ratones utilizados como donantes.

#### 8.1.1. Marcaje de linfocitos B con CFSE

Una vez obtenidos los linfocitos B purificados, se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en HBSS 1X a temperatura ambiente a una concentración celular de 11 millones/mL.

Por otro lado, se preparó el CFSE (C1157, Invitrogen), cuya concentración stock era de 5  $\mu$ M. Se diluyó 1  $\mu$ L en 5000  $\mu$ L de HBSS 1X, obteniéndose así una concentración de trabajo de  $2 \times 10^{-4}$   $\mu$ M.

A continuación, se utilizó una ratio 1:1 para realizar la tinción:

- volumen de suspensión celular: volumen de CFSE (a la concentración de trabajo)

Una vez hecha la mezcla de linfocitos y CFSE se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 12 minutos. A continuación, se paró la reacción de marcaje con 8 mL de HBSS 1X suplementado con 5% de suero de ratón y se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos. Después, se resuspendieron los linfocitos en 3 mL de HBSS 1X suplementado con 5% de suero de ratón y se incubaron en un baño a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se volvieron a añadir 8 mL de HBSS 1X suplementado con 5% de suero de ratón y se centrifugó a 400 xg durante 5 minutos. Por último, los linfocitos B fueron resuspendidos en suero fisiológico.

#### 8.1.2. Transferencia de linfocitos B

Dado que en el proceso de marcaje con CFSE se podían haber perdido muchos linfocitos B, se volvió a hacer un conteo utilizando la citometría de flujo utilizando el reactivo "*Perfect Count Microspheres*" (Cyt-PCM-100). Este reactivo permite tener un conteo muy preciso utilizando muy poco volumen de suspensión celular. Así, se utilizaron 10  $\mu$ L de suspensión celular, al que se añadieron 10  $\mu$ L de "perfect count" y todo ello se puso en un volumen final de 100  $\mu$ L de HBSS 1X. El número inyectado de linfocitos B fue de 2,5 millones por ratón receptor (diluidos en 150  $\mu$ L de suero fisiológico). Para la inyección se utilizó la vena lateral de la cola.

#### 8.1.3. Seguimiento de los linfocitos B marcados con CFSE

Para hacer el seguimiento de los linfocitos transferidos, 24 horas después de la transferencia o 96 horas después de la transferencia, fueron sacrificados dos ratones receptores y se analizó la presencia de linfocitos B marcados con CFSE de entre el total de esplenocitos que fueron marcados con anti-CD19-V450 (dilución 1/100). (ver apartado 3.2)

(En este caso para realizar el marcaje se utilizaron 200 mil esplenocitos del ratón receptor).

Por último, antes de adquirir las células por el citómetro, se añadieron 2,5 µL de 7-AAD (559925, BD) al volumen final de adquisición (150 µL) y se incubaron 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

## 8.2. Transplante de Médula Ósea. Producción de ratones quimeras

La finalidad de este estudio fue analizar cómo se comportaban los linfocitos B procedentes de médula ósea de ratones transgénicos frente a linfocitos B de ratones NOD cuando están inicialmente en igualdad de condiciones. Además como control, se utilizó médula ósea procedente exclusivamente de ratón transgénico.

Para realizar este estudio se usó médula ósea procedente de ratones transgénicos y no transgénicos. Como ratones receptores se usaron ratones NOD de 5 semanas.

### 8.2.1. Acondicionamiento de los ratones receptores

Los ratones receptores fueron irradiados con dosis letal de irradiación gamma (8Gy) producida por una fuente de Cs<sup>137</sup> (Irradiador IBL 437C tipo H, CisbioInternational).

Dado que la tasa de irradiación que produce la fuente radioactiva es muy elevada, mucha dosis por unidad de tiempo, y por tanto, podría ser letal para los ratones si se diera de forma continua, se optó por realizar la siguiente estrategia:

Según cálculos teóricos el ratón puede recibir como máximo una tasa de 1 Gy en 75 segundos. Sin embargo, el irradiador utilizado tiene una tasa de 1 Gy en 25 segundos. Para corregir esta diferencia se procedió de la siguiente manera:

- Se programó el irradiador para dar 1 Gy (25 segundos) y a continuación se dejó un periodo de descanso sin irradiar de 60 segundos. Se repitió este proceso tres veces para así alcanzar una dosis de 4 Gy
- Se dejaron descansar a los ratones durante un periodo de 1,5 horas
- Se volvió a proceder como en el primer punto (1Gy, seguido de descanso), repitiéndolo por un total de 4 veces para así recibir otros 4 Gy de irradiación.

Así, la suma total de dosis recibida entre los dos tandas fue de 8 Gy (habiendo recibido una tasa cercana a la tasa teórica).

### 8.2.2. Obtención de Médula Ósea

La médula fue extraída del fémur de los ratones donantes mediante “*flushing*” (método que consiste en inyectar una solución a través del canal medular para que salga su contenido).

Posteriormente, los hematíes fueron lisados según se indica en el apartado 3.2. y el botón celular obtenido fue resuspendido en suero fisiológico. A continuación, se procedió a realizar el conteo celular y como en este caso era muy importante ser lo más preciso posible para inyectar exactamente el mismo número de células de ratón transgénico y no transgénico, se utilizó el reactivo para citometría “*Perfect Counts*” (ver apartado 8.1.2.).

### 8.2.3. Transplante de Médula Ósea

Una vez realizado el conteo de cada una de las suspensiones celulares, se preparó una suspensión celular, con un 50% de células procedentes de ratón transgénico y un 50% de células procedentes de ratón NOD, con una concentración de 3 millones (1,5 + 1,5) de células por cada 150  $\mu$ L de volumen (que es volumen que se utilizó para inyectar).

Por otro lado, para preparar el transplante utilizado como control, se preparó una suspensión celular de 3 millones de células procedentes de médula ósea exclusivamente de ratón transgénico en 150  $\mu$ L de volumen de inyección

### 8.2.4. Seguimiento del transplante

Todos los ratones sobrevivieron al transplante. Se produjeron un total de 4 ratones quimera y 3 ratones control transplantados con médula de ratón transgénico.

Los ratones fueron sacrificados 4 semanas del transplante y fue analizada la médula ósea.

Para ello, se cogió un fémur de cada ratón. Se le extrajo la médula mediante “*flushing*” y se lisaron los hematíes. Por último, se hizo el marcaje para citometría con los anticuerpos CD19V450, IgM<sup>a</sup>Pe, IgM<sup>b</sup>-biotina (2ario SA-APC) tal como se describe en la sección 3.2.

### **III HIPÓTESIS**

Dada la autoreactividad observada por el reconocimiento del AcMoH116 sobre célula beta-pancreática, hipotetizamos que el ratón 116-NOD, el cual es portador por transgénesis de la inmunoglobulina con la misma especificidad que el H116, deberá reflejar cambios en la respuesta inmunitaria bien sean por aumento o por una disminución de la misma, dependiendo de los mecanismos de tolerización que se den en el ratón NOD.

### **IV OBJETIVOS**

Objetivo general:

- Determinar las características de la respuesta autoinmunitaria y la posible alteración de los mecanismos de la tolerancia central y periférica que se dan en el ratón NOD como modelo de susceptibilidad a la enfermedad.

Objetivos específicos:

- Caracterizar fenotípicamente las distintas subpoblaciones de linfocitos B.
- Estudiar en qué medida se afecta el curso y gravedad de la T1D.
- Analizar el estado de desarrollo y activación de los linfocitos B transgénicos
- Establecer la función de los linfocitos B reactivos en el curso de la T1D.
- Investigar los mecanismos de tolerancia central y periférica implicados en la generación de linfocitos B autoreactivos.
- Identificar el autoantígeno específico de célula beta reconocido por el AcMo H116 como diana de la respuesta autoinmunitaria durante el desarrollo de la T1D.

## V RESULTADOS

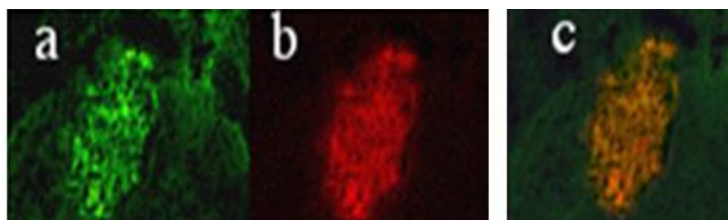
### 1. ANTECEDENTES

Los linfocitos B infiltran los islotes pancreáticos aunque su papel es todavía poco conocido. Para conocer mejor la función que desempeñan en la Diabetes autoinmunitaria, en nuestro laboratorio se generaron una colección de hibridomas de linfocitos B a partir del infiltrado procedente de varias cepas de ratón con distintos grados de insulitis y diabetes [108].

La caracterización de la especificidad tisular de los anticuerpos secretados por dichos hibridomas desveló que una pequeña fracción de ellos (5,8%) producía anticuerpos que reconocían algún autoantígeno específico de células beta (Figura 1). Además, el análisis del isotipo de la inmunoglobulina secretada mostró que los anticuerpos eran de tipo IgG<sub>2b</sub> y IgG<sub>1</sub>, indicando que derivaban de linfocitos B que habían sufrido cambio de clase. Además, el análisis de las regiones variables VL y VH del hibridoma H116, representativo de este grupo de hibridomas, mostró la existencia de hipermutación somática, indicando que estos hibridomas derivaban de linfocitos B que habían sufrido maduración de la afinidad<sup>67</sup>. Por ello, concluimos que los linfocitos B de los cuales derivaban estos hibridomas habían sido seleccionados positivamente durante la ontogenia y/o durante el desarrollo de la T1D.

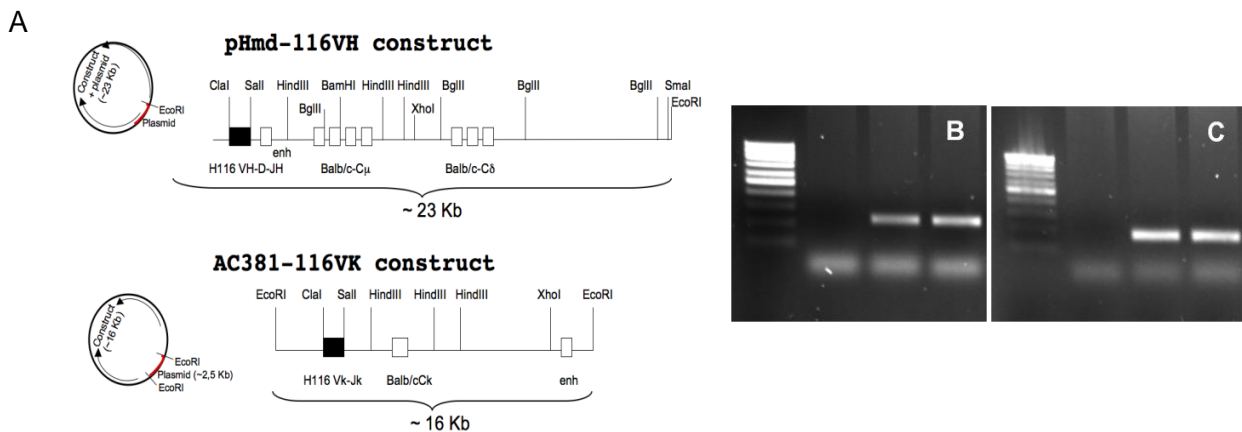
Por otro lado, se analizó la reactividad de los anticuerpos anti-islole sobre criosecciones de páncreas humano y de rata. Hallamos que los anticuerpos reaccionaban cruzadamente con probablemente el mismo antígeno producido en islotes de páncreas de rata y humanos, y por ello indicaba que la respuesta de los linfocitos B “tipo H116” durante la iniciación y/o progresión de la T1D se producía contra un determinante antigénico altamente conservado ínter especies.

El hibridoma H116 se obtuvo de la fusión de linfocitos B procedentes de infiltrados de islotes pancreáticos de un ratón F1(8.3-NODxNOR)[108]. Característicamente los ratones F1(8.3-NODxNOR), al igual que los F1(NODxNOR) [109], padecen insulitis pero raramente diabetes, por lo que es un buen modelo de “insulitis benigna”.



**Figura 1:** Reconocimiento del anticuerpo monoclonal procedente del H116 (AcMoH116) sobre tejido pancreático. En a, tinción simple con AcMoH116. En b, tinción simple con anticuerpo anti-insulina (b). En c, doble tinción con AcMo116 y anticuerpo anti-insulina

Dada la probable relevancia de los linfocitos B “tipo H116” durante la iniciación y/o progresión de la T1D, decidimos generar un ratón transgénico portador de las inmunoglobulinas de este hibridoma. Para construir el transgen IgM/IgD, el fragmento de cDNA que codificaba por la región VDJH de la cadena pesada (IgH) del hibridoma H116 fue ligado en la zona de restricción Sall-ClaI del vector pHelixmdSMI codificador de la región intrónica del enhancer y la región Cm1-4m y la Cd1-3m procedente del genoma del ratón Balb/c (obtenido del Dr. Thierry Martin, Institute d’Hematologie et d’Immunologie, Strasbourg Cedex, Francia, con el consentimiento del Dr. Klaus Rajewsky, Harvard Medical School, Boston, USA [110]). El nuevo constructo génico codificaba las inmunoglobulinas IgM<sup>a</sup> y IgD<sup>a</sup> de membrana y secretada. La correcta inserción fue establecida por secuenciación. El segmento L-VJ clonado del gen de la cadena ligera del hibridoma H116 se insertó dentro de la región Vk del constructo de la cadena ligera AC38KISMI-Ck (también obtenido del Dr. Martin con el consentimiento del Dr. Rajewsky).



**Figura 2:** Esquema de los transgenes para la cadena pesada y ligera del BCR del ratón transgénico 116-NOD y PCR de screening de ratones transgénicos. A, la cadena pesada codifica para la síntesis de la IgM e IgD (haplotipo a) y la cadena ligera codifica para la síntesis de la cadena ligera kappa. B, screening para la cadena pesada para el transgén. C, screening para la cadena ligera de transgén.

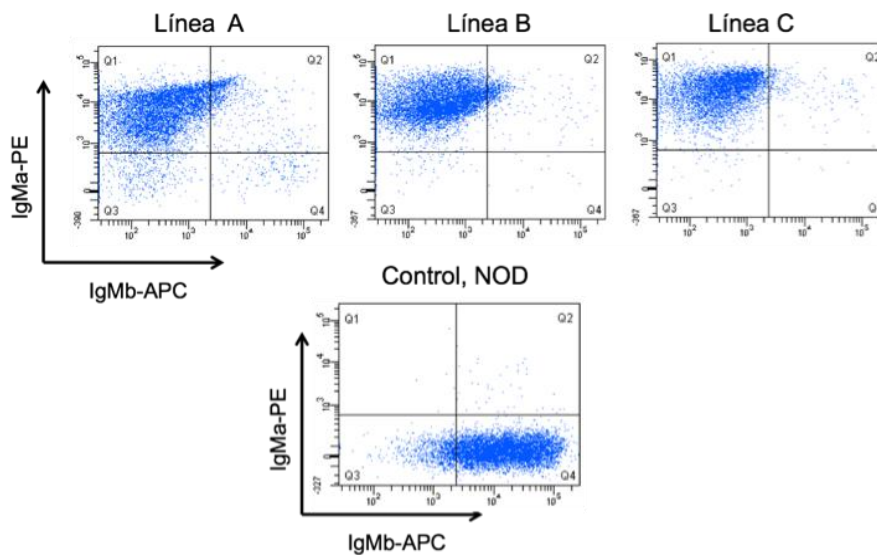
Para la generación del ratón transgénico, los constructos génicos fueron liberados del vector, purificados y microinyectados en oocitos de ratón NOD (Xenogen Biosciences, Cranbury, New Jersey, USA). Los ratones transgénicos resultantes de la microinyección fueron identificados por análisis de PCR (figura 2). Los resultados indicaron que de las diferentes microinyecciones se generaron 3 ratones portadores de los transgenes (líneas o *founders*) a las que denominamos 116A-NOD, 116B-NOD, y 116C-NOD.

## 1. ANÁLISIS DE EXPRESION DE LOS TRANSGENES

### 2.1. Expresión de IgM

Con los primeros descendientes de cada una de las tres líneas, se analizaron la expresión de los transgenes, mediante citometría de flujo. Como la región constante de los genes de las inmunoglobulinas IgM y IgD del transgén proceden del ratón balb/c que es de haplotipo "a" (IgM<sup>a</sup> e IgD<sup>a</sup>), y los genes de las inmunoglobulinas del ratón NOD pertenecen al haplotipo "b" (IgM<sup>b</sup> e IgD<sup>b</sup>), esto hizo posible detectar en los linfocitos B del ratón transgénico.

En la (figura 3) se muestran los niveles de expresión del transgén que codifica para la cadena pesada mediante citometría de flujo. Como se puede observar, en las tres líneas, la expresión de la cadena pesada de origen transgénico (IgM<sup>a</sup> y IgD<sup>a</sup>) fue correcta, y con exclusión alélica de los genes de las inmunoglobulinas endógenos.



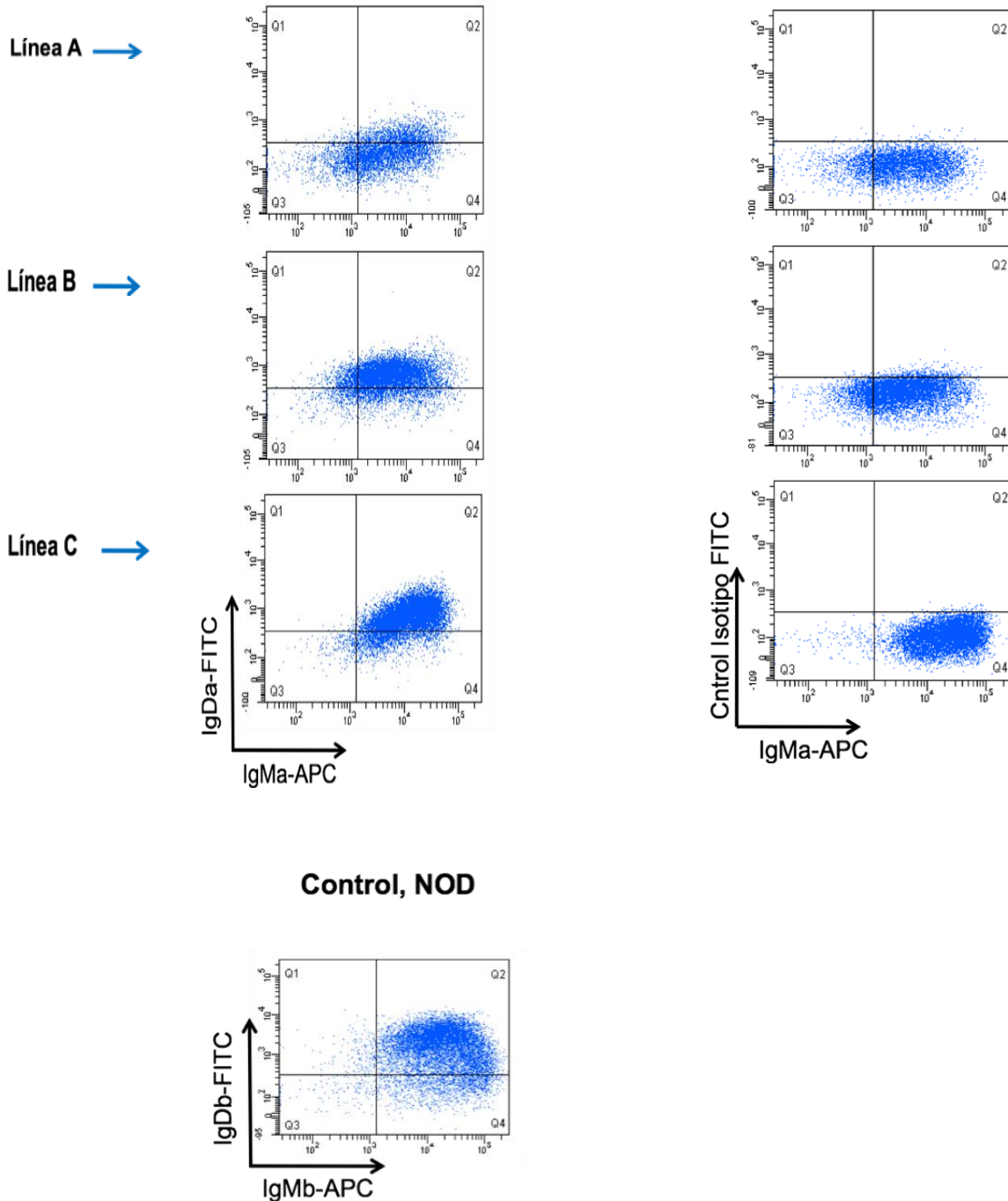
**Figura 3:** Expresión del transgén para la cadena pesada IgM de membrana en linfocitos B de bajo de ratones de las Líneas 116A-NOD, 116B-NOD y 116C-NOD de 6 semanas de edad. En las figuras de la parte superior se muestra el marcaje para la inmunoglobulina transgénica en Pe frente al marcaje para la inmunoglobulina endógena APC. En la parte inferior se muestra el control NOD para los mismos anticuerpos.

### 2.2. Expresión de IgD

El transgén que codifica para la cadena pesada codifica para la inmunoglobulina IgM<sup>a</sup> también y para la IgD<sup>a</sup>. La doble expresión en membrana de linfocitos B de ambas inmunoglobulinas, se analizó mediante citometría de flujo marcando de forma conjunta la IgD<sup>a</sup> y la IgM<sup>a</sup>. El resultado obtenido muestra una bajada de expresión de la inmunoglobulina IgD<sup>a</sup> en las tres líneas de ratones generadas respecto a la expresión en el ratón NOD (figura 4). Dado que la expresión de la IgD<sup>a</sup> en los linfocitos B de los ratones transgénicos tiene unos niveles bajos respecto a la expresión que se

observa en el ratón NOD, se utilizó un anticuerpo monoclonal control de isotipo marcado con el mismo fluorocromo (FITC).

De las tres líneas de ratones generadas, la línea 116C-NOD, es la que expresa mayores niveles de IgD<sup>a</sup>, siendo en este caso la que se muestra más parecida a la expresión de IgD<sup>b</sup> en linfocitos B del ratón NOD control.



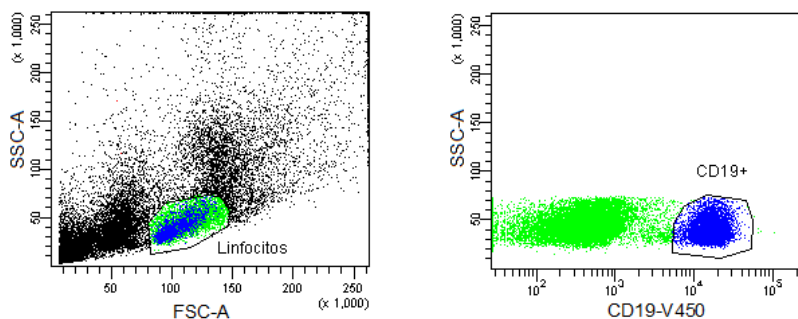
**figura 4:** Doble expresión de IgM e IgD en linfocitos B de ratones 116A-NOD, 116B-NOD y 116C-NOD de 6 semanas de edad. Los gráficos de la parte superior izquierda muestran el marcaje para IgM<sup>a</sup> en APC e IgD<sup>a</sup> en FITC. En la parte superior derecha se muestran los controles de isotipo para IgD. En la parte inferior se muestra el marcaje de IgMb en APC e IgDb de un ratón NOD de la misma edad. Los gráficos muestran un descenso de expresión de la IgD, sobretodo en el 116A-NOD.



### 2.3. Expresión de la cadena ligera (Kappa)

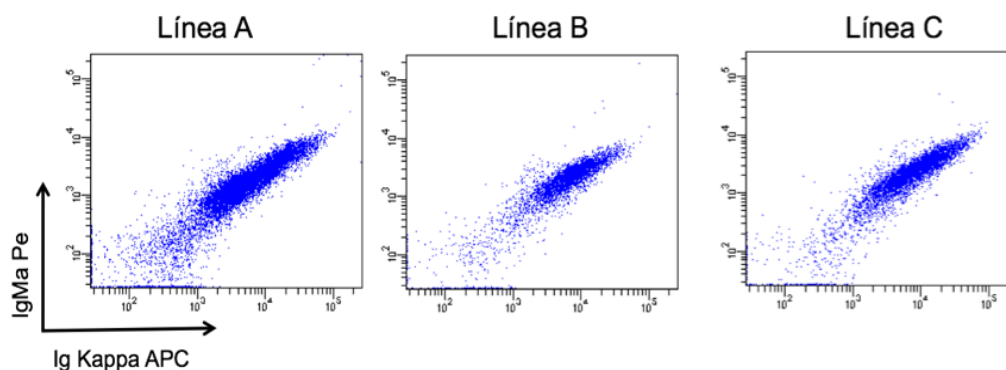
Para analizar la expresión del transgén que codifica para la cadena ligera se utilizó una estrategia indirecta ya que no existe ningún anticuerpo que nos permita discriminar la cadena ligera endógena de la cadena ligera producida por expresión del transgén. La estrategia consistió en pasar “los transgenes” a un fondo NOD.RAG2<sup>-/-</sup>, es decir la generación de ratones 116-NOD.RAG2<sup>-/-</sup>. Como en estos ratones, la ausencia de las recombinasas (RAG-2) no les permite reordenar los genes de las inmunoglobulinas ni los TCRs endógenos, y por ello generar linfocitos B ni T de forma endógena, sólo podía haber linfocitos B con expresión de los transgenes (tanto de la cadena pesada como ligera).

En primer lugar, se comprobó la presencia de linfocitos B en el bazo de los ratones 116-NOD.RAG2<sup>-/-</sup> mediante el marcaje con CD19. (figura 5)



**Figura 5:** Presencia de linfocitos B CD19+ en ratones 116-NOD.RAG2<sup>-/-</sup>. La expresión de los transgenes produce linfocitos B “transgénicos” en ratones con fondo genético RAG2<sup>-/-</sup>

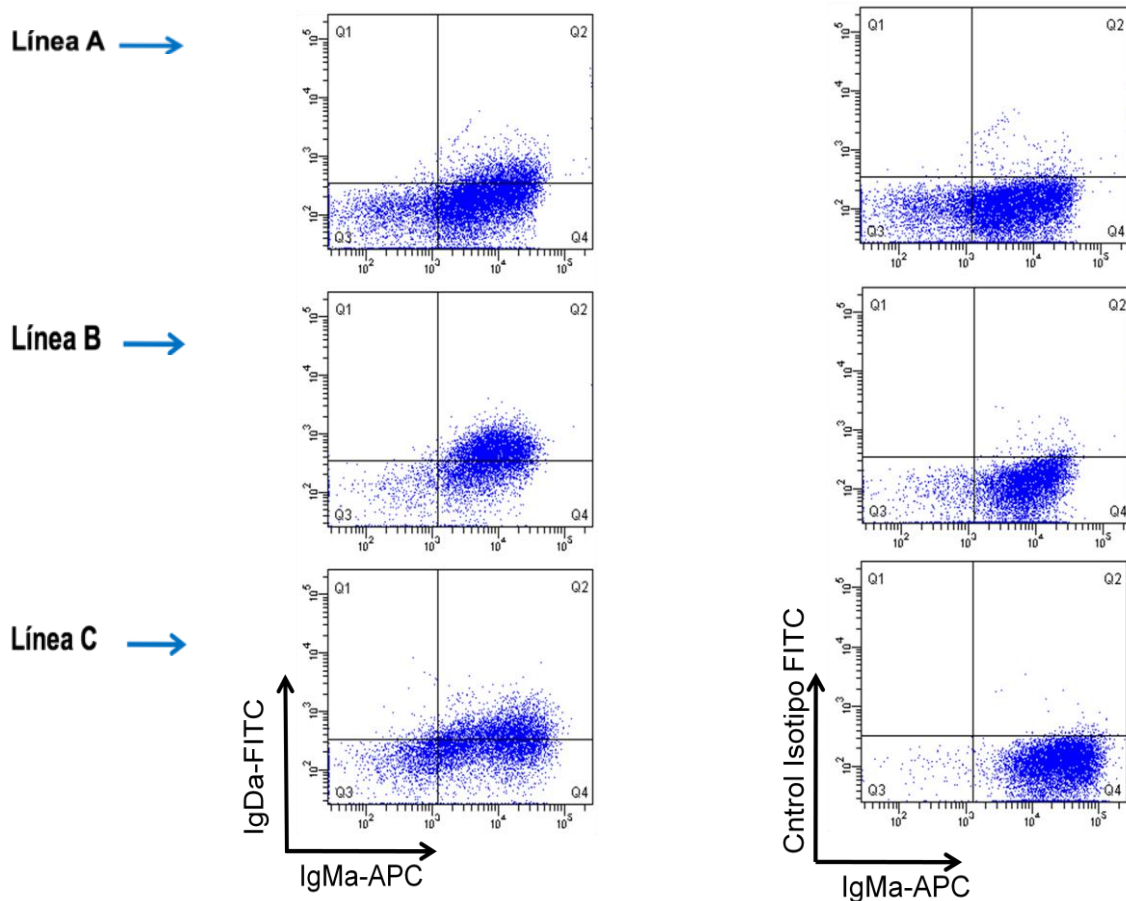
Posteriormente, se comprobó que la cadena ligera correspondía exclusivamente a la cadena Kappa producida por la expresión del transgén en las tres líneas de ratones generadas (figura 6). De esta forma también se descartaba la formación de un BCR anómalo que pudiera llevar, por ejemplo, las cadenas subrogadas.



**Figura 6:** Análisis de la expresión de los transgenes en linfocitos B de bazo de ratones 116A-NOD, 116B-NOD y 116C-NOD de seis semanas de vida. Doble marcaje con anticuerpos que reconocen la cadena pesada (IgM<sup>α</sup>) y la cadena kappa. Los niveles de expresión se muestran muy similares en las tres líneas de ratón.

## 2.4. Expresión de IgM<sup>a</sup>-IgD<sup>a</sup> en el ratón 116-NOD.RAG2<sup>-/-</sup>

Además, observamos que la expresión de las cadenas pesadas IgM<sup>a</sup> e IgD<sup>a</sup> era similar a la observada en los ratones transgénicos de las tres Líneas (figura 7). Por tanto los linfocitos B están madurando igual y es independiente a la competencia con los linfocitos B generados de forma endógena así como el efecto que pueden ejercer los linfocitos T a nivel medular.



**Figura 7:** Doble expresión de IgM e IgD en linfocitos B de ratones transgénicos 116A-NOD.RAG2<sup>-/-</sup>, 116B-NOD.RAG2<sup>-/-</sup> y 116C-NOD.RAG2<sup>-/-</sup> de 6 semanas de edad. Los gráficos de la izquierda corresponden al doble marcaje para IgM<sup>a</sup> e IgD<sup>a</sup> y los de la derecha son los controles de isotipo.

En cuanto a la producción de inmunoglobulina secretada (anticuerpos) observamos que hay diferentes niveles de producción, siendo los ratones 116C-NOD y 116B-NOD los que secreta niveles más elevados (figura ). (ver sección donde se identifica la *Valosin Containin Protein*, apartado 8.1.2)

## 2. INCIDENCIA DE T1D

Una vez analizadas la expresión de las inmunoglobulinas, realizamos el estudio de la incidencia de diabetes autoinmune en las tres líneas.

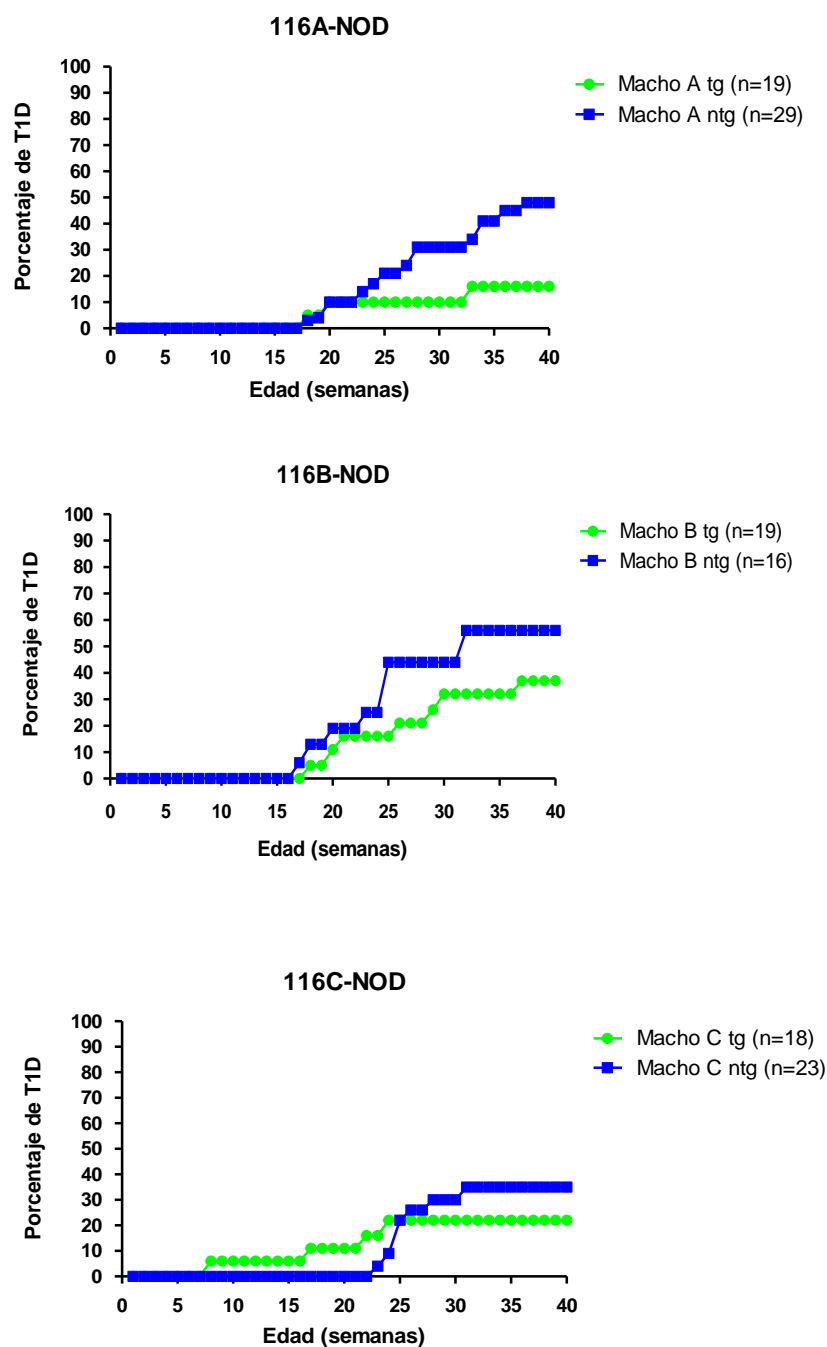
Los resultados obtenidos mostraron que los ratones macho transgénicos de las tres líneas tienen una incidencia inferior de la enfermedad respecto a la que se observa en sus hermanos de camada

no transgénicos. Siendo en las Líneas A y B en torno a un 20-30% inferior y en la línea C un 13% más bajo (figura 8).

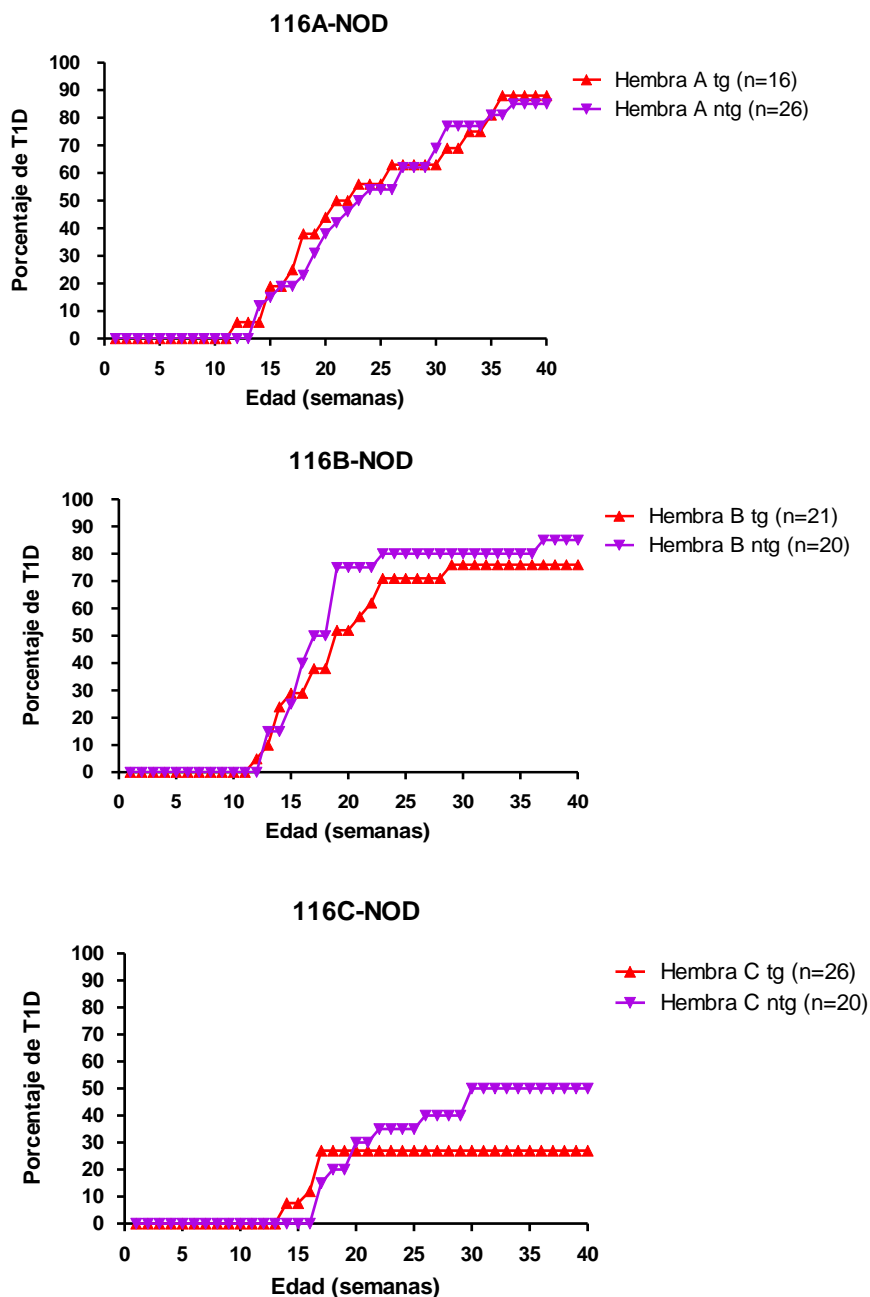
Por lo que respecta a los ratones hembra, las líneas A y B mostraban unos valores muy similares de incidencia de la enfermedad tanto en ratones transgénicos como no transgénicos (figura 8). Sin embargo, en la línea C es donde se observaba una diferencia más clara, con una bajada de un 50% respecto a los ratones no transgénicos (27% de incidencia en ratones transgénicos respecto a un 50% de los no transgénicos).

Si bien hay que destacar que, a nivel mundial, la incidencia teórica de los ratones hembra NOD está en torno al 60-90%, en la Línea C estamos por debajo de estos niveles.

### Incidencia de la enfermedad: Machos



## Incidencia de la enfermedad: Hembras



**Figura 8:** Incidencia de T1D en ratones machos y hembras. Se muestran los porcentajes de ratones que se hicieron diabéticos. Se indica en la leyenda el número de ratones a los que se hizo el seguimiento en cada caso

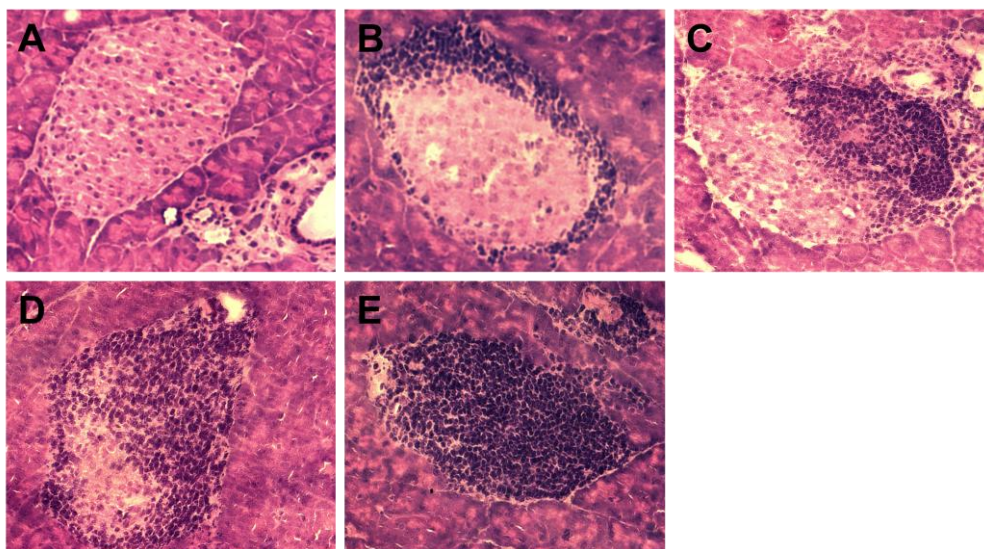
Los resultados mostrados hasta este momento, indicaban que de las tres Líneas generadas, la Línea C era en la que mejor se expresaban los transgenes (ej: expresión más alta de la mIgD), y que era en esta misma línea donde la incidencia de la enfermedad se veía más alterada, es decir se producía una menor incidencia de la enfermedad en ambos sexos de ratones transgénicos, en relación a los ratones *littermates* no transgénicos. Ambos aspectos nos parecieron de mayor interés, si tenemos en cuenta que el hibridoma H116 procedía de un ratón F1(8.3-NODxNOR)

susceptible a insulitis pero diabetesresistente. Por todo ello, se decidió focalizar el estudio en la Línea C. Así, los resultados que se muestran a partir de este punto hacen referencia exclusivamente a resultados obtenidos de ratones 116C-NOD.

### 3. ESTUDIO DEL INFILTRADO PANCREÁTICO

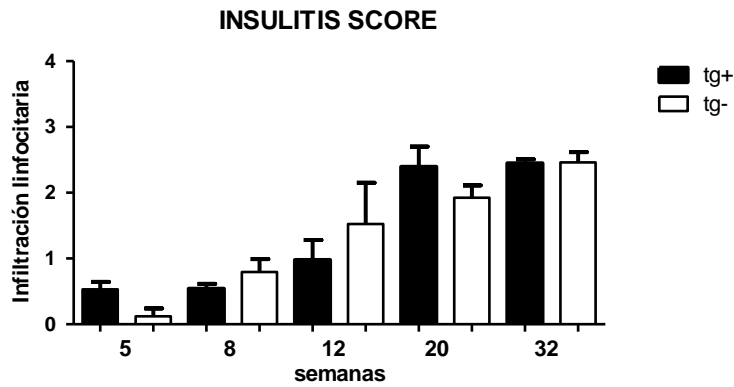
#### 4.1. Grado de Infiltración en islotes pancreáticos: “*insulitis score*” en ratones 116C-NOD

El grado de infiltración insular o “*insulitis score*” marca el nivel de afectación que tienen los islotes pancreáticos. Para el cálculo se utiliza una numeración que va del 0 al 4, de menor a mayor afectación, respectivamente. Este número se obtiene después de analizar un mínimo de 20 islotes. Cuanto mayor sea el número obtenido mayor es el nivel de afectación (figura 9).



**Figura 9:** Tinciones de hematoxilina /eosina de secciones de 5  $\mu\text{m}$  de páncreas de ratones NOD. En las imágenes se pueden observar diferentes grados de infiltración: A) un islote sin infiltrar (grado 0 de *insulitis score*), B) un islote con peri-insulitis (grado 1 de *insulitis score*); C) islote con insulitis moderada (grado 2 de *insulitis score*); D) islote con infiltración moderada-severa (grado 3 de *insulitis score*); E) islote totalmente infiltrado (grado 4 de *insulitis score*).

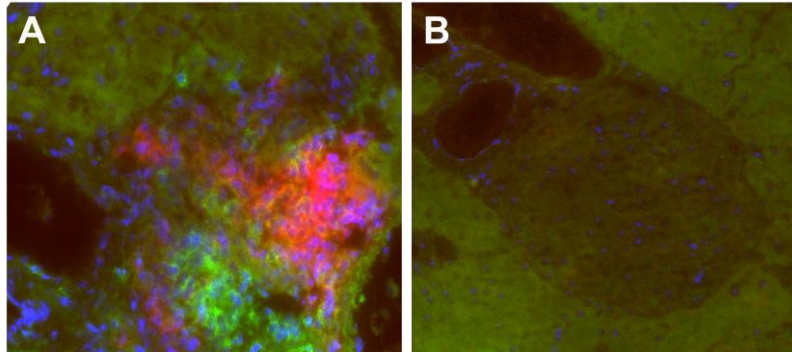
Según este criterio se evaluó la *insulitis score* a lo largo del tiempo de evolución de la enfermedad en ratones transgénicos y no transgénicos (figura 10). El resultado muestra una tendencia ascendente de infiltración de los islotes pancreáticos en ambos tipos de ratones, aunque en los ratones 116C-NOD la insulitis se inicia antes, pero a partir de ahí parece evolucionar más lentamente hasta etapas más evolucionadas de la enfermedad donde el grado de insulitis es similar en ambos grupos.



**Figura 10:** Infiltración insular (*insulitis score*) en ratones hembra 116C-NOD y no transgénicos *littermates*. Los resultados hacen referencia a 3 ratones por grupo. La diferencia más importante se observa en el grupo de 5 semanas de vida aunque esta no es significativa ( $p=0.06$ )

#### 4.2. Estudio fenotípico del infiltrado de islotes pancreáticos en ratones 116C-NOD.

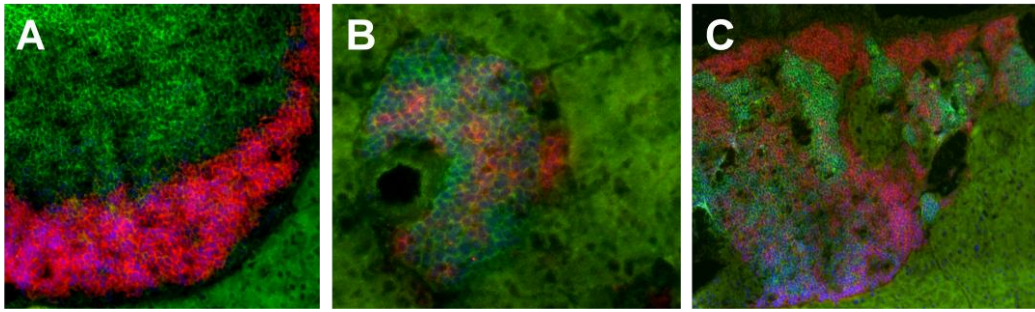
Para valorar a nivel cualitativo las características del infiltrado, se hicieron tinciones histológicas sobre páncreas utilizando anticuerpos para marcar específicamente linfocitos B y linfocitos T (figura 11). Los estudios indican que la presencia de un mayor infiltrado de linfocitos T y B (en mayor número) en las primeras semanas de vida en los ratones 116C-NOD, comparado con ratones no transgénicos *littermates*.



**Figura 11:** Tinciones de inmunofluorescencia sobre secciones de tejido pancreático. Se han utilizado tejidos de ratones transgénicos 116C-NOD y no transgénicos *littermates* de 5 semanas de vida, en los que se han marcado los linfocitos B (rojo), los linfocitos T (verde) y los núcleos con DAPI.

Por otro lado se hicieron tinciones con tejido de ratón 116-NOD a las 12 semanas de edad sobre nódulo linfático y páncreas. En este último, se puede observar como el infiltrado puede distribuirse de forma homogénea a lo largo del islote o puede adquirir una distribución preferencial, situándose los linfocitos T y B por zonas (figura 12)





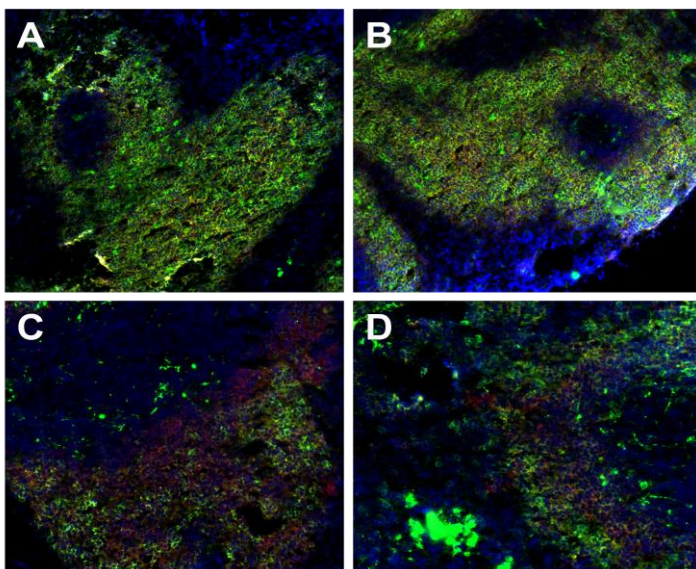
**Figura 12:** Tinciones de nódulo linfático y páncreas de ratones transgénicos de 12 semanas de vida. A, tinción sobre nódulo linfático. B y C tinciones sobre tejido pancreático. Se han marcado linfocitos B en rojo, linfocitos T en verde y los núcleos en azul. A y B han sido tomadas a 20 aumentos y C a 10 aumentos.

## 5. ANÁLISIS DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN BAZO DE RATONES 116C-NOD

Para profundizar en el estudio de los linfocitos B de los ratones 116C-NOD transgénicos, se realizaron tinciones histológicas y estudios de subpoblaciones de linfocitos B por citometría de flujo de bazo utilizando ratones de edades comprendidas entre 5 y 32 semanas.

### 5.1. Distribución de los linfocitos B en bazo de ratones transgénicos 116C-NOD.

La expresión de los transgenes produce la prácticamente la total exclusión alélica de los genes endógenos de las inmunoglobulinas en los linfocitos B de los ratones 116C-NOD transgénicos. Este ya lo habíamos comprobado mediante citometría en las tres líneas de ratones generadas. Como complemento a estos estudios a los que se hace referencia y utilizando sólo la Línea C se hicieron tinciones histológicas con anticuerpos específicos sobre tejido de bazo de ratón transgénico y *littermate*. Tal y como cabría esperar, los linfocitos B IgM<sup>a</sup> de la Línea C se distribuyen de forma homogénea a lo largo de toda la zona folicular, zona B del bazo (figura 13). Sin embargo, en los ratones no transgénicos la distribución de los linfocitos IgM<sup>b</sup> parece limitada a dos zonas: zona interfase T-B y sobre todo zona marginal.

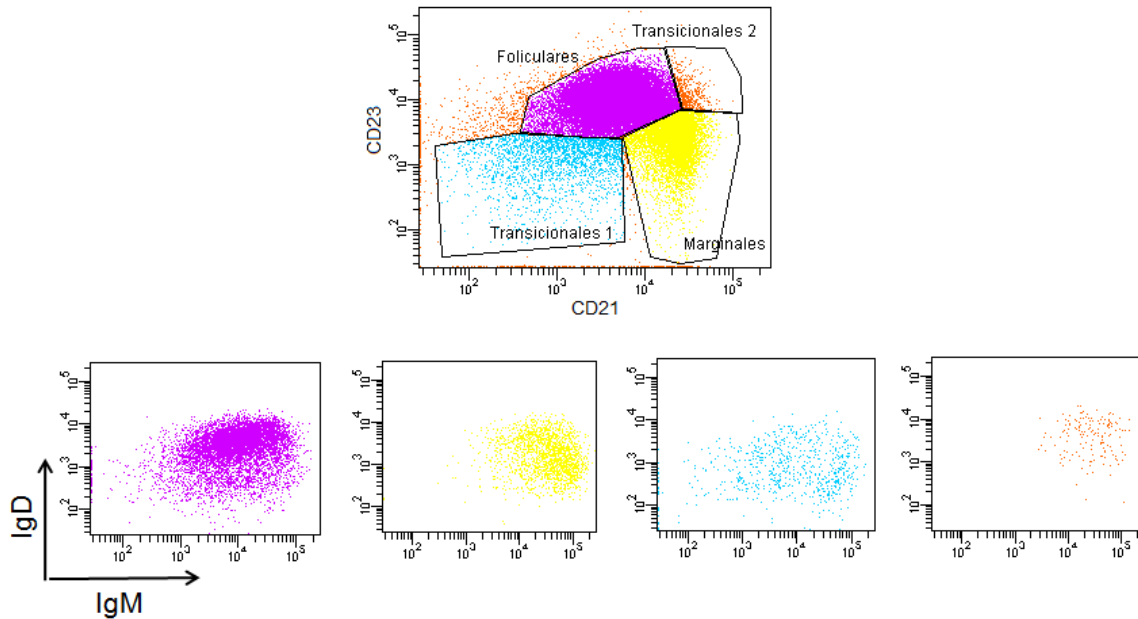


**Figura 13:** Tinción sobre bazo de ratones hembras 116C-NOD y ratones no transgénicos *littermates* de 12 semanas de vida donde se puede observar la diferente distribución de linfocitos B IgM. En las imágenes de la parte superior (A y B) se muestra la tinción sobre bazo de un ratón 116C-NOD transgénico utilizando anticuerpos anti-CD19 (rojo), anti-IgM<sup>a</sup> (verde) y tinción nuclear con DAPI. En las imágenes de la parte inferior (C y D) se ha realizado la misma tinción de un bazo de un ratón *littermate* pero utilizando en este caso el anticuerpo anti-IgM<sup>b</sup> (verde)

## 5.2. Linfocitos B Foliculares, de Zona Marginal y estadios T1 y T2

Para llevar a cabo el análisis de estas subpoblaciones por citometria de flujo, los linfocitos B fueron seleccionadas en primer lugar por la expresión de CD19 y después en base a la expresión de los marcadores CD21 y CD23. Por último, se evaluaron las células según los niveles de expresión de la inmunoglobulina de membrana IgM e IgD (figura 14).

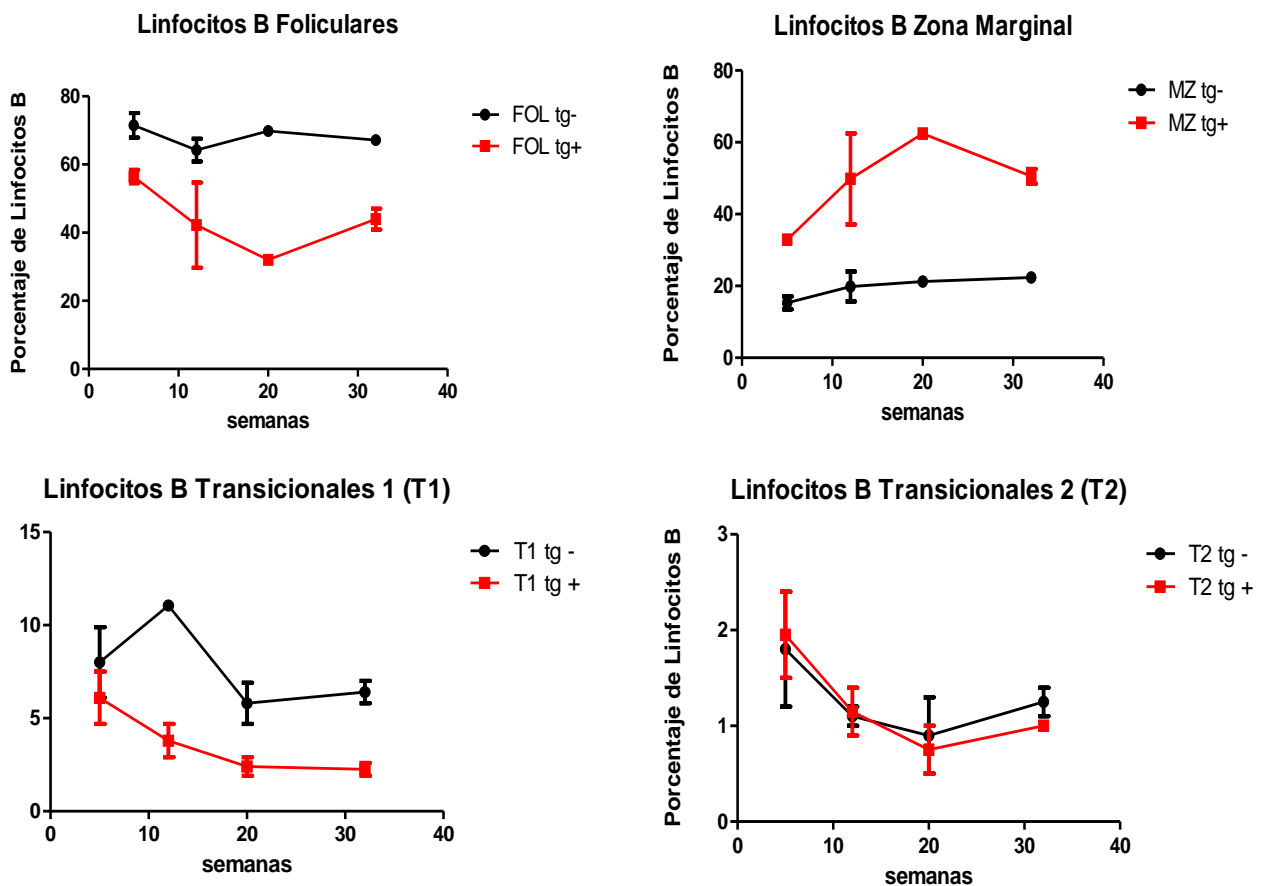
Utilizando estos marcadores también se pudieron analizar las poblaciones de linfocitos B de los estadios transicionales, T1 y T2.



**Figura 14:** Esquema que ilustra cómo se analizaron las diferentes subpoblaciones de linfocitos B en base a la expresión de los marcadores CD21, CD23, IgM e IgD. La imagen superior muestra la distribución de las subpoblaciones: Foliculares (lila), Marginales (amarillo), T1 (azul) y T2 (naranja) en base a la expresión de CD21 y CD23. En las imágenes de la parte inferior se muestran los niveles de expresión de IgM e IgD para cada uno de los subtipos mostrados.

Tal y como se muestra en la figura 15, los resultados indicaron la presencia de un aumento significativo de los linfocitos B de la Zona marginal, y un descenso también significativo de los linfocitos B foliculares y transiciones T1 en los ratones transgénicos respecto a los *littermates*.



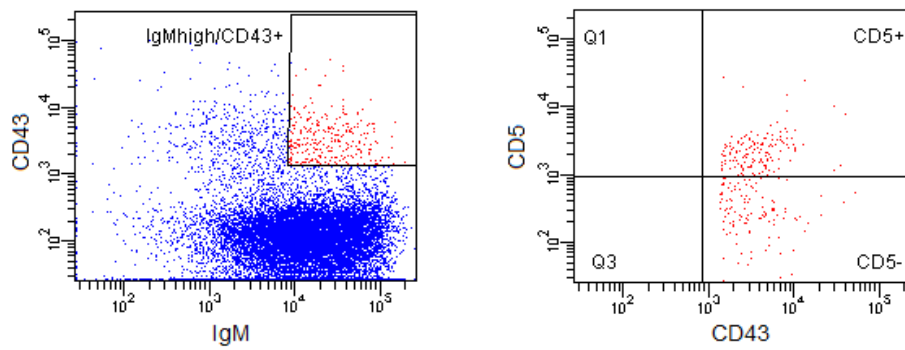


**Figura 15:** Evolución a lo largo del tiempo de las subpoblaciones de linfocitos B Foliculares, Zona Marginal, T1 y T2. Los linfocitos B de los ratones transgénicos están marcados en rojo y los linfocitos B de ratones *littermates* en negro. Destacan el aumento de linfocitos B de Zona Marginal así como la disminución de linfocitos Foliculares y de estadio transicional T1. Cada punto representa la media (con la desviación estándar) de tres animales.

Además de las subpoblaciones mayoritarias de linfocitos B maduros presentes en el bazo, se analizaron otras subpoblaciones de linfocitos B, que aunque son minoritarias, eran importantes a tener en cuenta desde el punto de vista de su funcionalidad biológica. Tal es el caso de los linfocitos B1 (B1a y B1b), los linfocitos B10 y las células plasmáticas.

### 5.3. Análisis de los linfocitos B1a y B1b

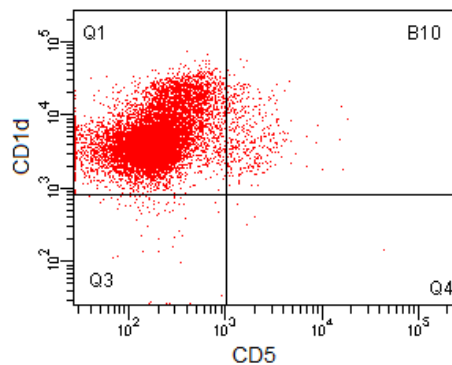
El esquema siguiente muestra como se analizaron estas subpoblaciones mediante citometría de flujo. En primer lugar, los linfocitos B fueron seleccionados desde el área de linfocitos a través del marcador CD19. De los que eran CD19+, fueron seleccionados aquellos que presentaban el marcador CD43 y altos niveles de IgM. Finalmente, fueron clasificados en dos categorías según la expresión de CD5: por un lado los linfocitos B1a aquellos que fueron CD5<sup>+</sup>; y por otro, los B1b los que fueron CD5<sup>-</sup> (figura 16). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1



**Figura 16:** Esquema que ilustra cómo se analizaron las subpoblaciones de linfocitos B B1. Se utilizaron como marcadores las moléculas CD43, IgM y CD5 para definir los linfocitos B1a (CD5+) o B1b (CD5-).

#### 5.4. Análisis de linfocitos B10

Se ha propuesto que la población de linfocitos B CD5<sup>+</sup>, CD1d<sup>+</sup>, productores de IL-10 tendrían funciones inmunoregulatoras (conocidos también como linfocitos B10). Esta población se analizó en base a la presencia en membrana de linfocitos B de los marcadores CD5 y CD1d (figura 17). Para ello, igual que se hizo con la población de células del tipo B1, previamente fueron seleccionadas las células a través del marcaje de CD19. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1.



**Figura 17:** Análisis de linfocitos B10. Los linfocitos B10 se situarían en el cuadrante superior derecho.

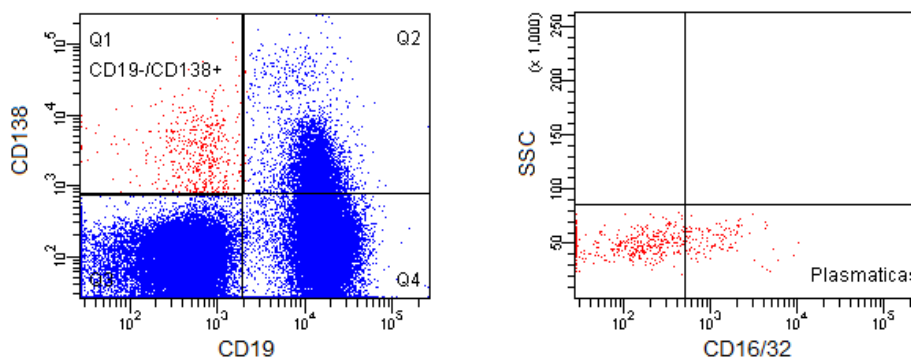
		Porcentaje de linfocitos B		
		B1a	B1b	B10
116C-NOD	<b>5 semanas</b>	0.15	0.76	1.1
<i>littermate</i>		0.34	1.2	3.1
116C-NOD	<b>12 semanas</b>	0.15	0.475	0.75
<i>littermate</i>		0.185	1.365	1.95
116C-NOD	<b>20 semanas</b>	0.1	0.52	1
<i>littermate</i>		0.11	0.8	1.45
116C-NOD	<b>32 semanas</b>	0.06	0.52	0.9
<i>littermate</i>		0.08	0.85	2.1

**Tabla 1:** Resumen de los resultados obtenidos de las subpoblaciones de linfocitos B1 y B10 a lo largo del tiempo comparando ratones transgénicos y no transgénicos.

En general, los linfocitos B1a muestran una proporción casi idéntica entre ratones 116C-NOD y sus respectivos *littermates*. Los linfocitos B1b sí muestran un descenso pero este no es significativo. Por otro lado, sí es significativo el descenso de linfocitos B10, mostrándose en los ratones 116C-NOD de forma estable a lo largo del periodo de vida estudiado

### 5.5. Análisis de Células Plasmáticas

Otras dos poblaciones celulares que se analizaron en bazo fueron la de las células plasmáticas y la de las células plasmacitoides. Para analizar la población de células plasmáticas se tuvo que recurrir a un proceso de conteo indirecto ya que estas no presentan el marcador CD19. Así, se analizó la presencia en membrana de esplenocitos de los marcadores CD138 (syndecan-1) y CD16/32 (FcγRII), para así identificar a las células plasmáticas (CD19<sup>-</sup>) y las plasmacitoides (CD19<sup>+</sup>) (figura 18). Para obtener el número de células plasmáticas se dividieron las células CD16/32 positivas entre el total resultante del conteo indirecto. Los resultados se resumen en la tabla 2.



**Figura 18:** Esquema que ilustra cómo se analizaron las células plasmáticas. Se consideraron plasmáticas aquellas células CD19<sup>-</sup> pero con marcadores de membrana CD138 y CD16/32 positivos.

		<b>Porcentaje células plasmáticas</b>
116C-NOD	<b>5 semanas</b>	0.82
<i>littermate</i>		0.59
116C-NOD	<b>12 semanas</b>	0.48
<i>littermate</i>		0.76
116C-NOD	<b>20 semanas</b>	0.4
<i>littermate</i>		0.37
116C-NOD	<b>32 semanas</b>	0.45
<i>littermate</i>		1.21

**Tabla 2:** Resumen de los porcentajes obtenidos de células plasmáticas a lo largo del tiempo comparando ratones transgénicos y no transgénicos 116C-NOD.

Tal como muestran los resultados de la tabla 2, las diferencias entre los grupos son muy pequeñas y más teniendo en cuenta que los porcentajes celulares se sitúan en casi todos los casos por debajo del 1%. Sin embargo, hay que destacar que a la edad de 32 semanas es donde se observó la diferencia más importante, con un porcentaje mayor el *littermates*.

## 6. ESTUDIOS *IN VITRO* DE LINFOCITOS B 116C-NOD

### 6.1. Proliferación celular

Para profundizar en el papel que podían tener los linfocitos B “transgénicos” en la enfermedad, en ratones 116C-NOD, se hicieron estudios funcionales *in vitro*. Lo primero que se realizó fue estudios de proliferación de linfocitos B utilizando estímulos policlonales. La proliferación se midió en base a la incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{[H]}\text{-TdR}$ ) a las 48 horas post-estimulación.

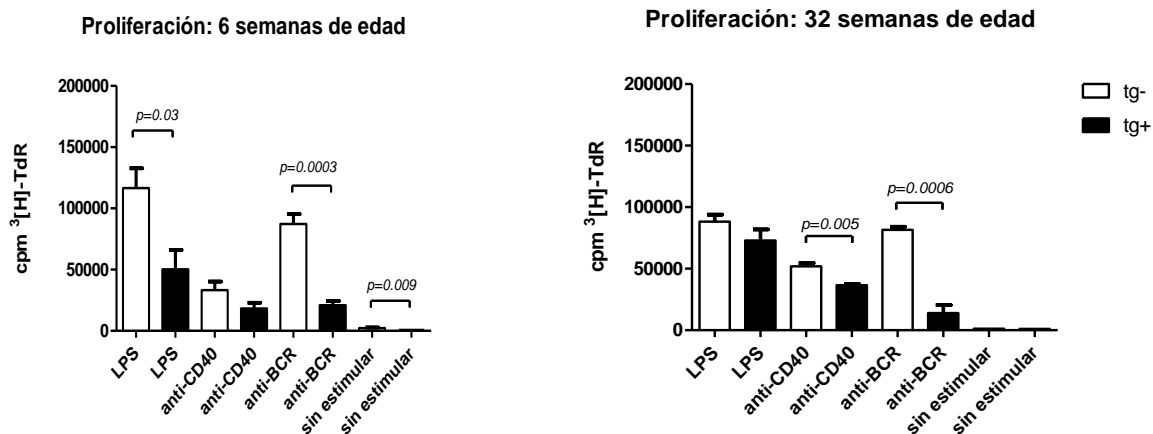
Los estímulos elegidos fueron el Lipopolisacárido (LPS) que simularía la estimulación policlonal a través de los receptores tipo “*Toll-like Receptor*” (TLR), estimulación mediante un anticuerpo monoclonal anti-CD40 + IL-4 que simularía la estimulación a través de la célula T y la estimulación directa del BCR mediante un anticuerpo contra la cadena  $\mu$  del BCR.

Los estudios de proliferación se realizaron a las 6 semanas y a las 32 semanas de edad, para así poder observar si había diferencias en la respuesta al inicio de la enfermedad o bien cuando ya se ha mostrado resistencia a ella (los ratones de 32 semanas raramente desarrollan diabetes clínica).

Para realizar este procedimiento, previamente los linfocitos B fueron purificados y seleccionados utilizando selección negativa, con el objetivo de que los linfocitos B no sufrieran ninguna alteración.

Los resultados obtenidos muestran que frente a los tres estímulos estudiados hay un descenso de proliferación de los linfocitos B de los ratones 116C-NOD transgénicos respecto a los de ratones no transgénicos *littermates* tanto a las 6 semanas como a las 32 semanas de vida (figura 19). Las mayores diferencias se observaron cuando los linfocitos fueron estimulados a través del BCR en ambos grupos de edad, observándose una disminución significativa de la proliferación de los linfocitos B de los ratones transgénicos tanto a las 6 semanas de edad ( $p=0.0003$ ) como a las 32 semanas de edad ( $p=0.0006$ ). También se observó una disminución de la proliferación a la estimulación a través de CD40 en los linfocitos B de los ratones 116C-NOD, tanto a las seis como a las 32 semanas de vida, aunque esta diferencia solo fue significativa en el último caso ( $p=0.005$ ).

Por último, también se observó una disminución de la proliferación al estímulo con LPS en linfocitos B de ratones 116C-NOD en ambas edades, aunque estas diferencias solo fueron significativas a las 6 semanas de edad ( $p=0.03$ ). Curiosamente, en el grupo de 6 semanas de edad se observó un descenso significativo de proliferación en linfocitos B de ratones 116C-NOD en ausencia de estímulo dando pie a pensar que estas células se encuentran en un nivel basal más bajo de respuesta. Esta diferencia no se observó en el grupo de 32 semanas en el cual las medias de proliferación en ambos grupos fueron muy parecidas (1200 cpm en linfocitos B de ratones NOD frente a 1000 cpm en linfocitos B de ratones 116C-NOD).



**Figura 19:** Proliferación de los linfocitos B tras estimulación con diversos estímulos. Las proliferaciones fueron consideradas en base a las cuentas por minuto (cpm) resultante de incorporación de timidina tritiada por las células. Estudio realizado con ratones 116C.NOD yno transgénicos *littermates* de 6 y 32 semanas edad (tres animales por grupo y edad).

## 6.2. Producción de citoquinas

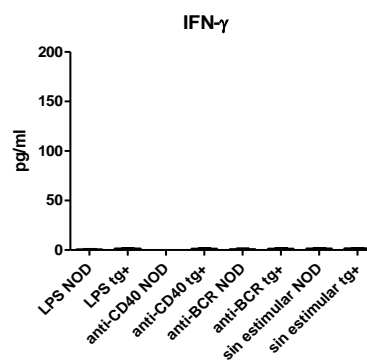
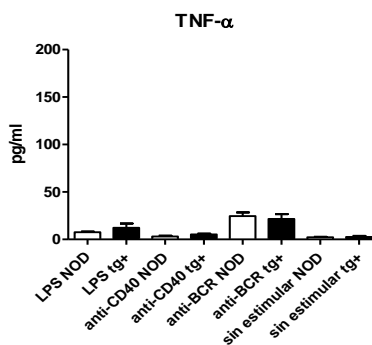
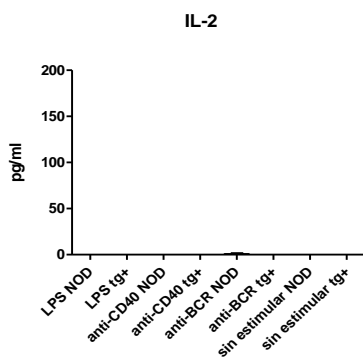
Antes de añadir la timidina tritiada a los cultivos de linfocitos B (16 horas antes de la medición de la proliferación), se recuperó una parte del sobrenadante para analizar en él, la presencia de citoquinas (ver material y métodos).

Se analizaron citoquinas de respuesta Th1, Th2 y Th17 mediante CBA. De la respuesta de tipo Th1 se analizaron las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. De la respuesta de tipo Th2 se analizaron las citoquinas IL-4, IL-6 e IL-10. Además, la IL-10, es también una citoquina propia de linfocitos con funciones reguladoras (supresoras) tipo Treg y Th3, y de linfocitos B reguladores (B10). Por último, de la respuesta de tipo Th17, la citoquina IL-17 (figura 20).

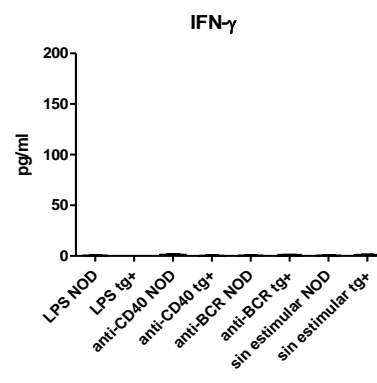
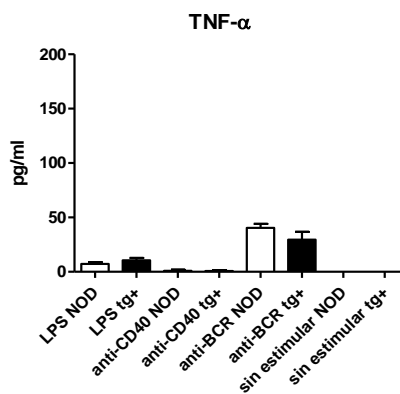
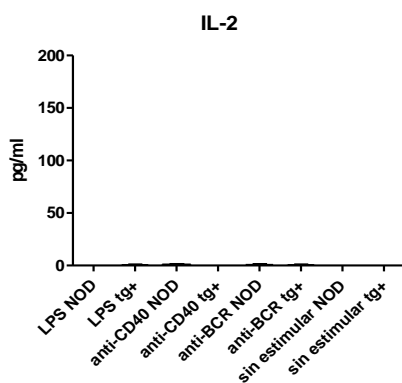
Tras analizar los resultados y comparar las diferentes citoquinas únicamente se observaron diferencias significativas en la producción de IL-10 (más baja producción de IL-10 en ratones 116C-NOD tanto a las 6 semanas como a las 32 semanas). Del resto de citoquinas no se observaron diferencias significativas, si bien en el caso de la IL-6 sí se observó una tendencia a una mayor producción en ratones 116C-NOD transgénicos de 32 semanas de edad tras el estímulo con LPS. Por otro lado cabe destacar que fueron relevantes los niveles de producción de TNF- $\alpha$  al estímulo con LPS y con la estimulación directa del BCR mediante un anticuerpo contra la cadena  $\mu$  del BCR, en ambos grupos de ratones tanto a las 6 semanas como a las 32 semanas, pero sin que se observen diferencias significativas entre ellos. También se detectó, un ligero incremento, aunque no significativo, de producción de IL-4 al estímulo con la estimulación directa del BCR en ratones no transgénicos *littermates* pero solo a las seis semanas de vida. Finalmente, observamos la presencia en el sobrenadante de niveles muy bajos de IFN- $\gamma$  e IL-17 tanto en ratones 116C-NOD como no transgénicos *littermates*, con valores similares en presencia y ausencia de estímulo, por lo que sugiere que este contenido podría deberse a su presencia previa en el propio medio de cultivo.

## Citoquinas de respuesta tipo Th1:

6 semanas

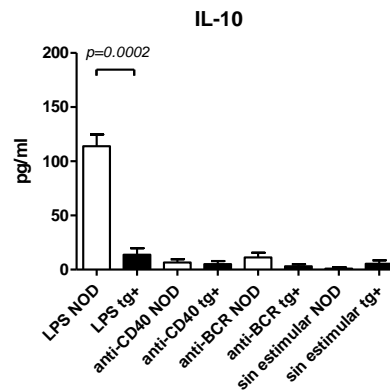
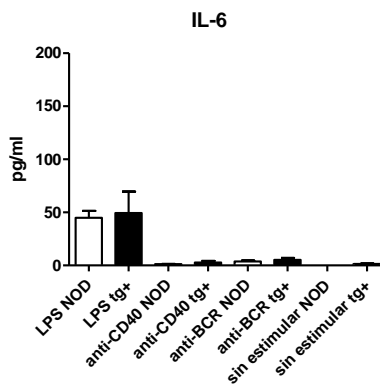
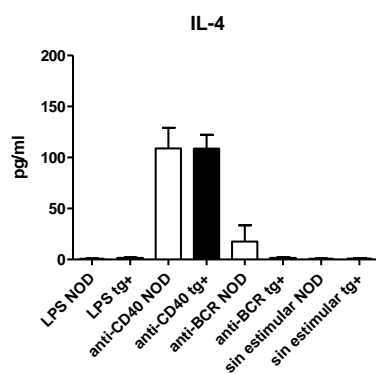


32 semanas

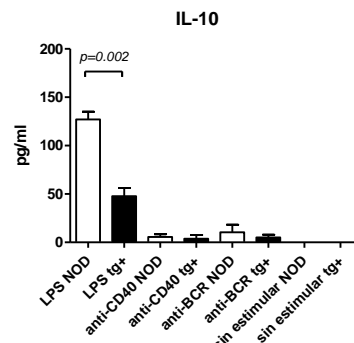
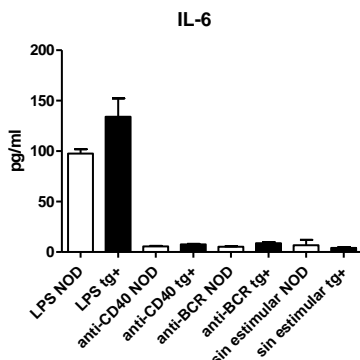
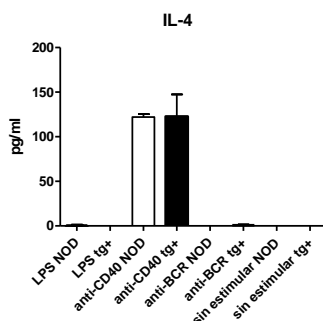


## Citoquinas de respuesta tipo Th2:

6 semanas

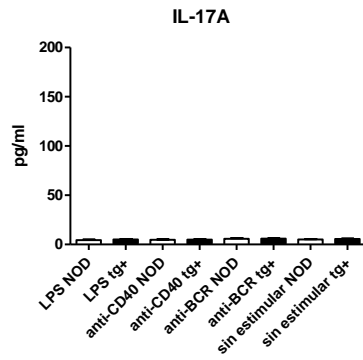


32 semanas

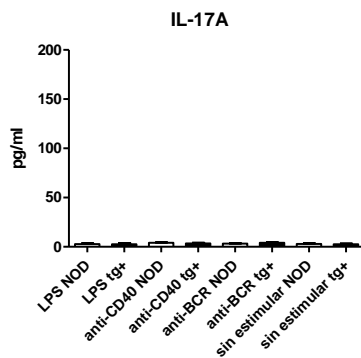


## Citoquinas de respuesta tipo Th17:

6 semanas



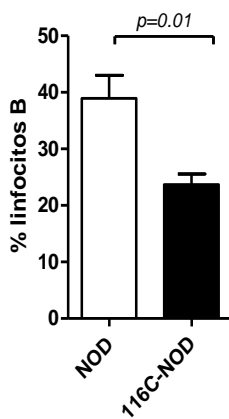
32 semanas



**Figura 20:** Producción de citoquinas *in vitro* tras estimulación de linfocitos B. Producción de citoquinas agrupadas según el tipo de respuesta (Th1, Th2 o Th17) comparando los niveles producidos de cada una de ellas a las 6 y 32 semanas por linfocitos B de bazo de ratones 116C.NOD transgénicos (barras negras) y no transgénicos *littermates* (barras blancas).

## 7. TOLERANCIA CENTRAL Y PERIFÉRICA DE LINFOCITOS B EN RATONES 116C-NOD

Una observación derivada de los estudios de proliferación, indicaba que había un descenso en el número relativo de linfocitos B en los bazos de ratones 116C-NOD transgénicos respecto a los que habían en los ratones no transgénicos *littermates*. (figura 21)



**Figura 21:** Porcentaje de linfocitos B transgénicos 116C-NOD, respecto al porcentaje de linfocitos B de ratones no transgénicos *littermates* a las 6 semanas de vida. Resultado obtenido de 4 experimentos diferentes.

Este hecho nos sugirió que podía estar teniendo lugar un mecanismo de presión selectiva que, bien a nivel periférico y/o bien a nivel central, estuviera mermando el número de linfocitos B a nivel periférico en ratones 116C-NOD transgénicos.

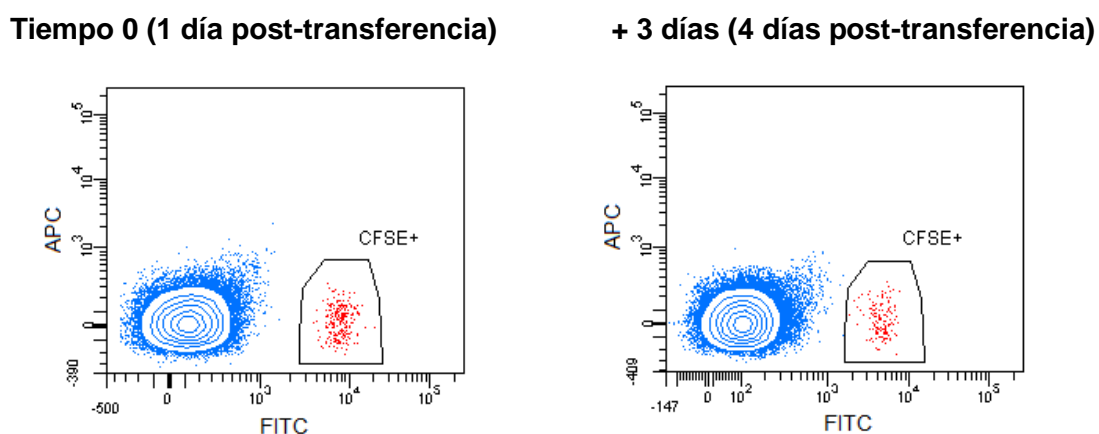
### 7.1. Estudios de tolerancia periférica: Vida Media

Para comprobar si la presión selectiva podía estar ocurriendo a nivel periférico y ver si esta reducción era debida a un proceso de eliminación a través de anergia periférica, se llevaron a cabo experimentos de vida media periférica mediante transferencia de linfocitos B de ratones 116C-NOD y no transgénicos *littermates* a ratones NOD receptores.

Para poder comparar la vida media de los linfocitos B “transgénicos” con la del los “no transgénicos”, utilizando las mismas condiciones experimentales, y poder realizar su posterior seguimiento *in vivo*, estos se marcaron con CFSE antes de su transferencia.

Antes de llevar a cabo estos experimentos de transferencia de linfocitos B de forma conjunta (linfocitos B “transgénicos” y “no transgénicos”), se realizaron experimentos para determinar la vida media de linfocitos B de bazo cuando son sometidos al proceso de purificación por selección negativa y marcaje posterior con CFSE. Observamos que el marcaje con CFSE adquirido por los linfocitos B perdía intensidad a medida que pasaban los días. Por ello, los análisis se realizaron los días uno y cuatro post-transferencia, y no más adelante para evitar errores.

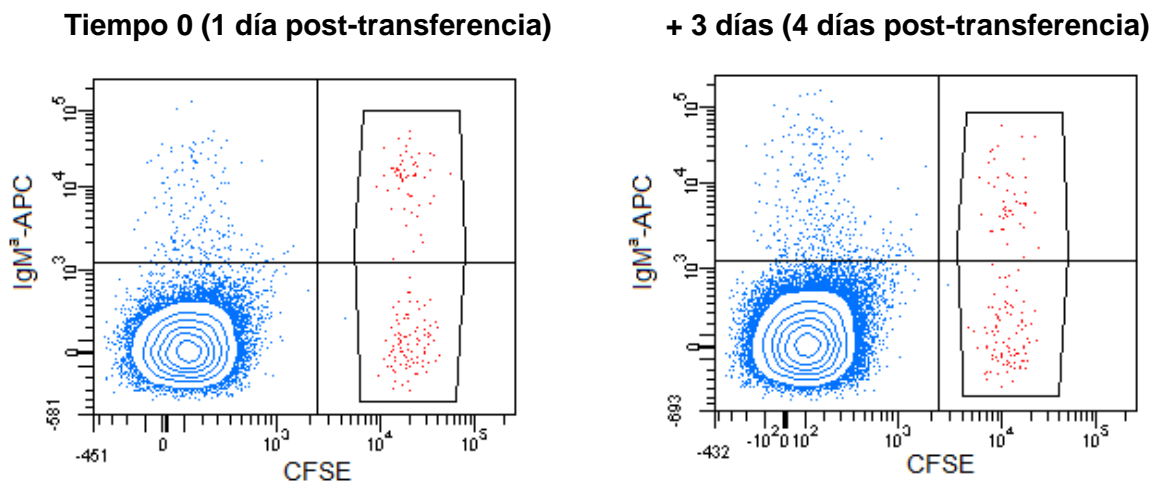
Se observó que en estas condiciones experimentales, la vida media de los linfocitos B de bazo de ratones NOD transferidos, que migraban al bazo del ratón NOD receptor, bajaba de un 100% al 56,5% cuatro días post-transferencia, estableciendo como punto inicial, o tiempo 0, el primer día post-transferencia celular y considerando como 100% el número total de células transferidas a tiempo 0 (figura 22).



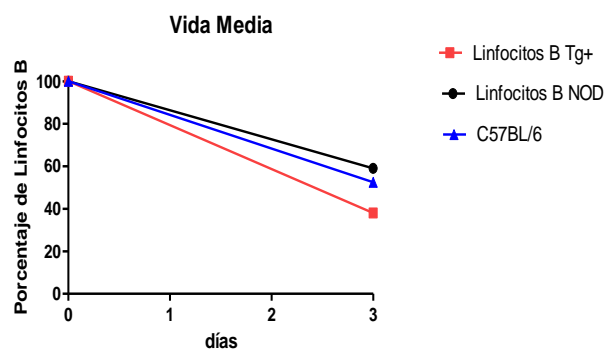
**Figura 22:** Análisis del porcentaje de linfocitos B de ratón NOD *littermates* marcados con CFSE, en bazo de ratones NOD receptores. Tanto donantes como receptores de 5 semanas de vida. A la izquierda se muestran los linfocitos a tiempo 0. A la derecha, se muestran los linfocitos 4 días post-transplante (3 días respecto del tiempo 0). Figura representativa de 2 a 4 experimentos por cada punto temporal de análisis.



Una vez valorada la vida media en linfocitos B de ratones NOD en las condiciones experimentales expuestas, siguiendo la misma metodología, pasamos a analizar la vida media de los linfocitos B del ratón 116C-NOD transgénico en un experimento que incluía la combinación de linfocitos B transgénicos y linfocitos B no transgénicos (figura 23), es decir donde transferimos simultáneamente linfocitos B de ratones 116C-NOD y de ratones NOD no transgénicos *littermates* en ratones NOD receptores. El resultado mostró que los linfocitos B de ratones 116C-NOD tienen una vida media inferior a la vida media de los ratones NOD no transgénicos *littermates*. En este caso la vida media de los linfocitos B de ratones 116C-NOD transgénicos se situaba, a los 4 días post-transferencia, en el 38%, mientras que los linfocitos B de los ratones no transgénicos *littermates*, era del 59%(valor muy similar al obtenido cuando fueron transferidos solos). Según estos datos la vida de los linfocitos B “transgénicos” estaría sobre unos 2,5 días mientras que la vida media de los linfocitos “no transgénicos” se situaría en torno a los 3,6 días (figura 24).



**Figura 23:** Transferencia conjunta de linfocitos B de ratones 116C-NOD transgénicos y NOD no transgénicos *littermates*. Gracias al marcaje de las células con CFSE, los linfocitos B de los ratones donantes se pueden diferenciar de los linfocitos B de los ratones receptores. Los linfocitos B “transgénicos” se pueden diferenciar de los linfocitos de ratón NOD *littermate* no transgénico porque expresan en membrana la IgM<sup>a</sup> (marcado aquí con APC). Figura representativa de 2 a 4 experimentos por cada punto temporal de análisis. Ratones de 5 semanas de edad tanto en ratones donantes como receptores.



**Figura 24:** Vida media de linfocitos B. Gráfico comparativo entre la vida media de linfocitos B transgénicos, no transgénicos y C57BL/6. Mientras que los linfocitos B de ratones transgénicos tienen una vida media de 2,5 días, los de NOD y C57 se sitúan en torno a los 3,6 y 3,4 días respectivamente.

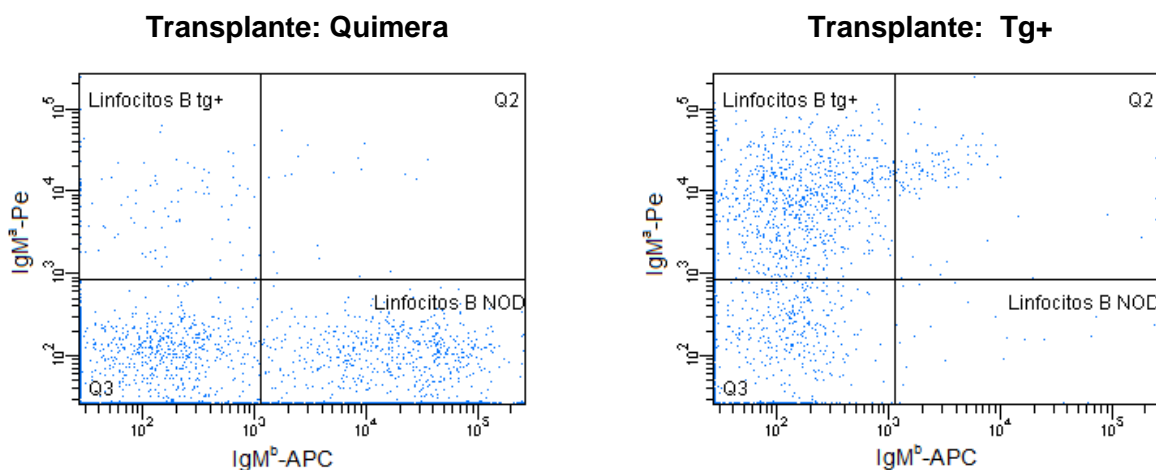
## 7.2. Estudios de tolerancia central: Ratones quimera

Para comprobar si la pérdida de linfocitos B se debía quizás a la selección negativa a nivel central, se llevaron a cabo estudios de maduración de linfocitos B, mediante trasplantes de médula ósea produciendo ratones NOD receptores quimera con el 50% de médula ósea procedente de ratón 116C-NOD transgénico y el 50% de médula ósea procedente de ratón NOD no transgénico *littermate*.

Como receptores se utilizaron ratones NOD de 5 semanas de edad que fueron irradiados con dosis letal de radiación gamma (8 Gy) para asegurar la ablación total de las células hematopoyéticas de su médula.

Para verificar que la médula ósea de los ratones 116C-NOD transgénicos producía un buen injerto y que se había producido una ablación total de los ratones receptores, se hicieron trasplantes con médula ósea procedente exclusivamente de ratones 116C-NOD transgénicos.

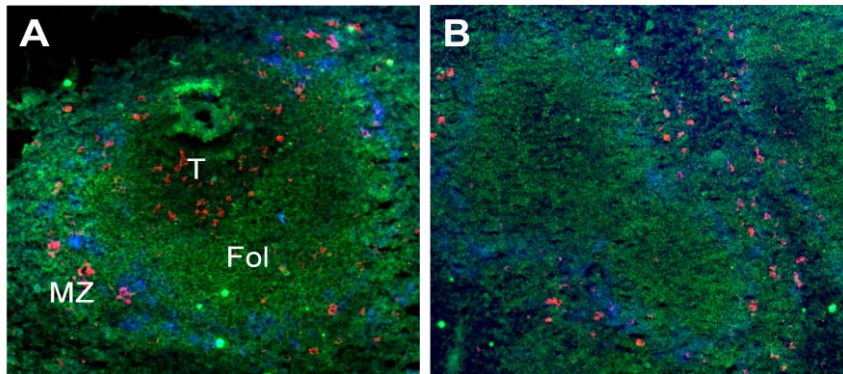
A los 30 días de la realización del trasplante se sacrificaron los ratones y se analizó el número de linfocitos B procedentes de la médula ósea de ratones 116C-NOD, y de los ratones NOD no transgénicos *littermates*. Se observó que prácticamente la mayor parte de los linfocitos B procedían de la médula ósea de ratón NOD (figura 25). En términos de porcentajes, del total de linfocitos B, los procedentes de médula ósea de ratón NOD no transgénico *littermate* suponían un 88,28%, frente a un 11,72% de linfocitos procedentes del ratón 116C-NOD transgénico (medias procedentes de un total de 4 experimentos).



**Figura 25:** Transplante de Médula ósea a ratones NOD receptores. En la figura de la izquierda se muestra el análisis de los linfocitos B del bazo procedente de ratones transplantados con médula ósea procedente de ratones transgénicos 116C-NOD y NOD no transgénicos *littermates* al 50%. Los linfocitos B "transgénicos" están marcados en Pe, mientras que los linfocitos B "no transgénicos" están marcados en en. En la figura de la derecha se muestra el análisis de los linfocitos B del bazo procedente de ratones transplantados exclusivamente con médula ósea de ratón 116C-NOD transgénico.

Para analizar la distribución en la pulpa blanca de los linfocitos B generados a partir de la médula ósea de ratones 116C-NOD transgénicos, se hicieron tinciones sobre los bazos de los ratones

quimera. El resultado mostró que los linfocitos “transgénicos” se ubicaban preferentemente en la Zona Marginal y dentro de la Zona-T, aunque también se observan que hay algunos en la zona folicular, estos últimos con una expresión (marcaje) más débil de la IgM de membrana (figura 26).



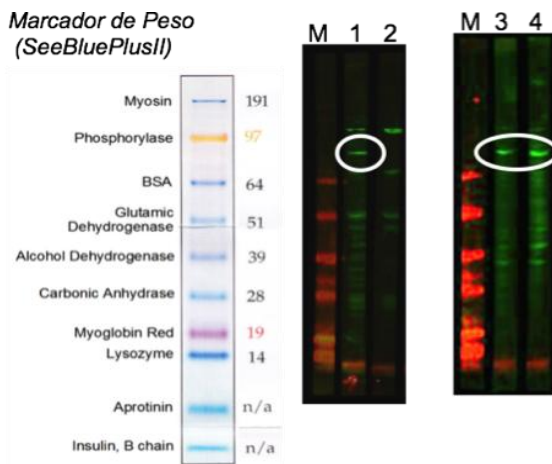
**Figura 26:** Distribución de linfocitos B 116C-NOD en ratones quimera. En las figuras, se muestran varios folículos de bazo en los cuales se han teñido los linfocitos transgénicos en rojo. Además se han teñido los linfocitos B en verde y los macrófagos metalofílicos en azul. Estos últimos permiten diferenciar entre la zona folicular y la zona marginal. Como se puede observar, los linfocitos 116C-NOD se encuentran mayoritariamente en la zona marginal y en la zona T. MZ, zona marginal. Fol, zona folicular. T, zona

## 8. APROXIMACION A LA IDENTIFICACION DEL RECONOCIDO POR EL AcMoH116

### 8.1. Identificación de VCP

#### 8.1.1. Reconocimiento de VCP mediante Western-Blot en geles 1D y 2D

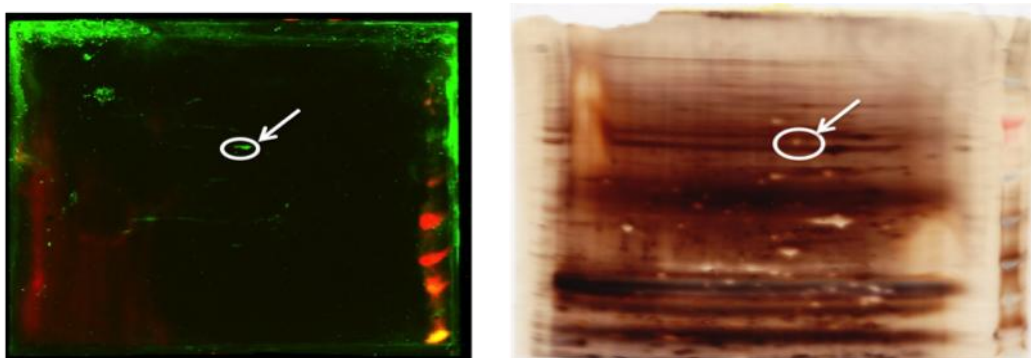
Para identificar el antígeno reconocido por el anticuerpo H116 utilizamos distintas aproximaciones de la metodología de proteómica. Para ello, se utilizó como fuente antigénica extractos proteicos obtenidos de islotes purificados o bien extracto proteico procedente de la línea de insulinooma murino Nit-1. Con estos extractos se realizaron electroforesis en geles de una dimensión y posterior transferencia proteica a membrana de nitrocelulosa para realizar el *Western-Blot* con el anticuerpo purificado producido por el hibridoma o bien por el suero de ratón transgénico (figura 27).



**Figura 27:** Identificación del antígeno mediante *Western-Blot*. Carril 1 y carril 4, marcaje con AcMo116. Carril 2, Control de secundario (Streptavidina). Carril 3, marcaje con suero de ratón transgénico (dilución 1/10). Se ha señalado con una elipse la banda que es reconocida.

Se observó que había reconocimiento de una proteína de unos 90 KDa. A continuación se procedió a realizar la electroforesis en geles de dos dimensiones (2-D), que consiste en la realización de dos electroforesis consecutivas, la primera de ellas, separa las proteínas según su punto isoeléctrico y la segunda por su peso molecular.

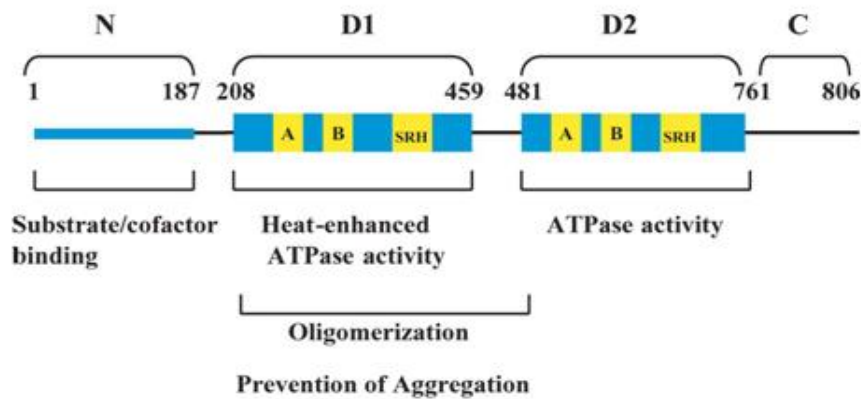
Utilizando esta técnica por duplicado y simultáneamente, se obtuvieron dos geles con un patrón de proteínas idéntico, que se utilizaron para diferentes finalidades. Uno de ellos fue utilizado para hacer la transferencia a una membrana de nitrocelulosa y posteriormente con esta realizar un *Western-Blot* con el anticuerpo H116. El segundo gel fue teñido con una tinción de plata. A continuación, con la ayuda del software informático se enfrentaron las dos imágenes obtenidas (del *Western-Blot* y de la tinción de plata) para de esta manera identificar, en el gel teñido con plata, la proteína (*spot*) reconocida específicamente por el AcMoH116 en la membrana de nitrocelulosa (figura 28)



**Figura 28:** Imágenes de geles 2D. En la imagen de la izquierda se muestra el *Western-Blot* realizado sobre la membrana de nitrocelulosa teñida con AcMoH116. En la imagen de la derecha, se muestra el gel teñido con plata. La flecha indica el punto (*spot*) de reconocimiento que coincide en ambas imágenes.

Finalmente, el *spot* fue recortado del gel teñido con plata y posteriormente fue analizado en un espectrómetro de masas. El resultado de este análisis fue la identificación de la proteína *Valosin Containin Protein* (VCP) (Figura 29). Se trata de una proteína muy conservada, ubicua y miembro de la familia de las proteínas ATPasa con actividad celular diversa. Es una chaperona que ayuda a

eliminar proteínas defectuosas generadas en el retículo endoplasmático y que se han de degradar vía ubiquitin-proteasoma.



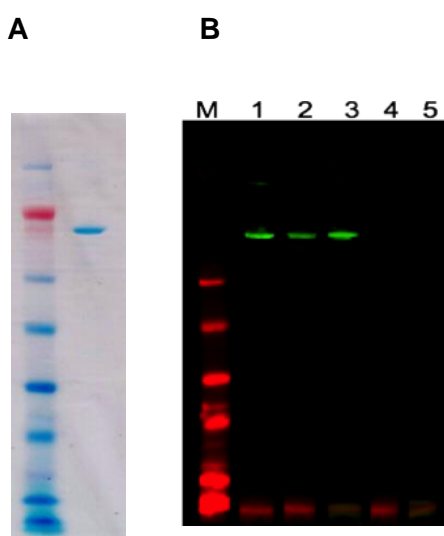
**Figura 29:** Ilustración de una de las subunidades de la proteína VCP. Funcionalmente es un hexámero formado por 6 subunidades. La energía para realizar su función la extrae del ATP.

### 8.1.2. Clonación y purificación de la VCP

Para comprobar que la VCP estaba siendo reconocida por el AcMoH116, el gen de la VCP fue clonado en el vector procariota pet21d y la proteína fue producida en las bacterias de expresión *E. coli* BI21(D3).

Para su purificación, se utilizó el “tag” de histidinas producido en conjunto con la proteína, cuya secuencia de codificación se había añadido a la secuencia de codificación de la VCP.

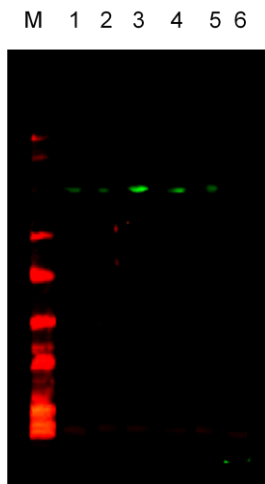
Una vez purificada la proteína se confirmó que esta era reconocida por el AcMoH116 por *Western-Blot* (figura 30). Además, se estudió la producción de anticuerpos por parte de cada una de las líneas transgénicas contra la proteína VCP.



**Figura 30:** Detección del reconocimiento de la VCP por el AcMoH116 mediante *Western-Blot*. En la imagen de la izquierda, se muestra un gel 1D teñido con *Coomassie* (A), donde se puede observar la banda de la proteína VCP una vez purificada. En la imagen de la derecha (B), se muestra un *Western-Blot* realizado con la proteína VCP purificada, y su reconocimiento por los siguientes anticuerpos: carril 1, marcaje con anticuerpo anti-histidinas; carril 2, marcaje con AcMoH116; carril 3, marcaje con anticuerpo anti-VCP comercial. En los carriles 4 y 5, se muestra el resultado de los controles de los anticuerpos secundarios (IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a/2b</sub> respectivamente).

En cuanto a los niveles de anticuerpos secretados producidos por los ratones transgénicos se observó que los ratones transgénicos 116B-NOD y 116C-NOD producían mayor cantidad que en el

ratón transgénico 116A-NOD en el cual los niveles detectados eran comparables con los niveles de anticuerpos que secretan el ratón NOD o el C57BL/6 (figura 31).



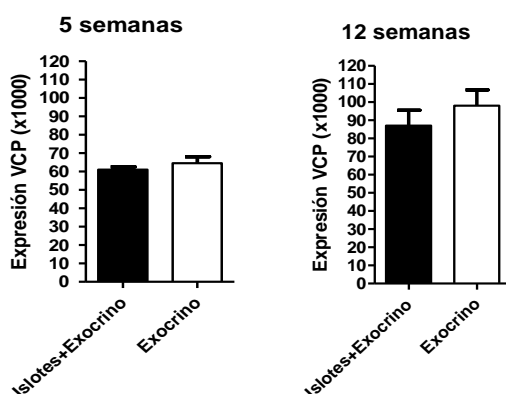
**Figura 31:** Producción de anticuerpos por las tres líneas de ratones transgénicas frente a la proteína VCP. Se ha utilizado suero de ratón de 5 semanas de edad a una dilución 1/50. Carril 1: NOD. Carril 2: 116A-NOD. Carril 3: 116B-NOD. Carril 4: 116C-NOD. Carril 5: C57BL/6. Carril 6: Control negativo, sin suero.

### 8.1.3. Nivel de expresión génica de VCP

Se había observado que la VCP se expresaba en otras líneas celulares (por ejemplo en SV-T2 o CHO). Esta observación coincidía con el hecho de que según la bibliografía se trata de una proteína ubicua. Sin embargo, las tinciones histológicas iniciales con el AcMoH116 mostraban un reconocimiento exclusivo de las células beta de los islotes pancreáticos.

Una posible explicación de este hecho podía ser que hubiera más expresión de esta proteína a nivel de islote que a nivel del tejido exocrino. Para descartar esta posibilidad se realizó el análisis a nivel de expresión génica de esta proteína utilizando la técnica de PCR a tiempo real con sondas Taqman<sup>R</sup> utilizando como muestras, cortes de tejido pancreático de ratones NOD.RAG-2<sup>-/-</sup>, de la siguiente forma: por un lado, cortes de páncreas con predominio de tejido exocrino, y por otro cortes de páncreas con una alta densidad de tejido endocrino (islotes).

El análisis fue realizado con tejido pancreático de ratones NOD.RAG-2<sup>-/-</sup> de 5 y 12 semanas de edad. Se hizo así para contemplar posibles cambios de expresión de la VCP según la edad del ratón. El resultado mostró una expresión más elevada, aunque no significativa, de VCP en tejido exocrino en ambos grupos de edad (figura 32).



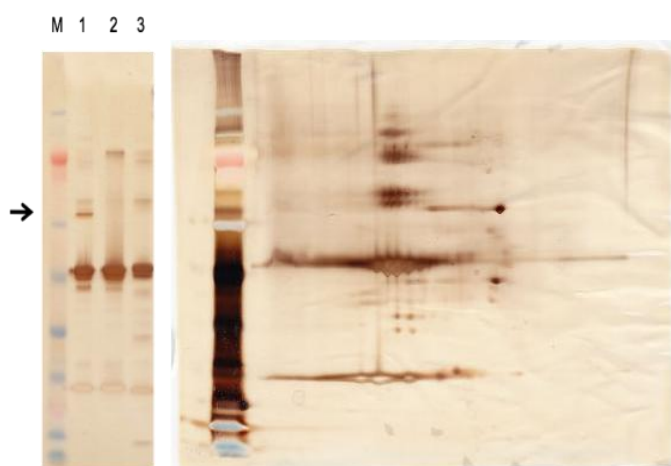
**Figura 32:** Expresión de mRNA de VCP en páncreas de ratón NOD.RAG2<sup>-/-</sup>. Se observa un aumento de expresión de VCP en los ratones 12 semanas de vida respecto a los de 5 semanas. En ambos casos, se puede observar que el tejido exocrino expresa niveles más elevados de VCP



Estos resultados confirmaron que la VCP no era la proteína que estaba siendo reconocida en condiciones fisiológicas aunque sí lo estaba siendo en las condiciones experimentales utilizadas que conllevaban consigo desnaturalización proteica (electroforesis desnaturalizante con uso de agentes reductores, calentamiento de la muestra y presencia de SDS).

## 8.2. Inmunoprecipitación de proteínas nativas con el anticuerpo AcMoH116.

Para descartar la posibilidad de que el reconocimiento estaba siendo debido al procesamiento de la muestra se procedió a utilizar la técnica de inmunoprecipitación donde el reconocimiento antígeno-anticuerpo se produce en condiciones nativas. Con esta técnica el reconocimiento antigénico se da antes de que el antígeno sea desnaturalizado, aunque posteriormente para poder identificar la proteína reconocida, esta debe ser desnaturalizada para realizar las electroforesis de 1-D y 2-D. Para llevar a cabo esta técnica, se utilizó extracto proteico procedente de la línea celular Nit-1. El resultado que se obtuvo fue la aparición de varias bandas (o *spots*) de las cuales ninguna de ellas correspondía con el de la VCP (figura 33)



**Figura 33:** Identificación de Grp78. En la imagen de la izquierda, se muestra la tinción de plata sobre un gel de una dimensión (1-D) después de realizar la electroforesis con el inmunoprecipitado del AcMoH116 con un extracto proteico de células Nit-1. Imagen de la derecha, tinción de plata sobre gel de dos dimensiones después de realizar la electroforesis con el inmunoprecipitado del AcMoH116 con un extracto proteico de células Nit-1. Además de la banda señalada con la flecha se pueden observar las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo

Como en el caso de la VCP, para poder identificar el antígeno los distintos *spots*, estos fueron recortados del gel teñido con plata, procesados de la misma forma que se indica en el anterior apartado, y los péptidos resultantes analizados por espectrometría de masas. El resultado del análisis de los siguientes *spots* fue la identificación de las siguientes proteínas: *Glucose Regulated Protein*(GRP78), la *Rab GDP dissociation inhibitor beta* (GDi2, GDi3), la *Protein disulfide isomerase associated 6* (PDIA6), y la Cadena ligera B de la Clatrina [*Clathrin light chain B* (Cltb)].

Por tanto, en condiciones nativas, el anticuerpo AcMoH116 no reconoce la VCP, y en cambio inmunoprecipitava varias proteínas.

## VI DISCUSIÓN

Los modelos animales están sirviendo para el estudio de un gran número de procesos patológicos como la diabetes tipo 1 o autoinmunitaria ya que suponen una herramienta muy valiosa para ayudar a interpretar y en muchos casos entender los mecanismos fisiopatológicos que acontecen en la enfermedad. En el estudio de la diabetes autoinmunitaria, el ratón NOD es el modelo de la enfermedad más utilizado ya que presenta muchas similitudes con la diabetes autoinmunitaria humana.

La utilización de ratones transgénicos basados en modelos de enfermedad ya establecidos, como el NOD, están aportando una gran fuente de conocimiento desde que se describiera los primeros animales transgénicos en la década de los 70 [111]. Aunque no fue hasta los años 80 cuando Gordon y colaboradores describieron la microinyección pronuclear y se convirtió en el método de elección para crear modelos transgénicos incluidos los ratones[89].

Uno de los inconvenientes que tiene esta técnica es el efecto aleatorio que tiene la inserción del transgén dentro del genoma del ratón receptor. Esto puede llevar consigo la alteración de la expresión del transgén [112]. Por ello, en la práctica, para minimizar el efecto de posición del transgén, se ha de llevar a cabo el análisis de múltiples líneas de ratón generadas a partir de diferentes ratones fundadores[90].

En 1986, utilizando la técnica de microinyección pronuclear fue generado el primer modelo de ratón transgénico para genes de inmunoglobulinas, en el que los linfocitos B, y solo esa población celular expresaban un BCR de membrana codificado por el transgén [93]. Así, gracias a la exclusión alélica, los linfocitos B no formaban un BCR con los genes endógenos sino que poseían un BCR de la especificidad determinada por el reordenamiento presente en la región variable de los genes de la inmunoglobulina presentes en el transgén.

Los modelos transgénicos para genes de inmunoglobulinas pueden ser doble transgénicos, es decir para las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, o pueden ser transgénicos únicamente para una de las dos cadenas. En el primer caso, se genera una inmunoglobulina de membrana y soluble ya preestablecida por el reordenamiento prefijado por los genes del transgen, mientras que en el segundo caso, el transgén codificaría solo la síntesis de una de las dos cadenas y por ello el repertorio de linfocitos B con diferentes especificidades antigénicas es más amplio. Estos modelos, aún poseyendo una sola de las cadenas de forma transgénica, permiten estudiar los linfocitos B desde una perspectiva simplificada sobre lo que acontece de forma natural. Básicamente permiten incrementar el número de precursores de linfocitos B sobre un determinado antígeno. Finalmente, los transgenes para inmunoglobulinas pueden codificar por uno o varios isotipos (ej: IgM y/o IgD) y para inmunoglobulinas de membrana (BCR) y/o secretada. En nuestro caso, el transgén de la cadena pesada codifica para los isotipos IgM y IgD, y para inmunoglobulina de membrana y secretada.



Para poder visualizar más fácilmente la expresión de los transgenes de inmunoglobulinas, es también muy útil utilizar, en la construcción del transgén que codifica para la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, el genoma procedente de un ratón con un haplotipo diferente al del ratón que será utilizado en el estudio. Así, una vez generado el ratón transgénico, los linfocitos B donde se expresa el trasgén, pueden ser distinguidos de aquellos donde se produce reordenamiento endógeno por esta diferencia de haplotipo. En nuestro caso, en la construcción del transgén de la cadena pesada, se utilizó DNA que codificaba para la región constante de la cadena pesada del gen de la inmunoglobulina procedente de un ratón BALB/C que es de haplotipo “a”, mientras que los genes de las inmunoglobulinas del ratón de estudio (cepa NOD) codifican para inmunoglobulinas del haplotipo “b”.

Tal como se ha comentado, la inserción del transgén es aleatoria. Teniendo en cuenta este último aspecto, se analizaron 3 líneas de ratones provenientes cada una de ellas de un ratón fundador (*founder*) diferente.

La presencia de los transgenes a nivel de genómico fue confirmada mediante la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) con los oligonucleótidos específicos (*primers*) para amplificar las regiones variables de las inmunoglobulinas transgénicas. Los tres ratones fundadores resultaron ser portadores de los dos transgenes (transgén de la cadena pesada y el transgén de la cadena ligera), y en los tres casos se heredaban en desequilibrio de enlace, es decir la presencia del transgén de la cadena pesada conllevaba también la presencia del transgén de la cadena ligera, en los descendientes. Esta es una situación que sucede de forma habitual, ya que normalmente los transgenes “aprovechan” el mismo punto de apertura del DNA para insertarse de forma conjunta[90]. Mediante análisis por citometría de flujo, hemos observado que en las tres líneas se induce la expresión de los transgenes aunque con niveles diferentes de expresión en cada una de ellas. Estos niveles de expresión pueden estar indicando que el transgén se está comportando de forma diferente en las tres líneas y por tanto puede estar generando efectos diferentes en cada una de ellas. Las diferencias en lo que respecta al nivel de expresión de la cadena pesada mIgM y el número de linfocitos B que la expresan, son muy sutiles, siendo la línea C la que la expresa mejor. En todo caso, en las tres líneas el número de linfocitos B que lo expresan es superior al 97%.

En lo que respecta a la cadena pesada mIgD, es donde hemos observado las mayores diferencias de expresión. Así, en la línea A los niveles de expresión están muy reducidos, y el número de linfocitos B que la expresan son del orden de tres veces menos que los que la expresan en las líneas B y C. Sin embargo, es importante también destacar que, comparado con la expresión de mIgM y mIgD de ratones NOD no transgénicos, los niveles de expresión de IgM y IgD de membrana en las tres líneas de ratones están claramente reducidos. Finalmente, en cuanto a la cadena ligera, no se observaron diferencias en los niveles de expresión entre ninguna de las tres líneas de ratones transgénicas generadas. Por todo ello, concluimos que los linfocitos B de las tres líneas de ratones 116 sufren un descenso de expresión de las IgM y IgD de membrana. Por otro lado concluimos que la línea C era en la que mejor se expresaban los transgenes, razón por la cual

el mayor número de experimentos fenotípicos y funcionales se llevaron a cabo con linfocitos B de esta línea.

Nuestro modelo comparte características fenotípicas y funcionales con el modelo transgénico MD4 el cual expresa inmunoglobulinas (IgM e IgD) de alta afinidad contra la lisozima de huevo de gallina o HEL (del inglés, *hen egg lysozyme*). En este ratón los linfocitos B maduran sin ningún problema, y al activarse estos se transforman en células productoras de anticuerpos anti-HEL. Sin embargo en ratones F1(MD4xML5), fruto del cruce del ratón MD4 con el ratón transgénico ML5 (el cual expresa transgénicamente una forma soluble de la proteína HEL, la mayoría de los linfocitos B reconocen HEL pero tienen dificultad para producir anticuerpos contra este, y presentan una reducción de la expresión de mIgM aunque con niveles de mIgD inalterados[93]. Además, sufren otras alteraciones, entre ellas señalización intracelular deficiente a través del BCR [113], capacidad de respuesta frente al LPS pero dificultades para migrar a la zona B folicular de bazo con una acumulación preferente por la zona de interfase T-B [95], y finalmente, una tasa de renovación de linfocitos B aumentada, con una vida media de 3-4 días [114]. De interés, la exposición crónica a niveles altos de HEL soluble inducía anergia de los linfocitos B, con incapacidad de responder a la administración exógena de dicha proteína [93], y mostraban una capacidad reducida a activarse en células productoras de anticuerpos en presencia de LPS y DNA CpG [115], [116].

Todos estos cambios se producían cuando los linfocitos B transgénicos se encontraban con el antígeno de forma soluble. Sin embargo, cuando los linfocitos B anti-HEL se desarrollaban en presencia del antígeno unido a membrana (mHEL), estos eran delecionados del repertorio B [91].

Otro de los modelos con el cual parece que también comparte características fenotípicas y funcionales con el ratón 116-NOD es con el modelo murino de BCR transgénico anti-DNA de doble cadena (anti ds-DNA), el ratón  $V_H3H9xV_{\lambda}2$  *light chain* en fondo genético BALB/c (ratón que al igual que el utilizado en los modelos de HEL, no es susceptible a procesos autoinmunes) [117]. En este modelo, al igual que el modelo F1(MD4xML5), los linfocitos B no se delecionan aunque también presentan un descenso en los niveles de expresión de mIg, se situaban preferentemente en la interfase entre la zona T-B, presentan un estado diferenciado de linfocito inmaduro, no responden al estímulo con LPS, y presentan un periodo de vida media de 8 días [117]. Existe otro modelo de ratón de BCR transgénico anti-DNA de doble cadena (anti ds-DNA), el ratón  $V_H3H9TG + V_{\lambda}4$  *light Chain*, también en fondo genético BALB/c, en el que los linfocitos B son incapaces de producir anticuerpos anti-DNA, y donde estos parecen ser tolerizados tanto por deleción como por edición del receptor [118].

Todo ello nos indica que los mecanismos de tolerancia, y en especial la anergia, pueden manifestarse bajo un amplio abanico de posibilidades fenotípicas.

Según estos datos, es probable que los linfocitos B del ratón 116-NOD reconozcan el antígeno de forma soluble, aunque tampoco podemos descartar que el antígeno se encuentre unido a membrana. Sin embargo en el modelo anti-HEL, la mIgD tiene niveles de expresión inalterados tras encontrarse con su antígeno de forma soluble. Cabe señalar que todos los estudios anti-HEL y anti-DNA se realizaron en un fondo genético de resistencia a la autoinmunidad, mientras que en nuestro

caso los ratones tienen un fondo genético NOD de susceptibilidad a Diabetes autoinmune. Esto podría explicar en parte, las diferencias de expresión de esta inmunoglobulina de membrana en nuestro modelo.

En los estudios realizados *in vitro* con nuestro modelo observamos una bajada de proliferación frente a distintos estímulos, pero preferentemente tras la estimulación a través del BCR, hecho que nos indica la deficiente señalización a través del BCR, tal y como ocurre con los modelos de anergia precedentes. A esto hay que añadirle los defectos y/o dificultades para activar estas células y transformarse en productoras de anticuerpos. Estos datos parecen indicar que los linfocitos B de los ratones 116-NOD se encuentran en estado de anergia, como sucedería en los modelos de tolerancia presentados previamente pero con alguna característica propia y diferenciales a ellos.

Los estudios con otros modelos experimentales de tolerancia indican que la vida media de los linfocitos B anérgicos es inferior a la vida media de los linfocitos B funcionales no autoreactivos. Para profundizar en el estudio del estado de anergia en el que se encuentran los linfocitos B en ratones 116C-NOD, llevamos a cabo estudios *in vivo* que confirmaron que la vida media de los linfocitos B de ratones 116C-NOD era aproximadamente un día inferior a los linfocitos de ratones NOD. Cabe destacar que la vida media obtenida tanto en un grupo como en el otro ha sido inferior a la esperada, probablemente porque en los experimentos se ha utilizado la molécula CFSE que produce toxicidad en las células. Sin embargo, al haber usado las mismas condiciones experimentales para linfocitos B transgénicos y no transgénicos, el grado de afectación de los mismos es comparable entre sí. Por ello los resultados indican que la vida media de los linfocitos B de ratones 116C-NOD es más corta que la de los linfocitos B funcionales no autoreactivos.

Por otro lado, hemos detectado una disminución de linfocitos B de bazo en ratones 116C-NOD que es difícil que sean explicados en términos de anergia únicamente.

Así, tras la generación de ratones quimera con 50% de médula ósea de ratón NOD y 50% de médula ósea de ratón 116 (de la línea C), observamos que estaba habiendo delección clonal de los linfocitos B a nivel central (médula ósea), con tan sólo presencia de un 10% de linfocitos B transgénicos. Por tanto, además de la anergia periférica, parece que a nivel central se están eliminando gran parte de los linfocitos B transgénicos por selección negativa (tolerancia central).

Independientemente del estado de anergia de los linfocitos B de los ratones 116C-NOD, es importante destacar su capacidad funcional diabetogénica. Este es un aspecto destacable, pues aunque es cierto que existe un descenso en la incidencia de la enfermedad, tanto en hembras como en machos 116C-NOD, en algunos individuos la enfermedad se presenta antes de lo esperado. Además, es conocido que en ausencia de linfocitos B en ratones NOD, estos no desarrollan diabetes. Tal es el caso de los ratones IgM null<sup>-/-</sup>. En ellos hay una mutación en el gen de la cadena pesada C $\mu$  que le impide expresar la mIgM y por consiguiente no tiene linfocitos B [75, 119], aunque sí tiene linfocitos T. Esta inmunodeficiencia, por ausencia de linfocitos B, hace que los ratones no sufran la enfermedad. Por otro lado, se ha descrito que los ratones MD4.NOD (NOD.IgHEL) transgénicos, es decir portadores de Igs anti-HEL, se retrasa el debut de la enfermedad, aunque la incidencia de la enfermedad sigue siendo la misma que en ratones NOD

*littermates* no transgénicos [119]. Si se comparan estos dos modelos con nuestro ratón 116-NOD transgénico en términos de incidencia de T1D, se puede observar que en éstos últimos en cualquiera de los tres grupos sufren la enfermedad, pero con una incidencia menor en machos, y en la línea C también en las hembras. Por tanto, aunque estos linfocitos se encuentran en estado de anergia, es muy probable que conserven la capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno, concepto nuevo no descrito hasta el momento en la literatura. En este sentido, hemos observado que los linfocitos B transgénicos infiltran los islotes pancreáticos lugar donde podrían adquirir el antígeno a través de su BCR y posteriormente presentarlo a una célula T, bien *in situ*, es decir a nivel del propio infiltrado, en el nódulo linfático regional o bien en el bazo. A favor de que esta presentación pueda suceder e iniciar la respuesta es que, tanto en bazo como en nódulo linfático, existe una distribución muy similar a la distribución de los linfocitos B en estos órganos en el ratón NOD no transgénico. Además en los estudios de quimeras de médula ósea que realizamos, también hemos podido observar que los pocos linfocitos B transgénicos que maduran, al llegar al bazo se sitúan preferentemente en la zona T y en la zona marginal. De forma similar a nuestros resultados, en los estudios realizados en otros modelos de linfocitos B anérgicos, éstos también tienen dificultad en entrar en la zona folicular, ubicándose preferentemente en la interfase entre zona T y B, lugar donde podrían estar ejerciendo, como en nuestro caso, la posible función APC [95],[120],[117].

No hemos analizado aún la presencia de moléculas co-estimuladoras, B7-1(CD80) y B7-2(CD-86), en la membrana citoplasmática de estos linfocitos B, para poder acabar de confirmar que tras ser estimulados podrían actuar activando linfocitos T.

Un aspecto interesante a destacar, respecto al modelo de HEL, F1(MD4xML5), es que en nuestro caso se produce, además de un bajada de mIgM, una bajada significativa de la mIgD. Tanto la mIgM como la mIgD son los primeros isotipos de BCR expresados durante la ontogenia de los linfocitos B. En condiciones normales, la mayoría de linfocitos B adquieren la mIgD después de abandonar la médula ósea y dirigirse hacia los órganos linfoides secundarios, y es tras interactuar con el antígeno por el que tienen especificidad, que la expresión de ambas, mIgM y mIgD disminuyen, porque el linfocito B se activa, entra en el folículo linfoide, generándose un centro germinal donde tiene lugar la hipermutación somática y el cambio de isotipo de Ig[121]. Por el contrario, en estado de anergia, la disminución de la expresión del BCR, y más concretamente de la mIgM, se ha considerado que, al menos parcialmente, podría ser responsable de la disminución de la respuesta en estas células, aunque sigue siendo objeto de controversia, pues se cree también que sería suficiente la mIgM y la mIgD de membrana para inducir su activación. Se ha postulado que la exposición crónica al antígeno atenuaría la señal de los BCRs ocupados. Se postula que en estas condiciones, se produciría una asociación inefectiva entre las moléculas IgM y IgD de superficie con los componentes de señalización  $Ig\alpha$  y  $Ig\beta$ , y/o otras moléculas de señalización que finalmente comportaría la falta de su fosforilación [113],[122], defectos en la movilización del Calcio intracelular [123] y en último término la activación de dichas células. En nuestro modelo, el defecto en la proliferación tras su estímulo, ratifica el estado de anergia de los

linfocitos B de los ratones 116C-NOD. Desconocemos el por qué de la existencia de un descenso más significativo de mIgD que de mIgM, no observado en otros modelos de autoinmunidad. Quizá se deba a las características propias de la enfermedad, o al fondo genético de susceptibilidad en el que se expresan los transgenes. De hecho, mientras que la IgM se muestra más estable a lo largo de la evolución en diferentes especies, la IgD muestra mayor plasticidad estructural y puede ser predominantemente expresada como una molécula de membrana o secretada de forma diferente dependiendo de la especie que la posea [121].

En cuanto a la incidencia de la enfermedad, hemos observado una concordancia inversa entre los niveles de expresión de los transgenes y el hecho de padecer la enfermedad en las hembras. Esto iría a favor de que la mejor expresión del transgén provocaría un descenso de la enfermedad quizá porque se está produciendo una mejor tolerancia de los linfocitos B transgénicos o porque el estado de anergia de los linfocitos B de la Línea C se muestra más eficaz, o quizás porque estos linfocitos B tienen un efecto protector de la enfermedad. En este sentido, se ha descrito la existencia de linfocitos B antígeno-específicos, productores de IL-10 y por ello han sido designados como linfocitos B10, capaces de regular la enfermedad de la encefalitis autoinmune experimental (EAE) [124]. En este contexto, hemos observado que la producción de IL-10 al estímulo con LPS, por parte de linfocitos B de ratones 116C-NOD, es prácticamente ausente en las primeras etapas de vida, donde se dan la mayoría de casos de la enfermedad, mientras que es en etapas posteriores de la vida, cuando ya se ha establecido una clara resistencia a la enfermedad clínica, esta citoquina se produce en cantidades superiores. Estos resultados estarían en concordancia con el hecho que, después de analizar la población de linfocitos B10 en ratones 116C-NOD, parece que esta no tenga un peso relevante en la prevención de la enfermedad en estos ratones, ya que se han observado, incluso un menor número de estas células, en estos ratones 116C-NOD que en ratones NOD *littermates* no transgénicos. Quizá esta resistencia a la enfermedad estaría relacionada a la presencia de un mayor número de linfocitos B de zona marginal en esta cepa 116C-NOD (comparada con el propio NOD no transgénico) y con las líneas B y C (datos no mostrados). De hecho, a los linfocitos B de zona marginal también se les ha otorgado una función supresora/reguladora, y es curiosamente en estos ratones 116C-NOD donde el número de linfocitos de zona marginal incrementa con la edad, aspecto que coincide, como ya se ha comentado antes, con un descenso de la incidencia de la enfermedad.

En el caso de ratones NOD machos no transgénicos, la incidencia de T1D es inferior a la de los ratones hembra. Así, los ratones NOD machos suelen tener una incidencia que oscila, dependiendo de la colonia analizada, entre un 10-40% frente a la incidencia de ratones hembra que está entre el 60-90% [60]. Por ello, en el presente estudio se ha priorizado el estudio de la enfermedad en ratones hembras. Sin embargo, hay que destacar que en lo que respecta a las tres líneas de ratones 116 transgénicas, observamos un franco descenso de la incidencia de la enfermedad en los ratones machos. Fenómenos relacionados con el sexo, tales como niveles hormonales, influyen de forma diferente en la funcionalidad de los linfocitos B y esto conlleva a un descenso de la T1D, independientemente de los niveles de expresión de los transgenes en las tres líneas.

Como ya se ha comentado con anterioridad, en lo que respecta a la línea de ratones 116C-NOD transgénicos, se observa un inicio más prematuro de la enfermedad tanto en los ratones hembra como en los ratones macho. Esta aceleración inicial de la enfermedad coincide con niveles con niveles de infiltración insular más elevados en las primeras semanas de edad. Esto reforzaría el hecho de que sería en esta línea C donde el transgén se expresa mejor. Aunque en este caso, a diferencia de lo que cabría esperar, por el estado de anergia observado en los linfocitos B de estos ratones 116C-NOD, el hecho que en los ratones transgénicos los primeros casos de T1D se den antes, pueden estar indicando que la respuesta inmunitaria se ha iniciado antes y esto podría estar en relación con la posible maduración de algunos linfocitos B maduros “no anérgicos” que habrían escapado a los mecanismos de tolerancia, o bien como ya se ha mencionado antes, a la posibilidad de que estas células anérgicas continúen manteniendo su capacidad presentadora y estimuladora de células T.

Uno de los resultados más relevantes, en relación al grado de maduración de los linfocitos B de los ratones 116C-NOD, es el aumento de la subpoblación de linfocitos B de la Zona Marginal, en detrimento de los linfocitos B foliculares, observado en los ratones transgénicos. Este mismo fenómeno se observa en los ratones NOD transgénicos para transgenes que codifican para inmunoglobulinas que reconocen insulina[125].

Se ha descrito que los linfocitos de la Zona Marginal conectan la inmunidad innata con la adquirida y que estos linfocitos contribuyen a la patogénesis de la T1D actuando como células presentadoras de antígeno[126]. Apoyando esta idea estaría el hecho de que son linfocitos que se sitúan en la zona marginal de la pulpa blanca de bazo donde tendrían un papel importante en la respuesta temprana a antígenos transportados por la sangre [127]. Por otro lado, son linfocitos que responden eficiente y rápidamente a antígenos de forma T-independiente, como puede ser al estímulo con LPS. También se ha descrito que los niveles más elevados de IgM y del receptor del complemento CD21, podrían estar ayudando a que tuvieran un umbral de activación más bajo[127]. Además de esta función durante la respuesta innata, se ha propuesto que los linfocitos B de zona marginal podrían actuar como células presentadoras de antígeno en la activación de linfocitos T[128] o facilitando la función de las células foliculares dendríticas en la activación de los linfocitos T, si bien también se les ha otorgado una función supresora/reguladora, como se ha mencionado con anterioridad.

Por todo ello, podríamos aventurarnos a proponer que en el inicio de la enfermedad, los linfocitos B de zona marginal, ya sea por un menor número de y/o su incapacidad de actuar como supresoras y/o de actuar como presentadoras/activadoras facilitarían la aceleración de la respuesta, mientras que en etapas más tardías estos mismos, por su mayor número y/o por su capacidad de actuar como supresoras y/o de no actuar como presentadoras/activadoras frenarían la enfermedad.

En cuanto al origen, funcionalidad, y autoreactividad del linfocito B original, que dio origen a este modelo de ratón 116-NOD transgénico, y con los datos obtenidos y discutidos hasta el momento, se plantean dos posibilidades: Por un lado, pudiera ser un linfocito que hubiera escapado a la

selección negativa a nivel central y fuera por tanto un linfocito B autoreactivo desde su origen a nivel central, y que posteriormente hubiera sido activado, y entrado en un proceso de maduración su afinidad. Por otro lado, podría tener su origen en un proceso de hipermutación somática de un linfocito que una vez en periferia hubiera adquirido el reconocimiento de un antígeno específico mediante maduración de la afinidad y por tanto en este caso la autoreactividad fuera adquirida en periferia posteriormente. Sea cual sea su origen, el BCR original muestra indicios de haber sufrido mecanismos de maduración de la afinidad, y por ello, junto con los resultados propios de nuestro estudio con el ratón transgénico, nos está indicando la existencia de defectos en los mecanismos de selección tanto a nivel central como periférico.

En relación a la autoreactividad de los linfocitos B del ratón 116-NOD, y a su posible capacidad reguladora, hay que recordar el origen del hibridoma (hibridoma H116) fue un linfocito B presente en la población infiltrante en islotes pancreáticos de ratón F1(8.3-NODxNOR). Esta cepa de ratón tiene un progenitor transgénico para linfocito T cuyo TCR es altamente diabetogénico (8.3-NOD) [129] aunque el otro progenitor, el ratón NOR le confiere resistencia a la enfermedad [130]. Por tanto, el linfocito que se encontraba infiltrando el islote pancreático fue obtenido de una cepa de ratón resistente a la T1D pero en un entorno de susceptibilidad ya que los linfocitos T transgénicos y los linfocitos B infiltran el islote. Sin embargo, en este caso parece que sería el fondo genético heredado del ratón NOR el que protegería al ratón de sufrir T1D. O bien, podría explicarse por la producción de un tipo de respuesta disminuida o por no haber activación de la respuesta inmunitaria en este contexto de los linfocitos T, que son los principales causantes de la destrucción de la célula beta pancreática. Aunque para ello, se tendría que estudiar específicamente el ratón F1(8.3-NODxNOR).

Hemos evaluado la respuesta a diferentes estímulos en los linfocitos B de ratones 116C-NOD. Los resultados parecen indicar que el tipo de respuesta variaría según la forma de activación que estos recibirían. Tras estimulación de los linfocitos con lipopolisacárido (LPS), se produce un incremento de IL-6, tanto en ratones transgénicos como no transgénicos, observada en ratones jóvenes y en ratones adultos (en estos con una mayor producción). Este dato iría encaminado a que el tipo de respuesta que se está produciendo en este caso es de tipo Th2. En concordancia con la producción de IL-6, encontramos también un aumento de IL-10, tras estimulación también con LPS en linfocitos de ratones NOD (observando también un incremento moderado en linfocitos B de ratones 116C-NOD adultos). Esta última citoquina en este caso podría estar actuando como inhibidora de la respuesta Th1 y dando preferencia así a una respuesta tipo Th2, y/o supresora.

Por otro lado, parece clara la producción de TNF- $\alpha$  tras estimulación del BCR tanto en ratones transgénicos como en ratones no transgénicos. En este caso, parece estar indicando que tras estimulación a través del BCR el balance se declinaría hacia un tipo de respuesta tipo Th1.

Es importante destacar en este caso que en comparación con la proliferación celular obtenida tras la estimulación del BCR transgénico (la cual estaba muy disminuida), el nivel de citoquina TNF- $\alpha$  producida es muy elevada dando valores comparables a los niveles obtenidos en los ratones no

transgénicos, los cuales si habían una buena respuesta proliferativa al estímulo del BCR. Además, esta situación se observa tanto en ratones jóvenes como en ratones adultos.

En conclusión, tras estimulación con LPS, se obtendría un tipo de respuesta Th2, tanto en ratones transgénicos como en no transgénicos. En cambio, tras estimulación del BCR, parece que el balance de la respuesta sería hacia Th1 (principalmente por producción de TNF- $\alpha$ , tanto en ratones transgénicos como no transgénicos). Teniendo en este caso mucha más relevancia la producción de TNF- $\alpha$  en ratones transgénicos dada la baja proliferación que habíamos observado tras estimulación del BCR.

Se ha descrito que las enfermedades órgano-específicas, entre ellas la T1D están dirigidas por un tipo de respuesta Th1 [131]. Aunque hay estudios que indican que el balance en el tipo de respuesta puede ser alterada experimentalmente.

Los resultados obtenidos estarían acorde con este tipo de la respuesta hacia un balance Th1, descrita en el caso de la T1D, aunque puede verse modificada hacia un tipo de respuesta Th2 con la adición de LPS. En este caso, es conocido que el ratón NOD para desarrollar la enfermedad ha de estar en condiciones de estabulación de SPF (condiciones libre de patógenos) y por tanto en esas condiciones no se esperaría que el ratón entrara en contacto con LPS, y que la activación de linfocitos B con LPS y su posterior transferencia a ratones NOD receptores, protege a estos últimos de la enfermedad.

Como conclusión final y en relación a la producción de citoquinas, no hemos observado cambios sustanciales en el tipo de respuesta, sobre todo tras estimulación a través del BCR, a pesar de la falta de proliferación fenómeno que no invalida que se puedan estar produciendo cambios a nivel de las características de esta respuesta inmunitaria y por tanto a nivel de la enfermedad ya que por un lado son linfocitos que hemos observado que están en estado de anergia y que además sufren delección clonal, aunque por otro lado, se ha observado, que son linfocitos que tienen la capacidad de desarrollar la enfermedad. Quizás esta capacidad sea gracias a su papel como célula presentadora de antígeno, que se vería aumentada por la mayor presencia de linfocitos B maduros de Zona Marginal que responderían de forma T-independiente. Esto estaría indicando además, que los linfocitos transgénicos son capaces de reconocer su antígeno a través del BCR transgénico.

Por último, es importante tener en cuenta el papel que está teniendo el antígeno que está siendo reconocido por el BCR de de los linfocitos B transgénicos.

En este sentido, a lo largo de todo el periodo doctoral, hemos intentado averiguar cuál era el antígeno reconocido utilizando técnicas de proteómica de uso cotidiano como son: las electroforesis en geles de una y dos dimensiones sobre las cuales se han realizado tinciones inespecíficas como la tinción de plata o coomassie, o se han transferido a membranas de nitrocelulosa para realizar westerns.

Hasta el momento se ha podido identificar en condiciones desnaturalizantes la Valosin Containin Protein, la cual se trata de una proteína constitutiva de la que el AcMoH116 reconoce un epítipo lineal. Sin embargo, desestimamos que era el antígeno específico reconocido por el anticuerpo



monoclonal AcMoH116 porque en condiciones no desnaturalizantes no nos aparecía y además mostraba unos niveles de expresión incluso inferiores en el tejido endocrino.

También hemos identificado otras proteínas que inmunoprecipitan junto con el AcMoH116. Una de ellas es la *Glucose-regulated protein* o conocida también como *Binding immunoglobulin protein* (Grp78, HSPA5, BiP). La Grp78 es una chaperona ubicua que actúa como regulador/sensor de estrés de retículo endoplasmático (es decir funciona como control de calidad de otras proteínas). Al igual que en caso de la VCP, el resultado mostró que había un ligero incremento, aunque no significativo, de expresión de mRNA a nivel del tejido exocrino que concordaba a nivel proteico con una mayor síntesis de la proteína (Resultado no mostrado). Este estaría indicando que la proteína GRP78, tampoco es nuestra candidata como autoantígeno reconocido por el AcMoH116.

En cuanto a las otras proteínas identificadas, la *Protein disulfide isomerase associated 6* (PDIA6), junto con la GRP78 forman parte de un gran complejo macromolecular de chaperonas, y por ello, posiblemente inmunoprecipitó junto con al GRP78. Además se trata también de una proteína ubicua. Por ello creemos que tampoco esta proteína es la candidata a autoantígeno reconocido por el AcMoH116. En cuanto a la *Rab GDP dissociation inhibitor beta* o *Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2* (GDi2, GDi3), es una proteína que regula las reacciones de intercambio GDP/GTP de la mayoría de proteínas Rab, inhibiendo la disociación de GDP de ellas, y la consecuente unión de GTP a ellas. Se trata también de una proteína ubicua, con lo que tampoco creemos que esta sea el autoantígeno reconocido por el AcMoH116.

Finalmente, la Cadena ligera B de la Clatrina (*Clathrin light chain B* (Cltb), forma parte de la Clatrina (formada por una cadena polipeptídica de 190kDa i tres cadenas ligeras), que recubre interiormente las invaginaciones de la membrana plasmática y las vesículas endocíticas constituyendo la unidad estructural del trisquelion. La Cadena ligera B de la Clatrina es también una proteína ubicua, sin embargo existe una isoforma específica de Sistema Nervioso Central (SNC). Dado que un número importante de autoantígenos de célula beta son también presentes a nivel del sistema nervioso, la posibilidad de que la isoforma específica de SNC de la Cadena ligera B de la Clatrina sea el autoantígeno reconocido por el AcMoH116 es la más posible y atractiva de las cuatro proteínas precipitadas.

## VII CONCLUSIONES

1. Los transgenes codifican para inmunoglobulinas IgM<sup>a</sup> y IgD<sup>a</sup> con la misma especificidad que el AcMo H116, hecho que confirma su correcta construcción y expresión.
2. En las tres líneas de ratones transgénicos 116-NOD se expresan los transgenes pHmd-116VH y AC381-116VK, aunque la mejor expresión se da en la línea C (116C-NOD) donde se expresan mejor.
3. La incidencia de Diabetes Tipo 1 en ratones 116-NOD machos de las tres líneas es significativamente inferior a la de los ratones NOD hermanos no transgénicos, mientras que en hembras solo es en los ratones de la cepa 116C-NOD donde se observa este mismo fenómeno.
4. Aunque la incidencia de la enfermedad en ratones machos y hembras de la línea 116C-NOD está disminuida en relación a los ratones NOD hermanos no transgénicos, el debut diabético en los ratones 116C-NOD está acelerado en relación a los ratones NOD hermanos no transgénicos.
5. En ratones 116C-NOD transgénicos, la insulinitis se inicia antes y evoluciona más lentamente que en los ratones NOD hermanos no transgénicos, aunque en etapas más evolucionadas de la enfermedad el grado de insulinitis tiende a igualarse.
6. A lo largo de toda la vida de los ratones 116C-NOD, existe un aumento significativo de los linfocitos B de la Zona Marginal que se acompaña de un descenso también significativo de los linfocitos B foliculares y transiciones T1, respecto a los ratones NOD hermanos no transgénicos.
7. Los linfocitos B de ratones 116C-NOD transgénicos se encuentran en estado de anergia, hecho constatado por presentar una vida media más corta, un estado de respuesta a estimulación disminuido sobre todo a la estimulación a través del BCR, y por un descenso de la expresión de la mIgM y especialmente de la mIgD.
8. La anergia que tienen los linfocitos B de los ratones 116C-NOD transgénicos no impide que la enfermedad se desarrolle, y en cierta medida puede incluso facilitarla.
9. Los linfocitos B de ratones 116C-NOD sufren delección clonal a nivel central, hecho constatado por la disminución de linfocitos B presentes a nivel de bazo en estos ratones, y confirmado mediante los estudios de quimeras de médula ósea.
10. En los estudios de quimerismo de médula ósea, los linfocitos B procedentes de ratones 116C-NOD transgénicos se sitúan preferentemente en la Zona Marginal, y/o en la zona T de la pulpa blanca del bazo.
11. Tanto en linfocitos B de ratones 116C-NOD transgénicos como de ratones NOD no transgénicos, el tipo de respuesta que se obtiene tras la estimulación del BCR es principalmente de tipo Th1 con producción de la citoquina principalmente TNF- $\alpha$ . Sin

embargo, tras la estimulación con LPS esta respuesta cambia hacia tipo Th2 produciéndose básicamente IL-6 e IL-10.

12. Tras el estímulo con LPS, la producción de IL-10 por parte de los linfocitos B de los ratones 116C-NOD transgénicos, es significativamente inferior a la producida por los linfocitos B de los ratones NOD no transgénicos. Sin embargo, este mismo estímulo hace que la producción de IL-6 tenga una tendencia a ser superior en los linfocitos B de ratones 116C-NOD transgénicos.
13. En extractos de islotes y/o células Nit-1, el anticuerpo monoclonal H116 reconoce la forma lineal (desnaturalizada) de la *Valosin Containing Protein*, mientras que en condiciones nativas coprecipita con las proteínas *Grp78*, *GDI2*, *PDIA6* y *Clathrin beta Chain*.

## VIII BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, *Inmunología celular y molecular*. 2005.
2. Wilson, A., et al., *Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1106**: p. 64-75.
3. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
4. Tokoyoda, K., et al., *Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development*. Immunity, 2004. **20**(6): p. 707-18.
5. Chung, J.B., M. Silverman, and J.G. Monroe, *Transitional B cells: step by step towards immune competence*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 343-9.
6. Carsetti, R., M.M. Rosado, and H. Wardmann, *Peripheral development of B cells in mouse and man*. Immunol Rev, 2004. **197**: p. 179-91.
7. Merrell, K.T., et al., *Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 953-62.
8. Niiro, H. and E.A. Clark, *Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 945-56.
9. Kraus, M., et al., *Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalpha/beta heterodimer*. Cell, 2004. **117**(6): p. 787-800.
10. Mackay, F. and P. Schneider, *Cracking the BAFF code*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 491-502.
11. Vora, K.A., et al., *Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function*. J Immunol, 2003. **171**(2): p. 547-51.
12. Hahne, M., et al., *APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth*. J Exp Med, 1998. **188**(6): p. 1185-90.
13. Lopez-Fraga, M., et al., *Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase*. EMBO Rep, 2001. **2**(10): p. 945-51.
14. Moisini, I. and A. Davidson, *BAFF: a local and systemic target in autoimmune diseases*. Clin Exp Immunol, 2009. **158**(2): p. 155-63.
15. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
16. Schneider, P., et al., *Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen*. J Exp Med, 2001. **194**(11): p. 1691-7.
17. Yan, M., et al., *Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice*. Nat Immunol, 2001. **2**(7): p. 638-43.
18. Seshasayee, D., et al., *Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BlyS receptor*. Immunity, 2003. **18**(2): p. 279-88.
19. Mackay, F. and P. Schneider, *TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 263-76.
20. Pape, K.A., et al., *The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles*. Immunity, 2007. **26**(4): p. 491-502.
21. Bergtold, A., et al., *Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 503-14.
22. Cozine, C.L., K.L. Wolniak, and T.J. Waldschmidt, *The primary germinal center response in mice*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(3): p. 298-302.
23. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
24. Bofill, M., A.N. Akbar, and P.L. Amlot, *Follicular dendritic cells share a membrane-bound protein with fibroblasts*. J Pathol, 2000. **191**(2): p. 217-26.
25. Allen, C.D., et al., *Imaging of germinal center selection events during affinity maturation*. Science, 2007. **315**(5811): p. 528-31.
26. Rogozin, I.B. and M. Diaz, *Cutting edge: DGYW/WRCH is a better predictor of mutability at G:C bases in Ig hypermutation than the widely accepted RGYW/WRCY motif and probably*

- reflects a two-step activation-induced cytidine deaminase-triggered process. *J Immunol*, 2004. **172**(6): p. 3382-4.
27. Muramatsu, M., et al., *Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(26): p. 18470-6.
  28. Dorner, T., et al., *Somatic hypermutation of human immunoglobulin heavy chain genes: targeting of RGYW motifs on both DNA strands*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(10): p. 3384-96.
  29. Neuberger, M.S. and C. Rada, *Somatic hypermutation: activation-induced deaminase for C/G followed by polymerase eta for A/T*. *J Exp Med*, 2007. **204**(1): p. 7-10.
  30. Chaudhuri, J. and F.W. Alt, *Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(7): p. 541-52.
  31. Manis, J.P., M. Tian, and F.W. Alt, *Mechanism and control of class-switch recombination*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(1): p. 31-9.
  32. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(9): p. 822-9.
  33. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(3): p. 230-42.
  34. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 161-96.
  35. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, *Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens*. *Immunity*, 2001. **14**(5): p. 617-29.
  36. Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind, *New perspectives in B-1 B cell development and function*. *Trends Immunol*, 2006. **27**(9): p. 428-33.
  37. Wolf, S.D., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice*. *J Exp Med*, 1996. **184**(6): p. 2271-8.
  38. Su, T.T., et al., *Signaling in transitional type 2 B cells is critical for peripheral B-cell development*. *Immunol Rev*, 2004. **197**: p. 161-78.
  39. Mizoguchi, A., et al., *Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation*. *Immunity*, 2002. **16**(2): p. 219-30.
  40. Duddy, M.E., A. Alter, and A. Bar-Or, *Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation?* *J Immunol*, 2004. **172**(6): p. 3422-7.
  41. McGeachy, M.J., L.A. Stephens, and S.M. Anderton, *Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system*. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 3025-32.
  42. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. *Immunity*, 2008. **28**(5): p. 639-50.
  43. Pelanda, R. and R.M. Torres, *Receptor editing for better or for worse*. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(2): p. 184-90.
  44. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. *Annu Rev Immunol*, 2003. **21**: p. 231-64.
  45. Strasser, A. and P. Bouillet, *The control of apoptosis in lymphocyte selection*. *Immunol Rev*, 2003. **193**: p. 82-92.
  46. Cornall, R.J., C.C. Goodnow, and J.G. Cyster, *The regulation of self-reactive B cells*. *Curr Opin Immunol*, 1995. **7**(6): p. 804-11.
  47. Bell, S.E. and C.C. Goodnow, *A selective defect in IgM antigen receptor synthesis and transport causes loss of cell surface IgM expression on tolerant B lymphocytes*. *EMBO J*, 1994. **13**(4): p. 816-26.
  48. Hippen, K.L., L.E. Tze, and T.W. Behrens, *CD5 maintains tolerance in anergic B cells*. *J Exp Med*, 2000. **191**(5): p. 883-90.
  49. Daar, A.S., et al., *The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs*. *Transplantation*, 1984. **38**(3): p. 287-92.
  50. Goodnow, C.C., et al., *Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity*. *Nature*, 2005. **435**(7042): p. 590-7.
  51. Mahler, M. and M.J. Fritzler, *Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1183**: p. 267-87.

52. Marrack, P., J. Kappler, and B.L. Kotzin, *Autoimmune disease: why and where it occurs*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 899-905.
53. Ahren, B., *Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease*. Diabetologia, 2000. **43**(4): p. 393-410.
54. Tisch, R. and H. McDevitt, *Insulin-dependent diabetes mellitus*. Cell, 1996. **85**(3): p. 291-7.
55. Gepts, W., *Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus*. Diabetes, 1965. **14**(10): p. 619-33.
56. Daaboul, J. and D. Schatz, *Overview of prevention and intervention trials for type 1 diabetes*. Rev Endocr Metab Disord, 2003. **4**(4): p. 317-23.
57. Vang, T., et al., *Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant*. Nat Genet, 2005. **37**(12): p. 1317-9.
58. Bach, J.F., *Six questions about the hygiene hypothesis*. Cell Immunol, 2005. **233**(2): p. 158-61.
59. Akerblom, H.K. and M. Knip, *Putative environmental factors in Type 1 diabetes*. Diabetes Metab Rev, 1998. **14**(1): p. 31-67.
60. Pozzilli, P., et al., *NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures*. Immunol Today, 1993. **14**(5): p. 193-6.
61. Todd, J.A. and L.S. Wicker, *Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models*. Immunity, 2001. **15**(3): p. 387-95.
62. Tsai, S., A. Shameli, and P. Santamaria, *CD8+ T cells in type 1 diabetes*. Adv Immunol, 2008. **100**: p. 79-124.
63. Mohan, J.F., et al., *Unique autoreactive T cells recognize insulin peptides generated within the islets of Langerhans in autoimmune diabetes*. Nat Immunol, 2010. **11**(4): p. 350-4.
64. Macdonald, W.A., et al., *T cell allorecognition via molecular mimicry*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 897-908.
65. Wong, F.S., et al., *Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library*. Nat Med, 1999. **5**(9): p. 1026-31.
66. Trudeau, J.D., et al., *Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood*. J Clin Invest, 2003. **111**(2): p. 217-23.
67. Amrani, A., et al., *Progression of autoimmune diabetes driven by avidity maturation of a T-cell population*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 739-42.
68. Santamaria, P., *The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 437-45.
69. Hoglund, P., et al., *Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes*. J Exp Med, 1999. **189**(2): p. 331-9.
70. Carbone, F.R., et al., *Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance*. Immunol Today, 1998. **19**(8): p. 368-73.
71. Rock, K.L. and L. Shen, *Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 166-83.
72. Reynoso, E.D. and S.J. Turley, *Unconventional antigen-presenting cells in the induction of peripheral CD8(+) T cell tolerance*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 795-801.
73. Silveira, P.A. and S.T. Grey, *B cells in the spotlight: innocent bystanders or major players in the pathogenesis of type 1 diabetes*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(4): p. 128-35.
74. Wong, F.S., et al., *To B or not to B--pathogenic and regulatory B cells in autoimmune diabetes*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(6): p. 723-31.
75. Serreze, D.V., et al., *B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice*. J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 2049-53.
76. Yang, M., B. Charlton, and A.M. Gautam, *Development of insulinitis and diabetes in B cell-deficient NOD mice*. J Autoimmun, 1997. **10**(3): p. 257-60.
77. Serreze, D.V., et al., *B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. J Immunol, 1998. **161**(8): p. 3912-8.
78. Noorchashm, H., et al., *I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 743-50.

79. Pietropaolo, M. and G.S. Eisenbarth, *Autoantibodies in human diabetes*. *Curr Dir Autoimmun*, 2001. **4**: p. 252-82.
80. Bonifacio, E., et al., *International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice*. *Diabetes*, 2001. **50**(11): p. 2451-8.
81. Greeley, S.A., et al., *Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice*. *Nat Med*, 2002. **8**(4): p. 399-402.
82. Kendall, P.L., et al., *Peritoneal B cells govern the outcome of diabetes in non-obese diabetic mice*. *Eur J Immunol*, 2004. **34**(9): p. 2387-95.
83. Hussain, S. and T.L. Delovitch, *Dysregulated B7-1 and B7-2 expression on nonobese diabetic mouse B cells is associated with increased T cell costimulation and the development of insulinitis*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 680-7.
84. Livneh, A., et al., *A human monoclonal antibody to insulin*. *Diabetes*, 1986. **35**(1): p. 68-73.
85. Jury, K.M., et al., *Evidence for somatic mutation and affinity maturation of diabetes associated human autoantibodies to glutamate decarboxylase*. *J Autoimmun*, 1996. **9**(3): p. 371-7.
86. Brogren, C.H., et al., *Production and characterization of a monoclonal islet cell surface autoantibody from the BB rat*. *Diabetologia*, 1986. **29**(5): p. 330-3.
87. Supon, P., P. Stecha, and K. Haskins, *Anti-islet cell antibodies from NOD mice*. *Diabetes*, 1990. **39**(11): p. 1366-72.
88. Pleau, J.M., et al., *Evidence for antigen driven selection in two monoclonal auto-antibodies derived from nonobese diabetic mice*. *Mol Immunol*, 1993. **30**(14): p. 1257-64.
89. Gordon, J.W., et al., *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(12): p. 7380-4.
90. Gama Sosa, M.A., R. De Gasperi, and G.A. Elder, *Animal transgenesis: an overview*. *Brain Struct Funct*, 2010. **214**(2-3): p. 91-109.
91. Hartley, S.B., et al., *Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens*. *Nature*, 1991. **353**(6346): p. 765-9.
92. Goodnow, C.C., R. Brink, and E. Adams, *Breakdown of self-tolerance in anergic B lymphocytes*. *Nature*, 1991. **352**(6335): p. 532-6.
93. Goodnow, C.C., et al., *Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice*. *Nature*, 1988. **334**(6184): p. 676-82.
94. Goodnow, C.C., et al., *Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes*. *Nature*, 1989. **342**(6248): p. 385-91.
95. Cyster, J.G., S.B. Hartley, and C.C. Goodnow, *Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire*. *Nature*, 1994. **371**(6496): p. 389-95.
96. Erikson, J., et al., *Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice*. *Nature*, 1991. **349**(6307): p. 331-4.
97. Roark, J.H., et al., *Persistence of functionally compromised anti-double-stranded DNA B cells in the periphery of non-autoimmune mice*. *Int Immunol*, 1997. **9**(11): p. 1615-26.
98. Nguyen, K.A., et al., *Characterization of anti-single-stranded DNA B cells in a non-autoimmune background*. *J Immunol*, 1997. **159**(6): p. 2633-44.
99. Rojas, M., C. Hulbert, and J.W. Thomas, *Anergy and not clonal ignorance determines the fate of B cells that recognize a physiological autoantigen*. *J Immunol*, 2001. **166**(5): p. 3194-200.
100. Acevedo-Suarez, C.A., et al., *Impaired intracellular calcium mobilization and NFATc1 availability in tolerant anti-insulin B cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(4): p. 2234-41.
101. Culton, D.A., et al., *Early preplasma cells define a tolerance checkpoint for autoreactive B cells*. *J Immunol*, 2006. **176**(2): p. 790-802.
102. Santulli-Marotto, S., et al., *Autoreactive B cell regulation: peripheral induction of developmental arrest by lupus-associated autoantigens*. *Immunity*, 1998. **8**(2): p. 209-19.
103. Borrero, M. and S.H. Clarke, *Low-affinity anti-Smith antigen B cells are regulated by anergy as opposed to developmental arrest or differentiation to B-1*. *J Immunol*, 2002. **168**(1): p. 13-21.
104. Kilmon, M.A., et al., *Low-affinity, Smith antigen-specific B cells are tolerized by dendritic cells and macrophages*. *J Immunol*, 2005. **175**(1): p. 37-41.

105. Benschop, R.J., et al., *Activation and anergy in bone marrow B cells of a novel immunoglobulin transgenic mouse that is both hapten specific and autoreactive*. *Immunity*, 2001. **14**(1): p. 33-43.
106. Gauld, S.B., et al., *Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1160-7.
107. Cambier, J.C., et al., *B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?* *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(8): p. 633-43.
108. Carrillo, J., et al., *Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements*. *Diabetes*, 2005. **54**(1): p. 69-77.
109. Serreze, D.V., et al., *Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene*. *J Exp Med*, 1994. **180**(4): p. 1553-8.
110. Koenig-Marrony, S., et al., *Natural autoreactive B cells in transgenic mice reproduce an apparent paradox to the clonal tolerance theory*. *J Immunol*, 2001. **166**(3): p. 1463-70.
111. Brackett, B.G., D.E. Killen, and M.D. Peace, *Cleavage of rabbit ova inseminated in vitro after removal of follicular cells and zonae pellucidae*. *Fertil Steril*, 1971. **22**(12): p. 816-28.
112. Elder, G.A., et al., *Enhancer trapping by a human mid-sized neurofilament transgene reveals unexpected patterns of neuronal enhancer activity*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994. **26**(1-2): p. 177-88.
113. Cooke, M.P., et al., *Immunoglobulin signal transduction guides the specificity of B cell-T cell interactions and is blocked in tolerant self-reactive B cells*. *J Exp Med*, 1994. **179**(2): p. 425-38.
114. Fulcher, D.A. and A. Basten, *Reduced life span of anergic self-reactive B cells in a double-transgenic model*. *J Exp Med*, 1994. **179**(1): p. 125-34.
115. Rui, L., et al., *ERK signaling is a molecular switch integrating opposing inputs from B cell receptor and T cell cytokines to control TLR4-driven plasma cell differentiation*. *J Immunol*, 2006. **177**(8): p. 5337-46.
116. Rui, L., et al., *Resistance to CpG DNA-induced autoimmunity through tolerogenic B cell antigen receptor ERK signaling*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(6): p. 594-600.
117. Mandik-Nayak, L., et al., *Regulation of anti-double-stranded DNA B cells in nonautoimmune mice: localization to the T-B interface of the splenic follicle*. *J Exp Med*, 1997. **186**(8): p. 1257-67.
118. Gay, D., et al., *Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance*. *J Exp Med*, 1993. **177**(4): p. 999-1008.
119. Silveira, P.A., et al., *The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors*. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(12): p. 3657-66.
120. Fulcher, D.A., et al., *The fate of self-reactive B cells depends primarily on the degree of antigen receptor engagement and availability of T cell help*. *J Exp Med*, 1996. **183**(5): p. 2313-28.
121. Chen, K. and A. Cerutti, *New insights into the enigma of immunoglobulin D*. *Immunol Rev*, 2010. **237**(1): p. 160-79.
122. Weintraub, B.C., et al., *Entry of B cell receptor into signaling domains is inhibited in tolerant B cells*. *J Exp Med*, 2000. **191**(8): p. 1443-8.
123. Healy, J.I., et al., *Different nuclear signals are activated by the B cell receptor during positive versus negative signaling*. *Immunity*, 1997. **6**(4): p. 419-28.
124. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(10): p. 944-50.
125. Acevedo-Suarez, C.A., et al., *Uncoupling of anergy from developmental arrest in anti-insulin B cells supports the development of autoimmune diabetes*. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 827-33.
126. Marino, E., et al., *Marginal-zone B-cells of nonobese diabetic mice expand with diabetes onset, invade the pancreatic lymph nodes, and present autoantigen to diabetogenic T-cells*. *Diabetes*, 2008. **57**(2): p. 395-404.
127. Rolf, J., et al., *The enlarged population of marginal zone/CD1d(high) B lymphocytes in nonobese diabetic mice maps to diabetes susceptibility region Idd11*. *J Immunol*, 2005. **174**(8): p. 4821-7.



128. Harris, D.P., et al., *Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 475-82.
129. Verdaguer, J., et al., *Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice*. J Exp Med, 1997. **186**(10): p. 1663-76.
130. Prochazka, M., et al., *NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice*. Diabetes, 1992. **41**(1): p. 98-106.
131. Joseph, J., et al., *IL-17 silencing does not protect nonobese diabetic mice from autoimmune diabetes*. J Immunol, 2012. **188**(1): p. 216-21.