UNIVERSIDAD DE GRANADA

Tesis doctoral - Programa de Doctorado en Biomedicina

Bank1 modula la diferenciación y el perfil molecular de las células B en el Lupus Eritematoso Sistémico

Doctorando

Gonzalo Gómez Hernández

Directoras de tesis

Dra. Marta E. Alarcón Riquelme

Dra. María Morell

Granada, enero 2025

GenYo

CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA DE **GENÓMICA** E **INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Gonzalo Gómez Hernández
ISBN: 978-84-1195-746-5
URI: https://hdl.handle.net/10481/103189

El doctorando **Gonzalo Gómez Hernández** y las directoras de la tesis **Dra. Marta E. Alarcón-Riquelme** y **Dra. María Morell**:

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de las directoras de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada (España), 24 de enero de 2025

Codirectora de la tesis:

Dra. Marta E. Alarcón-Riquelme

Firma:

Codirectora de la tesis:

Dra. María Morell

Firma:

Doctorando:

Gonzalo Gómez Hernández

Firma:

Criterios de calidad para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Publicación de un artículo científico en una revista de impacto en el campo de conocimiento de la tesis doctoral, firmada por el doctorando, y que incluya parte de los resultados de la tesis.

Gómez Hernández, G., Domínguez, T., Galicia, G., Morell, M., & Alarcón-Riquelme, M. E. (2024). *Bank1* modulates the differentiation and molecular profile of key B cell populations in autoimmunity. *JCI insight*, 9(19), e179417. https://doi.org/10.1172/jci.insight.179417

Este artículo ha sido publicado en la revista *JCI Insight* (ISSN: 2379-3708), con un factor de impacto, en el año 2024, de 6,33 ocupando la posición 27 de 189 en la categoría *Medicine, Research & Experimental*, en la edición SCI (del inglés *Science Citation Index*) del JCR (del inglés *Journal Citation Reports*). Esta publicación pertenece al cuartil Q1.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS 11
ÍNDICE DE TABLAS 15
ABREVIATURAS 17
RESUMEN 23
INTRODUCCIÓN 29
1. EL SISTEMA INMUNITARIO: GENERALIDADES 29
2. LA AUTOINMUNIDAD 34
3. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO 37
3.1 Epidemiología del LES 38
3.2 Etiología del LES. Factores de riesgo 40
3.3 Mecanismos inmunopatológicos del LES 44
3.3.1 Implicación de los receptores tipo Toll en el LES 47
3.3.2 Autoanticuerpos en el LES 52
3.3.3 Fenotipo de las poblaciones celulares en el LES 57
3.4 Modelos murinos de lupus 68
3.5 Sintomatología, signos y tratamientos actuales del LES 71
4. EL PAPEL DE BANK1 EN EL LUPUS Y EN LA AUTOINMUNIDAD 75
4.1 Asociación genética de *BANK1* con la autoinmunidad 76
4.2 El papel de BANK1 en la señalización de las células B 80
4.3 Mecanismos de BANK1 en modelos experimentales de enfermedad 85
5. CÉLULAS B ASOCIADAS A LA EDAD (AGE-ASSOCIATED B CELLS) 89
5.1 Caracterización y localización de las ABCs 89
5.2 Activación y diferenciación de las ABCs 92
5.3 El papel de las ABCs en la autoinmunidad 97
HIPÓTESIS 105
OBJETIVOS 109
METODOLOGÍA 113

1. MODELOS EXPERIMENTALES Y COMITÉ ÉTICO 114
2. EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO POR PCR 117
3. DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE AUTOANTICUERPOS EN SUERO MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNO-ENSAYO (ELISA).....118
4. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO 120
5. AISLAMIENTO Y ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS B *IN VITRO*.....123
6. INMUNOFLUORESCENCIA 124
7. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE CÉLULA ÚNICA (scRNA-Seq) 126
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....129
RESULTADOS.....133
1. EL PAPEL DE BANK1 EN LA AUTOINMUNIDAD MEIDADA POR EL TLR7 133
1.1 Evaluación de los niveles de autoanticuerpos 134
1.2 Análisis del fenotipo celular en los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ 138
2. EL EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BANK1 EN LAS ABCs.....146
2.1 Análisis de la frecuencia de ABCs en los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ.....147
2.2 Diferenciación *in vitro* de las ABCs 152
3. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LAS CÉLULAS B, EN EL CONTEXTO DE LA AUTOINMUNIDAD, MODULADO POR BANK1.....154
3.1 Clusterización de las diferentes subpoblaciones de células B mediante scRNA-Seq 154
3.2 El análisis del scRNA-Seq identifica a las ABCs como una población única y distintiva de células B 160
3.3 La ausencia de *Bank1* modifica el perfil transcripcional de las ABCs.....168
3.4 Los ratones TLR7.tg6 presentan un clúster de células B con estimulados por IFN, significativamente modificado por *Bank1* 172
3.5 Las ABCs surgen de un clúster cuyo fenotipo es de células B de la zona marginal y de memoria.....175
4. CORRELACIÓN ENTRE LAS ABCs Y LAS CÉLULAS T AUXILIARES EXTRAFOLICULARES 188
DISCUSIÓN 199

CONCLUSIONES.....215
ANEXOS.....219
1. ARCHIVO DE DATOS SUPLEMENTARIO.....219
2. PUBLICACIÓN ORIGINAL QUE RESPALDA ESTA TESIS.....221
3. PUBLICACIONES ADICIONALES.....222
4. FINANCIACIÓN.....222
BIBLIOGRAFÍA.....225

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Afectación multi-orgánica en el lupus eritematoso sistémico 35
Figura 2. Prevalencia mundial del lupus eritematoso sistémico por cada 100 000 habitantes 37
Figura 3. Modelo patogénico del lupus eritematoso sistémico 44
Figura 4. Modelo de las vías de señalización de los receptores TLR7 y TLR9 48
Figura 5. Etapas de desarrollo de las células B 58
Figura 6. Reacciones dentro de un centro germinal, en el contexto del LES 61
Figura 7. Estructura de los centros germinales 62
Figura 8. Integración de estudios humanos y murinos para el descubrimiento de nuevos mecanismos y fármacos para el LES 67
Figura 9. Estructura de la proteína BANK1 y sus homólogas 74
Figura 10. Estructura esquemática de BANK1 75
Figura 11. Modelo esquematizado de las diferentes vías de señalización en las que está implicado BANK1 82
Figura 12. Esquema del hipotético papel de las ABCs en el desarrollo del LES 89
Figura 13. Modelo de la activación y diferenciación de las ABCs 94
Figura 14. Principales características de las ABCs, comparando la situación habitual en un individuo sano con lo que sucede en una enfermedad autoinmune 99
Figura 15. Esquema de los modelos de autoinmunidad, mediada por el TLR7, empleados en este proyecto, y diseño experimental 114
Figura 16. Tasa de supervivencia de ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ 132
Figura 17. Niveles de autoanticuerpos en suero de ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ 133
Figura 18. Niveles de inmunoglobulinas en suero de ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ 135

Figura 19. Tamaño y peso de los bazos de los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ.....136
Figura 20. Análisis de las poblaciones celulares MZB y FOB en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ.....138
Figura 21. Análisis de la población de células plasmáticas en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ.....139
Figura 22. Análisis de las poblaciones celulares $CD4^+$ en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ 141
Figura 23. Análisis de las poblaciones celulares $CD8^+$ en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ 142
Figura 24. Optimización del proceso de gating para la caracterización de la población de las ABCs 144
Figura 25. Efecto de la deficiencia de *Bank1* en la frecuencia total de ABCs en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ.....146
Figura 26. Frecuencia de ABCs en edades tempranas 147
Figura 27. Efecto de la deficiencia de *Bank1* en la frecuencia total de ABCs en el modelo B6.*Sle1*.*yaa* 148
Figura 28. Efecto de la deficiencia de *Bank1* en la frecuencia total de ABCs IgG^+ e $IgG2c^+$ en los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ.....149
Figura 29. Cultivo y diferenciación *in vitro* de células B aisladas hacia el fenotipo de ABCs 151
Figura 30. Clusterización de las diferentes poblaciones celulares del bazo.....153
Figura 31. Clusterización de las diferentes poblaciones de células B 154
Figura 32. Expresión de los marcadores específicos de las diferentes subpoblaciones de células B en cada clúster 155
Figura 33. Comparativa de las proporciones de los diferentes clústeres de células B entre condiciones 156
Figura 34. Proporción de los diferentes clústeres de células B entre los distintos fenotipos 157

Figura 35. Las ABCs forman un clúster único diferenciado del resto de clústeres.....159
Figura 36. Selección de genes sobreexpresados en el clúster 7 (ABCs) 160
Figura 37. Perfil transcripcional del clúster 7 (ABCs) 161
Figura 38. Subclusterización del CL7 163
Figura 39. Niveles de expresión génica dentro de los subclústeres del CL7 164
Figura 40. Expresión génica diferencial (DEG) entre condiciones dentro del clúster 7.....167
Figura 41. Análisis de enriquecimiento de ontología génica del clúster 7 169
Figura 42. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 4 vs el resto de clústeres 171
Figura 43. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 3 vs el resto de clústeres 173
Figura 44. Trayectoria de la diferenciación hacía las ABCs del CL7.....175
Figura 45. Esquema de las etapas de desarrollo de las células B.....176
Figura 46. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 0 vs el resto de clústeres 177
Figura 47. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 5 vs el resto de clústeres 180
Figura 48. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 1 vs el resto de clústeres 182
Figura 49. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 6 vs el resto de clústeres 184
Figura 50. Efecto de la ausencia de *Bank1* en la estructura de los centros germinales en el bazo de los ratones del modelo TLR7.tg6.....188
Figura 51. Efecto de la ausencia de *Bank1* en las células B extrafoliculares, en los ratones del modelo TLR7.tg6 189
Figura 52. Efecto de la ausencia de *Bank1* sobre las células B T-bet$^+$ extrafoliculares en el bazo de los ratones del modelo TLR7.tg6.....190
Figura 53. Efecto de *Bank1* en la distribución de las células T-bet$^+$ extrafoliculares en el bazo de los ratones del modelo TLR7.tg6 191

Figura 54. Correlación entre la población de las ABCs y las células T auxiliares extrafoliculares 192
Figura 55. Modelo de una célula ABC de ratón, deficiente y suficiente en *Bank1*, en el contexto de la autoinmunidad 208

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de las asociaciones genéticas de los polimorfismos de *BANK1*..... 78
Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados en el genotipado de *Bank1* 116
Tabla 3. Condiciones para la amplificación del ADN genómico de *Bank1* mediante PCR ...116
Tabla 4. Lista de anticuerpos utilizados en el análisis multiparamétrico mediante citometría de flujo 120
Tabla 5. Lista de anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia del bazo.....123
Tabla 6. Lista de genes, o marcadores, específicos asignados para cada población celular 126
Tabla 7. Expresión génica diferencial del clúster 7 vs el resto de clústeres.....162
Tabla 8. Expresión génica diferencial del subclúster 7-0 vs el subclúster 7-1.....165
Tabla 9. Expresión génica diferencial del clúster 4 171
Tabla 10. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 4.....172
Tabla 11. Expresión génica diferencial del clúster 3 173
Tabla 12. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 3.....174
Tabla 13. Expresión génica diferencial del clúster 0 vs el resto de clústeres.....178
Tabla 14. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 0.....174
Tabla 15. Expresión génica diferencial del clúster 2 vs el resto de clústeres.....179
Tabla 16. Expresión génica diferencial del clúster 5 vs el resto de clústeres.....181
Tabla 17. Expresión génica diferencial del clúster 1 vs el resto de clústeres.....182
Tabla 18. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 1.....183
Tabla 19. Expresión génica diferencial del clúster 6 vs el resto de clústeres.....184
Tabla 20. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 6.....185

ABREVIATURAS

ABC	Célula B asociada a la edad (*age-associated B cell*)
ACK	Amonio-cloruro-potasio (*ammonium-chloride-potassium*)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AID	Deaminasa de citosina inducida por la activación (*activation-induced cytidine deaminase*)
AKT	*Protein kinase B*
ANA	Anticuerpo antinuclear (*anti-nuclear antibody*)
aNav	Célula B näive activada (*activated näive B cell*)
AP-1	Proteína de activación 1 (*activator protein 1*)
APC	Célula presentadora de antígenos (antigen-presenting cell)
AR	Artritis reumatoide
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASC	Célula productora de anticuerpos (*antibody secreting cell*)
atMBC	Célula B de memoria atípica (*atypical memory B cell*)
B1$^{-/-}$	*Bank1*$^{-/-}$
B6	C57BL/6
BAFF	Factor activador de las células B (*B-cell activating factor*)
BANK1	*B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*
BCAP	*B-cell adaptor protein*
BCR	Receptor de células B (*B-cell receptor*)
BLK	*B lymphoid kinase*
BSA	Seroalbumina bovina (*Bovine serum albumin*)
CD	Grupo de diferenciación (*cluster of differentiation*)
CG	Centro germinal
CIA	Artritis inducida por colágeno (*collagen-induced arthritis*)
CL	Clúster
CLE	Lupus eritematoso cutáneo (*cutaneous lupus erythematosus*)
CLL	Leucemia linfocítica crónica (*chronic lymphocytic leukemia*)
cMBC	Célula B de memoria clásica (*classical memory B cell*)
CSR	Recombinación del cambio de clase (*class-switch recombination*)
CVID	Inmunodeficiencia variable común (*common variable immunodeficiency*)
CYLD	*Cylindromatosis tumor suppressor lysine deubiquitinase*
D2	Delta 2

DAG	Diacilglicerol (*diacylglycerol*)
DAMP	Patrón molecular asociado al daño (*damage-associated molecular pattern*)
DC	Célula dendrítica (*dendritic cell*)
DD	Dominio de muerte (*death domain*)
DEG	Gen diferencialmente expresado (*differentially expressed gene*)
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DN2	Doble negativa 2 (*double negative 2*)
DPBS	*Dulbecco's phosphate-buffered saline*
dsDNA	ADN de doble cadena (*double stranded DNA*)
DSS	Sulfato sódico de dextrano (*dextran sodium sulfate*)
DZ	Zona oscura (*dark zone*)
EAE	*Experimental autoinmune encephalomyelitis*
EF	Extrafolicular
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
ERK1/2	*Extracellular signal-regulated kinase 1/2*
FBS	Suero fetal bovino (*fetal bovine serum*)
FDC	Células dendríticas foliculares (*follicular dendritic cells*)
FL	*Full-length*
FOB	Célula B folicular (*follicular B cell*)
GC	Centro germinal (*germinal center*)
GVHD	Enfermedad de injerto contra huésped (*graft-versus-host disease*)
GWAS	Estudios de asociación a nivel genómico (*genome-wide association study*)
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*)
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IKK	*Inhibitory-κB kinase*
IL	Interleuquina
IMQ	Imiquimod
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato (*inositol 1,4,5-triphosphate*)
IRAK	Quinasa asociada al receptor de IL-1 (*interleukin 1 receptor associated kinase*)
IRF	Factor regulador del interferón (interferón regulatory factor)
ISG	Gen estimulado por IFN (*interferón stimulated gene*)
ITAM	*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
ITGAM	*Integrin subunit alpha M*
JNK	*c-Jun N-terminal kinase*

LDL	*Low density lipoproteins*
LES	Lupus eritematoso sistémico
Log2FC	Logaritmo en base 2 del fold change (*logarithm base 2 of fold change*)
LZ	Zona clara (*light zone*)
MAL	*MyD88-adaptor-like protein*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MBC	Célula B de memoria (*memory B cell*)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*)
MRL-*lpr/lpr*	*Murphy Roths Large / lymphoproliferation*
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (*myeloid differentiation primary response 88*)
MZB	Célula de la zona marginal (*marginal zone B cell*)
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
NGS	Secuenciación de próxima generación (*next-generation sequencing*)
NK	*Natural killer*
NMDA	*N-methyl-D-aspartate*
NZB/W	*New Zealand Black and White*
O.D.	Densidad óptica (*optical density*)
OCT	*Optimal cutting temperatura*
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos (*pathogen-associated molecular pattern*)
PBS	*Phosphate-buffered saline*
PC	Célula plasmática (*plasma cell*)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)
PI3K	*Phosphoinositide 3-kinase*
PIP2	Inositol polifosfato 5-fosfatasa (*phosphatidylinositol biphosphate*)
PLC-γ2	*Phospholipase C gamma 2*
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptor*)
pSS	Síndrome de Sjögren primario (*primary Sjögren's síndrome*)
PTK	Proteína tirosina quinasa (*protein tyrosine kinase*)
RNP	Ribonucleoproteína (*ribonucleoprotein*)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)
RT-PCR	PCR tras transcripción inversa (*reverse transcriptase PCR*)
scRNA-Seq	Ensayo de secuenciación del ARN de célula única (*single cell RNA-sequencing*)

SEM	Error estándar de la media (*standard error of the mean*)
SER	Sociedad Española de Reumatología
SHM	Hipermutación somática (*somatic hypermutation*)
SLE	Lupus eritematoso sistémico (*systemic lupus erythematosus)*
SLE1	Gen de susceptibilidad del LES (SLE) 1
Sm	*Smith*
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (*single nucleotide polymorphism*)
snRNP	Ribonucleoproteína nuclear pequeña (*small nuclear ribonucleoprotein*)
SSc	Esclerosis sistémica (*systemic slcerosis*)
ssRNA	ARN de cadena sencilla (*single-stranded RNA*)
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción 4 (*signal transducer and activator of transcription*)
T7	TLR7.tg6
TAK1	*Transforming growth factor-β activated kinase 1*
TBS-T	Solución salina tamponada con Tris y Tween 20 (*Tris-buffered saline with Tween 20*)
Tefh	Células T auxiliar extrafolicular (*extrafollicular T helper cell*)
Tfh	Célula T auxiliar folicular (*follicular T helper cell*)
TIR	Receptor Toll/IL-1 (*Toll-Interleukin-1 receptor*)
TIRAP	Proteína adaptadora con dominio TIR (*TIR domain-containing adaptor protein*)
TLR	Receptor de tipo Toll (*Toll-like receptor*)
TLR7.tg6	Modelo transgénico 6 del TLR7
TMB	Peroxidasa 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TRAF6	*TNF receptor-associated factor 6*
TRAM	Molécula adaptadora relacionada con TRIF (*TRIF-related adaptor molecule*)
TRIF	Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR que induce el IFN-β (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*)
UMAP	Proyección bidimensional y uniforme (*uniform manifold approximation and projection*)
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)
WT	Silvestre (*wild-type*)
yaa	Acelerador de la autoinmunidad ligado al cromosoma Y (*Y-linked autoinmune accelerator*)

RESUMEN

RESUMEN

Los factores clave que contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes incluyen la predisposición genética y los desencadenantes ambientales. El lupus eritematoso sistémico (LES) es el ejemplo más representativo de una enfermedad autoinmune sistémica, que puede afectar a múltiples tejidos y órganos del cuerpo. El LES es una enfermedad compleja y heterogénea en su manifestación clínica, marcada por la hiperactivación de linfocitos y la presencia de autoanticuerpos, lo que dificulta tanto su diagnóstico como su tratamiento. A pesar de los avances en la comprensión de su patogénesis, la etiología del LES sigue siendo incierta, y solo unos pocos medicamentos están aprobados para su tratamiento.

En este contexto, los estudios genéticos han emergido como una herramienta prometedora para identificar las vías de señalización que promueven el desarrollo de la enfermedad. En nuestro grupo de investigación, hemos contribuido al conocimiento y comprensión del gen *BANK1* (del inglés *B-cell scaffold with ankyrin repeats 1*), identificado como un gen de susceptibilidad al LES. Este gen codifica para una proteína adaptadora, crucial en la señalización de las células B, especialmente en la vía del receptor endosomal TLR7. En estudios recientes, se ha demostrado que BANK1 interactúa con la molécula adaptadora MyD88 a través de su dominio TIR, y con TRAF6, desencadenando la producción de varias citoquinas proinflamatorias. Además, *Bank1* juega un papel crucial en la autoinmunidad mediada por los receptores TLR7 y TLR9 *in vivo*, destacando su influencia en la progresión de la enfermedad.

Recientemente, se ha identificado una subpoblación rara de células B, conocida como células B asociadas a la edad (ABCs, del inglés *age-associated B cells*), que desempeña un papel significativo en la respuesta inmune, tanto en ratones como en humanos. Estas células presentan un origen, fenotipo, perfil transcripcional y funciones únicas, y tienden a acumularse con el envejecimiento. Las ABCs tienen un papel fundamental en la autoinmunidad, y se cree que su proliferación está impulsada por la señalización a través del

TLR7, ya que se activan y proliferan de manera robusta tras la estimulación de este receptor, secretando autoanticuerpos en el proceso.

Por todo ello, dada la importancia de *Bank1* en la vía del receptor TLR7 y el impacto que tiene esta vía de señalización en las ABCs, el presente trabajo tuvo como objetivo principal definir el papel de *Bank1* en la aparición de las diferentes subpoblaciones de células B, con un enfoque particular en las ABCs, en dos modelos murinos de lupus dependientes del TLR7. Para ello, se han empleado dos modelos murinos previamente cruzados con ratones knockout para *Bank1*: un modelo transgénico TLR7.tg6 y un modelo inducido con Imiquimod. Ambos modelos se caracterizan por la sobreexpresión del gen *Tlr7*, siendo crucial el aumento en el número de copias de este gen para el desarrollo y progresión de la enfermedad en dichos animales.

La ausencia de *Bank1* mejoró el fenotipo de la enfermedad en ambos modelos, disminuyendo los niveles de autoanticuerpos en suero, así como el tamaño de los bazos, o esplenomegalia. La deficiencia de *Bank1* provocó una reducción significativa en los niveles de ABCs, afectando también a otras poblaciones de células B. Para profundizar en la vía de diferenciación de estas células y comprender el impacto de *Bank1* en las subpoblaciones de células B, se llevó a cabo un ensayo transcriptómico de célula única (scRNA-Seq). En el modelo TLR7.tg6, se identificaron 10 clústeres distintos de células B, incluyendo un grupo específico de ABCs, el cual se redujo en los ratones deficientes en *Bank1*. En ausencia de *Bank1*, las ABCs mostraron un perfil de expresión génica antiinflamatorio, mientras que en los ratones enfermos *Bank1*$^{+/+}$, estas células exhibieron un fenotipo mayormente proinflamatorio. Los análisis de trayectoria celular revelaron que las ABCs se originan a partir de células B de la zona marginal y de células B de memoria, adquiriendo finalmente características transcripcionales asociadas con células de memoria atípicas y de células plasmáticas. Además, la deficiencia de *Bank1* normalizó la presencia de células B naïve, casi ausentes en los ratones con lupus. Otro hallazgo a destacar fue que la ausencia de *Bank1* también redujo de manera significativa un grupo celular distintivo caracterizado por la

expresión de genes de respuesta al interferón (IFN). Todos estos resultados en conjunto destacan el papel crucial de *Bank1* en el desarrollo de las ABCs, influyendo en las etapas tempranas de las células B hacia su diferenciación, y en la presencia de células B que contienen genes estimulados por el IFN, ambas poblaciones determinantes para el desarrollo de la enfermedad.

Finalmente, en este trabajo se evaluó la implicación de *Bank1* en la localización de las ABCs y su posible interacción con otras poblaciones celulares. Nuestros resultados sugieren que las células ABCs se encuentran ubicadas en el área extrafolicular, donde podrían desempeñar un papel crucial en la producción de autoanticuerpos. Su presencia en esta zona específica se vio reducida en ausencia de *Bank1*. En todos los grupos de ratones, observamos que existía una correlación positiva y significativa entre el número de ABCs y el número de células T auxiliares extrafoliculares (Tefh). Este hallazgo sugiere una posible interacción y activación entre ambos tipos celulares, contribuyendo así a la autoinmunidad.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El SISTEMA INMUNITARIO: GENERALIDADES

El sistema inmunitario es esencial para nuestro organismo, ya que desempeña un papel fundamental en la prevención de infecciones y la lucha contra los agentes patogénicos. Este sistema está compuesto por una compleja red de órganos y tipos celulares que, si es completamente funcional, puede diferenciar el tejido propio y sano de sustancias extrañas y nocivas provenientes del exterior, como virus, bacterias y otros parásitos. En caso de detectarse e identificarse una sustancia maligna, se activa una respuesta inmunológica, un ataque complejo y eficaz para proteger al cuerpo de los invasores.

La defensa del sistema inmunológico implica una interacción coordinada entre diversos procesos biológicos, organizados en dos fases distintas y claramente definidas: la defensa innata, que actúa de manera inmediata, pre-programada e inespecífica, reconociendo patrones moleculares comunes; y la defensa adaptativa, respuesta específica que reconoce los epítopos únicos de un antígeno [1]. Ambos procesos difieren en su momento de iniciación, su especificidad y su capacidad para recordar infecciones pasadas. También emplean diferentes métodos de reconocimiento y mecanismos efectores. Sin embargo, todos los procesos están altamente relacionados e intercomunicados entre sí y la calidad inicial de la respuesta innata dirigirá las funciones adaptativas posteriores [2].

La primera línea de defensa incluye las barreras de la superficie corporal, como la piel, y los epitelios mucosos de los tractos respiratorio, gastrointestinal y reproductivo, que previenen la entrada de agentes infecciosos a nuestro organismo. Sin embargo, la mayoría de los mecanismos de defensa del huésped son inducibles tras la infección y, por lo tanto, su activación requiere del reconocimiento del patógeno [3]. La inmunidad innata reconoce estructuras moleculares, a menudo compartidas por muchas clases de microbios, que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen-*

associated molecular patterns) [4]. El reconocimiento de estas moléculas es llevado a cabo por un gran abanico de tipos celulares, entre los que destacan los macrófagos, neutrófilos y las células dendríticas. En el momento de la infección, se inicia el reclutamiento de estas poblaciones celulares, generándose así un proceso de inflamación [5]. Debido al daño causado por estas infecciones, o por la propia inflamación, se genera lo que se conoce como apoptosis inmunológica, una reacción que libera moléculas endógenas producidas por las células dañadas o muertas. El sistema inmunitario innato también reconoce a este conjunto de sustancias, denominadas patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, del inglés *damage-associated molecular patterns*) [6].

Las células cuentan con una variedad de receptores encargados de detectar estas moléculas PAMPs y DAMPs. Estos receptores, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*), se encuentran en la superficie celular, en vesículas o en el citoplasma y están presentes en una amplia gama de tipos celulares. De entre los PRRs que existen, destacan los receptores de tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptor*) por su implicación a la hora de desencadenar respuestas inmunológicas efectivas. Esta gran familia de receptores TLR son proteínas transmembrana de tipo I que se expresan mayoritariamente en la superficie celular, mientras que una minoría se encuentra en los compartimentos endosomales. Los receptores TLR están involucrados en la unión del ligando y contienen un dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR, del inglés *Toll-Interleukin-1 receptor*) esencial para iniciar el proceso de señalización celular [7]. Una vez iniciada la respuesta y activados los receptores correspondientes mediante la unión del ligando, se desencadenan las distintas cascadas de señalización intracelular. Este proceso implica el reclutamiento de proteínas adaptadoras y la activación de factores de transcripción que, a su vez, inducen la expresión y producción de citoquinas. Estas moléculas de señalización extracelular retroalimentan positivamente el proceso inflamatorio, y resultan fundamentales para la defensa inmunitaria innata [8].

Con el fin de que se den las propiedades fundamentales de la inmunidad adaptativa, tales como la especificidad, la memoria, y la capacidad de discriminar lo propio de lo ajeno, es necesario procesar y presentar los antígenos a los linfocitos. El proceso de presentación de antígenos se lleva a cabo a través de la participación de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*), las cuales se expresan en toda célula nucleada, como es el caso de los MHC de clase I, y en la superficie de las células presentadoras de antígenos (APC, del inglés *antigen-presenting cell*), como es el caso de los MHC de clase II [9]. Este proceso, junto con la liberación de citoquinas, actúa de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Se desencadena entonces la activación de la defensa adaptativa, la cual está mediada principalmente por los linfocitos T y los linfocitos B.

Los linfocitos T experimentan su primera activación en los órganos linfoides periféricos, o secundarios, donde tienen la oportunidad de interaccionar, mediante sus receptores, con los antígenos presentados por las APCs. La activación de los linfocitos T desencadena diferentes respuestas efectoras, lo que se conoce como inmunidad celular. Por un lado, las células T $CD8^+$, o células citotóxicas, responden a antígenos presentados por moléculas MCH de clase I, y están involucradas en el reconocimiento específico y eliminación de aquellas células diana que estén infectadas o dañadas a través de la liberación de gránulos citotóxicos. Por otro lado, las células T $CD4^+$, también conocidas como células auxiliares, son activadas por moléculas MHC de clase II. Estas células organizan respuestas dirigidas y coordinadas a través de su capacidad para reclutar y asistir a múltiples efectores del sistema inmunológico, como los linfocitos B, mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas [10].

La activación de los linfocitos B, en los órganos linfoides secundarios, desencadena un proceso conocido como inmunidad humoral. A través de sus receptores principales (BCR, del inglés *B-cell receptor*), estas células se unen a antígenos específicos y los procesan en su interior, donde se generan las señales necesarias para su proliferación y diferenciación en

células plasmáticas productoras de anticuerpos y en células de memoria. En los centros germinales, las células B sufren un proceso conocido como hipermutación somática y maduración de la afinidad, que implica cambios en los receptores de inmunoglobulinas de las células B, permitiendo que algunos de ellos adquieran una mayor afinidad por el antígeno. Como resultado, las células B diferenciadas comienzan a producir millones de copias de anticuerpos con fragmentos específicos de unión a un antígeno en concreto. Estos anticuerpos poseen la capacidad de neutralizar toxinas y recubrir agentes infecciosos, lo que a su vez permite su identificación por los mediadores inflamatorios y así promover la fagocitosis y lisis microbiana [11]. Además, durante esta respuesta, también se generan células B de memoria, con una vida media más prolongada, las cuales expresan receptores de anticuerpos específicos para el antígeno dado, pero no secretan anticuerpos [12]. La memoria inmunológica se logra gracias a la capacidad del sistema para recordar y reconocer antígenos previamente encontrados. Esto permite una activación más rápida y eficiente para producir células plasmáticas productoras de anticuerpos frente a una segunda exposición al mismo antígeno.

Las estructuras encargadas de la producción y maduración de las células inmunitarias y la generación de respuestas inmunológicas específicas se denominan órganos linfoides. Estos órganos incluyen el timo, la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y el tejido linfoide asociado a las mucosas. Cada órgano tiene una función específica en el sistema y todos trabajan en conjunto para proteger al organismo de las infecciones y enfermedades. El timo y la médula ósea son los órganos primarios donde se producen y maduran los linfocitos T y las células precursoras de las células sanguíneas, incluyendo los linfocitos B. Los ganglios linfáticos son pequeños nódulos distribuidos por todo el cuerpo que contienen un gran repertorio de células inmunitarias, incluyendo linfocitos, macrófagos y células dendríticas. Los ganglios linfáticos son importantes para la captura y presentación de antígenos y la activación de las respuestas inmunológicas. El bazo es el órgano encargado de filtrar la sangre y eliminar los antígenos y células dañadas. En el bazo se producen y almacenan las células inmunitarias, incluyendo los linfocitos B y T, y es el sitio más importante para la

generación de respuestas inmunológicas contra los antígenos sanguíneos [13]. Este proyecto de tesis se enfocará en el bazo, así como en el análisis detallado de las diferentes poblaciones celulares que integran su complejo sistema de defensa.

2. LA AUTOINMUNIDAD

La función más importante del sistema inmunitario es la de reconocer antígenos extraños y proteger al huésped de agentes infecciosos. Esta función está determinada por una compleja red de órganos y diferentes tipos celulares que trabajan de manera eficaz y coordinada, a fin de mantener la homeostasis y la eficacia de la respuesta inmunológica. No obstante, existen situaciones que pueden alterar la sinergia de este sistema y poner en riesgo su adecuado funcionamiento.

La propiedad fundamental que tiene que darse para que nuestro organismo funcione correctamente es la tolerancia inmunológica. Este proceso incluye una serie de mecanismos que previenen que el sistema inmunológico genere respuestas frente a un antígeno, inducidas por el contacto previo con dicho antígeno. El estado activo de falta de respuesta a antígenos propios del organismo, en un esfuerzo por prevenir la hiperreactividad destructiva del sistema inmunitario, se denomina tolerancia frente a lo propio. Este proceso consiste en la eliminación de clones de linfocitos autorreactivos, durante su etapa de desarrollo, con el fin de evitar que se vuelvan completamente inmunocompetentes. En los órganos linfoides periféricos, se desencadenan diversos mecanismos para inhibir la respuesta inmunitaria contra los propios tejidos del organismo. Estos mecanismos incluyen la anergia, que implica la ausencia de respuesta funcional, la supresión celular y la deleción, que conlleva la muerte celular apoptótica. El resultado del fracaso en los mecanismos de tolerancia hacia los antígenos propios viene dado cuando los linfocitos autorreactivos evaden estos mecanismos, se activan y desencadenan respuestas inmunitarias anormales y desmedidas, lo que conlleva a la generación de autoanticuerpos que atacan a los tejidos sanos. Estas respuestas adversas darían como resultado el inicio del proceso conocido como autoinmunidad, y si persisten en el tiempo y se cronifican, pueden resultar en enfermedades autoinmunes [14].

Los principales factores que contribuyen al desarrollo de la autoinmunidad son la propensión génica y los desencadenantes ambientales, como las infecciones y la lesión tisular [15]. Existen una gran cantidad de estudios de asociación a nivel genómico (GWAS, del inglés *genome-wide association study*) que han indicado la posible implicación de múltiples polimorfismos genéticos en diversas enfermedades autoinmunes. La mayor parte de estos polimorfismos se ubican en las regiones reguladoras de los genes, cuyos productos se consideran que tienen funciones relevantes en el desarrollo de las respuestas inmunitarias [16]. También hay factores externos que contribuyen en la generación de estos trastornos. Ciertas infecciones virales y bacterianas se han relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes [17, 18]. Las radiaciones ultravioletas (UV), por ejemplo, pueden tener un papel perjudicial para la piel y generar trastornos a nivel cutáneo [19]. También existe un reciente interés por la microbiota intestinal ya que hay evidencias de que tiene un papel importante en la regulación del sistema inmunológico del huésped [20]. Incluso el estrés crónico puede afectar al sistema inmunológico de una manera que podría desencadenar estos trastornos. Las hormonas del estrés, como el cortisol, pueden alterar el equilibrio de las células inmunológicas y aumentar la inflamación de los tejidos [21].

Las enfermedades autoinmunes abarcan más de ochenta trastornos crónicos, recurrentes, progresivos e incluso letales, que se caracterizan por tener reacciones inflamatorias sistémicas, o específicas de un órgano [22]. En cuanto a las primeras, cabe destacar el lupus eritematoso sistémico (LES o SLE, del inglés *sistemic lupus erythematosus*) [23], como una de las enfermedades más relevantes, la cual se sitúa como foco central de este proyecto de tesis y que trataremos en detalle más adelante. Otros ejemplos de trastornos inmunológicos sistémicos son: la artritis reumatoide (AR o RA, del inglés *rheumatoid arthritis*) [24] o el síndrome de Sjögren [25]. Ejemplos de enfermedades órgano-específicas son la esclerosis múltiple [26] o la diabetes mellitus de tipo 1 [27].

Se estima que al menos el 5% de la población en países desarrollados presenta alguna enfermedad autoinmune, y su incidencia está en aumento. Muchas de estas enfermedades

son frecuentes en personas de entre veinte y cuarenta años de edad. Además, son más prevalentes en mujeres que en hombres, siendo mujeres aproximadamente el 80% de todos los pacientes diagnosticados con un trastorno autoinmune [28]. Las enfermedades autoinmunes son extremadamente heterogéneas y conllevan una carga significativa de morbilidad y mortalidad. Pueden manifestarse de forma clásica o compartir múltiples características, lo que dificulta el diagnóstico debido a la presencia de una combinación de síntomas en los pacientes [29].

En este trabajo se explorará el LES y, en particular, una subpoblación de linfocitos B y el papel fundamental que un gen específico ejerce sobre estas células. El objetivo principal de esta tesis es conocer mejor esta afección y los mecanismos de la autoinmunidad para abordar nuevas estrategias terapéuticas en el futuro.

3. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

En el siglo XIII se utilizó por primera vez el término “lupus”, proveniente del latín, para catalogar una enfermedad cuya característica principal era la presencia de erosiones cutáneas en la cara que asemejaban la mordida de un lobo. Fue en el siglo XIX cuando el dermatólogo francés Cazenave usó el término “lupus eritematoso” para describir una erupción cutánea que se parecía a un eritema facial en forma de mariposa. El término “sistémico” se agregó años más tarde, cuando se reconoció que el lupus no sólo afectaba a la piel, sino que también podía afectar a los órganos internos como el bazo, los riñones, el corazón, los pulmones y el cerebro, entre otros (**Figura 1**) [30].

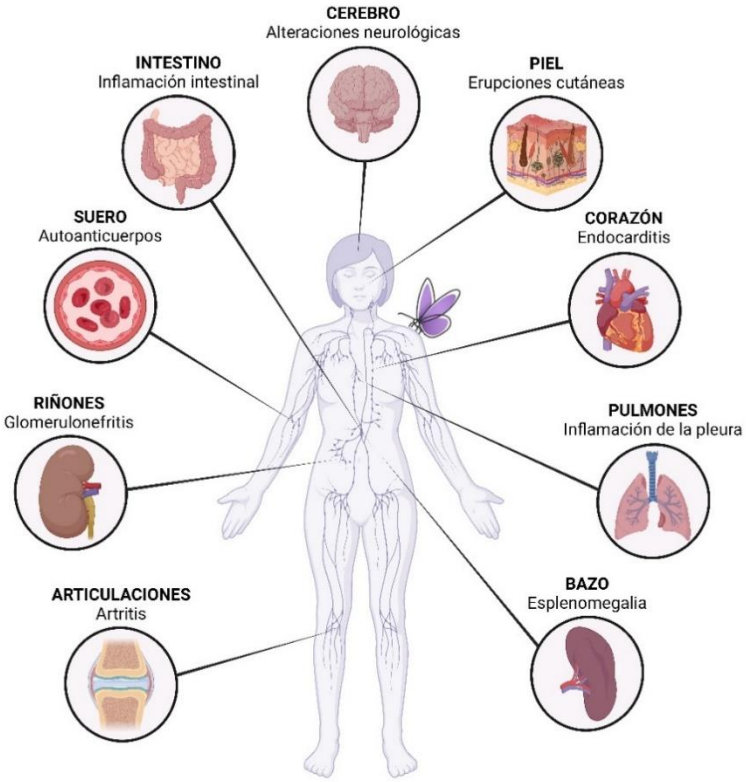

Figura 1. Afectación multi-orgánica en el lupus eritematoso sistémico. La inflamación en el LES puede afectar a la piel (erupciones), al corazón (inflamación del endocardio), a los pulmones (inflamación de la pleura), al bazo (esplenomegalia), a las articulaciones (artritis), a los riñones (glomerulonefritis), al intestino (inflamación de las paredes intestinales), al sistema nervioso central (trastornos neuropsiquiátricos) y, por último, a la presencia de anticuerpos anti-nucleares en el suero de la sangre. Imagen adaptada de [31], y modificada en *BioRender*.

El LES es el claro exponente de enfermedad autoinmune sistémica, con un impacto potencial en múltiples tejidos y órganos del cuerpo, y con una amplia diversidad de alteraciones inmunológicas que se pueden detectar en quienes lo padecen. Es una enfermedad compleja y heterogénea en su presentación clínica, caracterizada por la hiperactivación de los linfocitos y la presencia de autoanticuerpos, lo que hace difícil su diagnóstico y tratamiento. Se ha demostrado que está asociada con una desregulación tanto del sistema inmunológico innato como del adaptativo, lo que contribuye a la inflamación crónica y exacerbada.

3.1 Epidemiología del LES

La epidemiología del LES varía significativamente en todo el mundo y está influenciada por diversos factores, como la edad, el sexo y la ubicación geográfica de la población. Debido a estas diferencias, las estimaciones de la prevalencia y la incidencia del LES pueden variar considerablemente en diferentes países y regiones. Además, las tendencias de estas estimaciones no están unificadas entre los estudios, y hay escasez de datos epidemiológicos en países en vías de desarrollo [32-34].

Se estima que la incidencia mundial del LES es de alrededor de 5,14 por cada 100 000 personas en un año, y que cada año se diagnostican alrededor de 0,40 millones de casos nuevos. Sin embargo, esta cifra varía significativamente según la región y el país. Por ejemplo, en varios estudios se ha visto que la incidencia del LES en América del norte es mucho más alta que en Europa, Asia y Sudamérica, y Polonia tiene la tasa más alta de incidencia en todo el mundo. Por otro lado, Kazajistán tiene la tasa de incidencia más baja. La prevalencia global del LES en la población general se estima en 43,7 casos por cada 100000 personas, lo que equivale a una población afectada de 3,41 millones de personas. Los números más altos se registran en Norteamérica y en países como Emiratos Árabes Unidos, Barbados, Cuba y Brasil. Por otro lado, la prevalencia más baja se registra en Argentina [32, 33] (**Figura 2**). Las diferencias étnicas también afectan a la incidencia y

prevalencia del LES. Se ha observado que las tasas son más altas en poblaciones negras y más bajas en caucásicos, mientras que los grupos étnicos asiáticos e hispanos se encuentran en un punto intermedio [35, 36]. En España, en base a un estudio realizado por la Sociedad Española de Reumatología (SER), la prevalencia del LES se estima en 90 por cada 100 000 habitantes, [37, 38].

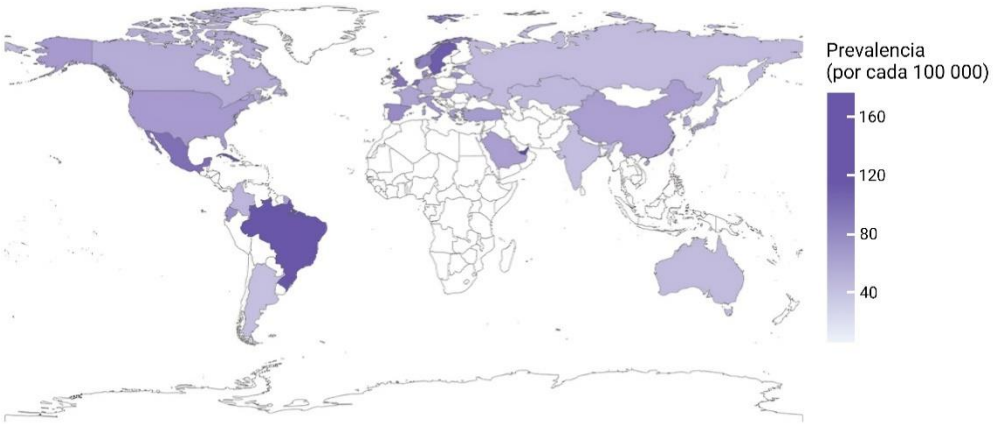

Figura 2. Prevalencia mundial del lupus eritematoso sistémico por cada 100 000 habitantes. Imagen adaptada de [33], y modificada en *BioRender*.

El género se presenta como el factor de riesgo más relevante en el desarrollo del LES, siendo su frecuencia significativamente mayor en mujeres en comparación con los hombres. Los estudios evidencian que la proporción de mujeres afectadas por el LES es mayor al 90%. En consecuencia, las tasas de incidencia y prevalencia de la enfermedad en hombres son alrededor de una décima parte en relación con las mujeres, con una razón mujer-hombre de 9:1 [39, 40]. Esto puede estar relacionado con la presencia del segundo cromosomas X en mujeres, así como con las diferencias en los niveles hormonales de estrógenos, los cuales pueden modular las respuestas inmunitarias [41, 42].

A pesar de que el LES puede afectar a personas de todas las edades, es más prevalente en el rango de edad de entre 20 y 45 años, especialmente en la edad fértil de las mujeres [43, 44]. En un 10-20% de los casos, la enfermedad se desarrolla en la infancia, lo que puede estar relacionado con una mayor incidencia de complicaciones renales, neuropsiquiátricas y

cardiopulmonares en esta población [45, 46]. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se observa un pico de incidencia en la edad que difiere entre mujeres y hombres. En mujeres, el pico de incidencia varía entre los 30 y los 70 años. En hombres, el pico de incidencia se observa más tarde, entre los 50 y los 70 años [47]. La tasa de supervivencia de los pacientes con LES en países en vías de desarrollo es inferior a la de los países desarrollados e industrializados, debido a una mayor mortalidad, una intervención deficiente y la presencia de comorbilidades, incluyendo las infecciones [48]. Sin embargo, en general, el aumento en la mortalidad sigue siendo una característica inherente al lupus. Los pacientes con LES tienen un riesgo de mortalidad de dos a cinco veces mayor que la población general [32, 49].

La complejidad de los síntomas y el desafío que representa el diagnóstico dificultan la realización de estudios epidemiológicos del LES. La variación en la epidemiología de esta enfermedad se asocia no sólo con factores genéticos, sino también con factores ambientales, sociodemográficos y socioculturales, entre los que destacan la educación, el acceso a la atención médica, la etnia, o el cumplimiento con los medicamentos prescritos [48, 50].

3.2 Etiología del LES. Factores de riesgo

A pesar de los avances significativos en la investigación del LES, la causa exacta de esta enfermedad crónica y autoinmune aún no se conoce con certeza. Si bien se sabe que se produce por una interacción compleja entre factores genéticos, ambientales e inmunológicos, los mecanismos precisos que desencadenan dicha enfermedad siguen siendo un misterio.

A lo largo del tiempo, se han utilizado diferentes técnicas para identificar polimorfismos de nucleótido único (SNPs, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) y otros tipos de variantes genéticas que se asocian con el LES y otras enfermedades autoinmunes. A partir de la década

de 1970, se comenzaron a realizar numerosos estudios genéticos de pacientes con LES en diversas poblaciones. En ellos, se identificaron varios loci de susceptibilidad que estaban asociados con la enfermedad. Los primeros métodos fueron los estudios de clonación posicional y análisis de ligamiento, enfoques tradicionales usados para identificar las regiones cromosómicas en las que se encuentran los genes de interés, y estudiar la coherencia de la transmisión de una enfermedad con la herencia de marcadores genéticos en una familia [51, 52]. Estas, junto con otras técnicas, han ido evolucionando con el tiempo y se han vuelto cada vez más precisas y efectivas gracias a los avances en la tecnología y la comprensión de la biología molecular. Cabe destacar una de ellas por su amplio uso en la investigación, como es el estudio de asociación del genoma completo, o GWAS, en el que se examinan variantes genéticas comunes, o SNPs, en todo el genoma de grandes grupos de individuos, tanto afectados (casos) como no afectados (controles). Los GWAS han permitido la identificación de cientos de variantes genéticas relacionadas con enfermedades complejas [51, 53, 54]. Otras técnicas avanzadas, como la secuenciación de próxima generación (NGS, del inglés *Next-Generation Sequencing*) o la secuenciación del exoma, han demostrado ser útiles para la identificación de variantes genéticas raras [55, 56]. A pesar de estos avances, se ha observado que la variabilidad genética identificada hasta el momento solo representa una fracción de la heredabilidad total del LES, y que los efectos individuales son modestos en general [52, 57-59].

Los estudios familiares y de gemelos han evidenciado la existencia de agregación familiar en el LES, observándose una mayor concordancia entre gemelos monocigóticos que entre gemelos dicigóticos [60, 61]. Esto sugiere un importante papel de los factores genéticos o ambientales compartidos en su patogénesis. La heredabilidad del LES se estima alrededor del 50%, lo que indica una fuerte contribución de los factores genéticos en su desarrollo [62]. Por ende, los esfuerzos para comprender la patogénesis de esta enfermedad se centran en los factores genéticos, habiéndose identificado a día de hoy más de 30 loci de susceptibilidad para esta enfermedad mediante análisis de GWAS [63].

La primera asociación genética que se realizó, mediante estudios de caso-control, fue una serie de alelos del complejo MHC, que se identificaron como factores de riesgo del LES. En esta región del genoma humano, que contiene más de 200 genes con funciones inmunológicas, se encontraron siete alelos HLA-DR de clase II que estaban asociados de manera significativa con el LES [64, 65]. El mecanismo por el cual los alelos HLA-DR aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad aún es objeto de estudio. Se cree que los alelos HLA-DR pueden influir en la selección y enriquecimiento de células del sistema inmunitario mediante la alteración en la presentación de péptidos antigénicos, lo que resultaría en una activación y respuesta anómala de los linfocitos B y T [66, 67]. En los años siguientes, numerosos grupos de investigación comenzaron a identificar varios genes de susceptibilidad, los cuales aumentan el riesgo al desarrollo de la enfermedad. Se ha demostrado que ciertas variantes genéticas del transductor de señal y activador de la transcripción 4 (STAT4, del inglés *Signal Transducer And Activator Of Transcription 4*) [68] y de la integrina Mac-1 (ITGAM, del inglés *Integrin Subunit Alpha M*) [69] se asocian con un mayor riesgo de desarrollar el LES, lo que sugiere un papel importante de estas variantes genéticas en la influencia del fenotipo de la enfermedad. STAT4, junto con STAT1, está involucrado en la señalización de citoquinas inflamatorias, en la diferenciación de células T, y en la producción de IFN-γ e IL-17 [68, 70]. Por su parte, ITGAM está implicado en la interacción celular y la regulación de citoquinas inflamatorias en macrófagos y otros tipos celulares. Variantes genéticas de esta molécula podrían determinar una integrina disfuncional, incapaz de mediar la adhesión celular a los ligandos de integrina y la fagocitosis [69, 71]. La disfunción en la vía del interferón (IFN) también se ha identificado en más de la mitad de los pacientes con LES, lo que sugiere su papel en la patogénesis de la enfermedad [72]. La vía del IFN está involucrada en varios mecanismos patológicos, que involucran la activación y supervivencia de las células B y T. Además, los genes reguladores del IFN (*Irfs*, del inglés *Interferon regulatory factors*) también se han asociado con la susceptibilidad al LES. Estos genes codifican para factores de transcripción involucrados en la expresión de citoquinas proinflamatorias por un gran abanico de tipos celulares [54, 73]. Otros ejemplos de variantes genéticas de interés, asociadas con la susceptibilidad al LES, son: los genes del

complemento C1q, C2 y C4 [74], *FcγRIIA* y *FcγRIIIA* [75], *Pdcd1* [76], *Irak1* [77], *Lyn* [78] o *Blk* [79].

De entre todos los genes implicados en el LES, destacamos a *Bank1* (del inglés *B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*) [80] como uno de los más relevantes debido a su papel crucial en la señalización de las células B. La alta implicación de *Bank1* en la vía del TLR7, la cual activa los factores de transcripción NFκB (del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) y los factores reguladores del IFN, promueve la activación de las células B y la inflamación, características indispensables en la patogénesis del LES [81]. Un estudio detallado reveló dos variantes genéticas, siendo el polimorfismo mayor (*full-length*) identificado como de riesgo y confirmado en múltiples grupos de pacientes, lo que lo posicionó como una asociación genética bien establecida para la enfermedad [80, 82-84]. En este trabajo de tesis se profundizará en la función de *Bank1* y su papel en el desarrollo de la enfermedad. Su capacidad para regular el sistema inmunológico lo convierte en un objetivo de gran interés para la investigación en el campo de la autoinmunidad.

Además de los factores genéticos, es ampliamente reconocido que los factores ambientales pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo del LES. Entre estos factores, la exposición a la radiación ultravioleta (UV) es uno de los más claros y peligrosos. La exposición prolongada a la luz solar, especialmente durante horas de alta intensidad, se ha relacionado con la aparición y exacerbación de los síntomas de la enfermedad [85]. La radicación UV es capaz de penetrar en la capa dérmica más profunda e inducir la apoptosis de los queratinocitos a través del daño oxidativo mitocondrial, que puede resultar en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*). Esta inflamación dérmica, seguida de la incapacidad para eliminar los restos celulares y la deposición de complejos inmunitarios en la membrana basal, daría como inicio a un subtipo de enfermedad conocido como lupus eritematoso cutáneo (CLE, del inglés *cutaneous lupus erythematosus*) [19, 85, 86]. Diversos estudios han respaldado la hipótesis de que ciertas infecciones y virus, tanto en etapas tempranas como tardías de la vida, pueden tener un

papel fundamental en la patogénesis del LES. Estos factores de riesgo pueden actuar como desencadenantes para la producción de autoanticuerpos y el daño tisular, y se cree que interactúan con factores genéticos y ambientales para contribuir al desarrollo de la autoinmunidad [87]. Infecciones víricas como es el caso del virus de Epstein-Barr [17] o infecciones bacterianas como es el caso de la bacteria Yersinia Enterocolítica [18] formarían parte de este grupo de factores. Existen evidencias crecientes que indican que las bacterias comensales presentes en el tracto gastrointestinal, es decir, la microbiota intestinal, podrían influir en el desarrollo del LES. Varios trastornos se inician por respuestas inmunitarias desreguladas a los microbios comensales intestinales. La disbiosis, que es el resultado de anomalías en la comunidad microbiana del organismo, se observa en pacientes con enfermedades autoinmunes [20, 88, 89]. También se han realizado varios estudios epidemiológicos que han demostrado una relación significativa entre esta enfermedad con otros factores ambientales, entre ellos: la exposición a sílice cristalina, a la polución o a diferentes metales pesados del aire [90]; el consumo de alcohol y el tabaquismo actual [91]; y los estrógenos exógenos, como los anticonceptivos [92].

En resumen, aunque se han realizado importantes avances en la investigación del LES, su causa exacta sigue siendo un misterio y todavía existen vacíos de conocimiento con respecto a los posibles mecanismos por los cuales varios de estos factores podrían estar implicados en la patogénesis del LES. Una vez que la enfermedad ha comenzado, se desencadenan una serie de mecanismos que contribuyen a su progresión. En este sentido, resulta fundamental entender no solo la etiología del LES, sino también los mecanismos que subyacen a su fisiopatología.

3.3 Mecanismos inmunopatológicos del LES

Como ya hemos visto, el LES es una enfermedad compleja que aún no se comprende completamente, en la cual factores genéticos y ambientales contribuyen a una alteración de

la tolerancia y a la consiguiente generación de linfocitos B y T autorreactivos. Esta enfermedad se caracteriza por una producción anormal de autoanticuerpos que atacan diversos tejidos y órganos del cuerpo, como resultado de una respuesta inmunitaria desregulada y disfuncional. Los mecanismos patológicos del LES implican una interacción compleja entre células del sistema inmunológico, sus vías de señalización, y la producción de citoquinas y autoanticuerpos. Los linfocitos B y T autorreactivos se activan en presencia de antígenos propios y generan una respuesta inflamatoria crónica, que da lugar al daño tisular y a la disfunción de múltiples órganos. Por lo tanto, el conocimiento de estos mecanismos es fundamental para poder entender la actividad y progresión de esta enfermedad, con el objetivo último de desarrollar terapias efectivas y específicas para el tratamiento del LES.

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es un proceso fundamental en la homeostasis de un tejido normal. Durante este proceso, la membrana celular se desestructura y se libera material fragmentado, incluyendo antígenos nucleares. La aceleración de la apoptosis en las células circulantes, así como la deteriorada eliminación de los cuerpos apoptóticos, puede aumentar la cantidad de antígenos nucleares presentados a los linfocitos [93]. Estos fragmentos suelen ser rápidamente eliminados en condiciones normales, resultando inaccesibles para el sistema inmune, sin embargo, si persisten en el tiempo, pueden estimular una respuesta inflamatoria a través de la activación de los PRRs, en especial, de la familia de los receptores TLRs [94]. Esta activación tiene como consecuencia: la producción de citoquinas proinflamatorias, que promueven la retroalimentación positiva, la diferenciación de las células B y T, y la pérdida de la tolerancia. Las células B maduras producen autoanticuerpos y se expanden iniciando la respuesta inmune adaptativa. La exposición del sistema inmunitario a cantidades excesivas de autoantígenos que no se eliminan de manera eficiente desempeña un papel importante en la generación de autoanticuerpos y se ha sugerido como uno de los mecanismos patogénicos del LES [95].

Durante el proceso de apoptosis, la redistribución de los contenidos nucleares y citoplasmáticos en fragmentos de membrana y micropartículas permite la opsonización mediada por anticuerpos. Los complejos inmunitarios opsonizados resultantes pueden ser internalizados por los receptores Fc, lo que conlleva la presentación de autoantígenos y la amplificación de la respuesta autoinmune. Por lo tanto, una apoptosis excesiva puede resultar en una eliminación ineficaz de las células muertas. Esto, a su vez, desencadena la liberación del contenido celular y de moléculas DAMPs. Los autoantígenos liberados de forma constante por las células muertas promueven la activación celular, ya que pueden estimular directamente los receptores PRRs, o ser reconocidos por autoanticuerpos, creando complejos inmunitarios. Dichos complejos pueden ser fagocitados a través del receptor Fcγ y activar a los receptores TLRs. Todo ello, sumado a la predisposición genética que puedan tener las células del sistema inmunitario y a los factores externos, hace que se inicie el desarrollo de la enfermedad (**Figura 3**).

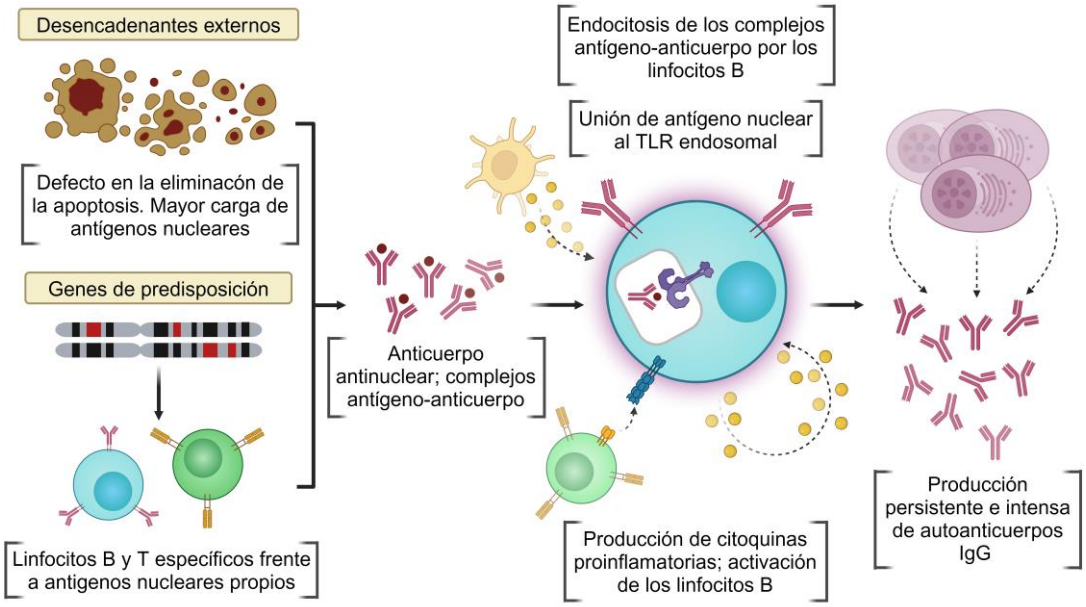

Figura 3. Modelo patogénico del lupus eritematoso sistémico. En este modelo hipotético, varios genes de predisposición interfieren con el mantenimiento de la tolerancia frente a lo propio, y los desencadenantes externos provocan que los antígenos nucleares persistan. El resultado es una respuesta de anticuerpos contra los antígenos nucleares propios, que se amplifica por la activación dependiente del TLR en los linfocitos B activados. Finalmente, estas células se diferencian en células plasmáticas productoras de autoanticuerpos. Imagen adaptada de [96], y modificada en *BioRender*.

En este apartado se destacarán los mecanismos más relevantes que tiene el sistema inmunitario para iniciar el proceso de autoinmunidad en el organismo, como son los receptores tipo Toll, sus vías de señalización y su implicación en la producción de citoquinas proinflamatorias y autoanticuerpos, así como del fenotipo celular de la enfermedad, es decir, los tipos celulares y sus funciones en el contexto del LES.

3.3.1 Implicación de los receptores tipo Toll en el LES

La gran mayoría de tipos celulares presentan PRRs, lo que les permite participar en la respuesta innata. Entre ellos, los receptores TLR son los más ampliamente estudiados, y constituyen un componente clave del sistema inmunitario especializado en el reconocimiento de moléculas PAMPs y DAMPs. Estos receptores están involucrados en la activación de múltiples respuestas celulares, incluyendo la producción de citoquinas inflamatorias y la eliminación de patógenos, y desempeñan un papel crucial en las fases tempranas de la respuesta inmunitaria, permitiendo una respuesta eficaz contra infecciones [7, 97]. Los receptores TLR se expresan en diversas células inmunitarias innatas y adaptativas, incluyendo células dendríticas, monocitos, granulocitos, células B y células T. Cada tipo celular presenta una combinación diferente de receptores. En humanos, la familia de los TLRs comprende 10 miembros (TLR1-10), mientras que en ratones son 12 (TLR1-9, TLR11-13). Estos receptores se localizan en la superficie celular (TLR1-6 y TLR11) o en diferentes compartimentos intracelulares, como el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas o endolisosomas (TLR3, TLR7-9 y TLR12-13). Se han identificado tres categorías de TLRs, según su especificidad por los PAMPs que pueden reconocer: lípidos y lipopéptidos (TLR1-2, TLR4 y TLR6), proteínas (TLR5) y ácidos nucleicos (TLR3 y TLR7-9) [7, 97, 98].

Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana de tipo I que se caracterizan por la presencia de repeticiones ricas en leucina, rodeadas por motivos ricos en cisteína, en sus regiones extracelulares, que les permiten reconocer y unirse a sus ligandos específicos. En la región citoplasmática, los TLRs tienen un dominio TIR que es esencial para la transducción

de la señal [98]. Los dominios TIRs interactúan con proteínas adaptadoras y transductoras de señales, las cuales son esenciales para activar cascadas de señalización intracelular y desencadenar la producción de citoquinas y la activación de la respuesta inmunitaria innata [99]. Tras el reconocimiento y unión del ligando al receptor correspondiente, se desencadena el proceso de dimerización del mismo, lo que permite iniciar la transducción de las señales en los TLRs. Este evento se lleva a cabo mediante el reclutamiento de una o más proteínas adaptadoras, las cuales incluyen: la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88, del inglés *myeloid differentiation primary response 88*); la proteína adaptadora con dominio TIR que contiene el receptor Toll/IL-1 (MAL, del inglés *MyD88-adaptor-like protein*, también conocida como TIRAP, del inglés *TIR domain-containing adaptor protein*); la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR que induce el interferón IFNβ (TRIF, del inglés *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*), también conocida como TICAM1; y la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM, del inglés *TRIF-related adaptor molecule*), también conocida como TICAM2. Estas proteínas adaptadoras actúan como mediadoras en la activación de diversas cascadas de señalización intracelular, que culminan en la activación de factores de transcripción y, en última instancia, en la producción de citoquinas inflamatorias y la expresión de moléculas coestimuladoras esenciales para la activación de la respuesta inmunitaria [99, 100]. Los principales factores de transcripción activados por las vías de transmisión de señales de los TLRs son: el factor nuclear kappa B (NF-κB), los factores reguladores del interferón (IRF*s*), la proteína de activación 1 (AP-1, del inglés *activator protein 1*) y otros factores de transcripción más generales [100, 101]. La señalización de los receptores TLRs generalmente se divide en dos vías distintas según el reclutamiento de MyD88 o TRIF para las cascadas de señalización. La vía dependiente de Myd88 es utilizada por todos los TLRs excepto por el receptor TLR3, el cual junto con TLR4 utiliza la vía dependiente de TRIF [102]. A pesar de ello, ambas vías acaban desembocando en la activación de NF-κB [103].

En el contexto del LES, los receptores TLRs ganan importancia debido a su implicación en la producción desmedida de citoquinas proinflamatorias, con la consiguiente hiperactivación

en bucle de las células del sistema inmunitario. En particular, de entre todos los receptores, destacan TLR7 y TLR9, siendo el receptor endosomal TLR7 uno de los más relevantes en la patogénesis y progresión de la enfermedad [104]. Este receptor, cuya especificidad de ligando es a los ácidos nucleicos endosomales, tiene un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad, especialmente a través de su señalización en las células B [105]. La función normal de los receptores endosomales TLR7 y TLR9 es la de responder a motivos no metilados CpG de ADN derivado de patógenos y al ARN de cadena sencilla (ssRNA, del inglés *single-stranded RNA*). Sin embargo, en el LES, estos receptores tienen acceso a los ácidos nucleicos propios del huésped. Durante el desarrollo de la enfermedad, los ácidos nucleicos propios extracelulares son más visibles para el sistema inmunitario debido a defectos en la eliminación de restos celulares y al aumento de la muerte celular. Las células B pueden reconocer los antígenos que contienen estos ácidos nucleicos y estimularse tanto a través del BCR como de los TLRs endosomales. La activación del BCR induce la internalización y entrega del antígeno, incluidos los componentes del ácido nucleico, a los compartimentos donde se encuentra el TLR7, el cual se activa y emite las señales sucesivas [106, 107].

Tras la activación del receptor TLR7, MyD88 forma un complejo con miembros de la familia de quinasas IRAKs (del inglés *interleukin receptor-associated kinases*) [108]. Durante la formación de este complejo, IRAK4 activa IRAK1, que es autofosforilado y liberado de MyD88 [109]. IRAK1 se asocia con la ubiquitina ligasa TRAF6 (del inglés *TNF receptor-associated factor 6*), y promueve la propia poliubiquitinación ligada a K63 de TRAF6 y de la proteína quinasa TAK1 (del inglés *transforming growth factor-β activated kinase 1*) [97, 110]. Una vez activado, TAK1 promueve la activación de dos vías diferentes que conducen a la activación del complejo IKK-NF-κB (del inglés *inhibitory-κB kinase-NF-κB*) y la vía MAPK (del inglés *mitogen-activated protein kinase*). El complejo IKK fosforila la proteína inhibidora de NF-κB, IκBα, que sufre una degradación mediada por el proteasoma, lo que permite que NF-κB se traslade al núcleo para inducir la expresión génica de proteínas pro- y anti-inflamatorias, así como de otras proteínas relacionadas con la respuesta inmunitaria [111]. TRAF6 también promueve la activación de IRF7, con la consiguiente regulación de la producción del IFN de

tipo I [112]. Asimismo, TAK1 facilita la activación de miembros de la familia MAPK, tales como ERK1/2 (del inglés e*xtracellular signal-regulated kinase 1/2*), p38 y JNK (del inglés *c-Jun N-terminal kinase*), las cuales median la activación de la familia de factores de transcripción AP-1, encargados de la regulación de las respuestas inflamatorias [97, 113]. Un modelo esquematizado de la vía de señalización de los receptores TLR7/9 se muestra en la **Figura 4.**

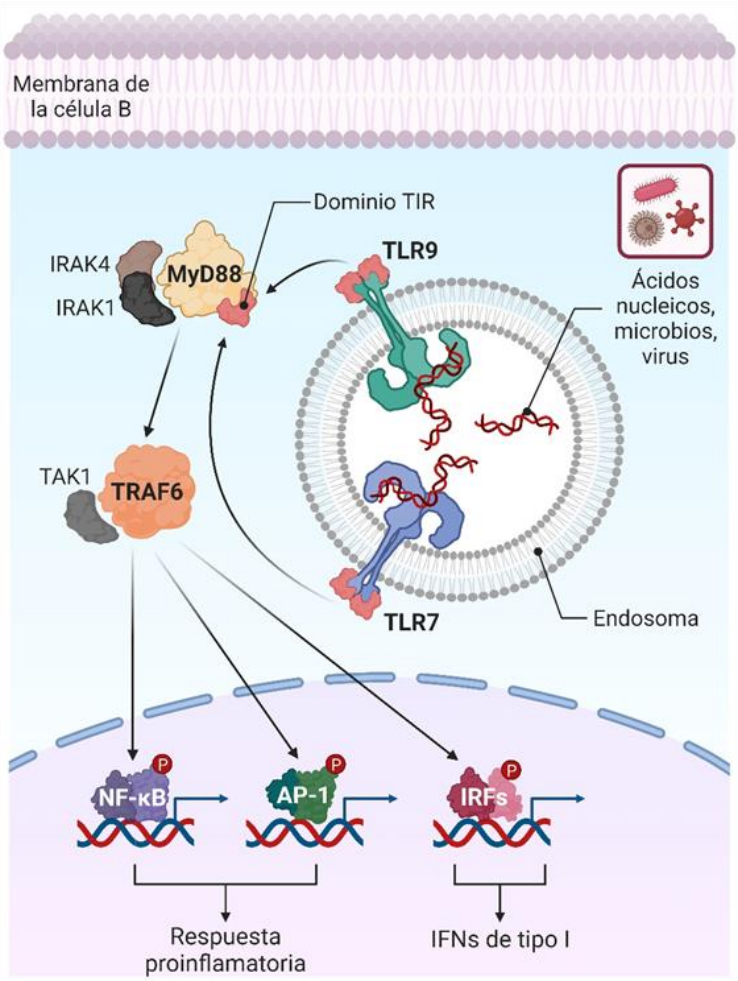

Figura 4. Modelo de las vías de señalización de los receptores TLR7 y TLR9. En el contexto del LES, los receptores endosomales TLR7 y TLR9 se activan tras su unión con antígenos nucleares propios. Tras la dimerización de los receptores, se unen al dominio TIR de la proteína adaptadora MyD88 y, esta a su vez, con TRAF6. Esto da como resultado la activación de diferentes factores de transcripción como: NF-κB o AP-1, que promueven la expresión de genes implicados en las respuestas pro-inflamatorias; y los IRFs, que promueven la producción del IFN de tipo I. Imagen creada en *BioRender*.

Además de la vía de activación del NF-κB dependiente de Myd88, existe una ruta alternativa e independiente, cuya iniciación se debe a la interacción del receptor con dos proteínas adaptadoras, TRAM y TRIF [114]. Esta interacción activa de nuevo a TRAF6, que recluta a la quinasa RIP-1, la cual interacciona con el complejo TAK1 y lo activa, lo que conduce a la activación de las vías del NF-κB y del MAPK y, en última instancia, a la inducción de citoquinas inflamatorias. La proteína TRIF también puede interactuar con TRAF3 e inducir la activación del factor de transcripción IRF3, lo que resulta en la expresión de los genes de interferón [97, 115].

Como se mencionó anteriormente, en condiciones normales, los ácidos nucleicos endógenos no activan respuestas inmunitarias innatas. Esto se debe a que las nucleasas presentes en la circulación sanguínea los degradan eficazmente antes de que sean reconocidos por los receptores TLR localizados en los endosomas [116]. Es posible que estas protecciones se destruyan en condiciones inflamatorias y autoinmunes. Por ejemplo, cuando los ácidos nucleicos propios forman complejos con proteínas endógenas, pueden volverse resistentes a las nucleasas y obtener acceso a los TLRs endosómicos, que a su vez promueven y mantienen los procesos autoinmunes. Los ácidos nucleicos pueden actuar como ligandos endógenos para el TLR7 y el TLR9, y se ha demostrado que su respuesta a los antígenos que contienen ADN o ARN propio puede inducir la activación de células B autorreactivas [7]. No obstante, se ha observado que tanto el TLR7 como el TLR9 presentan funciones antagónicas en el LES, siendo la señalización mediada por este último la que puede aumentar la protección frente a la enfermedad [117, 118].

Estudios de asociación genética han relacionado la señalización de los TLRs con el LES. En particular, los polimorfismos que resultan en una mayor expresión de TLR7 están asociados con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad [119, 120]. La expresión del *Tlr7* es mayor en mujeres que en hombres debido a la localización de este gen en el cromosoma X. Normalmente, uno de los dos cromosomas X está inactivado en las mujeres, sin embargo, algunos de los genes que lo conforman, incluido el *Tlr7*, parecen escapar de la inactivación.

Como resultado, este gen puede expresarse bialélicamente en las células B [121]. La sobreexpresión de *Tlr7* también ejerce un papel importante en la aparición de la autoinmunidad sistémica en cepas murinas [104, 122, 123], y la deleción de dicho gen reduce la patogenia de la enfermedad en cepas que desarrollan espontáneamente el lupus [124]. La activación del TLR7, en el contexto del LES, desencadena una cascada de señalización que resulta en la producción de citoquinas proinflamatorias, la presentación de antígenos a las células T y la diferenciación de las células B a células plasmáticas y productoras de autoanticuerpos. Estos son los puntos clave que contribuyen significativamente al desarrollo de la autoinmunidad en esta enfermedad [117, 125]. Tanto en pacientes como en modelos murinos de lupus, se ha demostrado el papel del TLR7 en la diferenciación de las células B naïve en células B efectoras y plasmáticas. Estas células son capaces de producir grandes cantidades de autoanticuerpos, los cuales atacan a los tejidos y a las células del propio organismo [126]. Esto daría lugar a la liberación y alteración de nuevos antígenos tisulares, a la reactivación de los linfocitos y a la exacerbación de la enfermedad, lo que ayuda a la prolongación y perpetuación de la misma.

3.3.2 Autoanticuerpos en el LES

La producción de autoanticuerpos se presenta como el principal desorden inmunológico en pacientes con lupus. Este fenómeno patológico se encuentra asociado con la producción de anticuerpos frente a autoantígenos, lo que a su vez conlleva a la formación de complejos inmunitarios que se depositan en diversos tejidos y órganos, generando una variedad de manifestaciones clínicas y daño tisular. Los autoanticuerpos pueden dirigirse hacia una variedad de moléculas biológicas, incluyendo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos antígenos pueden encontrarse en diferentes ubicaciones celulares, tanto intracelularmente en el núcleo o en el citoplasma, como en la superficie de las células o en el medio extracelular [127]. La presencia elevada de autoanticuerpos específicos contra autoantígenos, principalmente de origen nuclear, es el sello distintivo del LES. Los anticuerpos antinucleares (ANAs, del inglés *anti-nuclear antibodies*), que actúan contra antígenos nucleares, y que

están presentes en más del 95% de los pacientes con lupus [128], se han establecido como uno de los biomarcadores de diagnóstico y pronóstico más determinantes de esta patología [129]. El mecanismo por el cual se producen los autoanticuerpos ha sido objeto de numerosos estudios y, en algunos casos, se ha demostrado que la lesión tisular y las manifestaciones fenotípicas posteriores se desarrollan como resultado de mecanismos mediados por autoanticuerpos [126].

En el proceso de desarrollo de los linfocitos B, las células pre-B experimentan una maduración hacia células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Estas células se pueden ver afectadas por múltiples señales positivas y negativas que determinan su activación, eliminación o estado anérgico [130, 131]. En pacientes con LES, así como en modelos murinos de la enfermedad, se han identificado numerosas anomalías genéticas que afectan diferentes puntos de control de la tolerancia frente a lo propio, las cuales resultan en una producción excesiva de autoanticuerpos [132]. La supervivencia de las células productoras de anticuerpos está determinada por su nicho de supervivencia, ya sea en los centros germinales o en la zona extrafollicular, lo que a su vez determina su tiempo de vida, pudiendo ser de corta duración si se encuentran en la zona extrafollicular, o de larga duración si residen en los centros germinales. Los factores genéticos, así como los efectores endógenos (quinasas, fosfatasas o factores de transcripción) pueden influir directa o indirectamente en estos pasos de selección, lo que en el LES resulta en la acumulación de células B maduras autorreactivas. Además de las posibles anomalías intrínsecas, estas células son apoyadas principalmente por la exposición continua a autoantígenos y complejos inmunes circulantes. Las células B naïve autorreactivas pueden ser activadas mediante la doble participación de su receptor BCR de superficie y del receptor TLR7 endosomal [126, 130].

La comprensión de la biología de los autoanticuerpos es crucial para mejorar tanto el diagnóstico como el pronóstico de la enfermedad. En particular, la identificación de ciertos autoanticuerpos se considera un componente clave de estos criterios, ya sea debido a la alta

especificidad de su presencia en pacientes con LES o a su probada patogenicidad [133]. Entre los autoanticuerpos más prevalentes en estos pacientes, se encuentran los ANA, de los cuales destacan dos: los anti-ADN de doble cadena (anti-dsDNA, del inglés *anti-double stranded DNA*) y los anti-Smith, o anti-Sm, los cuales se dirigen contra ribonucleoproteínas (RNPs) o antígenos nucleares específicos. Estos autoanticuerpos se han estudiado extensamente y se consideran útiles en la identificación y caracterización de pacientes con LES [128, 134, 135].

Los anticuerpos anti-dsDNA tienen una prevalencia descrita del 60%-90% de los pacientes, y su presencia en otras condiciones patológicas y en sujetos sanos suele ser muy rara (menos del 0,5%) [136]. De hecho, se ha demostrado que estos autoanticuerpos pueden estar presentes en los pacientes incluso antes de que desarrollen las características clínicas de la enfermedad [137]. No obstante, no todos los anticuerpos anti-dsDNA tienen propiedades patogénicas, siendo su efecto determinado por el isotipo en particular. En líneas generales, se ha aceptado que el LES activo se asocia con un predominio de anticuerpos IgG, en detrimento de los anticuerpos IgM o IgA anti-dsDNA [138]. En lo que respecta a su función patogénica, múltiples investigaciones han relacionado estos autoanticuerpos con el daño renal, como se ha constatado mediante su deposición en varias estructuras renales en pacientes con LES y nefritis activa [136]. La formación de inmunocomplejos en la circulación entre fragmentos de cromatina y anticuerpos anti-dsDNA permite su posterior deposición y unión al glomérulo [126, 139]. Este proceso también se ha observado en otros órganos, incluyendo la piel y el sistema nervioso central. En estos casos, los anticuerpos anti-dsDNA interactúan con otras estructuras en el órgano, como la laminina y el colágeno en la piel, o las subunidades del receptor NMDA (del inglés *N-methyl-D-aspartate*) en el cerebro, lo que puede llevar a la muerte celular y otras anomalías en el órgano afectado [140, 141].

Por otro lado, los anticuerpos anti-Sm también son altamente específicos para el LES y constituyen uno de los criterios de diagnóstico inmunológico de dicha enfermedad [142, 143]. No obstante, su sensibilidad es limitada, ya que solo se detectan en el 20% de los

pacientes de origen caucásico, y en un porcentaje del 30%-40% en pacientes de origen africano, afroamericano y asiático, según estudios previos [144]. Los antígenos Sm (nombrados así por su identificación en el suero de una paciente llamada Stephanie Smith) son un conjunto de siete proteínas nucleares que forman un anillo para las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP, del inglés *small nuclear ribonucleoproteins*). Los snRNP son cofactores esenciales para el empalme del pre-ARNm y ayudan en la eliminación de los intrones del pre-ARNm. Las proteínas nucleares Sm se ensamblan en el citoplasma, donde se unen a los snRNP antes de ser transportados al núcleo y los anticuerpos anti-Sm están dirigidos contra varios epítopos distribuidos por todas esas proteínas nucleares [145]. Con respecto al isotipo, se ha observado una elevada incidencia de anticuerpos IgG anti-Sm en pacientes diagnosticados con LES, mientras que los niveles de anticuerpos IgA e IgM anti-Sm muestran una frecuencia baja en esta población [146]. La presencia de los anticuerpos anti-Sm está correlacionada significativamente con la presencia de anticuerpos anti-dsDNA positivos [144, 147]. El papel patogénico y la contribución de los autoanticuerpos anti-Sm a la enfermedad todavía son inciertos. Sin embargo, varios estudios han observado que estos autoanticuerpos están asociados con manifestaciones clínicas importantes, como el daño renal [144]. Además, se ha demostrado que los anticuerpos anti-Sm también se relacionan con manifestaciones neuropsiquiátricas, específicamente con la psicosis, así como con la anemia hemolítica, la vasculitis y la fibrosis pulmonar [146, 148, 149].

Como se mencionó anteriormente, los receptores endosomales TLRs juegan un papel fundamental en la producción de autoanticuerpos. Se ha identificado que la activación simultánea, de los receptores BCR y TLR7, es el principal impulsor de la producción de estos autoanticuerpos [106].En particular, se ha encontrado que la ausencia del TLR7 en el modelo murino de lupus MRL-*lpr/lpr* conduce a la supresión total de los autoanticuerpos anti-Sm [124]. De manera similar, se ha demostrado que tanto los autoanticuerpos anti-Sm como los anti-dsDNA en el lupus inducido por pristano son dependientes del TLR7 [150].

Los distintos isotipos de inmunoglobulina (IgM, IgD, IgG, IgA e IgE) se caracterizan por sus regiones constantes únicas en las cadenas pesadas y por su distribución tisular diversa, lo que les permite reaccionar adecuadamente contra diferentes tipos de patógenos [126]. Mientras que las células B naïve solo expresan IgM e IgD, el resto de clases y/o subclases de inmunoglobulinas se van generando durante el desarrollo de la respuesta inmunitaria, dependiendo de la naturaleza del antígeno que la desencadena y su modo de entrada. Los otros isotipos (IgG, IgA e IgE) se generan mediante la recombinación del cambio de clase (CSR, del inglés *class-switch recombination*), en la cual la región variable de unión al antígeno se mantiene inalterada [151]. La inducción de esta recombinación requiere de la expresión de la deaminasa de citosina inducida por la activación (AID, del inglés *activation-induced cytidine deaminase*), y de la unión de CD40 en las células B, o a través de la interacción dual entre el receptor BCR de superficie y el receptor TLR endosomal [126]. Finalmente, la maduración de la afinidad de un anticuerpo se obtiene mediante la hipermutación somática (SHM, del inglés *somatic hypermutation*), la cual se caracteriza por una alta tasa de mutaciones puntuales en la región variable del anticuerpo de unión al antígeno [151]. De entre todos los isotipos, el IgG es el más común y abundante de la sangre periférica, y los autoanticuerpos IgG son las más estudiados en el LES. La presencia de autoanticuerpos IgG en el suero de pacientes con lupus puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad al activar las células inflamatorias y el sistema del complemento, lo que a su vez puede causar daño tisular en diferentes órganos [152]. En modelos murinos de lupus, la subclase de autoanticuerpos IgG, IgG2a/c, ha sido descrita como el isotipo con la mayor actividad patogénica debido a su capacidad para formar complejos inmunes más estables y activar más eficientemente los receptores Fc de las células del sistema inmunitario, desencadenando una respuesta inflamatoria más intensa y exagerada [126, 153]. En la **Figura 1** se muestra como los autoanticuerpos y los inmunocomplejos que forman, junto con los autoantígenos nucleares, son capaces de desencadenar una respuesta autoinmunitaria.

3.3.3 Fenotipo de las poblaciones celulares en el LES

La patogénesis del LES implica una compleja interacción entre células inmunitarias específicas con el resto de células de los tejidos, que resulta en una elevada concentración de citoquinas, autoanticuerpos y la inflamación tisular. La contribución de las células inmunitarias a esta enfermedad no se limita a la producción de productos inflamatorios, sino que también se relaciona con su comportamiento fisiológico, función y desregulación específica. La presencia de niveles elevados de autoanticuerpos circulantes en el LES sugiere la participación de tipos celulares como las células B productoras de autoanticuerpos y las células T, las cuales tienen un papel en la señal e inducción de la producción de estos autoanticuerpos por parte de las células B.

El sistema inmune innato comprende una variedad de mecanismos diversos que ejecutan diferentes funciones en la defensa del huésped. Estos incluyen, entre otros: el sistema fagocítico (macrófagos y neutrófilos); las células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*); y las células dendríticas (DC, del inglés *dendritic cells*) [154]. Estos tipos celulares, correspondientes a la primera línea de defensa del organismo, pueden encontrarse circulando por el torrente sanguíneo o residir en los tejidos, y están preparados para la respuesta a los patógenos y estímulos inflamatorios [155]. Dentro de la inmunidad adaptativa, es importante destacar el papel crucial de las células B y las células T, ya que son responsables de dictar la especificidad de la respuesta adaptativa y coordinar la actividad de los diferentes efectores de la respuesta inmune. Estas células son capaces de reconocer y responder a antígenos específicos a través de la producción de anticuerpos y la activación de células efectoras, respectivamente [154]. La gran mayoría de las células del sistema inmunitario tienen su origen en las células madre hematopoyéticas, presentes en la médula ósea, las cuales se diferencian a lo largo de diversos linajes especializados. Según la especificidad de sus precursores comunes, las células inmunitarias se pueden clasificar de manera amplia en dos grandes grupos: las células mieloides, que engloban a los fagocitos y

a la mayoría de las células dendríticas, y las células linfoides, que incluyen a todos los linfocitos y a las células NK [156, 157].

Los macrófagos y neutrófilos, componentes clave de la inmunidad innata, fagocitan patógenos y restos celulares, pero su deficiencia en la eliminación de células apoptóticas y, por ende, prolongándose la exposición de los autoantígenos a las células inmunitarias adaptativas, puede contribuir a la patogenia del LES [154, 158, 159]. Las células dendríticas, son APCs que desempeñan un papel clave en la respuesta innata y en el inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas. Al activarse en pacientes con lupus, aumentan los niveles de expresión de las moléculas MHC de clase I y II en su superficie, y presentan autoantígenos a los linfocitos autorreactivos [154, 160, 161]. Finalmente, las células NK, aunque reducidas en número en estos pacientes, muestran una mayor actividad proinflamatoria al expresar niveles elevados del receptor activador CD69 y producir más citoquinas [162, 163].

Durante el desarrollo del LES, se produce una compleja red de interacciones de células inmunitarias innatas y adaptativas, que desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad. Entre estas células destacan como los actores principales los linfocitos B y los linfocitos T, debido a su capacidad para dictar la especificidad de la respuesta adaptativa y coordinar los brazos efectores de la misma. Tanto los linfocitos B como los linfocitos T se originan a partir de una célula progenitora común en la médula ósea, en un proceso conocido como linfopoyesis. Una vez producidos, los precursores de los linfocitos B completan su maduración en la médula ósea, mientras que los precursores de los linfocitos T emigran hacia el timo para su maduración final. Tras la maduración, los linfocitos B y T se liberan al torrente sanguíneo y migran hacia los órganos linfoides periféricos, como los ganglios linfáticos, el bazo y las placas de Peyer en el intestino [164, 165]. Este proyecto de tesis tiene como uno de los objetivos el profundizar en el papel de las células B y sus subtipos más importantes en el desarrollo del LES.

Las células B desempeñan un papel fundamental en la patogénesis del LES debido a sus múltiples funciones, incluyendo la producción de autoanticuerpos específicos, la presentación de antígenos, la ayuda en la activación de las células T y la producción de citoquinas. La especificidad de las células B está determinada por su receptor BCR, el cual es único para cada célula. La diversidad en los BCRs se genera a través de un proceso altamente regulado en la médula ósea durante el desarrollo de las células B [154, 166]. En individuos sanos, las células B que expresan BCRs autorreactivos se eliminan durante la maduración temprana en la médula ósea, así como durante el proceso de selección periférica. Sin embargo, en pacientes con LES y en modelos murinos de lupus, estos procesos de selección y eliminación están alterados, lo que resulta en la persistencia de células B autorreactivas que pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad [167].

Durante el proceso de linfopoyesis, y en condiciones fisiológicas normales, las células B atraviesan múltiples etapas de maduración y selección con el propósito de asegurar que únicamente aquellas con receptores de antígenos funcionales y no auto-reactivos sean liberadas al sistema inmunológico. A partir de las células madre hematopoyéticas, se origina una población de células progenitoras linfoides conocidas como células Pro-B, las cuales experimentan un proceso de proliferación y diferenciación hasta convertirse en células Pre-B. En este estadio se desarrollan los receptores de las células B (BCRs) que conferirán su especificidad antigénica. En esta fase, también se pasa por unas reorganizaciones genéticas especiales conocidas como recombinaciones V(D)J y VJ, en las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, respectivamente, las cuales generan una amplia diversidad en los receptores de antígenos. Estas células ya se pueden distinguir del resto de células inmaduras por la expresión de dos moléculas de superficie específicas de las células B, CD19 y B220. Aquellas células que poseen receptores con una fuerte afinidad a antígenos propios son eliminadas o inactivadas, lo que ayuda a prevenir respuestas inmunológicas dañinas contra el propio organismo. Las células Pre-B que superan esta selección se convierten así en células B inmaduras, las cuales serían las primeras en expresar moléculas de inmunoglobulina IgM [168, 169]. Posteriormente, abandonan la médula ósea y emigran hacia el bazo, donde da

inicio su proceso final de maduración. Estas células recién llegadas al bazo son denominadas células B transicionales [170, 171], las cuales finalmente ingresan en diferentes compartimentos del bazo y se diferencian a células B naïve maduras foliculares o de la zona marginal (**Figura 5**).

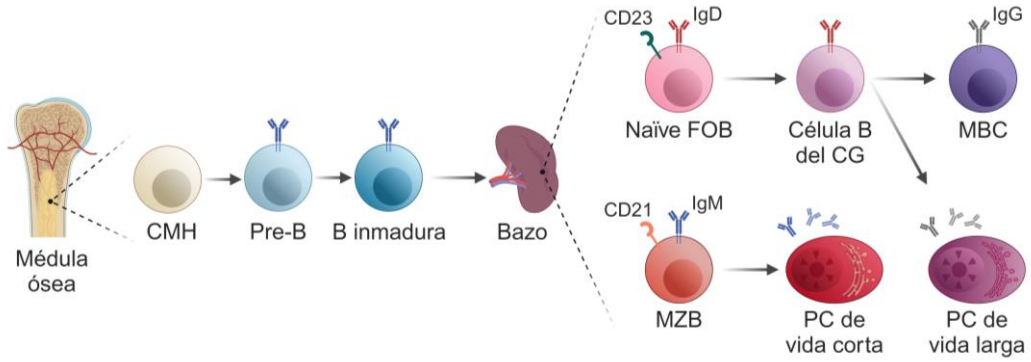

Figura 5. Etapas de desarrollo de las células B. En la médula ósea, las células madre hematopoyéticas (CMH) se diferencian en células B, pasando de célula pre-B a células B inmaduras antes de migrar al bazo como células B transicionales. Al reconocer un antígeno, las células B naïve foliculares (FOB) ingresan en centros germinales (CG) y experimentan una expansión clonal e hipermutación somática. Estas células de los CGs realizan la recombinación de cambio de clase y se diferencian a células B de memoria (MBC) o a células plasmáticas (PC) de vida larga. Las células B naïve también pueden diferenciarse a células de la zona marginal (MZB), y estas a su vez en células plasmáticas de vida corta. Imagen creada en *BioRender*.

Las células B naïve maduras son aquellas que aún no han experimentado un encuentro directo con su antígeno correspondiente, por lo que se les denomina "naïve", indicando su estado primigenio en términos de respuesta inmunitaria. Estas células permanecen en un estado de reposo, aunque están preparadas para reaccionar ante la presencia de antígenos extraños. Se caracterizan comúnmente por la expresión elevada de IgD y la presencia positiva de IgM. El fenotipo característico de estas células en reposo incluye la expresión constitutiva de CD21 y CD23, establecida durante la maduración, y la ausencia de marcadores de activación como CD80, CD86 o CD95. Una vez que un antígeno coincide con el receptor BCR de una célula B naïve específica, se desencadena una cascada de eventos que culminan en la activación de dicha célula [172, 173].

Una vez activadas, estas células pueden seguir diferenciándose, a través del efecto de moléculas como BAFF y APRIL, en células B de la zona marginal o en células B foliculares e ingresar a los centros germinales. Más tarde, según los estímulos antigénicos que reciben y el entorno de citoquinas que los rodea, cada una de estas células se puede diferenciar en una célula plasmática secretora de anticuerpos o en células B de memoria [174, 175]. En el LES, debido a la perdida de los mecanismos de tolerancia antigénica frente a lo propio, estas células B naïve maduras se ven sometidas a una hiperactivación desregulada, lo que finalmente desencadena en la diferenciación a células plasmáticas productoras de autoanticuerpos. Como resultado, se ha observado que el número relativo de células B naïve maduras disminuye en comparación con las células B activadas en el contexto de la autoinmunidad [125, 176].

Las células B foliculares (FOB, del inglés *follicular B cells*) se suelen considerar células en reposo, o naïve, y constituyen la subpoblación más grande de células B maduras. Circulan libremente por el bazo y por el resto de órganos linfoides, formando una parte importante de la respuesta inmune adaptativa, especialmente en respuestas dependientes de las células T, ya que pueden utilizar sus receptores BCR para capturar el antígeno, procesarlo y presentárselo a dichas células [177, 178]. Las células FOB se caracterizan principalmente por la expresión de la molécula de superficie CD23, de la inmunoglobulina IgD y por niveles intermedios de expresión de CD21 [177, 179].

Estas células, junto con la interacción de las células dendríticas foliculares (FDC, del inglés *follicular dendritic cells*) y las células T auxiliares foliculares (Tfh, del inglés *follicular T helper cell*), forman las estructuras conocidas como centros germinales (CGs, o GCs, del inglés *germinal centers*), las cuales se desarrollan en los folículos de las células B del bazo. Las FDCs tienen un papel clave en la presentación de antígenos a las células FOB en los centros germinales, mientras que las células Tfh son esenciales para la regulación y cooperación en la maduración y diferenciación de estas células B [180]. La diferenciación de las células FOB activadas puede verse facilitada por la activación de los receptores TLR presentes en ellas,

siempre en el contexto de una activación previa de los receptores BCR y CD40, este último interactuando con el ligando CD40L de las células Tfh [183]. Por último, al igual que ocurre con las células B naïve, la frecuencia de las células FOB se ha observado que se encuentra anormalmente reducida en varios estudios con modelos murinos de LES [81, 181].

Los centros germinales cumplen varias funciones esenciales dentro de la respuesta inmune adaptativa. En ellos es donde ocurren los procesos de proliferación, apoptosis, hipermutación somática, selección de antígenos de alta afinidad, el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y la diferenciación en células secretoras de anticuerpos o en células de memoria. Los CGs comprenden dos zonas muy bien diferenciadas: la zona oscura (DZ, del inglés *dark zone*), que actúa como epicentro de la proliferación de las células B y donde ocurre la hipermutación somática de los genes de la región variable de las inmunoglobulinas; y la zona clara (LZ, del inglés *light zone*), a donde migran para ser seleccionadas por las células Tfh y que se produzca la maduración de la afinidad de la respuesta de anticuerpos. Ambos procesos son esenciales en las reacciones de los CGs en las respuestas inmunitarias dependientes de las células T. Finalmente, estas células B abandonan los centros germinales como células plasmáticas o células de memoria [182, 183] (**Figura 6**).

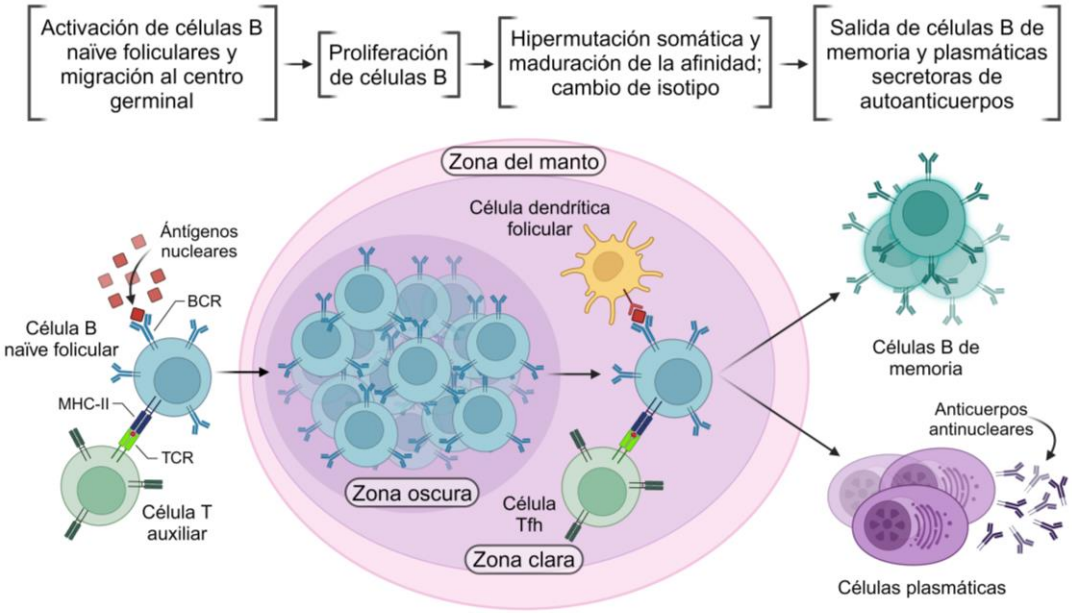

Figura 6. Reacciones dentro de un centro germinal, en el contexto del LES. Las células B maduras naïve foliculares, que han sido activadas por las células T auxiliares, y/o por la unión al antígeno antinuclear, migran a los folículos, formando la zona oscura de los centros germinales. En esta zona se produce la proliferación celular. Las células B comienzan a experimentar un cambio de isotipo, teniendo lugar la hipermutación somática. Tras esto, migran a la zona clara, donde se encuentran las células dendríticas foliculares, que muestran el antígeno a las células B, las cuales son luego seleccionadas por las células Tfh, produciéndose la maduración de la afinidad. Finalmente, estas células se diferencian y salen de los centros germinales como células B de memoria, o células plasmáticas productoras de autoanticuerpos. Imagen creada en *BioRender*.

Los CGs pueden surgir de manera espontánea en ausencia de una inmunización deliberada o debido a una infección evidente. En modelos murinos y en pacientes con enfermedades autoinmunes, la regulación anormal de los CGs promueve el desarrollo de autoanticuerpos patogénicos somáticamente mutados, y de cambio de clase, favoreciendo el desarrollo de la autoinmunidad. Además, aparte del desarrollo espontaneo de los CGs, el tamaño y la frecuencia de estos se ven aumentados, lo que también genera que la estructura normal se rompa. Todo ello acompañado de un incremento en el número de células proliferativas y en estado de diferenciación [184] (**Figura 7**).

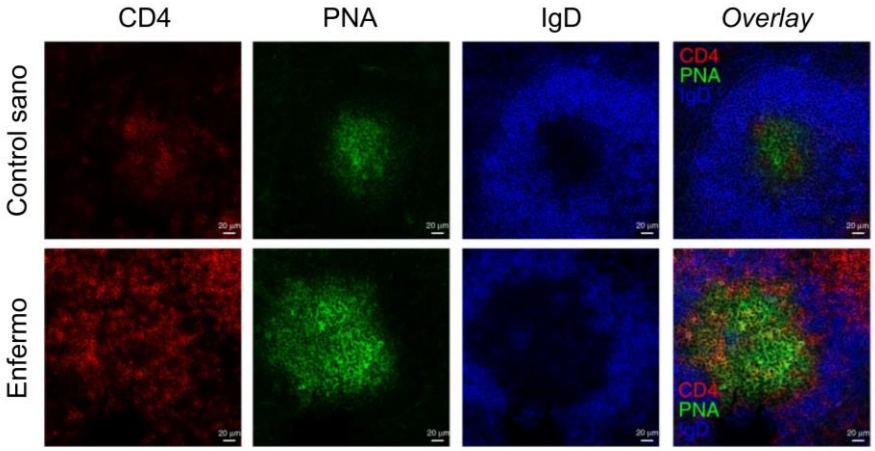

Figura 7. Estructura de los centros germinales. Se muestra un corte de bazo y posterior tinción inmunohistológica de un centro germinal en un ratón sano (panel superior) y uno enfermo (panel inferior). En rojo se tiñó la zona de las células T (CD4); en verde se tiñó la zona oscura (PNA); en azul se tiñó la zona clara (IgD). Imagen modificada de [185].

Rodeando y delimitando los CGs se sitúa la zona del manto, o zona marginal, donde se encuentran las células B de la zona marginal (MZB, del inglés *marginal zone B cells*). Se considera que estas células se diversifican en el proceso de maduración de las células B, siendo un subconjunto o un linaje separado de las que ocupan los folículos. Aunque esto podría llevar a confusión debido a la presencia de células de memoria en la zona marginal. Estas células podrían residir ahí o estar de tránsito [186]. Las células MZB sirven como la primera línea de defensa frente a patógenos provenientes del torrente sanguíneo, debido a su proximidad con la pulpa roja del bazo, donde se encuentran los capilares y se filtra la sangre. La pulpa blanca, en cambio, está constituida por tejido linfático, principalmente linfocitos y los centros germinales, los cuales se forman por el interior del bazo. En humanos, las células MZB se pueden encontrar en la circulación, así como en otras partes del cuerpo, mientras que, en los ratones, estas son inmóviles y residen en el bazo [187]. Estas células se caracterizan por tener una expresión elevada de IgM y una baja expresión de IgD. Por otro lado, en comparación con las células FOB, las células MZB presentan una expresión positiva de CD21 y negativa para CD23. Finalmente, estas células también cuentan con la expresión de *CD1d* y los receptores S1PR1 y S1PR3 [178, 188].

En presencia de señales coestimuladoras, tanto de células del sistema inmunitario innato como adaptativo, las células MZB activadas por antígenos pueden experimentar una diferenciación rápida hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos a través de dos vías principales. Estas vías pueden depender de la interacción con células T o ser independientes de ellas [189, 190]. Además de su capacidad para inducir la producción de inmunoglobulinas IgM, las células MZB tienen la capacidad de cambiar de clase y producir tanto IgG como IgA. Estas células presentan niveles elevados de receptores tipo TLR. Las señales generadas por la activación de estos receptores, junto con la activación del receptor BCR, desencadenan la producción de anticuerpos [191]. En modelos murinos, se ha observado como señales similares regulan la tolerancia de las células B. De hecho, la coactivación desregulada de los receptores BCR y TLR por autoantígenos contribuye al inicio de la autoinmunidad al activar de manera patogénica las células B autorreactivas, incluyendo las células MZB [192]. Como resultado, se ha observado una disminución anormal en la frecuencia de estas células en modelos murinos de LES, ya que su activación desregulada implica la pérdida de la expresión de superficie de CD21 y del cambio de clase de inmunoglobulina [81, 181].

Finalmente, llegados al último estadio de diferenciación de las células B, estas se podrían diferenciar, a grandes rasgos, en células plasmáticas productoras de anticuerpos y en células de memoria. Las células plasmáticas (PCs, del inglés *plasma cells*) desempeñan un papel crucial en la síntesis de anticuerpos destinados a proteger el organismo contra agentes infecciosos. Sin embargo, estas células también son responsables de la generación de autoanticuerpos patogénicos en el contexto de las enfermedades autoinmunes. Se ha observado un aumento en el número de PCs circulantes en pacientes con lupus activo, correlacionándose con mayores concentraciones de autoanticuerpos [193]. Las células B activadas poseen la capacidad de llevar a cabo un cambio de clase en el receptor BCR, es decir, hacia isotipos como IgG e IgA, culminando en su diferenciación en PCs [194]. La diferenciación de las PCs es un proceso continuo en el cual se va perdiendo gradualmente la expresión de marcadores característicos de los linfocitos B (como B220, CD19, y moléculas

del MHC-II), mientras que se observa una progresiva sobreexpresión de marcadores específicos como *Sdc1* (CD138), *Fas*, *Lgals1*, o las propias inmunoglobulinas secretadas [195]. Tradicionalmente, se pensaba que los autoanticuerpos de alta afinidad de tipo IgG se originaban principalmente a través de las respuestas en los centros germinales. Sin embargo, el cambio de clase y la hipermutación somática también pueden ocurrir en la zona extrafolicular (EF). Tanto las respuestas en los centros germinales como en la zona EF están implicadas en el LES [196, 197], contribuyendo ambas al mantenimiento de la respuesta humoral crónica y agresiva [193].

En comparación con las células plasmáticas, las células B de memoria (MBC, del inglés *memory B cell*) poseen un tiempo de vida más prolongado, permaneciendo inactivas hasta una reexposición con el antígeno [198]. Cuando estas células se reactivan, se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Por lo tanto, las células MBC desempeñan un papel fundamental al proporcionar inmunidad a largo plazo, y son esenciales para preservar la memoria serológica [199]. Las MBCs pueden originarse a partir de respuestas dependientes de los centros germinales o en la zona extrafolicular. En humanos, su marcador de superficie más distintivo es el CD27, sin embargo, en ratones, se han identificado varios marcadores, tales como CD38, CD80, CD81 y *Fcrl5*, entre otros [200]. En el LES, se observa un aumento en el número de MBCs de cambio de clase (del inglés *class-switched memory B cells*) en relación con las células B naïve, lo que indica un desequilibrio en la proporción de ambos subtipos de células B. Este incremento representa un riesgo significativo para el desarrollo del LES. Esto se debe a que estas células poseen un umbral de activación más bajo, lo que facilita la proliferación de células B autorreactivas, y contribuye al fenotipo activo constante observado en la enfermedad [201]. Por otro lado, estas células también tienen respuestas exageradas de los BCRs, lo que resulta en un aumento en la entrada de calcio y la fosforilación de moléculas de señalización celular [167]. Una subpoblación de MBCs específica, cuyos números están incrementados en el LES, es conocida como células B doble negativas (DN, del inglés *double negative*), caracterizadas por la expresión negativa de IgD y CD27 [202]. Estas células exhiben un fenotipo de anticuerpos

con cambio de isotipo, y se correlacionan con la presencia de anticuerpos anti-dsDNA y anti-Sm [203]. Dichas células se pueden clasificar en dos subtipos: las células DN1 ($CD19^+$ $CXCR5^+$), y las células DN2 ($CD19^+$ $CD11c^+$ $CXCR5^-$). La subpoblación DN2, expandida en pacientes con LES, se caracteriza por tener un fenotipo parecido al de las células plasmáticas y tener una hiperreactividad a la estimulación del receptor TLR7 [204].

Finalmente encontramos a los linfocitos T, los cuales se dividen en dos grandes subpoblaciones: las células T $CD4^+$ o auxiliares (del inglés, *helper cells*); y las células T $CD8^+$, también conocidas como células T citotóxicas. Los linfocitos T desempeñan un papel crucial en la patogénesis del LES, donde la desregulación de estas células incide directamente en la tolerancia periférica, dando lugar a la hiperactivación de las células B. Se han identificado múltiples subgrupos de células T vinculados con la patogénesis de la enfermedad. Estos subgrupos, al inducir una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias y al participar en interacciones con otras células, estimulan la síntesis de autoanticuerpos y contribuyen al deterioro tisular [205]. En el contexto del LES, se observa una correlación positiva entre una mayor activación de las células T y la progresión de la enfermedad. Entre estas, las células de memoria efectora emergen como una subpoblación fundamental en el proceso de la autoinmunidad. Estas células presentan un fenotipo ($CD62L^-$ $CD44^+$) que es opuesto al fenotipo de las células T naïve ($CD62L^+$ $CD44^-$) [206].

La interacción entre las células T y las células B se considera uno de los eventos más relevantes y tempranos en el contexto de los procesos autoinmunes, el cual desempeña un papel crucial en la activación de las células B y la consecuente producción de autoanticuerpos. Tradicionalmente, las células T auxiliares foliculares (Tfh) han sido consideradas como las protagonistas en esta interacción, especialmente en la estimulación de las respuestas de las células B en los diferentes órganos linfoides secundarios, como es el caso del bazo [207]. Sin embargo, la investigación reciente ha evidenciado que las células Tfh no constituyen el único componente encargado de estas interacciones. Fuera de los folículos, que son donde se encuentran los centros germinales, las células T auxiliares

extrafoliculares (Tefh, del inglés *extrafollicular T helper cell*) emergen como una población clave en las enfermedades autoinmunes [208]. A diferencia de las células Tfh, que se encuentran confinadas en compartimentos específicos, las células Tefh exhiben una mayor plasticidad y capacidad de migración hacia los tejidos inflamados. Esta capacidad de operar en un entorno inflamado tiene como función estratégica la de promover las respuestas inmunitarias locales, incluida la producción de autoanticuerpos. Las interacciones T-B pueden dar lugar a respuestas autoinmunes aberrantes, y se han observado en enfermedades autoinmunes como el LES y la artritis reumatoide [209, 210].

3.4 Modelos murinos de lupus

Los modelos murinos de lupus han surgido como herramientas indispensables para comprender los complejos mecanismos de la patogenia del LES, y evaluar la eficacia de nuevas dianas terapéuticas. La progresión paso a paso en la investigación de una enfermedad, desde los experimentos *in vitro* hasta los modelos animales preclínicos, pasando por las pruebas en humanos *in vivo* y, en última instancia, los ensayos clínicos, ha sido fundamental para allanar el camino a los avances terapéuticos que tenemos en la actualidad (**Figura 8**).

Existen una amplia gama de estos animales de experimentación, los cuales presentan diferentes aspectos específicos de la fisiopatología del lupus y que recapitulan distintos aspectos de la enfermedad en humanos [211]. En general, los modelos de experimentación para el estudio de LES se pueden diferenciar en tres grandes categorías: los modelos transgénicos o genéticamente modificados, los modelos inducidos y los modelos espontáneos.

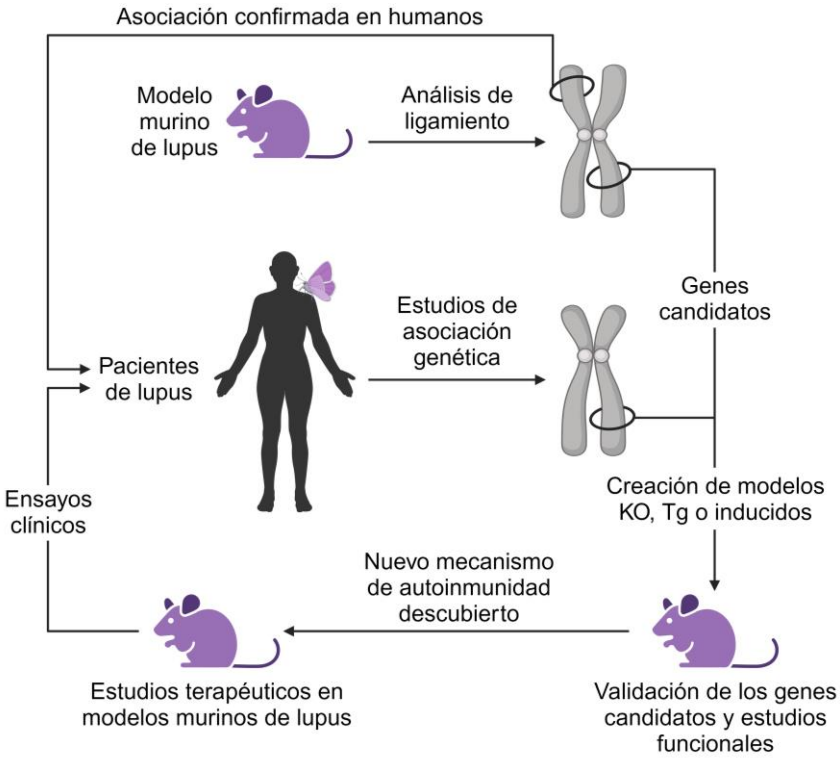

Figura 8. Integración de estudios humanos y murinos para el descubrimiento de nuevos mecanismos y fármacos para el LES. El estudio de genes de susceptibilidad tanto en pacientes con lupus como en modelos murinos de lupus ha permitido identificar posibles dianas terapéuticas. Para validar la asociación de estos genes con los síntomas de la enfermedad, se llevan a cabo estudios exhaustivos en estos animales. Finalmente se procederían a realizar los ensayos clínicos en humanos. Imagen adaptada de [211], y modificada en *BioRender*.

Los modelos transgénicos son cruciales para comprender la función de genes específicos en el desarrollo y respuesta a condiciones patológicas complejas. Hasta la fecha, la susceptibilidad al LES se ha asociado con numerosos genes mediante estudios de GWAS [212]. Existen técnicas de ingeniería genética avanzadas para investigar a fondo la función de distintos genes, como lo son el *knock-in* y el *knock-out*, las cuales posibilitan la manipulación controlada de estos genes, ya sea para su sobreexpresión, inactivación o eliminación. En el contexto del LES, cabe resaltar uno de los modelos empleados en este proyecto, el modelo TLR7.tg6. Este modelo se caracteriza por la sobreexpresión del gen *Tlr7*, debido a una inserción de varias copias del gen en el cromosoma Y. De esta manera, en los machos se desarrolla un proceso autoinmune agudo, caracterizado por la producción de

autoanticuerpos, esplenomegalia y otros fenotipos patológicos asociados con el lupus en humano [213].

Los modelos inducidos son aquellos en los que aparecen signos de enfermedad tras la administración de un agente externo. Dentro de esta categoría, los modelos más conocidos y usados serían dos: el modelo inducido por pristano, cuya inducción intraperitoneal induce en los ratones una enfermedad similar al lupus, con glomerulonefritis, artritis y la presencia de autoanticuerpos [214]; y el modelo inducido por la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, del inglés *graft-versus-host disease*), el cual resulta en una activación masiva de células B policlonales del huésped, y en la expansión y producción de inmunoglobulinas circulantes [215]. Recientemente se ha desarrollado un tercer modelo inducido, basado en la administración tópica de un agonista de los receptores TLR7, el imiquimod (IMQ). La aplicación repetida de IMQ induce el desarrollo de una enfermedad con características muy similares al lupus en humanos, incluyendo la producción de autoanticuerpos, la aparición de esplenomegalia y glomerulonefritis [216]. El modelo inducido por IMQ también se ha empleado en este proyecto y se profundizará en él en los próximos apartados.

Finalmente, los modelos espontáneos son aquellos en los cuales los ratones desarrollan una enfermedad de manera natural, sin intervención externa. Estos modelos son muy valiosos en la investigación biomédica ya que reflejan condiciones patológicas que surgen de manera similar a cómo se manifiestan en los seres humanos. Dentro de esta categoría podríamos destacar los tres modelos clásicos y muy utilizados en el ámbito de la investigación del LES. En primer lugar, la cepa NZB/W F1 (del inglés *New Zealand Black and White F1*), la cual desarrolla un fenotipo severo similar a la enfermedad de pacientes con lupus, exhibe linfoadenopatía, esplenomegalia y un aumento de los anticuerpos ANA en sangre [211]. En segundo lugar, la cepa MRL-*lpr/lpr*, caracterizada por una mutación autosómica recesiva (*lpr*) que genera lo que se conoce como linfoproliferación, exhibe un aumento de células del sistema inmune, una elevada tasa de mortalidad y altas concentraciones de inmunoglobulinas circulantes [217]. Finalmente, la cepa BXSB.*yaa* [218], la cual se

caracteriza por la presencia de un acelerador de la autoinmunidad ligado al cromosoma Y, conocido como *yaa* (del inglés, *Y-linked autoinmune accelerator*). Se trata de una translocación de una porción del cromosoma X al cromosoma Y, dando como resultado una duplicación de un gran número de genes, entre los que se incluye el *Tlr7* [104]. El aumento en la expresión del *Tlr7* es suficiente para generar la enfermedad en los machos [219].

También se utilizan cepas portadoras de loci de susceptibilidad al LES. En ratón se han identificado tres, conocidos como *Sle1*, *Sle2* y *Sle3* [220]. Estos están involucrados en la pérdida de la tolerancia a los antígenos nucleares, lo que conduce a la hiperactividad de las células B y T, que culminan en la secreción de autoanticuerpos [221]. Mediante el proceso de retrocruzamiento con ratones C57BL/6, se desarrollaron una serie de ratones congénitos que albergaban dichos loci de susceptibilidad [222]. En nuestro grupo de investigación también se trabaja con un modelo espontáneo con dichas características, el modelo B6.*Sle1.yaa*.

Los modelos murinos de lupus han sido un recurso imprescindible y clave para el estudio de esta enfermedad durante las últimas décadas. Los hallazgos en estos modelos han proporcionado información fundamental y novedosa sobre la patogénesis del LES a nivel celular y molecular. A pesar de las diferencias entre los sistemas inmunológicos del ratón y del humano, estos animales siguen siendo extremadamente valiosos como modelos preclínicos para evaluar el valor terapéutico y los posibles tratamientos de la enfermedad [223].

3.5 Sintomatología, signos y tratamientos actuales del LES

Los modelos murinos de lupus representan poblaciones genéticamente homogéneas para estudiar el inicio y la progresión patogénica de la enfermedad, tanto a nivel local como periférico, y en los diferentes órganos [224]. La elección de un modelo adecuado para el

estudio de esta patología resulta fundamental, dependiendo de los aspectos que se deseen analizar, dado que la sintomatología y los signos del lupus abarcan un amplio espectro. La presencia y detección de anticuerpos antinucleares (ANAs), anticuerpos anti-dsDNA y anticuerpos anti-RNA o asociados al RNA, como los anticuerpos anti-Sm, son una característica distintiva del LES en humanos, así como el desequilibrio en las respuestas inmunes de las células B y T. Entre las manifestaciones clínicas más relevantes se incluyen las lesiones cutáneas, la glomerulonefritis o daño renal, la artritis, la esplenomegalia, los síntomas neurológicos como las disfunciones cognitivas o la depresión, y las manifestaciones gastrointestinales, cardiacas o pulmonares [225, 226]. Sin embargo, dado que cada paciente presenta un fenotipo único, cada modelo de ratón puede replicar características limitadas de la enfermedad.

Los modelos de ratón empleados en este proyecto se fundamentan en la sobreexpresión del gen *Tlr7*, siendo crucial el aumento en el número de copias de este gen para el desarrollo y progresión de la enfermedad en dichos animales [213, 227]. La sobreexpresión de este gen, duplicada en modelos con un fondo genético predispuesto a padecer una enfermedad autoinmune leve, como la cepa B6.*Sle1*, donde *Sle1* representa uno de los mayores locus de susceptibilidad al lupus (*Sle1*.tg) [228], o un aumento más significativo en la expresión del *Tlr7* (TLR7.tg) en modelos que actúan como controles sanos, es suficiente para desencadenar un fenotipo grave de la enfermedad [213, 229]. Las cepas con una expresión elevada del *Tlr7* presentan un aumento en la producción de autoanticuerpos en suero, un desequilibrio completo de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune, como la reducción de las células MZB y FOB, o la expansión de células plasmáticas y T foliculares, así como el aumento de las células mieloides [81, 104, 213]. En etapas avanzadas, se observa una infiltración de células del sistema inmune en los diferentes órganos, como las células $CD11b^+$, glomerulonefritis, o el aumento del tamaño del bazo. También se puede llegar a observar una pérdida de peso, artritis, erosiones cutáneas y déficits cognitivos [227, 230]. En definitiva, estas cepas asociadas al TLR7 se utilizan para proporcionar una comprensión

detallada de los mecanismos inmunológicos, celulares y moleculares, que promueven el desarrollo de la respuesta autoinmune en los diferentes órganos.

No obstante, los modelos murinos de lupus no se usan solo para analizar y comprender los mecanismos de la enfermedad, sino que también han servido para evaluar la eficacia de posibles tratamientos. Hasta la fecha, solo unos pocos medicamentos han sido aprobados para el uso frente al LES en humanos [211]. Han hecho falta unos 60 años de investigación, aproximadamente, para que se aprobase el primer tratamiento biológico, conocido como Belimumab, en 2011. Este compuesto es un anticuerpo monoclonal cuya diana es el factor activador de las células B (BAFF, del inglés *B-cell activating factor*), el cual ha cumplido con todos los criterios de los ensayos clínicos y ha sido recomendado para el tratamiento del LES [231]. La hidroxicloroquina, un antipalúdico, es el tratamiento estándar para la enfermedad y se recomienda en pacientes con síntomas, pero sin tener los órganos afectados o con lesiones [232]. Los corticosteroides, aunque se administran para el tratamiento del LES, su capacidad para inducir inmunosupresión generalizada se ve acompañada de efectos secundarios. En casos de pacientes con lesiones severas en órganos y una alta actividad de la enfermedad, se puede considerar la utilización de agentes inmunosupresores en combinación con hidroxicloroquina. Dado que el tratamiento inmunosupresor carece de especificidad, con el tiempo se han ido descubriendo varios agentes biológicos que se encuentran en fase de desarrollo, con el objetivo de lograr una inmunomodulación dirigida, la remisión de la enfermedad y una mejora en la calidad de vida de los pacientes. Además del Belimumab, cabe mencionar el Rituximab, un anticuerpo anti-CD20 dirigido a linfocitos B, utilizado también en casos severos, y el compuesto Anifrolumab, un antagonista del receptor del IFN de tipo I, el cual también ha resultados muy positivos en el tratamiento del LES [233].

A pesar de los grandes avances que se han hecho en los tratamientos para el lupus, persiste la falta de consenso en relación a la etiología y patogénesis de la enfermedad. El empleo de estudios genéticos emerge como un recurso de gran potencial para identificar las vías de

señalización que contribuyen a la patogenia del lupus. En la actualidad, se han identificado diversas regiones genéticas vinculadas al lupus, y los genes presuntamente responsables tienden a coexpresarse y colaborar en vías de señalización compartidas. Las funciones de estos genes en estas vías ofrecen información muy valiosa acerca de los mecanismos y el desarrollo de la enfermedad, al mismo tiempo que sugieren posibles dianas para futuras estrategias terapéuticas [234]. Estudios recientes de GWAS en humanos han identificado una serie de genes asociados a la enfermedad, pero de los que se desconoce el papel. En este sentido, los modelos murinos permiten la evaluación del papel de genes novedosos identificados en estudios humanos (**Figura 8**) [211]. En este contexto, esta es la estrategia utilizada para este proyecto en el que se va a evaluar en detalle el papel del gen *Bank1*, identificado mediante GWAS como gen de susceptibilidad al LES en humanos, en modelos de ratón.

4. EL PAPEL DE BANK1 EN EL LUPUS Y EN LA AUTOINMUNIDAD

A lo largo de los años, los estudios genéticos han adquirido un papel crucial, beneficiándose de los avances científicos y de las técnicas en constante evolución destinadas a identificar variantes genéticas asociadas al LES y a otras enfermedades autoinmunes complejas. En este contexto, *BANK1* ha emergido como un gen de particular relevancia. En el marco de este proyecto, hemos realizado un análisis detallado de las funciones de este gen, explorando sus relaciones y funciones específicas en el LES, destacando su papel en la señalización de las células B, así como en la vía del receptor TLR7.

El grupo de investigación del doctor Kazumasa Yokoyama [235] identificó la proteína BANK1 por primera vez mediante un análisis de fosforilación en fase sólida [236], mientras buscaban sustratos para LYN, una proteína de la familia Src de tirosina quinasas (PTK, del inglés *protein tyrosine kinase*), la cual se activa tras la unión del ligando al receptor BCR [237]. La proteína que aislaron resultó tener repeticiones de anquirina, cuya secuencia codificante se determinó mediante RT-PCR de ARN aislado de células B Daudi. En este proceso se identificó la isoforma principal de la proteína, compuesta por 755 o 785 aminoácidos, dependiendo de si presentan un exón 1A o 1B, y con un peso molecular de 85500 Da.

El gen *BANK1* se encuentra localizado en el cromosoma humano número 4 (4q24), y en el cromosoma número 3 en ratones. Los primeros análisis de expresión génica, usando la técnica de *northern blot* y tejidos de ratón, demostraron que BANK1 se expresaba tanto en las células B del bazo como de los nódulos linfáticos. Esta expresión se observó en ratones adultos, pero no en modelos *Rag*$^{-/-}$ o SCID, en los cuales el desarrollo de las células B está bloqueado en el estadio pro-B [238]. Siguiendo el desarrollo de las células B, BANK1 se observó en las células B inmaduras y recirculantes. Su expresión también fue corroborada en las células IgM^{+}IgD^{-}, IgM^{+}IgD^{+} y en las poblaciones más maduras, IgM^{-}IgD^{+}. Además, se descubrió que la proteína de BANK1 presentaba cierta homología con otras proteínas que contenían anquirina, como BCAP (del inglés *B-cell adaptor protein*) y la proteína Dof de

Drosophila (**Figura 9**). La proteína BCAP es un sustrato de tirosina quinasa multifuncional que regula las vías de transducción de señales en varios tipos celulares, y que conecta el receptor BCR con la activación de la quinasa PI3K (del inglés *phosphoinositide 3-kinase*) [239, 240]. Por otro lado, la proteína Dof regula, de manera específica, la vía de señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR, del inglés *fibroblast growth factor receptor*) en Drosophila [241]. Las repeticiones de anquirina están localizadas entre los aminoácidos 309 y 372 de BANK1, mientras que una secuencia de hélice superenrrollada (del inglés *coiled-coil*) se encontró entre los aminoácidos 647 y 675. A partir del descubrimiento realizado por el doctor Yokoyama y su grupo de investigación, BANK1 comenzó a ganar importancia en el ámbito científico, anticipando nuevas revelaciones en el futuro.

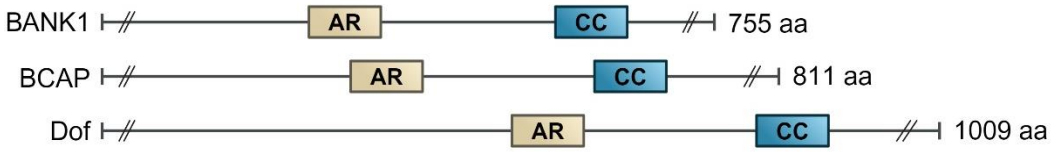

Figura 9. Estructura de la proteína BANK1 y sus homólogas. Representación esquemática de la estructura y motivos de la proteína BANK1 en humanos, la proteína BCAP en ratón, y la proteína Dof en Drosophila. Imagen adaptada de [235], y modificada en *BioRender*.

4.1 Asociación genética de *BANK1* con la autoinmunidad

En el año 2008, el grupo de la doctora Alarcón-Riquelme identificó *BANK1* como un gen de susceptibilidad al LES, mediante un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) en una población europea [80]. En este estudio, de entre todos los SNPs, se identificó una asociación entre la enfermedad y una sustitución no sinónima de la proteína de BANK1 (rs10516487), en concreto fue un cambio de arginina a histidina en la posición del aminoácido 61 (R61H), en el exón codificante número 2. La diferencia entre un SNP sinónimo y uno no sinónimo es que, aunque ambos ocurren en una región codificante del ADN, los primeros no alteran la secuencia de aminoácidos, mientras que los segundos sí lo hacen,

pudiendo tener consecuencias funcionales en la proteína resultante [242]. Otra variante, asociada con la enfermedad, fue localizada en el intrón 1 (rs17266594), precediendo al exón 2, en el sitio de ramificación (*branch-point site*), punto de referencia para la maquinaria de splicing. Por último, se identificó un tercer SNP asociado (rs3733197), el cual causa una sustitución de alanina por treonina, en la posición del aminoácido 383 (A383T), localizado en el exón 7, que codifica el dominio de repeticiones de anquirina [80].

Mediante la técnica de RT-PCR, se llevó a cabo un análisis de la estructura de *BANK1*, el cual reveló dos isoformas principales. La primera es la isoforma completa, conocida como *full-length* (FL), de 755 o 785 aminoácidos. Por otro lado, la segunda isoforma, conocida como Delta 2 (D2), presenta un tamaño reducido de 652 aminoácidos, al carecer por completo del exón 2, el cual codifica para un dominio TIR conformacional [243] (**Figura 10**).

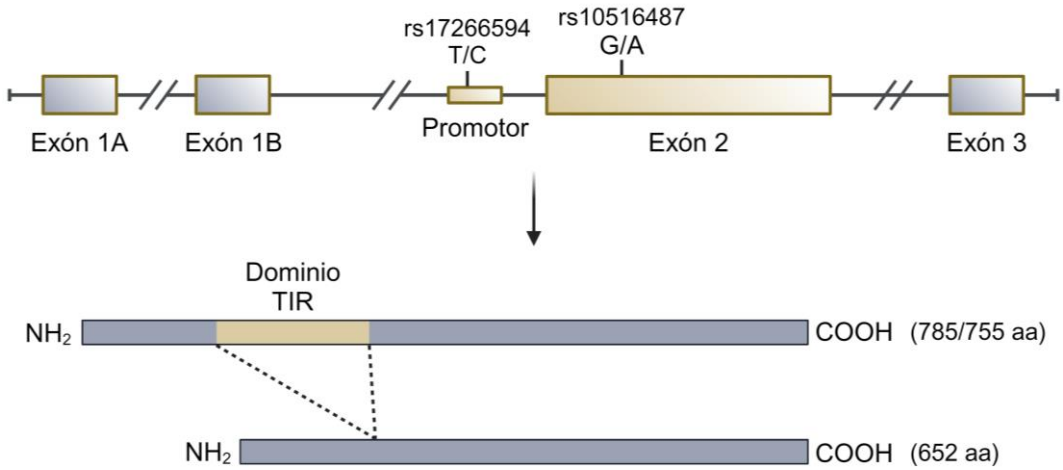

Figura 10. Estructura esquemática de BANK1. El SNP rs17266594, ubicado en el sitio de ramificación del intrón 1, altera la eficiencia de empalme de los transcritos de longitud completa (FL) y Δ2. El SNP rs10516487 resulta en una sustitución no sinónima R61H. El empalme alternativo da lugar a dos isoformas, FL y Δ2, esta última con la eliminación del exón 2. La isoforma corta Δ2 carece del dominio putativo para TIR. Imagen adaptada de [80] y modificada en *BioRender*.

Se observó que un incremento en la expresión de la isoforma D2, acompañado de una disminución en la isoforma FL, estaba genéticamente asociado con una mayor protección frente al LES [80]. Además, se observó que la isoforma FL tiene la capacidad de formar

complejos de andamiaje más extensos en el citoplasma, lo que sugiere un potencial aumento en la multimerización [244]. Un aspecto importante de la asociación genética entre *BANK1* y el LES es que la frecuencia alélica más grande de rs10516487 (R61) mostró dicha asociación y, por lo tanto, se postuló como la variante de riesgo.

Esta asociación genética fue replicada por el grupo de investigación del doctor Guthridge [84], el cual sugirió que los polimorfismos de *BANK1* alteraban el desarrollo y la función normal del sistema inmune, incrementando el riesgo de desarrollar la enfermedad. Estudios adicionales replicaron dicha asociación en la población finlandesa [245], así como en otras poblaciones europeas [63, 246-248]. En uno de estos estudios, en el cual se usó una cohorte de más de 7000 casos de LES y cerca de 16000 controles, la variante de riesgo identificada fue rs10028805 [62], posteriormente confirmada en una población afroamericana [82]. La asociación genética de los polimorfismos de *BANK1* con el LES también fue confirmada en poblaciones chinas, especialmente en Hong Kong, y tailandesas [249-251]. Sin embargo, *BANK1* mostró una asociación débil en poblaciones mexicanas [252], o nula en una población con ascendencia amerindia [253]. Un descubrimiento a destacar fue la asociación en afroamericanos, donde dicha conexión fue particularmente fuerte [83, 254].

También se llevaron a cabo numerosos estudios adicionales de asociación con otras enfermedades. En primer lugar, *BANK1* no mostró ninguna asociación con el síndrome anti-fosfolípido primario [255], por otro lado, sí mostró dicha asociación con la artritis reumatoide (AR) [256], aunque no pudo ser replicada en un segundo estudio [257]. De manera similar, los polimorfismos genéticos de *BANK1* sí que mostraron una asociación con la esclerosis sistémica (SSc, del inglés *systemic sclerosis*) [258], no obstante, estos sí se pudieron replicar en una segunda población europea [259]. Asimismo, se encontró una asociación genética entre el SNP rs10028805 de *BANK1* y la leucemia linfocítica crónica (CLL, del inglés *chronic lymphocytic leukemia*) [260], y otra variante (rs3733197) se vinculó con niveles elevados de colesterol LDL (del inglés *low density lipoproteins*), en una población

coreana [261]. Finalmente, se demostró que también existía una asociación genética con el síndrome de Sjögren primario (pSS, del inglés primary Sjögren's syndrome) [262].

El grupo de investigación de la doctora Vinuesa [79] encontró otra variante de *BANK1* que implicaba un cambio de triptófano a cisteína en la posición del aminoácido 40 ubicada en el exón 2 (W40C). En este estudio se encontró que la expresión de BANK1 40C en las células HEK293T condujo a una reducción en la formación de los llamados secuestrasomas, o autofagosomas, estructuras esenciales en la degradación de agregados proteicos. Estos secuestrasomas incluyen p62, una proteína adaptadora que regula la vía NF-κB mediante interacciones con TRAF6 y CYLD (del inglés *Cylindromatosis tumor suppressor lysine deubiquitinase*) [263]. En estas células, la expresión de BANK1 condujo a la formación de inclusiones citoplasmáticas, semejantes a los secuestrasomas. De esta manera se confirmó la colocalización de BANK1 con TRAF6, la proteína p62 y la enzima CYLD [79], sugiriendo que BANK1 podría secuestrar a TRAF6, reduciendo su capacidad de ubiquitinar a IRF5, lo que disminuiría la activación de esta última y la producción de IFN tipo I, clave en el LES [264]. La variante BANK1^{W40C} reduciría la formación de estos secuestrasomas, lo que incrementaría la activación de IRF5 y la inducción de IFN tipo I, agravando la enfermedad [79].

Otro estudio profundizó más en el papel de *BANK1* en las alteraciones de la señalización en las células B periféricas [265]. Se demostró que las células B de los portadores del alelo de riesgo rs10516487 de *BANK1* presentaban un aumento en la expresión basal de la proteína FOXO1, clave en la vía de señalización de PI3K-AKT, desempeñando un papel crucial en el proceso de diferenciación celular [266]. La activación de la vía PI3K/AKT se vio disminuida en individuos que portaban los alelos de riesgo de *BANK1*. Esta disminución se evidenció a través de la reducción en la fosforilación de AKT (del inglés *protein kinase B*) y PLC-γ2 (del inglés *phospholipase C gamma 2*), lo que indicaba una reducción general en la señalización del receptor BCR. De manera significativa, durante la estimulación BCR/CD40, la expresión de la isoforma completa de BANK1 aumentó en las células B portadoras del alelo de riesgo, correlacionándose con los niveles de ARN mensajero de *FOXO1* y de *AICDA*. Este hallazgo

fue clave, ya que *AICDA* desempeña un papel crucial en el cambio de clase de las inmunoglobulinas en las células B [265].

Todas las asociaciones genéticas más relevantes de los polimorfismos de BANK1 con las diferentes enfermedades, y en qué región de la proteína se localizan, están resumidas en la **Tabla 1** [267]. En esta tesis nos centraremos en el estudio y las funciones clave de BANK1 en la señalización de las células B.

Enfermedad	SNP	Localización	Referencia
LES	rs10516487	Dominio TIR	[80]
LES	rs17266594	-	[80]
LES	rs3733197	Repeticiones de anquirina	[80]
LES	rs17266594	-	[84]
LES	rs10028805	-	[63, 82, 83, 249-252, 254]
LES	W40C	Dominio TIR	[79]
SSc	rs10516487	Dominio TIR	[258]
SSc	rs3733197	Repeticiones de anquirina	[258]
AR	rs10516487	Dominio TIR	[256, 257]
CLL	rs10028805	-	[260]
Colesterol LDL	rs3733197	Repeticiones de anquirina	[261]

Tabla 1. Lista de las asociaciones genéticas de los polimorfismos de BANK1.

4.2 El papel de BANK1 en la señalización de las células B

La proteína BANK1 está constituida por tres dominios conservados: dos motivos similares a repeticiones dobles de anquirina [250], un dominio de hélice superenrrollada (coiled-coil) y un motivo Dof/BCAP/BANK (DBB) [268]. BANK1 también incluye en su secuencia varias

regiones ricas en tirosina y prolina que podrían proporcionar sitios de acoplamiento para proteínas que contengan los dominios SH2 y SH3 [269]. También se confirmó la presencia de un motivo funcional de unión a TRAF6, así como la presencia del dominio TIR funcional [270]. BANK1 se expresa principalmente en las células B y, como proteína adaptadora, o de andamiaje (del inglés *scaffold*), está involucrada en varías de las vías de señalización más importantes de dichas células [267] (**Figura 11**).

El primer estudio demostró que BANK1 se une a LYN, una tirosina quinasa de la familia Src [235]. En esta línea, estudios posteriores mostraron que BANK1 también se une a BLK, otra tirosina quinasa de la misma familia [269, 271, 272]. Ambas tienen un papel crucial en la señalización de los receptores BCR. Tras el reconocimiento del antígeno por parte de este receptor, los ITAM (del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de Igα/β del BCR son fosforilados por ambas quinasas [273]. En este sentido, BANK1 también es fosforilado y se une a las dos quinasas Src [236, 273]. BANK1 también se ha visto que interactúa con PLCγ2 [274]. Esta enzima tiene dos dominios de homología a Src (SH2) y un dominio SH3, se expresa en todas las células hematopoyéticas y pertenece a un grupo importante de moléculas “interruptoras” de la señalización, la cual juega un papel clave en la formación de segundos mensajeros como el inositol-1,4,5-trifosfato (IP3, del inglés *inositol 1,4,5-triphosphate*) y el diacilglicerol (DAG, del inglés diacylglycerol), lo que la hace muy importante en la regulación de la activación inmunológica [275]. PLCγ2 comienza hidrolizando al inositol polifosfato 5-fosfatasa (PIP2, del inglés *phosphatidylinositol biphosphate*), lo que genera IP3 y DAG. Tras la unión a su receptor, IP3 activa los canales de calcio (Ca^{2+}), lo que resulta finalmente en la movilización de calcio al interior celular mediante la apertura de dichos canales en la membrana plasmática [276]. La formación del complejo BANK1-PLCγ2 está sujeta a regulación por la ubicación celular y la actividad quinasa de BLK, indicando la participación de BANK1 en la modulación de la señalización del BCR mediante la interacción BANK1-BLK [274].

En el primer estudio en el que se emplearon ratones deficientes en *Bank1* (*Bank1*$^{-/-}$) [277] se observó un aumento en las respuestas de células B IgM^{+} a antígenos T-dependientes, así como un incremento en el número de células B maduras, la formación espontanea de centros germinales y un aumento en los niveles de IgG2a. Este fenotipo fue bloqueado mediante la eliminación, o doble *knock-out*, tanto de *Bank1* como de *Cd40*. Además, en condiciones *in vitro*, se observó un aumento en la proliferación mediada por CD40 y la supervivencia celular en los ratones *Bank1*$^{-/-}$, acompañado por un incremento en la activación de Akt. La estimulación de CD40 es conocida por desencadenar múltiples vías de señalización, como la vía de NF-κB, la vía de MAPK y la vía PI3K-Akt [278]. La activación de PI3K mediada por CD40 se inicia a través de la fosforilación de tirosina y, en este contexto, BANK1 podría estar actuando como un atenuador para la vía PI3K en la señalización del CD40. Este conjunto de evidencias subraya el papel fundamental de BANK1 en la señalización de CD40, donde su presencia reduce la activación de Akt mediada por CD40 y, por ende, previene las respuestas hiperactivas de las células B [277]. Finalmente, siguiendo esta vía de señalización de PI3K/AKT, los factores de transcripción FOXO1 y AICDA se incrementan en sujetos donde están presentes las variantes de riesgo de BANK1, lo que resulta en un aumento en los números de células plasmáticas, células B de los centros germinales y células B de memoria [265].

Además de las vías de señalización mediadas por receptores localizados en las membranas de las células B, BANK1 también está involucrado en las vías intracelulares. Las vías de señalización de los TLRs endosomales, tanto de TLR7 como de TLR8 y TLR9, están estrictamente vinculadas a MyD88, una proteína adaptadora con dos motivos homotípicos de interacción: un dominio de muerte (DD, del inglés *death domain*) [279] y un dominio TIR [280]. El reclutamiento de Myd88 por parte de los TLRs endosomales ocurre tras la activación mediante su dominio TIR. La activación de MyD88, destacada como un impulsor significativo de la autoinmunidad [281], conlleva a su unión con la quinasa asociada al receptor de IL-1 4 (IRAK4, del inglés *interleukin 1 receptor associated kinase 4*), activando IRAK1 e IRAK2, que a su vez interactúan directamente con TRAF6. Esta interacción conduce

a la poliubiquitinación ligada a la lisina (K)63 de TRAF6, amplificando la señal y resultando en la activación de IRF5, IRF7, NFκB y las MAPKs [109, 110]. En el año 2020, Georg et al. [270] identificaron por primera vez la conexión de BANK1 dentro de la vía de los TLRs. Mediante estudios de inmunoprecipitación, se demostró que BANK1 interactúa y colocaliza con las dos moléculas clave de señalización del TLR7: MyD88 y TRAF6. El dominio TIR codificado por el exón 2 de BANK1, demostró ser crucial para la interacción con MyD88, la poliubiquitinación ligada a la lisina (K)63, y la inducción de la producción de la citoquina proinflamatoria IL-8. Además, se describieron cinco sitios de unión a TRAF6 previamente no identificados en las isoformas de BANK1, formando un complejo a través del dominio C-terminal con TRAF6. Este estudio resaltó, por primera vez, la importancia funcional del dominio TIR de BANK1, estableciendo un vínculo entre los análisis genéticos previos y los estudios en modelos animales con el riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes. Tras la estimulación del TLR7, TRAF6 forma un complejo con MyD88 e IRF7, lo que desencadena la producción de IFNα [282]. En estudios *in vitro*, se observó que la falta del exón 2 (D2), sin el dominio TIR, conllevó a una disminución significativa en la unión a MyD88, en comparación con la isoforma FL [270], lo que confirma la funcionalidad del dominio TIR de BANK1. La poliubiquitinación de BANK1, mediada por la lisina 63 (K63) a través del dominio TIR, resulta crucial para la activación de la vía de señalización y la producción de citoquinas [270].

Hasta la fecha, estos son todos los roles que se han descrito para BANK1 en las vías de señalización de las células B. La profundización en estos resultados es fundamental para tener una comprensión más detallada de la función de BANK1 en las células B y en la inmunidad. Todos los procesos en los que está implicado BANK1 en la señalización de las células B, descritos anteriormente, están detallados en la **Figura 11** [267].

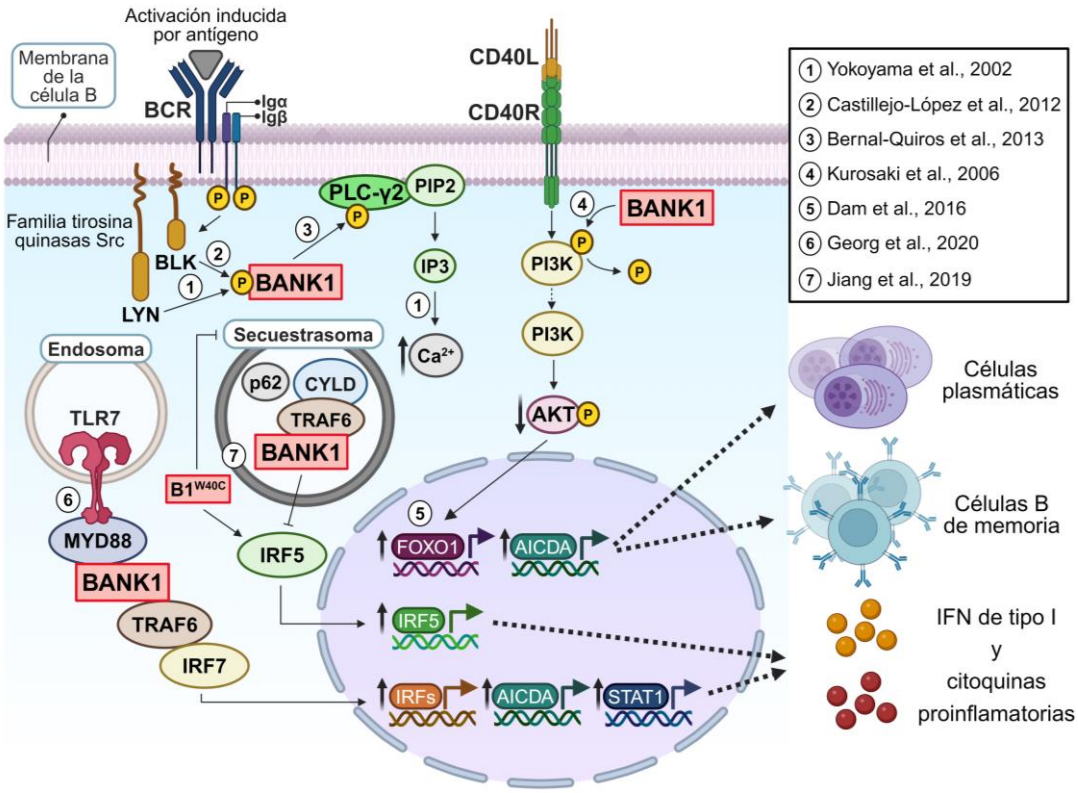

Figura 11. Modelo esquematizado de las diferentes vías de señalización en las que está implicado BANK1. Durante la activación del receptor BCR, BANK1 se fosforila y se une a las quinasas de la familia Src, LYN y BLK (1-2) [235, 272]. Además, BANK1 interactúa con PLC-γ2 (3) [274], regulando la movilización de calcio. BANK1 atenúa la activación de AKT mediada por CD40 (4) [277]. En la vía PI3K/AKT, se observa un aumento de los factores de transcripción FOXO1 y AICDA en sujetos con variantes de riesgo de BANK1, lo que conduce a un incremento de células plasmáticas y células B de memoria (5) [265]. BANK1 también interactúa con MyD88 y TRAF6, a través de la activación del receptor TLR7 (6) [270], lo que desencadena la producción de IFN de tipo I y citoquinas proinflamatorias. Finalmente, BANK1 se une a TRAF6, formando un complejo con la proteína secuestrasoma p62 y la enzima desubiquitinasa CYLD. En estas estructuras, BANK1 facilita el secuestro de TRAF6, disminuyendo así la activación de IRF5 y la inducción de IFN tipo I. Esta función es alterada por la mutación W40C en el exón 2 (7) [79]. Imagen adaptada de [267], y modificada en *BioRender*.

4.3 Mecanismos de BANK1 en modelos experimentales de enfermedad

Hasta la fecha, el conocimiento acerca del papel que BANK1 desempeña en las diversas enfermedades es muy limitado. Después de demostrarse la asociación genética entre *BANK1* y enfermedades autoinmunes como el LES [80] y la AR [256], se necesitaba pasar a los experimentos *in vivo*. Se estableció entonces un vínculo entre los análisis genéticos previos y los estudios en modelos animales de diferentes enfermedades.

En primer lugar, se identificó la implicación de BANK1 en la disfunción primaria (PNF, del inglés *primary non-function*) de los islotes pancreáticos, o islotes de Langerhans, un problema grave relacionado con el trasplante de dichos islotes [283]. Estos son estructuras formadas por cúmulos densos y compactos de células con función exclusivamente endócrina, del páncreas, que se encargan de producir hormonas como la insulina [284]. El procedimiento del trasplante, que utiliza islotes aislados de un páncreas donante, se emplea en el tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 1, una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción selectiva de las células β pancreáticas y la subsiguiente deficiencia de insulina [285]. El estudio se centró en DcR3, un receptor de la familia del TNF, evaluándose su capacidad para proteger los islotes de la apoptosis, a través de las vías de FasL, LIGHT o TL1A. Mediante la generación de ratones transgénicos que expresaban el receptor DcR3 humano, se identificó que dos moléculas, *Adcyap1* y *Bank1*, reducían la apoptosis de las células β al modular su expresión. El análisis de la expresión génica reveló que la sobreexpresión de *Adcyap1* o la reducción de la expresión de *Bank1*, en estos ratones, prevenían la apoptosis desencadenada por citoquinas, indicando un nuevo mecanismo de protección y supervivencia de los islotes. La apoptosis celular inducida por IL-1β o por glucosa es dependiente del flujo de Ca^{2+} [286]. En este contexto, un posible mecanismo de acción de DcR3, para proteger las células β, sería la inhibición de la regulación positiva de *Bank1*, inducida por las citoquinas, evitando así la movilización de Ca^{2+}, tal como se ha descrito previamente para BANK1 en las células B [235]. Cabe destacar que los cambios en

la movilización de Ca^{2+} dependientes de BANK1 no han sido confirmados por otros estudios, por lo que se requiere de una exploración adicional para comprender mejor dicha función.

Como se señaló anteriormente, BANK1 juega un papel crucial en la señalización de las células B. Durante la activación del receptor BCR, BANK1 se fosforila e interactúa con las quinasas de la familia Src, LYN y BLK. En este contexto, BANK1 actúa como una proteína adaptadora, o de andamiaje, estableciendo una conexión entre estas quinasas y los receptores IP3R, que pertenecen a la misma familia de BCAP [235, 243]. Adicionalmente, se ha identificado que el exón 2 de BANK1 en humanos codifica un dominio N terminal (TIR) compartido con BCAP, lo cual es de relevancia ya que los receptores TLR utilizan adaptadores que contienen el dominio TIR, como MyD88 y TRIF, para orquestar la activación de factores de transcripción tales como NF-κB, MAPK y factores reguladores del interferón [243]. En este contexto, Wu et al. [287] exploraron el efecto de BANK1 en la señalización del TLR9, otro TLR endosomal relevante en células B, y asociado con la autoinmunidad [288]. Se utilizaron ratones deficientes en *Bank1* y, mediante la estimulación con el agonista de TLR9, CpG, se observó una reducción en la fosforilación de la MAPK p38 en las células B del bazo, comparado con los ratones control. La deficiencia de *Bank1* también condujo a una disminución en la producción de la citoquina proinflamatoria IL-6 en respuesta a CpG, ya fuese sola o en combinación con la estimulación del BCR. Es importante destacar que la deficiencia de *Bank1* también afectaba negativamente la fosforilación de las quinasas MNK1/2 y eIF4E, inducidas por CpG. Estas quinasas forman parte de la vía MNK1/2/eIF4E/eIF4G en el proceso de iniciación de la traducción, controlada por p38, por lo tanto, la deficiencia de *Bank1* resultó en una reducción en la traducción de IL-6 [287].

Los siguientes estudios se centraron en investigar los efectos que pudiese tener BANK1 en el contexto de una enfermedad autoinmune utilizando modelos murinos de lupus. Para llevar a cabo este abordaje, se realizaron cruces entre ratones B6.*Sle1.yaa* y ratones deficientes en *Bank1* (B6.*Sle1.yaa.Bank1*$^{-/-}$) [81]. Este modelo lleva el locus *Sle1* [228], y el locus *yaa*, conocido acelerador de la inmunidad, resultado de la translocación de una región

del cromosoma X al cromosoma Y, que implica la duplicación de un gran número de genes, incluyendo el *Tlr7* [104], En este estudio, se observó el efecto de la deficiencia de *Bank1* en los principales fenotipos del lupus, una reducción en la producción de IgG total, así como de anticuerpos IgG anti-dsDNA, incluida la isoforma patogénica IgG2c, en los ratones B6.*Sle1.yaa.Bank1*$^{-/-}$ en comparación con la cepa B6.*Sle1.yaa.Bank1*$^{+/+}$. También se redujeron los niveles de IL-6 [287]. Mediante análisis de citometría de flujo, se observó que la deficiencia de *Bank1* restauró los fenotipos celulares, tanto de los linfocitos del bazo como de las células mieloides. El único efecto observado en las células T fue la normalización de la expresión de CXCR4 en las células Tfh, sugiriendo que BANK1 podría tener un efecto en la formación del área extrafolicular [81]. Además, se realizaron experimentos *in vitro* mediante la estimulación de los receptores TLR7 y TLR8, mediante el uso de sus agonistas imiquimod y resiquimod, respectivamente. Estos mostraron que *Bank1* regula las vías de señalización inducidas por el TLR7 en las células B, lo que lleva a la reducción de la expresión de *Aicda*, así como de genes de factores de respuesta al IFN (*Irf1*, *Irf7* e *Irf9*), *Stat1* y genes del IFN de tipo I (*Ifna4* e *Ifnb*) [81].

En los años posteriores, se ha seguido relacionando a BANK1 con diferentes enfermedades. BANK1 ha sido identificado como un factor implicado en la linfomagenia de células B, específicamente en la tumorigénesis de células B inmaduras [289]. El modelo murino SL/KH, el cual representa los pre-linfomas B espontáneos, se utilizó en este contexto. Mediante técnicas de RT-PCR, se demostró que la sobreexpresión de *Zfp521*, un gen potencialmente relacionado con la inducción de la linfomagenia de células B, generó un aumento significativo en la expresión de genes asociados al pre-BCR, incluyéndose *Bank1*. La inhibición de *Bank1* resultó en una reducción en la proliferación de las células pre-B [289].

Además, se ha establecido una asociación de BANK1 con la colitis, una enfermedad inflamatoria conocida también como enfermedad de Crohn. Se empleó una metodología innovadora basada en la inmunocaptura de complejos MHC-II obtenidos de ganglios linfáticos, seguida de un análisis espectrométrico de péptidos eluidos. Se identificaron

péptidos derivados de una serie de proteínas, incluida BANK1, en un modelo murino de colitis inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS, del inglés *dextran sodium sulfate*) [290].

Por último, un estudio en ratones con artritis inducida por colágeno (CIA, del inglés *collagen-induced arthritis*), modelo clásico de AR, observó una disminución en los niveles de BANK1 en el bazo, en la sangre periférica y en los ganglios linfáticos durante la etapa aguda de la artritis. Esta reducción se correlacionó negativamente con la gravedad de la enfermedad y la producción de autoanticuerpos [291].

A pesar de todos los avances e investigaciones realizadas, se necesita de una comprensión más profunda del papel de BANK1 en la señalización de las células B. En este proyecto nos centraremos en el estudio de las células B y, más concretamente, en una subpoblación que ha ganado mucho interés en los últimos años, las células B asociadas a la edad (ABCs, del inglés Age-associated B cells), en el contexto de activación de la vía del TLR7 endosomal.

5. CÉLULAS B ASOCIADAS A LA EDAD (AGE-ASSOCIATED B CELLS)

En apartados anteriores se describieron las principales poblaciones de células B, desde los primeros estadios de diferenciación, hasta las células B activadas por antígeno, llegando finalmente a las células plasmáticas y de memoria. Además de estas poblaciones conocidas, en el año 2011 se identificó una nueva subpoblación de células B: las células B asociadas a la edad (ABCs) [292, 293], las cuales han despertado un creciente interés en toda la comunidad científica. Estas células, presentes tanto en ratones como en humanos, tienden a acumularse con el envejecimiento, tienen experiencia antigénica desarrollada en circunstancias de señalización específicas, y están involucradas en la memoria frente a patógenos externos [294-296]. No obstante, el interés se intensificó al descubrirse que estas ABCs están fuertemente vinculadas con las enfermedades autoinmunes [297-299]. Por todo ello, en la última década, se ha colocado a las ABCs en el foco de estudio. Estas células tienen un papel significativo en la respuesta inmune, y presentan un origen, fenotipo, perfil transcripcional y funciones únicas, las cuales se detallan a continuación.

5.1 Caracterización y localización de las ABCs

Para identificar la población de las ABCs se ha empleado fundamentalmente la citometría de flujo y diversos marcadores. En un inicio, el doctor Yi Hao, junto a su grupo de investigación [292], las describió como células B $CD19^+$ carentes de los marcadores CD21, CD23, CD93 y CD43, mientras que Rubtsov et al. [293] las definió como una población celular doblemente positiva para los marcadores CD11b y CD11c, siendo igualmente células $CD19^+$. A pesar de las diferencias en los marcadores específicos utilizados por ambos grupos, estas células comparten una característica principal. En los dos estudios se demuestra que estas ABCs, como su propio nombre lo indica, aumentan en número y proporción de manera continua con la edad. Estas células son prácticamente indetectables en el bazo de ratones jóvenes, entre los 3 y 6 meses de edad, constituyendo un grupo fácilmente distinguible y en

constante aumento en ratones de unos 12 a 18 meses de edad aproximadamente [292]. Este incremento gradual persiste durante toda la vida, sin embargo, hay que señalar que incluso ratones de la misma edad, exhiben una variabilidad individual considerable en el inicio y la cinética del crecimiento de estas ABCs [300]. En humanos, existe una población con características fenotípicas y funcionales similares a las ABCs, denominada DN2 (del inglés *double negative 2*), las cuales están caracterizadas por la nula expresión de los marcadores IgD y CD27 [125].

La firma transcripcional de las ABCs abordada por Rubtsov et al. [293], fue posteriormente corroborada en otros estudios. La mayoría de las ABCs expresan T-bet, un marcador intracelular y regulador transcripcional codificado por el gen *Tbx21*, previamente asociado con el linaje de las células Tfh activadas [301]. Este factor de transcripción se había vinculado con las células B debido a que es clave en la producción de citoquinas proinflamatorias e inmunoglobulinas, en el cambio de isotipo transitorio de las IgG hacia el isotipo patológico IgG2a/c, en determinar la naturaleza y la calidad de las poblaciones efectoras y de memoria, y en algunos trastornos linfoproliferativos de células B [302-304], pero no se le había asociado con una subpoblación duradera de células B en estado avanzado de diferenciación [300]. Investigaciones posteriores llevadas a cabo en modelos de ratón han demostrado que las ABCs, específicamente aquellas que expresan CD11c^{+} T-bet^{+}, están implicadas en la generación de anticuerpos anti-cromatina, en el modelo de lupus cGVHD bm12 [305]. Un estudio realizado por Manni et al. [306], utilizó el modelo de lupus knock-out para las proteínas SWEF (SWAP-70 y DEF6), destacando la influencia crucial de T-bet en la formación de las ABCs y la producción de autoanticuerpos. Se observó que la deficiencia de T-bet impedía la diferenciación de las ABCs y, como consecuencia, la generación de autoanticuerpos, subrayando así la importancia de la expresión de T-bet en este proceso [306, 307]. Mediante citometría de flujo, se realizó una caracterización adicional de estas células, las cuales fueron positivas para los marcadores CD5, CD138, y expresaban niveles elevados de Fas, CD80, CD86, CD122, de la molecula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1, del inglés *vascular cell adhesion molecule 1*) y del complejo MHC-II [293] (**Figura 12**).

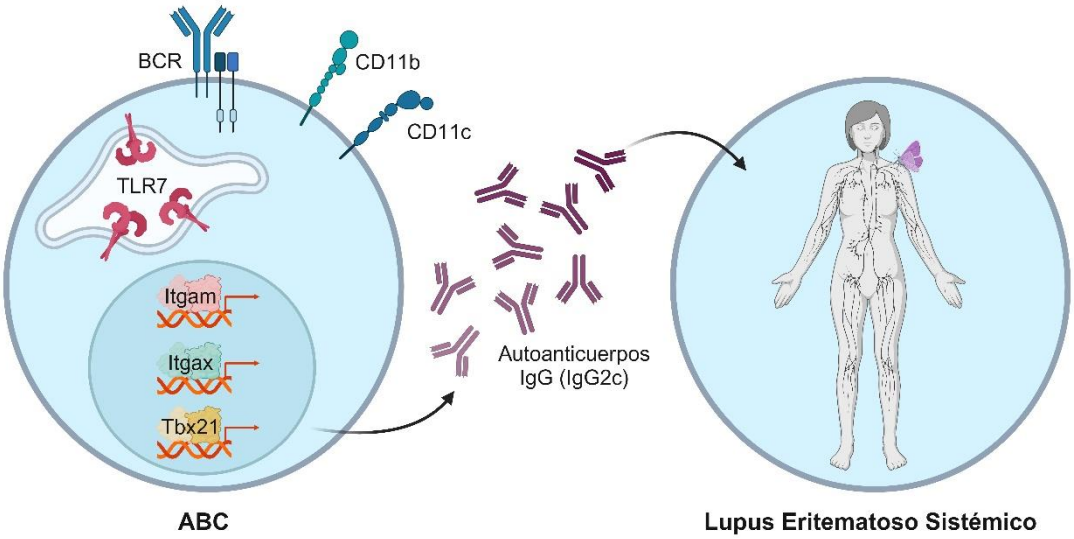

Figura 12. Esquema del hipotético papel de las ABCs en el desarrollo del LES. Las células B se activan a través de los receptores TLR7. Estas comienzan a expresar los marcadores característicos de las ABCs: CD11b (*Itgam*) y CD11c (*Itgax*). El factor de transcripción T-bet (*Tbx21*) promueve el cambio de clase de las inmunoglobulinas hacia el isotipo IgG2a/c, contribuyendo así al desarrollo y progresión de la autoinmunidad. Imagen creada en *BioRender*.

En resumen, y en base a los criterios fenotípicos aplicados por estos grupos de investigación, podríamos estar hablando de hasta tres subtipos dentro de las ABCs. Dentro del grupo de células B que carecen de los marcadores clásicos de las células MZB y FOB (CD21 y CD23 respectivamente), dos tercios de estas células expresan el factor de transcripción T-bet, y aproximadamente la mitad de estas células expresan los marcadores de superficie CD11b y CD11c. Muchos estudios emplean indistintamente unos marcadores u otros, sin embargo, hasta ahora, no se comprende completamente si estas subpoblaciones representan grupos distintos y estables de células o si, en cambio, se encuentran en diferentes etapas de diferenciación o activación dentro de una única línea celular. Esta incertidumbre no solo plantea preguntas significativas sobre el origen de las ABC, sino que también suscita interrogantes sobre la cronología y la plasticidad durante el proceso de diferenciación [300].

En cuanto a la localización de las ABCs, se observó que presentaban una distribución tisular única, en comparación con otras subpoblaciones de células B. Mientras las ABCs son

consistentemente observadas en el bazo, aumentando en número con la edad, hay una gran escasez de estas células en la mayoría de los órganos y ganglios linfáticos, independientemente de la edad [292, 293]. También se observó la presencia de las ABCs en la médula ósea y la sangre periférica, aunque con una variabilidad significativa entre ratones e incluso dentro de un mismo individuo en diferentes momentos. Cabe destacar que la representación proporcional de las ABCs en la sangre no necesariamente refleja la observada en el bazo, sugiriendo que las poblaciones de ABCs en la sangre y el bazo no están en equilibrio. Tras una infección viral, se ha observado que estas células se encuentran mayoritariamente en el bazo, por lo que este órgano actúa como su reservorio principal [296, 308]. En los procesos autoinmunes, estas células migrarían a los sitios de inflamación. Además, el grupo de investigación de Weinstein [309] observó que las ABCs persisten, a largo plazo, en la zona marginal del bazo. Estos hallazgos, junto con la ausencia de ABCs en los conductos linfáticos, sugiere patrones de tráfico únicos y, posiblemente, residencia esplénica [292].

5.2 Activación y diferenciación de las ABCs

La comprensión del origen de las ABCs, cómo emergen *in vivo* en un organismo de manera natural, sigue siendo incompleta y tema de debate. A día de hoy, existen pruebas de que estas células son el resultado de una activación impulsada por los antígenos, sin embargo, también existe la posibilidad de que las alteraciones relacionadas con la edad, en la linfopoyesis de las células B, faciliten la generación de células precursoras con características similares [310]. Los experimentos de Hao el al. [292] con ratones envejecidos, sometidos a una radiación subletal para después ser reconstituidos, dieron como resultado un perfil de células B esplénicas similares a las de los ratones jóvenes, pero sin rastro de ABCs. En base a esos resultados se concluyó que la médula ósea envejecida no tenía la predisposición para generar estas células. Finalmente, mediante análisis del ciclo celular se reveló que las ABCs se encuentran en un estado de reposo, sugiriendo que se acumulan con la edad en lugar de

renovarse por sí mismas [292]. Esto contrasta con los hallazgos del grupo del Dr. Shlomchik [311], los cuales, a través de ensayos con bromodesoxiuridina (BrdU), concluyeron que las ABCs son altamente heterogéneas, y observaron que una gran mayoría de estas células proliferan activamente y presentan elevadas tasas de renovación.

Para determinar si las ABCs podrían originarse a partir de otra subpoblación de células B maduras, se llevó a cabo un experimento de transferencia adoptiva a hospedadores congénitos jóvenes de células FOB teñidas con CFSE. Aquellas que habían sufrido la división más exhaustiva también adquirieron un fenotipo similar al de las ABCs. Esto respaldó la idea de que dichas células pudiesen surgir de otros reservorios de células inmunes, en consonancia con la noción de que reflejan una diferenciación impulsada por antígenos y se acumulan con el tiempo [292, 310].

Aunque es probable que las células B, con características fenotípicas y funcionales similares a las ABCs, se originen a través de varios mecanismos, hay evidencias que indican que dichas células surgen, de manera natural, con la experiencia antigénica que se genera en respuestas inmunitarias dependientes de células T, y luego persisten como una población distintiva de células B de memoria. Sin embargo, es importante considerar que estas sean una población expandida homeostáticamente impulsada por ligandos endógenos [300]. Un estudio más reciente reveló que muchas secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas producidas por las ABCs, presentaban mutaciones somáticas, lo que implicaría su origen en los centros germinales y, por ende, una necesidad de ayuda y coestimulación por parte de las células Tfh. Además, se demostró que ni las células FOB deficientes en MHC-II ni las deficientes en CD40 podían generar ABCs [312].

A pesar de que las interacciones con el complejo MHC-II y con CD40 pueden facilitar la generación de ABCs *in vivo*, experimentos *in vitro* indican que el fenotipo de las ABCs puede lograrse sin ambas vías [313, 314]. Aunque se ha demostrado que las células B T-bet^{+} expresan marcadores de superficie asociados a los centros germinales durante las primeras

semanas de una respuesta inmunitaria, la localización anatómica de dichas células en los centros germinales aún no se ha corroborado. Además, la hipermutación somática también puede ocurrir independientemente de la formación de los centros germinales. En este sentido, es plausible que las ABCs surjan en nichos extrafoliculares u otras áreas independientes de los CGs [315]. Estas perspectivas no son mutuamente excluyentes, y las ABCs podrían surgir mediante diferentes rutas según las señales y el contexto específicos que los inicien. Asimismo, la ayuda que reciben para su activación podría surgir de varios escenarios alternativos, ya sea mediante la presentación del antígeno a las células T y la coestimulación de CD40, con la posterior producción de citoquinas proinflamatorias, dando lugar ya sea a la formación de centros germinales o a la diferenciación extrafolicular con hipermutación somática y recombinación de cambio de clase; o que estas señales de citoquinas se reciban como eventos colaterales sin una interacción con las células T, y su posterior activación y maduración de la afinidad independiente de estas [300].

Además de sus características fenotípicas y de localización distintivas, las ABCs tienen unos requisitos para su activación y atributos funcionales únicos. A diferencia de las células B transicionales, FOB o MZB, las ABCs no proliferan tras la unión del ligando al receptor BCR, sin embargo, sobreviven frente a estas señales. Por el contrario, estas células reaccionan y tienen respuestas proliferativas después de la estimulación de los receptores TLR7 y TLR9. Dichas respuestas se pueden incluso potenciar cuando se activan simultáneamente tanto el BCR como los receptores endosomales TLR. Además, tanto la expresión del TLR7, como la del TLR9, están elevadas en las ABCs [292, 293]. El grupo de la doctora Marrack [295] corroboró la importancia de la vía de señalización del TLR7 en la generación y diferenciación de las ABCs CD11c^{+}, de las cuales, la mayoría presentaban una elevada expresión de T-bet. Estas observaciones fueron confirmadas y ampliadas por Naradikian et al. [313], quienes demostraron que la expresión de T-bet se inducía en respuesta a la estimulación del TLR7, pero no a la del BCR ni del CD40. El requisito de la estimulación del TLR7 confirmó los primeros estudios, que apuntaban a este receptor como el factor principal en la generación de las ABCs. Estos hallazgos se corroboraron con investigaciones en las que se demostró que

en los ratones deficientes en MyD88 (*Myd88*$^{-/-}$), molécula adaptadora esencial para la señalización del TLR7, no había presencia de estas ABCs [293].

Aparte de estos sensores innatos, la diferenciación de las ABCs también requiere de una exposición a ciertas citoquinas proinflamatorias, como el IFNγ y la IL-21. Los experimentos de cocultivo *in vitro*, realizados en estos estudios, demostraron que tanto los requisitos de señalización por el TLR7, como por las citoquinas, son intrínsecos a dichas células [295, 313]. En la sangre periférica de humanos se observó que las células B CD27^{-} activadas exhibían una expresión elevada de T-bet inducida por IFNγ, sin la presencia simultánea de ligandos de los receptores TLR. Esto podría estar reflejando diferencias intrínsecas entre las células B de ratón y humano, o también podría ser que algunas células dentro del pool de las CD27^{-} ya hubiesen experimentado previamente señales de predisposición hacia el fenotipo de las ABCs [313].

Otra característica en el proceso de diferenciación de las ABCs es el cambio de isotipo a IgG que experimentan, principalmente a IgG1 en humanos y a IgG2a/c en ratones [295, 316]. Este cambio de clase coincide con una de las funciones clave de T-bet, factor de transcripción con un papel fundamental en el cambio a IgG2a/c, lo que acercaría las ABCs al fenotipo y desarrollo de las células plasmáticas [302]. El proceso del cambio de isotipo se desconoce si ocurre en los centros germinales o fuera de ellos, en la zona extrafolicular, pero lo evidente es que estas ABCs tienen un papel en la inmunidad humoral, y contribuirían a su respuesta mediante la producción de anticuerpos [317].

Las características funcionales de las ABCs abarcarían prácticamente todos los mecanismos efectores de las células B, como la presentación de antígenos, la producción de citoquinas y anticuerpos, y los cambios de isotipo. Se ha demostrado que las ABCs son células APCs eficientes, lo cual concuerda con sus niveles relativamente elevados de MHC II, CD80 y CD86. Además, la presentación de antígenos por las ABCs *in vitro* tiende a direccionar a las células T CD4^{+} naïve hacia un destino Th17 [292]. Resultados más recientes indican que las ABCs

también actúan como APCs eficaces *in vivo* [318], ya que cuando son activadas por agonistas del TLR7 o del TLR9, secretan diversas citoquinas, incluyendo IFNγ, IL-4 o IL-6 entre otras. Finalmente, tras la activación, las ABCs se diferencian rápidamente en células secretoras de anticuerpos y tienden hacia el cambio de clase IgG2a/c [295, 318]. Dada su propensión a convertirse en células secretoras de anticuerpos, las ABCs podrían constituir una población de células B de memoria que se acumulan gradualmente en respuesta a antígenos nucleares.

En resumen, los mecanismos efectores de las ABCs parecen encontrarse conectados entre la inmunidad innata y humoral, con inclinación hacia una respuesta proinflamatoria pudiendo finalmente dar lugar a una respuesta autoinmune [293, 307]. El modelo de la activación y diferenciación de las ABCs se esquematiza en la **Figura 13**.

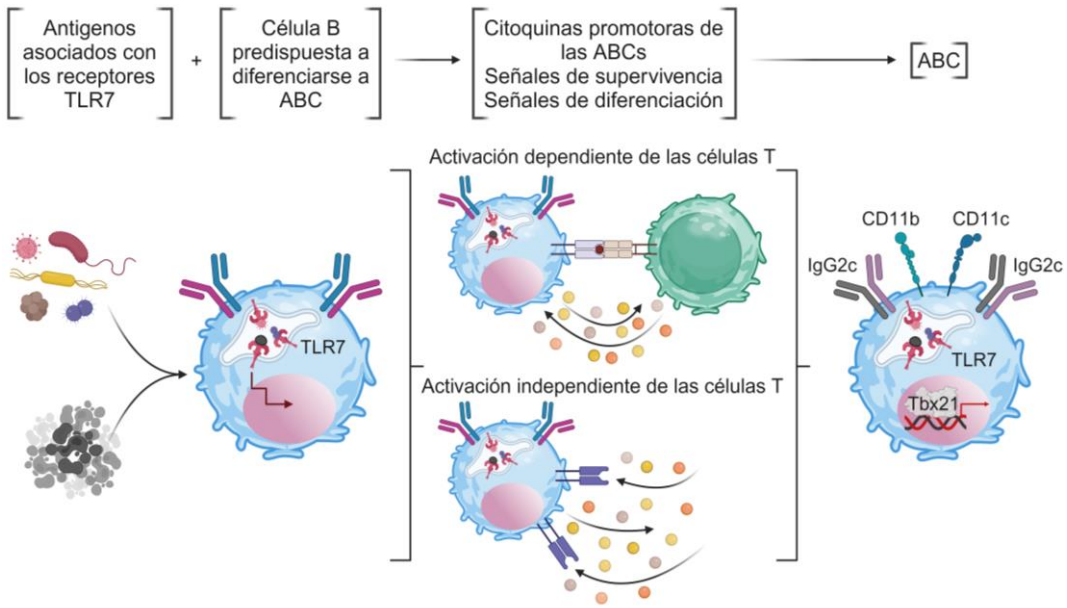

Figura 13. Modelo de la activación y diferenciación de las ABCs. Algunas subpoblaciones de células B pueden servir como progenitoras de las ABC. Para ello, los antígenos unidos e internalizados a través del BCR incluyen agonistas de los receptores TLR7. Estos pueden incluir patógenos microbianos, así como antígenos endógenos, como cromatina y restos apoptóticos. Tras este evento, pueden surgir varios escenarios alternativos. Se producen señales que promueven la supervivencia de estas células. Se secretan citoquinas proinflamatorias como IFN-γ o IL-21, las cuales promueven la diferenciación hacia las ABCs, ya sea en el contexto de la ayuda de las células T o independiente de estas. Cualquiera de estos procesos resultará en la formación de las ABCs en su estadio final. Imagen adaptada de [300], y modificada en *BioRender*.

5.3 El papel de las ABCs en la autoinmunidad

Las células B desempeñan un papel activo en la patogenicidad de las enfermedades autoinmunes. La eficacia de las terapias destinadas a la reducción de estas células, como lo son Belibumab y Rituximab, dejan claro este rol perjudicial de las células B [231, 233]. Sin embargo, aunque dicha reducción o eliminación dan pruebas evidentes de su participación en la progresión de la autoinmunidad, la manera en la que intervienen aún no se comprende del todo [317]. A lo largo de la última década, se ha observado que las ABCs aparecen tanto en modelos *in vivo* de autoinmunidad, como en individuos con enfermedades autoinmunes. Rubtsov et al. [293] fueron los primeros en identificar la implicación de estas células en la autoinmunidad. Ellos observaron que las ABCs se acumulaban en varias cepas de ratón autoinmunes. A los 6 meses de edad, esta población se vio incrementada en ratones que carecían de la tirosina quinasa MER (*Mer*$^{-/-}$), necesaria para la captación de células apoptóticas, y como consecuencia, estos desarrollaban anticuerpos antinucleares [319], así como en ratones de la cepa NZB/WF1. Este grupo señaló al TLR7 como el principal mediador de la expansión de las ABCs en estas cepas, las cuales secretaron, *in vitro*, autoanticuerpos IgG anti-cromatina [293].

A raíz de este estudio, se sugirió que las ABCs podrían tener implicaciones significativas en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. En este contexto, los modelos *in vivo* se presentaron como herramientas fundamentales para entender los mecanismos de estas células en la autoinmunidad. En varios modelos de LES, se observaron niveles elevados de ABCs [86, 297, 305, 306, 320]. En las cepas NZB/WF1, MRL-*lpr/lpr* y otra carente del pre-BCR (SLC$^{-/-}$), la cual tiene una tolerancia defectiva de las células B [321], se encontró que las ABCs presentaban marcadores característicos de las células B de memoria. Además, estas células producían grandes cantidades de anticuerpos anti-Sm y anti-dsDNA [320]. El factor de transcripción T-bet, el cual promueve el cambio de isotipo a IgG2a/c en las células B, también está implicado en la producción patogénica de autoanticuerpos [302, 310]. Se demostró que las ABCs CD11c^{+} T-bet^{+} eran fundamentales para la producción de anticuerpos anti-

cromatina en el modelo de lupus bm12 cGVHD LES [305]. Mediante el uso de otro modelo doble *knockout* para las proteínas SWEF (SWAP-70 y DEF6), Manni et al. [306] demostraron que la diferenciación hacia las ABCs T-bet$^+$ dependía de IL-21 y estaba controlada por *Irf5*. Otros estudios han corroborado que la deficiencia de T-bet impide la diferenciación de las ABCs y la producción de autoanticuerpos en ratones, lo que también sugiere que la expresión de T-bet es esencial para la formación autoinmune de estas ABCs [306, 307]. Cabe destacar que estas células también se observaron en un modelo humanizado de CLE [86].

En pacientes con LES, se ha observado la presencia de la población DN2 [307, 322]. Además, se ha encontrado una correlación significativa entre el aumento de estas células circulantes en la sangre periférica y la actividad de la enfermedad, destacando su papel como productoras de autoanticuerpos [299]. Aquellas personas con un LES activo mostraron un aumento de las ABCs en comparación con aquellas con la enfermedad en estado inactivo [125, 323]. Estas células constituyen aproximadamente el 1% de la población de células B circulantes en donantes sanos, sin embargo, esta proporción puede incrementarse a más del 5% en individuos con LES [296]. En este contexto, en un ensayo clínico reciente se observó que en pacientes con LES tratados con Belimumab, el número de células con un fenotipo similar al de las ABCs se correlacionó con una respuesta terapéutica, aunque el marcador T-bet no fue incluido en el análisis [324]. Las ABCs también fueron observadas en la AR [293], en la inmunodeficiencia variable común (CVID, del inglés *common variable immunodeficiency*) [325] y en pacientes con síndrome de Sjögren [326]. Asimismo, se demostró que las ABCs se expanden en diversas infecciones intracelulares [327, 328].

Durante el desarrollo de la respuesta autoinmune, el número de ABCs se incrementa en el tejido afectado, aunque muestran una tendencia a localizarse principalmente en el bazo y en el lugar específico de la inflamación. En pacientes con esclerosis múltiple, se han observado niveles más elevados de estas células en el líquido cefalorraquídeo, en comparación con las muestras emparejadas de sangre periférica [329]. De manera similar, en el modelo murino EAE (del inglés *experimental autoimmune encephalomyelitis*), se han

registrado números más altos de ABCs en el sistema nervioso central, en comparación con ratones sanos [330]. Dicho aumento también se ha observado en el hígado durante la hepatitis autoinmune [331]. Finalmente, en el modelo humanizado del CLE, donde las células PBMCs de pacientes con lupus se injertan en ratones irradiados, se encontró un número elevado de ABCs en la zona de las lesiones cutáneas [86].

Como se mencionó anteriormente, las ABCs se generan gracias a la implicación de antígenos que interactúan con el BCR, en menor medida, y a ligandos para el receptor TLR7, en mayor medida, los cuales inducen un entorno favorable de citoquinas. En este sentido, se esperaría que las ABCs surgiesen tanto durante las respuestas adaptativas en condiciones normales frente a patógenos externos, como en respuestas autorreactivas frente al propio organismo [328]. En un individuo sano, las ABCs, las cuales actuarían como un tipo de células B de memoria, desempeñarían un papel crucial en las respuestas antivirales, y serían necesarias para combatir ciertas infecciones. Sin embargo, una de las consecuencias más probables de su acumulación, sería la capacidad de contribuir a la autoinmunidad [317, 330]. Un mecanismo por el cual las ABCs contribuyen a la autoinmunidad es a través de la producción de autoanticuerpos. Durante el LES, el número total de ABCs se correlaciona positivamente con los niveles de autoanticuerpos [125, 293, 305]. Estas generan autoanticuerpos IgG2a/c en varios modelos de lupus, y la eliminación de dichas células resulta en la disminución de estos autoanticuerpos [86, 305, 332]. En un estudio reciente se demostró que la inhibición del receptor TLR7 resultó en una disminución de la producción de autoanticuerpos [333]. La producción de citoquinas es posiblemente otro mecanismo mediante el cual las ABCs contribuyen a la enfermedad. Las ABCs expresan un perfil de citoquinas distinto al de otras células B, mostrando un aumento en la expresión de IFNγ, TNF, IL-6 o IL-17 [292, 330, 334]. La capacidad de las ABCs para formar interacciones estables con las células T y actuar como células APCs es otro posible mecanismo mediante el cual las ABCs contribuyen a las enfermedades autoinmunes. Mientras que las células FOB se distribuyen uniformemente en los folículos, las ABCs tienen una mayor propensión a localizarse en las zonas del borde B-T, es decir, entre la zona de las células T y la zona de las células B, en el bazo [318]. Las ABCs

también exhiben una expresión elevada de moléculas coestimuladoras, incluyendo CD80 y CD86, en comparación con las células FOB [125, 292, 293].

En resumen, las ABCs constituyen una población de células B en continuo crecimiento, con un fenotipo distintivo, propiedades de señalización específicas y con características efectoras diferenciadas. Localizadas mayoritariamente en el bazo, su activación y diferenciación están mediadas principalmente por la vía del TLR7. Las ABCs desempeñan un papel crucial en los procesos autoinmunes, y su disminución se ha vinculado con respuestas clínicas favorables. Comprender a fondo los eventos que subyacen a la formación, los mecanismos moleculares y funcionales, así como su perfil transcripcional y fenotípico, en el contexto de la autoinmunidad, y en nuestros modelos murinos de lupus, será fundamental para identificar posibles objetivos de intervención en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. En la **Figura 14** se resumen todas las características de las ABCs.

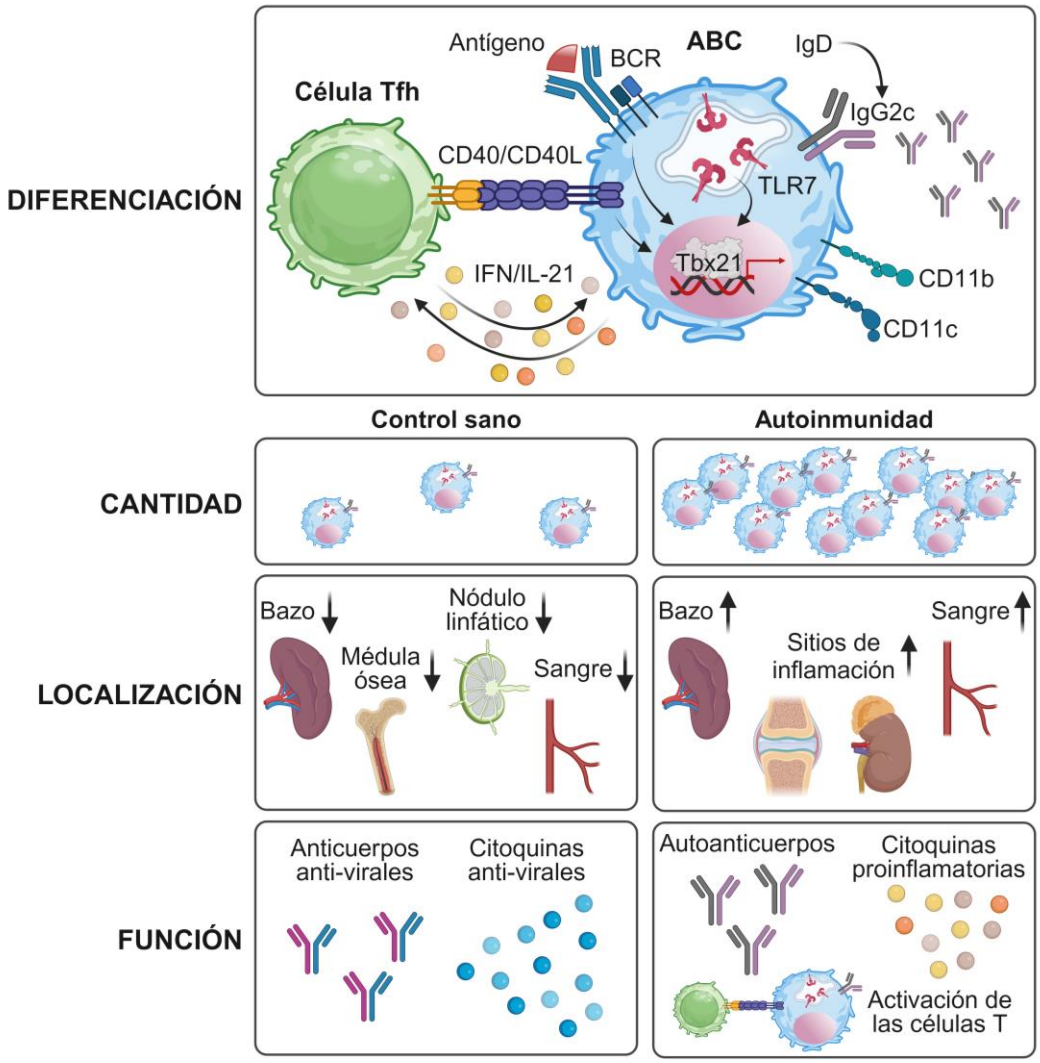

Figura 14. Principales características de las ABCs, comparando la situación habitual en un individuo sano con lo que sucede en una enfermedad autoinmune. Las ABCs se desarrollan en respuesta a una combinación de señales que incluyen la estimulación del BCR y la activación de los receptores TLR7/9, junto con señales adicionales como CD40, IFNγ e IL-21. En condiciones de salud, las ABCs se mantienen en niveles bajos. Sin embargo, en la autoinmunidad, la cantidad de ABCs aumenta, y estas células circulan y se localizan en el sitio de la enfermedad. En individuos sanos, durante una infección viral, las ABCs producen anticuerpos y citoquinas antivirales. Por el contrario, en las enfermedades autoinmunes, las ABCs generan citoquinas proinflamatorias, estimulan a las células T y producen autoanticuerpos. Imagen adaptada de [317], y modificada en *BioRender*.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Las vías de señalización mediadas por el TLR7 en las células B juegan un papel crucial en los procesos autoinmunes, actuando como un puente entre las respuestas innatas y adaptativas.

Nuestro grupo de investigación ha estado trabajando con el gen *Bank1* desde que se identificó como un gen de susceptibilidad al LES. BANK1 se expresa predominantemente en las células B y descubrimos su papel en la vía dependiente del TLR7. Nuestros resultados preliminares demostraron que la deficiencia de *Bank1* reducía los niveles de citoquinas proinflamatorias y autoanticuerpos en sangre, previa estimulación de estos receptores endosomales. Por otro lado, en el contexto de la hiperactivación de las células B, recientemente se descubrieron las ABCs, las cuales han sido implicadas en la autoinmunidad. Se cree que la activación de esta población está mediada por la señalización de los receptores TLR7, ya que proliferan significativamente tras la estimulación y activación de estos, a la vez que secretan autoanticuerpos.

Por consiguiente, dada la importancia de *Bank1* en la vía mediada por el TLR7 y la influencia de esta vía de señalización en la aparición de las ABCs, hipotetizamos que la deficiencia de *Bank1*, en situación de sobreexpresión o sobreactivación del *Tlr7*, podrá reducir el fenotipo de la enfermedad, afectando a la formación, diferenciación y función de las ABCs. Además, dicha ausencia tendrá un impacto en el resto de subpoblaciones de células B, disminuyendo así las respuestas proinflamatorias exacerbadas que se observan en los procesos autoinmunes.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis es profundizar en el conocimiento del gen *Bank1*, así como elucidar su papel en las células B y, específicamente, en las ABCs, dentro del contexto de la autoinmunidad. Para abordar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de la deficiencia de *Bank1* en el contexto del LES, en dos modelos murinos mediados por el TLR7: el modelo transgénico (TLR7.tg6) y el modelo inducido por IMQ.
    a. Determinar los niveles y subtipos de autoanticuerpos mediante análisis serológicos.
    b. Analizar las diferentes poblaciones inmunológicas principales del bazo, tanto de células B, como de células T.

2. Determinar el papel de *Bank1* en la formación de las células ABCs.
    a. Detectar y caracterizar la población de las ABCs mediante citometría de flujo.
    b. Evaluar el impacto de *Bank1* en los niveles y fenotipo de las ABCs, *in vivo* e *in vitro*.
    c. Profundizar en las vías de diferenciación hacía las ABCs, su relación con el resto de las subpoblaciones de células B, y estudiar el impacto de la deficiencia de *Bank1* en dichos tipos celulares.
    d. Determinar la localización de las ABCs dentro del bazo, así como el efecto de *Bank1* en dicha ubicación.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

Para alcanzar los diferentes objetivos de este trabajo de tesis, se emplearon tres modelos experimentales de lupus, caracterizados por la expresión exacerbada del gen *Tlr7*, los cuales fueron cruzados con ratones *Bank1*$^{-/-}$: un modelo transgénico (TLR7.tg6), un modelo inducido por IMQ, y un modelo espontáneo (B6.*Sle1*.*yaa*). Estas cepas se desarrollaron en un fondo genético C57BL/6. El empleo exclusivo de ratones macho en este estudio se debió a que la enfermedad se manifiesta únicamente en este sexo, en estos modelos, y solo es relevante para este mismo.

La determinación del tamaño de la muestra se basó en métodos estadísticos, además de en la experiencia previa con nuestros modelos. Se realizaron experimentos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, que abarcaron el seguimiento de la supervivencia, la medición del peso del bazo, la medición de los niveles en suero mediante ELISAs, el análisis de las diferentes poblaciones celulares mediante citometría de flujo, el aislamiento, cultivo, estimulación y diferenciación de las células B, así como el análisis de inmunofluorescencia del tejido del bazo. El objetivo principal de estos experimentos fue determinar las alteraciones fenotípicas y funcionales de las ABCs, y de las subpoblaciones más importantes de células B, afectadas por la deficiencia de *Bank1*. En general, se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes para cada ensayo, cada uno con muestras biológicas independientes provenientes de cada ratón.

Además, se realizó un ensayo de secuenciación del ARN de célula única (scRNA-Seq) para obtener una comprensión más profunda y detallada del proceso de diferenciación de los ABCs y evaluar los cambios transcriptómicos inducidos por la deficiencia de *Bank1*, en las subpoblaciones de células B. Los datos transcriptómicos se obtuvieron de células individuales aisladas de la población de esplenocitos totales de tres ratones por cada grupo: ratones WT, como control sano, ratones TLR7.tg6 y ratones TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$.

1. MODELOS EXPERIMENTALES Y COMITÉ ÉTICO

Los animales empleados en este proyecto fueron mantenidos en las instalaciones del animalario del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada (CIBM, Granada). Los ratones se alojaron adecuadamente en cubetas esterilizadas, con ciclos de día/noche de 12 horas, y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, provistos de agua y alimento. Todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo bajo condiciones asépticas.

Los animales control C57BL/6 silvestres, o *wild-type* (WT), fueron adquiridos de los laboratorios de Jackson Laboratories (Charles River Laboratory, Lyon, Francia) para la realización de cruces con las distintas cepas de transgénicos, con el objetivo de asegurar el fondo genético de la cepa original C57BL/6. Los ratones *Bank1*$^{-/-}$ fueron generosamente proporcionados por el Dr. T. Kurosaki, del Instituto RIKEN en Kioto, Japón. Los animales transgénicos TLR7.tg6, y el modelo espontáneo B6.*Sle1*.*yaa* fueron donados por la Dra. Darise Farris, del Programa de Investigación en Artritis e Inmunología Clínica de la Fundación de Investigación Médica de Oklahoma (OMRF, del inglés *Oklahoma Medical Research Foundation*, Oklahoma City, Oklahoma, EEUU), y se cruzaron con ratones knockout para *Bank1* (*Bank1*$^{-/-}$), los cuales ya habían sido retrocruzados más de 9 generaciones con el linaje C57BL/6 [81, 287].

La cepa TLR7.tg6, fue previamente publicada y caracterizada por el grupo de la doctora S. Bolland et al. [213]. Dicho grupo utilizó un constructo BAC RP23-139P21 que incluía los genes *Tlr7*, *Tlr8* y *Tmsb4x*. Los primeros 83 kb fueron reemplazados con un casete de neomicina para permitir la expresión exclusiva del gen *Tlr7*. El constructo final se inyectó en cigotos derivados de la cepa C57BL/6, lo que resultó en la producción de 6 líneas positivas con diferentes números de copias del *Tlr7*. La cepa TLR7.tg6 presenta de 8 a 16 copias del gen *Tlr7*, y el transgén que se utilizó para su generación está insertado en el cromosoma Y, lo que resulta en un aumento de 4 a 8 veces más en el ARNm del *Tlr7*, es decir, el aumento de

expresión de TLR7 sólo se producirá en los machos. Por lo tanto, en todos los ensayos con esta cepa se incluyeron ratones machos TLR7.tg6 y C57BL/6 como control.

También se empleó un modelo inducido mediante la aplicación tópica de una crema que contiene IMQ, agonista de los receptores TLR7, siguiendo el protocolo publicado previamente [216], con pequeñas modificaciones. Los ratones machos de las cepas silvestre C57BL/6 WT y *Bank1*$^{-/-}$, de entre 10 y 12 semanas de edad, fueron tratados con 1,25 mg de crema Aldara al 5% (3M Pharmaceuticals) en la oreja izquierda de cada ratón, 3 veces por semana durante un total de 8 semanas.

Por último, para los ensayos con la cepa B6.*Sle1*.*yaa*, se utilizaron ratones macho congénitos C57BL/6, que contienen el locus de susceptibilidad 1 al LES (*Sle1*) derivado del locus NZM2410/Aeg, y el factor acelerador de la autoinmunidad ligado al cromosoma Y (*yaa*) derivado de la cepa BXSB/MpJ [104, 228].

Al final del tratamiento, a las 18-20 semanas de edad, tanto los ratones tratados, como los controles no tratados, fueron sacrificados. Los ratones machos TLR7.tg6, TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ y sus controles C57BL/6 WT fueron sacrificados a las 30-32 semanas de edad. Por último, los ratones machos B6.*Sle1*.*yaa* y B6.*Sle1*.*yaa*.*Bank1*$^{-/-}$ se sacrificaron a las 36 semanas de edad. En la **Figura 15** se incluye un esquema con todos los modelos empleados en esta tesis.

Llegados al punto final, y de sacrificio de los ratones, estos fueron anestesiados mediante el uso de ketamina/xilacina (100 mg/kg, 10 mg/kg) vía intraperitoneal. Se realizó una punción cardiaca para la obtención de sangre total y, posteriormente, se realizó una perfusión intracardiaca con tampón salino, con el fin de eliminar los restos de sangre de los diferentes órganos, para su posterior fijación. Por último, se realizó una disección del bazo del cual, una parte se incluyó en paraformaldehido 4% para su posterior procesamiento para histología, y el resto se homogeneizó para el cultivo de esplenocitos, marcajes de citometría o para el ensayo de célula única.

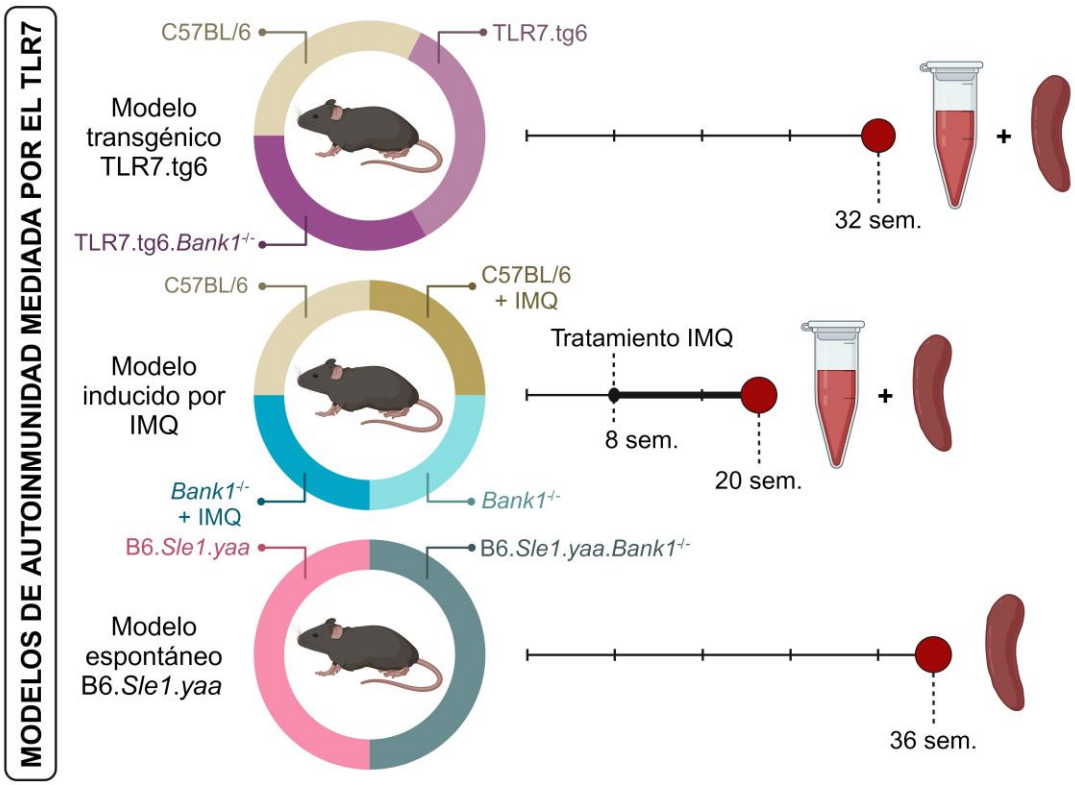

Figura 15. Esquema de los modelos de autoinmunidad, mediada por el TLR7, empleados en este proyecto, y diseño experimental. En esta figura se muestran los tres modelos murinos utilizados: el modelo transgénico TLR7.tg6, el modelo inducido por IMQ y el modelo espontáneo B6.*Sle1.yaa*. De los dos primeros se recolectó tanto el bazo como la sangre (suero), y del último, el bazo. Figura creada en *BioRender*.

Todos los procedimientos experimentales realizados en esta tesis fueron previamente aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Granada y el Ministerio de Agricultura de España (25/05/2017 y 10/05/2022/063).

De ahora en adelante, se empleará el uso de abreviaciones para las cepas utilizadas en este proyecto, con la finalidad de facilitar su lectura: wild-type C57BL/6 (WT); TLR7.tg6 (T7); TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ (T7.B1$^{-/-}$); wild-type C57BL/6 tratado con imiquimod (WT+IMQ); *Bank1*$^{-/-}$ (B1$^{-/-}$); *Bank1*$^{-/-}$ tratado con imiquimod (B1$^{-/-}$+IMQ); B6.*Sle1.yaa* (SLE1); y B6.*Sle1.yaa.Bank1*$^{-/-}$ (SLE1.B1$^{-/-}$).

2. EXTRACCIÓN DE ADN Y GENOTIPADO POR PCR

Para determinar y corroborar la integridad de los modelos knockout de este estudio, se realizaron genotipados de manera rutinaria. El destete se realizó cuatro semanas después del nacimiento de las crías. Para marcar a los animales se emplearon grapas con un código en la oreja. Se tomaron muestras de cola sobre las cuales se realizó una extracción del ADN genómico y posteriormente una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés polymerase chain reaction) con cebadores específicos para la detección de la presencia o ausencia de los genes de interés.

Para la extracción del ADN se empleó el kit de extracción de ADN *Mouse Direct PCR Kit* (Selleckchem, #B45012). En primer lugar, se incubó la cola en un tampón de lisis (*Buffer L*, #B45012), en presencia de la proteinasa K (*Protease plus*, #B45012), durante 15 minutos a 55°C, para realizar la digestión del tejido, y así liberar el ADN genómico intacto. Tras la digestión, se realizó una segunda incubación a 95°C, durante 5 minutos, para inactivar la actividad de la proteinasa K. Por último, se centrifugó la solución a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, con el objetivo de separar la fase acuosa que contiene el ADN de la muestra, que se empleó posteriormente para realizar la PCR.

La amplificación del ADN mediante la técnica de la PCR se llevó a cabo en un termociclador. En la reacción se incluyeron: una solución con los nucleótidos (dNTPs), la Taq polimerasa y el ion magnesio (*M-PCR OPTI™ Mix*, #B45012), y los cebadores, o *primers*, para el gen *Bank1* (**Tabla 2**).

En los ratones *knockout*, la ausencia del gen *Bank1* se determinó mediante el uso de cebadores que reconocen el casete de neomicina insertado en el lugar de dicho gen, mediante recombinación homóloga, generándose un producto de ADN de 1500 pares de bases para los ratones *Bank1*$^{-/-}$, y de 800 pares de bases para los ratones *Bank1*$^{+/+}$ [277]. Las condiciones de la PCR se muestran en la **Tabla 3**. Finalmente, los productos resultantes de

la PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8% y el tamaño de las bandas se detectó gracias al empleo de un agente intercalante *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, #41003).

Gen	Especie	Secuencia
Bank1$^{-/-}$ Forward	Ratón	5'-ACAACAGAGCTTTCTTGTAGCAGTATAG-3'
Bank1$^{-/-}$ Reverse	Ratón	5'-CAGTACTGTTTTACAATATTGGTGTCTG-3'

Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados en el genotipado de *Bank1*.

Fase		Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial		95°C	2 minutos
35 ciclos	Desnaturalización	95°C	30 segundos
	Alineamiento	60°C	1 minuto
	Elongación	72°C	2 minutos
Elongación final		72°C	10 minutos
Parada y conservación		4°C	-

Tabla 3. Condiciones para la amplificación del ADN genómico de *Bank1* mediante PCR.

4. DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE AUTOANTICUERPOS EN SUERO MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNO-ENSAYO (ELISA)

Los niveles de anticuerpos en suero se determinaron en el punto final de los experimentos empleando la sangre obtenida mediante punción cardiaca. Para la obtención del suero, la sangre se centrifugó (13000 rpm, 10 minutos a 4 °C), y posteriormente se recogió el sobrenadante (suero), que fue alicuotado y congelado a -80ºC. La medición de los niveles de

los diferentes parámetros se llevó a cabo mediante una técnica de cuantificación de antígenos conocida como ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Los niveles de anticuerpos anti-dsDNA se determinaron mediante una ELISA no comercial, conforme al protocolo previamente publicado [335], empleando una dilución del suero de 1:1000. Para la detección de los niveles de anticuerpos anti-Sm se empleó el kit comercial *Mouse Anti-Sm ELISA Kit* (Alpha Diagnostic Intl, #5405), conforme a las instrucciones del fabricante, empleando una dilución del suero de 1:100. Los niveles de anticuerpos totales IgM, IgG y del isotipo IgG1 se determinaron mediante el uso de los kits comerciales Mouse Uncoated ELISA Kits (eBioscience, #88-50470-88, #88-50400-88 y #88-50410-88, respectivamente), conforme a las instrucciones del fabricante, con unas diluciones del suero de 1:5000 para la medición de IgM, 1:100000 para la medición de IgG total y 1:10000 para la medición de IgG1. Los niveles de IgG2c se midieron con el kit *Mouse IgG2c ELISA Quantitation Set* (Bethyl, #E90-136), conforme a las instrucciones del fabricante, empleando una dilución del suero de 1:10000.

En todos los casos se realizó una incubación antígeno-anticuerpo y, posteriormente, la adicción de un anticuerpo secundario conjugado con una peroxidasa. Como método de detección se utilizó un método colorimétrico basado en el uso del sustrato cromogénico de la peroxidasa 3,3’,5,5’-Tetrametilbenzidina (TMB). Las medidas se realizaron en un lector de placas *Infinite M200 NanoQuant* (TECAN) a una densidad óptica de 450 nm, con una corrección utilizando los valores obtenidos a 570-630 nm. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

5. ANALISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Tras el sacrificio de los ratones, los bazos fueron extraídos y homogeneizados mecánicamente mediante el uso de una jeringa de 5 ml en una placa de Petri, en presencia de 5 ml de medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified Eagle's medium*), y en condiciones de esterilidad. La suspensión de células resultante se filtró mediante un filtro de nylon de 70 µm. Para eliminar los eritrocitos se empleó una solución hipertónica, o tampón de lisis, de amonio-cloruro-potasio (ACK, del inglés *ammonium-chloride-potassium*). Tras una incubación de 5 minutos con el tampón ACK, la reacción de lisis se detuvo con la adición de al menos el doble del volumen inicial de medio RPMI. Posteriormente, se realizó un lavado de las células con este medio, mediante dos centrifugaciones sucesivas a 1300 rpm, 10 minutos a 4°C, y finalmente, el pellet de células resultante se resuspendió mediante agitación ligera en tampón fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) 1X. El número total de células por cada muestra y el porcentaje de viabilidad se estimaron mediante el uso de azul de Tripan, en una cámara de Neubauer.

Para cada muestra y tinción se requirió una cantidad de $1x10^6$ de células. Las tinciones se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo en V. En primer lugar, para excluir del análisis las células muertas, se añadió el marcador de viabilidad *Fixable Viability Stain 620* (FVS620, 1:1000, BD Horizon™, #564996) o el marcador *LIVE/DEAD™ Fixable Aqua* (1:1000, Thermo Fisher Scientific, #L34957), dependiendo de los marcadores incluidos en el panel de anticuerpos. Las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C, en presencia de estos marcadores de viabilidad. Posteriormente, se realizó un lavado con una solución tampón FACS buffer (PBS1X, 1% de FBS y 2 mM de EDTA), y una centrifugación a 1300 rpm, 10 minutos a 4°C. Para bloquear posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos, se añadió una solución de bloqueo TruStain FcX™ anti-mouse CD16/32 (1:100, BioLegend, #101319), y se incubaron las muestras durante 10 minutos a 4°C.

Tras un nuevo lavado con el FACS buffer y otra centrifugación, se procedió a la tinción con los distintos anticuerpos monoclonales conjugados a fluorocromos, para el análisis multiparamétrico mediante citometría de flujo (**Tabla 4**). Las células se incubaron durante 20 minutos a 4°C en presencia de los distintos anticuerpos. Para las tinciones intracelulares, y tras la tinción de superficie, los esplenocitos fueron incubados en una solución de fijación y permeabilización *BD Cytofix/Cytoperm™ Plus* (BD Biosciences, #555028), siguiendo las instrucciones del fabricante, durante 20 minutos a 4°C. Tras un lavado con la solución de permeabilización y lavado *Perm/Wash* (#555028), las células se incubaron con los anticuerpos intracelulares durante 20 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, se realizó un último lavado y centrifugado, y finalmente, se resuspendieron en el tampón FACS buffer para su posterior adquisición en el citómetro.

La adquisición de los datos se llevó a cabo en un citómetro BD FACS Diva o un citómetro Symphony (BD Biosciences), y posteriormente se realizó el análisis utilizando el software FlowJo 9.8 (TreeStar).

Anticuerpo	Fluorocromo	Clon	Referencia	Casa comercial
Anti-mouse CD11b	BV421	M1/70	101235	BioLegend
Anti-mouse CD11c	APC	HL3	550261	BD Biosciences
Anti-mouse CD138	BV510	281-2	563192	BD Biosciences
Anti-mouse CD138	PE	281-2	142503	BioLegend
Anti-mouse CD19	APC eFluor780	eBio1D3	47-0193-82	Invitrogen
Anti-mouse CD21/CD35	PerCP-Cy5.5	7E9	123415	BioLegend
Anti-mouse CD23	PE-Cy7	B3B4	25-0232-82	eBioscience
Anti-mouse CD3	FITC	17A2	100203	BioLegend
Anti-mouse CD3	APC	145-2C11	100311	BioLegend
Anti-mouse CD4	V500	RM4-5	560783	BD Biosciences
Anti-mouse CD4	FITC	RM4-5	100509	BioLegend
Anti-mouse CD44	PE-Cy7	IM7	103029	BioLegend
Anti-mouse CD45R/B220	PE	RA3-6B2	103208	BioLegend
Anti-mouse CD62L	PerCP-Cy5.5	MEL-14	104431	BioLegend
Anti-mouse CXCR4	BV421	2B11	48-9991-82	BD Biosciences
Anti-mouse IgG (H+L)	FITC	Poly4060	ab6785	Abcam
Anti-mouse IgG2c	FITC	Policlonal	ab97254	Abcam
Anti-mouse PSGL-1	PE	2PH1	555306	BD Biosciences
Anti-mouse T-Bet	PE	4B10	561265	BD Biosciences
Anti-mouse T-Bet	PE-Cy7	4B10	644823	BioLegend
Anti-mouse TCRβ	PerCP-Cy5.5	H57-597	109227	BioLegend

Tabla 4. Lista de anticuerpos utilizados en el análisis multiparamétrico mediante citometría de flujo.

6. AISLAMIENTO Y ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS B *IN VITRO*

Para el estudio de las ABCs, se utilizó un protocolo de diferenciación *in vitro*. En primer lugar, se realizó un aislamiento de células B a partir de los esplenocitos totales mediante selección negativa en columnas magnéticas. En estos ensayos se emplearon ratones control wild-type y ratones *Bank1*$^{-/-}$, de 10 semanas de edad. Tras el procesamiento de los bazos y los esplenocitos, explicado en el apartado anterior, se procedió con el protocolo de aislamiento de células B.

Para ello, se utilizó el kit *B cell isolation kit* (Miltenyi Biotec, #130 090 862), conforme a las instrucciones del fabricante. La cantidad inicial de células requerida fue de $50x10^6$ de células por ratón. En primer lugar, estas células se incubaron con un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina frente a CD43 (Ly48), CD4 (L3T4) y Ter-119, y con el cóctel de *microbeads*, o imanes, anti-biotina. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a la separación magnética. Se empleó el separador automático autoMACS Pro (Miltenyi Biotec), mediante una separación negativa (programa: *depletes,* en el autoMACS Pro), es decir, las células B no marcadas con los imanes, se recogerían en un tubo de 5 ml, mientras que las células marcadas (el resto de poblaciones celulares), se recogerían en un tubo diferente.

Las células B obtenidas mediante este protocolo se cultivaron posteriormente a una densidad de $2x10^6$ células/ml, en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, #21870076), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (Biowest, #S181A), penicilina-estreptomicina a 100 U/ml (Gibco, #15140122), aminoácidos no esenciales al 1X (Gibco, #11140068), L-glutamina a 2 mM (Gibco, #A2916801), HEPES a 25 mM (Gibco, #15630-056) y β-mercaptoetanol a 50 µM (Sigma, #M3148). Además, para su estimulación, estas células fueron expuestas a 5 µg/ml de F(ab')2-goat anti-mouse IgM Mu chain (Invitrogen, #16-5092-85) y a 5 µg/ml de Ultra-LEAF purified anti-mouse CD40 (BioLegend, #102811), en presencia o ausencia de 2.5 µg/ml de Imiquimod (Invivogen, #tlrl-imqs) y 25 ng/ml de IL-21

recombinante de ratón (BioLegend, #574504), de forma individual o en combinación con ambos estímulos. Las células estimuladas fueron recogidas pasadas 72 horas de incubación, a 37°C y 5% de CO2. Finalmente, se procedió al análisis de las ABCs mediante citometría de flujo, siguiendo el protocolo previamente descrito.

7. INMUNOFLUORESCENCIA

Con el objetivo de caracterizar y visualizar la estructura y morfología de los centros germinales, así como la localización de las poblaciones celulares de interés, se realizaron inmunofluorescencias sobre cortes histológicos de los bazos de los ratones. Tras la anestesia se realizó una perfusión intracardiaca con 20 ml de la solución salina DPBS 1X (del inglés *Dulbecco's phosphate-buffered saline*), y una fijación con paraformaldehido al 2% durante 12 horas a 4°C. Pasado ese tiempo, los bazos se cortaron transversalmente, en segmentos de aproximadamente 2 cm, para su posterior criogenización. Estos segmentos fueron embebidos en el compuesto OCT (del inglés *optimal cutting temperature*; Tissue-Tek, #4583), el cual proporciona una matriz adecuada a la muestra para protegerla de la rápida bajada de temperatura, y congelados mediante el contacto con hielo seco e isopentano, para su preservación y almacenamiento a -80°C.

Se utilizaron criosecciones de 8 µm, mediante el uso de un micrótomo criostato, y se pasaron a un portaobjetos. En primer lugar, las láminas de tejido se hidrataron en TBS durante 20 minutos, y se realizó una permeabilización con TBS con Tween 20 al 0,05% (TBS-T) durante otros 20 minutos, a temperatura ambiente. Para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos, las láminas se bloquearon con una solución de TBS-T, 2 mg/ml de TruStain FcX™ anti-mouse CD16/32 (BioLegend, #101319) y suero normal de cabra al 10% (Sigma-Aldrich, #S26-100ML), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la permeabilización y bloqueo de las muestras de tejido, estas fueron incubadas con los anticuerpos primarios en PBS 1X y Tritón al 0,05%, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las

muestras y se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios, conjugados con sus respectivos fluorocromos, en PBS 1X y Tritón al 0,05% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en estos experimentos se detallan en la **Tabla 5**. Tras un lavado en PBS 1X, para teñir los núcleos, las muestras de tejido fueron incubadas con Hoechst 33342 1mM (Sigma-Aldrich, #B2261), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, para proteger la fluorescencia y previo a su observación en el microscopio, las láminas fueron cubiertas con medio de montaje *SlowFade™ Diamond Antifade Mountant* (Invitrogen, #S36967).

Anticuerpos primarios	**Clon**	**Referencia**	**Casa comercial**
Anti-mouse CD169 (MOMA-1)	3D6.112	142401	BioLegend
Anti-mouse CD4	EPR19514	ab183685	Abcam
Anti-mouse CXCR4	2B11	14-9991-82	Invitrogen
Anticuerpos conjugados	**Clon**	**Referencia**	**Casa comercial**
Anti-mouse B220 - eFluor 450	RA3-682	48-0452-82	Invitrogen
Anti-mouse CD138 - PE	281-2	561070	BD Biosciences
Anti-mouse CXCR4 - APC eFluor 780	2B11	47-9991-82	Invitrogen
Anti-mouse IgG2c - FITC	Polyclonal	1078-02	SouthernBiotech
Anti-mouse T-Bet - PE	4B10	12-5825-82	Invitrogen
PNA - FITC	-	FL-1071	VectorLabs
Anticuerpos secundarios	**Clon**	**Referencia**	**Casa comercial**
Goat anti-rabbit Alexa Fluor 633	Polyclonal	A-21070	Invitrogen
Goat anti-rat Alexa Fluor 555	Polyclonal	A-21434	Invitrogen
Goat anti-rat APC	Polyclonal	A10540	Invitrogen

Tabla 5. Lista de anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia del bazo.

Las imágenes de los tejidos fueron capturadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 710, con los objetivos de Zeiss Plan-Apochromat 10X/0.45 o 20X/0.8, y analizadas en el software Zeiss ZEN 2010.

8. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE CÉLULA ÚNICA (scRNA-Seq)

Con objeto de analizar en profundidad el patrón transcriptómico del bazo de los ratones empleados como modelo del LES, se realizó un ensayo transcripcional de célula única. Se emplearon los bazos de tres ratones macho por grupo (Wild-type C57BL/6, TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$), de 32 semanas de edad. El procesamiento de las células del bazo se realizó como se ha explicado en el apartado 5 de Metodología, hasta la obtención de una solución de esplenocitos final.

En este caso resultó esencial asegurar la ausencia de agregados celulares en la muestra. Tras la optimización de las etapas de procesamiento, cálculo de número de células necesario, y porcentajes de viabilidad, las células esplénicas fueron procesadas individualmente en un sistema *Chromium Controller* (10x Genomics) en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (IPBLN, CSIC, Granada, España). Los datos brutos del recuento celular fueron procesados utilizando el software *Cell Ranger 10X*. Este proceso incluyó la alineación de lecturas contra el genoma de referencia, la cuantificación de la expresión génica y la generación de matrices de conteo de expresión génica para cada célula. Todos los análisis posteriores se llevaron a cabo utilizando principalmente el paquete *Seurat* de R [336], siguiendo el procedimiento descrito por la doctora Mathew N. R., et al. [337]. Se llevó a cabo un análisis de control de calidad para identificar y eliminar las células de baja calidad. Se filtraron las células basándose en criterios como el número de genes expresados, o la proporción de expresión mitocondrial y ribosomal. En primer lugar, los datos brutos fueron integrados utilizando el paquete *SeuratObject* en R, el cual sirve para representar los datos de expresión génica de las células individuales. A continuación, se aplicaron los filtros y se

descartaron las células que contuviesen un porcentaje de recuento mitocondrial, o ribosomal, superior al 25%, también aquellas células cuyo número de características únicas o recuentos totales estuviera fuera del rango entre el 0.5% al 99.5% de todas las células, así como las células que tuviesen un índice de Gini o Simpson por debajo del 0,8, indicativo de una diversidad de expresión génica insuficiente. Siguiendo estos pasos se consigue mantener la consistencia y la calidad de los datos, al eliminarse valores atípicos o anomalías. También se descartaron los genes mitocondriales, debido a que su expresión podría sesgar los resultados, y aquellos expresados en menos de 5 células totales, ya que su contribución al análisis podría ser insignificante debido a su baja presencia. Los recuentos celulares totales fueron normalizados y fijados en 1000, para asegurar que todas las muestras tuviesen una base comparable y así facilitar la interpretación de los resultados. Los recuentos génicos fueron transformados a escala logarítmica en base 2, con el fin de estabilizar y normalizar la distribución de los datos. Los valores de expresión de cada gen fueron estandarizados mediante centrado en la media y dividido por la desviación estándar, teniendo en cuenta el conjunto de muestras. Adicionalmente, se corrigieron los valores celulares en base a la variabilidad relacionada con el ciclo celular y los recuentos mitocondriales. Los dobletes, es decir, dos (o más) células que han sido procesadas erróneamente como una sola célula, y que por tanto presentan el ARN de dos células diferentes, fueron identificados y eliminados utilizando el paquete de R *scDblFinder*. Finalmente, se llevó a cabo la integración de datos con *Harmony*, un algoritmo que permite combinar múltiples conjuntos de datos y eliminar variaciones técnicas mientras se preservan las diferencias biológicas [338]. Con esto se buscó mejorar la detección de genes diferencialmente expresados y reducir el impacto de la heterogeneidad técnica en los resultados del análisis, lo que aumentó la sensibilidad y fiabilidad del ensayo.

Una vez realizado el control de calidad, se procedió al análisis de los datos. En primer lugar, se realizó un análisis de *clustering* para agrupar las células en base a la expresión de los genes. Se utilizó la proyección bidimensional y uniforme (UMAP, del inglés *uniform manifold approximation and projection*), para visualizar cómo se agrupaban las células, y se evaluó la

estabilidad de los clústeres mediante el paquete de R *clustree* [339]. La anotación de las diferentes poblaciones celulares se realizó mediante correlación con marcadores específicos de cada tipo y subtipo celular [337]. Se identificaron las células NK, las células T, las células B, las células dendríticas, los macrófagos, los monocitos, los neutrófilos y las células rojas de la sangre, o eritrocitos, en un total de 18 clústeres, mediante el uso de marcadores específicos para cada población celular (**Tabla 6**). De todos ellos, se escogieron los clústeres 0 y 5, en representación de las células B, en base a la expresión de los genes específicos de estas células *Cd19*, *Cd79a* y *Ms4a1*, y se repitió el análisis completo, esta vez excluyendo al resto de poblaciones no catalogadas como células B.

Población	Marcadores específicos
Células B	*Cd19*, *Cd79a*, *Ms4a1*
Células dendríticas	*Flt3*, *Clec10a*, *Tbc1d4*
Células NK	*Gzma*, *Nkg7*, *Klrd1*
Células T	*Cd3g*, *Cd3d*, *Cd28*
Eritrocitos	*Alas2*, *Snca*
Macrófagos	*Clec4a1*, *Clec4a3*, *Tbc1d4*
Monocitos	*Ctss*, *Ms4a6d*, *Lyz2*
Neutrófilos	*S100a8*, *Cxcr2*, *Mmp8*

Tabla 6. Lista de genes, o marcadores, específicos asignados para cada población celular.

Para realizar el análisis de los genes diferencialmente expresados (DEG, del inglés *differentially expressed genes*), entre clústeres o entre grupos, se utilizó la función *FindMarkers* del paquete *Seurat* en R. Para la visualización de los datos, se generaron *heatmaps* con el paquete *pheatmap*. Para los análisis de enriquecimiento funcional se empleó la API (del inglés *application programming interface*) de la herramienta web Genecodis [340], con la cual se asignan funciones biológicas de la base de datos Gene Ontology [341] a las listas de DEGs de interés. Para la visualización se seleccionó el top 10

de los términos GO más significativos. Los *bar plot*, o gráfico de barras, se generaron mediante la función *AddModuleScore* y *ggplot2* de Seurat en R.

El análisis de trayectoria de los clústeres de células B se llevó a cabo utilizando el paquete de R *Monocle3*. Esta función tiene como objetivo inferir trayectorias representadas mediante líneas y ramificaciones, estableciendo transiciones celulares a través de los cambios en la expresión génica de las células individuales. Con este paquete también se puede establecer el inicio, o raíz, de una trayectoria, basándose en el sentido biológico de los clústeres.

Todos los archivos originales de los datos del scRNA-Seq empleados en esta tesis se han depositado en el repositorio GEO (del inglés *gene expression omnibus*) del NCBI (del inglés *National Center* for *Biotechnology Information*), con el número de acceso GSE271694. Además, el código empleado para los diferentes análisis está subido en la plataforma GitHub (github.com/dtordom/scRNASeq_bank1.git).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los gráficos y figuras, a excepción de aquellos derivados del análisis de scRNA-Seq, muestran los puntos independientes correspondientes a los datos de ratones individuales, provenientes de al menos tres experimentes independientes. Antes de proceder con los análisis de los resultados, en todas las cohortes se realizó una evaluación de los valores atípicos, o *outliers*, mediante la prueba de Tukey. El análisis de supervivencia se llevó a cabo mediante el método de *Kaplan-Meier*, una técnica ampliamente utilizada para estimar la probabilidad de supervivencia en función del tiempo. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de *log-rank* (*Mantel-Cox*), una prueba no paramétrica utilizada para comparar las curvas de supervivencia entre grupos. Para los análisis de los datos obtenidos en las ELISAs y en la citometría de flujo, se aplicó la prueba de *Mann-*

Whitney en grupos de muestras no pareadas. Esta prueba no paramétrica se utiliza para comparar las distribuciones de dos grupos independientes cuando los datos no siguen una distribución normal. En los gráficos se incluye el error estándar de la media, el cual se representó mediante barras de error en los gráficos. Estos errores proporcionan una estimación de la variabilidad de los datos y ayudan a evaluar la precisión de las estimaciones de la media. Para los análisis de correlación, se utilizó el coeficiente de correlación de *Pearson*, una medida estadística que cuantifica la relación lineal entre dos variables continuas. Esta técnica permite explorar la asociación entre diferentes variables en el conjunto de datos. Se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0,05. Además, se utilizaron asteriscos para indicar el nivel de significancia estadística: "ns" no significativo, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ y ****$p < 0.0001$. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc.) y R Studio.

Con respecto al análisis del scRNA-Seq, y para comparar las diferencias estadísticas entre la abundancia de células de un grupo u otro en cada clúster, se aplicaron test de proporciones. Además, se utilizó la prueba de *Mann-Whitney* con la función *FindMarkers* del paquete *Seurat* de R para analizar la expresión génica diferencial entre clústeres y/o grupos. Los valores de p se corrigieron utilizando el método de *Bonferroni*. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos genes con un valor p ajustado menor a 0,05 (nivel de confianza del 95%), y se empleó el logaritmo en base 2 del fold change (log2FC) para cuantificar la magnitud del cambio en la expresión génica. Finalmente, el análisis funcional de los genes diferencialmente expresados (DEGs) se realizó mediante el uso de *Genecodis* [342], una herramienta ampliamente utilizada para la identificación y caracterización funcional de un conjunto de genes.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. El PAPEL DE BANK1 EN LA AUTOINMUNIDAD MEDIADA POR EL TLR7

En primer lugar, evaluamos el papel de *Bank1* en el contexto de la autoinmunidad. Para ello, empleamos dos modelos murinos de lupus, basados en la estimulación de la vía del receptor TLR7, con un desarrollo diferencial de la enfermedad. El primero es el TLR7.tg6, el cual es un modelo transgénico en el cual la sobreexpresión del gen *Tlr7* es suficiente para desencadenar un proceso autoinmune agudo, caracterizado por la producción de citoquinas proinflamatorias, autoanticuerpos, esplenomegalia y otros fenotipos patológicos asociados con el lupus en humanos, como el daño renal o el déficit cognitivo [213]. El segundo modelo es el inducido por imiquimod (IMQ-inducido). En este modelo, la activación del receptor TLR7 ocurre mediante el tratamiento tópico con imiquimod al 5%, agonista de dicho receptor. La aplicación de este tratamiento en ratones control C57BL/6 conduce a la aparición de los síntomas de autoinmunidad, similares a los que se observan en el lupus en humanos, como la aparición de esplenomegalia, aumento de niveles de citoquinas y autoanticuerpos circulantes [216].

Para determinar si la ausencia de *Bank1* afectaba a la progresión del LES, comenzamos analizando las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad. El primer parámetro evaluado fue la tasa de supervivencia. Las edades empleadas fueron 32 semanas de edad en el modelo TLR7.tg6 y 20 semanas de edad en el modelo inducido por IMQ (tras 8 semanas de tratamiento) (**Figura 16**). Como se muestra en las gráficas, en ambos modelos no se aprecian porcentajes de mortalidad reseñables. A pesar de ello, sí observamos un aumento en la tasa de supervivencia en ausencia de *Bank1*, en ambos modelos. Los ratones T7 presentaron una tasa de supervivencia del 85%, comparado con el 100% de las cepas WT control y T7.B1$^{-/-}$ (**Figura 16A**). Por el otro lado, los ratones WT+IMQ presentaron una tasa de supervivencia menor que los B1$^{-/-}$+IMQ, observándose valores idénticos en el caso de los ratones sin tratar WT y B1$^{-/-}$ (**Figura 16B)**. En base a estos datos, podemos sugerir que la

ausencia de *Bank1* mejora ligeramente el porcentaje de supervivencia de los ratones enfermos. Cabe mencionar que la mortalidad en el modelo del TLR7.tg6 en el tiempo escogido es muy baja, aumentando probablemente si se escogiesen tiempos posteriores, sin embargo los tiempos evaluados se seleccionaron por ser óptimos para la observación de signos claros de enfermedad, sin demorar demasiado la realización de los experimentos, evitando además el mantenimiento de animales con signos graves de enfermedad de forma innecesaria [213, 216].

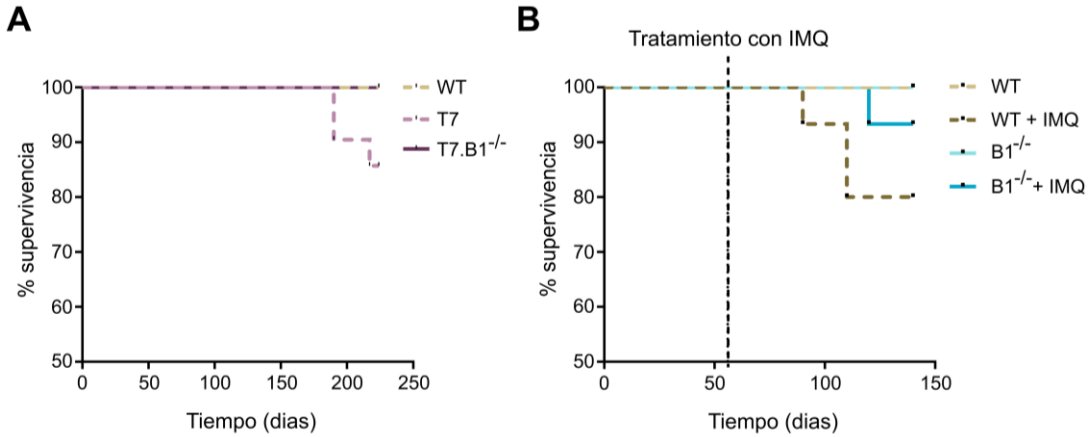

Figura 16. Tasa de supervivencia de ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. Se monitoreó la tasa de supervivencia en ambos modelos. Se muestra la tasa de supervivencia (%) en función de tiempo (días). (**A**) En el modelo TLR7.Tg6 se realizó el seguimiento hasta la semana 32. Ratones monitoreados: WT (n = 12), T7 (n = 21) y T7.B1$^{-/-}$ (n = 15); (p valor de 0,1362). (**B**) En el modelo inducido por IMQ se realizó el seguimiento hasta la semana 20. Ratones analizados: WT (n = 12), WT + IMQ (n = 15), B1$^{-/-}$ (n = 12) y B1$^{-/-}$ + IMQ (n = 15); (p valor de 0,1374)**.** Se muestra un gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier.

1.1 Evaluación de los niveles de autoanticuerpos

La producción de autoanticuerpos es uno de los principales desordenes inmunológicos en pacientes con LES. La identificación del tipo de autoanticuerpos es crucial, ya sea debido a su alta especificidad o a su comprobada patogenicidad [133]. Entre los autoanticuerpos más prevalentes se destacan los ANA, incluyendo los anti-dsDNA y los anti-Smith (anti-Sm), que

se dirigen contra antígenos nucleares específicos. Para el presente trabajo nos centramos en la determinación de los niveles de estos autoanticuerpos en el suero de los ratones a tiempo final.

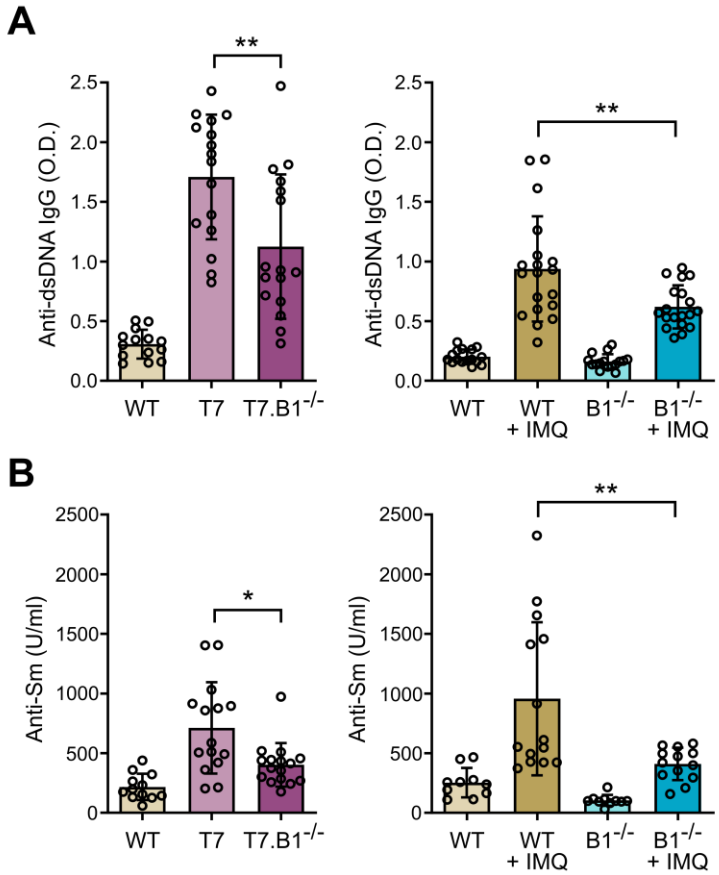

Figura 17. Niveles de autoanticuerpos en suero de ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. (**A**) Niveles de anticuerpos IgG anti-dsDNA (O.D). Modelo TLR7.tg6: WT (n = 14), T7 (n = 16), T7.B1$^{-/-}$ (n = 16); modelo inducido por IMQ: WT (n = 16), WT+IMQ (n = 19), B1$^{-/-}$ (n = 16), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 19). (**B**) Niveles de anticuerpos anti-Sm (U/ml). Modelo TLR7.tg6: WT (n = 12), T7 (n = 15), T7.B1$^{-/-}$ (n = 16); modelo inducido por IMQ: WT (n = 10), WT+IMQ (n = 14), B1$^{-/-}$ (n = 10), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 13). Cada punto representa el valor obtenido para un ratón individual. Los datos se muestran en gráficas de barras con la media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

Los niveles séricos de los anticuerpos IgG anti-dsDNA mostraron un aumento marcado en los grupos TLR7.tg6 y WT+IMQ en comparación con los controles sanos y no tratados, respectivamente (**Figura 17A**). Además, la deficiencia de *Bank1* en ambos modelos resultó

en una reducción significativa de estos niveles en comparación con los ratones TLR7.tg6 y WT+IMQ (**Figura 17A**). Por otro lado, en los niveles de anticuerpos anti-Sm se observó un incremento significativo en los ratones enfermos comparado con los ratones sanos y no tratados. Estos niveles disminuyeron significativamente en los grupos T7.B1$^{-/-}$ y B1$^{-/-}$+IMQ comparado con los ratones enfermos *Bank1*$^{+/+}$ (**Figura 17B**), indicando un papel clave de *Bank1* en la regulación de la producción de estos autoanticuerpos.

Entre los distintos isotipos, las inmunoglobulinas IgG destacan por su prevalencia y abundancia en la sangre periférica, siendo los autoanticuerpos IgG los más investigados en el contexto del LES [152]. Los resultados obtenidos revelaron un incremento significativo en los niveles séricos de IgG total en los ratones afectados por la enfermedad, tanto en los ratones T7 como en los tratados con IMQ, en comparación con los controles sanos y los no tratados. Estos niveles se redujeron de manera significativa en ausencia de *Bank1*, en los ratones T7.B1$^{-/-}$ y B1$^{-/-}$+IMQ (**Figura 18A**). En modelos murinos de lupus, se ha identificado al subtipo IgG2c como el isotipo de mayor actividad patogénica [126, 153]. De nuevo, se observó un incremento en los niveles de IgG2c en los ratones T7 y WT+IMQ en comparación con los controles sanos y no tratados. Además, la ausencia de *Bank1* condujo a una disminución significativa en los niveles de IgG2c (**Figura 18B**). Estos resultados indican que *Bank1* tiene un papel fundamental en la producción de niveles elevados de estas inmunoglobulinas IgG patogénicas.

Por otro lado, los niveles del isotipo IgG1 mostraron una disminución significativa en los ratones deficientes en *Bank1* en comparación con los ratones T7, aunque estas diferencias no alcanzaron significancia estadística en el modelo inducido por IMQ (**Figura 18C**). Este patrón sugiere una posible influencia de *Bank1* en la producción de IgG1 en determinadas condiciones, lo que resalta la complejidad de su papel en la respuesta inmunitaria.

Finalmente, los niveles de IgM no se vieron afectados por la deficiencia de *Bank1* (**Figura 18D**), lo cual concuerda con lo observado previamente en nuestro grupo de

investigación [81], y sugiere que *Bank1* puede no estar directamente involucrado en la regulación de la producción de IgM.

En conjunto, estos resultados respaldan la hipótesis de que la deficiencia de *Bank1* puede limitar los fenotipos principales del LES al reducir la producción patogénica de autoanticuerpos e inmunoglobulinas en los dos modelos murinos de lupus.

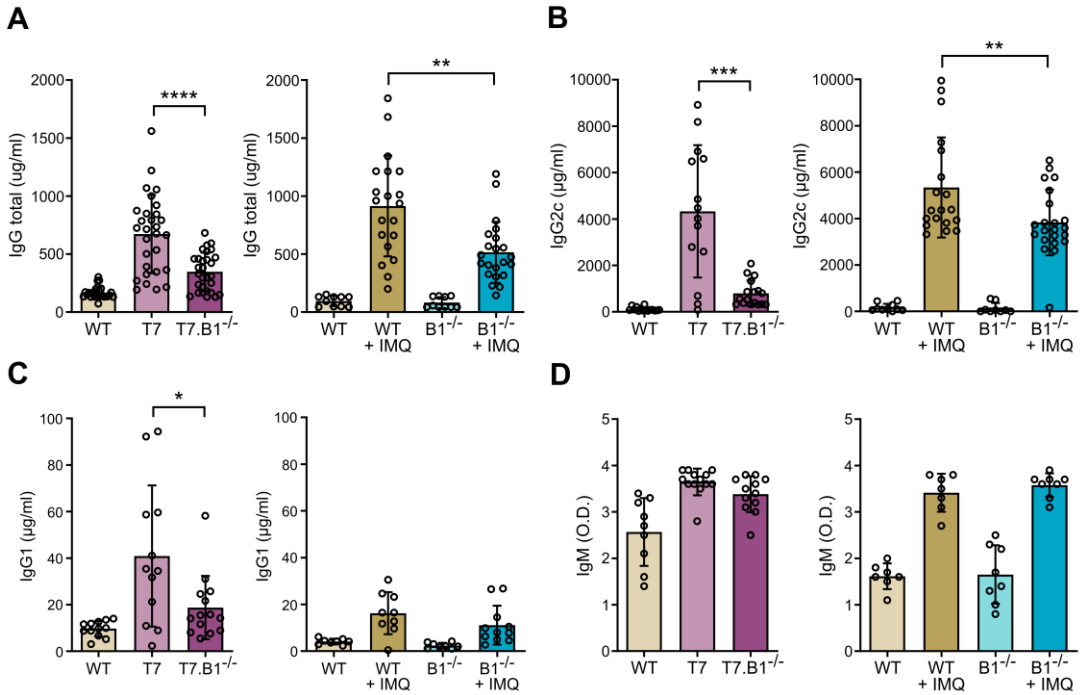

Figura 18. Niveles de inmunoglobulinas en suero de ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. (**A**) Niveles de IgG total (µg/ml). Modelo TLR7.tg6: WT (n = 25), T7 (n = 29), T7.B1$^{-/-}$ (n = 29); modelo inducido por IMQ: WT (n = 10), WT+IMQ (n = 20), B1$^{-/-}$ (n = 10), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 22). (**B**) Niveles de IgG2c (µg/ml). Modelo TLR7.tg6: WT (n = 15), T7 (n = 15), T7.B1$^{-/-}$ (n = 17); modelo inducido por IMQ: WT (n = 10), WT+IMQ (n = 19), B1$^{-/-}$ (n = 9), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 22). (**C**) Niveles de IgG1 (µg/ml). Modelo TLR7.tg6: WT (n = 12), T7 (n = 12), T7.B1$^{-/-}$ (n = 14); modelo inducido por IMQ: WT (n = 8), WT+IMQ (n = 9), B1$^{-/-}$ (n = 8), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 11). (**D**) Niveles de IgM (O.D). Modelo TLR7.tg6: WT (n = 9), T7 (n = 13), T7.B1$^{-/-}$ (n = 12); modelo inducido por IMQ: WT (n = 7), WT+IMQ (n= 7), B1$^{-/-}$ (n = 8), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 8). Cada punto representa el valor obtenido para un ratón individual. Los datos se muestran en gráficas de barras con la media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

1.2 Análisis del fenotipo celular en los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ

El bazo actúa como el órgano linfoide secundario más importante del sistema inmune y es el sitio donde ocurre la maduración y el almacenamiento de los linfocitos B y T. En este contexto, antes de profundizar en el análisis de las distintas poblaciones celulares, evaluamos la presencia o ausencia de esplenomegalia, definida como el agrandamiento del bazo como resultado de un crecimiento celular exacerbado.

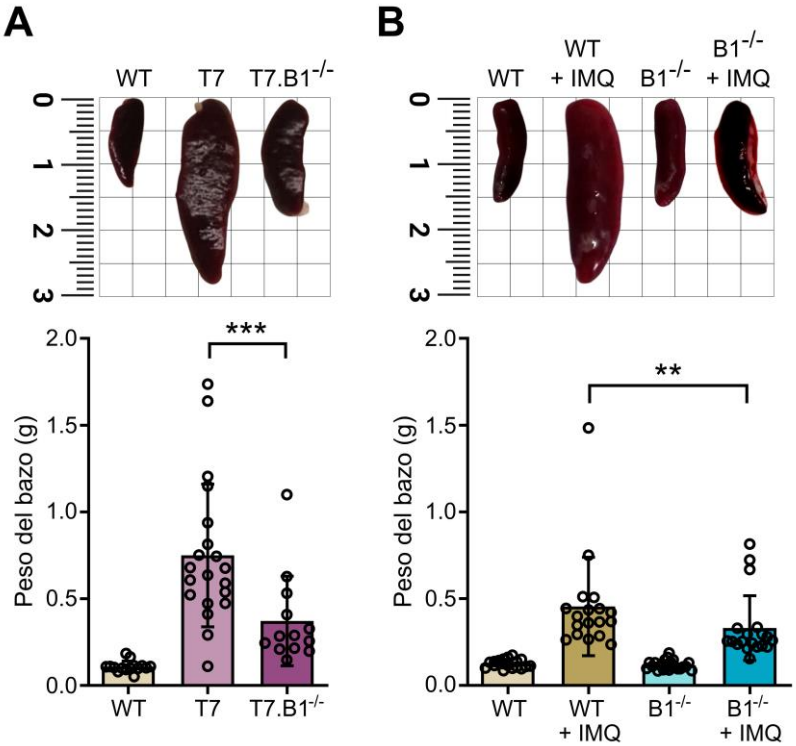

Figura 19. Tamaño y peso de los bazos de los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. En el panel superior se incluye una imagen representativa del bazo de cada grupo; en el panel inferior se muestra el peso del bazo de cada grupo. (**A**) Ratones del modelo TLR7.tg6: WT (n = 15), T7 (n = 20), T7.B1$^{-/-}$ (n = 13). (**B**) Ratones del modelo inducido por IMQ: WT (n = 18), WT+IMQ (n = 18), B1$^{-/-}$ (n = 22), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 19). Cada punto representa el valor obtenido para un ratón individual. Los datos se muestran en gráficas de barras con la media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

El tamaño de los bazos en el grupo de ratones T7 fue significativamente mayor que en los ratones deficientes de *Bank1*, T7.B1$^{-/-}$ (**Figura 19A**). Resultados similares se obtuvieron en el modelo inducido, siendo el tamaño de los bazos en el grupo de ratones WT+IMQ significativamente mayor al observado en los ratones B1$^{-/-}$+IMQ (**Figura 19B**). Como se observa en la figura, la ausencia de *Bank1* es suficiente para que, en los ratones afectados por la enfermedad, se restaure el tamaño de los bazos, pero sin llegar a ser el tamaño normal que se observa en los controles sanos y en los ratones no tratados con IMQ.

Como BANK1 se expresa mayoritariamente en las células B [237, 277], se procedió a evaluar, mediante citometría de flujo, si la deficiencia de *Bank1* podría restablecer a los niveles estándar, o normales, los fenotipos celulares alterados por el proceso autoinmune en las células B esplénicas. En primer lugar, observamos que la frecuencia de células B de la zona marginal (MZB), caracterizadas por la expresión de CD19^{+} CD21^{+} CD23^{-} (**Figura 20, A y B**), disminuyó en los ratones T7 y WT+IMQ comparado con los controles sanos y no tratados. Además, se observó que la ausencia de *Bank1* provocó un incremento significativo en el porcentaje de células MZB, en comparación con los ratones enfermos, logrando en parte restaurar los niveles observados en los ratones WT (**Figura 20C**). Por otro lado, el porcentaje total de células B foliculares (FO B), caracterizadas por la expresión de CD19^{+} CD21^{-} CD23^{+} (**Figura 20, A y B**), también mostró una disminución en los ratones enfermos comparado con los grupos sanos y no tratados. De la misma manera, observamos que en los ratones T7.B1$^{-/-}$ y B1$^{-/-}$+IMQ, la frecuencia de células FOB fue significativamente mayor que la observada en los ratones T7 y WT+IMQ, respectivamente (**Figura 20D**).

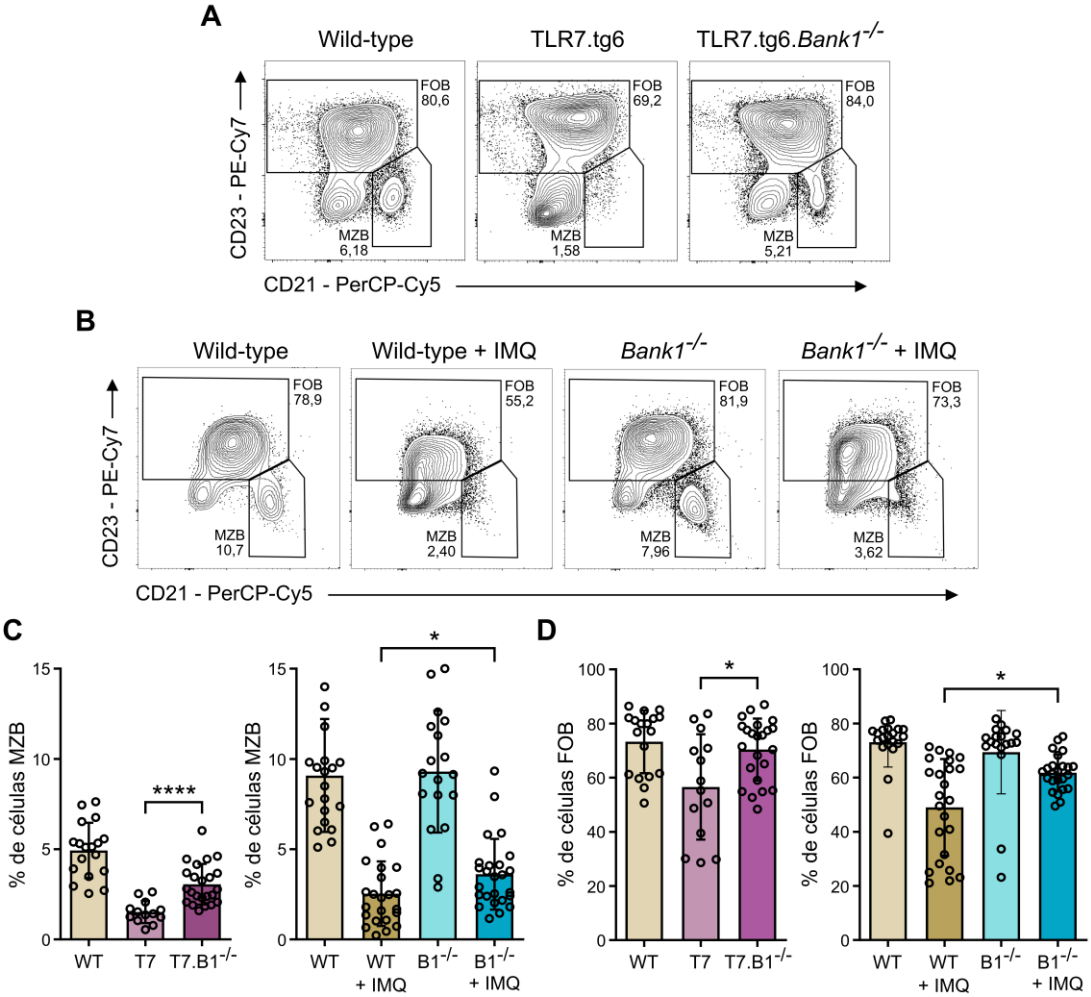

Figura 20. Análisis de las poblaciones celulares MZB y FOB en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. (**A**-**B**) Estrategia de *gating* para el análisis de las células MZB ($CD19^+$ $CD21^+$ $CD23^-$), y de las células FOB ($CD19^+$ $CD21^-$ $CD23^+$), (**A**) en el modelo TLR7.tg6, y (**B**) en el modelo inducido por IMQ. (**C**) Frecuencia de células MZB y (**D**) células FOB en el bazo de ambos modelos. Modelo TLR7.tg6: WT (n = 18), T7 (n = 14), T7.B1-/- (n = 23); modelo inducido por IMQ: WT (n = 20), WT+IMQ (n = 24), $B1^{-/-}$ (n = 18), $B1^{-/-}$+IMQ (n = 25). Cada punto representa el valor obtenido para un ratón individual. Los datos se muestran en gráficas de barras con la media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

Otra población con un papel fundamental en autoinmunidad son las células plasmáticas. Esta población se caracteriza por la pérdida de expresión negativa de CD19 y la expresión positiva de CD138 (**Figura 21, A y B**). Como se muestra en la figura, se observó un aumento significativo del porcentaje de células $CD138^+$ en los ratones de ambos modelos de lupus, en

comparación con los ratones de los grupos sanos y no tratados. Este aumento en la población de células plasmáticas es una característica distintiva de la respuesta autoinmune subyacente en los modelos murinos de lupus [343, 344]. Además, en ausencia de *Bank1*, estos niveles disminuyeron de manera significativa en ambos modelos, en comparación con los ratones T7 y WT+IMQ (**Figura 21C**).

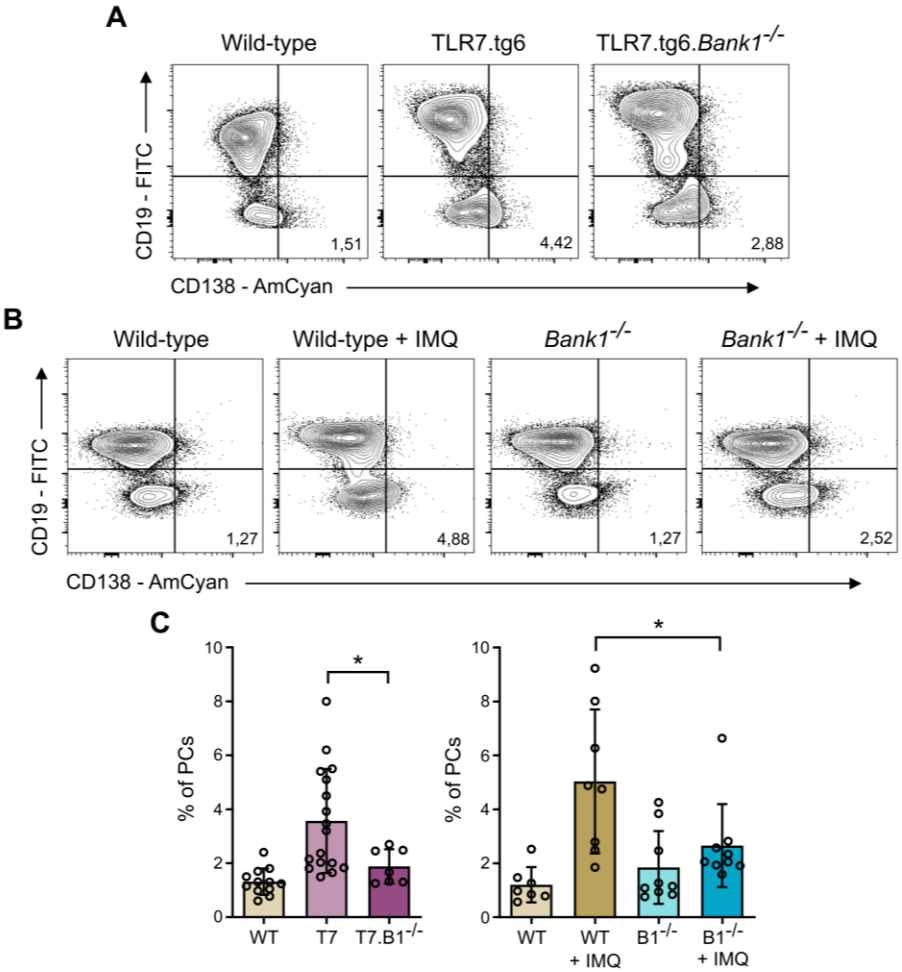

Figura 21. Análisis de la población de células plasmáticas en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. (**A** y **B**) Estrategia de *gating* para las células plasmáticas ($CD19^{-}$ $CD138^{+}$), (**A**) en el modelo TLR7.tg6; (**B**) y en el modelo inducido por IMQ. (**C**) Frecuencia de células plasmáticas en el bazo de ambos modelos. Modelo TLR7.tg6: WT (n = 12), T7 (n = 17), T7.B1-/- (n = 7); modelo inducido por IMQ: WT (n = 7), WT+IMQ (n = 8), $B1^{-/-}$ (n = 9), $B1^{-/-}$+IMQ (n = 9). Cada punto representa el valor obtenido para un ratón individual. Los datos se muestran en gráficas de barras con la media ± SEM.

Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

La hiperactivación y expansión de las células T es también uno de los procesos característicos de los procesos de autoinmunidad, en general, y del LES, en particular. Para poder evaluar el efecto de la deficiencia de *Bank1* en los linfocitos T, analizamos las principales poblaciones de células T esplénicas, mediante citometría de flujo. Las células T más relevantes son las células T auxiliares $CD4^+$ y las células T citotóxicas $CD8^+$. Estas poblaciones se podrían dividir, a grandes rasgos, en células naïve, o de reposo, definidas como $CD3^+$ $CD4^+/CD8^+$ $CD62L^+$ $CD44^-$, y en células activadas, también conocidas como efectoras de memoria, caracterizadas por ser $CD3^+$ $CD4^+/CD8^+$ $CD62L^{+/-}$ $CD44^+$.

La frecuencia de las células T naïve $CD4^+$ (**Figura 22, A y B**) se redujo de manera significativa en los ratones afectados por la enfermedad, T7 y WT+IMQ, comparado con los ratones sanos y no tratados. Además, se observó un incremento en la frecuencia de las células T naïve $CD4^+$ en los ratones deficientes en *Bank1*, comparado con los ratones T7 y WT+IMQ (**Figura 19C**). La frecuencia de las células T activadas (**Figura 22, A y B**), aumentó considerablemente en los ratones T7 y WT+IMQ en comparación con los ratones sanos y no tratados. Asimismo, observamos que el número de células T activadas $CD4^+$ disminuyó significativamente en los ratones T7.B1$^{-/-}$, comparado con el grupo T7, sin embargo, en el modelo inducido no se observaron dicha diferencia (**Figura 22D**). De igual manera, la frecuencia de células T naïve $CD8^+$ (**Figura 23, A y B**) se redujo de manera significativa en los ratones afectados por la enfermedad, T7 y WT+IMQ, comparado con los ratones sanos y no tratados. Además, se observó un incremento en la frecuencia de las células T naïve $CD8^+$ en los ratones deficientes en *Bank1*, comparado con los ratones T7 y WT+IMQ (**Figura 23C**). El número de células T activadas $CD8^+$ (**Figura 23, A y B**), aumentó considerablemente en los ratones T7 y WT+IMQ en comparación con los ratones sanos y no tratados. En ausencia de *Bank1*, el número de estas células se redujo en comparación con los grupos T7 y WT+IMQ (**Figura 23D**). Esta reducción en el número de células T activadas se correlaciona positivamente con el aumento en el número de células T naïve en los ratones deficientes en *Bank1*.

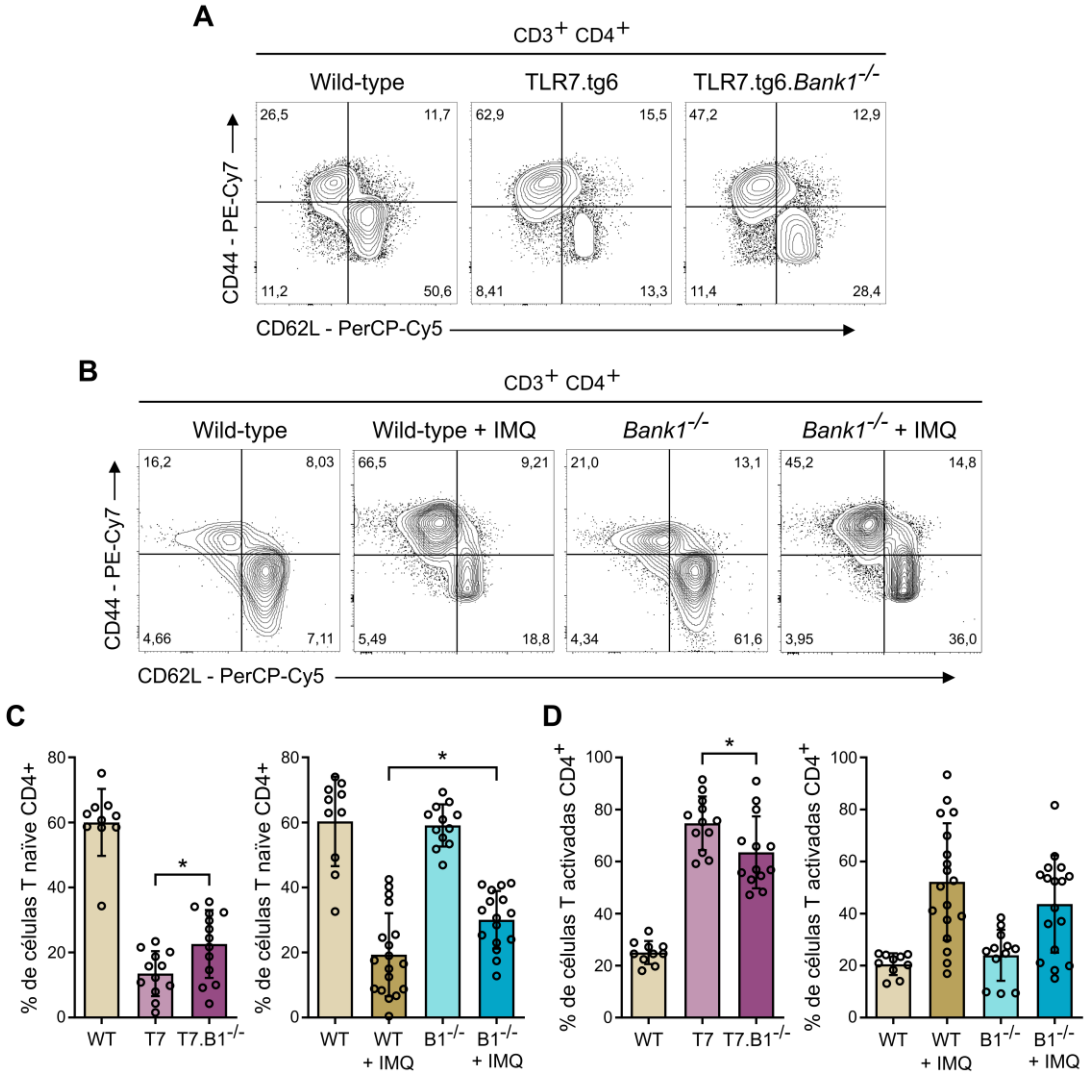

Figura 22. Análisis de las poblaciones celulares CD4⁺ en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. (**A**-**B**) Estrategia de *gating* para el análisis de las células T naïve CD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺ CD62L⁺ CD44⁻), y de las células T activadas CD4⁺ (CD3⁺ CD4⁺ CD62L⁻ CD44⁺), (**A**) en el modelo TLR7.tg6, y (**B**) en el modelo inducido por IMQ. (**C**) Frecuencia de células T naïve CD4⁺ y (**D**) células T activadas CD4⁺ en el bazo de ambos modelos. Modelo TLR7.tg6: WT (n = 10), T7 (n = 12), T7.B1-/- (n = 13); modelo inducido por IMQ: WT (n = 10), WT+IMQ (n = 18), B1$^{-/-}$ (n = 12), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 17). Cada punto representa el valor obtenido para un ratón individual. Los datos se muestran en gráficas de barras con la media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

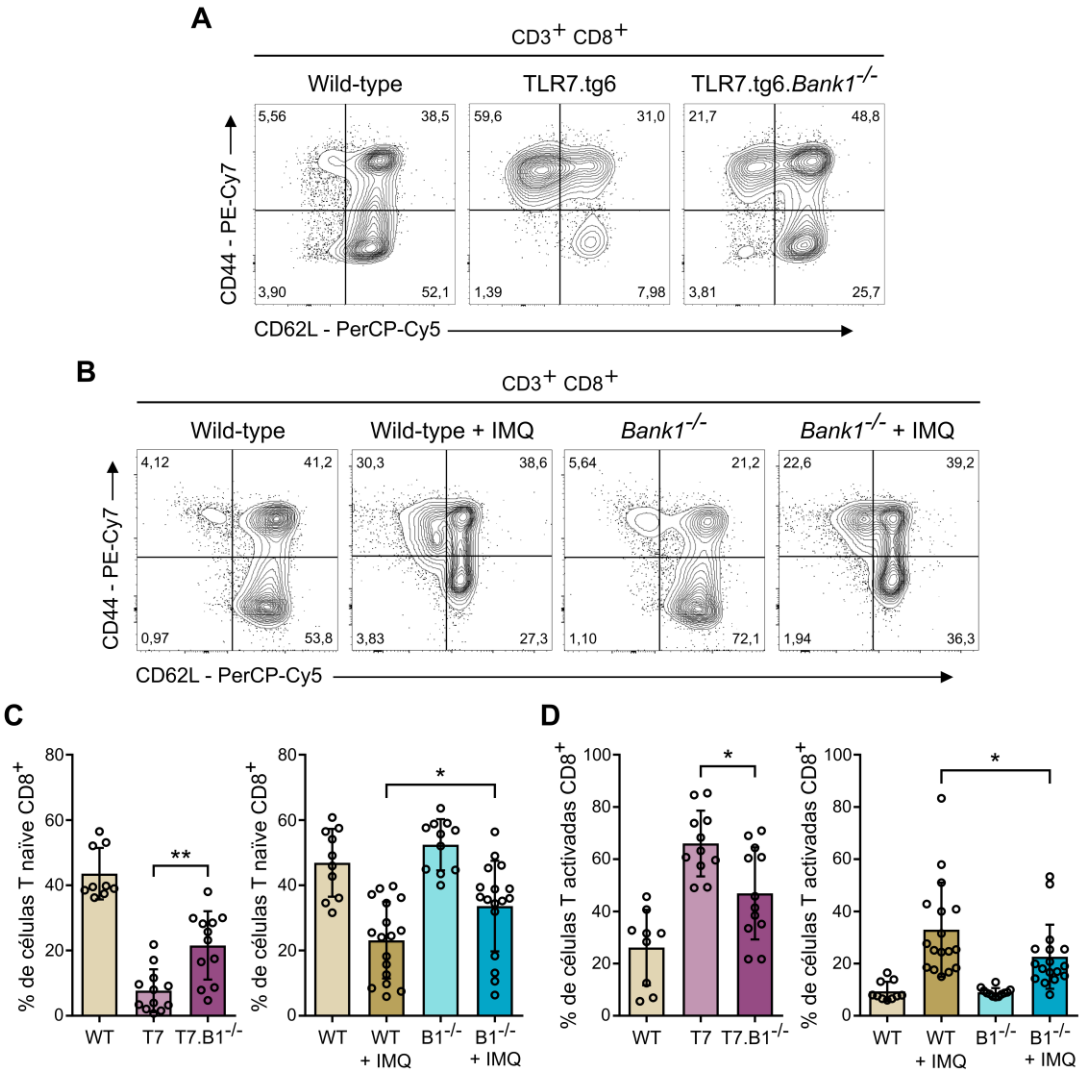

Figura 23. Análisis de las poblaciones celulares CD8⁺ en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. (**A**-**B**) Estrategia de *gating* para el análisis de las células T naïve CD8⁺ (CD3⁺ CD8⁺ CD62L⁺ CD44⁻), y de las células T activadas CD4⁺ (CD3⁺ CD8⁺ CD62L⁻ CD44⁺), (**A**) en el modelo TLR7.tg6, y (**B**) en el modelo inducido por IMQ. (**C**) Frecuencia de células T naïve CD8⁺ y (**D**) células T activadas CD8⁺ en el bazo de ambos modelos. Modelo TLR7.tg6: WT (n = 9), T7 (n = 11), T7.B1-/- (n = 12); modelo inducido por IMQ: WT (n = 10), WT+IMQ (n = 17), B1$^{-/-}$ (n = 12), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 17). Cada punto representa el valor obtenido para un ratón individual. Los datos se muestran en gráficas de barras con la media ± SEM. Las comparaciones entre grupos se realizaron con la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

En conjunto, nuestros hallazgos respaldan la idea de que la deficiencia de *Bank1* tiene un impacto significativo en la respuesta autoinmune mediada por los receptores TLR7, afectando al grado de activación y proliferación de los esplenocitos (esplenomegalia), así como a la composición de las principales poblaciones de células B y T.

2. El EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE BANK1 EN LAS ABCs

Como se mencionó anteriormente, la población de las ABCs fue identificada recientemente y de manera independiente por los grupos de investigación liderados por Hao et al. [292] y Rubtsov et al. [293], los cuales mostraron el papel relevante de estas células en la autoinmunidad. Para completar el análisis del papel de *Bank1* en las respuestas autoinmunes, analizamos la población de las ABCs con el objetivo principal de evaluar los efectos de la ausencia del gen *Bank1* en la formación y acumulación de dichas células, en dos modelos murinos de lupus. En primer lugar, optimizamos un panel de citometría para definir a las ABCs integrando los marcadores previamente utilizados, implementando una nueva estrategia de *gating*, y más precisa, para caracterizarlas como células B $CD19^+$ $CD21^-$ $CD23^-$ $CD11b^+$ $CD11c^+$ T-bet^+ (**Figura 24)**.

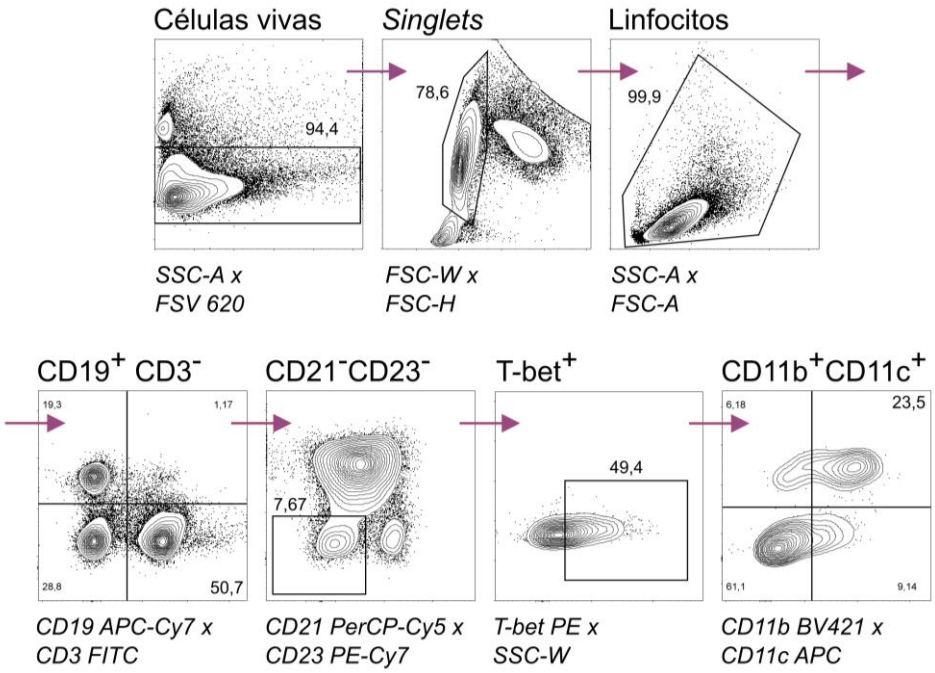

Figura 24. Optimización del proceso de *gating* para la caracterización de la población de las ABCs. Estrategia basada en la selección secuencial de: células vivas FSV620; células individuales (*singlets*) (FSC-W x FSC-H); linfocitos totales (SSC-A x FSC-A); posteriormente, para las ABCs la selección secuencial siguió de la siguiente manera: células B ($CD19^+$ $CD3^-$); dobles negativas ($CD21^-$ $CD23^-$); células T-bet^+; y finalmente células dobles positivas ($CD11b^+$ $CD11c^+$).

2.1 Análisis de la frecuencia de ABCs en los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ

Una vez optimizado el panel de anticuerpos y los criterios de selección para la detección de las ABCs, procedimos a evaluar el efecto de Bank1 en esta población, determinando el porcentaje y número total células en ambos modelos murinos de lupus (**Figura 25, A y B**).

Se registró un incremento significativo en la frecuencia de ABCs en los ratones T7, a partir de las 32 semanas de edad, así como en los ratones WT+IMQ, a partir de las 20 semanas de edad, en comparación con sus controles de la misma edad, sanos y no tratados, respectivamente (**Figura 25C**). En los ratones T7.B1$^{-/-}$ y B1$^{-/-}$+IMQ se observó una reducción significativa en el porcentaje total de estas células en comparación con los ratones enfermos (**Figura 25C**). Este hallazgo sugiere una conexión significativa entre la expresión de *Bank1* y la formación de las ABCs, subrayando la importancia de este gen en la regulación de los procesos inmunitarios subyacentes, particularmente en el contexto de la respuesta mediada por el TLR7.

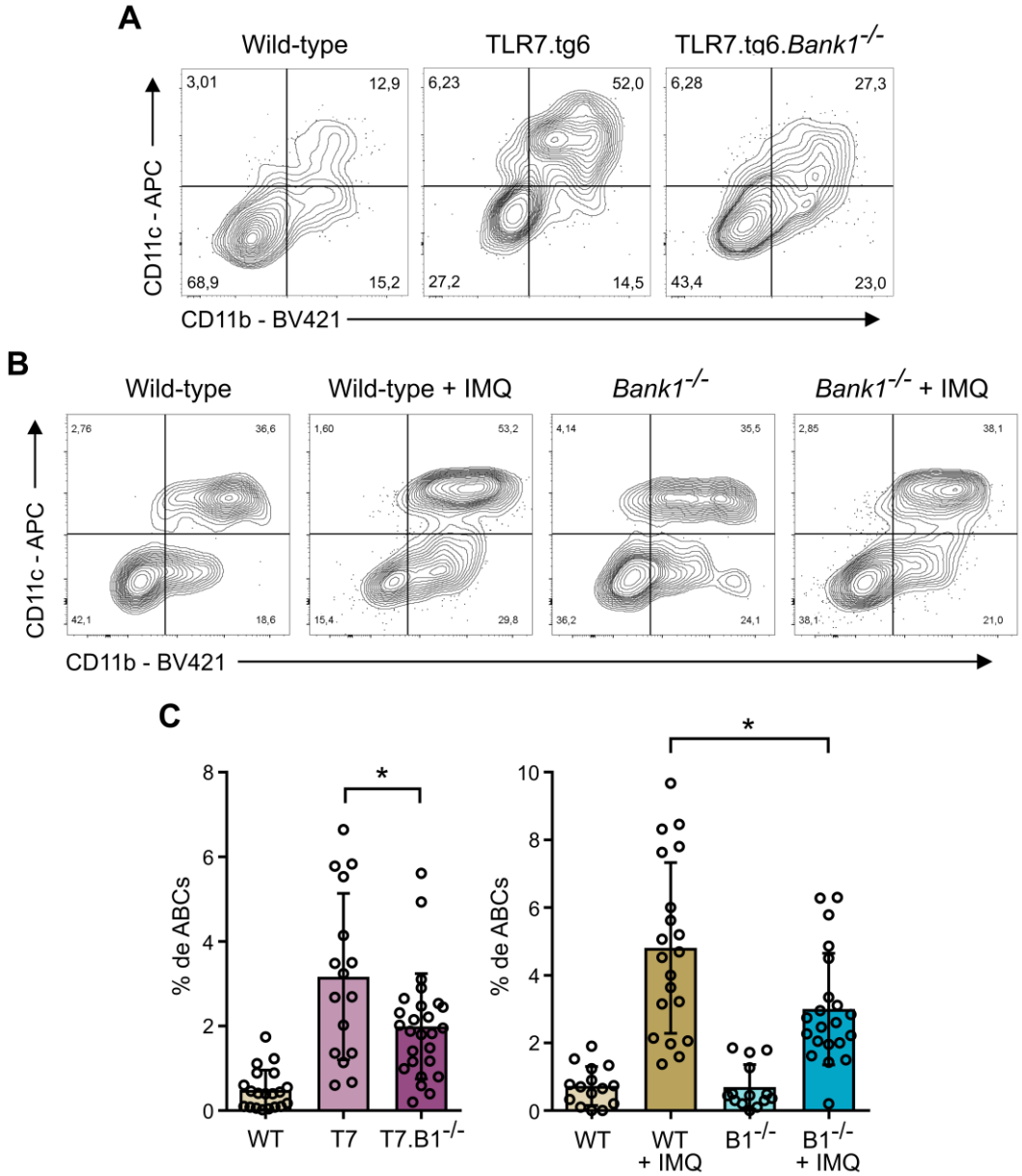

Figura 25. Efecto de la deficiencia de *Bank1* en la frecuencia total de ABCs en los ratones de los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. Ejemplo representativo del último *gate* de las ABCs, definidas como CD19$^+$ CD21$^-$ CD23$^-$ T-bet$^+$ CD11b$^+$ CD11c$^+$, (**A**) en el modelo TLR7.tg6, (**B**) y en el modelo inducido por IMQ. (**C**) Frecuencia de ABCs (sobre el total de CD19$^+$) en el bazo de ambos modelos. Modelo TLR7.tg6: WT (n = 20), T7 (n = 16), T7.B1-/- (n = 26); modelo inducido por IMQ: WT (n = 15), WT+IMQ (n = 20), B1$^{-/-}$ (n = 14), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 21). Cada punto representa un ratón individual. Los datos se muestran como la media ± SEM. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

Como se ha descrito en la literatura, esta población apenas es detectable en edades tempranas, entre 8 y 10 semanas de edad, tanto en ratones sanos como en ratones susceptibles de padecer la enfermedad, en los que aún no existen signos de ella. Sin embargo, a pesar de la baja proporción de estas células en estas etapas, se observó un ligero agrandamiento del bazo en los ratones T7 de 10 semanas (**Figura 26A**), junto con una frecuencia de células ABC significativamente mayor (**Figura 26B**) en comparación con ratones sanos WT de la misma edad. Esto podría indicar un patrón de desarrollo diferencial en la aparición de estas células a lo largo del tiempo, lo que sugiriere una posible implicación de la vía de señalización del TLR7 en la regulación de la homeostasis de las ABCs en el sistema inmunitario.

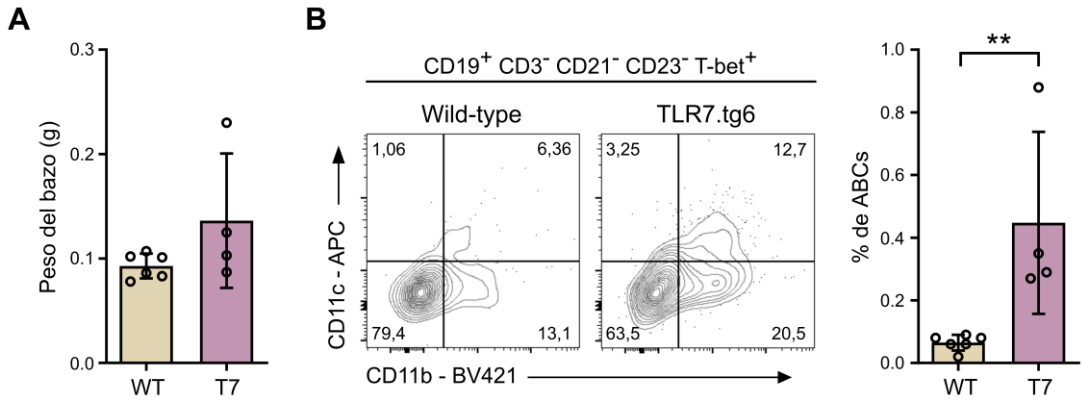

Figura 26. Frecuencia de ABCs en edades tempranas. (**A**) Peso del bazo de ratones WT (n = 6) y T7 (n = 4), a las 10 semanas de edad. (**B**) A la izquierda: ejemplo representativo del último *gate* de las ABCs de cada una de las cepas analizadas; a la derecha: frecuencia de ABCs (sobre el total de CD19$^+$) en el bazo de ratones WT y T7. Cada punto representa un ratón individual. Los datos se muestran como la media ± SEM. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

Para confirmar el papel general de *Bank1* en el control de la población celular de las ABCs, evaluamos el porcentaje de esta población en un tercer modelo murino de lupus, la cepa congénita B6.*Sle1.yaa*, y cruzado con ratones *knockout* para *Bank1*. Esta cepa, cuyo fondo genético es del C57BL/6, se caracteriza por tener el locus *Sle1*, uno de los primeros tres loci identificados como susceptibles del LES [228]; y por la presencia del factor *yaa*, una duplicación de una región del cromosoma X que contiene el *Tlr7* translocado al cromosoma

Y [104]. Todo ello resulta en importantes efectos sinérgicos de las respuestas inflamatorias y autoinmunes inducidas en los ratones macho [345]. A las 36 semanas de edad, se observó una acumulación de ABCs en los ratones B6.*Sle1*.*yaa* (SLE1) con una reducción significativa en los ratones deficientes en *Bank1*, B6.*Sle1*.*yaa*.*Bank1*$^{-/-}$ (SLE1.B1$^{-/-}$) (**Figura 27**).

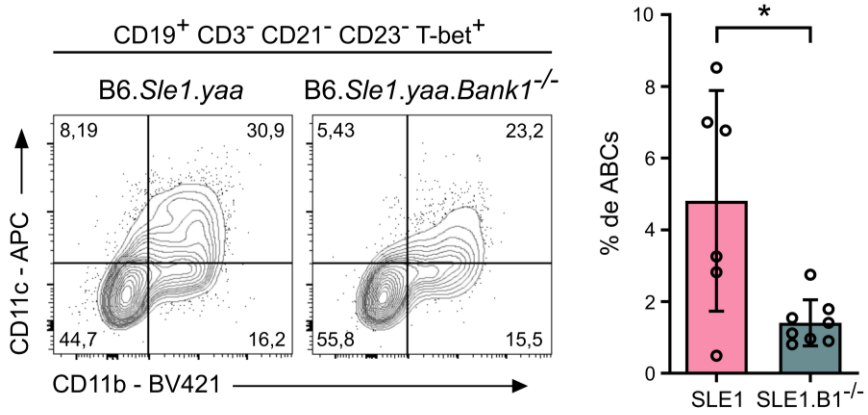

Figura 27. Efecto de la deficiencia de *Bank1* en la frecuencia total de ABCs en el modelo B6.*Sle1*.*yaa*. A la izquierda: ejemplo representativo del último gate de las ABCs de cada una de las cepas analizadas; a la derecha: frecuencia de ABCs (sobre el total de CD19^{+}) en los bazos de los ratones B6.*Sle1*.*yaa* y B6.*Sle1*.*yaa*.*Bank1*$^{-/-}$, de 36 semanas de edad. Ratones analizados: SLE1 (n = 6), SLE1.B1-/- (n = 8). Cada punto representa un ratón individual. Los datos se muestran como la media ± SEM. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

En conjunto, estos resultados sugieren que el crecimiento y la expansión de las ABCs, están sujetos a la edad, dado que en etapas tempranas su proporción es muy baja (menor al 1%), y que dicha expansión se ve limitada por la deficiencia de *Bank1*.

Las ABCs experimentan una diferenciación rápida hacia el fenotipo de células secretoras de anticuerpos, con una alta propensión al cambio de clase IgG2a/c [295, 318]. Estas células son responsables de la producción de autoanticuerpos de dicha clase, en diversos modelos de lupus, reduciéndose de manera significativa los niveles de estos autoanticuerpos tras su eliminación [86, 305, 332]. Por ello, con el fin de evaluar el papel de *Bank1* en este fenotipo, se determinó la frecuencia de ABCs que expresasen IgG e IgG2c. En ambos modelos de lupus, los ratones deficientes en *Bank1*, T7.B1$^{-/-}$ y B1$^{-/-}$+IMQ mostraron una reducción significativa

de ABCs positivas para IgG en comparación con los ratones T7 y WT+IMQ (**Figura 28A**). Además, el porcentaje de ABCs positivas para IgG2c disminuyó significativamente en los ratones T7.B1$^{-/-}$ y B1$^{-/-}$+IMQ, en comparación con los ratones enfermos (**Figura 28B**). Por lo tanto, podemos concluir que la deficiencia de *Bank1* reduce la generación y expansión de las células ABCs cuyo fenotipo es positivo para las inmunoglobulinas de cambio de clase IgG e IgG2c, en ambos modelos murinos de lupus, mediados por el TLR7.

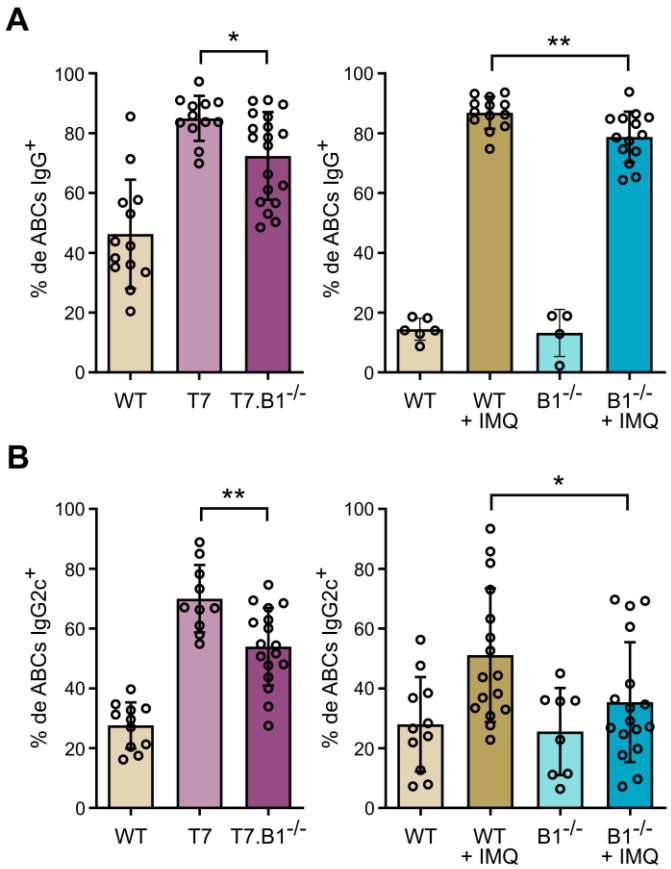

Figura 28. Efecto de la deficiencia de *Bank1* en la frecuencia total de ABCs IgG$^+$ e IgG2c$^+$ en los modelos TLR7.tg6 e inducido por IMQ. (**A**) Frecuencia de ABCs IgG$^+$ (sobre el total de CD19$^+$) en el bazo de ambos modelos. Modelo TLR7.tg6: WT (n = 13), T7 (n = 12), T7.B1-/- (n = 19); modelo inducido por IMQ: WT (n = 6), WT+IMQ (n = 13), B1$^{-/-}$ (n = 4), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 14). (**B**) Frecuencia de ABCs IgG2c$^+$ (sobre el total de CD19$^+$) en el bazo de ambos modelos. Modelo TLR7.tg6: WT (n = 11), T7 (n = 10), T7.B1-/- (n = 17); modelo inducido por IMQ: WT (n = 10), WT+IMQ (n = 16), B1$^{-/-}$ (n = 6), B1$^{-/-}$+IMQ (n = 17). Cada punto representa un ratón individual. Los datos se muestran como la media ± SEM. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

2.2 Diferenciación *in vitro* de las ABCs

La inducción y diferenciación de las ABCs puede ser desencadenada mediante la activación de las vías de señalización del TLR7 y de la IL-21, según varios estudios [293, 306]. En este contexto, y para evaluar si *Bank1* tenía un papel en el proceso de diferenciación de estas células, quisimos examinar directamente la capacidad de estos estímulos para promover la diferenciación *in vitro* de las ABCs, a partir de células B esplénicas aisladas ($CD19^{+}$) de ratones jóvenes WT y $B1^{-/-}$, de aproximadamente 10 semanas de edad. Para ello, cultivamos las células B en un medio suplementado con anti-CD40 y anti-IgM, para estimular tanto los receptores CD40R como los BCR. Además, estimulamos adicionalmente estas células con Imiquimod e IL-21 recombinante.

A simple vista, aparecieron unos agregados de células más grandes, indicativos de una mayor capacidad de proliferación, en las células de los ratones WT comparado con las células deficientes en *Bank1* (**Figura 29A**). Cabe destacar, que la adición de Imiquimod, solo o en combinación con IL-21, condujo a la diferenciación *in vitro* hacia las ABCs. Sin embargo, la deficiencia de *Bank1* aparentemente no afectó a la formación de estas células (**Figura 29, B y C**), a diferencia de lo que observamos *in vivo* en los ratones enfermos, lo que sugiere que *Bank1* podría estar afectando a una población de células B en una etapa diferente, o posterior, y no estimulada *in vitro*.

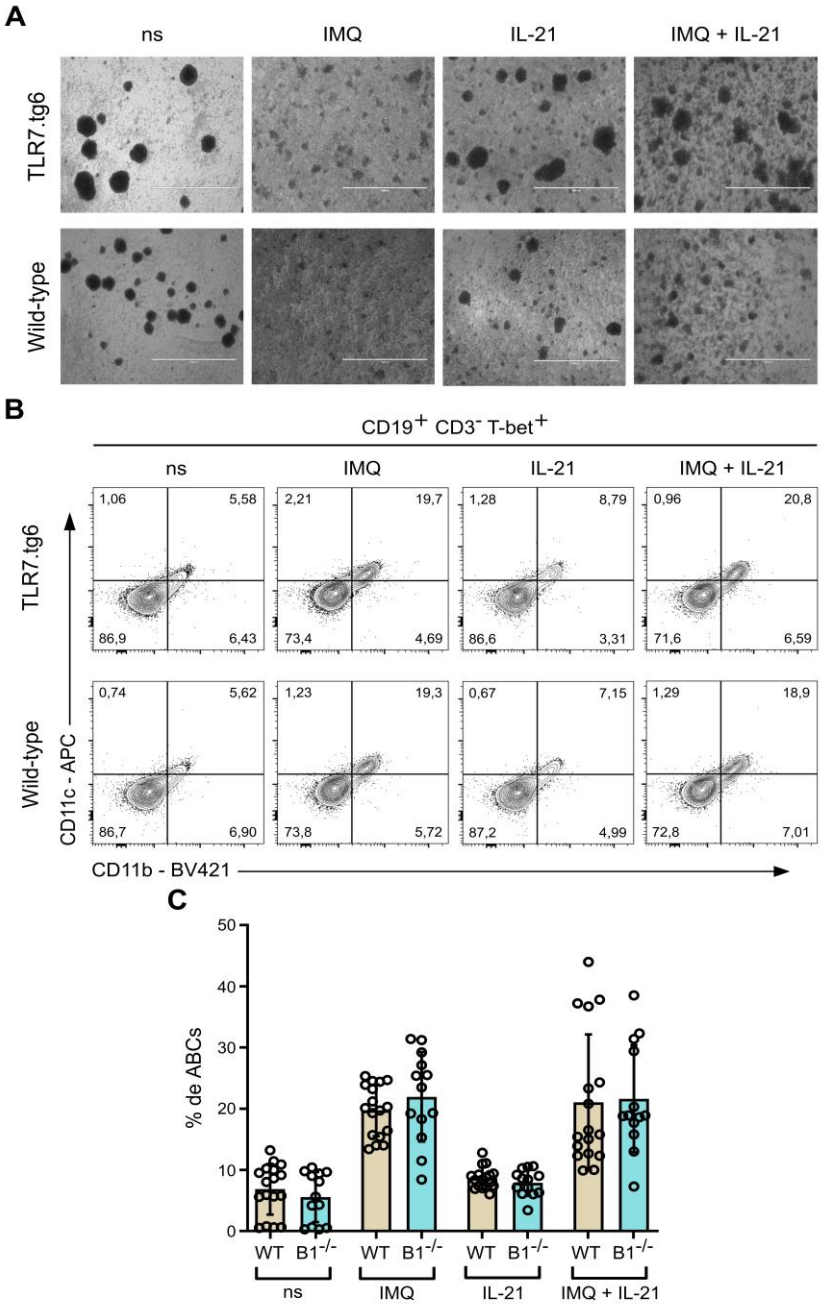

Figura 29. Cultivo y diferenciación *in vitro* de células B aisladas hacia el fenotipo de ABCs. (**A**) Imágenes representativas de las agrupaciones celulares *in vitro* por cada grupo y estímulo. Barra de escala: 1 mm. (**B**) Ejemplo representativo del último gate de las ABCs CD11b$^+$ CD11c$^+$ (sobre el total de células CD19$^+$ CD3$^-$ T-bet$^+$). (**C**) Frecuencia de ABCs en los bazos de los ratones WT y B1$^{-/-}$ de 10 semanas de edad, sin tratar (ns) y tratados con IMQ, IL-21 o la combinación de IMQ e IL-21. Ratones analizados: WT (n = 17) y B1$^{-/-}$ (n = 13). Cada punto representa un ratón individual. Los datos se muestran como la media ± SEM. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

3. PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LAS CÉLULAS B, EN EL CONTEXTO DE LA AUTOINMUNIDAD, MODULADO POR BANK1

La ausencia de cambios durante el proceso de diferenciación *in vitro* de las ABCs derivadas de células B CD19^{+} provenientes de ratones deficientes en *Bank1*, nos llevó a plantearnos un análisis más exhaustivo del papel de *Bank1* en la diferenciación y activación, ya no solo de las ABCs, sino de las distintas subpoblaciones de células B, en el contexto de la inflamación en el LES. Para completar este estudio, se llevó a cabo un análisis de secuenciación del ARN de célula única (scRNA-Seq, del inglés *single cell RNA Sequencing*). Esta técnica, empleada por primera vez en el año 2009 [346], consiguió dos objetivos fundamentales nunca antes logrados: la obtención de células aisladas y la amplificación del ADNc de estas células para la creación de librerías. El proceso del scRNA-Seq abarca varias etapas, que incluyen el aislamiento de células individuales, la transcripción inversa, la síntesis del ADNc, la construcción de librerías de dichas células, la secuenciación de alto rendimiento y, finalmente, el análisis de los datos obtenidos [347]. En nuestro contexto, este enfoque nos permitiría analizar el estado de otros tipos celulares, patrones de expresión en diferentes subpoblaciones celulares, analizar el proceso de diferenciación, y eventualmente desvelar mecanismos subyacentes de la patogénesis [348].

3.1 Clusterización de las diferentes subpoblaciones de células B mediante scRNA-Seq

Para llevar a cabo el análisis del scRNA-Seq, primero se obtuvieron los esplenocitos totales de tres ratones, de 32 semanas de edad, de cada genotipo: wild-type, TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$. Tras aislar cada célula individual, realizar la secuenciación y construir las librerías, se procedió al análisis de los datos obtenidos. En primer lugar, los datos fueron sometidos a una reducción bidimensional de UMAP, para poder visualizar y analizar el conjunto de datos en su totalidad, y se obtuvieron 18 clústeres de diferentes tipos celulares,

incluyendo a las células B, T, NK, dendríticas, así como a macrófagos, neutrófilos, monocitos y eritrocitos (**Figura 30A**).

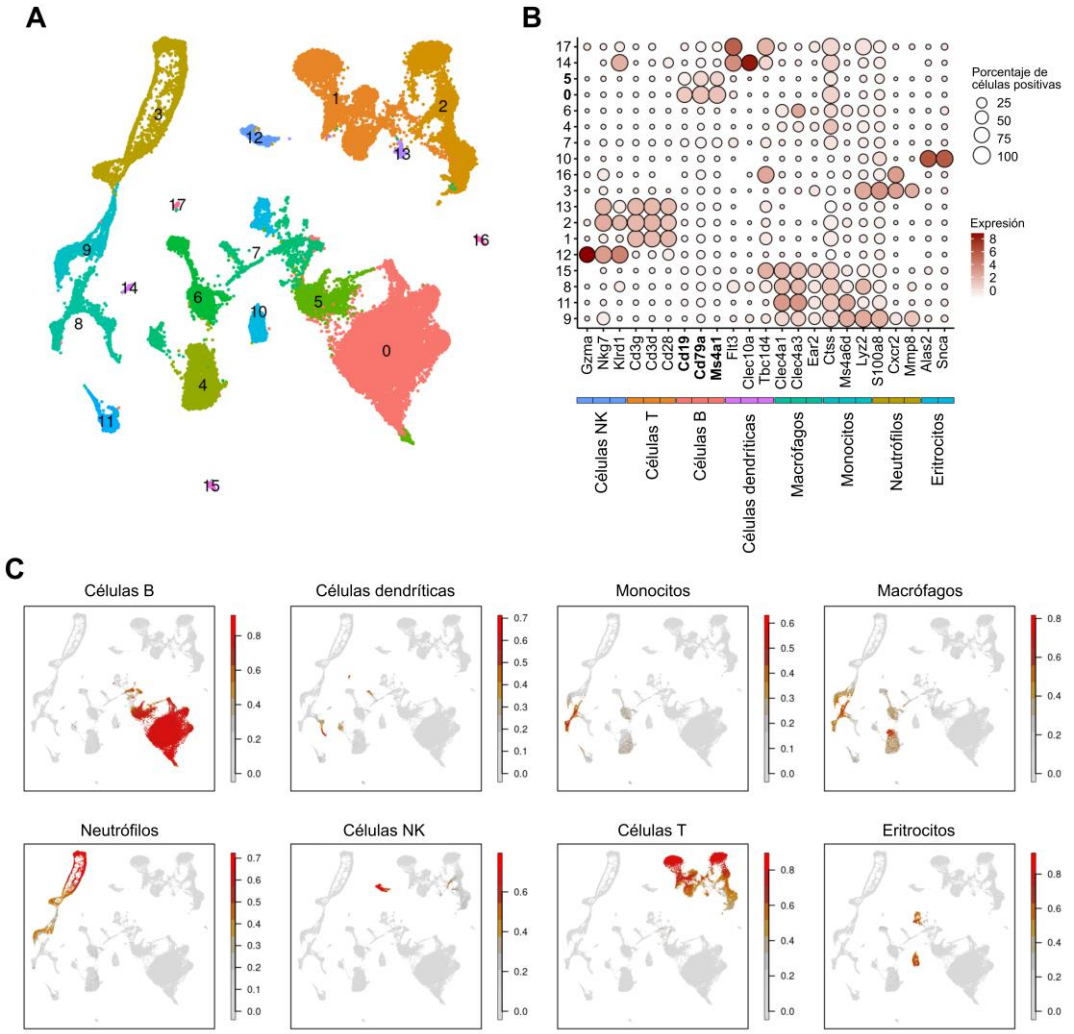

Figura 30. Clusterización de las diferentes poblaciones celulares del bazo. (**A**) Proyección bidimensional de UMAP de los diferentes tipos celulares del bazo. Cada punto representa una única célula, y los colores representan los diferentes clústeres (**B**) *Dot matrix plot*, o gráfico de matriz de puntos, de la expresión de los diferentes genes dentro de cada clúster. El tamaño del círculo representa el porcentaje de células positivas para ese marcador, y el gradiente de color representa el nivel de expresión de cada gen. (**C**) Correlación entre los marcadores específicos de cada tipo celular y su expresión por dichas células. El gradiente de color representa el nivel de correlación.

Para la anotación de las distintas poblaciones, se emplearon marcadores genéticos característicos de cada tipo celular presente en el bazo. En concreto, para definir y detectar la población de linfocitos B, se emplearon marcadores clásicos y generales de estas células, como son: *Cd19*, *Cd79a* y *Ms4a1* (**Figura 30B**). La expresión de los diferentes marcadores permitió detectar y categorizar las distintas poblaciones celulares dentro del UMAP (**Figura 30C**).

Posteriormente, se seleccionaron las células anotadas como células B (clústeres 0 y 5), y se sometieron a un proceso completo de reanálisis. Se identificaron así un total de 10 clústeres diferentes de linfocitos B, y se categorizaron en función de la expresión de los genes característicos de estas células, comentados previamente (*Cd19*, *Cd79a* y *Ms4a1*) (**Figura 31**).

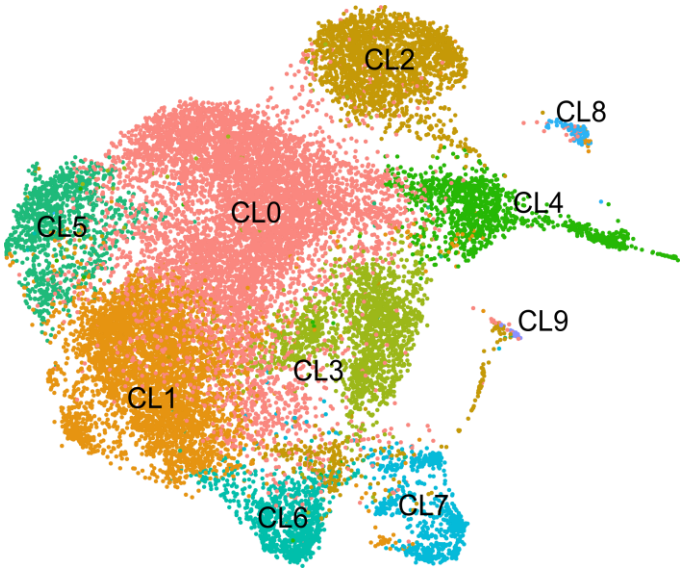

Figura 31. Clusterización de las diferentes poblaciones de células B. Proyección bidimensional de UMAP que muestra los diferentes clústeres de células B del bazo.

Para comprender mejor qué subtipo de célula B estaba siendo representada por cada clúster, se emplearon anotaciones y marcadores genéticos característicos de cada subpoblación, en base a estudios previos [337, 349, 350], con el fin de poder clasificar dichos

clústeres en los diferentes subtipos específicos. De esta manera, se anotaron y clasificaron los clústeres en: células B naïve foliculares (FOB), representadas por el clúster 0; células B de la zona oscura y clara de los centros germinales (GC_DZ y GC_LZ), representadas por los clústeres 4 y 5, respectivamente; células B de respuesta a IFN, representadas por el clúster 3; células B naïve activadas (aNav), representadas por el clúster 1; células B de la zona marginal (MZB) y células B de memoria (MBC), representadas por el clúster 6; células plasmáticas (PC) y, por último, ABCs, representadas por el clúster 7 (**Figura 32**).

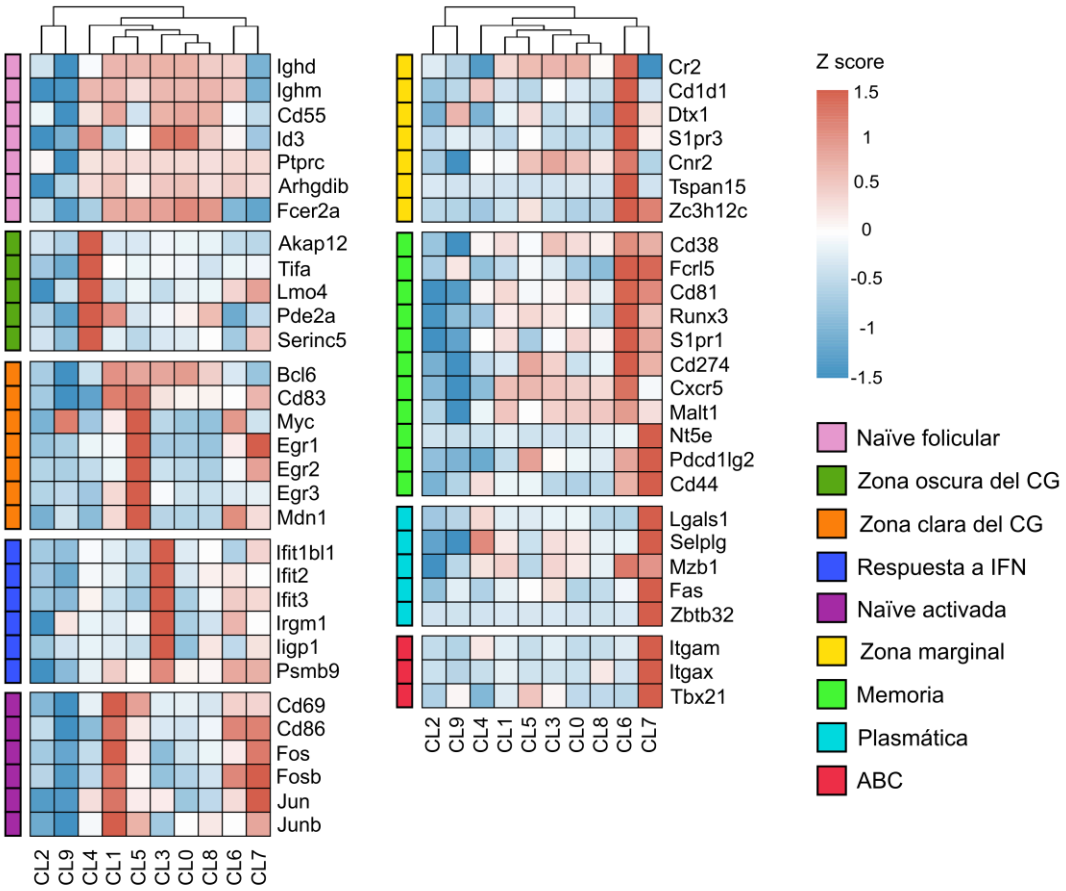

Figura 32. Expresión de los marcadores específicos de las diferentes subpoblaciones de células B en cada clúster. *Heatmap*, o mapa de calor, que muestra la expresión de genes específicos de cada subpoblación de células B comparando cada clúster con el resto de clústeres. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Después, quisimos representar gráficamente la proporción relativa de células en cada clúster para cada grupo de ratones (WT, T7 y T7.B1$^{-/-}$) (**Figura 33, A y B**).

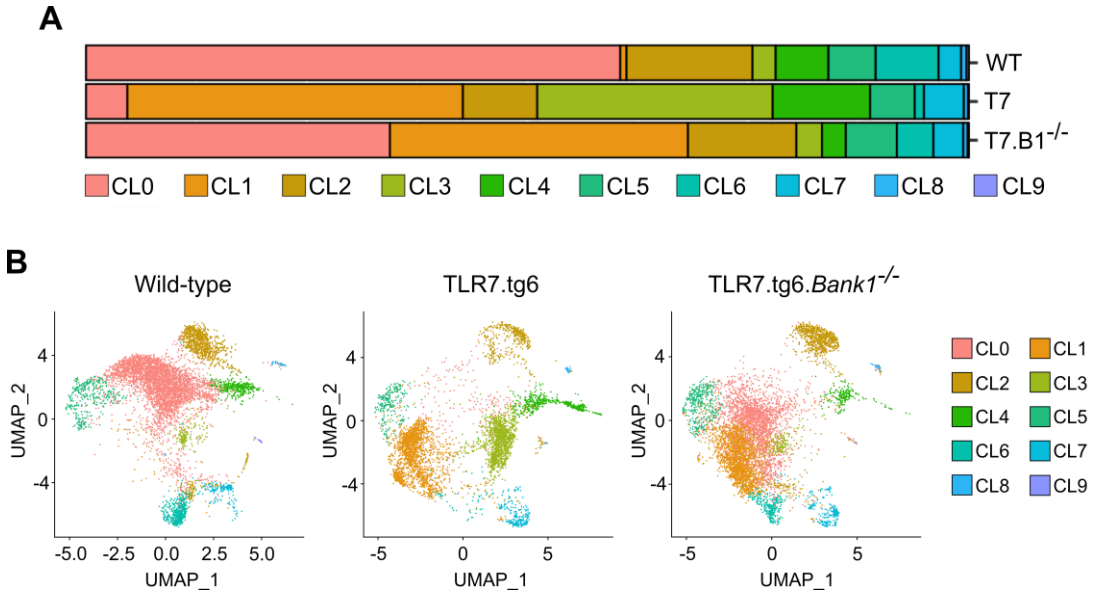

Figura 33. Comparativa de las proporciones de los diferentes clústeres de células B entre condiciones. (**A**) Proporción de células pertenecientes a cada clúster por cada grupo o condición (WT, T7 y T7.B1$^{-/-}$). Los colores representan los diferentes clústeres de células B. (**B**) UMAPs individuales de cada grupo o condición (WT, T7 y T7.B1$^{-/-}$).

Más adelante, se detallarán las características de cada clúster, y también por cada condición, comparando entre sí los ratones enfermos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$. Lo que podemos observar a simple vista en esta figura es que en el grupo TLR7.tg6, las células B naïve foliculares (CL0) desaparecieron completamente, probablemente debido a que dicha población transicionase a células B naïve activadas (CL1), o a células B de respuesta al IFN (CL3). Además, lo mismo ocurriría con el CL6, correspondiente con las células B de la zona marginal, o células B de memoria, el cual también estaría prácticamente ausente en este grupo de ratones. Sin embargo, dichos clústeres estarían mayormente representados en los grupos control y deficientes en *Bank1*.

Una vez obtenidos los clústeres de células B, se realizó una comparación por pares entre los tres grupos de las proporciones de caca clúster, para determinar la significancia estadística (**Figura 34**). Se observó que la distribución y proporción de cada clúster era diferente dependiendo del genotipo, indicando la existencia de modificaciones en estas poblaciones celulares debido al proceso de inflamación y autoinmunidad.

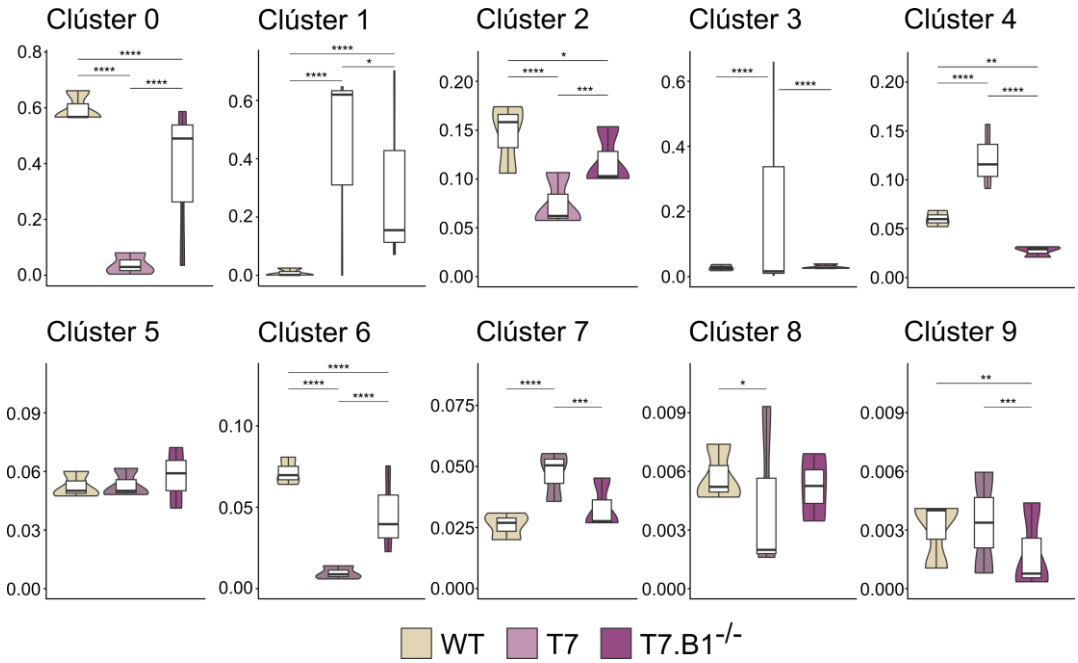

Figura 34. Proporción de los diferentes clústeres de células B entre los distintos fenotipos. *Box plot*, o gráfico de cajas, que muestra la cantidad de células de cada clúster entre las tres condiciones (WT, T7 y T7.B1$^{-/-}$).

Los resultados de este análisis mostraron la existencia de un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia de ciertos clústeres en los ratones T7 en comparación con los ratones sanos WT. Específicamente, los clústeres 1, 3, 4 y 7, que incluyen a las células naïve activadas, las células de respuesta a IFN, las células GC_DZ y las ABCs, respectivamente, mostraron un incremento significativo. Por el contrario, se observó una disminución en la frecuencia de los clústeres 0 y 2, en los bazos de los ratones T7 en comparación con los ratones sanos WT, que principalmente consisten en células B naïve foliculares (**Figura 34**).

Por otro lado, la ausencia de *Bank1* resultó en una restauración parcial de las proporciones de varios clústeres hacia el fenotipo observado en los ratones WT. Las diferencias entre los ratones T7.B1$^{-/-}$ y los WT fueron notablemente menores que las observadas entre los ratones T7 y los WT. Además, la proporción de células B naïve foliculares (CL0) aumentó en el grupo T7.B1$^{-/-}$ en comparación con el grupo T7. Por otro lado, los clústeres 1, 3, 4 y 7, que aparecían aumentados en los ratones T7, en comparación con los ratones WT, disminuyeron considerablemente en los ratones deficientes en *Bank1*. Finalmente, se observó un aumento en la proporción de células B del clúster 6, en los ratones WT y T7.B1$^{-/-}$, en comparación con los ratones T7 (**Figura 30**). Estas observaciones sugieren que la deficiencia de *Bank1*, en el contexto de la autoinmunidad, restablece parcialmente el fenotipo hacia el estado control o sano, ya que las proporciones de las diferentes subpoblaciones de B, en dichos ratones T7.B1$^{-/-}$, están en un punto intermedio entre los ratones WT y los enfermos T7.

3.2 El análisis del scRNA-Seq identifica a las ABCs como una población única y distinta de células B

Como se puede observar en la **Figura 32**, únicamente el clúster 7 (CL7) mostró características genéticas compatibles con las ABCs, ya que es el único con una elevada expresión de los marcadores específicos de estas células, los cuales son *Itgam* (que codifica para la integrina CD11b), *Itgax* (que codifica para la integrina CD11c) y *Tbx21* (que codifica para el factor de transcripción T-bet) (**Figura 32; Figura 35, A y B**). Además, en el CL7 se registró una disminución significativa en la expresión de los genes asociados con las células de la zona marginal, *Cr2* (que codifica para CD21), y con las células foliculares, *Fcer2a* (que codifica para CD23) (**Figura 32**). Estos hallazgos eran previsibles ya que las ABCs, en su definición, son doble negativas para ambos marcadores. Este clúster se encuentra significativamente enriquecido en el grupo de ratones T7 en comparación con los ratones WT. Además, se observó una reducción significativa en la proporción de estas células del CL7 en los ratones deficientes de *Bank1*, T7.B1$^{-/-}$ (**Figura 34**).

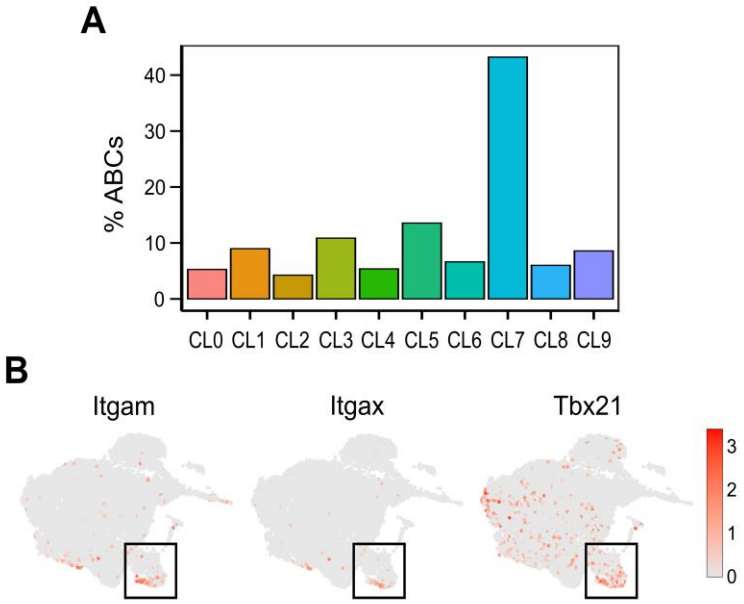

Figura 35. Las ABCs forman un clúster único diferenciado del resto de clústeres. (**A**) Bar plot, o gráfico de barras, mostrando el porcentaje de ABCs en cada clúster, teniendo en cuenta la expresión de *Itgam*, *Itgax* y *Tbx21*. (**B**) UMAPs individuales que muestran el nivel de expresión de los genes específicos de las ABCs: *Itgam*, *Itgax* y *Tbx21*.

Esta subpoblación exhibió un perfil único de expresión génica, claramente distinguible de otras subpoblaciones de células B. Además de los tres marcadores mencionados, empleados previamente para su caracterización mediante citometría de flujo, se identificaron otros genes sobreexpresados en las células del CL7, como *Ahnak*, *Itgb1*, *Zeb2*, *Sox5* y *Hck* (**Figura 36A**), los cuales han sido reconocidos como marcadores de ABCs en otros estudios recientes [309, 351-353]. Estos genes también han sido empleados para definir de un subtipo de células B de memoria conocido como células B de memoria atípica (atMBC, del inglés *atypical memory B cell*) [352, 354]. De la misma manera, las células del CL7 mostraron una sobreexpresión significativa, compartida con el CL6, de otro gen típicamente observado en las células atMBCs, el gen *Fcrl5* [355] (**Figura 36A**). Es importante señalar que se observó una sobreexpresión de varios genes asociados con el fenotipo de células B de memoria, tales como *Nt5e*, *Cd80* y *Cd44*, en el CL7 en comparación con el resto de los clústeres (**Figura 36B**). Estas observaciones, en conjunto, sugieren que las ABCs presentan un fenotipo similar al de

memoria, no obstante, diferente al de las células B de memoria clásicas (cMBC, del inglés *classical memory B cell*) [352, 356].

En las células de este clúster se observó una marcada tendencia hacia la inducción de respuestas inmunitarias específicas, particularmente en lo concerniente a la producción de anticuerpos. Esto se evidenció debido a la sobreexpresión de ciertos genes que tienen un papel clave en facilitar la activación de las células B y dirigir su diferenciación hacia un fenotipo de células plasmáticas, como lo son: *Fas*, *Zbtb32* y *Lgals1* (**Figura 36C**) [351, 352, 357]. En este contexto, se observó la sobreexpresión del gen *Ighg2c*, que codifica para la isoforma IgG2c, en el CL7 (**Figura 36C**), junto con otros genes de inmunoglobulinas IgG, como *Ighg1*, *Ighg2b* e *Ighg3*, que codifican para IgG1, IgG2b e IgG3, respectivamente. Todos estos genes mostraron una sobreexpresión específica en dicho clúster, en comparación con el resto de clústeres (**Figura 37**). Estas observaciones sugieren una activación específica y potenciada de los mecanismos de producción de anticuerpos en este clúster en comparación con el resto de clústeres.

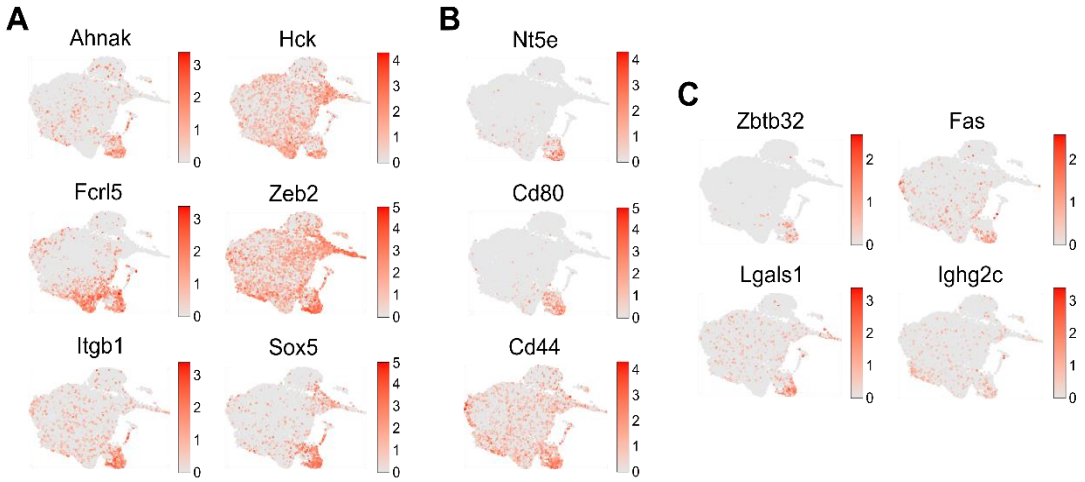

Figura 36. Selección de genes sobreexpresados en el clúster 7 (ABCs). UMAPs individuales que muestran el nivel de expresión de los genes específicos de: (**A**) células atMBCs (*Ahnak*, *Itgb1*, *Hck*, *Zeb2*, *Fcrl5* y *Sox5*); (**B**) células MBCs (*Nt5e*, *Cd80* y *Cd44*); (**C**) células plasmáticas (*Zbtb32*, *Fas*, *Lgals1* e *Ighg2c*).

Además, el CL7 exhibió una sobreexpresión destacada de genes específicos que codifican para integrinas, entre los que se incluyen *Itga4* (subunidad α de VLA-4), *Itgb1* (subunidad β de VLA-4) e *Itgb2* (LFA-1) (**Figura 37**). Estas integrinas desempeñan funciones esenciales en la adhesión y migración celular al interactuar con las moléculas VCAM-1 e ICAM-1. Estos ligandos están expresados en la zona marginal del bazo [358], indicando que las ABCs podrían permanecer retenidas en esta ubicación. Además, en este clúster se observó una alta expresión de *Cxcr4*, acompañada de una disminución en la expresión de *Cxcr5* y *Sell* (**Figura 33**), lo que implica una posible localización o destino final de estas células en las zonas extrafoliculares [359].

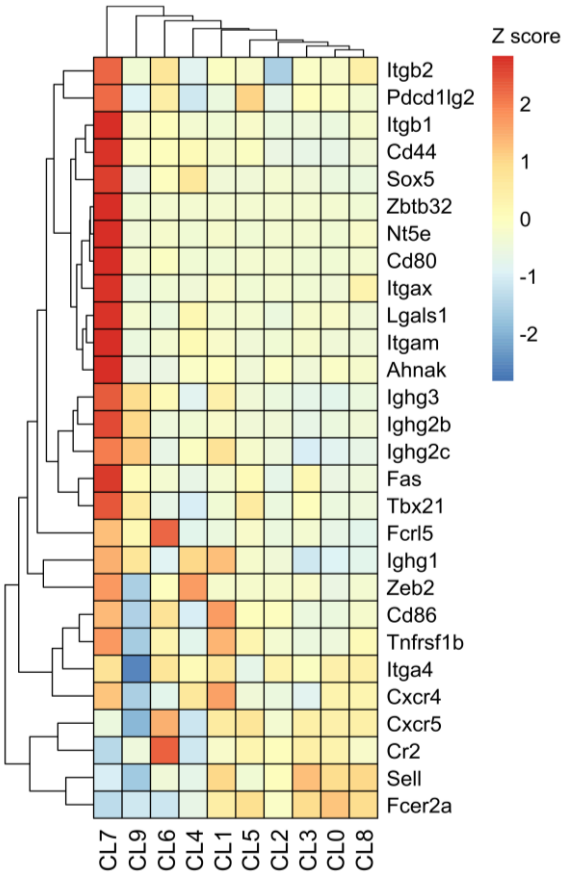

Figura 37. Perfil transcripcional del clúster 7 (ABCs). Heatmap, o mapa de calor, que muestra los genes seleccionados con diferencias significativas en la expresión, entre el CL7 y el resto de clústeres, con un cambio logarítmico en base 2 mayor a 1 (log2FC > 1), entre cada clúster. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Cabe destacar la expresión negativa del gen *Il21r*, que codifica para el receptor de la IL-21, así como de *Icosl*. Todos los genes de interés del CL7 se encuentran reflejados en la **Tabla 7**.

Clúster 7			
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Sox5	3,449	*Itgam*	0,607
Nt5e	2,438	*Ighg1*	0,603
Itgb1	2,063	*Ighg2c*	0,544
Ahnak	1,905	*Hck*	0,421
Cd44	1,890	*Itgax*	0,416
Cd80	1,856	*Itga4*	0,383
Ighg2b	1,848	*Itgb2*	0,348
Zeb2	1,789	*Cxcr4*	0,289
Lgals1	1,697	*Cxcr5*	-0,442
Fcrl5	1,621	*Il21r*	-0,626
Ighg3	1,399	*Icosl*	-0,666
Zbtb32	0,827	*Sell*	-1,408
Tbx21	0,707	*Fcer2a*	-1,856
Fas	0,704	*Cr2*	-2,247

Tabla 7. Expresión génica diferencial del clúster 7 vs el resto de clústeres. Selección de genes sobreexpresados en el CL7, comparado con el resto de clústeres, de manera significativa. Los genes en color azul están sobreexpresados y los genes en color rojo están infraexpresados dentro del CL7. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Dada la heterogeneidad observada en este clúster, y que los genes específicos de las ABCs (*Itgam*, *Itgax* y *Tbx21*) se encontraban sobreexpresados únicamente en la parte inferior del CL7, como se observa en la **Figura 35**, se llegó a pensar que este clúster podría estar formado por varios subgrupos de células diferentes, siendo las ABCs una de ellas, separadas de otras

poblaciones, como podrían ser las células B de memoria atípicas o plasmáticas. Por consiguiente, decidimos realizar una subclusterización del CL7, lo que nos permitió identificar 2 subclústeres diferentes, a los que denominados subCL7-0 y subCL7-1 (**Figura 38A**). El subCL7-0, resultó estar predominantemente compuesto por las ABCs, con la expresión de los marcadores clásicos asociados a dicha población (*Itgam*, *Itgax*, *Tbx21*) (**Figura 38B**).

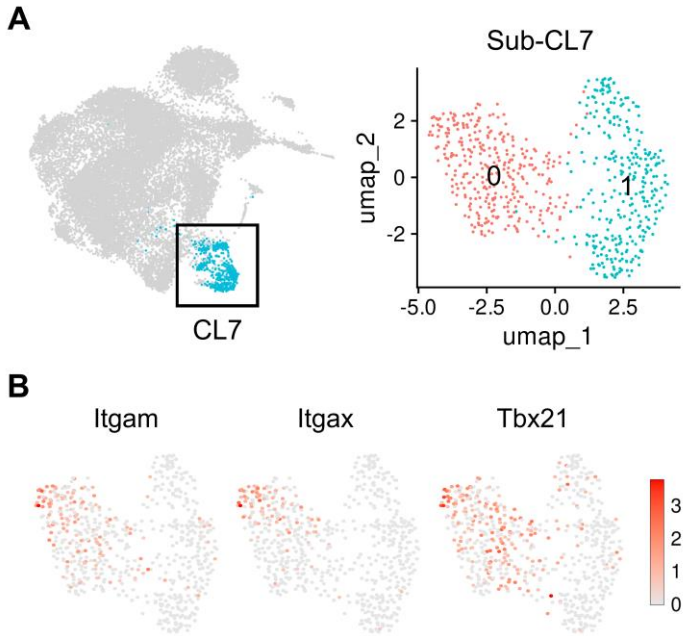

Figura 38. Subclusterización del CL7. (**A**) Visualización de UMAP que muestra dos subclústeres diferentes (subCL7-0 y subCL7-1) obtenidos a partir de la subclusterización del CL7. (**B**) UMAPs individuales que muestran los niveles de expresión de los genes específicos de las ABCs empleados mediante citometría de flujo en este proyecto (*Itgam*, *Itgax* y *Tbx21*). La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Este subclúster también exhibió un patrón de expresión génica similar al de las células B de memoria atípicas (*Zeb2*, *Itgb1*, *Hck*, *Ahnak* y *Sox5*) (**Figura 39A**). De la misma manera, se observó la presencia de los mismos marcadores de células B de memoria (*Nt5e*, *Cd44* y *Cd80*) (**Figura 39B**). Además, el subCL7-0 exhibió una elevada expresión de los genes característicos de las células plasmáticas (*Zbtb32*, *Cd86*, *Fas*, *Lgals1* e *Ighg2b*), y su localización dentro del área de las ABCs fue confirmada mediante visualizaciones adicionales de UMAP (**Figura 39C**).

El gen *Ighg2c* se detectó de manera muy tenue, aunque se observaron células positivas en dicha área. Cabe destacar la expresión elevada del gen Cxcr4, el cual también se encontró colocalizada dentro del mismo área (**Figura 39D**). Todos los genes mencionados y de interés se encuentran reflejados en la **Tabla 7**.

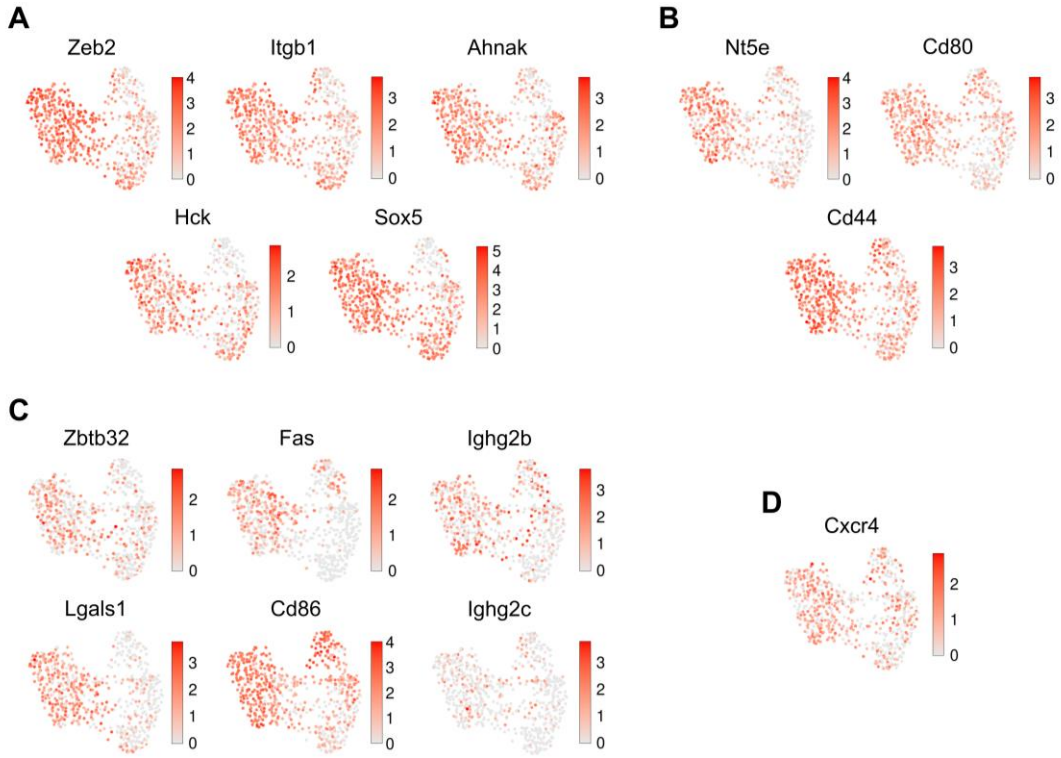

Figura 39. Niveles de expresión génica dentro de los subclústeres del CL7. UMAPs individuales que muestran los niveles de expresión de los genes: (**A**) específicos de las células de memoria atípica (*Zeb2*, *Itgb1*, *Hck*, *Ahnak* y *Sox5*); (**B**) específicos de las células de memoria (*Nt5e*, *Cd44* y *Cd80*); (**C**) específicos de las células plasmáticas (*Zbtb32*, *Cd86*, *Fas*, *Lgals1*, *Ighg2b* e *Ighg2c*); (**D**) y específico de las células extrafoliculares (*Cxcr4*). La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Por otro lado, las células del subCL7-1 presentaron un perfil de expresión bastante heterogéneo, el cual incluye marcadores indicativos o sugerentes de células B naïve (*Sell* y *Id3*), de células B naïve activadas (*Mpp6*), de células B de pre-memoria y memoria (*Ccr6* y *Cotl1*), así como marcadores asociados tanto con las ABCs (*Hopx*) como con las células plasmáticas (*Cd180*). Además, se observó la presencia de marcadores asociados tanto con

respuestas proinflamatorias (*S100a6* y *Drd3*) como antiinflamatorias (*Sh3bp5*) en este subgrupo (**Tabla 8**). El número de células identificadas en estos subclústeres fue muy limitado, por lo que no fue posible realizar una comparativa adicional de estas poblaciones entre los distintos fenotipos.

Sobreexpresado en el SubCL7-0	
Gen	**Media_log2FC**
Itgax	5,300
Itgam	3,965
Lgals1	2,638
Nt5e	2,446
Tbx21	2,297
Fas	2,241
Zeb2	2,205
Itgb1	1,546
Sox5	1,467
Cd44	1,463
Ahnak	1,367
Cd80	1,200
Zbtb32	1,037
Cd86	0,803
Ighg2b	0,227

Sobreexpresado en el SubCL7-1	
Gen	**Media_log2FC**
Drd3	5,884
Hopx	4,142
S100a6	3,323
Id3	3,102
Sell	1,870
Ccr6	1,835
Sh3bp5	1,486
Mpp6	1,444
Cotl1	1,152
C180	0,597

Tabla 8. Expresión génica diferencial del subclúster 7-0 vs el subclúster 7-1. Selección de genes sobreexpresados en el subCL7-0, comparado con el subCL7-1, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Estos resultados, en conjunto, sugieren que el CL7 está compuesto en su mayoría por las ABCs, las cuales constituyen una población única y homogénea de células B, que se

diferencian del resto de subpoblaciones celulares, lo que sugiere un papel especializado en la respuesta inmune. Estas células se caracterizan por presentar un perfil transcriptómico y un fenotipo distintivo. Las ABCs del subCL7-0 podrían representar un estadio de desarrollo final, con características de células de memoria atípica y de células plasmáticas, mientras que las células del subCL7-1 podrían comprender una variedad de ABCs transicionales, o pre-ABCs, en etapas aún por definir. Cabe destacar su perfil de expresión génica, el cual nos indica que las ABCs podrían desempeñar un papel crucial en las respuestas mediadas por inmunoglobulinas de clase IgG. Por esto último, la expresión génica apoya aún más la noción de que las ABCs podrían representar un estado transicional de las células de memoria atípica en camino hacia convertirse en células plasmáticas completamente diferenciadas, cuya función se ejercería en las zonas extrafoliculares. Estos últimos resultados corroboran nuestras observaciones iniciales que respaldan al CL7 como un grupo completo y definido de células, a las que definimos como ABCs, y en el cual nos enfocaremos para la realización de los siguientes análisis e interpretaciones.

3.3 La ausencia de *Bank1* modifica el perfil transcripcional de las ABCs

A continuación, se llevó a cabo una comparación exhaustiva de los transcriptomas de las células del CL7 entre los tres fenotipos (WT, T7 y T7.B1$^{-/-}$), mediante un análisis de expresión génica diferencial (DEG) con el fin de identificar patrones de expresión que difiriesen del resto de clústeres y entre los tres grupos de ratones. De esta manera, se encontró que había un conjunto significativo de genes cuya expresión variaba entre estos tres grupos (**Figura 40**).

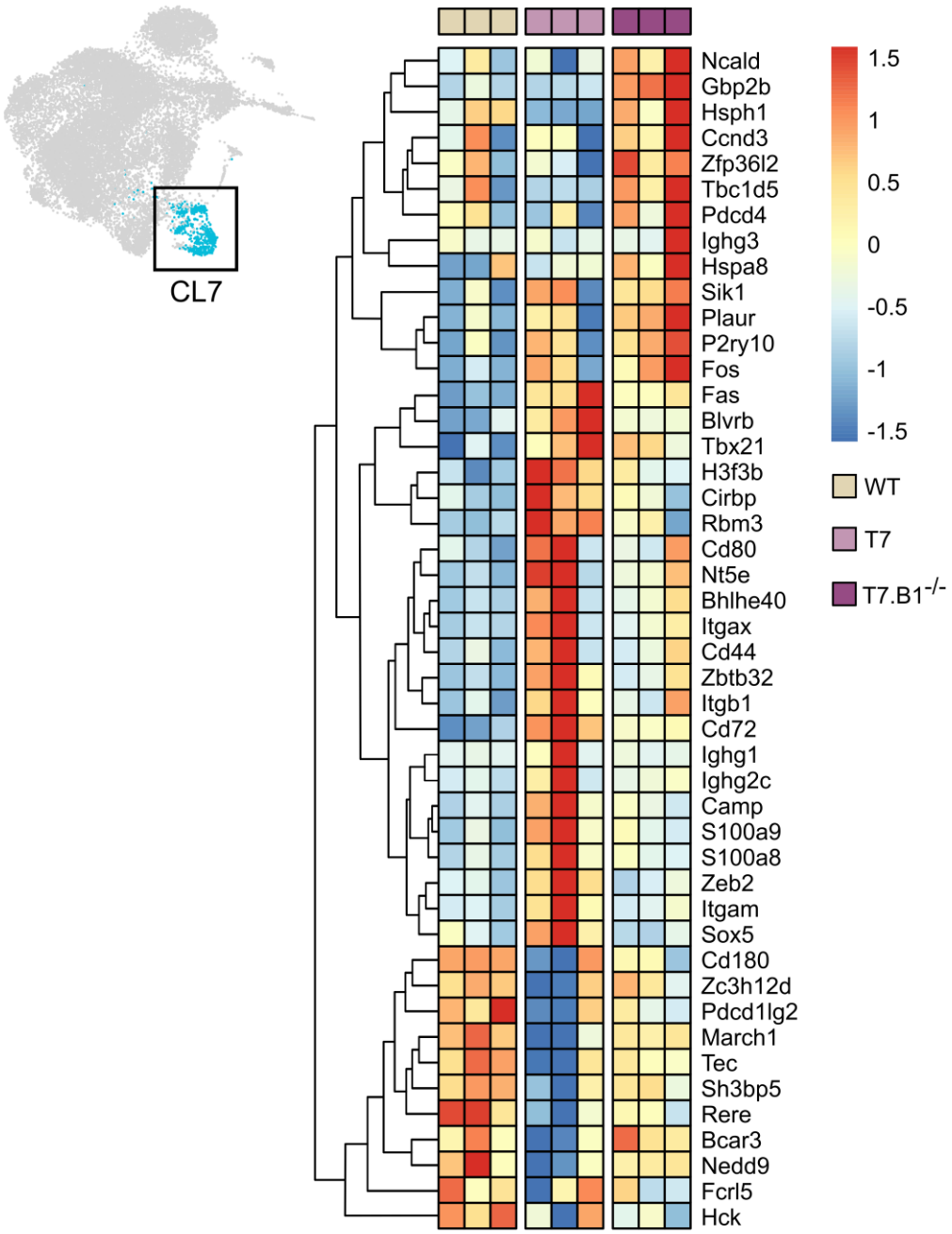

Figura 40. Expresión génica diferencial (DEG) entre condiciones dentro del clúster 7. Heatmap, o mapa de calor, que muestra los genes seleccionados con diferencias significativas en la expresión, dentro del CL7, entre los tres grupos de ratones (WT, T7 y T7.B1$^{-/-}$), con un cambio logarítmico en base 2 mayor a 1 (log2FC > 1), entre cada grupo. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

En el grupo enfermo T7, se observó la sobreexpresión de la mayoría de los genes previamente mencionados como marcadores relacionados con las ABCs, ya sean los clásicos, como los ligados al fenotipo de células B de memoria atípica y plasmáticas (*Itgam*, *Itgax*, *Tbx21*, *Zeb2*, *Itgb1*, *Sox5*, *Cd44*, *Nt5e*, *Zbtb32* y *Fas*). Estas células del CL7 de los ratones T7 también exhibieron una expresión notablemente elevada de genes asociados con las respuestas proinflamatorias, como *S100a8*, *S100a9*, *Cirbp* y *Rbm3*, además de mostrar una sobreexpresión de los genes de las inmunoglobulinas IgG1 (*Ighg1*) e IgG2c (*Ighg2c*). Por otro lado, las células del CL7 de los ratones T7.B1$^{-/-}$ mostraron una expresión incrementada de genes relacionados con las respuestas antiinflamatorias, como *Sik1*, *Pdcd4*, *P2ry10*, *Zc3h12d*, *Zfp36l2* y *March1*, junto con un cambio en los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas hacia el isotipo IgG3 (*Ighg3*) (**Figura 40**). También es interesante destacar que varios genes cuya expresión está mediada por el interferón, se encontraron notablemente sobreexpresados en las células del CL7 del grupo T7 en comparación con las del grupo T7.B1$^{-/-}$, como *H3f3b* y *Camp*. Por otro lado, las células del grupo deficiente de *Bank1* mostraron un aumento en la expresión de genes relacionados con el control del transporte de proteínas y la represión transcripcional, como *Rere*, *Sh3bp5* y *Tbc1d5* (**Figura 40**). Estos hallazgos sugieren que la presencia o ausencia de *Bank1* tiene un impacto significativo en el fenotipo de las ABCs, siendo proinflamatorio en los ratones enfermos, y volviéndose antiinflamatorio en los ratones deficientes de *Bank1*.

Para profundizar en las características funcionales de estas células, se realizaron análisis de enriquecimiento de ontología génica (GO, del inglés *gene ontology enrichment analysis)*. Se observó que la mayoría de los genes presentes en el grupo de los ratones enfermos T7 estaban asociados positivamente con procesos inmunes mediados por inmunoglobulinas y respuestas inflamatorias crónicas, además de estar vinculados principalmente con la regulación positiva de la activación de células T y con el proceso de migración hacía los sitios de inflamación (**Figura 41**). Por otro lado, los genes presentes en el grupo deficiente de *Bank1* mostraron un enriquecimiento en procesos relacionados con la respuesta inmune, específicamente en la inhibición de diversas vías de señalización, como las vías p38 MAPK y

la vía c-Jun N-terminal quinasa (JNK), las cuales están asociadas con la activación del sistema inmunitario y pueden estar implicadas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (**Figura 41**).

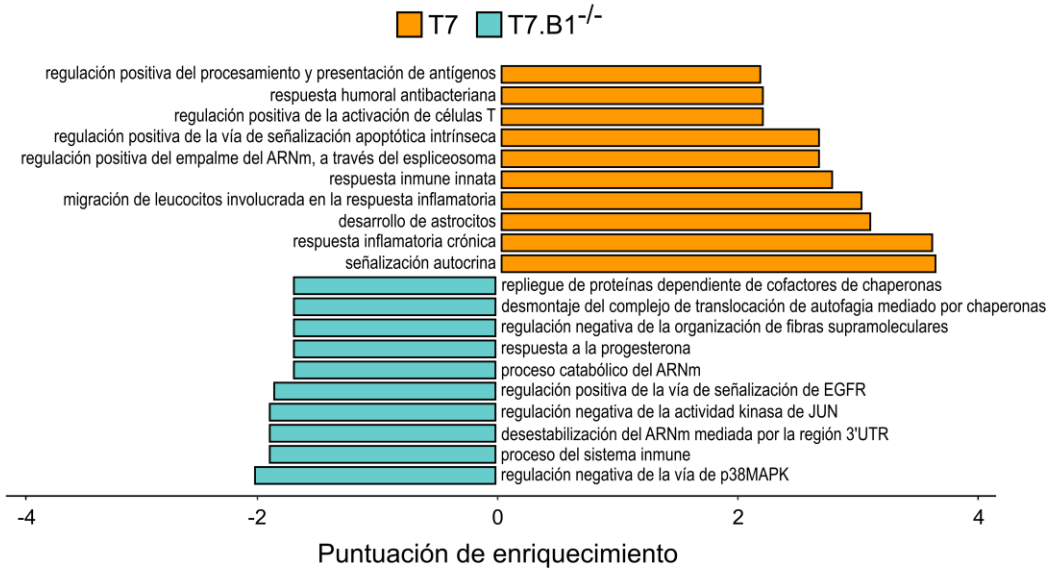

Figura 41. Análisis de enriquecimiento de ontología génica del clúster 7. Representación del top 10 de los procesos biológicos más enriquecidos de manera significativa en el grupo T7 (barras naranjas), y en el grupo T7.B1$^{-/-}$ (barras azules), dentro del CL7.

En conclusión, estos resultados respaldan la noción de que las ABCs que carecen de *Bank1* presentan un perfil transcripcional distintivo, caracterizado por una reducción en las características de las respuestas proinflamatorias, comparado con las ABCs de los ratones TLR7.tg6, las cuales además están enriquecidas en procesos biológicos involucrados en la producción de inmunoglobulinas. Todo ello ofrece nuevas perspectivas sobre el papel de *Bank1* en la regulación de la respuesta inmune.

3.4 Los ratones TLR7.tg6 presentan un clúster de células B con genes estimulados por IFN, significativamente modificado por *Bank1*

Con el propósito de investigar en profundidad cómo la ausencia de *Bank1* afecta al resto de clústeres, se llevó a cabo el mismo análisis de expresión génica diferencial (DEG), comparando entre clústeres y entre condiciones, en dichos clústeres. Primero se identificaron los 10 genes con mayor diferencia de expresión (top 10) al comparar cada clúster con el conjunto de los demás clústeres, y al comparar entre grupos dentro de cada clúster. Este enfoque nos permitió examinar de manera detallada las características únicas de cada clúster, los cambios en la expresión génica que se producen en respuesta a la falta de *Bank1* y su impacto en la diversidad de las distintas subpoblaciones de células B.

Las mayores diferencias en cuanto a la frecuencia de los clústeres entre condiciones se encontraron en los clústeres 3 y 4, en los cuales su proporción aumentó de manera considerable en los ratones T7 comparado con los ratones deficientes de *Bank1* (**Figura 34**). Es por ello que comenzamos con estos dos clústeres describiendo sus características.

En comparación con el grupo T7.B1$^{-/-}$, se observó una mayor prevalencia del CL4 en el grupo T7 (**Figura 34**). Este clúster está compuesto por células relacionadas con la zona oscura de los centros germinales (GC_DZ), dado su perfil de expresión elevada de genes como *Akap12*, *Tifa*, *Lmo4*, *Neil1*, *Pde2a*, *Serinc5*, *Cdkn2d*, *Lig4, Tcf3*, *Pou2af1* y *Cd24a*. Este clúster también está caracterizado por la expresión de *Vpreb3*, el cual está involucrado en la maduración de las células B y que, por lo tanto, se encuentra expresado en las células B maduras (**Figura 42**; **Tabla 9**).

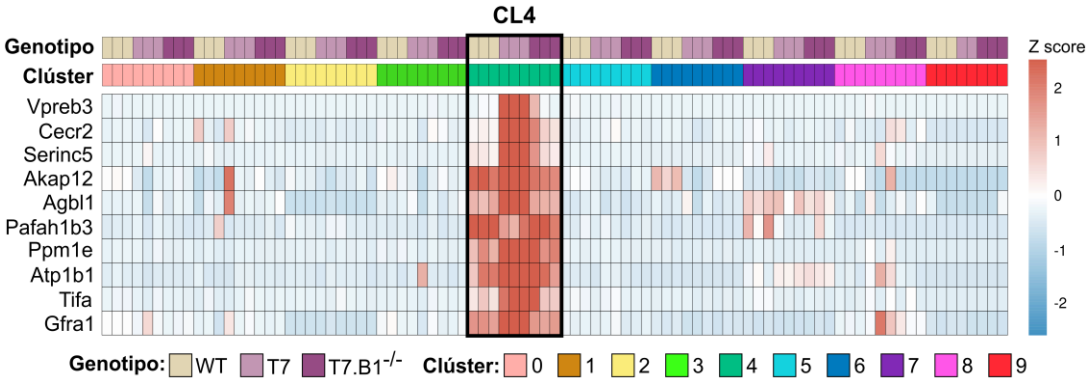

Figura 42. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 4 vs el resto de clústeres. Mapa de calor, o heatmap, de los 10 genes con la expresión diferencial más elevada, comparando el CL4 frente al resto de clústeres. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Clúster 4			
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Akap12	2,604	*Lmo4*	0,861
Vpreb3	2,469	*Pde2a*	0,598
Serinc5	2,412	*Pou2af1*	0,520
Tifa	1,873	*Neil1*	0,397
Cd24a	1,447	*Cdkn2d*	0,335
Tcf3	0,957	*Lig4*	0,288

Tabla 9. Expresión génica diferencial del clúster 4. Selección de genes sobreexpresados en el CL4, comparado con el resto de clústeres, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

En los ratones T7, el CL4 exhibió una marcada sobreexpresión de genes implicados en la respuesta humoral y la producción de inmunoglobulinas, tales como *Ighg1* y un marcador de superficie celular específico de las células plasmáticas, *Slamf7*, así como genes asociados a la respuesta inflamatoria, como *Iigp1*, *Irf4*, *S100a8* y *S100a9*. Este grupo también tendría un papel clave en la regulación del ciclo celular, por la expresión de *Pafah1b3*. Por el contrario, las células del CL4 en los ratones T7.B1$^{-/-}$ mostraron una alta expresión de *Swap70*, la cual se descubrió que limitaba la generación de las ABCs en respuesta a la IL-21 [306].

Además, este clúster presentó una elevada expresión de transcritos asociados con un papel tanto antiinflamatorio (*Btla*, *Zfp36l2* y *Pdcd4*) como proinflamatorio (*Dennd4a*), y de genes encontrados en células inmaduras o transicionales (*Ighd* y *Tnfrsf13c*) (**Tabla 10**). En consecuencia, podemos inferir que el CL4 representa una subpoblación específica de células B localizadas dentro de la zona oscura de los centros germinales, caracterizadas por sus capacidades proliferativas y proinflamatorias, las cuales se ven disminuidas en los ratones deficientes de *Bank1*.

Sobreexpresado en el CL4 del T7		**Sobreexpresado en el CL4 del T7.B1$^{-/-}$**	
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Ighg1	1,283	*Zfp36l2*	-0,709
Iigp1	1,235	*Btla*	-0,705
Pafah1b3	1,078	*Pdcd4*	-0,561
S100a8	0,889	*Tnfrsf13c*	-0,419
S100a9	0,842	*Dennd4a*	-0,329
Irf4	0,649	*Ighd*	-0,299
Slamf7	0,647	*Swap70*	-0,272

Tabla 10. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 4. Comparativa de la selección de genes sobreexpresados diferencialmente en los ratones T7 y T7.B1$^{-/-}$ del CL4, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

El CL3 destacó por presentar la variación más notable en la expresión génica, observándose un marcado enriquecimiento en el grupo T7 en comparación con el grupo T7.B1$^{-/-}$ (**Figura 30**). Este clúster está conformado por células B enriquecidas en genes estimulados por IFN (ISGs, del inglés *interferon stimulated genes*) o asociados a la respuesta del IFN, entre los cuales, varios están presentes entre el top 10 de los DEGs entre clústeres, tales como *Ifi206*, *Irgm1*, *Iigp1*, *Stat1*, *Psmb9*. Además, se identificaron otros ISGs exclusivos del CL3, incluyendo *Irf7*, *Ifit1bl1*, *Ifi47*, *Ifit2* e *Ifit3* (**Figura 43**; **Tabla 11**).

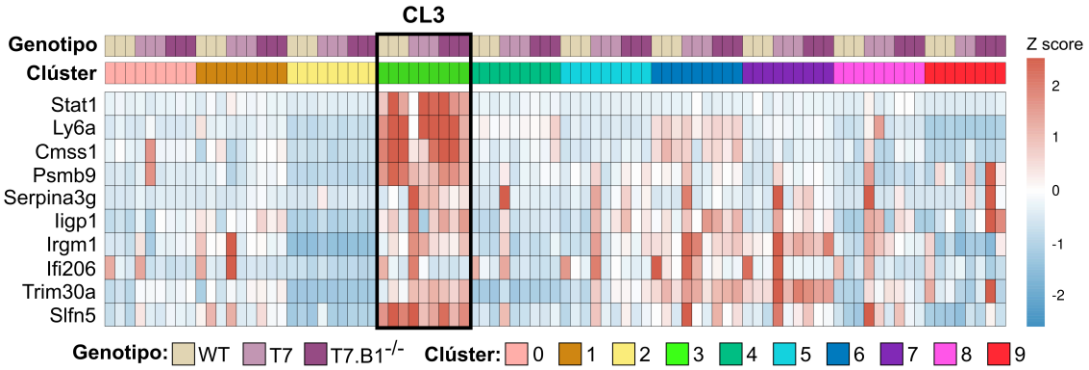

Figura 43. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 3 vs el resto de clústeres. Mapa de calor, o heatmap, de los 10 genes con la expresión diferencial más elevada, comparando el CL3 frente al resto de clústeres. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Clúster 3			
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Iigp1	1,822	*Ifi47*	0,891
Stat1	1,479	*Ifit3*	0,824
Irgm1	0,987	*Ifit2*	0,557
Psmb9	0,976	*Irf7*	0,497
Ifi206	0,898	*Ifit1bl1*	0,477

Tabla 11. Expresión génica diferencial del clúster 3. Selección de genes sobreexpresados en el CL3, comparado con el resto de clústeres, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Las células del CL3, en los ratones enfermos T7, mostraron una marcada expresión de genes con una firma de interferón y asociados con la respuesta proinflamatoria, debido a la sobreexpresión elevada de *Ifgga4*, *Ffar2*, *Iigp1c*, *Iigp1* y *Cdk8*. Asimismo, se observaron genes involucrados en la regulación positiva de la producción de citoquinas y la respuesta humoral mediada por la producción de inmunoglobulinas, así como genes con un papel en la presentación de antígenos, como *Sash3*, *Ptpn6*, *Tnf*, *Slamf1*, *Pycard* y *Cd48*. Por otro lado, en los ratones deficientes de *Bank1*, destaca el gen *Cytip* (o *Cybr*), el cual se ha observado que tiene la capacidad de inhibir la expresión de T-bet e IFN-γ mediante la inhibición de p38

[360]. Además, varios genes en este grupo poseen una función antiinflamatoria descrita y pueden bloquear la vía proinflamatoria de NF-kB, incluyendo *Tsc22d3*, *Rnf213*, *P2ry10*, *Zfp36l2*, *Il10ra* y *Trim30a*. Sin embargo, también se identificaron genes cuya expresión se incrementa tras la activación del receptor BCR y/o CD40, como *Junb*, así como genes inducidos por la activación del IFN, como *Dennd4a*, *Ccnd3* e *Ifi213* (**Tabla 12**).

Sobreexpresado en el CL3 del T7		**Sobreexpresado en el CL3 del T7.B1$^{-/-}$**	
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Iigp1	1,252	*Junb*	-2,116
Iigp1c	0,778	*Tsc22d3*	-1,572
Ffar2	0,757	*Rnf213*	-1,489
Cdk8	0,630	*Trim30a*	-1,411
Slamf1	0,499	*Dennd4a*	-1,364
Ifgga4	0,487	*Cytip*	-1,350
Ptpn6	0,349	*P2ry10*	-1,241
Pycard	0,328	*Zfp36l2*	-1,240
Cd48	0,328	*Ifi213*	-1,175
Sash3	0,310	*Ccnd3*	-1,172
Tnf	0,306	*Il10ra*	-0,417

Tabla 12. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 3. Comparativa de la selección de genes sobreexpresados diferencialmente en los ratones T7 y T7.B1$^{-/-}$ del CL3, de manera significativa. Se muestra promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

En resumen, estos hallazgos sugieren que el CL3 engloba una subpoblación única de células B que expresan ISGs, y cuya abundancia se reduce claramente en ausencia de *Bank1*. Sin embargo, a diferencia del clúster de las ABCs (CL7), la deficiencia de *Bank1* no impactó necesariamente en la expresión de ciertos ISGs.

3.5 Las ABCs surgen de un clúster cuyo fenotipo es de células B de la zona marginal y de memoria

Para completar una comprensión exhaustiva de la vía asociada con la transición hacia las ABCs del CL7, se llevó a cabo un análisis de trayectoria (**Figura 44**). Este análisis tiene como objetivo estudiar la diferenciación celular o el desarrollo de los diferentes tipos celulares. Las trayectorias resultantes se basan en los cambios que se producen en la expresión génica y, posteriormente, las células se organizan a lo largo de dichas trayectorias para obtener lo que se conoce como pseudotiempos [361].

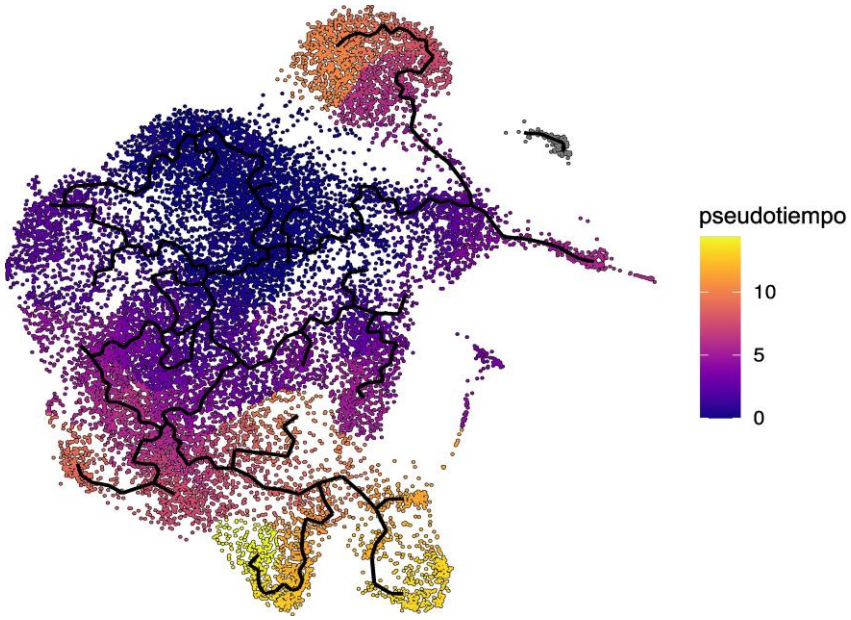

Figura 44. Trayectoria de la diferenciación hacía las ABCs del CL7. Visualización de UMAP de los clústeres dispuestos a lo largo de trayectorias, coloreados en base al pseudotiempo inferido. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Para esta interpretación del análisis, decidimos excluir los clústeres 2, 8 y 9 por encontrarse claramente desconectados y alejados del resto de clústeres. Este análisis permitió identificar una transición gradual desde las células B naïve foliculares (CL0) hacia el resto de los clústeres, siendo el elemento raíz prestablecido para dos trayectorias de desarrollo distintas. Una de estas vías sugiere que las células B de respuesta al IFN (CL3) derivan directamente

del CL0. Por otro lado, la otra vía pasaría por las células B naïve activadas (CL1), las células B de la zona marginal y de memoria (CL6) y, en última instancia, las ABCs (CL7). Estas ABCs podrían tener una vía alternativa de diferenciación, pasando por los centros germinales (CL4 y CL5), aunque varios estudios sugieren el origen extrafolicular de dichas células [311, 362]. Nuestra interpretación de las trayectorias de diferenciación se encuentra esquematizada en la **Figura 45**, con la finalidad de representar de manera clara y detallada los eventos de transición observados a lo largo del proceso de diferenciación celular hacia las ABCs del CL7.

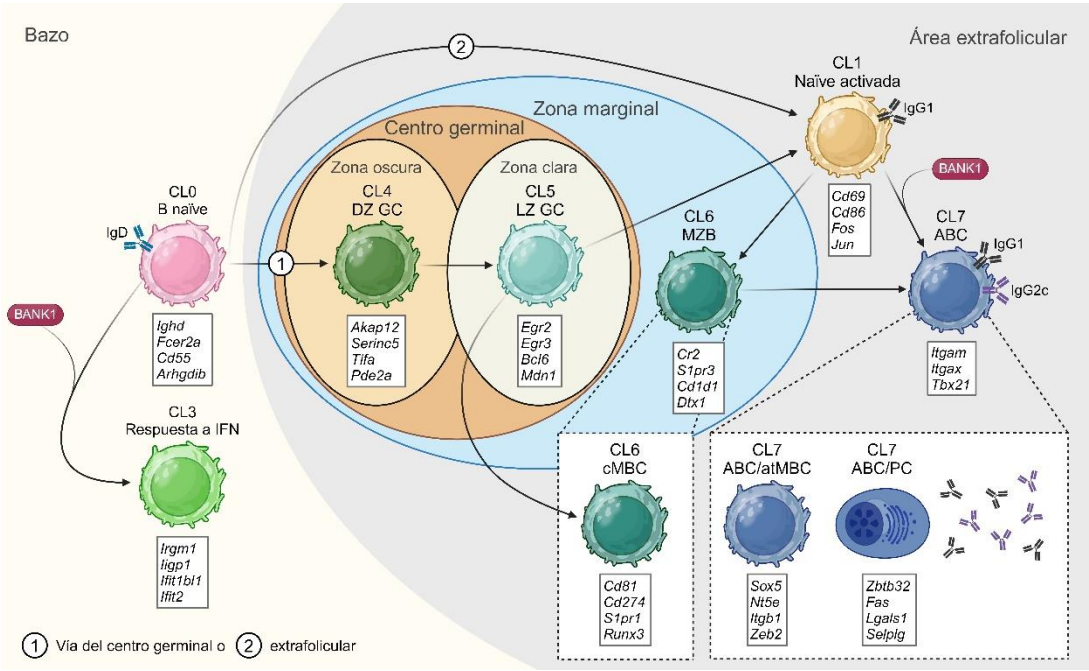

Figura 45. Esquema de las etapas de desarrollo de las células B. Ilustración de las diferentes etapas del desarrollo de las diferentes subpoblaciones de células B que conducen a la formación de las ABCs del CL7, dentro del bazo, en base al análisis de trayectorias previo. Las flechas indican los pasos de diferenciación. Los círculos granates etiquetados como "BANK1" indican el papel que ejerce *Bank1* en dicho paso de diferenciación o, lo que es lo mismo, donde la frecuencia de la siguiente subpoblación celular se ve disminuida debido a la deficiencia de *Bank1*. Los números denotan dos posibles vías de diferenciación: la de los centros germinales (1), o la de las vías extrafoliculares (2). Cada célula tiene debajo un cuadro que enumera algunos de los genes más específicos y regulados al alza dentro de cada subpoblación. Abreviaturas: DZ GC, célula B de la zona oscura del centro germinal; LZ GC, célula B de la zona clara del centro germinal; MZ, célula B de la zona marginal; cMBC, célula B de memoria clásica; atMBC, célula B de memoria atípica; PC, célula plasmática. Imagen creada en *BioRender*.

Para determinar y comprender las características de los clústeres pertenecientes a la ruta de diferenciación de las ABCs, empezamos con la descripción de las células que conforman el CL0, las cuales, junto con las células del CL2, demostraron tener una presencia más alta, de manera significativa, en ratones sanos WT y en los enfermos deficientes de *Bank1*, T7.B1$^{-/-}$, en comparación con los ratones enfermos T7 (**Figura 34**). El análisis del top 10 de los DEGs reveló que las células del CL0 exhibieron una marcada expresión de *Ighd* (IgD), característico de las células B naïve maduras, y de *Fcer2a* (CD23), el gen por excelencia de las células B foliculares, así como una elevada expresión de *Arhgdib* y *Cd55*. Además, se observó una sobreexpresión de genes esenciales para la supervivencia celular y con propiedades antiinflamatorias, tales como *Emp3*, *Id3*, *Gimap1* y *Sh3bgrl3* (**Figura 46**; **Tabla 13**). Por lo tanto, el CL0 estaría representando a las células B naïve foliculares.

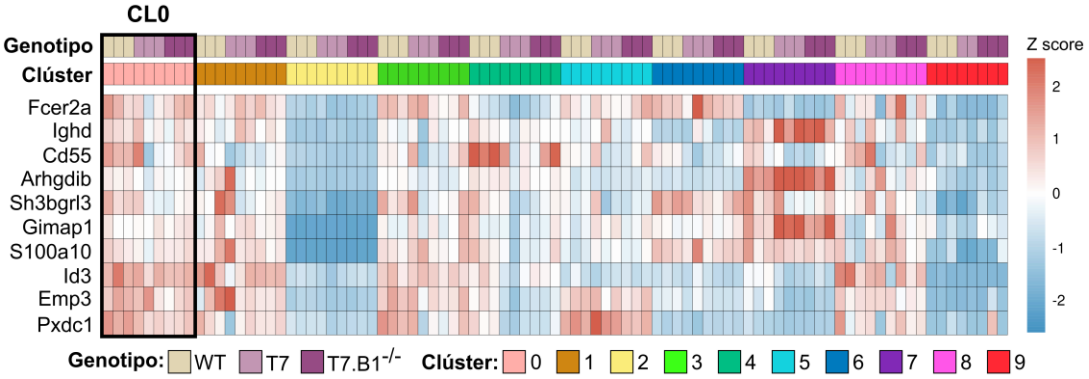

Figura 46. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 0 vs el resto de clústeres. Mapa de calor, o heatmap, de los 10 genes con la expresión diferencial más elevada, comparando el CL0 frente al resto de clústeres. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Clúster 0			
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Fcer2a	0,639	*Gimap1*	0,478
Ighd	0,613	*Emp3*	0,475
Id3	0,591	*Arhgdib*	0,459
Cd55	0,532	*Sh3bgrl3*	0,454

Tabla 13. Expresión génica diferencial del clúster 0 vs el resto de clústeres. Selección de genes sobreexpresados en el CL0, comparado con el resto de clústeres, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

En el grupo enfermo T7, las células del CL0 exhibieron un perfil más proinflamatorio (*Stat1*, *Psmb9*, *S100a9* y *H2-Q7*), probablemente debido a su predisposición a activarse rápidamente y comenzar los procesos de diferenciación celular. Por otro lado, las células del CL0 en los ratones T7.B1$^{-/-}$, presentaron una sobreexpresión de ciertos genes involucrados en las respuestas antiinflamatorias, como lo son *Sik1*, *Tsc22d3*, *Zfp36l2* y *P2ry10* (**Tabla 14**).

Sobreexpresado en el CL0 del T7		Sobreexpresado en el CL0 del T7.B1$^{-/-}$	
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Stat1	0.468	*Sik1*	-0.973
H2-Q7	0.444	*Tsc22d3*	-0.903
S100a9	0.378	*Zfp36l2*	-0.808
Psmb9	0.355	*P2ry10*	-0.789

Tabla 14. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 0. Comparativa de la selección de genes sobreexpresados diferencialmente en los ratones T7 y T7.B1$^{-/-}$ del CL0, de manera significativa. Se muestra promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Por otro lado, los genes que aparecen en el top 10 del CL2, aun siendo genes expresados en ese clúster, su nivel de expresión es inferior cuando se compara con el resto de clústeres,

indicativo de un conjunto de células que no muestran unas características únicas. De todas maneras, procedimos a la caracterización y descripción de dicho clúster. El CL2 está formado por un grupo heterogéneo de células, con la expresión de varios genes implicados en el desarrollo, el crecimiento y la supervivencia celular en las etapas tempranas de las células B (*Bcl2*, *Runx1*, *Pax5*, *Ccnd3* y *Bcl11a*). Además, se observó la expresión de genes asociados con la migración y la adhesión celular, (*Nedd9* y *Elmo1*), genes involucrados en los estadios previos a la formación de los centros germinales (*Dyrk1a* y *Lpp*), así como genes relacionados con la inmunosupresión (*Btla*, *Dgkd*) y la respuesta antiinflamatoria (*March1*) (**Tabla 15**).

Clúster 2			
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Lpp	0,780	*Nedd9*	0,595
Bcl11a	0,730	*Ccnd3*	0,577
Elmo1	0,683	*Dgkd*	0,554
Dyrk1a	0,683	*Runx1*	0,535
Bcl2	0,655	*Btla*	0,451
March1	0,618	*Pax5*	0,426

Tabla 15. Expresión génica diferencial del clúster 2 vs el resto de clústeres. Selección de genes sobreexpresados en el CL2, comparado con el resto de clústeres, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Sin embargo, dada la heterogeneidad de este conjunto y su mínima expresión diferencial en comparación con los demás grupos, concluimos que asignarle un sentido biológico a este clúster no sería factible ni del todo veraz. Además, basándonos en un análisis de trayectoria realizado en otro estudio de scRNA-Seq en ratones [337], decidimos excluir el CL2 de nuestra interpretación, ya que se encontraba desconectado de los demás clústeres, al igual que los clústeres 8 y 9. En resumen, estos hallazgos nos sugirieron que la deficiencia de *Bank1* normalizaba la presencia de células B, tanto naïve foliculares, como otras en una etapa de maduración temprana, ambas prácticamente ausentes en los ratones con lupus.

En cuanto al CL5, la distribución de su frecuencia fue similar tanto en los ratones T7, como en los controles WT y los deficientes de *Bank1*, T7.B1$^{-/-}$ (**Figura 34**). Las células B en este clúster exhibieron una sobreexpresión de genes implicados en las reacciones del centro germinal, particularmente vinculados a la zona clara, como *Cd83*, *Egr1*, *Egr2*, *Egr3* y *Mdn1*, asó como genes relacionados con la activación y diferenciación celular, como *Bcl2a1b*, *Myc* y *Mif*. Además, se observó una activación en la proliferación mediada por los receptores BCR, con genes como *Ccnd2* y *Marcksl1* (**Figura 47**; **Tabla 16**). En definitiva, este clúster está implicado en la regulación de la formación y función de los centros germinales, en el contexto de la inmunidad adaptativa. También hay que destacar que el CL5 demostró tener una expresión genética más elevada del factor de transcripción *Bcl6*, en comparación con los clústeres CL6 y CL7 (**Figura 32**). Esta observación es particularmente interesante, ya que el gen *Bcl6* desempeña un papel crucial en la formación de los centros germinales, lo que nos dio una primera idea de que los clústeres CL6 y CL7 podrían encontrarse fuera de dichos centros germinales.

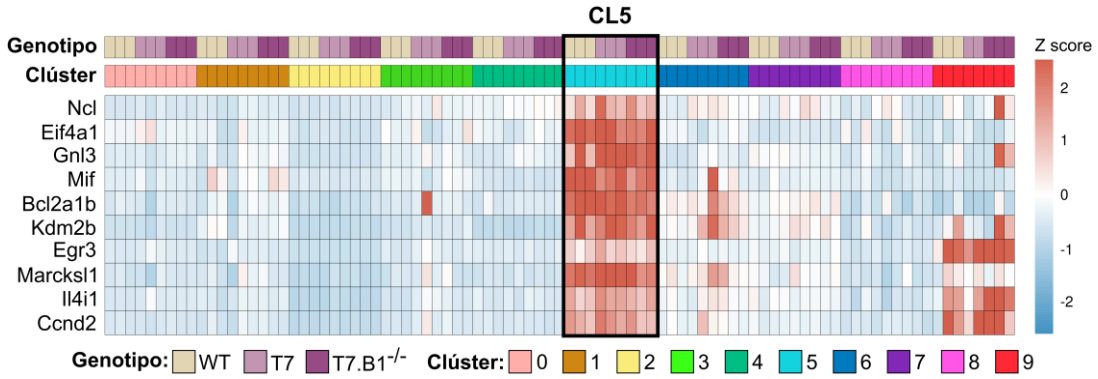

Figura 47. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 5 vs el resto de clústeres. Mapa de calor, o heatmap, de los 10 genes con la expresión diferencial más elevada, comparando el CL5 frente al resto de clústeres. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Clúster 5

Gen	Media_log2FC	Gen	Media_log2FC
Bcl2a1b	1,669	*Myc*	1,319
Ccnd2	1,620	*Cd83*	1,297
Egr3	1,549	*Mdn1*	1,292
Mif	1,445	*Egr1*	1,106
Marcksl1	1,411	*Egr2*	0,368

Tabla 16. Expresión génica diferencial del clúster 5 vs el resto de clústeres. Selección de genes sobreexpresados en el CL5, comparado con el resto de clústeres, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

El tamaño del CL1 se encontró significativamente aumentado en los ratones con lupus en comparación con los animales sanos WT. Asimismo, en el contexto de la enfermedad, se observó un incremento en la frecuencia de dicho clúster en los ratones T7 en comparación con aquellos deficientes de *Bank1* (**Figura 34**). Las células del CL1, comprenden una serie de genes los cuales están implicados en la activación de las células B, tales como *Cd69*, *Cd86*, *Fos*, *Fosb*, *Jun* y *Junb*. Por lo tanto, el CL1 estaría representando al grupo de células B activadas. También hay que destacar que este clúster exhibió una expresión elevada de los genes *Cxcr4* e *Ighg1*, lo cual guarda una estrecha semejanza con la expresión observada en el CL7, sugiriendo de la misma manera una posible localización de estas células en el área extrafolicular (**Figura 48**; **Tabla 17**).

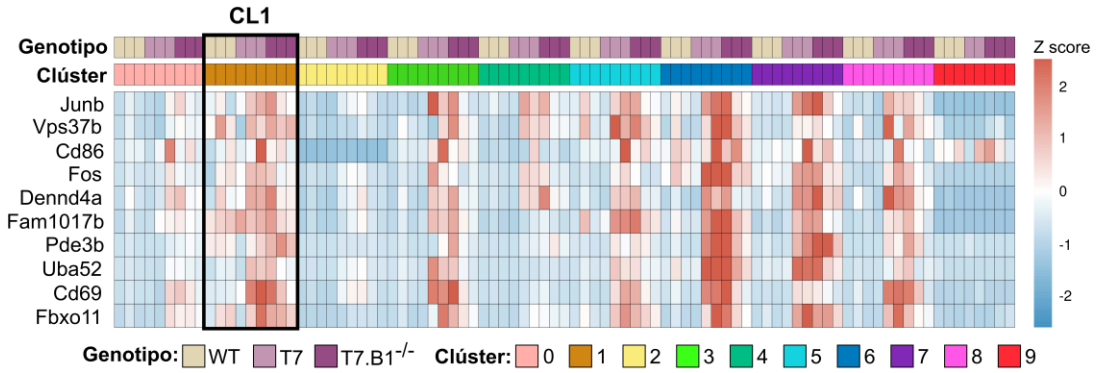

Figura 48. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 1 vs el resto de clústeres. Mapa de calor, o heatmap, de los 10 genes con la expresión diferencial más elevada, comparando el CL1 frente al resto de clústeres. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Clúster 1			
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Junb	1,673	*Fosb*	0,826
Cd86	1,454	*Jun*	0,672
Fos	1,373	*Ighg1*	0,555
Cd69	0,971	*Cxcr4*	0,532

Tabla 17. Expresión génica diferencial del clúster 1 vs el resto de clústeres. Selección de genes sobreexpresados en el CL1, comparado con el resto de clústeres, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Las células del CL1 provenientes de los ratones T7 mostraron una mayor expresión de genes relacionados con la presentación de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, tales como *H2-Aa*, *H2-Ab1*, *H2-Dma* y *H2-Oa*. Además, este conjunto de células exhibió un enriquecimiento en funciones vinculadas con respuestas humorales mediadas por la producción de inmunoglobulina, y presentaron una expresión elevada de los genes *Ighg1* e *Ighg2c* en comparación con los ratones T7.B1$^{-/-}$ (**Tabla 18**). Por el contrario, las células del CL1 provenientes de los ratones deficientes de *Bank1* mostraron una significativa sobreexpresión de genes asociados con funciones antiinflamatorias,

suprimiendo la proliferación celular, la secreción de citoquinas y la expresión de las moléculas de superficie del MHC-II, incluyendo a *Btla*, *March1*, *Dnaja1*, *Arhgap15* (**Tabla 18**). Por lo tanto, la deficiencia de *Bank1* contribuyó parcialmente a normalizar la frecuencia de las células B activadas en el CL1, lo que sugiere un papel potencial en la regulación de la activación de las respuestas inmunitarias.

Sobreexpresado en el CL1 del T7	
Gen	**Media_log2FC**
Ighg1	1,004
Ighg2c	0,326
H2-Oa	0,320
H2-Dma	0,312
H2-Ab1	0,297
H2-Aa	0,282

Sobreexpresado en el CL1 del T7.B1$^{-/-}$	
Gen	**Media_log2FC**
March1	-0,612
Dnaja1	-0,588
Btla	-0,572
Arhgap15	-0,323

Tabla 18. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 1. Comparativa de la selección de genes sobreexpresados diferencialmente en los ratones T7 y T7.B1$^{-/-}$ del CL1, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Por último, el CL6 está principalmente conformado por células B de memoria y de la zona marginal. Tanto el grupo WT como el grupo T7.B1$^{-/-}$, mostraron una frecuencia significativamente mayor de este clúster en comparación con el grupo T7 (**Figura 34**). Las células del CL6 presentan una elevada expresión de genes asociados al fenotipo de las células B de memoria, tanto de ratones como de humanos (*Cd274*, *Cxcr5*, *S1pr1*, *Malt1* y *Runx3*), así como específico de ratones (*Cd9* y *Cd81*). También se observó que este clúster compartía genes de las células B de memoria y de memoria atípica, *Cd38* y *Fcrl5*, respectivamente, con las células del CL7. Además, cabe destacar la expresión de los genes característicos de las células B de la zona marginal, como lo son *Dtx1*, *Cd1d1* y *Cr2*, el cual este último codifica para CD21. También se identificó la expresión de genes codificantes de

receptores involucrados en la migración hacia la zona marginal, como *S1pr3* y *Cnr2*. Un hallazgo relevante fue la presencia del gen *Atxn1* en el CL6, el cual es un represor transcripcional conocido por modular la expresión de *Cd80* y *Cd44*, ambos genes sobreexpresado en el CL7 (**Figura 49**; **Tabla 19**).

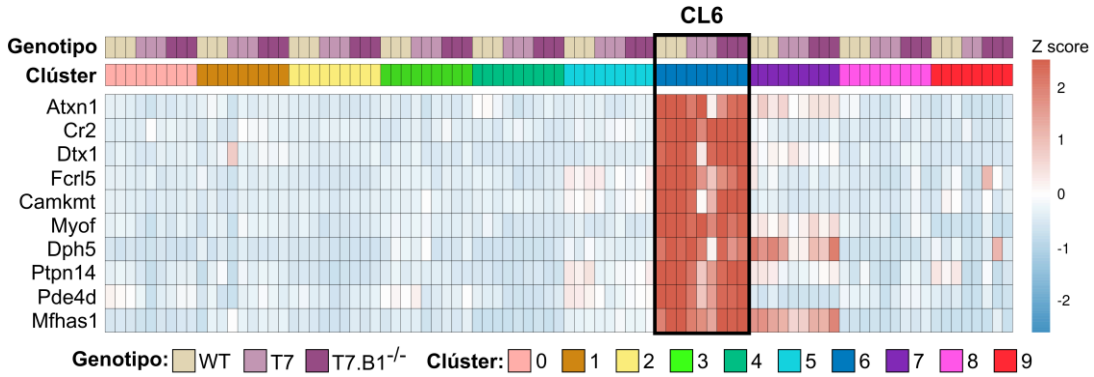

Figura 49. Top 10 genes diferencialmente expresados del clúster 6 vs el resto de clústeres. Mapa de calor, o heatmap, de los 10 genes con la expresión diferencial más elevada, comparando el CL6 frente al resto de clústeres. La escala de colores representa la expresión normalizada mediante z-score.

Clúster 6			
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Atxn1	2,385	*S1pr1*	0,868
Fcrl5	2,241	*Cd38*	0,722
Cr2	2,075	*Cd274*	0,615
Dtx1	1,820	*Cd81*	0,598
S1pr3	1,001	*Runx3*	0,532
Cd9	0,988	*Cxcr5*	0,331
Cd1d1	0,879	*Cnr2*	0,298

Tabla 19. Expresión génica diferencial del clúster 6 vs el resto de clústeres. Selección de genes sobreexpresados en el CL6, comparado con el resto de clústeres, de manera significativa. Se muestra el p valor ajustado para cada gen y su promedio del cambio logarítmico en base 2. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Es interesante destacar que las células del CL6 del grupo T7.B1$^{-/-}$ mostraron una notable regulación al alza de genes asociados con funciones antiinflamatorias, como *Kctd2*, *Serpine2*, *Pdcd4*, *Zfp36l2* y *Sesn1*, y una menor variedad de genes relacionados con funciones proinflamatorias, como *Ccl5* (**Tabla 20**).

Sobreexpresado en el CL6 del T7.B1$^{-/-}$			
Gen	**Media_log2FC**	**Gen**	**Media_log2FC**
Sesn1	-0,830	*Serpine2*	-0,431
Zfp36l2	-0,820	*Ccl5*	-0,269
Pdcd4	-0,720	*Kctd2*	-0,251

Tabla 20. Expresión génica diferencial entre los grupos TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ en el clúster 6. Comparativa de la selección de genes sobreexpresados diferencialmente en los ratones T7 y T7.B1$^{-/-}$ del CL6, de manera significativa. Se muestra el promedio del cambio logarítmico en base 2 de cada gen. Log2: logaritmo en base 2; FC: *fold change*.

Estos hallazgos sugieren que la deficiencia de *Bank1* podría dificultar o limitar el proceso de diferenciación del CL6 hacia el fenotipo celular del CL7, lo que podría conducir a un aumento en el subconjunto de células B de la zona marginal y células B de memoria. Por otro lado, en el grupo T7, esta transición parece estar activada y facilitada, lo que se ve reflejado en un aumento tanto en el número como en el porcentaje de las ABCs del CL7.

4. CORRELACIÓN ENTRE LAS ABCs Y LAS CÉLULAS T AUXILIARES EN LA ZONA EXTRAFOLICULAR

Las células B pueden activar respuestas tanto dependientes como independientes de las células T. En los casos donde es necesaria la interacción B-T, las células B requieren señales específicas de las células T para diferenciarse y producir anticuerpos. Aunque en algunas enfermedades autoinmunes las células T citotóxicas adquieren mayor protagonismo, en el LES, las células T $CD4^+$ auxiliares desempeñan un papel crucial. Fuera de los centros germinales, las células Tefh emergen como actores clave en los procesos autoinmunes, reafirmando su capacidad para mediar la activación de las células B y la producción de autoanticuerpos. En línea con nuestro trabajo, *Bank1* ha sido identificado como un factor que podría influir en la dinámica de estas interacciones. En estudios previos de nuestro grupo de investigación, se observó que la deficiencia de *Bank1* podría ejercer un papel limitante en la formación del área extrafolicular. Los niveles de expresión de CXCR4 en las células T del modelo B6.*Sle1*.*yaa*.*Bank1*$^{-/-}$ disminuyeron de manera significativa comparado con el modelo B6.*Sle1*.*yaa*.*Bank1*$^{+/+}$, y se normalizaron con respecto a los controles sanos [81]. Además, las células T $CXCR4^+$ son conocidas por proporcionar ayuda en las respuestas de las células plasmáticas extrafoliculares en los modelos de autoinmunidad [359]. Por otro lado, las ABCs se cree que tienen su origen y diferenciación en la región extrafolicular, como se mencionó anteriormente, sugiriendo una posible interconexión entre ambas poblaciones.

El análisis de los datos del scRNA-Seq reveló diferentes patrones de expresión génica entre los diferentes clústeres de células B. Específicamente, se observó que las células B naïve activadas (CL1) y las ABCs (CL7) exhibían una expresión elevada del gen *Cxcr4* en comparación con el resto de las subpoblaciones celulares, o clústeres (**Figura 37**). Esto nos sugirió la posible localización de ambas poblaciones dentro del nicho extrafolicular y, por lo tanto, una posible implicación en la respuesta inmune fuera de los centros germinales. Además, y como se describió anteriormente, se observó que las ABCs presentaban un fenotipo similar al de las células plasmáticas (**Figura 37**), lo que sugiere una posible

diferenciación final como células productoras de autoanticuerpos en el proceso autoinmune. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la deficiencia de *Bank1* podría estar afectando tanto a la expresión de *Cxcr4* como a la localización celular de las ABCs fuera de los CGs en el modelo TLR7.tg6. Es por ello que quisimos comprender en mayor profundidad la complejidad de estas interacciones entre las ABCs y las células Tefh en los entornos extrafoliculares.

Las células productoras de anticuerpos (ASC, del inglés *antibody secreting cells*), o células plasmáticas, pueden originarse tanto en los CGs como a través de vías extrafoliculares [200]. En este contexto, en primer lugar, observamos que el modelo T7 presentó un crecimiento exacerbado y una ruptura de los CGs, cuya estructura se encontraba alterada y la zona oscura expandida (detectada por el marcador PNA). Sin embargo, la deficiencia de *Bank1* restableció, al menos parcialmente, la estructura de dichos CGs, asemejándola más a la observada en los ratones sanos (**Figura 50**).

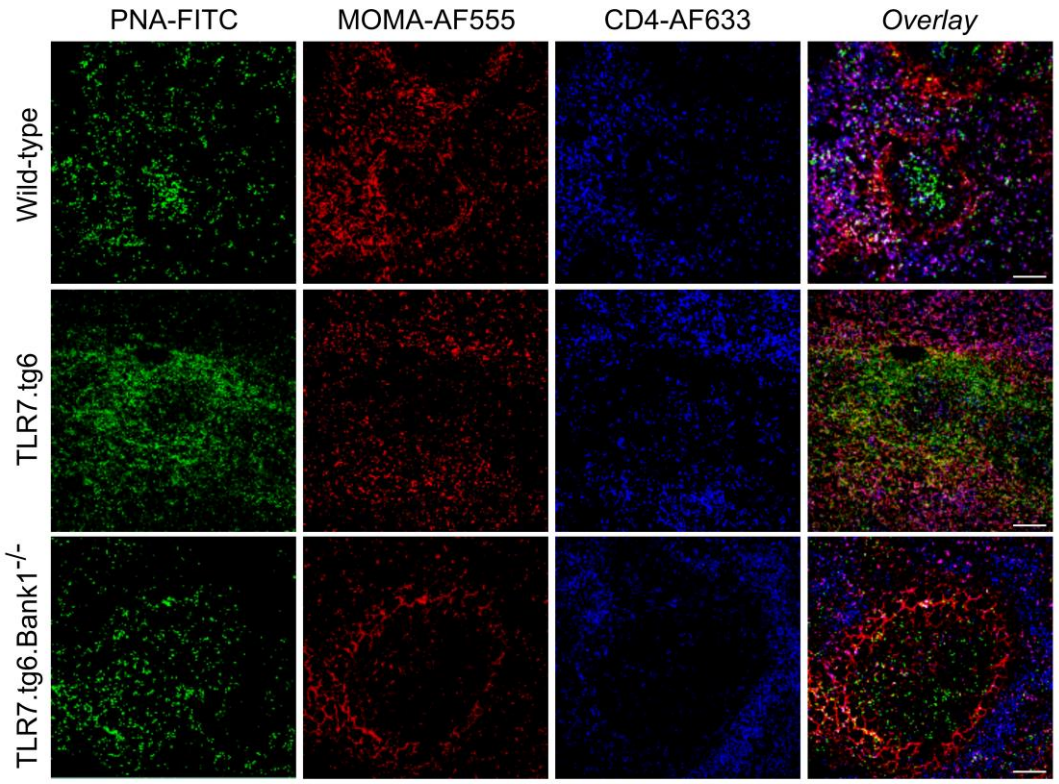

Figura 50. Efecto de la ausencia de *Bank1* en la estructura de los centros germinales en el bazo de los ratones del modelo TLR7.tg6. Imágenes de inmunofluorescencia de criosecciones del bazo de ratones wild-type, TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$, de 32 semanas de edad. Se muestra la expresión de PNA en verde (FITC), MOMA-1 en rojo (Alexa Fluor 555) y CD4 en azul (Alexa Fluor 633). Se muestra una imagen representativa para cada uno de los fenotipos Barra de escala: 100 µm.

A continuación, quisimos determinar el número de células B que se encontrasen en la zona extrafolicular y que expresasen un fenotipo de células plasmáticas en los diferentes grupos. Observamos que la frecuencia de las células B extrafoliculares, caracterizadas por la expresión positiva de B220^{+} CD138^{+} IgG2c^{+} CXCR4^{+} fue significativamente mayor en los ratones T7 en comparación con los ratones deficientes en *Bank1* y los controles sanos WT (**Figura 51A**). Además, pudimos observar que la mayoría de estas células se distribuían fuera de los centros germinales, y expresaban marcadores de células plasmáticas, CD138 e IgG2c (**Figura 51B**). De la misma manera, se observó un aumento estadísticamente significativo en

las áreas que ocupaban las células B extrafoliculares en los bazos de ratones T7 en comparación con los ratones WT y T7.B1$^{-/-}$ (**Figura 51C**).

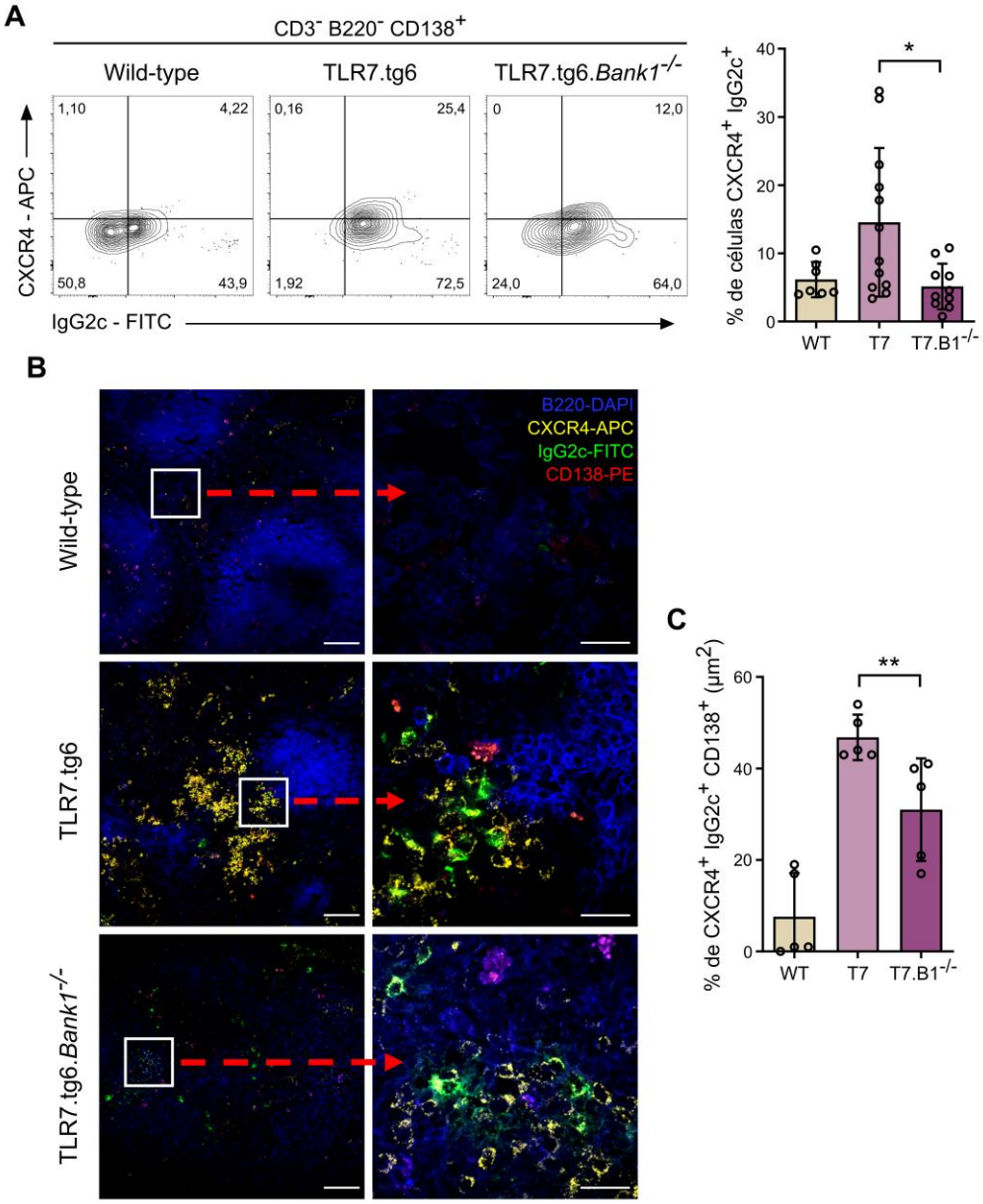

Figura 51. Efecto de la ausencia de *Bank1* en las células B extrafoliculares, en los ratones del modelo TLR7.tg6. (**A**) Frecuencia de células CXCR4^{+} IgG2c^{+} (sobre el total de células B220^{-} CD138^{+}) en los bazos del modelo TLR7.tg6: WT (n = 7), T7 (n = 12) y T7.B1$^{-/-}$ (n = 10). (**B**) Imagenes representativas de criosecciones del bazo de ratones WT, T7 y T7.B1$^{-/-}$ teñidas con anti-B220 DAPI (azul), anti-CXCR4 APC (amarillo), anti-IgG2c FITC (verde) y anti-CD138 PE (rojo). La flecha roja indica un zoom al 2x de una zona concreta (cuadro blanco) seleccionada para cada imagen. Barra de escala: 100 µm (izquierda);

20 µm (derecha). Las imágenes han sido capturadas con el Microscopio Laser Confocal Zeiss LSM 710. (**C**) Área en µm2 de las células CXCR4$^+$ IgG2c$^+$ CD138$^+$ en los bazos del modelo TLR7.tg6; WT (n = 5), T7 (n = 5) y T7.B1$^{-/-}$ (n = 5). Cada punto representa un ratón individual. Los datos se muestran como la media ± SEM. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

Cabe destacar que en el modelo enfermo T7, las células CXCR4$^+$ colocalizaron con la expresión positiva de T-bet (**Figura 52A**), y que dicha frecuencia de células B extrafoliculares T-bet$^+$ incrementó de manera significativa en estos animales. Por el contrario, en los ratones sanos WT y en los enfermos deficientes de *Bank1*, esta población celular se vio significativamente reducida (**Figura 52B**).

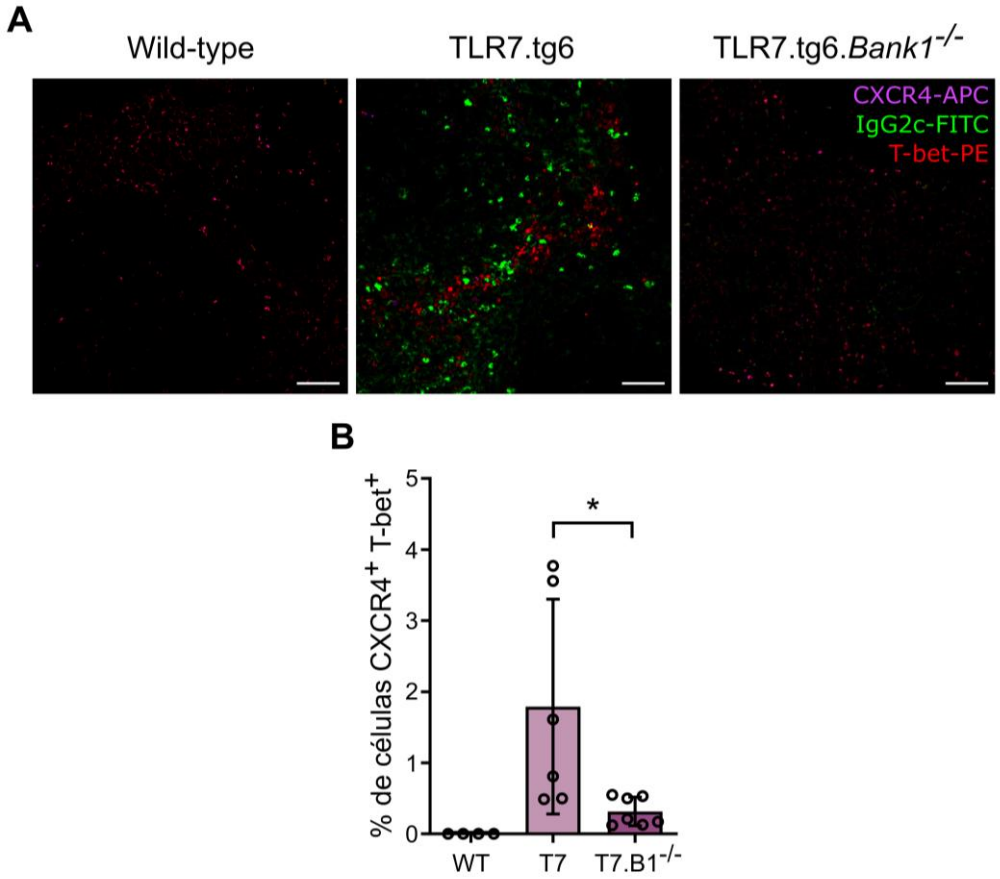

Figura 52. Efecto de la ausencia de *Bank1* sobre las células B T-bet$^+$ extrafoliculares en el bazo de los ratones del modelo TLR7.tg6. (**A**) Imagenes representativas de secciones del bazo de ratones WT, T7 y T7.B1$^{-/-}$, teñidas con anti-CXCR4 APC (morado), anti-IgG2c FITC (verde) y anti-T-bet PE (rojo). Barra de escala: 100 µm. Todas las imágenes han sido capturadas mediante el uso del Microscopio Laser Confocal Zeiss LSM 710. (**B**) Frecuencia de células CXCR4$^+$ T-bet$^+$ (sobre el total de células B220$^+$ TCR$^-$ IgG2c$^+$) en los bazos del modelo TLR7.tg6. Número total de animales analizados: WT (n = 4), T7

(n = 6), T7.B1$^{-/-}$ (n = 7). Cada punto representa un ratón individual. Los datos se muestran como la media ± SEM. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

Además, observamos como las células T-bet^{+} se encontraban ampliamente distribuidas fuera de los centros germinales en los ratones TLR7.tg6, comparado con los controles sanos y los ratones TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ (**Figura 53**).

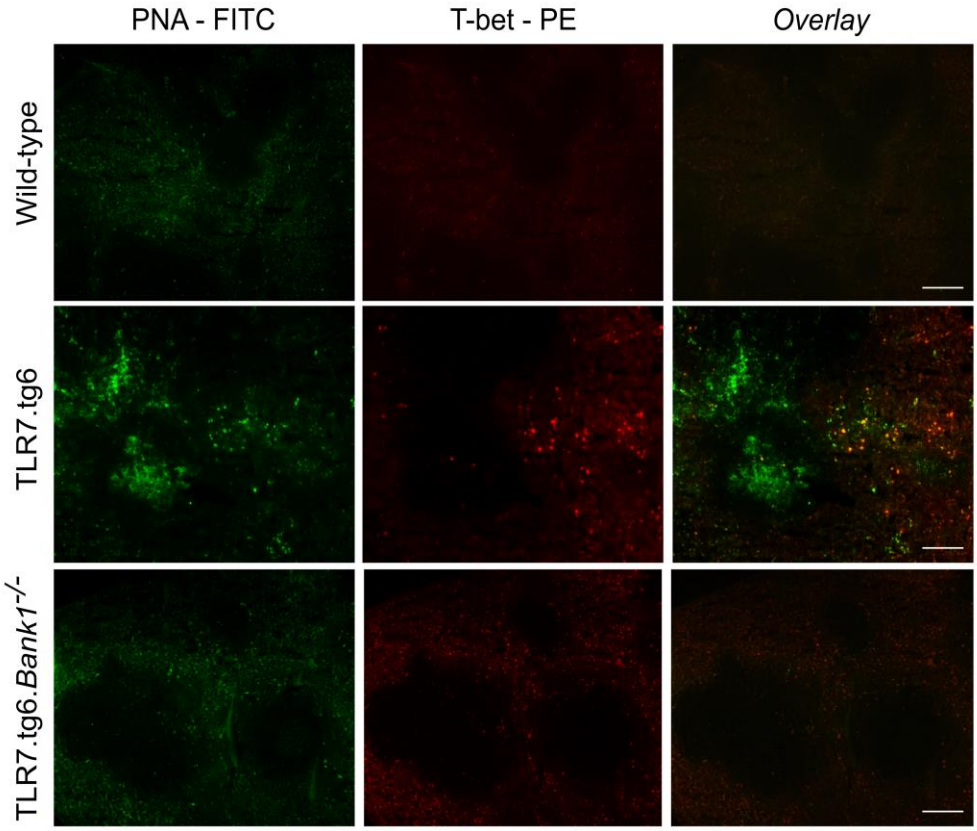

Figura 53. Efecto de *Bank1* en la distribución de las células T-bet^{+} extrafoliculares en el bazo de los ratones del modelo TLR7.tg6. Criosecciones del bazo de ratones wild-type, TLR7.tg6 y TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$, de 32 semanas de edad. Se muestra la expresión de PNA en verde (FITC), T-bet en rojo (PE). Se muestra una imagen representativa para cada uno de los fenotipos. Barra de escala: 100 µm.

Estos resultados sugieren que las ABCs se localizan predominantemente en el área extrafolicular del bazo, donde podrían desempeñar un papel crucial en la producción de

autoanticuerpos y, notablemente, la ausencia de *Bank1* se asocia con una disminución de esta población, en esta área específica.

Por último, evaluamos la potencial interacción entre las ABCs y las células Tefh, mediante el cálculo del coeficiente de correlación. En primer lugar, calculamos la frecuencia de las células Tefh, caracterizadas mediante citometría de flujo por la expresión de $CD3^+$ $CD4^+$ $CD62L^-$ $CD44^+$ $PSGL\text{-}1^-$ $CXCR4^+$. Los resultados muestran que el porcentaje de esta población era significativamente mayor en los ratones T7 comparado con los controles sanos WT y T7.B1$^{-/-}$ (**Figura 54A**).

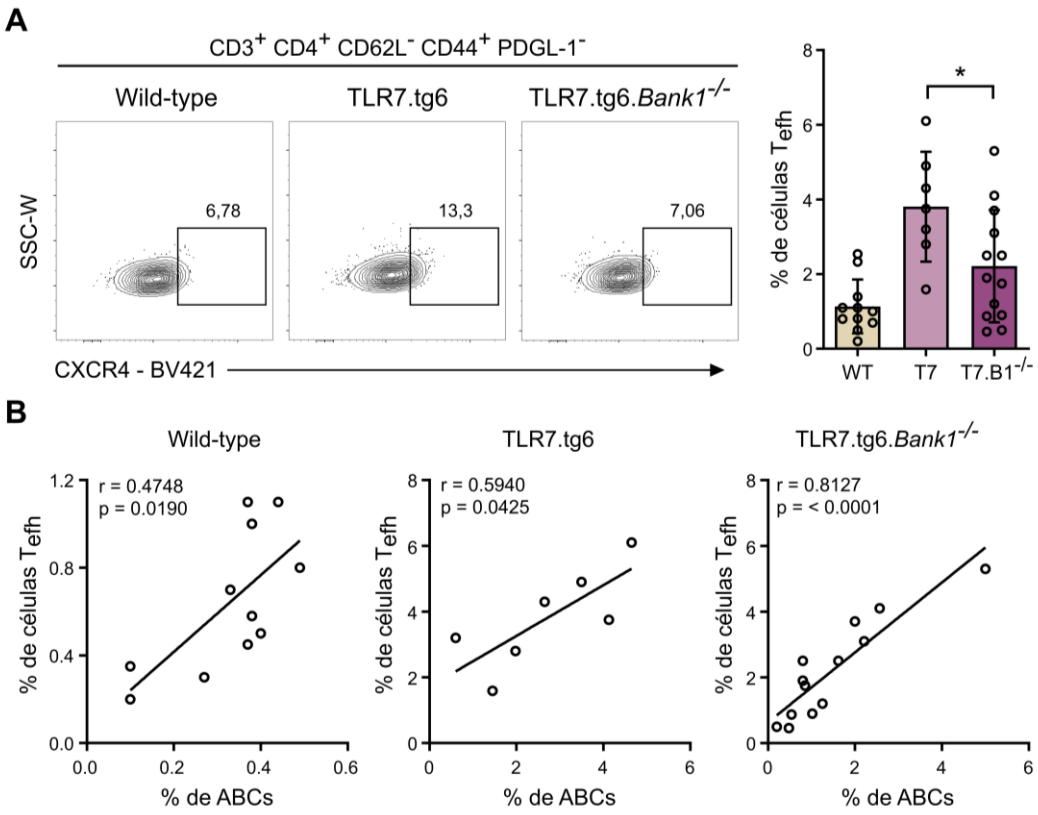

Figura 54. Correlación entre la población de las ABCs y las células T auxiliares extrafoliculares. (**A**) Frecuencia de células Tefh ($CD62L^-$ $CD44^+$ $PSGL\text{-}1^-$ $CXCR4^+$) sobre el total de células $CD3^+$ $CD4^+$, en los bazos del modelo TLR7.tg6: WT (n = 11), T7 (n = 7), T7.B1$^{-/-}$ (n = 13). (**B**) Correlación entre el porcentaje de ABCs y de células Tefh, empleando el coeficiente de correlación de Pearson, en los ratones WT, T7

y T7.B1$^{-/-}$. Cada punto representa un ratón individual. Los datos se muestran como la media ± SEM. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney con corrección de Welch.

Con estos resultados y con los porcentajes de ABCs obtenidos en los ensayos previos, realizamos el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson. Observamos que existía una correlación positiva entre el número total de ABCs y el número total de células Tefh en todos los grupos de ratones estudiados (**Figura 54B**). Este hallazgo sugiere la existencia de una posible interacción entre ambas poblaciones celulares en el límite, o borde, entre las zonas T y B del bazo, lo que implicaría un papel coordinado de ambas poblaciones celulares en la respuesta autoinmune.

Los hallazgos presentados nos acercan no solo a una comprensión más profunda de la función y activación de las ABCs, sino también a una apreciación más completa del papel de las células Tfh extrafoliculares y la influencia de *Bank1* en ellas. Estos resultados sugieren la alteración en la frecuencia y formación de estas células, así como un impacto en su distribución anatómica.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Actualmente, las enfermedades autoinmunes siguen siendo una incógnita para la investigación y la clínica. El LES lo sufren unas 5,14 por cada 100000 habitantes al año y, aunque existen ciertos fármacos que pueden revertir o, mejor dicho, bloquear el proceso de la enfermedad, aún se desconocen las causas que la generan. Por estos motivos, es muy importante seguir investigando esta enfermedad e intentar conocer todos los elementos clave que forman parte de este gran problema como es la autoinmunidad. En esta tesis nos enfocamos en dos elementos fundamentales, un gen relacionado con la susceptibilidad a padecer la enfermedad en humanos, y una subpoblación de células B que cada vez va ganando un mayor protagonismo en las investigaciones en el campo de los procesos autoinmunes y el daño tisular.

La idea inicial de estudiar el papel del gen *BANK1* surgió en 2008, cuando la Dra. Alarcón-Riquelme llevó a cabo un estudio de asociación a nivel genómico, o GWAS, en el que identificó a *BANK1* como un gen de susceptibilidad al LES [80]. A partir de entonces, nuestro grupo comenzó a investigar de manera minuciosa e intensiva el papel de *Bank1* en los procesos autoinmunes. Desde la publicación de los efectos de *Bank1* en la señalización del TLR9, en 2013, hemos obtenido importantes avances con respecto al conocimiento sobre las consecuencias patológicas de la expresión de este gen en los modelos murinos de lupus [287]. En 2016, se empleó el modelo espontáneo de lupus B6.*Sle1*.*yaa*, cruzado con ratones *Bank1*$^{-/-}$, en el cual se demostró, por primera vez, el papel clave y funcional de *Bank1*, en un modelo *in vivo*, en el contexto de la autoinmunidad mediada por los receptores TLR7 [81]. Finalmente, en el año 2020, se identificó uno de los sitios específicos donde BANK1 ejerce su función en la señalización del TLR7. Este estudio demostró que BANK1 interactúa de manera constitutiva, a través de sus dominios TIR, con el principal adaptador de señalización de los receptores Toll, MyD88, así como con la ubiquitina E3, TRAF6, en las células B [270]. Actualmente, en nuestro grupo de investigación, seguimos trabajando en dilucidar los mecanismos subyacentes de *Bank1* en la señalización de las células B y su papel en la

autoinmunidad. Por lo tanto, en este trabajo de tesis quisimos ampliar el conocimiento de la funcionalidad del papel de *Bank1* en los procesos autoinmunes, utilizando dos modelos murinos de lupus, uno transgénico y otro inducido, ambos dependientes del TLR7 para desarrollar la enfermedad.

Los primeros hallazgos de este trabajo confirman de manera rotunda que la deficiencia de *Bank1* ejerce un impacto significativo sobre el fenotipo principal del LES, contribuyendo a la reducción tanto de la mortalidad como de la producción total de inmunoglobulinas IgG, con un énfasis particular en la disminución de la isoforma patogénica IgG2c. Asimismo, se observó una notable reducción en los niveles de autoanticuerpos, específicamente los dirigidos contra el ADN de doble cadena (anti-dsDNA) y las RNPs nucleares (anti-Sm). Estos efectos son compartidos de manera sostenida en los dos modelos experimentales empleados, a pesar de la gran variabilidad que pudiesen llegar a presentar.

Los modelos empleados presentan una considerable variabilidad en cuanto a la manifestación de los signos clínicos de la enfermedad. Esto se atribuye principalmente a que la sobreexpresión del TLR7 no es uniforme entre los animales, y a que el desarrollo de la autoinmunidad sigue una progresión variable. Como resultado, no todos los animales desarrollan la enfermedad de manera sincrónica. Algunos individuos pueden mostrar signos tempranos, mientras que otros pueden tener una progresión más lenta o incluso permanecer asintomáticos durante períodos prolongados. Esta heterogeneidad en la manifestación de la enfermedad refleja la complejidad de los procesos autoinmunes y subraya la importancia de considerar la variabilidad individual en la interpretación de los resultados experimentales. Todos los animales presentan signos de enfermedad, pero no necesariamente al mismo tiempo ni con igual grado de severidad. En definitiva, son dos modelos a priori distintos, en cuanto al desarrollo de la enfermedad, pero ambos dependientes de la vía de señalización del TLR7 y, por lo tanto, ambos afectados por la deficiencia de *Bank1*. Cabe destacar que la respuesta que se observa en el modelo inducido es más rápida y aguda, mientras que, en el modelo transgénico, la aparición de signos de la

enfermedad se produce en edades más avanzadas, lo que podría equipararse a una situación crónica.

En base a los resultados obtenidos en el bazo, en primer lugar, observamos que en ambos modelos se produce un engrosamiento significativo del tamaño del bazo, apareciendo signos de esplenomegalia, similares a los que se observan en algunos pacientes. Este dato apoya el uso de ambos modelos para el estudio de la enfermedad. Los datos experimentales muestran una reducción sustancial en la esplenomegalia como resultado de la deficiencia de *Bank1*. Este hallazgo adquiere una relevancia significativa dada la función y expresión predominante de *Bank1* en las vías de señalización de las células B [235]. Los resultados presentados muestran alteraciones notables en los principales subtipos de células B en ausencia de *Bank1*. Los ratones TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$ mostraron una restauración parcial de las poblaciones celulares foliculares y de la zona marginal, siendo similares a los niveles normales de los controles sanos, al mismo tiempo que se produjo una ligera reducción en el número de células plasmáticas. De esta manera, se confirman los resultados previos obtenidos en nuestro grupo de investigación, con el modelo B6.*Sle1*.*yaa* [81]. En conjunto, estos resultados enfatizan el papel fundamental de *Bank1* en la modulación de los fenotipos asociados al lupus, incluyendo la producción de autoanticuerpos, la esplenomegalia y la frecuencia de las diferentes subpoblaciones de células B.

En este trabajo se dio un paso más al frente en el conocimiento de la enfermedad y se llevó a cabo un análisis exhaustivo de las ABCs, una población celular que no había sido estudiada previamente en relación con la deficiencia de *Bank1*. La generación y diferenciación de las ABCs está mediada por las vías de señalización del TLR7, y estas muestran una tendencia a promover la patología y los procesos proinflamatorios de las enfermedades autoinmunes [292, 293, 363]. Resultados previos de nuestro grupo de investigación [81], mostraron que la deficiencia de *Bank1* disminuyó los signos de la enfermedad, incluidos los niveles de autoanticuerpos, células plasmáticas y la activación de las células B. Por otro lado, un estudio reciente destacó la participación dinámica de las ABCs en la generación de autoanticuerpos

y células plasmáticas autorreactivas [311]. Con estos datos podríamos plantear la existencia de un posible vínculo causal entre *Bank1* y la población de las ABCs.

Nuestros resultados obtenidos en tres modelos independientes avalan que la deficiencia de *Bank1* tiene un impacto significativo en la aparición de las ABCs en el bazo. La sobreexpresión del TLR7 en estos modelos provoca diversas anomalías, incluida la proliferación celular desmedida y el desarrollo de células B autorreactivas. Estos procesos podrían contribuir a la expansión y acumulación de las ABCs en nuestros modelos, viéndose reducidas en ausencia de *Bank1*. Un posible mecanismo por el cual estas ABCs pueden contribuir a la autoinmunidad es a través de la producción de autoanticuerpos [86, 305, 332]. En este contexto, observamos que las ABCs de los ratones enfermos *Bank1*$^{+/+}$ exhibieron una expresión significativamente elevada de las inmunoglobulinas IgG e IgG2c, en relación con los ratones enfermos *Bank1*$^{-/-}$. Estas observaciones podrían confirmar la participación de *Bank1* en la vía mediada por los receptores TLR7 en las células B, ya que se ha visto como la ausencia de estos receptores resulta en la reducción de los niveles de IgG total e IgG2c [364, 365]. En relación con esta vía de señalización, es interesante destacar el papel de su proteína adaptadora más importante por antonomasia, e intrínseca de las células B, como es MyD88, en la regulación de la producción de autoanticuerpos [366]. En un estudio reciente se demostró que la eliminación de MyD88 en ratones *Ship*$^{-/-}$, los cuales presentan un fenotipo de lupus espontáneo, resultó en la reducción de las ABCs CD11c^{+} T-bet^{+} [367]. De la misma manera, la acumulación de estas células también se vio disminuida en ratones adultos *Tlr7*$^{-/-}$ [293]. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la presencia de BANK1, el cual interactúa con MyD88 tras la activación de la vía del TLR7, tiene un impacto significativo en la modulación del número y fenotipo de las ABCs. Por consiguiente, aquí confirmamos el incremento de las ABCs en las tres cepas de lupus y cómo la deficiencia de *Bank1* reduce dicha población celular. Sin embargo, no observamos cambios al realizar la diferenciación *in vitro* de las ABCs mediante la estimulación de las células B naïve CD19^{+}. La explicación de este resultado no está clara, una posible hipótesis es que, como observamos

anteriormente, las ABCs se originen a partir de linfocitos B de memoria o de la zona marginal, los cuales, probablemente, no fueran estimulados *in vitro*.

Por consiguiente, para profundizar en el papel de *Bank1* en la población de las ABCs y de otras subpoblaciones celulares, durante el proceso de la autoinmunidad, decidimos realizar un análisis exhaustivo a nivel transcriptómico de los linfocitos B a escala singular, es decir, de células individuales. Mediante la técnica de secuenciación del ARN de célula única (scRNA-Seq), en los esplenocitos totales, identificamos un total de 10 clústeres distintos dentro de todos los linfocitos B. Posteriormente, empleamos marcadores convencionales para identificar los perfiles de transcripción únicos para estos subconjuntos. Este enfoque nos permitió descubrir que solamente un clúster estaba representado por una población distintiva y única de ABCs, caracterizado por la expresión diferencial de genes, funciones y vías de enriquecimiento, lo que nos proporcionó una información valiosa sobre su función, origen y posibles implicaciones en la enfermedad.

Observamos que las ABCs representaron un subconjunto distintivo de linfocitos B identificados tanto por marcadores convencionales como por aquellos descubiertos recientemente mediante el análisis del scRNA-Seq. Especialmente, estas células, representadas en el CL7, muestran una expresión elevada y específica de los marcadores de superficie *Itgam* (CD11b) e *Itgax* (CD11c) [293, 368], junto con una disminución en los genes *Cr2* (CD21) y *Fcer2a* (CD23) [292, 368]. Además, las ABCs del CL7 muestran niveles elevados del factor de transcripción *Tbx21* (T-bet) [313, 368]. De la misma manera, también se observó la expresión diferencial de otros factores de transcripción importantes como *Zeb2* [125, 352]. El gen *Zeb2* está emergiendo en los últimos años, como uno de los genes reguladores más cruciales que contribuyen significativamente a la especificación del linaje de las ABCs, el cual junto con T-bet, se encarga de dirigir la diferenciación de los linfocitos B hacia dicho destino. El aumento de la expresión de CD11c y la facilitación de la diferenciación celular hacia un fenotipo más extrafolicular, en lugar de entrar en los centros germinales, es

promovido por el gen *Zeb2*; por otro lado, el cambio de isotipo de inmunoglobulina, notablemente hacia IgG2a/c, es promovido por el gen *Tbx21* [296, 369].

Múltiples estudios destacan las características fenotípicas y funcionales compartidas entre las ABCs y las células B de memoria [368, 370, 371]. En concreto, las ABCs del CL7 mostraron una elevada expresión de moléculas efectoras como CD73 (*Nt5e*), CD80 (*Cd80*) y CD44 (*Cd44*), específicas también de las MBCs de ratón [372]. Este patrón de expresión podría implicar que estas células están fuertemente predispuestas a diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos [373, 374]. Esta característica va en línea con observaciones realizadas en pacientes y en modelos murinos de lupus, donde las ABCs muestran un fenotipo similar al de las células plasmáticas capaces de producir autoanticuerpos [306, 375]. Cabe destacar la elevada expresión de *Zbtb32* en las células del CL7 de los ratones TLR7.tg6, el cual es clave para la diferenciación terminal hacia las células plasmáticas [357, 376]. Recientemente, este gen se ha observado sobreexpresado en una población de ABCs en un estudio de infección crónica y en modelos de ratón deficientes en EGR2/3 [352, 353], lo que sugiere un papel regulador de este factor de transcripción sobre la formación de las ABCs en modelos autoinmunes. Además, la deficiencia de *Bank1* podría obstaculizar, o impedir, la diferenciación de las ABCs hacia un fenotipo similar al de las células plasmáticas al modular la expresión de ciertas inmunoglobulinas con cambio de clase [86, 365, 377], en parte mediante la desregulación de *Aicda* [81]. Especialmente, la deficiencia de *Bank1* impacta en los niveles séricos de IgG total, IgG2c e IgG1, así como en sus niveles de expresión, mientras aumenta la expresión de *Ighg3*, en las células del CL7 de los TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$, lo cual podría explicarse por este mismo aumento observado previamente en un modelo de ratón inmunizado IgG1$^{-/-}$ [378]. En conjunto, esto sugiere que las ABCs del modelo TLR7.tg6 pueden desencadenar respuestas más exageradas y patogénicas, mediadas por inmunoglobulinas, en comparación con sus contrapartes deficientes de *Bank1*.

El análisis de enriquecimiento realizado en el CL7 reveló que la deficiencia de *Bank1* ejerce un efecto regulador negativo sobre dos elementos clave de la familia de las MAPK quinasas, como son la quinasa Jun N-terminal (JNK) y p38. Estas MAPKs desempeñan un papel crucial en la modulación de las respuestas inflamatorias y proliferativas durante la progresión de los procesos autoinmunes [379-382]. En investigaciones previas realizadas en nuestro grupo de investigación, se demostró como BANK1 regulaba la producción de IL-6 a través de la vía p38-MNK1/2-eIF4E, proporcionando una conexión entre BANK1 y la respuesta inflamatoria [287]. Sin embargo, también se observó que la activación de p38 bajo la señalización del TLR7 no dependía necesariamente de BANK1, lo que sugiere la existencia de vías de señalización independientes de BANK1 en este contexto específico [81]. Por otro lado, la activación de JNK conduce a la fosforilación de su sustrato principal, c-Jun, que junto con c-Fos, forman un complejo de factores de transcripción, conocido como AP-1. Esta asociación es esencial para orquestar la proliferación celular y la respuesta inflamatoria en diversos contextos fisiológicos y patológicos [81, 383, 384]. Asimismo, es importante mencionar que, en nuestros análisis, y siguiendo esta línea, observamos tanto la sobreexpresión del gen *Fos*, que codifica para c-Fos, como del gen *Pdcd4*, un conocido supresor de la transcripción dependiente de AP-1, en las células del CL7 de los ratones deficientes de *Bank1*. Dicha observación sugiere un mecanismo compensatorio para contrarrestar la posible sobreactivación de AP-1 en estas células. Así mismo, en otros estudios se observó una disminución en la expresión de *Pdcd4* en pacientes con lupus activo, lo que sugiere un papel relevante de este gen en la patogénesis de la enfermedad [385, 386].

En este contexto, y en base tanto a los genes diferencialmente expresados entre condiciones, como a los análisis de enriquecimiento, podemos concluir que la ausencia de *Bank1* potencia la expresión de genes asociados con un fenotipo antiinflamatorio en las ABCs del CL7, lo que sugiere un papel clave de este gen en la modulación de la respuesta inflamatoria. Por el contrario, las ABCs del CL7 de los ratones enfermos TLR7.tg6 exhibieron una elevada expresión de genes asociados con una respuesta mayormente proinflamatoria, parte de la cual estaría mediada por el IFN. Estas observaciones van en línea con la reducción

significativa en la proporción de las células B de respuesta al IFN del CL3, en ratones sanos y deficientes en *Bank1*, en comparación con los ratones enfermos TLR7.tg6. Sin embargo, la relación exacta entre las células del CL3 y las del CL7 sigue siendo poco clara, ya que el análisis de trayectorias no sugiere una proximidad directa entre estos dos subtipos celulares.

Con respecto al análisis de trayectoria, este delineó la ruta más verosímil para la diferenciación de las ABCs, en la que destacan los clústeres 0, 1 y 6, siendo este último el más cercano, y el que muestra la expresión de genes relacionados con un fenotipo de células B de la zona marginal y de memoria. En ausencia de *Bank1*, se observó un aumento en la frecuencia de las células del CL6, lo que sugiere una retención de estas en la zona del manto esplénico. Según la evidencia actual, las ABCs pueden originarse tanto dentro como fuera de los centros germinales, siendo más común su formación fuera de los folículos, una observación respaldada por la expresión de integrinas específicas conocidas por su papel en redirigir las células a esta región anatómica. Sin embargo, hoy en día se sigue debatiendo sobre la localización de estas células, de hecho, las dos vías de diferenciación posibles de las ABCs pueden variar según el contexto [318, 354]. Un estudio realizado en linfomas indicó que la expresión de BANK1 se encontraba de manera predominante fuera de los centros germinales, específicamente al lado de la zona del manto, donde BANK1 podría ejercer su influencia en las áreas extrafoliculares [387]. Esta observación explicaría el por qué la deficiencia de *Bank1* no tiene efecto en la frecuencia de las células de los centros germinales, representadas por el CL5. Considerando esto, es muy probable que las células B naïve foliculares (CL0) se vuelvan hiperactivadas (CL1) en el contexto de la autoinmunidad, adquieran un fenotipo de memoria en la zona marginal (CL6) y posteriormente se diferencien en células de memoria atípicas, plasmáticas o ABCs, localizadas en el área extrafolicular (CL7). Estas células estarían siendo retenidas en la zona marginal en ausencia de *Bank1* [318, 375] (**Figura 55**).

Como hipótesis alternativa al análisis de trayectoria realizado, y a pesar de la dificultad para anotar el CL2, se podría haber seleccionado este como el punto inicial del pseudotiempo.

Esta elección se fundamentaría en la hipótesis de que el CL2 podría representar una fase de células B inmaduras, sustentada por la expresión de algunos genes como *Pax5* y *Bcl11a*. En este modelo, las etapas posteriores de la diferenciación de las células B avanzarían a través de CL4, que probablemente funcionaría como células B transicionales, hasta llegar al CL0, correspondiente a las células B naïve maduras foliculares.

Tras observar como algunos de los genes de las ABCs no se encontraban uniformemente expresados por todo el CL7, decidimos subclústerizarlo, con el fin de poder describir dichas células de una manera más exacta y determinar si las ABCs forman o no una subpoblación diferente a la de otras poblaciones celulares presentes en dicho clúster, como podrían ser las células de memoria o las células plasmáticas. Observamos que el CL7 se componía de dos subclústeres, uno de los cuales exhibía el fenotipo clásico de las ABCs. Sin embargo, esta observación no excluyó la presencia del resto de fenotipos descritos anteriormente, como el de las células atMBCs, las MBCs y las PCs. Por el contrario, el segundo subclúster sugirió una mayor tasa de recambio y una gran diversidad de células en transición, por lo que se podría deducir que dicho grupo podría estar formado por células precursoras de las ABCs (pre-ABCs), o en proceso de diferenciación hacía un estadio terminal o más maduro de dicha subpoblación. En este contexto, se requerirán investigaciones adicionales a nivel de célula única para discernir las etapas específicas del desarrollo y diferenciación de las ABCs, una vez que han adquirido sus marcadores característicos.

Es relevante señalar que un estudio reciente llevó a cabo un análisis de expresión génica a nivel de célula única en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lupus, en el cual se reveló un grupo distinto de células B caracterizadas por una alta expresión de *BANK1*. Este grupo de células compartía similitudes con la población de las ABCs murinas identificadas en el CL7 de nuestro análisis. Específicamente, las células B humanas presentaban un fenotipo similar al de las células B de memoria extrafoliculares doble negativas (DN2). Además, este grupo demostró un aumento en la expresión de genes

también observados en nuestra población murina, incluyendo *ITGAX*, *TBX21*, *ZEB2*, *ZBTB32* y *CD86* [349].

Cada vez está cogiendo un mayor interés la importancia de las respuestas extrafoliculares en los modelos murinos de autoinmunidad, las cuales destacan por su contribución al desarrollo de estas enfermedades [387, 388]. Las ABCs del CL7 muestran varias características extrafoliculares, incluida la presencia de *Cxcr4* y la ausencia de *Cxcr5* y *Sell* [125, 359]. Además, esta localización también podría estar influenciada por una menor expresión de *Bcl6*. Por lo tanto, *Bank1* podría desempeñar un papel en la regulación de la localización y expansión de estas células dentro de las regiones extrafoliculares. De hecho, en apoyo a nuestras observaciones, un estudio reciente utilizó un knock-out para *Bcl6* con el objetivo de bloquear la formación de las células B de los centros germinales en un modelo de lupus inducido, sin embargo, dicho bloqueo no modificó ni revirtió el desarrollo de la enfermedad en los animales, ya que estos seguían presentando las células B extrafoliculares [388]. Estos resultados concuerdan con nuestro análisis de trayectoria sobre el origen de las ABCs del CL7 como células extrafoliculares, que aparecen directamente a partir de células B naïve activadas (CL1), y a través de las células del manto (CL6). Las respuestas extrafoliculares también se han observado en infecciones graves mediadas por el virus SARS-CoV-2, las cuales surgen de compartimentos desregulados, y en continuo crecimiento, de células B naïve activadas [389]. De la misma manera, en pacientes con COVID-19, las respuestas extrafoliculares y aumentadas de células B conducen a una activación rápida de estas, lo que resulta en un incremento de la proporción celular de atMBCs y de células secretoras de anticuerpos. Estas respuestas extrafoliculares comparten similitudes con las observadas en pacientes con lupus [375]. En la misma línea, también es posible que *Bank1* esté modulando a las ABCs cuando, en su ausencia, haya una reducción importante de IgG total e IgG2c, niveles que pueden provenir tanto de las mismas ABCs como de células plasmáticas, ambas extrafoliculares [365]. Es importante destacar que observamos un aumento en la expresión de los genes *Ighg* en el análisis del scRNA-Seq, los cuales fueron

principalmente sobreexpresados en el clúster de las ABCs y se redujeron significativamente en ausencia de *Bank1* (**Figura 55**).

Finalmente, nuestros análisis realizados con el marcador CXCR4 confirman la estrecha relación entre las ABCs y las células T auxiliares de la zona extrafolicular. Estudios previos sugirieron que esta interacción podría ser mediada por la producción de IL-21, así como a través del ligando CD40L e ICOS en las células Tefh [359]. No obstante, nuestros datos transcriptómicos mostraron una disminución en la expresión de los genes *Il21r* e *Icosl* en las ABCs del CL7, de tal manera que debe haber una explicación alternativa para esta relación entre ambos subgrupos. Una función importante atribuida a las ABCs es su capacidad para actuar como células presentadoras de antígenos (APCs), las cuales se localizan preferentemente en la frontera, o el borde, entre las zonas T y B, en el bazo [318, 351]. Las ABCs del CL7 mostraron una elevada expresión de varios genes del MHC de clase II, así como de los genes *Cd80* y *Cd86*. Además, descubrimos que las ABCs de los ratones TLR7.tg6 estaban asociadas, significativamente, con la regulación positiva de genes implicados en el procesamiento y presentación de antígenos, así como en la activación de las células T. Por último, observamos una reducción en la expresión de *Cd80* en los ratones deficientes en *Bank1*.

Todos estos hallazgos indican que *Bank1* desempeña un papel fundamental en la capacidad de las ABCs para interactuar con las células Tefh, lo que resulta crucial para facilitar la respuesta y activación de las ABCs durante la autoinmunidad. Además, nuestros datos sugieren que *Bank1* tiene un impacto en la formación de las zonas extrafoliculares al modular la expresión aumentada de CXCR4 tanto en las células B como en las células T. Dicho mecanismo podría explicar cómo estas subpoblaciones contribuyen a la enfermedad (**Figura 55**).

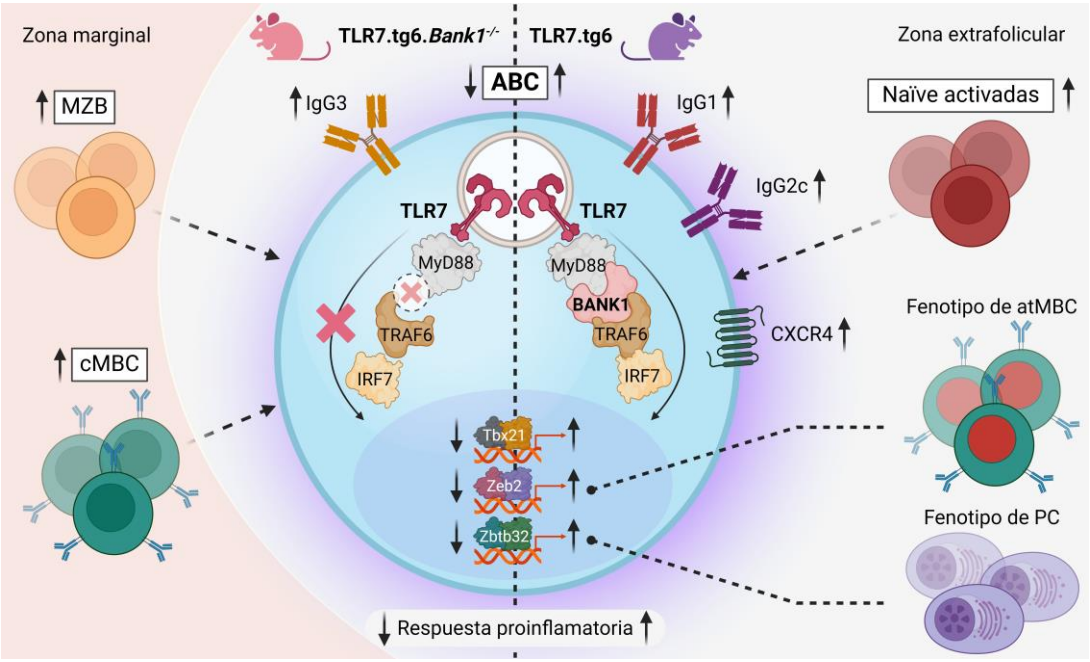

Figura 55. Modelo de una célula ABC de ratón, deficiente y suficiente en *Bank1*, en el contexto de la autoinmunidad. En ausencia de *Bank1*, la vía de señalización del TLR7 se ve interrumpida, lo que resulta en una disminución en los niveles de varios factores de transcripción como *Tbx21* (T-bet). Por consiguiente, se forman menos ABCs, las cuales son IgG3$^+$, y se retienen en la zona marginal del bazo. En presencia de *Bank1*, aumenta la activación de la vía dependiente del TLR7, y se incrementa el número de ABCs IgG$^+$ e IgG2c$^+$, las cuales presentan un fenotipo de células de memoria atípicas (*Zeb2*) y de células plasmáticas (*Zbtb32*). En estas células, la presencia de *Bank1* también promueve la expresión de CXCR4, y su localización extrafolicular. Las ABCs de los ratones TLR7.tg6 exhiben un perfil de expresión génica de respuesta mayormente proinflamatorio, siendo más antiinflamatorio en los ratones deficientes en *Bank1*. Las ABCs provienen de las células del manto (marginales o de memoria), aumentadas en los ratones deficientes en TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$, y de las células naïve activadas, aumentadas en los ratones enfermos TLR7.tg6. Imagen creada en *BioRender*.

En este trabajo, si bien hemos visto que las ABCs son cruciales en los procesos autoinmunes, también nos encontramos con una subpoblación particular de células B que expresan genes estimulados por interferón (ISG), representada por el CL3, la cual está fuertemente influenciada por *Bank1*. Este gen desempeña un papel importante en la regulación de la expresión de una gran cantidad de genes estimulados por el interferón, lo que sugiere un mecanismo clave en la respuesta inmunitaria. Un detalle a tener en cuenta fue que las células del CL3 no siguen la misma trayectoria de desarrollo que las ABCs, sino que parecen surgir directamente de las células B naïve foliculares (CL0). Además, observamos que estas

células de respuesta a IFN muestran una predisposición hacia las respuestas proinflamatorias en los ratones TLR7.tg6, mientras que en ausencia de *Bank1*, esta predisposición se reduce, y de esta manera se mantiene un equilibrio homeostático en estas células. Cabe la posibilidad de que estas células respondan directamente al interferón tipo I (IFN-β), producido por las células estimuladas por la vía dependiente del TLR7. La disminución en su número podría estar relacionada con una reducción en la producción de IFN-β, atribuida a la disminución en la vía de señalización de TLR7 observada en ausencia de *Bank1* [81]. Un aspecto intrigante fue la identificación de un gen llamado *Cytip* (también conocido como *Cybr*) en las células del CL3 deficientes en *Bank1*. Este gen codifica para un factor de transcripción que inhibe la activación del factor de transcripción T-bet y, aunque inicialmente se ha estudiado su función solamente en células T humanas [360], su presencia en las células B sugiere un posible papel en la regulación de la respuesta inmunitaria en este contexto. A pesar de que aún no comprendemos completamente la importancia de las funciones de las células del CL3 en el proceso autoinmune, nuestras observaciones sugieren que podrían estar representando una sobrecarga del sistema, donde dichas células continúan diferenciándose sin un control regulado. Este descubrimiento plantea interrogantes sobre su papel en este contexto. Será fundamental entender los mecanismos que impulsan su desarrollo y sus funciones para avanzar en nuestra comprensión de cómo las células B se diferencian y su contribución a las enfermedades autoinmunes.

En definitiva, todos nuestros hallazgos subrayan la relevancia del gen *Bank1* en los procesos autoinmunes, especialmente en la patogénesis del LES, así como su contribución fundamental a la función y diferenciación de la subpoblación de las ABCs. Estos resultados sugieren que *Bank1* no solo desempeña un papel directo en la regulación de la respuesta inmune, sino que también podría influir de manera indirecta a través de cascadas de señalización complejas que aún deben ser completamente elucidadas. Además, destacamos el papel de *Bank1* en la presencia de células B que expresan genes estimulados por el IFN, lo que resalta su importancia en la respuesta inmune frente a infecciones virales y otros desencadenantes ambientales. En consecuencia, la investigación continua sobre *Bank1* es

imperativa para profundizar nuestra comprensión de los mecanismos subyacentes a las enfermedades autoinmunes y su relación con las respuestas innatas y adaptativas. Estos descubrimientos podrían complementar los tratamientos actuales al ofrecer nuevos enfoques terapéuticos y opciones más específicas para los pacientes de lupus, especialmente a aquellos que presenten las variantes de riesgo del gen *Bank1*. Además, la posibilidad de dirigir los tratamientos a las ABCs, en lugar de recurrir a la inmunosupresión global, generada por fármacos actuales como Belibumab o Rituximab, podría reducir la autorreactividad y la producción de autoanticuerpos en estos pacientes, mejorando así su calidad de vida.

En resumen, la investigación sobre *Bank1* emerge como un campo vital y prometedor en el desarrollo de estrategias terapéuticas más específicas y efectivas para las enfermedades autoinmunes, y su conocimiento es esencial para el avance y la mejora de los resultados clínicos en los pacientes afectados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La deficiencia de Bank1 mejora los signos de la enfermedad del LES, a nivel sérico, en los modelos transgénico TLR7.tg6 e inducido por IMQ, reduciendo los niveles de autoanticuerpos anti-dsDNA y anti-Sm, así como los niveles totales de la inmunoglobulina IgG y del isotipo patogénico IgG2c.

2. La ausencia de Bank1 produce una disminución de la esplenomegalia y una restauración parcial de las principales poblaciones de células B y T en el bazo, en los modelos transgénico TLR7.tg6 e inducido por IMQ.

3. La frecuencia total de las ABCs aumenta en los tres modelos de lupus mediados por el TLR7 (TLR7.tg6, inducido por IMQ y B6.Sle1.yaa). Bank1 tiene un efecto significativo en la formación y producción de las ABCs, y en su ausencia disminuye tanto el número de estas como su fenotipo IgG+ e IgG2c+.

4. Las ABCs son una población distintiva de células B, agrupadas en un único clúster, cuya proporción se reduce en los ratones deficientes de Bank1. Estas células están caracterizadas por la expresión de los marcadores clásicos, así como de nuevos genes específicos, relacionados con el fenotipo de células de memoria atípica, y de células plasmáticas.

5. En la caracterización de las ABCs se distinguen dos subpoblaciones: una de ellas formada por pre-ABCs en transición, y otra compuesta por las ABCs propiamente dichas, y totalmente diferenciadas.

6. Las ABCs de los ratones TLR7.tg6 exhibieron un perfil de respuestas mayormente proinflamatorio, siendo antiinflamatorio en los ratones enfermos Bank1$^{-/-}$.

7. En ausencia de Bank1, la diferenciación de las ABCs hacia un fenotipo de células plasmáticas se ve afectada, reduciéndose la expresión de Ighg1 e Ighg2c, así como de genes relacionados con la respuesta inmune, como Zeb2 y Zbtb32.

8. El análisis de trayectoria revela que las ABCs se originan a partir de células naïve activadas que se diferencian en células B de la zona marginal y de memoria, previo a obtener su fenotipo definitivo.

9. La deficiencia de Bank1 reduce significativamente un clúster distintivo de células cuyos genes son de respuesta al interferón, teniendo un papel importante en las vías de señalización dependientes del IFN. Además, esta ausencia normaliza los niveles de las células B naïve foliculares, o en reposo, y regula las poblaciones DZ_GC y naïve activadas.

10. Bank1 está implicado en la formación espontánea y desestructuración de los centros germinales, los cuales se reducen en su ausencia.

11. Las ABCs están localizadas en el área extrafolicular, donde podrían ser contribuyentes clave en la producción de autoanticuerpos. Su presencia en esta región disminuye en ausencia de Bank1. Además, Bank1 ejerce un efecto sobre la formación de estas áreas, modificando la presencia de las células Tefh, mediante la alteración en la expresión de CXCR4.

12. El número total de ABCs se correlaciona positivamente, y de manera significativa, con las células Tefh en el área extrafolicular, lo que implica una posible interacción entre ambas poblaciones y su posterior activación.

ANEXOS

ANEXOS

1. ARCHIVO DE DATOS SUPLEMENTARIO

Todos los genes y todas las vías o procesos biológicos obtenidos y analizados en el experimento del scRNA-Seq, realizado para esta tesis doctoral, se encuentran organizados en diferentes tablas de Excel, disponibles como material suplementario. Debido al volumen de los datos, estos archivos se han almacenado en un repositorio de libre acceso en la plataforma GitHub. El acceso a los archivos de datos se puede realizar a través del siguiente enlace: https://github.com/gonzaloghgenyo/Tablas-suplementarias-Tesis-GGH.git

Estas son las leyendas de las diferentes tablas, o archivos de datos, suplementarios anexados a este trabajo:

Archivo de datos S1. Tablas de los genes diferencialmente expresados entre los diferentes clústeres. Las columnas incluyen: Clúster de referencia: el cluster con respecto al cual se comparan los valores del resto de la fila; Identificador del gen (GeneID): símbolo o identificador único del gen; Valor de p ajustado (PvalAdj): valor de p corregido mediante el método de Bonferroni; Cambio en la expresión (AvgLog2FC): cambio en la expresión génica en escala logarítmica de base 2; Porcentaje en el clúster estudiado (pct1): porcentaje de células que expresan el gen en el clúster estudiado; Porcentaje en el clúster de referencia (pct2): porcentaje de células que expresan el gen en el clúster de referencia o clústeres comparados.

Archivo de datos S2. Tablas de los genes diferencialmente expresados entre los subclústeres del CL7, subCL7-0 y subCL7-1. Las columnas incluyen: Clúster de referencia: el cluster con respecto al cual se comparan los valores del resto de la fila; Identificador del gen (GeneID): símbolo o identificador único del gen; Valor de p ajustado (PvalAdj): valor de p corregido mediante el método de Bonferroni; Cambio en la expresión (AvgLog2FC): cambio

en la expresión génica en escala logarítmica de base 2; Porcentaje en el clúster estudiado (pct1): porcentaje de células que expresan el gen en el clúster estudiado; Porcentaje en el clúster de referencia (pct2): porcentaje de células que expresan el gen en el clúster de referencia o clústeres comparados.

Archivo de datos S3. Tablas de los genes diferencialmente expresados entre el grupo TLR7.tg6 y el grupo TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$, para cada clúster. Las columnas incluyen: Clúster de referencia: el cluster con respecto al cual se comparan los valores del resto de la fila; Identificador del gen (GeneID): símbolo o identificador único del gen; Valor de p ajustado (PvalAdj): valor de p corregido mediante el método de Bonferroni; Cambio en la expresión (AvgLog2FC(t7_vs_t7b1ko)): cambio en la expresión génica en escala logarítmica de base 2; Porcentaje en el clúster estudiado (pct_t7): porcentaje de células, del grupo T7, que expresan el gen en el clúster estudiado; Porcentaje en el clúster de referencia (pct_t7b1ko): porcentaje de células, del grupo T7.B1$^{-/-}$, que expresan el gen en el clúster de referencia o clústeres comparados.

Archivo de datos S4. Tabla con los procesos y vías biológicas diferencialmente regulados entre los diferentes clústeres. Las columnas incluyen: Clúster de referencia: el cluster con respecto al cual se comparan los valores del resto de la fila; Identificador de la anotación (AnnotationID): identificador único para cada vía o proceso específico, en base a la Ontología Génica (GO, *Gene Ontology*); Valor de p ajustado (PvalAdj): valor de p corregido mediante el método de Bonferroni; Cambio relativo (fold): cambio relativo, magnitud de cambio, o dirección, de una vía o proceso biológico en el clúster de estudio, en comparación con el clúster, o clústeres, de referencia, para los genes regulados al alza, o a la baja. Enriquecimiento relativo (relative_enrichment): grado de sobrerrepresentación de la vía, o proceso biológico, en el clúster de estudio, en comparación con el clúster, o clústeres, de referencia.

Archivo de datos S5. Tablas con los procesos y vías biológicas diferencialmente regulados entre el grupo TLR7.tg6 y el grupo TLR7.tg6.*Bank1*$^{-/-}$, para cada clúster. Las columnas incluyen: Clúster de referencia: el cluster con respecto al cual se comparan los valores del resto de la fila; Identificador de la anotación (AnnotationID): identificador único para cada vía o proceso específico, en base a la Ontología Génica (GO, *Gene Ontology*); Valor de p ajustado (PvalAdj): valor de p corregido mediante el método de Bonferroni; Cambio relativo (fold): cambio relativo, magnitud de cambio, o dirección, de una vía o proceso biológico en el clúster de estudio, en comparación con el clúster, o clústeres, de referencia, para los genes regulados al alza, o a la baja. Enriquecimiento relativo (relative_enrichment): grado de sobrerrepresentación de la vía, o proceso biológico, en el clúster de estudio, en comparación con el clúster, o clústeres, de referencia.

2. PUBLICACIÓN ORIGINAL QUE RESPALDA ESTA TESIS

Parte de los resultados que se muestran en esta tesis doctoral han sido previamente publicados en este artículo científico original:

Gómez Hernández, G., Domínguez, T., Galicia, G., Morell, M., & Alarcón-Riquelme, M. E. (2024). Bank1 modulates the differentiation and molecular profile of key B cell populations in autoimmunity. *JCI insight*, 9(19), e179417. https://doi.org/10.1172/jci.insight.179417

Según la información de licencia y los términos de uso de la revista *JCI Insight*: “Desde el 20 de agosto de 2020, todos los artículos se publican bajo la licencia CC BY 4.0 (del inglés *Creative Commons Attribution License*), la cual permite la máxima difusión y reutilización de materiales de acceso abierto. Esta licencia permite que cualquier persona pueda usar y compartir el contenido, incluso con fines comerciales, siempre que se mencione la fuente original (consultar la información legal completa en: https://insight.jci.org/kiosks/terms).

3. PUBLICACIONES ADICIONALES

Durante el trascurso y desarrollo del trabajo de esta tesis doctoral, se obtuvieron otras publicaciones adicionales:

Gómez Hernández, G., Morell, M., & Alarcón-Riquelme, M. E. (2021). The Role of BANK1 in B Cell Signaling and Disease. *Cells*, 10(5), 1184. https://doi.org/10.3390/cells10051184

Morell, M., Varela, N., Castillejo-López, C., Coppard, C., Luque, M. J., Wu, Y. Y., Martín-Morales, N., Pérez-Cózar, F., Gómez Hernández, G., Kumar, R., O'Valle, F., Alarcón-Riquelme, M. E., & Marañón, C. (2022). SIDT1 plays a key role in type I IFN responses to nucleic acids in plasmacytoid dendritic cells and mediates the pathogenesis of an imiquimod-induced psoriasis model. *EBioMedicine*, 76, 103808. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103808

4. FINANCIACIÓN

La realización de este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de una beca predoctoral (con referencia SAF2016-78631-P), otorgada en el marco de los proyectos de I+D del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2013-2016.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. McCullough, K.C. and A. Summerfield, *Basic concepts of immune response and defense development.* ILAR J, 2005. **46**(3): p. 230-40.
2. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response.* J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
3. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways.* Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
4. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
5. Nicholson, L.B., *The immune system.* Essays Biochem, 2016. **60**(3): p. 275-301.
6. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.* J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 1-5.
7. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.* Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
8. Ozato, K., H. Tsujimura, and T. Tamura, *Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system.* Biotechniques, 2002. **Suppl**: p. 66-8, 70, 72 passim.
9. Wieczorek, M., et al., *Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 292.
10. Koretzky, G.A., *Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation.* J Immunol, 2010. **185**(5): p. 2643-4.
11. Forthal, D.N., *Functions of Antibodies.* Microbiol Spectr, 2014. **2**(4): p. 1-17.
12. Lindsly, S., et al., *Understanding memory B cell selection.* J Theor Biol, 2021. **531**: p. 110905.
13. Lewis, S.M., A. Williams, and S.C. Eisenbarth, *Structure and function of the immune system in the spleen.* Sci Immunol, 2019. **4**(33).
14. Romagnani, S., *Immunological tolerance and autoimmunity.* Intern Emerg Med, 2006. **1**(3): p. 187-96.
15. Shepshelovich, D. and Y. Shoenfeld, *Prediction and prevention of autoimmune diseases: additional aspects of the mosaic of autoimmunity.* Lupus, 2006. **15**(3): p. 183-90.
16. Marson, A., W.J. Housley, and D.A. Hafler, *Genetic basis of autoimmunity.* J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2234-41.
17. Houen, G. and N.H. Trier, *Epstein-Barr Virus and Systemic Autoimmune Diseases.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 587380.
18. Zangiabadian, M., et al., *Associations of Yersinia Enterocolitica Infection with Autoimmune Thyroid Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis.* Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2021. **21**(4): p. 682-687.

19. Kuhn, A., J. Wenzel, and H. Weyd, *Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a critical review.* Clin Rev Allergy Immunol, 2014. **47**(2): p. 148-62.
20. Mousa, W.K., F. Chehadeh, and S. Husband, *Microbial dysbiosis in the gut drives systemic autoimmune diseases.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 906258.
21. Harbuz, M.S., et al., *Stress in autoimmune disease models.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1069**: p. 51-61.
22. Sudres, M., et al., *Pathophysiological mechanisms of autoimmunity.* Ann N Y Acad Sci, 2018. **1413**(1): p. 59-68.
23. Kaul, A., et al., *Systemic lupus erythematosus.* Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16039.
24. Sparks, J.A., *Rheumatoid Arthritis.* Ann Intern Med, 2019. **170**(1): p. ITC1-ITC16.
25. Brito-Zeron, P., et al., *Sjogren syndrome.* Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16047.
26. Lemus, H.N., A.E. Warrington, and M. Rodriguez, *Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair.* Neurol Clin, 2018. **36**(1): p. 1-11.
27. Kawasaki, E., *Type 1 diabetes and autoimmunity.* Clin Pediatr Endocrinol, 2014. **23**(4): p. 99-105.
28. Angum, F., et al., *The Prevalence of Autoimmune Disorders in Women: A Narrative Review.* Cureus, 2020. **12**(5): p. e8094.
29. Goldblatt, F. and S.G. O'Neill, *Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases.* Lancet, 2013. **382**(9894): p. 797-808.
30. Mallavarapu, R.K. and E.W. Grimsley, *The history of lupus erythematosus.* South Med J, 2007. **100**(9): p. 896-8.
31. Crampton, S.P., P.A. Morawski, and S. Bolland, *Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus.* Dis Model Mech, 2014. **7**(9): p. 1033-46.
32. Barber, M.R.W., et al., *Global epidemiology of systemic lupus erythematosus.* Nat Rev Rheumatol, 2021. **17**(9): p. 515-532.
33. Tian, J., et al., *Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study.* Ann Rheum Dis, 2023. **82**(3): p. 351-356.
34. Duarte-Garcia, A., et al., *Population-based incidence and time to classification of systemic lupus erythematosus by three different classification criteria: a Lupus Midwest Network (LUMEN) study.* Rheumatology (Oxford), 2022. **61**(6): p. 2424-2431.
35. Lau, C.S., G. Yin, and M.Y. Mok, *Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview.* Lupus, 2006. **15**(11): p. 715-9.
36. Hart, H.H., R.R. Grigor, and D.E. Caughey, *Ethnic difference in the prevalence of systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 1983. **42**(5): p. 529-32.
37. Seoane-Mato, D., et al., *Prevalence of rheumatic diseases in adult population in Spain (EPISER 2016 study): Aims and methodology.* Reumatol Clin (Engl Ed), 2019. **15**(2): p. 90-96.

38. Cortes Verdu, R., et al., *Prevalence of systemic lupus erythematosus in Spain: higher than previously reported in other countries?* Rheumatology (Oxford), 2020. **59**(9): p. 2556-2562.
39. Pons-Estel, G.J., et al., *Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus.* Semin Arthritis Rheum, 2010. **39**(4): p. 257-68.
40. Margery-Muir, A.A., et al., *Gender balance in patients with systemic lupus erythematosus.* Autoimmun Rev, 2017. **16**(3): p. 258-268.
41. Strickland, F.M., et al., *Environmental exposure, estrogen and two X chromosomes are required for disease development in an epigenetic model of lupus.* J Autoimmun, 2012. **38**(2-3): p. J135-43.
42. Bose, M. and C. Jefferies, *Sex bias in systemic lupus erythematosus: a molecular insight.* Immunometabolism (Cobham), 2022. **4**(3): p. e00004.
43. Cozier, Y.C., et al., *A prospective study of reproductive factors in relation to risk of systemic lupus erythematosus among black women.* Lupus, 2021. **30**(2): p. 204-210.
44. Brinks, R., et al., *Age-specific and sex-specific incidence of systemic lupus erythematosus: an estimate from cross-sectional claims data of 2.3 million people in the German statutory health insurance 2002.* Lupus Sci Med, 2016. **3**(1): p. e000181.
45. Dave, M., et al., *Global prevalence estimates of three chronic musculoskeletal conditions: club foot, juvenile idiopathic arthritis and juvenile systemic lupus erythematosus.* Pediatr Rheumatol Online J, 2020. **18**(1): p. 49.
46. Aggarwal, A., et al., *Outcomes in juvenile onset lupus: single center cohort from a developing country.* Lupus, 2018. **27**(11): p. 1867-1875.
47. Rees, F., et al., *The worldwide incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: a systematic review of epidemiological studies.* Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(11): p. 1945-1961.
48. Tikly, M. and S.V. Navarra, *Lupus in the developing world--is it any different?* Best Pract Res Clin Rheumatol, 2008. **22**(4): p. 643-55.
49. Fors Nieves, C.E. and P.M. Izmirly, *Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review.* Curr Rheumatol Rep, 2016. **18**(4): p. 21.
50. Borchers, A.T., et al., *The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus.* Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A277-87.
51. Londin, E., et al., *Use of linkage analysis, genome-wide association studies, and next-generation sequencing in the identification of disease-causing mutations.* Methods Mol Biol, 2013. **1015**: p. 127-46.
52. Ceccarelli, F., et al., *Genetic Factors in Systemic Lupus Erythematosus: Contribution to Disease Phenotype.* J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 745647.
53. Cui, Y., Y. Sheng, and X. Zhang, *Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS.* J Autoimmun, 2013. **41**: p. 25-33.
54. Teruel, M. and M.E. Alarcon-Riquelme, *The genetic basis of systemic lupus erythematosus: What are the risk factors and what have we learned.* J Autoimmun, 2016. **74**: p. 161-175.
55. Seaby, E.G., R.J. Pengelly, and S. Ennis, *Exome sequencing explained: a practical guide to its clinical application.* Brief Funct Genomics, 2016. **15**(5): p. 374-84.

56. Petersen, B.S., et al., *Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing.* BMC Genet, 2017. **18**(1): p. 14.
57. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus, G., et al., *Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXK, KIAA1542 and other loci.* Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 204-10.
58. Gateva, V., et al., *A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus.* Nat Genet, 2009. **41**(11): p. 1228-33.
59. Graham, R.R., et al., *A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus.* Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 550-5.
60. Alarcon-Segovia, D., et al., *Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1138-47.
61. Deapen, D., et al., *A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 1992. **35**(3): p. 311-8.
62. Kuo, C.F., et al., *Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families.* JAMA Intern Med, 2015. **175**(9): p. 1518-26.
63. Bentham, J., et al., *Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* Nat Genet, 2015. **47**(12): p. 1457-1464.
64. Gough, S.C. and M.J. Simmonds, *The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action.* Curr Genomics, 2007. **8**(7): p. 453-65.
65. Niu, Z., P. Zhang, and Y. Tong, *Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis.* Int J Rheum Dis, 2015. **18**(1): p. 17-28.
66. Relle, M. and A. Schwarting, *Role of MHC-linked susceptibility genes in the pathogenesis of human and murine lupus.* Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 584374.
67. Deshmukh, U.S., et al., *HLA-DR3 restricted T cell epitope mimicry in induction of autoimmune response to lupus-associated antigen SmD.* J Autoimmun, 2011. **37**(3): p. 254-62.
68. Remmers, E.F., et al., *STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.* N Engl J Med, 2007. **357**(10): p. 977-86.
69. Nath, S.K., et al., *A nonsynonymous functional variant in integrin-alpha(M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus.* Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 152-4.
70. Taylor, K.E., et al., *Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus.* PLoS Genet, 2008. **4**(5): p. e1000084.
71. Fagerholm, S.C., et al., *The CD11b-integrin (ITGAM) and systemic lupus erythematosus.* Lupus, 2013. **22**(7): p. 657-63.

72. Salloum, R. and T.B. Niewold, *Interferon regulatory factors in human lupus pathogenesis.* Transl Res, 2011. **157**(6): p. 326-31.
73. Kozyrev, S.V. and M.E. Alarcon-Riquelme, *The genetics and biology of Irf5-mediated signaling in lupus.* Autoimmunity, 2007. **40**(8): p. 591-601.
74. Demirkaya, E., et al., *New Horizons in the Genetic Etiology of Systemic Lupus Erythematosus and Lupus-Like Disease: Monogenic Lupus and Beyond.* J Clin Med, 2020. **9**(3).
75. Karimifar, M., et al., *Impacts of FcgammaRIIB and FcgammaRIIIA gene polymorphisms on systemic lupus erythematous disease activity index.* BMC Res Notes, 2021. **14**(1): p. 455.
76. Prokunina, L., et al., *A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans.* Nat Genet, 2002. **32**(4): p. 666-9.
77. Jacob, C.O., et al., *Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(15): p. 6256-61.
78. Lu, R., et al., *Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus.* Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 397-403.
79. Jiang, S.H., et al., *Functional rare and low frequency variants in BLK and BANK1 contribute to human lupus.* Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 2201.
80. Kozyrev, S.V., et al., *Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus.* Nat Genet, 2008. **40**(2): p. 211-6.
81. Wu, Y.Y., et al., *BANK1 Regulates IgG Production in a Lupus Model by Controlling TLR7-Dependent STAT1 Activation.* PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0156302.
82. Martinez-Bueno, M., et al., *Trans-Ethnic Mapping of BANK1 Identifies Two Independent SLE-Risk Linkage Groups Enriched for Co-Transcriptional Splicing Marks.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).
83. Grant, S.F., et al., *Association of the BANK 1 R61H variant with systemic lupus erythematosus in Americans of European and African ancestry.* Appl Clin Genet, 2009. **2**: p. 1-5.
84. Guo, L., et al., *Replication of the BANK1 genetic association with systemic lupus erythematosus in a European-derived population.* Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 531-8.
85. Barbhaiya, M. and K.H. Costenbader, *Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus.* Lupus, 2014. **23**(6): p. 588-95.
86. Zhou, S., et al., *A novel humanized cutaneous lupus erythematosus mouse model mediated by IL-21-induced age-associated B cells.* J Autoimmun, 2021. **123**: p. 102686.
87. Woo, J.M.P., et al., *The role of environmental exposures and gene-environment interactions in the etiology of systemic lupus erythematous.* J Intern Med, 2022. **291**(6): p. 755-778.
88. Zhang, L., et al., *Gut Microbiome and Metabolites in Systemic Lupus Erythematosus: Link, Mechanisms and Intervention.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 686501.

89. Vieira, S.M., O.E. Pagovich, and M.A. Kriegel, *Diet, microbiota and autoimmune diseases.* Lupus, 2014. **23**(6): p. 518-26.
90. Parks, C.G., et al., *Understanding the role of environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus.* Best Pract Res Clin Rheumatol, 2017. **31**(3): p. 306-320.
91. Gulati, G. and H.I. Brunner, *Environmental triggers in systemic lupus erythematosus.* Semin Arthritis Rheum, 2018. **47**(5): p. 710-717.
92. Costenbader, K.H., et al., *Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(4): p. 1251-62.
93. Liphaus, B.L. and M.H. Kiss, *The role of apoptosis proteins and complement components in the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus.* Clinics (Sao Paulo), 2010. **65**(3): p. 327-33.
94. Pan, L., et al., *Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus.* World J Pediatr, 2020. **16**(1): p. 19-30.
95. Pravda, J., *Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis at the Functional Limit of Redox Homeostasis.* Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 1651724.
96. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. 2012, Philadelphia: Elsevier/Saunders. x, 545 p.
97. Kawasaki, T. and T. Kawai, *Toll-like receptor signaling pathways.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 461.
98. Akira, S. and H. Hemmi, *Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family.* Immunol Lett, 2003. **85**(2): p. 85-95.
99. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie, *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 353-64.
100. Liu, G., L. Zhang, and Y. Zhao, *Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells.* Clin Exp Immunol, 2010. **160**(2): p. 168-75.
101. Barton, G.M. and J.C. Kagan, *A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 535-42.
102. Sameer, A.S. and S. Nissar, *Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility.* Biomed Res Int, 2021. **2021**: p. 1157023.
103. Troutman, T.D., J.F. Bazan, and C. Pasare, *Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K.* Cell Cycle, 2012. **11**(19): p. 3559-67.
104. Subramanian, S., et al., *A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 9970-5.
105. Liu, Z. and A. Davidson, *Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances.* Nat Med, 2012. **18**(6): p. 871-82.
106. Lau, C.M., et al., *RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement.* J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1171-7.
107. Satterthwaite, A.B., *TLR7 Signaling in Lupus B Cells: New Insights into Synergizing Factors and Downstream Signals.* Curr Rheumatol Rep, 2021. **23**(11): p. 80.

108. Deguine, J. and G.M. Barton, *MyD88: a central player in innate immune signaling.* F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 97.
109. Li, S., et al., *IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5567-72.
110. Walsh, M.C., J. Lee, and Y. Choi, *Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system.* Immunol Rev, 2015. **266**(1): p. 72-92.
111. Deng, L., et al., *Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain.* Cell, 2000. **103**(2): p. 351-61.
112. Konno, H., et al., *TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA.* PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5674.
113. Suthers, A.N. and S. Sarantopoulos, *TLR7/TLR9- and B Cell Receptor-Signaling Crosstalk: Promotion of Potentially Dangerous B Cells.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 775.
114. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.* Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
115. Saikh, K.U. and C.M. Ranji, *Cells Stimulated with More Than One Toll-Like Receptor-Ligand in the Presence of a MyD88 Inhibitor Augmented Interferon-beta via MyD88-Independent Signaling Pathway.* Viral Immunol, 2021. **34**(9): p. 646-652.
116. Barton, G.M., J.C. Kagan, and R. Medzhitov, *Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA.* Nat Immunol, 2006. **7**(1): p. 49-56.
117. Fillatreau, S., B. Manfroi, and T. Dorner, *Toll-like receptor signalling in B cells during systemic lupus erythematosus.* Nat Rev Rheumatol, 2021. **17**(2): p. 98-108.
118. Santiago-Raber, M.L., et al., *Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice.* J Autoimmun, 2010. **34**(4): p. 339-48.
119. Garcia-Ortiz, H., et al., *Association of TLR7 copy number variation with susceptibility to childhood-onset systemic lupus erythematosus in Mexican population.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(10): p. 1861-5.
120. Wang, C.M., et al., *Genetic variations in Toll-like receptors (TLRs 3/7/8) are associated with systemic lupus erythematosus in a Taiwanese population.* Sci Rep, 2014. **4**: p. 3792.
121. Souyris, M., et al., *TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells.* Sci Immunol, 2018. **3**(19).
122. Giltiay, N.V., et al., *Overexpression of TLR7 promotes cell-intrinsic expansion and autoantibody production by transitional T1 B cells.* J Exp Med, 2013. **210**(12): p. 2773-89.
123. Walsh, E.R., et al., *Dual signaling by innate and adaptive immune receptors is required for TLR7-induced B-cell-mediated autoimmunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(40): p. 16276-81.

124. Christensen, S.R., et al., *Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus.* Immunity, 2006. **25**(3): p. 417-28.
125. Jenks, S.A., et al., *Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus.* Immunity, 2018. **49**(4): p. 725-739 e6.
126. Dema, B. and N. Charles, *Autoantibodies in SLE: Specificities, Isotypes and Receptors.* Antibodies (Basel), 2016. **5**(1).
127. Suurmond, J. and B. Diamond, *Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity.* J Clin Invest, 2015. **125**(6): p. 2194-202.
128. Mok, C.C. and C.S. Lau, *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* J Clin Pathol, 2003. **56**(7): p. 481-90.
129. Tan, E.M., *Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology.* Adv Immunol, 1989. **44**: p. 93-151.
130. Giltiay, N.V., C.P. Chappell, and E.A. Clark, *B-cell selection and the development of autoantibodies.* Arthritis Res Ther, 2012. **14 Suppl 4**(Suppl 4): p. S1.
131. Han, S., et al., *Mechanisms of autoantibody production in systemic lupus erythematosus.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 228.
132. Mohan, C. and C. Putterman, *Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis.* Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(6): p. 329-41.
133. Petri, M., et al., *Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2677-86.
134. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
135. Aringer, M., N. Leuchten, and S.R. Johnson, *New Criteria for Lupus.* Curr Rheumatol Rep, 2020. **22**(6): p. 18.
136. Conti, F., et al., *Systemic Lupus Erythematosus with and without Anti-dsDNA Antibodies: Analysis from a Large Monocentric Cohort.* Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 328078.
137. Isenberg, D.A., et al., *Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?* Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(7): p. 1052-6.
138. Forger, F., et al., *Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis.* Lupus, 2004. **13**(1): p. 36-44.
139. Fenton, K., et al., *Anti-dsDNA antibodies promote initiation, and acquired loss of renal Dnase1 promotes progression of lupus nephritis in autoimmune (NZBxNZW)F1 mice.* PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8474.
140. Fismen, S., et al., *Circulating chromatin-anti-chromatin antibody complexes bind with high affinity to dermo-epidermal structures in murine and human lupus nephritis.* Lupus, 2009. **18**(7): p. 597-607.

141. DeGiorgio, L.A., et al., *A subset of lupus anti-DNA antibodies cross-reacts with the NR2 glutamate receptor in systemic lupus erythematosus.* Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1189-93.
142. Ahn, S.S., et al., *Anti-Smith antibody is associated with disease activity in patients with new-onset systemic lupus erythematosus.* Rheumatol Int, 2019. **39**(11): p. 1937-1944.
143. van Beers, J. and M.W.J. Schreurs, *Anti-Sm antibodies in the classification criteria of systemic lupus erythematosus.* J Transl Autoimmun, 2022. **5**: p. 100155.
144. Arroyo-Avila, M., et al., *Clinical associations of anti-Smith antibodies in PROFILE: a multi-ethnic lupus cohort.* Clin Rheumatol, 2015. **34**(7): p. 1217-23.
145. Zieve, G.W. and P.R. Khusial, *The anti-Sm immune response in autoimmunity and cell biology.* Autoimmun Rev, 2003. **2**(5): p. 235-40.
146. Yasuma, M., et al., *Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus.* J Rheumatol, 1990. **17**(4): p. 469-75.
147. Munves, E.F. and P.H. Schur, *Antibodies to Sm and RNP. Prognosticators of disease involvement.* Arthritis Rheum, 1983. **26**(7): p. 848-53.
148. Janwityanuchit, S., et al., *Anti-Sm: its predictive value in systemic lupus erythematosus.* Clin Rheumatol, 1993. **12**(3): p. 350-3.
149. Ni, J.D., et al., *Clinical and serological correlates of anti-Sm autoantibodies in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: 1,584 cases.* Rheumatol Int, 2009. **29**(11): p. 1323-6.
150. Lee, P.Y., et al., *TLR7-dependent and FcgammaR-independent production of type I interferon in experimental mouse lupus.* J Exp Med, 2008. **205**(13): p. 2995-3006.
151. Xu, Z., et al., *Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(7): p. 517-31.
152. Zhang, Q., et al., *Predominant Role of Immunoglobulin G in the Pathogenesis of Splenomegaly in Murine Lupus.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 3020.
153. Falconer, D.J. and A.W. Barb, *Mouse IgG2c Fc loop residues promote greater receptor-binding affinity than mouse IgG2b or human IgG1.* PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0192123.
154. Medina, K.L., *Overview of the immune system.* Handb Clin Neurol, 2016. **133**: p. 61-76.
155. Herrada, A.A., et al., *Innate Immune Cells' Contribution to Systemic Lupus Erythematosus.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 772.
156. Lee, J.Y. and S.H. Hong, *Hematopoietic Stem Cells and Their Roles in Tissue Regeneration.* Int J Stem Cells, 2020. **13**(1): p. 1-12.
157. Weiskopf, K., et al., *Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications.* Microbiol Spectr, 2016. **4**(5).
158. Bijl, M., et al., *Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement.* Ann Rheum Dis, 2006. **65**(1): p. 57-63.

159. Ren, Y., et al., *Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(10): p. 2888-97.
160. Kaewraemruaen, C., P. Ritprajak, and N. Hirankarn, *Dendritic cells as key players in systemic lupus erythematosus.* Asian Pac J Allergy Immunol, 2020. **38**(4): p. 225-232.
161. Ohl, L., et al., *CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions.* Immunity, 2004. **21**(2): p. 279-88.
162. Henriques, A., et al., *NK cells dysfunction in systemic lupus erythematosus: relation to disease activity.* Clin Rheumatol, 2013. **32**(6): p. 805-13.
163. Spada, R., J.M. Rojas, and D.F. Barber, *Recent findings on the role of natural killer cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* J Leukoc Biol, 2015. **98**(4): p. 479-87.
164. Montecino-Rodriguez, E. and K. Dorshkind, *The layered development of mouse B and T Cells.* Immunol Rev, 2022.
165. Ichii, M., K. Oritani, and Y. Kanakura, *Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse.* World J Stem Cells, 2014. **6**(4): p. 421-31.
166. Hoffman, W., F.G. Lakkis, and G. Chalasani, *B Cells, Antibodies, and More.* Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(1): p. 137-54.
167. Karrar, S. and D.S. Cunninghame Graham, *Abnormal B Cell Development in Systemic Lupus Erythematosus: What the Genetics Tell Us.* Arthritis Rheumatol, 2018. **70**(4): p. 496-507.
168. Lim, V.Y., et al., *A Chemoattractant-Guided Walk Through Lymphopoiesis: From Hematopoietic Stem Cells to Mature B Lymphocytes.* Adv Immunol, 2017. **134**: p. 47-88.
169. Clark, M.R., et al., *Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2014. **14**(2): p. 69-80.
170. 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.
171. Vossenkamper, A. and J. Spencer, *Transitional B cells: how well are the checkpoints for specificity understood?* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. **59**(5): p. 379-84.
172. Sanz, I., et al., *Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations.* Front Immunol, 2019. **10**: p. 2458.
173. Jin, W., Z. Luo, and H. Yang, *Peripheral B Cell Subsets in Autoimmune Diseases: Clinical Implications and Effects of B Cell-Targeted Therapies.* J Immunol Res, 2020. **2020**: p. 9518137.
174. Nagasawa, T., *Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 107-16.
175. Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel, *B-cell biology and development.* J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(4): p. 959-71.
176. Tipton, C.M., et al., *Diversity, cellular origin and autoreactivity of antibody-secreting cell population expansions in acute systemic lupus erythematosus.* Nat Immunol, 2015. **16**(7): p. 755-65.

177. Allman, D. and S. Pillai, *Peripheral B cell subsets.* Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 149-57.
178. Pillai, S. and A. Cariappa, *The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 767-77.
179. Meng, Q.H. and H.N. White, *CD21(int) CD23(+) follicular B cells express antigen-specific secretory IgM mRNA as primary and memory responses.* Immunology, 2017. **151**(2): p. 211-218.
180. MacLennan, I.C., *Germinal centers.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 117-39.
181. Panda, S.K., et al., *Galectin-9 inhibits TLR7-mediated autoimmunity in murine lupus models.* J Clin Invest, 2018. **128**(5): p. 1873-1887.
182. Allen, C.D., T. Okada, and J.G. Cyster, *Germinal-center organization and cellular dynamics.* Immunity, 2007. **27**(2): p. 190-202.
183. De Silva, N.S. and U. Klein, *Dynamics of B cells in germinal centres.* Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 137-48.
184. Domeier, P.P., S.L. Schell, and Z.S. Rahman, *Spontaneous germinal centers and autoimmunity.* Autoimmunity, 2017. **50**(1): p. 4-18.
185. Cho, S., et al., *Differential cell-intrinsic regulations of germinal center B and T cells by miR-146a and miR-146b.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2757.
186. Vossenkamper, A., P.M. Lutalo, and J. Spencer, *Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Transitional B cells in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: clinical implications and effects of B cell-targeted therapies.* Clin Exp Immunol, 2012. **167**(1): p. 7-14.
187. Cerutti, A., M. Cols, and I. Puga, *Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 118-32.
188. Cinamon, G., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone.* Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 713-20.
189. 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.
190. Chappell, C.P., et al., *Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses.* J Exp Med, 2012. **209**(10): p. 1825-40.
191. Pone, E.J., et al., *BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway.* Nat Commun, 2012. **3**: p. 767.
192. Rawlings, D.J., et al., *Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 282-94.
193. Thoreau, B., B. Chaigne, and L. Mouthon, *Role of B-Cell in the Pathogenesis of Systemic Sclerosis.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 933468.
194. Malkiel, S., et al., *Plasma Cell Differentiation Pathways in Systemic Lupus Erythematosus.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 427.
195. Kallies, A., et al., *Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression.* J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 967-77.

196. Krautler, N.J., et al., *Differentiation of germinal center B cells into plasma cells is initiated by high-affinity antigen and completed by Tfh cells.* J Exp Med, 2017. **214**(5): p. 1259-1267.
197. Chan, T.D., et al., *Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts.* J Immunol, 2009. **183**(5): p. 3139-49.
198. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
199. Aranburu, A., et al., *Clonal relationships of memory B cell subsets in autoimmune mice.* Front Immunol, 2023. **14**: p. 1129234.
200. Elsner, R.A. and M.J. Shlomchik, *Germinal Center and Extrafollicular B Cell Responses in Vaccination, Immunity, and Autoimmunity.* Immunity, 2020. **53**(6): p. 1136-1150.
201. Iwata, S. and Y. Tanaka, *B-cell subsets, signaling and their roles in secretion of autoantibodies.* Lupus, 2016. **25**(8): p. 850-6.
202. Hansen, A., et al., *Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome.* Arthritis Rheum, 2002. **46**(8): p. 2160-71.
203. Mingueneau, M., et al., *Cytometry by time-of-flight immunophenotyping identifies a blood Sjogren's signature correlating with disease activity and glandular inflammation.* J Allergy Clin Immunol, 2016. **137**(6): p. 1809-1821 e12.
204. Lugar, P.L., et al., *Molecular characterization of circulating plasma cells in patients with active systemic lupus erythematosus.* PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44362.
205. Paredes, J.L., R. Fernandez-Ruiz, and T.B. Niewold, *T Cells in Systemic Lupus Erythematosus.* Rheum Dis Clin North Am, 2021. **47**(3): p. 379-393.
206. Raphael, I., R.R. Joern, and T.G. Forsthuber, *Memory CD4(+) T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases.* Cells, 2020. **9**(3).
207. Zhang, X., et al., *Follicular helper T cells: new insights into mechanisms of autoimmune diseases.* Ochsner J, 2013. **13**(1): p. 131-9.
208. Kim, S.T., et al., *Human Extrafollicular CD4(+) Th Cells Help Memory B Cells Produce Igs.* J Immunol, 2018. **201**(5): p. 1359-1372.
209. Seth, A. and J. Craft, *Spatial and functional heterogeneity of follicular helper T cells in autoimmunity.* Curr Opin Immunol, 2019. **61**: p. 1-9.
210. Yoshitomi, H. and H. Ueno, *Shared and distinct roles of T peripheral helper and T follicular helper cells in human diseases.* Cell Mol Immunol, 2021. **18**(3): p. 523-527.
211. Perry, D., et al., *Murine models of systemic lupus erythematosus.* J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 271694.
212. Moser, K.L., et al., *Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus.* Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 373-9.
213. Deane, J.A., et al., *Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation.* Immunity, 2007. **27**(5): p. 801-10.
214. Satoh, M., et al., *Anti-nuclear antibody production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(24): p. 10934-8.

215. Via, C.S., *Advances in lupus stemming from the parent-into-F1 model.* Trends Immunol, 2010. **31**(6): p. 236-45.
216. Yokogawa, M., et al., *Epicutaneous application of toll-like receptor 7 agonists leads to systemic autoimmunity in wild-type mice: a new model of systemic Lupus erythematosus.* Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(3): p. 694-706.
217. Strasser, A., P.J. Jost, and S. Nagata, *The many roles of FAS receptor signaling in the immune system.* Immunity, 2009. **30**(2): p. 180-92.
218. Merino, R., L. Fossati, and S. Izui, *The lupus-prone BXSB strain: the Yaa gene model of systemic lupus erythematosus.* Springer Semin Immunopathol, 1992. **14**(2): p. 141-57.
219. Giannakopoulos, B., et al., *Deletion of the antiphospholipid syndrome autoantigen beta2 -glycoprotein I potentiates the lupus autoimmune phenotype in a Toll-like receptor 7-mediated murine model.* Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(8): p. 2270-80.
220. Morel, L., et al., *Polygenic control of susceptibility to murine systemic lupus erythematosus.* Immunity, 1994. **1**(3): p. 219-29.
221. Sobel, E.S., et al., *Genetic dissection of systemic lupus erythematosus pathogenesis: evidence for functional expression of Sle3/5 by non-T cells.* J Immunol, 2002. **169**(7): p. 4025-32.
222. Morel, L., et al., *Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6670-5.
223. Richard, M.L. and G. Gilkeson, *Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't.* Lupus Sci Med, 2018. **5**(1): p. e000199.
224. Fairhurst, A.M., A.E. Wandstrat, and E.K. Wakeland, *Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease.* Adv Immunol, 2006. **92**: p. 1-69.
225. Celhar, T. and A.M. Fairhurst, *Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories.* Rheumatology (Oxford), 2017. **56**(suppl_1): p. i88-i99.
226. Cojocaru, M., et al., *Manifestations of systemic lupus erythematosus.* Maedica (Bucur), 2011. **6**(4): p. 330-6.
227. Santiago-Raber, M.L., et al., *Evidence for genes in addition to Tlr7 in the Yaa translocation linked with acceleration of systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 2008. **181**(2): p. 1556-62.
228. Morel, L., et al., *The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1787-92.
229. Hwang, S.H., et al., *B cell TLR7 expression drives anti-RNA autoantibody production and exacerbates disease in systemic lupus erythematosus-prone mice.* J Immunol, 2012. **189**(12): p. 5786-96.
230. Pisitkun, P., et al., *Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication.* Science, 2006. **312**(5780): p. 1669-72.

231. Wallace, D.J., *The evolution of drug discovery in systemic lupus erythematosus.* Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(10): p. 616-20.
232. Bertsias, G.K., et al., *Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis.* Ann Rheum Dis, 2012. **71**(11): p. 1771-82.
233. Athanassiou, P. and L. Athanassiou, *Current Treatment Approach, Emerging Therapies and New Horizons in Systemic Lupus Erythematosus.* Life (Basel), 2023. **13**(7).
234. Vaughn, S.E., et al., *Genetic susceptibility to lupus: the biological basis of genetic risk found in B cell signaling pathways.* J Leukoc Biol, 2012. **92**(3): p. 577-91.
235. Yokoyama, K., et al., *BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP(3) receptor.* EMBO J, 2002. **21**(1-2): p. 83-92.
236. Fukunaga, R. and T. Hunter, *MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates.* EMBO J, 1997. **16**(8): p. 1921-33.
237. Takata, M., et al., *Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca2+ mobilization through distinct pathways.* EMBO J, 1994. **13**(6): p. 1341-9.
238. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes.* Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
239. Okada, T., et al., *BCAP: the tyrosine kinase substrate that connects B cell receptor to phosphoinositide 3-kinase activation.* Immunity, 2000. **13**(6): p. 817-27.
240. Lauenstein, J.U., et al., *Phosphorylation of the multifunctional signal transducer B-cell adaptor protein (BCAP) promotes recruitment of multiple SH2/SH3 proteins including GRB2.* J Biol Chem, 2019. **294**(52): p. 19852-19861.
241. Vincent, S., et al., *The Drosophila protein Dof is specifically required for FGF signaling.* Mol Cell, 1998. **2**(4): p. 515-25.
242. Iniesta, R., E. Guino, and V. Moreno, *[Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies].* Gac Sanit, 2005. **19**(4): p. 333-41.
243. Troutman, T.D., et al., *Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(1): p. 273-8.
244. Kozyrev, S.V., et al., *The dual effect of the lupus-associated polymorphism rs10516487 on BANK1 gene expression and protein localization.* Genes Immun, 2012. **13**(2): p. 129-38.
245. Jarvinen, T.M., et al., *Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signalling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population.* Rheumatology (Oxford), 2012. **51**(1): p. 87-92.
246. Suarez-Gestal, M., et al., *Replication of recently identified systemic lupus erythematosus genetic associations: a case-control study.* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. R69.

247. Budarf, M.L., et al., *A targeted association study in systemic lupus erythematosus identifies multiple susceptibility alleles.* Genes Immun, 2011. **12**(1): p. 51-8.
248. Langefeld, C.D., et al., *Transancestral mapping and genetic load in systemic lupus erythematosus.* Nat Commun, 2017. **8**: p. 16021.
249. Chang, Y.K., et al., *Association of BANK1 and TNFSF4 with systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese.* Genes Immun, 2009. **10**(5): p. 414-20.
250. Yang, W., et al., *Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus.* PLoS Genet, 2010. **6**(2): p. e1000841.
251. Guan, M., et al., *Identification of BANK1 polymorphisms by unlabelled probe high resolution melting: association with systemic lupus erythematosus susceptibility and autoantibody production in Han Chinese.* Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(3): p. 473-80.
252. Ramirez-Bello, J., et al., *BLK and BANK1 polymorphisms and interactions are associated in Mexican patients with systemic lupus erythematosus.* Inflamm Res, 2019. **68**(8): p. 705-713.
253. Alarcon-Riquelme, M.E., et al., *Genome-Wide Association Study in an Amerindian Ancestry Population Reveals Novel Systemic Lupus Erythematosus Risk Loci and the Role of European Admixture.* Arthritis Rheumatol, 2016. **68**(4): p. 932-43.
254. Sanchez, E., et al., *Identification of novel genetic susceptibility loci in African American lupus patients in a candidate gene association study.* Arthritis Rheum, 2011. **63**(11): p. 3493-501.
255. Yin, H., et al., *Association of STAT4 and BLK, but not BANK1 or IRF5, with primary antiphospholipid syndrome.* Arthritis Rheum, 2009. **60**(8): p. 2468-71.
256. Orozco, G., et al., *Study of functional variants of the BANK1 gene in rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 2009. **60**(2): p. 372-9.
257. Orozco, G., et al., *Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 2011. **70**(3): p. 463-8.
258. Dieude, P., et al., *BANK1 is a genetic risk factor for diffuse cutaneous systemic sclerosis and has additive effects with IRF5 and STAT4.* Arthritis Rheum, 2009. **60**(11): p. 3447-54.
259. Speliotes, E.K., et al., *Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index.* Nat Genet, 2010. **42**(11): p. 937-48.
260. Berndt, S.I., et al., *Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia.* Nat Commun, 2016. **7**: p. 10933.
261. Hong, K.W., et al., *A nonsynonymous SNP in BANK1 is associated with serum LDL cholesterol levels in three Korean populations.* J Hum Genet, 2015. **60**(3): p. 113-8.
262. Reksten, T.R., et al., *Genetic associations to germinal centre formation in primary Sjogren's syndrome.* Ann Rheum Dis, 2014. **73**(6): p. 1253-8.
263. Tang, J., et al., *Sequestosome 1/p62: A multitasker in the regulation of malignant tumor aggression (Review).* Int J Oncol, 2021. **59**(4).

264. Balkhi, M.Y., K.A. Fitzgerald, and P.M. Pitha, *Functional regulation of MyD88-activated interferon regulatory factor 5 by K63-linked polyubiquitination.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(24): p. 7296-308.
265. Dam, E.M., et al., *The BANK1 SLE-risk variants are associated with alterations in peripheral B cell signaling and development in humans.* Clin Immunol, 2016. **173**: p. 171-180.
266. Szydlowski, M., E. Jablonska, and P. Juszczynski, *FOXO1 transcription factor: a critical effector of the PI3K-AKT axis in B-cell development.* Int Rev Immunol, 2014. **33**(2): p. 146-57.
267. Gomez Hernandez, G., M. Morell, and M.E. Alarcon-Riquelme, *The Role of BANK1 in B Cell Signaling and Disease.* Cells, 2021. **10**(5).
268. Battersby, A., et al., *Isolation of proteins that interact with the signal transduction molecule Dof and identification of a functional domain conserved between Dof and vertebrate BCAP.* J Mol Biol, 2003. **329**(3): p. 479-93.
269. Diaz-Barreiro, A., et al., *The SLE variant Ala71Thr of BLK severely decreases protein abundance and binding to BANK1 through impairment of the SH3 domain function.* Genes Immun, 2016. **17**(2): p. 128-38.
270. Georg, I., et al., *BANK1 interacts with TRAF6 and MyD88 in innate immune signaling in B cells.* Cell Mol Immunol, 2020. **17**(9): p. 954-965.
271. Coustet, B., et al., *C8orf13-BLK is a genetic risk locus for systemic sclerosis and has additive effects with BANK1: results from a large french cohort and meta-analysis.* Arthritis Rheum, 2011. **63**(7): p. 2091-6.
272. Castillejo-Lopez, C., et al., *Genetic and physical interaction of the B-cell systemic lupus erythematosus-associated genes BANK1 and BLK.* Ann Rheum Dis, 2012. **71**(1): p. 136-42.
273. Monroe, J.G., *ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(4): p. 283-94.
274. Bernal-Quiros, M., et al., *BANK1 and BLK act through phospholipase C gamma 2 in B-cell signaling.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e59842.
275. Wang, D., et al., *Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors.* Immunity, 2000. **13**(1): p. 25-35.
276. Kurosaki, T. and M. Hikida, *Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes.* Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 132-48.
277. Aiba, Y., et al., *BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses.* Immunity, 2006. **24**(3): p. 259-68.
278. Ren, C.L., et al., *Signal transduction via CD40 involves activation of lyn kinase and phosphatidylinositol-3-kinase, and phosphorylation of phospholipase C gamma 2.* J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 673-80.
279. Hofmann, K. and J. Tschopp, *The death domain motif found in Fas (Apo-1) and TNF receptor is present in proteins involved in apoptosis and axonal guidance.* FEBS Lett, 1995. **371**(3): p. 321-3.
280. Hultmark, D., *Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. **199**(1): p. 144-6.

281. Kiripolsky, J., et al., *Tissue-specific activation of Myd88-dependent pathways governs disease severity in primary Sjogren's syndrome.* J Autoimmun, 2021. **118**: p. 102608.
282. Kawai, T., et al., *Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6.* Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1061-8.
283. Han, B. and J. Wu, *DcR3 protects islet beta cells from apoptosis through modulating Adcyap1 and Bank1 expression.* J Immunol, 2009. **183**(12): p. 8157-66.
284. Pour, P.M., J. Standop, and S.K. Batra, *Are islet cells the gatekeepers of the pancreas?* Pancreatology, 2002. **2**(5): p. 440-8.
285. Lucier, J. and R.S. Weinstock, *Type 1 Diabetes*, in *StatPearls*. 2024: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Ruth Weinstock declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
286. Fei, H., et al., *Requirements of calcium fluxes and ERK kinase activation for glucose- and interleukin-1beta-induced beta-cell apoptosis.* Mol Cell Biochem, 2008. **315**(1-2): p. 75-84.
287. Wu, Y.Y., et al., *BANK1 controls CpG-induced IL-6 secretion via a p38 and MNK1/2/eIF4E translation initiation pathway.* J Immunol, 2013. **191**(12): p. 6110-6.
288. Christensen, S.R., et al., *Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus.* J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 321-31.
289. Hiratsuka, T., et al., *ZFP521 contributes to pre-B-cell lymphomagenesis through modulation of the pre-B-cell receptor signaling pathway.* Oncogene, 2016. **35**(25): p. 3227-38.
290. Fugmann, T., et al., *The MHC Class II Immunopeptidome of Lymph Nodes in Health and in Chemically Induced Colitis.* J Immunol, 2017. **198**(3): p. 1357-1364.
291. Yang, J., et al., *BANK1 alters B cell responses and influences the interactions between B cells and induced T regulatory cells in mice with collagen-induced arthritis.* Arthritis Res Ther, 2018. **20**(1): p. 9.
292. Hao, Y., et al., *A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice.* Blood, 2011. **118**(5): p. 1294-304.
293. Rubtsov, A.V., et al., *Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c(+) B-cell population is important for the development of autoimmunity.* Blood, 2011. **118**(5): p. 1305-15.
294. Kenderes, K.J., et al., *T-Bet(+) IgM Memory Cells Generate Multi-lineage Effector B Cells.* Cell Rep, 2018. **24**(4): p. 824-837 e3.
295. Rubtsova, K., et al., *T-box transcription factor T-bet, a key player in a unique type of B-cell activation essential for effective viral clearance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(34): p. E3216-24.
296. Johnson, J.L., et al., *The Transcription Factor T-bet Resolves Memory B Cell Subsets with Distinct Tissue Distributions and Antibody Specificities in Mice and Humans.* Immunity, 2020. **52**(5): p. 842-855 e6.
297. Rubtsov, A.V., et al., *TLR7 drives accumulation of ABCs and autoantibody production in autoimmune-prone mice.* Immunol Res, 2013. **55**(1-3): p. 210-6.

298. Manni, M., E. Ricker, and A.B. Pernis, *Regulation of systemic autoimmunity and CD11c(+) Tbet(+) B cells by SWEF proteins.* Cell Immunol, 2017. **321**: p. 46-51.
299. Wang, S., et al., *IL-21 drives expansion and plasma cell differentiation of autoreactive CD11c(hi)T-bet(+) B cells in SLE.* Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1758.
300. Cancro, M.P., *Age-Associated B Cells.* Annu Rev Immunol, 2020. **38**: p. 315-340.
301. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.* Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
302. Peng, S.L., S.J. Szabo, and L.H. Glimcher, *T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5545-50.
303. Wang, N.S., et al., *Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and RORalpha.* Nat Immunol, 2012. **13**(6): p. 604-11.
304. Dorfman, D.M., et al., *T-bet, a T-cell-associated transcription factor, is expressed in a subset of B-cell lymphoproliferative disorders.* Am J Clin Pathol, 2004. **122**(2): p. 292-7.
305. Liu, Y., et al., *T-bet(+)CD11c(+) B cells are critical for antichromatin immunoglobulin G production in the development of lupus.* Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1): p. 225.
306. Manni, M., et al., *Regulation of age-associated B cells by IRF5 in systemic autoimmunity.* Nat Immunol, 2018. **19**(4): p. 407-419.
307. Naradikian, M.S., Y. Hao, and M.P. Cancro, *Age-associated B cells: key mediators of both protective and autoreactive humoral responses.* Immunol Rev, 2016. **269**(1): p. 118-29.
308. Mouat, I.C., I. Shanina, and M.S. Horwitz, *Age-associated B cells are long-lasting effectors that impede latent gammaHV68 reactivation.* Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 21189.
309. Song, W., et al., *Development of Tbet- and CD11c-expressing B cells in a viral infection requires T follicular helper cells outside of germinal centers.* Immunity, 2022. **55**(2): p. 290-307 e5.
310. Myles, A., P.J. Gearhart, and M.P. Cancro, *Signals that drive T-bet expression in B cells.* Cell Immunol, 2017. **321**: p. 3-7.
311. Nickerson, K.M., et al., *Age-associated B cells are heterogeneous and dynamic drivers of autoimmunity in mice.* J Exp Med, 2023. **220**(5).
312. Russell Knode, L.M., et al., *Age-Associated B Cells Express a Diverse Repertoire of V(H) and Vkappa Genes with Somatic Hypermutation.* J Immunol, 2017. **198**(5): p. 1921-1927.
313. Naradikian, M.S., et al., *Cutting Edge: IL-4, IL-21, and IFN-gamma Interact To Govern T-bet and CD11c Expression in TLR-Activated B Cells.* J Immunol, 2016. **197**(4): p. 1023-8.
314. Zumaquero, E., et al., *IFNgamma induces epigenetic programming of human T-bet(hi) B cells and promotes TLR7/8 and IL-21 induced differentiation.* Elife, 2019. **8**.
315. Di Niro, R., et al., *Salmonella Infection Drives Promiscuous B Cell Activation Followed by Extrafollicular Affinity Maturation.* Immunity, 2015. **43**(1): p. 120-31.

316. Knox, J.J., et al., *T-bet+ B cells are induced by human viral infections and dominate the HIV gp140 response.* JCI Insight, 2017. **2**(8).
317. Mouat, I.C., E. Goldberg, and M.S. Horwitz, *Age-associated B cells in autoimmune diseases.* Cell Mol Life Sci, 2022. **79**(8): p. 402.
318. Rubtsov, A.V., et al., *CD11c-Expressing B Cells Are Located at the T Cell/B Cell Border in Spleen and Are Potent APCs.* J Immunol, 2015. **195**(1): p. 71-9.
319. Scott, R.S., et al., *Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER.* Nature, 2001. **411**(6834): p. 207-11.
320. Aranburu, A., et al., *Age-associated B cells expanded in autoimmune mice are memory cells sharing H-CDR3-selected repertoires.* Eur J Immunol, 2018. **48**(3): p. 509-521.
321. Ren, W., et al., *Surrogate light chain is required for central and peripheral B-cell tolerance and inhibits anti-DNA antibody production by marginal zone B cells.* Eur J Immunol, 2015. **45**(4): p. 1228-37.
322. Sachinidis, A., K. Xanthopoulos, and A. Garyfallos, *Age-Associated B Cells (ABCs) in the Prognosis, Diagnosis and Therapy of Systemic Lupus Erythematosus (SLE).* Mediterr J Rheumatol, 2020. **31**(3): p. 311-318.
323. Wehr, C., et al., *A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE.* Clin Immunol, 2004. **113**(2): p. 161-71.
324. Ramskold, D., et al., *B cell alterations during BAFF inhibition with belimumab in SLE.* EBioMedicine, 2019. **40**: p. 517-527.
325. Rakhmanov, M., et al., *Circulating CD21low B cells in common variable immunodeficiency resemble tissue homing, innate-like B cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(32): p. 13451-6.
326. Saadoun, D., et al., *Expansion of autoreactive unresponsive CD21-/low B cells in Sjogren's syndrome-associated lymphoproliferation.* Arthritis Rheum, 2013. **65**(4): p. 1085-96.
327. Mouat, I.C. and M.S. Horwitz, *Age-associated B cells in viral infection.* PLoS Pathog, 2022. **18**(3): p. e1010297.
328. Rubtsova, K., et al., *Age-Associated B Cells: A T-bet-Dependent Effector with Roles in Protective and Pathogenic Immunity.* J Immunol, 2015. **195**(5): p. 1933-7.
329. Claes, N., et al., *Age-Associated B Cells with Proinflammatory Characteristics Are Expanded in a Proportion of Multiple Sclerosis Patients.* J Immunol, 2016. **197**(12): p. 4576-4583.
330. Mouat, I.C., et al., *Gammaherpesvirus infection drives age-associated B cells toward pathogenicity in EAE and MS.* Sci Adv, 2022. **8**(47): p. eade6844.
331. Liu, X., et al., *B cells expressing CD11b effectively inhibit CD4+ T-cell responses and ameliorate experimental autoimmune hepatitis in mice.* Hepatology, 2015. **62**(5): p. 1563-75.
332. Rubtsova, K., et al., *B cells expressing the transcription factor T-bet drive lupus-like autoimmunity.* J Clin Invest, 2017. **127**(4): p. 1392-1404.

333. Murakami, Y., et al., *Anti-TLR7 Antibody Protects Against Lupus Nephritis in NZBWF1 Mice by Targeting B Cells and Patrolling Monocytes.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 777197.
334. Ratliff, M., et al., *In senescence, age-associated B cells secrete TNFalpha and inhibit survival of B-cell precursors.* Aging Cell, 2013. **12**(2): p. 303-11.
335. Wu, Y.Y., et al., *Concordance of increased B1 cell subset and lupus phenotypes in mice and humans is dependent on BLK expression levels.* J Immunol, 2015. **194**(12): p. 5692-702.
336. Butler, A., et al., *Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species.* Nat Biotechnol, 2018. **36**(5): p. 411-420.
337. Mathew, N.R., et al., *Single-cell BCR and transcriptome analysis after influenza infection reveals spatiotemporal dynamics of antigen-specific B cells.* Cell Rep, 2021. **35**(12): p. 109286.
338. Korsunsky, I., et al., *Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony.* Nat Methods, 2019. **16**(12): p. 1289-1296.
339. Zappia, L. and A. Oshlack, *Clustering trees: a visualization for evaluating clusterings at multiple resolutions.* Gigascience, 2018. **7**(7).
340. Carmona-Saez, P., et al., *GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists.* Genome Biol, 2007. **8**(1): p. R3.
341. Harris, M.A., et al., *The Gene Ontology (GO) database and informatics resource.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Database issue): p. D258-61.
342. Garcia-Moreno, A., et al., *Functional Enrichment Analysis of Regulatory Elements.* Biomedicines, 2022. **10**(3).
343. Hoyer, B.F., et al., *Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice.* J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1577-84.
344. Steinmetz, T.D., et al., *Targeting plasma cells in systemic autoimmune rheumatic diseases - Promises and pitfalls.* Immunol Lett, 2023. **260**: p. 44-57.
345. Fairhurst, A.M., et al., *Yaa autoimmune phenotypes are conferred by overexpression of TLR7.* Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1971-8.
346. Tang, F., et al., *mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell.* Nat Methods, 2009. **6**(5): p. 377-82.
347. de Klerk, E. and P.A. t Hoen, *Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing.* Trends Genet, 2015. **31**(3): p. 128-39.
348. Stubbington, M.J.T., et al., *Single-cell transcriptomics to explore the immune system in health and disease.* Science, 2017. **358**(6359): p. 58-63.
349. Nehar-Belaid, D., et al., *Mapping systemic lupus erythematosus heterogeneity at the single-cell level.* Nat Immunol, 2020. **21**(9): p. 1094-1106.
350. Tabula Muris, C., et al., *Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris.* Nature, 2018. **562**(7727): p. 367-372.
351. Gao, X. and I.A. Cockburn, *The development and function of CD11c(+) atypical B cells - insights from single cell analysis.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 979060.

352. Perez-Mazliah, D., et al., *Plasmodium-specific atypical memory B cells are short-lived activated B cells.* Elife, 2018. **7**.
353. Masle-Farquhar, E., et al., *Uncontrolled CD21(low) age-associated and B1 B cell accumulation caused by failure of an EGR2/3 tolerance checkpoint.* Cell Rep, 2022. **38**(3): p. 110259.
354. Stewart, A., et al., *Single-Cell Transcriptomic Analyses Define Distinct Peripheral B Cell Subsets and Discrete Development Pathways.* Front Immunol, 2021. **12**: p. 602539.
355. Kim, C.C., et al., *FCRL5(+) Memory B Cells Exhibit Robust Recall Responses.* Cell Rep, 2019. **27**(5): p. 1446-1460 e4.
356. Tokuhisa, T., et al., *Transcriptional regulation of memory B cell development.* Mod Rheumatol, 2001. **11**(1): p. 1-5.
357. Yoon, H.S., et al., *ZBTB32 is an early repressor of the CIITA and MHC class II gene expression during B cell differentiation to plasma cells.* J Immunol, 2012. **189**(5): p. 2393-403.
358. Lu, T.T. and J.G. Cyster, *Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone.* Science, 2002. **297**(5580): p. 409-12.
359. Odegard, J.M., et al., *ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity.* J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2873-86.
360. Chang, S.L., et al., *Role of Cybr, a cytohesin binder and regulator, in CD4(+) T-cell function and host immunity.* Mol Immunol, 2009. **46**(16): p. 3218-23.
361. Cheng, J., G.K. Smyth, and Y. Chen, *Unraveling the timeline of gene expression: A pseudotemporal trajectory analysis of single-cell RNA sequencing data.* F1000Res, 2023. **12**: p. 684.
362. Al-Aubodah, T.A., et al., *The extrafollicular B cell response is a hallmark of childhood idiopathic nephrotic syndrome.* Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 7682.
363. Rubtsova, K., P. Marrack, and A.V. Rubtsov, *TLR7, IFNgamma, and T-bet: their roles in the development of ABCs in female-biased autoimmunity.* Cell Immunol, 2015. **294**(2): p. 80-3.
364. Jackson, S.W., et al., *Opposing impact of B cell-intrinsic TLR7 and TLR9 signals on autoantibody repertoire and systemic inflammation.* J Immunol, 2014. **192**(10): p. 4525-32.
365. Acharya, M., et al., *B Cell alphav Integrins Regulate TLR-Driven Autoimmunity.* J Immunol, 2020. **205**(7): p. 1810-1818.
366. Teichmann, L.L., et al., *Signals via the adaptor MyD88 in B cells and DCs make distinct and synergistic contributions to immune activation and tissue damage in lupus.* Immunity, 2013. **38**(3): p. 528-40.
367. Zhang, W., et al., *Excessive CD11c(+)Tbet(+) B cells promote aberrant T(FH) differentiation and affinity-based germinal center selection in lupus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(37): p. 18550-18560.
368. Du, S.W., et al., *Generation of functional murine CD11c(+) age-associated B cells in the absence of B cell T-bet expression.* Eur J Immunol, 2019. **49**(1): p. 170-178.

369. Dai, D., et al., *The transcription factor ZEB2 drives the formation of age-associated B cells.* Science, 2024. **383**(6681): p. 413-421.
370. Horns, F., C.L. Dekker, and S.R. Quake, *Memory B Cell Activation, Broad Anti-influenza Antibodies, and Bystander Activation Revealed by Single-Cell Transcriptomics.* Cell Rep, 2020. **30**(3): p. 905-913 e6.
371. Du, S.W., et al., *Functional Characterization of CD11c(+) Age-Associated B Cells as Memory B Cells.* J Immunol, 2019. **203**(11): p. 2817-2826.
372. Bergmann, B., et al., *Memory B cells in mouse models.* Scand J Immunol, 2013. **78**(2): p. 149-56.
373. Krishnamurty, A.T., et al., *Somatically Hypermutated Plasmodium-Specific IgM(+) Memory B Cells Are Rapid, Plastic, Early Responders upon Malaria Rechallenge.* Immunity, 2016. **45**(2): p. 402-14.
374. Zuccarino-Catania, G.V., et al., *CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype.* Nat Immunol, 2014. **15**(7): p. 631-7.
375. Jenks, S.A., et al., *Extrafollicular responses in humans and SLE.* Immunol Rev, 2019. **288**(1): p. 136-148.
376. Zhu, C., et al., *Regulation of the Development and Function of B Cells by ZBTB Transcription Factors.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 580.
377. Klinman, D.M., *IgG1 and IgG2a production by autoimmune B cells treated in vitro with IL-4 and IFN-gamma.* J Immunol, 1990. **144**(7): p. 2529-34.
378. Huda, R., et al., *IgG1 deficiency exacerbates experimental autoimmune myasthenia gravis in BALB/c mice.* J Neuroimmunol, 2015. **281**: p. 68-72.
379. Kumar, A., et al., *JNK pathway signaling: a novel and smarter therapeutic targets for various biological diseases.* Future Med Chem, 2015. **7**(15): p. 2065-86.
380. Mavropoulos, A., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)-mediated autoimmunity: lessons to learn from ANCA vasculitis and pemphigus vulgaris.* Autoimmun Rev, 2013. **12**(5): p. 580-90.
381. Saklatvala, J., *The p38 MAP kinase pathway as a therapeutic target in inflammatory disease.* Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 372-7.
382. Berkowitz, P., et al., *p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(34): p. 12855-60.
383. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway.* Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(1): p. 14-21.
384. Ohkubo, Y., et al., *A role for c-fos/activator protein 1 in B lymphocyte terminal differentiation.* J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7703-10.
385. Yang, H.S., et al., *Pdcd4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1 transactivation.* Oncogene, 2003. **22**(24): p. 3712-20.
386. Stagakis, E., et al., *Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression.* Ann Rheum Dis, 2011. **70**(8): p. 1496-506.
387. William, J., et al., *Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers.* Science, 2002. **297**(5589): p. 2066-70.

388. Voss, L.F., et al., *The extrafollicular response is sufficient to drive initiation of autoimmunity and early disease hallmarks of lupus.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 1021370.
389. Woodruff, M.C., et al., *Dysregulated naive B cells and de novo autoreactivity in severe COVID-19.* Nature, 2022. **611**(7934): p. 139-147.