



Universitat
de Barcelona

Dinámica de Linfocitos T en Autoinmunidad

Línea de investigación:
Neurociencias clínicas y experimentales

Sara Martínez Pasamar

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Dinámica de Linfocitos T en Autoinmunidad

**Línea de investigación:
Neurociencias clínicas y experimentales**

Sara Martínez Pasamar

Director de tesis: Dr. Pablo Villoslada

Mayo 2013



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Dinámica de Linfocitos T en autoinmunidad

Memoria presentada por Sara Martínez Pasamar para aspirar al grado de doctor en Medicina por la Universidad de Barcelona.

Vº Bº del director de trabajo

Dr. Pablo Villoslada Díaz

*“A los que corren en un laberinto,
su misma velocidad los confunde”*

Séneca

Dedico este trabajo a todos los que sufren y conviven con esta enfermedad; a todos aquellos que me acompañaron antes, a los que ya no están, a los que perdí por el camino, a los que el tiempo alejó de mi lado, a los que me ayudaron, a quienes me escucharon, a los que me lo hicieron difícil, a quienes me sanaron; pero sobre todo, a todos aquellos hombres y mujeres imprescindibles que hacen que mi trabajo merezca la pena y sin los que la vida no tendría sentido. A mi familia, que me ha animado a seguir luchando siempre.

Pero sobre todo, dedico este trabajo, con todo mi amor, a mi marido y mi hija Claudia, que vino con un gran pan bajo el brazo.



1-Agradecimientos

*“Cuando ya no duele la herida,
duele la cicatriz”*

Bertold Brecht

Lo primero de todo, quiero agradecer a Astrid Pañeda, por su apoyo incondicional y por ser la primera persona que me ayudó en este largo camino y me dio esperanzas para que no lo abandonara. También debo agradecer con especial cariño a Natalia Suárez por las horas y deshoras de laboratorio y su amistad. Por supuesto, no puedo olvidar a Susana Inogés, sus enseñanzas y la ayuda que me dio en el campo de la terapia celular. También quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio de Inmunología de la Clínica Universitaria de Navarra, a los que recuerdo siempre con cariño. No puedo olvidar a aquellas personas de Barcelona que supieron escucharme, animarme y que me hicieron el camino más fácil. Gracias a todo el laboratorio de neuroinmunología de Barcelona. Agradezco también a Manel Juan del laboratorio de Inmunología del Hospital Clinic de Barcelona y Ricard Cervera del Servicio de Enfermedades Autoinmunes del Hospital Clinic de Barcelona por su excepcional trato y sus enseñanzas en el campo de la Autoinmunidad. Merecen, por supuesto, un especial agradecimiento Elena Abad y Jordi García Ojalvo por su valiosa aportación y participación en este proyecto, concretamente por su trabajo en el campo de la Biología de Sistemas y en el modelo matemático. Gracias a Pablo Villoslada, mi director de tesis.

Por último, y sobre todo, agradezco a mi familia por lo que han aguantado a mi lado todos estos años.

Muchas gracias a todos.



2-Índice

1-Agradecimientos	9
2-Índice	15
3-Introducción	21
1. Autoinmunidad: Esclerosis Múltiple.....	23
2. Modelando la dinámica de la enfermedad autoinmune.....	36
3. Dinámica de linfocitos T en EM.....	40
4. Dinámica y papel de Linfocitos B.....	44
5. Anti CD20: Depleción de Linfocitos B en EAE. Implicaciones en inmunoterapia.....	46
6. Microglía en EAE: Papel en neuroinflamación.....	48
4-Hipótesis de trabajo y Objetivos	51
1. Hipótesis.....	53
2. Objetivos.....	53
5-Metodología	55
1. Preparación de Tetrámeros MHC clase II (IA ^b).....	57
2. Animales e inducción de EAE.....	59
3. Separación de células mononucleadas de bazo y SNC.....	60
4. Marcaje con el tetrámero y otros anticuerpos monoclonales en el marcaje de linfocitos T.....	61
5. Tratamiento con anti-CD20.....	64
6. Modelo Computacional.....	65
7. Análisis estadístico.....	65
6-Resultados	73
1. Producción de tetrámeros MHC Clase II (IA ^b)- MOG ₃₅₋₅₅	75
2. Producción de células antígeno- específicas.....	85

3. Dinámica de linfocitos T en EAE	86
4. Análisis computacional del modelo, simulaciones, sensibilidad y bifurcaciones.....	95
7-Discusión	107
1. Homeostasis y regulación cruzada de T_{eff} / T_{reg}	109
2. Linfocitos T autorreactivos en la fisiopatología de EM y EAE.....	112
3. Papel de la microglía en EM y EAE.....	114
4. Amplitudes de los picos de activación del $L.T_{MOG+}$	115
5. T_{reg} y ruptura de tolerancia en autoinmunidad	116
6. Papel del linfocito B en autoinmunidad del SNC	117
7. Implicaciones en inmunoterapia	119
8. Nuestro modelo, un acercamiento a la patogenia de EM desde la Biología de Sistemas.....	120
9. Algunas limitaciones en el análisis experimental	126
8-Aspectos éticos	129
9-Resumen y Conclusiones Beneficios de la Investigación	133
1. Resumen	135
2. Conclusiones.....	137
3. Implicaciones para la inmunoterapia.....	138
4. Conclusiones del estudio y la aproximación dentro del campo de la Biología de Sistemas.....	139
10-Bibliografía	141
11-Abreviaturas	161

12-Anexos	165
1. Anexo 1	167
IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell	
function are impaired in Multiple Sclerosis	
2. Anexo 2	167
Dynamic cross-regulation of antigen-specific effector	
and regulatory T cell subpopulations and microglia in brain autoimmunity ..	



3-Introducción

1. Autoinmunidad: Esclerosis Múltiple

a. Definición de Esclerosis Múltiple

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad del Sistema Nervioso Central (SNC) caracterizada por la presencia de inflamación, desmielinización, gliosis y daño axonal [1]

b. Prevalencia y Epidemiología

La EM se suele diagnosticar en la tercera o cuarta década, siendo únicamente un 5-10% diagnosticado antes de los 10 años o en mayores de 50 años. Las mujeres se afectan con una frecuencia dos veces mayor que los hombres, quienes son diagnosticados más tarde y tienen un curso más progresivo de la enfermedad. Individuos que viven más lejos del ecuador se afectan más frecuentemente, siendo los que viven en Europa, el sur de Australia, centro y norte América los de mayor riesgo (*Figura 1*). Los criterios de diagnóstico han tenido varias revisiones; los criterios de McDonald[2] con criterios clínicos, evidencia paraclínica, de laboratorio y las lesiones inflamatorias desmielinizantes diseminadas en espacio y tiempo; con resonancia magnética (MRI), análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) y los potenciales visuales evocados que ayudan en el diagnóstico, han reemplazado a los de Schumacher y Poser (*Figura2*) [3]. Se debe hacer un diagnóstico diferencial de EM con síndrome clínico aislado (CIS). El primer episodio de un paciente con un signo o síntoma compatible con EM, causado por desmielinización, se definirá como CIS [4].

Figura 1. Distribución geográfica de EM

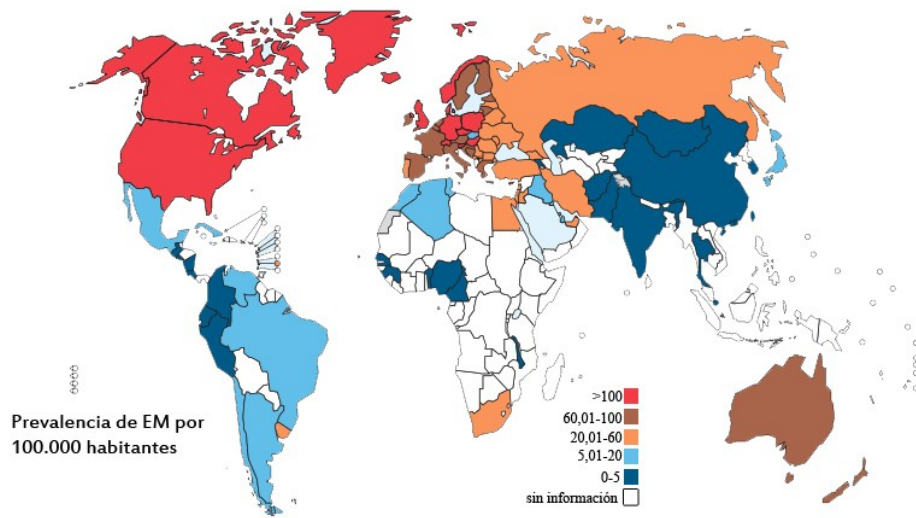


Figura 2. Criterios clínicos de Mc Donald para el diagnóstico de EM. [1]

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE Mc DONALD 2010	
PRESENTACIÓN CLÍNICA	INFORMACIÓN ADICIONAL NECESARIA PARA DIAGNÓSTICO
≥ 2 brotes; evidencia clínica objetiva de ≥2 lesiones o evidencia clínica objetiva de 1 lesión con una historia objetiva de 1 ataque previo.	Ninguna
≥ 2 brotes; evidencia clínica objetiva de ≥1 lesión	Diseminación en espacio demostrado por: ≥1 lesión T2 en al menos 2 de las 4 regiones típicas de EM (periventricular, juxtacortical, infratentorial o médula espinal) o esperar un brote clínico que implique un sitio diferente en SNC
≥1 brote; evidencia clínica objetiva de ≥2 lesión	Diseminación en tiempo demostrado por: Presencia simultánea de lesiones asintomáticas captantes o no de gadolínico en cualquier tiempo; o una nueva T2 y/o lesión captante de gadolínico en un seguimiento de MRI; independientemente del tiempo en referencia al scan basal; o esperar a un segundo brote clínico.
1 brote; evidencia clínica objetiva de 1 lesión (síndrome clínico aislado)	Diseminación en espacio y tiempo, demostrado por: Para DIS: ≥1 lesión T2 en al menos 2 de las 4 regiones típicas de EM (periventricular, juxtacortical, infratentorial o médula espinal) o esperar un brote clínico que implique un sitio diferente en SNC Para DIT: Presencia simultánea de lesiones asintomáticas captantes o no de gadolínico en cualquier tiempo; o una nueva T2 y/o lesión captante de gadolínico en un seguimiento de MRI; independientemente del tiempo en referencia al scan basal; o esperar a un segundo brote clínico
Progresión neurológica insidiosa sugestiva de MS (PPMS)	1 año de progresión de enfermedad (retrospectivamente o prospectivamente determinada) más 2 de los 3 criterios siguientes: 1. Evidencia de DIS en el cerebro basado en ≥1 lesión T2 en regiones características de MS-(periventricular, juxtacortical, o infratentorial) 2. Evidencia de DIS en médula ósea basado en ≥2 lesiones T2 3. CSF Positivo (bandas oligoclonales y/o IgG elevado)

DIS :diseminación en espacio
DIT: diseminación en tiempo
PPMS : EM primariamente progresiva
LCR: Líquido cefalorraquídeo

c. **Características clínico-patológicas y tipos de EM**

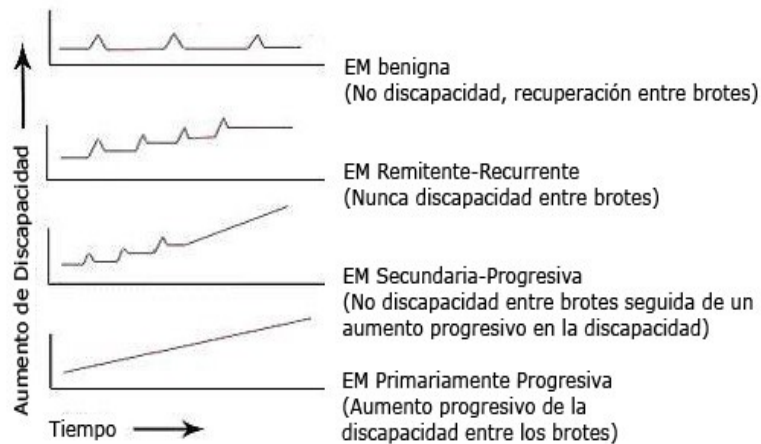


Figura 3. Subtipos de EM

EM típicamente sigue un curso remitente recurrente en sus etapas tempranas, que toman un tiempo y posteriormente se resuelven. Esta presentación aparece en un 80-85% de los pacientes. A este subtipo se le conoce como EM remitente-recurrente (RR) [5,6]. El curso típico de esta forma de enfermedad son los brotes que se resuelven completamente o parcialmente, quedando algún déficit, y eventualmente, la aparición de la forma progresiva. Aproximadamente, el 50% de los individuos diagnosticados de EMRR entrarán en un segunda fase progresiva (secundariamente progresiva, EMSP) después de 10 años del diagnóstico, mientras que un 15-20% experimentarán la forma progresiva desde el comienzo (primariamente progresiva, PP) (*Figura 3*).

El pronóstico de EM varía significativamente. Aproximadamente, un 10% de los pacientes funcionan bien durante 20 o más años [2]. La esperanza de vida se reduce en 5 años, pero solo en aquellos pacientes con

secuelas significativas; la mayoría de pacientes mueren por otras causas [6]. Los pacientes con neuritis óptica, mielitis transversa, afectación motora o disfunción de la marcha, por ejemplo, tienen peor pronóstico; mientras que los pacientes con síntomas visuales o sensoriales como síntoma dominante tienen mejor pronóstico, así como ser mujer, la edad temprana en el diagnóstico, y la recuperación completa de los brotes. Se ha postulado que el embarazo tiene un efecto protector, debido al elevado nivel de estrógenos durante el mismo, lo cual regula la respuesta inmune en EM [7-9].

d. **Patogénesis y patofisiología**

EM es una enfermedad crónica inflamatoria del SNC que está caracterizada por una amplia y compleja respuesta del sistema inmunológico (SI) y que tiene un curso remitente recurrente que la caracteriza.

- *Factores y riesgo genético: HLA*

Muchos estudios han confirmado que los genes de HLA (Human Leucocyte Antigen) de clase II confieren un riesgo para EM. Ya en 1972 se demostró que EM estaba asociada a alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Más tarde se vio que, en concreto, esta susceptibilidad se asociaba a genes del HLA- DRB1. En los descendientes del oeste de Europa caucásicos se trata, en concreto, de dos genes del HLA-DRB1: el haplotipo HLA-DR15, DRB1*1501 y DRB5*0101 [10-13]. Estudios de ligamiento han visto que el HLA de clase II en la región del cromosoma 6 p21 es significativo, pero sólo cuenta en una porción de la susceptibilidad a EM. Después se ha conocido gracias al análisis de polimorfismos de nucleótidos (single nucleotide polymorphisms ,SNPs)

que otras variables genéticas influyen en el desarrollo de EM, en su progresión y fenotipo, pero de manera menor; como por ejemplo IL7RA, IL2RA, CLEC16A, CD58, CD6, IRF8, KIF21B, TMEM39A y TNFRSF1A [13-15]. Se han hecho nuevos estudios genéticos con grandes poblaciones, GWAS (Genome Wide Association Studies), buscando genes susceptibles. Teniendo en cuenta los loci susceptibles de la enfermedad, son necesarias grandes cohortes de individuos para genotipar en cada enfermedad específica el espectro de variaciones, gracias al uso de chips, secuenciando regiones y genes candidatos, para identificar mutaciones y variantes estructurales (inserciones, deleciones, polimorfismos, CNVs, etc.) en la búsqueda sistemática de las diferencias y las similitudes entre ellos [16-20] (Figura 4).

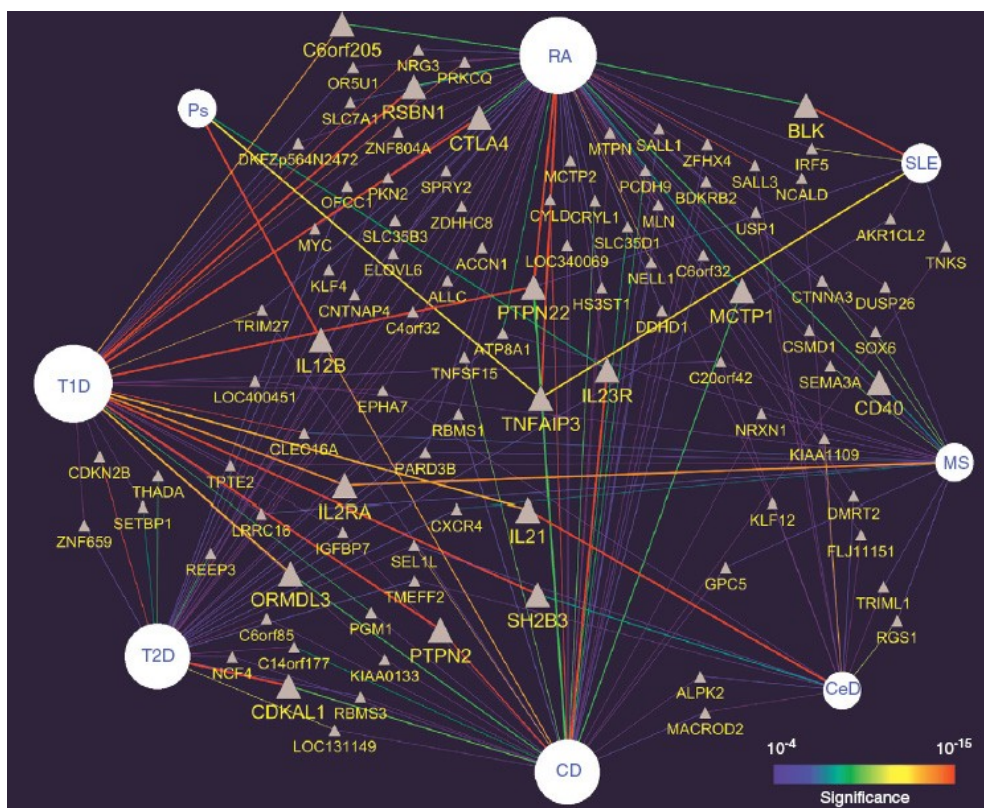


Figura 4. Genes implicados en autoinmunidad. Imagen tomada de Baranzini, 2011” Revealing the genetic basis of multiple sclerosis:are we there yet?”[20]. Genes implicados en autoinmunidad y su conexión en las diferentes enfermedades autoinmunes (RA: artritis reumatoide, T1D: Diabetes tipo 1, Ps: Psoriasis, CD: Enfermedad de Crohn, CeD: Enfermedad Celíaca MS: Esclerosis Múltiple, SLE: Lupus Eritematoso Sistémico y T2D: Diabetes tipo 2.

- *Mimetismo molecular*

La hipótesis del mimetismo molecular incluye patógenos virales y otros antígenos extraños (proteínas de herpes, sarampión, influenza y otros virus) que portan epítomos con determinantes antigénicos que son similares a aquellos que provocan la activación de los linfocitos T del huésped (proteína básica de la mielina (MBP) o glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG)[21-23].

El virus de Epstein-Barr (EBV) es un herpes virus humano que persiste en la memoria de las células B en la mayoría de la población mundial en una forma latente. Las proteínas del EBV líticas y latentes llevan a cabo una fuerte respuesta inmune. El aumento de replicación lítica puede resultar en una nueva infección- y transformación-y por tanto, un factor de riesgo de transformación maligna y enfermedad autoinmune. Algunas proteínas líticas o latentes de EBV pueden llevar a cabo una reacción cruzada con antígenos celulares y ocurrir procesos patológicos mediante mimetismo molecular que resultaría en EM, SLE y AR, entre otros [24,25].

- *Privilegio inmune y paso de linfocitos al SNC*

En cualquier caso, bien sea iniciado por la similitud molecular o la exposición a autoantígenos, la respuesta inmunológica que precede es muy compleja; ya que una vez comenzada esta respuesta en la periferia, las poblaciones celulares del SI tanto natural como adaptativo migrarán al SNC atravesando la barrera hemato-encefálica (BHE), mediante el proceso de recirculación, asentamiento y adhesión, facilitado por la expresión de integrinas y selectinas en los linfocitos T activados y la unión a las células

del endotelio en los vasos del SNC, mediado por moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1, o E-Selectina [26-28].

Una vez allí, astrocitos, microglía y macrófagos actuarán como células presentadoras de antígeno (CPA) gracias a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); presentando el antígeno a linfocitos T CD4+ que podrán adquirir un perfil Th1, Th2 o Th17 en función de la influencia de interleukinas, citoquinas, etc, con la activación también de la producción de anticuerpos por parte de linfocitos B. Se ha postulado que en un primer momento, podría ocurrir una respuesta inicial más auto inflamatoria (celular y humoral) seguida por una fase más tardía, con la aparición de apoptosis e isquemia, daño primario glial y escasa remielinización; aunque con esta acepción no se describen completamente todas las lesiones que presentan los pacientes a lo largo de la enfermedad [14,29].

- *Proceso Autoinmune*

EM se considera una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T; siendo responsables de la patogenia de la enfermedad durante las etapas precoces de aparición de nuevas lesiones [30-32]. Probablemente, se trate de linfocitos T auto-reactivos dirigidos contra antígenos del SNC [33], aunque los antígenos frente a los cuales se desarrolla la respuesta inmune son desconocidos por ahora [34]. Después de una primera fase inflamatoria con su respuesta reparadora tendrá lugar un proceso degenerativo, que afectará a la viabilidad neuronal y la glía (*Figura 5*).

Se trata de una enfermedad que se ha dividido en varias formas de evolución, aunque no se debe olvidar que EM es heterogénea. Tanto en la

clínica y curso de la enfermedad como en la respuesta al tratamiento los pacientes difieren entre sí. Actualmente, se está investigando el papel y caracterización de las poblaciones auto-reactivas contra componentes de la mielina como MBP o MOG, para entender mejor una parte de su patogénesis y de la fisiología del SI [35-39].

Las teorías que tratan de explicar la patología de la enfermedad asumen que el balance entre las células inflamatorias que producen daño tisular, entre otros, linfocitos T efectores (T_{eff}) [40-42] y las células que regulan la respuesta inmune inflamatoria, linfocitos T reguladores, (T_{reg}), está alterado con trastorno de la tolerancia periférica [43-47]. Esta supresión y control defectuoso debe estar relacionado con la susceptibilidad que presentan ciertos pacientes de tener la enfermedad autoinmune y con su naturaleza remitente-recurrente en algunos casos. Mientras que nuevos linfocitos T_{eff} son necesarios para poder mantener una respuesta inmune en el momento y tiempo adecuado, será preciso que linfocitos T_{reg} sean capaces de mantener el SI bajo control con la intención de prevenir una respuesta inflamatoria excesiva y la aparición de autoinmunidad [48-50]. Por lo tanto, según esta teoría, la expansión y disminución de T_{eff} y T_{reg} durante las enfermedades remitentes-recurrentes debe oscilar, suceder en sincronía y de manera interrelacionada con la población de linfocitos B (B_{eff} y B_{reg}) [51-57].

Clásicamente se pensaba que la respuesta efectora del SI en EM era mediada por linfocitos CD4+ Th1, con producción de $IFN\gamma$ como citoquina protagonista. Actualmente, se ha encontrado evidencia gracias a los modelos animales de encefalitis alérgica experimental (EAE), de que existe también una producción de IL-17 y una respuesta de linfocitos CD4+ con perfil Th17, aunque la aparición de estas respuestas difiere según el momento y evolución de EAE [58-63].

No está claro todavía si en EM los linfocitos T_{reg} ejercen su función en la periferia o *in situ* en el SNC [64]. Se ha visto que en EAE, el número de linfocitos T_{reg} es adecuado, no siendo así su función [65]. Se ha postulado que esto podría ser un efecto del micro ambiente rico en TGF e IL-6 en el foco inflamatorio, lo cual inhibiría la función reguladora de esta población [66]. Del mismo modo, se ha observado que las fases de recuperación se asocian a un aumento en la liberación de IL-10 producida presuntamente por linfocitos T_{reg} Foxp3+ [67-69] aunque también se habla de una población B_{reg} productora de IL-10 [70].

Figura 5. El proceso autoinmune en EM



- *Treg y Tr1*

Los linfocitos T_{reg} son uno de los mecanismos que previenen la aparición de enfermedades autoinmunes. Existen varias poblaciones de T_{reg} descritas, incluyendo las T_{reg} naturales CD4+CD25+Foxp3+ y las T_{reg} adquiridas como son las Tr1 y las Th3 [71]. Las Tr1 se definen por la producción de altos niveles de IL-10 con capacidad supresora, y niveles algo más moderados de TGF β e IFN γ ; no producen IL-4 y tienen poca capacidad de proliferación [72,73]. Las células Tr1 participan en el mantenimiento de la tolerancia periférica porque suprimen la activación de linfocitos T autorreactivos [74,75]. En pacientes con EM ambas

poblaciones, Tr1 y T_{reg} naturales CD4+CD25+Foxp3+ presentan una función alterada [76,77]

e. **Tratamiento actual de EM**

La EM es una enfermedad neurológica común en adultos jóvenes. Su progreso es incierto e impredecible y el mismo está asociado a un mayor o menor grado de discapacidad, la cual disminuye la calidad de vida del paciente. Hoy en día, el pronóstico del paciente se define basándose en la información resultante de pruebas clínicas: la tasa de recaídas y las escalas de discapacidad, y pruebas diagnósticas: resonancia magnética (MRI) y bandas oligoclonales en líquido cefalorraquídeo (LCR).

Las terapias como interferon- β , acetato de glatiramer, natalizumab y quimioterapia disminuyen el número de recaídas pero previenen el desarrollo de incapacidad de manera parcial. Interferón es seguro, pero tiene poca eficacia y presenta efectos adversos. Natalizumab, un anticuerpo monoclonal se une al linfocito T y previene que éste cruce la BHE, con riesgo de causar infección y en algún caso leucoencefalopatía multifocal progresiva.[78-80]. Ambas terapias de primera línea, interferon- β y acetato de glatiramer, tienen como objetivo disminuir la inflamación. Existen nuevos fármacos en desarrollo: orales (fingolimod- que tiene como diana el linfocito T [81], laquinimod-reduce la cantidad de citoquinas liberadas por las células inmunes y por tanto, reduce la inflamación. También disminuye la habilidad del linfocito T de cruzar la BHE, teriflunomida- es un inhibidor de una enzima mitocondrial que bloquea la producción de algunas células T y previene la división de ciertas células T y B [82], BG-12 [dimetil fumarato]- no está claro su funcionamiento pero se piensa que es un neuroprotector por varias vías, teniendo también efecto

anti-inflamatorio.-, cladribina oral-actúa inhibiendo una enzima metabólica en el linfocito T, causando su muerte., dalfampridina) y anticuerpos monoclonales (daclizumab, alemtuzumab-el cual funciona “reseteando” el SI, ya que tiene como diana CD52 y depleciéndola [83], rituximab, ocrelizumab, y ofatumumab [83-89]

Es necesario que se investiguen y desarrollen nuevas terapias que incidan de manera más profunda sobre la causa de la enfermedad, pudiendo desarrollarse en un futuro una medicina más personalizada y dirigida. El propósito de la medicina personalizada es poder predecir el curso y la evolución de la enfermedad, de tal manera que se pueda estratificar a los diferentes pacientes en subgrupos para poder, en primer término, diagnosticar más precisamente la enfermedad en cuanto a pronóstico, tratamiento y respuesta al mismo [90-91].

f. Modelo animal de EM: Encefalitis Autoinmune Experimental

La Encefalitis Autoinmune Experimental es un modelo animal de EM ampliamente utilizado que está caracterizado por un ataque inflamatorio contra los componentes de la mielina en el SNC. La EAE estaría, primeramente, mediado por linfocitos T CD4+ dirigidos frente a auto antígenos de la mielina en el SNC [1]. Se ha visto que transfiriendo linfocitos CD4+ a un huésped sano se induce EAE [92-94].

g. Tecnología de los Tetrámeros

Actualmente, se sabe poco acerca de la evolución y dinámica de linfocitos T_{eff} y T_{reg} antígeno específicos durante la historia de las enfermedades autoinmunes [95]. La tecnología de los tetrámeros, formados por moléculas del MHC unido a un péptido, se ha usado para detectar linfocitos T antígeno específicos durante la respuesta inmune *in vivo*. Generar tetrámeros de clase I ha sido útil en diversos estudios; pero detectar linfocitos T antígeno específicos utilizando tetrámeros de clase II [96-100] es más complicado debido a la baja afinidad del TCR, entre otras causas.

2. Modelando la dinámica de la enfermedad autoinmune

a. Una perspectiva fisiológica de la enfermedad autoinmune: el concepto de enfermedad dinámica

- *Oscilaciones en sistemas fisiológicos: el concepto de homeostasis y ritmos circadianos*

La palabra homeostasis viene del griego (*homos*: similar y *estasis*: posición o estabilidad) y define la característica que tienen los sistemas vivos de mantener una condición estable y constante. La homeostasis se mantiene gracias a ajustes dinámicos del equilibrio y los mecanismos de autorregulación. Los sistemas complejos se basan en sus propiedades de robustez y adaptabilidad para mantener el estado de homeostasis al estar sometidos a diferentes perturbaciones. Algunos ritmos fisiológicos se basan en sistemas oscilatorios para mantener la homeostasis del organismo. Los ritmos circadianos son oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de tiempo. Algunos ejemplos de variaciones rítmicas fisiológicas son la temperatura, los niveles de cortisol, el latido cardíaco, o la presión arterial.

b. La enfermedad dinámica

Las enfermedades dinámicas son aquellas enfermedades debidas a alteraciones en los ritmos fisiológicos (sistemas oscilatorios) [101]. Pueden definirse por cambios cualitativos; puede tratarse de la presencia de un nuevo periodo en un sistema periódico, como por ejemplo, una arritmia cardíaca (bloqueo AV), síndrome de Cheyne-Stokes o Biot breathing (respiración en cluster), trastorno bipolar maniaco-depresivo, anemia

hemolítica autoinmune, o la leucemia mieloide crónica; pero también puede suceder en la pérdida de un proceso rítmico fisiológico, por ejemplo, arritmia cardíaca (fibrilación ventricular), o apnea.

Para cada estímulo inmunológico o respuesta proinflamatoria hay uno o más elementos que se contraponen como mecanismo de control. Estos mecanismos inhibitorios pueden ser de varios tipos, pueden actuar inmediatamente o tener un retraso en el tiempo de ejecución, ser a nivel de gen, de mRNA o de proteína. En cualquier caso, lo que tienen en común es que proporcionan al sistema inmune la capacidad de regularse en intensidad, duración y alcance de los procesos pro-inflamatorios que proporcionan respuesta a los patógenos pero que también pueden dañar al huésped [102]. Cada organismo cuenta con múltiples circuitos y mecanismos de autorregulación para poder mantener esta homeostasis; entre ellos se encuentran sistemas de autorregulación tanto negativos como positivos con cascadas de señales y circuitos de retroalimentación negativa y positiva. En muchas ocasiones estas redes se autorregulan mutuamente. En un sistema complejo, si ocurre una perturbación que va dirigida hacia un componente clave del sistema, el mismo tendrá que evolucionar hacia otro estado de equilibrio aunque sea una dinámica de enfermedad. En un análisis dinámico se examinará cómo el sistema evoluciona a lo largo del tiempo y por tanto qué cambios ocurren en sus nodos y conexiones [103-106].

**c. La dinámica en enfermedades autoinmunes:
Modelando la dinámica de linfocitos en autoinmunidad**

Las limitaciones que se encuentran en la comprensión del funcionamiento del sistema inmune en condiciones de salud o de enfermedad, vienen de una visión demasiado parcial. La necesidad de

modelar los sistemas biológicos complejos reside en su propia complejidad y en la dificultad de estudiar el sistema completo, con todos sus componentes interrelacionados; es decir, estudiarlo como un todo, y no con una visión parcial de cada uno de sus componentes de forma independiente. Para integrar todos y cada uno de los conocimientos a nivel molecular, tanto de proteómica, genómica, metabolómica, de manera no reduccionista y determinista, será necesario utilizar herramientas que han sido utilizadas por ingenieros, matemáticos y físicos para modelar sistemas dinámicos. La aproximación reduccionista se centra en el estudio de uno de sus componentes, mientras que la aproximación holística desde el punto de vista de la biología de sistemas, trata de comprender el sistema, cada una de sus partes y sobre todo, la relación que existe entre ellas y su entorno [107]. Un aspecto clave en la naturaleza de la regulación del sistema inmune es que para conseguir un control inhibitorio a nivel de una célula, entre varias células o, más amplio aún, a nivel del sistema, los mecanismos específicos variarán a nivel molecular, pero no en el diseño de sus circuitos reguladores, los cuales están conservados. El otro aspecto clave que hay que tener en cuenta al estudiar estos mecanismos reguladores es la diferencia clave entre los mecanismos en los cuales se necesita superar un umbral para producirse la respuesta (previenen la excesiva actividad desde el primer momento), y los que limitan la intensidad o duración de la respuesta una vez que ha empezado. La respuesta se graduará en proporción a la fuerza del input mediante circuitos de retroalimentación negativa, con un presumible tiempo de retraso. Encontraremos circuitos de retroalimentación negativa lentos, menos robustos, cuya acción permanece durante más tiempo, y otros rápidos, que corresponden a una intensidad de señal con un alto pico rápido, pero de corta duración (*Figura 6*).

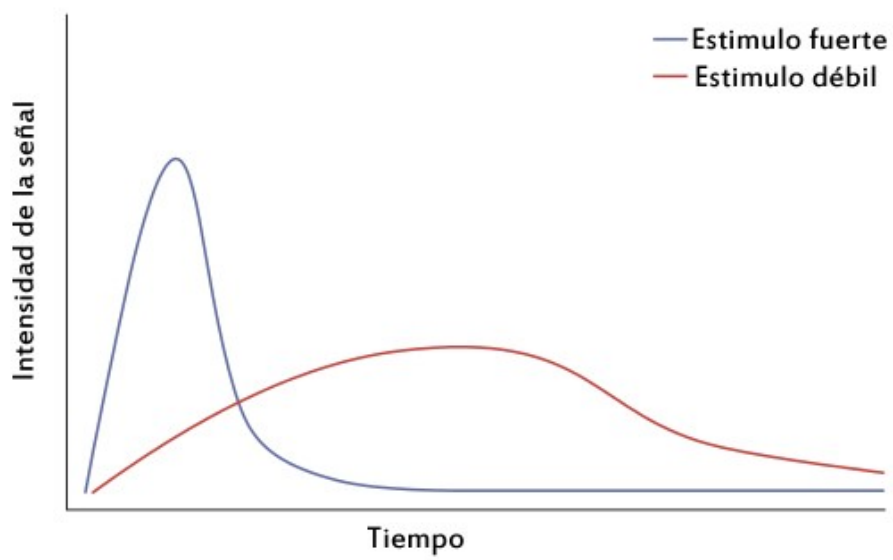


Figura 6. Vías de retroalimentación negativa: Diferentes estímulos darán lugar a picos de señal diferentes y, por tanto, a diferentes respuestas.

3. Dinámica de linfocitos T en EM

a. Dinámica oscilatoria en EM

El sistema nervioso está compuesto por una serie de procesos oscilatorios ordenados de manera jerárquica. Estos procesos oscilatorios pueden encontrarse a nivel de una única neurona o de un conjunto de ellas. No es extraño encontrar que varias enfermedades neurológicas o psiquiátricas se comporten de manera oscilatoria; como la epilepsia, la migraña, la enfermedad maníaco-depresiva o la EM. Las recaídas son el aspecto más asombroso de EM: ¿Cómo explicar esta dinámica oscilatoria? Algunos estudios tratan de explicar esta dinámica recurrente gracias a modelos matemáticos, tomando esta recurrencia como una parte de un mecanismo neurofisiológico de control gracias a sistemas de retroalimentación negativa. Estos circuitos serían capaces de crear ritmos periódicos, así como fluctuaciones similares al ruido del sistema. Si tenemos en cuenta que el patrón de estas enfermedades dinámicas está alterado podemos inferir que, probablemente, será porque haya una o varias alteraciones en alguno de sus parámetros a lo largo del tiempo. El número de recaídas clínicas en EM representa solo una de cada 5-10 recaídas como se ha demostrado en estudios de MRI (*Figura 7*).

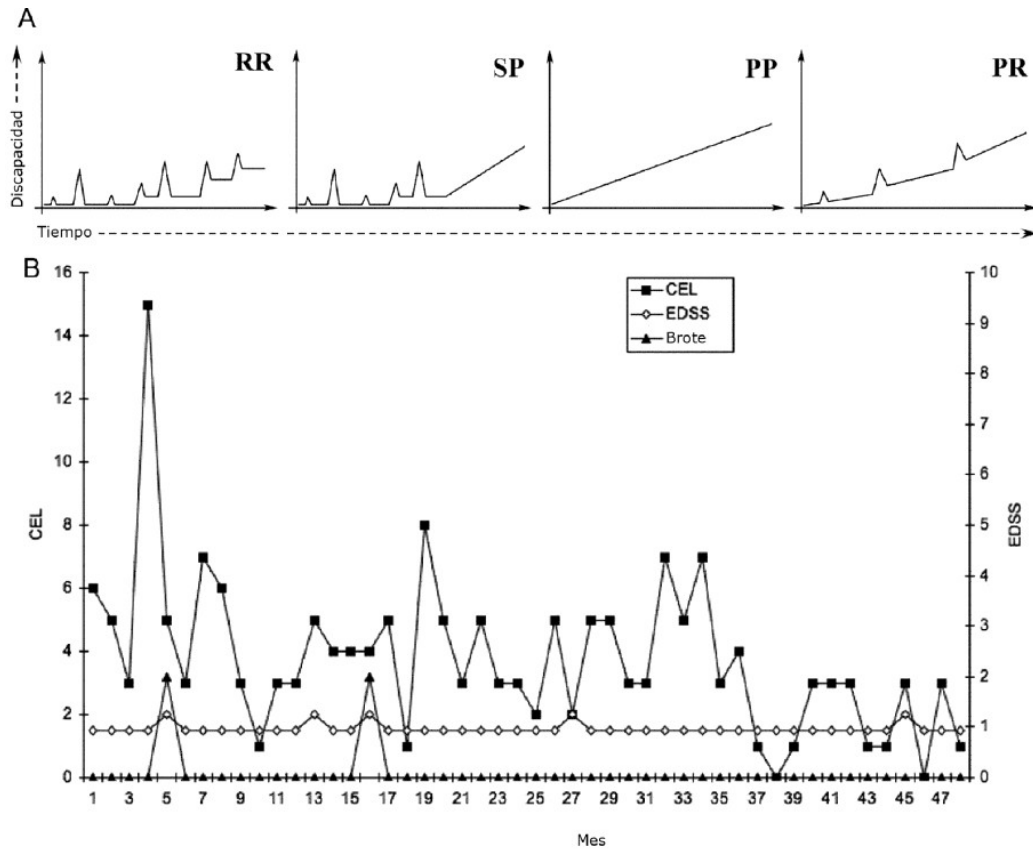


Figura 7. Dinámica remitente-recurrente en EM. A) Clasificación de la enfermedad en subtipos basada en la presencia de recurrencias: remitente-recurrente (RR), secundariamente-progresiva (SP), primariamente-progresiva (PP) y progresiva-recurrente (PR); B) Paciente representativo con EM que fue medido mensualmente por RMI durante 48 meses. Número de lesiones cataptes (CEL; izquierda, eje Y), discapacidad (medida con la escala EDSS; derecha eje Y) y presencia de recaídas clínicas homólogas (no escala)

En humanos, la tasa de recaídas clínicas es una por año con un mes de duración y de resolución. Sin embargo, no se conoce qué provoca el debut del brote. Finalmente, la importancia de estudiar la dinámica de estas enfermedades a lo largo del tiempo dará lugar a la posibilidad de aplicar nuevos tratamientos dirigidos hacia la manipulación y modificación de dichos parámetros críticos.

b. Dinámica oscilatoria de T_{eff} - T_{reg} en EM

En las enfermedades autoinmunes el balance entre la respuesta inmune inflamatoria y reguladora parece estar alterado. EM se ha considerado clásicamente una enfermedad autoinmune mediada por células T. Además, la activación de linfocitos T está segregada en tiempo y espacio. Los linfocitos T_{eff} y T_{reg} tienen una regulación cruzada con el fin de mantener la homeostasis gracias a un control con retroalimentación negativa, cuyos circuitos de retroalimentación negativa están contruidos por interacciones (por ejemplo, entre proteínas, genes o células) que tienen lugar en diferentes escalas de tiempo (*Figura 8*).

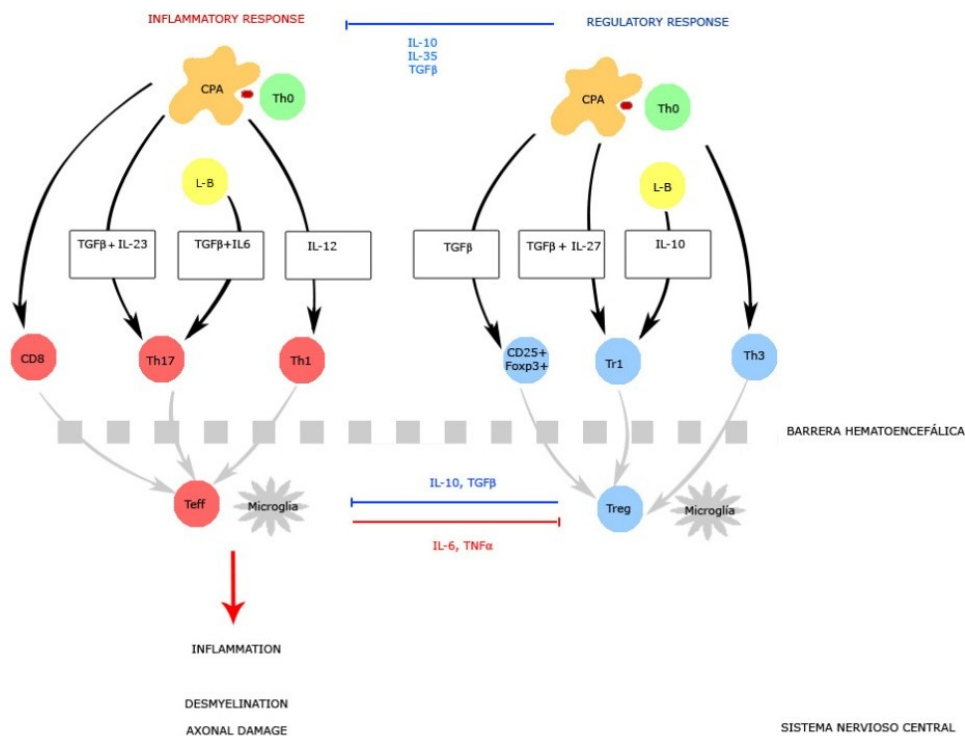


Figura 8: Interacciones entre linfocitos Teff y Treg en la patología de la EM

En condiciones de autoinmunidad esta homeostasis se romperá con la pérdida de tolerancia. Los modelos computacionales predicen que T_{eff} y T_{reg} oscilan con un mecanismo que permite una dinámica estable oscilatoria que mantiene la proliferación y expansión de células T_{eff} autorreactivas bajo control. Un control anormal y defectuoso debe estar relacionado con la susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes y con su naturaleza remitente-recurrente.

c. **De un modelo estático-determinista a un modelo dinámico de EM**

La biología de sistemas, por tanto, nos permite analizar un fenómeno en su totalidad. A la hora de estudiar EM como enfermedad dinámica nos encontramos que es necesario simplificar la información abundante de la que se dispone respecto a su origen autoinmune y aplicar un modelo de simulación para conocer las consecuencias de un cambio en el sistema a lo largo del tiempo. Se entiende que los modelos de simulación son una abstracción de lo que ocurre en la realidad. Según el tipo de variable, los clasificaremos en determinísticos (para cada condición dan un valor fijo) o estocásticos (cada condición podrá tener un resultado diferente según la probabilidad del mismo). Si no se incluye el tiempo, se tratará de modelos estáticos, frente a los dinámicos que sí lo incluyen. Un modelo estático determinista es aquel modelo no aleatorio y que no incluye la variable tiempo, mientras que un modelo dinámico podrá ser determinista o estocástico, en función de que tenga aleatoriedad o no.

4. Dinámica y papel de Linfocitos B

Se ha visto que la población de linfocitos B también juega un importante papel en la patología de EM. Más concretamente, se han publicado diversos artículos en los que se estudia la contribución de linfocitos B activados y específicos para MOG en el inicio y diferenciación hacia Th1 y Th17 de los linfocitos T naïve encefalitogénicos en EAE mediada por MOG₃₅₋₅₅ [108]. El proceso autoinmune es el resultado de un reconocimiento de antígenos propios por parte de linfocitos T y de linfocitos B. Algunas enfermedades autoinmunes, como el LES, se han considerado mediadas, principalmente, por linfocitos B [109], mientras que otras enfermedades como la AR o la EM se consideran mediadas, clásicamente, por linfocitos T. Sin embargo, se ha propuesto que también la población de linfocitos B juega un papel relevante en la patogenia de EM, quien actuará para colaborar con linfocitos CD4+ en la presentación del antígeno y en el proceso de coestimulación, pero también directamente mediante la producción de anticuerpos y de citoquinas, con una función tanto celular como humoral [110,111].

Diversos estudios avalan la importancia de una población de linfocitos B productores de IL-10. En EAE la liberación de IL-10 regula la enfermedad. Se ha descrito una subpoblación CD1d^{hi} CD5⁺ (B10), la cual regula las respuestas del linfocito T (L.T) mediante la liberación de IL-10. Representa del 1-2% de las células B del bazo. Además, estas células inhiben el inicio de EAE. Esta población B10 comparte marcadores fenotípicos con CD1d^{hi} CD21^{hi} de la zona marginal, y con CD5⁺ CD19^{hi} B220^{low} (B-1a), pero por sus características reguladoras se consideran un subgrupo diferente. Otros autores han expuesto la posibilidad de que tanto células B vírgenes como maduras hayan desarrollado la capacidad de liberar IL-10 y que esta liberación dependa del contexto en el que se

encuentren; si es necesario el mantenimiento de la homeostasis, la prevención de un proceso autoinmune o la resolución de una respuesta adaptativa a un patógeno.

5. Anti CD20: Depleción de Linfocitos B en EAE. Implicaciones en inmunoterapia

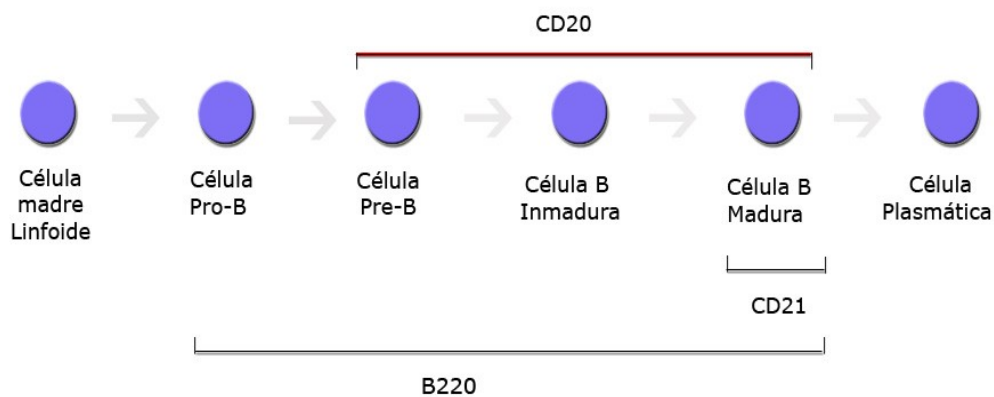
CD20 es una molécula específica de la población de linfocitos B. Se expresa en la superficie de un amplio rango de células pertenecientes al linaje B; desde las células pre- B al linfocito B (L.B) virgen y el de memoria, pero se pierde en la diferenciación a célula plasmática (*Figura 9*) [110,111]. El papel de CD20 no está bien elucidado hasta ahora, aunque se piensa que juega un rol en la activación y diferenciación celular.

El anticuerpo monoclonal anti-CD20, *rituximab*, se empezó a utilizar en pacientes con linfoma B no-Hodgkin. Posteriormente, aumentó el interés en utilizar este tratamiento en enfermedades autoinmunes. En 2006 se aprobó por la FDA su uso en AR en combinación con metotrexate en aquellos pacientes no respondedores a anti-TNF α . Los mecanismos por los que actúa son: citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, citotoxicidad dependiente del complemento e inducción de la apoptosis. Anti CD20 actúa sobre linfocitos B maduros y de memoria. Más del 95% de linfocitos B maduros en sangre y en órganos linfoides primarios son deplecionados después de dos días de un único tratamiento con anti-CD20. Estos efectos duran hasta 8 semanas después del tratamiento [112].

Hay diversos estudios y ensayos clínicos completados y publicados de rituximab en EM. Entre ellos, el ensayo en fase II aleatorizado y controlado con placebo de 104 pacientes de EMRR. Este estudio expone que el tratamiento con anti-CD20 mejora la enfermedad con una reducción relativa >90% en el número de lesiones captantes de gadolinio en RMI cerebral de pacientes comparados con el control acompañado de una mejora de los síntomas [113-114]. Es muy interesante que, tras el tratamiento con anti-CD20, los niveles de anticuerpos en EM no se

alteraron considerablemente, aunque sí se había obtenido una depleción de la población de linfocitos B >90%[112]. Estos datos dan una valiosa información acerca de la función pro-inflamatoria no dependiente de anticuerpos que juegan los linfocitos B en la patogenia de la enfermedad. Entre estas funciones encontraríamos: su capacidad para actuar como células presentadoras de antígeno al linfocito T contribuyendo en su activación, la producción de citoquinas pro-inflamatorias, su papel en la inmunidad innata y la contribución en la formación y mantenimiento de nuevos folículos linfoides, incluyendo lugares ectópicos como el SNC [84]. En EAE, el beneficio del tratamiento con anti-CD20 depende del momento de la enfermedad en el que se da, mejorando una EAE que ya está completamente establecida pero que, sin embargo, se exacerba dramáticamente cuando la terapia se administra antes de la inducción de la enfermedad [51].

Figura 9. Expresión de CD20, B220 y CD21 a lo largo de la maduración del L-B:



6. Microglía en EAE: Papel en neuroinflamación

La microglía ha sido objeto de análisis en numerosos estudios, siendo menos los artículos analizando su patrón temporal de activación a lo largo de EAE, por lo que la exacta función y rol de estas células en EAE no están claramente establecidos [115-117]. Aunque se ha planteado su papel inflamatorio en EAE, con una máxima reactividad de la microglía en el pico de la enfermedad, también se ha mostrado que, durante la remisión, a pesar de la mejora de la enfermedad, la microglía permanece muy reactiva, lo que daría la impresión de un papel beneficioso en esta fase de EAE [118-120]. Una de las dificultades que se encuentran en el estudio de la microglía es la diferenciación con la estirpe monocito-macrofágica y la microglía reactiva parecida al macrófago. La ausencia de buenos marcadores para diferenciarlos hace que su distinción en cuanto a la proliferación de cada una sea ardua [121,122]. Una vez que los linfocitos T infiltran e invaden el SNC requerirán la interacción con las CPAs locales, es decir, con las células de la microglía [123]. La microglía en condiciones de reposo no expresa MHC-I ni MHC-II, pero una vez activadas aumenta rápidamente su expresión, como ocurre en el caso de EAE [124-130].

Las preguntas teóricas que se plantean son:

- Por qué algunas enfermedades autoinmunes son remitentes-recurrentes y no agudas o crónicas simplemente.
- Qué significa que existan recaídas y qué nos muestran respecto al SI, teniendo en cuenta que ocurren en un período de 6-12 meses, mientras que los eventos moleculares tienen lugar en segundos-minutos y los celulares en horas-días.
- Qué pasaría a largo plazo en el sistema y su dinámica si se alterase alguna de sus poblaciones, por ejemplo con la terapia anti CD20 que produce una depleción de la población de linfocitos B.

Al plantearse estas cuestiones, es inevitable pensar que en los propios sistemas fisiológicos existen oscilaciones (ritmos circadianos, actividad cardíaca, actividad neuronal rítmica) las cuales son necesarias para mantener el organismo en homeostasis, conseguida gracias a la existencia de mecanismos de retroalimentación negativa para asegurar el control. Por tanto, nos cuestionamos una pregunta clave: ¿podría ser la enfermedad autoinmune una respuesta fisiológica para mantener la homeostasis del organismo?



4-Hipótesis de trabajo y Objetivos

1. Hipótesis

- Durante las enfermedades autoinmunes, específicamente en aquellas que son remitentes recurrentes como la EM, debe producirse una alteración en el balance de sus poblaciones de linfocitos T (dinámica de T_{eff} y T_{reg} concretamente), con alteración de la tolerancia periférica y afectación de la regulación de la respuesta inmune [131].
- Las enfermedades autoinmunes son debidas, al menos en parte, a una dinámica alterada entre linfocitos T_{eff} y T_{reg} . Dicha alteración no es determinista ni es consecuencia directa de una mutación puntual, sino que ocurre como un fallo de la tolerancia periférica (T_{reg}), sin que sea necesaria y únicamente una alteración en función y/o número de linfocitos T_{reg} . Las poblaciones de linfocitos T oscilan y se controlan entre sí y, por tanto, las recaídas en condiciones de autoinmunidad sucederán sin la necesidad de un estímulo exterior ni nada que las inicie sino que es la propia dinámica en sí misma la que está alterada y es vulnerable.
- La perturbación del sistema mediante la depleción de las células B con anticuerpos específicos anti CD-20 produce diferentes efectos en EAE dependiendo de la fase de la enfermedad.

2. Objetivos

El objetivo del proyecto es analizar la dinámica de linfocitos antígeno-específicos (T_{eff} y T_{reg}) para demostrar que dicha dinámica está alterada durante la respuesta autoinmune. Para conseguirlo se ha utilizado una aproximación dentro del campo de la biología de sistemas, combinando estudios experimentales, cuantificando estas poblaciones en

el modelo animal de EM (EAE en ratón) y adaptando un modelo computacional de la dinámica de linfocitos que se ha desarrollado en nuestro grupo [132].

Los objetivos específicos son:

- Cuantificar las poblaciones de Linfocitos T MOG específicos (T_{eff} T_{reg}) en bazo y SNC en animales con EAE inducida con MOG.
- Perturbación del sistema mediante depleción de las células B con anticuerpo específico anti CD-20. Efecto sobre T_{eff} y T_{reg} antígeno específicas.
- Modelización de las dinámicas de las diferentes poblacionales de linfocitos T mediante el uso de un modelo computacional de poblaciones de linfocitos T desarrollado por nuestro grupo que se ha actualizado según los resultados experimentales del objetivo anterior. Gracias a los resultados experimentales obtenidos se obtendrá información acerca de las interacciones entre ambas poblaciones y el efecto de la depleción de subpoblaciones de manera específica. Los parámetros del modelo se han ajustado basándose en los resultados experimentales y se han realizado simulaciones para identificar variables críticas, las cuales gobiernan la respuesta autoinmune, pudiendo de esta manera predecir en el futuro la respuesta a inmunoterapia de manera individualizada.
- Validación experimental de las predicciones del modelo.



5-Metodología

1. Preparación de Tetrámeros MHC clase II (IA^b)

En este trabajo se ha producido un tetrámero de clase II unido al péptido MOG₃₅₋₅₅. Este complejo péptido /M.H.C (I-A^b) es específico de ratones C57BL/6, ya que poseen I-A^b como MHC de clase II. El péptido MOG₃₅₋₅₅ está restringido por I-A^b; lo cual quiere decir que para ser reconocido por los linfocitos T CD4⁺ en ratones C57BL/6 será necesario ser presentado en moléculas M.H.C, I-A^b. [22,36,39].

- Los plásmidos que contiene los constructos de cDNA con MOG₃₅₋₅₅ /IA^b fueron proporcionados generosamente por Prof. Vijay Kuchroo, *Harvard Institutes of Medicine*.
- El proceso de transformación fue realizado en células competentes One Shot TOP 10 (Invitrogen) por quimioporcación con bacterias quimiocompetentes.
- Las moléculas MHC solubles fueron expresadas en un sistema de expresión baculovirus (BaculogoldTM linearized. Becton Dickinson) infectando células Sf-9 de insecto. (BD Pharmingen).
- La expresión de MHC II fue confirmado por inmunohistoquímica.
- La producción a gran escala de las moléculas MHC solubles fue llevado a cabo infectando las células Sf9 a una densidad de 1×10^6 cels/ml con un título alto de sobrenadante de IA^b baculovirus (5×10^8 PFU/ml).
- Las células Sf9 se pusieron a crecer en un medio de insecto sin suero (BaculoGold, BD) durante 3-5 días.
- Las moléculas MHC fueron posteriormente purificadas en una columna de afinidad preparada usando anticuerpo anti- IA^b (M5/114 American Type Culture Collection). Para ello se cultivó el anticuerpo anti-IA^b (M5/114) y se provocó ascitis con el mismo en ratones RAG inmunodeprimidos. Posteriormente, se purificó mediante una columna de

proteína G (HiTrap™ Protein G HP, GE Healthcare). El stock de anti-IA^b obtenido fue concentrado por centrifugación con centricon (Millipore).

- Las moléculas MHC, obtenidas tras la purificación en la columna de afinidad (HiTrap NHS-activated HP, GE Healthcare), fueron concentradas mediante evaporación hasta >5mg/ml.

- Para la biotinylación y tetramerización se utilizó Biotin protein ligase y se realizó añadiendo el conjugado de Streptavidin- Phycoerythrin, (PE) (Molecular Probes-Invitrogen) dejándolo incubar toda la noche como se ha descrito [36,39]. Se añadió el conjugado de estreptavidin-PE en un intervalo de 10 tiempos de 10 minutos cada uno para maximizar la formación del tetrámero. Se puso un exceso de moléculas MHC biotinyladas con el propósito de saturar toda la avidina. Al añadir la estreptavidina, como había un exceso de avidina, se asumió que la mayoría de las moléculas MHC formarían tetrámeros. En cambio, si se hubiera añadido el conjugado de estreptavidina-PE en un único tiempo y éste estuviera en exceso, el resultado sería una solución que probablemente tendría también una mezcla de monómeros y de trímeros.

Los tetrámeros producidos se mantuvieron y almacenaron alejados de la luz y a 4° C.

2. Animales e inducción de EAE

Se indujo EAE en ratones C57BL/6 (B6) (IA^b) de 8–10 semanas de edad (n=90), inmunizando con MOG₃₅₋₅₅. Los ratones C57BL/6(IA^b) (n=90) fueron anestesiados e inmunizados de forma subcutánea con una emulsión que contiene: 300µg de glicoproteína de la mielina del oligodendrocito MOG₃₅₋₅₅ (Espiken) y 500 µg de extracto de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco) en adyuvante completo de Freund (CFA). Los ratones recibieron 0.2 ml de la emulsión en uno de los flancos del animal. Además, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de toxina *B. Pertussis* (500ng en 200 µl de PBS) en los días 0 y 2[133].

Fueron seguidos diariamente para ver sus síntomas y asignarles una valoración según los mismos. Los signos clínicos se puntuaron según lo siguiente: 0, animal normal; 0.5, pérdida parcial del tono de la cola; 1, pérdida completa del tono de la cola, cola inmóvil; 2, cola flácida, leve parálisis de las extremidades traseras y marcha anormal vacilante; 3, parálisis moderada de las extremidades traseras con movimientos voluntarios todavía posibles; 4, parálisis de las extremidades traseras con una paresia de la parte trasera del cuerpo (tetraparesia pero sin paresia vesical); 5, parálisis de las extremidades traseras y delanteras(tetraplejia); 6, moribundo.

Los animales fueron pesados e inspeccionados de forma diaria desde el día de la inmunización (día 0) hasta el día en el que cada uno de ellos fue sacrificado.

Los ratones se mantuvieron en un entorno convencional libre de patógenos.

3. Separación de células mononucleadas de bazo y SNC

Los esplenocitos se obtuvieron de los bazos de los ratones tras una digestión con colagenasa D (Roche) y Dnasa I (Roche) a 37° C durante 45 min. Las células mononucleadas se aislaron pasándolas a través de un filtro (cell strainer ,70µm, BD) seguido por una separación mediante centrifugación por gradiente de densidad con ficoll [43,134]. Las células T del SNC se obtuvieron recogiendo el cerebro, cerebelo y médula espinal. El tejido del SNC se cortó en pequeños trozos y se digirió con colagenasa D (Roche) y Dnasa I (Roche) a 37° C durante 45 min. Las células mononucleadas se aislaron pasando la muestra a través de un filtro (*cell strainer* ,70µm, BD). Los leucocitos del SNC fueron aislados mediante centrifugación en gradiente de densidad como se ha descrito [135,136]. Brevemente, se realizó una separación celular por centrifugación basada en un gradiente de densidad con percoll (70/37 %) y se tomó la inter-fase entre 70% y 37%. La capa superior de mielina se desechó. Las células recogidas de la inter-fase y la fase superior fueron lavadas con PBS y resuspendidas [137-140]. Las células aisladas fueron cuantificadas cada día del estudio con trypan blue en cámara de Neubauer.

4. Marcaje con el tetrámero y otros anticuerpos monoclonales en el marcaje de linfocitos T

a. Purificación de tetrámeros y marcaje de las células

El tetrámero MOG₃₅₋₅₅ /IA^b fue cedido generosamente por Prof Vijay Kuchroo, de Harvard University y purificado como se ha descrito previamente [36]. Brevemente, los tetrámeros fueron incubados con PBS, 0,2% BSA, 0,1% azida sodica durante tres horas a 37° C y oscuridad. Después de lavadas, las células fueron teñidas con 7-AAD, (BD Pharmingen) y los siguientes marcadores de superficie: CD4 (BD Pharmingen), CD62L (BD Pharmingen), CD25 (BD Pharmingen), CD69 (BD Pharmingen), y CD45 (BD Pharmingen). Para la activación de microglía, la suspensión celular después de la digestión del SNC se tiñó con anti MHC clase II (IA^b) (Abcam), CD11b (BD Pharmingen) y CD45 (BD Pharmingen). La cuantificación de células B se realizó mediante la tinción con anticuerpos anti-CD45R/B220 (BD Pharmingen) y anti-CD21 (BD Pharmingen). Las células teñidas se analizaron con un citómetro FACSCanto (BD biosciences) y el análisis de datos se llevó a cabo con FACS Diva software.

b. Control positivo y control negativo

Para verificar la eficacia del marcaje del tetrámero MOG₃₅₋₅₅, se produjeron células antígeno-específicas mediante cultivo celular y estimulación con el péptido MOG₃₅₋₅₅. Para obtenerlas se aislaron esplenocitos. Las células mononucleadas fueron separadas, pasando el tejido a través de un filtro (*cell strainer* ,70µm, BD Biosciences). Se centrifugaron a 4° / 233g-1000rpm durante 7 minutos. El pellet obtenido

se somete a una solución de lisis de eritrocitos. Se cultiva 10^7 células/ mL medio, estimulando con MOG₃₅₋₅₅ (= 50µgr /mL de MOG). A los tres días se separan los linfocitos con un gradiente de ficoll. Se realizó un mismo estudio en paralelo en ratones C57BL/6 no inmunizados con MOG₃₅₋₅₅

c. Definición de las subpoblaciones de linfocitos y microglía

Las células T antígeno-específicas fueron caracterizadas por ser tetrámero positivas ($IA^b_{-MOG}^+$). Siendo las células T efectoras MOG específicas $CD45^+$, $CD4^+$, $CD25^-$ y $IA^b_{MOG}^+$; [36,141,142] además, hubo una subpoblación de células que expresaban CD69 lo cual significa que estaban activadas [143-144]. L-selectina, (CD62L), regula la migración del leucocito a los sitios de inflamación y su regulación juega un importante papel en el control del tráfico del linfocito T desde y al ganglio linfático [145-149]. CD62L se expresa en la membrana celular tras la activación de la célula T y su implicación en la patogénesis de EAE se ha demostrado previamente. CD62L se expresó con diferente intensidad a lo largo de la enfermedad en las distintas poblaciones de células T[150-152].

Las células T T_{MOG} específicas reguladoras fueron $CD45^+$, $CD4^+$, $CD25^{hi}$, y $IA^b_{-MOG}^+$ [44,64,153-155]; además, hubo una subpoblación de células que expresaba CD69. CD62 estaba presente en esta población pero el nivel de expresión osciló a lo largo de EAE. Los linfocitos T no-encefalitogénicos efectoras se caracterizaron por ser $CD45^+$, $CD4^+$, $CD25^-$. A su vez, los linfocitos T no-encefalitogénicos reguladores se caracterizaron por ser $CD45^+$, $CD4^+$, $CD25^{hi}$. CD69 y la expresión de CD62L también se analizó en esta subpoblación. Las células B se analizaron después de teñirlas con anticuerpos anti- B220 y anti CD21. La depleción de linfocitos B maduros e inmaduros basada en la expresión de $CD45^+$

B220⁺ y CD21⁺ se examinó en bazo y SNC cada día a lo largo de la enfermedad en el grupo de ratones que habían recibido anti-CD20 [156]. Cuando se activa, la microglía aumenta su expresión de CD45, CD11B y de moléculas MHC clase II -IA^b [157,158]. Analizamos la expresión de MHC clase II -IA^b en microglía activada.

d. Cuantificación y análisis por citometría de flujo

Los resultados de linfocitos T antígeno específicos se muestran en porcentajes de CD4⁺ (T_{eff} MOG⁺/CD4⁺, T_{reg} MOG⁺/CD4⁺). Los resultados de linfocitos T no-encefalitogénicos (linfocitos T efectores y reguladores) se muestran en porcentajes de CD4⁺ también (T_{eff} CD4⁺/CD4⁺TOTAL, T_{reg} CD4⁺/CD4⁺ TOTAL). Los resultados de linfocitos B se muestran en porcentajes del total de linfocitos (Linfocitos B/Total de Linfocitos). La activación de microglía se muestra como el porcentaje de IA^b respecto al total de microglía [159-160].

5. Tratamiento con anti-CD20

Para eliminar la población de linfocitos B *in vivo*, los animales recibieron el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD20, generosamente proporcionado por Andrew Chan de Genentech. Las poblaciones de linfocitos T y B en el grupo de ratones que recibieron anti-CD20 fueron analizados mediante citometría de flujo como se ha descrito previamente.

Para asegurar la máxima depleción de linfocitos B con anti-CD20 los ratones con EAE recibieron una inyección intraperitoneal de anti-*mouse*-CD20; 200µg en 250 µL de PBS (i.p.) 10 días antes de la inducción de la enfermedad [109].

6. Modelo Computacional

El trabajo de modelización en este proyecto y ajuste del modelo computacional [132] ha sido llevado a cabo por la Dra. Elena Abad y el Dr. Jordi García Ojalvo.

a. Modelando las recaídas como un circuito de retroalimentación negativa entre las poblaciones de células T

Se ha utilizado un modelo de la dinámica de linfocitos T en EM descrito por nuestro grupo previamente. Con este modelo hemos estudiado posibles fallos en los mecanismos de regulación que controlarían un comportamiento de regulación cruzada entre los linfocitos T efectores y reguladores. Estos 'fallos' podrían desencadenar dinámicas remitente-recurrentes como la activación de poblaciones celulares antígeno específicas en autoinmunidad. El modelo incluye cinco aspectos: tolerancia central generada en el timo (en el modelo se propone un factor de eventos estocásticos para la simulación de células vírgenes (*naive*), o para el fallo en la tolerancia central en el timo y/o activación por patógenos), activación de la célula T, célula T de memoria, regulación cruzada entre T_{reg} y T_{eff} (circuitos de retroalimentación positiva y negativa).

El modelo es una simplificación del SI adaptativo, centrado en la activación de los linfocitos T, su proliferación y consiguiente migración a los tejidos donde ejercen sus funciones. Las variables de la población de linfocitos T representan el conjunto de linfocitos T antígeno-específicos que participan en una respuesta inmune y no todo el repertorio de linfocitos T. Conceptualmente, el modelo usado incluye básicamente 3 partes: el bucle regulatorio T_{eff} - T_{reg} , los procesos estocásticos y la producción de daño en el tejido. El análisis muestra que la debilidad en la retroalimentación negativa entre T_{eff} y T_{reg} permite al SI generar las

dinámicas remitentes-recurrentes características de las enfermedades autoinmunes, sin la necesidad de otro desencadenante. No se requieren factores externos para la aparición de recaídas una vez que el sistema está funcionando en un régimen de autoinmunidad (trasfondo genético +memoria inmunológica). (Figura 10)

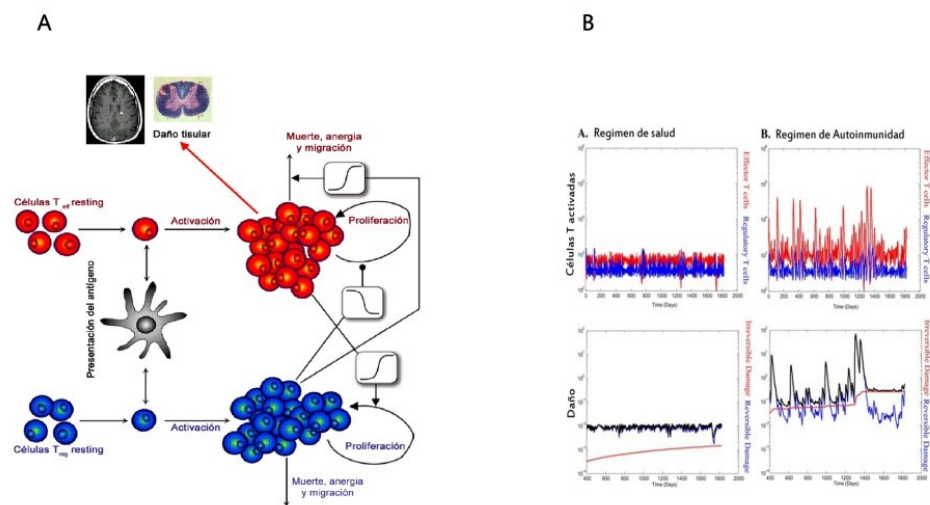


Figura 10. Modelo del SI adaptativo. 10A. Modelo del SI adaptativo. El modelo del SI adaptativo se compone de cuatro partes: 1) La generación de T_{eff} y T_{reg} en el timo; 2) La activación de las células T a través de la CPA; 3) La regulación cruzada T_{eff} - T_{reg} ; y 4) la activación de las células T y las poblaciones de memoria en los tejidos. El bucle de T_{reg} está compuesto por una retroalimentación negativa entre ambas poblaciones (T_{eff} en rojo y T_{reg} en azul). Figura 10B. Simulaciones en el modelo computacional en estado de salud y de autoinmunidad. Los histogramas muestran simulaciones representativas de células T_{eff} activadas (rojo) y T_{reg} (azul) en una escala logarítmica durante 5 años. Cambiando los parámetros del bucle T_{eff} - T_{reg} , es posible reproducir dos dinámicas: A) Estado de salud en donde las poblaciones de T_{eff} y T_{reg} fluctúan en bajos niveles indicando que el sistema no está generando una respuesta patológica; B) Dinámica de autoinmunidad debido a un fallo en la regulación cruzada (bucle T_{eff} - T_{reg}), provocando una expansión y reducción de las células T_{eff} activadas. C, D) Simulaciones del daño en el tejido (rojo) y daño total (negro: C) En la configuración de salud el funcionamiento del SI (línea azul) no induce daño tisular significativo (línea negra); D) en la configuración autoinmune los picos de T_{eff} activadas inducen disfunción y daño del tejido (línea roja), llevando a la dinámica remitente-recurrente (línea negra).

Como se ha dicho, el modelo es una simplificación del SI adaptativo donde E_r , R_r , E , R representan el tamaño de T_{eff} en reposo, T_{reg} en reposo, T_{eff} activadas, T_{reg} activadas respectivamente. Varios parámetros se asumen como idénticos para ambos T_{eff} y T_{reg} : η es la tasa en la cual las células T vuelven al estado de reposo, δ la tasa de activación celular, β es la tasa en la cual las células en reposo se vuelven anérgicas o mueren. Otros parámetros se asumen como específicos de cada tipo celular: I_E , I_R son los inputs estocásticos de la producción de linfocitos T_{eff} y T_{reg} respectivamente por el timo; α_E , α_R son las tasas de proliferación máxima y γ_E , γ_R son las tasas de eliminación linfocitos T_{eff} y T_{reg} respectivamente. Las interacciones de la regulación cruzada entre las poblaciones de T_{eff} y T_{reg} se modelaron como funciones de Hill, donde K_E , K_R miden la concentración o valor para el cual se produce la ocupación media de los sitios de enlace. Finalmente, h es el coeficiente de Hill como medida de cooperatividad de procesos de enlace.

$$\frac{dE_r}{dt} = I_E - E_r\delta - E_r\beta + E\eta \quad (1)$$

$$\frac{dR_r}{dt} = I_R - R_r\delta - R_r\beta + R\eta \quad (2)$$

$$\frac{dE}{dt} = E_r\delta - E\eta + \frac{E\alpha_E k_R^h}{k_R^h + R^h} - \frac{E\gamma_E R^h}{k_R^h + R^h} \quad (3)$$

$$\frac{dR}{dt} = R_r\delta - R\eta + \frac{R\alpha_R E^h}{k_E^h + E^h} - R\gamma_E \quad (4)$$

Para solucionar el modelo analíticamente, el sistema población de linfocitos T se redujo a las dos variables. E y R representan el tamaño de las poblaciones de células T activadas. Para eliminar los efectos estocásticos, los valores representando el influjo de las poblaciones de linfocitos en reposo se convirtieron en una constante sustituyendo Λ_E , Λ_R respectivamente por su valor esperado Λ_E , Λ_R respectivamente.

$$\frac{dE}{dt} = \Lambda_E \delta - E\eta + \frac{E\alpha_E k_R^h}{k_R^h + R^h} - \frac{E\gamma_E R^h}{k_R^h + R^h} \quad (5)$$

$$\frac{dR}{dt} = \Lambda_R \delta - R\eta + \frac{R\alpha_R E^h}{k_E^h + E^h} - R\gamma_E \quad (6)$$

b. Actualización del modelo. Análisis de sensibilidad

Se hizo uso del modelo de regulación cruzada $T_{\text{eff}}-T_{\text{reg}}$ descrito anteriormente, actualizando los parámetros del modelo para reproducir los datos experimentales de los estudios de ratones con EAE. Este modelo está basado en cuatro ecuaciones diferenciales que describen las dinámicas de linfocitos T antígeno específicos, T_{eff} en reposo (1), T_{reg} en reposo (2), T_{eff} activados (3), T_{reg} activados (4).

$$\frac{dE_r}{dt} = I_E - E_r\delta - E_r\beta + E\eta \quad (1)$$

$$\frac{dR_r}{dt} = I_R - R_r\delta - R_r\beta + R\eta \quad (2)$$

$$\frac{dE}{dt} = E_r\delta - E\eta + \frac{E\alpha_E k_R^h}{k_R^h + R^h} - \frac{E\gamma_E R^h}{k_R^h + R^h} \quad (3)$$

$$\frac{dR}{dt} = R_r\delta - R\eta + \frac{R\alpha_R E^h}{k_E^h + E^h} - R\gamma_E \quad (4)$$

Específicamente, los cambios en los parámetros llevaron a un cambio en la escala temporal para adaptar los característicos períodos de las oscilaciones de linfocitos T observados experimentalmente, con los respectivos valores teóricos observados en humanos (*Tabla 1*). En esta nueva versión del modelo también se representa un tren de pulsos de células T vírgenes desde el timo mediante una dinámica excitable inducida por ruido típico, como una herramienta matemática que imita actividad en forma de pulsos fortuitos [161]. Se simularon todas las ecuaciones diferenciales estocásticas del modelo mediante el método de Runge-Kutta de segundo orden (método de Heun) usando el software de Matlab.

Se realizó un análisis de sensibilidad del modelo aumentando y disminuyendo los parámetros basales en un 20% y 50%, y recogiendo la estadística de la amplitud media y el período de las poblaciones de T_{eff} y T_{reg} activadas (*Tabla 1*). Este análisis de sensibilidad se realizó mediante simulaciones durante un tiempo de 300 días en unidades del modelo

usando el software de Matlab. Las simulaciones se iniciaron sin células T_{eff} y T_{reg} en reposo, y con 1,000 y 200 células T_{eff} y T_{reg} activadas, respectivamente, como se ha descrito anteriormente. Para este estudio, hemos actualizado los parámetros del modelo usando los datos experimentales de nuestro estudio. Los parámetros del modelo se actualizan en base a los valores propuestos para humanos y teniendo en cuenta los ensayos de sensibilidad del modelo para poder adecuar o aproximarse a los datos experimentales de linfocitos T activos (los T_{reg} y los T_{eff}) Las simulaciones se realizaron en Matlab.

		Período (días)	Amplitud (%)			Períod (días)	Amplitud (%)	
EAE	Bzo	MOG-T _{eff}	5 ± 0.7	0.8 ± 0.2 *	EAE anti-CD20 tratamiento	MOG-T _{eff}	6.7 ± 0.7	0.3 ± 0.1 *
		MOG-T _{reg}	4.3 ± 0.9	0.14 ± 0.02 *		MOG-T _{reg}	6.7 ± 2.7	0.06 ± 0.02 *
	SNC	MOG-T _{eff}	4 ± 1	3.3 ± 0.9		MOG-T _{eff}	3.0 ± 0.4	2.4 ± 1.4
		MOG-T _{reg}	2.3 ± 0.9	4.0 ± 0.9 ***		MOG-T _{reg}	3.3 ± 0.7	0.5 ± 0.2 ***
		Microglia (activada)	8	60 ± 7		Microglia (activada)	--	57 ± 9
		Período (días)	Amplitud (nº cel)		Períod (días)	Amplitud (nº cel)		
Modelo EAE	Bazo	MOG-T _{eff}	5.2 ± 0.2 *	2254 ± 128 ***	Modelo EAE anti-CD20 tratamiento	MOG-T _{eff}	6.5 ± 0.5 *	816 ± 18 ***
		MOG-T _{reg}	4.9 ± 0.2	552 ± 26 ***		MOG-T _{reg}	5.5 ± 0.4	429 ± 10 **

Tabla 1. “Periodos, amplitud de los picos de Teff MOG+, Treg MOG+ activados y de microglía en bazo (órgano linfóide secundario) y SNC, en animales con EAE y animales con EAE tratados con anti-CD20, para datos experimentales y en modelo. Las amplitudes experimentales de las células T MOG-específicas y la microglía activas se muestran como porcentajes sobre la población total de CD4⁺ y sobre el total de la población de microglía, respectivamente. Las amplitudes en el modelo consideran número de células. Los datos se muestran como la media ± SEM, sig. (*) p<0.05, (***) p<0.0001.”

7. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces. Los valores se expresan como media \pm SEM. Se ha usado el test de Mann-Whitney para determinar la diferencia significativa (statistical significance) entre los grupos y el test de Wilcoxon signed-rank para las diferencias en las series temporales. Los análisis estadísticos se realizaron con el software PASW 18.0 software (IBM) y GraphPad Prism 4 software.



6-Resultados

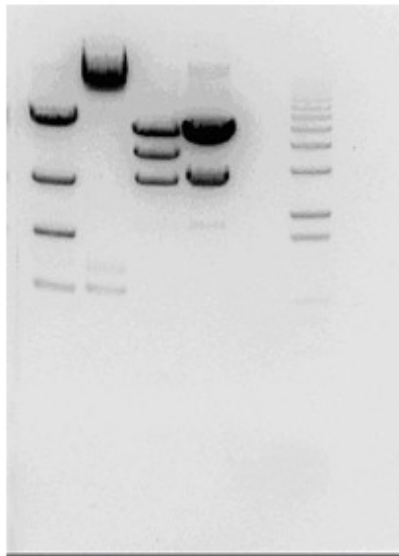
1. Producción de tetrámeros MHC Clase II (IA^b)- MOG₃₅₋₅₅

a. Transformación

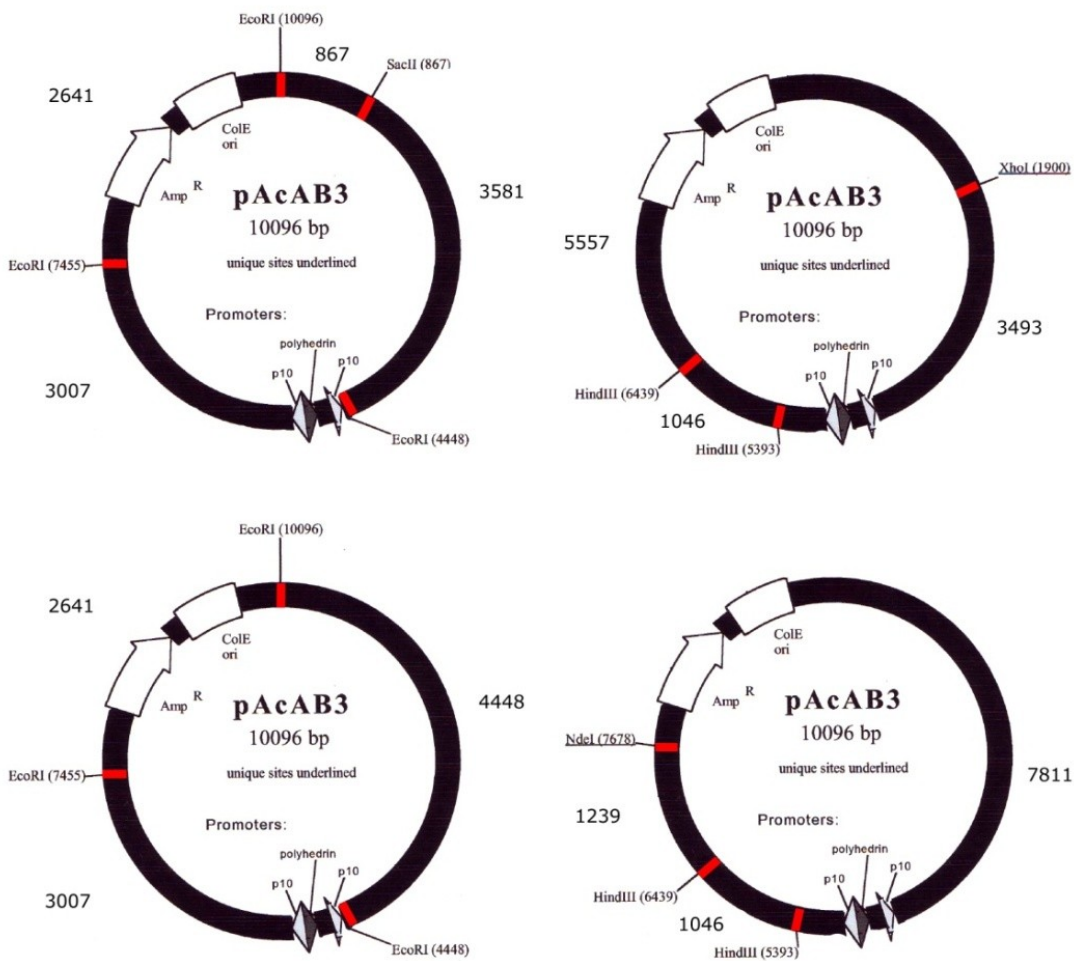
El plásmido fue transformado en células competentes ONE SHOT Top10. Se utilizaron bacterias quimiocompetentes (Invitrogen). Se añadió el plásmido a las bacterias para realizar el proceso de transformación. Sabiendo cuál era el mapa del plásmido se pudo hacer un análisis con enzimas de restricción para confirmar que el proceso fue correcto (*Figura 11*).

Figura 11: Validación del proceso mediante enzimas de restricción.

Se muestra también el mapa del plásmido



Eco RI Sac II	Nde I Hind III	Eco RI	Hind III Xho I
3581	7811	4448	5557
3007	1239	3007	3493
2641	1046	2641	1046
867			



b. Co-transfección

Se realizó el proceso de co- transfección, combinando el sistema de expresión Baculogold DNA (BD Biosciences) con el plásmido que contenía el tetrámero y posteriormente infectando células de insecto Sf9 (GIBCO Invitrogen). Se confirmó la eficiencia de la co-transfección y se determinó el título viral antes de la amplificación viral realizando un plaque-assay.

c. Amplificación viral

Se llevó a cabo la amplificación viral incubando el sobrenadante de la transfección con células Sf9 (concentración 5×10^5 cels/mL). Se recogió posteriormente el sobrenadante que contenía el tetrámero MHC clase II (IA^b)- MOG₃₅₋₅₅ mediante centrifugación.

d. Plaque-Assay

Se utilizó para determinar el título viral en las placas (unidades formadoras de colonias/mL –pfu/mL). De esta manera se conoce la cantidad de virus necesaria para infectar las células Sf9 durante la producción de la proteína a gran escala.

e. Producción de proteína a gran escala

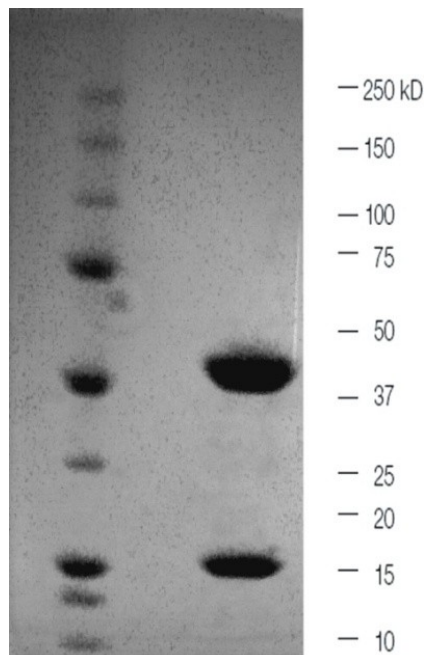
Para la producción de la proteína a gran escala se incubó el sobrenadante que contenía virus (baculovirus con el tetrámero) con células Sf9 (concentración 5×10^5 cels/mL; volumen final 200 mL). Posteriormente se filtró antes de la separación mediante columna de afinidad y se guardó a 4° protegido de la luz.

f. Preparación de la columna de afinidad

- *Obtención del anticuerpo anti-IA^b*

Como era necesario purificar el sobrenadante que contenía las proteínas MHC clase II (IA^b)- MOG₃₅₋₅₅ se requería la producción de grandes cantidades de anticuerpo anti-IA^b. Para ello se cultivó un hibridoma M5-114 (anti - I-A^b, I-A^d, I-A^q, I-E^d y I-E^k; American Type Culture Collection) obteniéndose sobrenadante con el anticuerpo; posteriormente, se indujo ascitis en ratones RAG inmunodeprimidos con el propósito de obtener mayores cantidades de anti-IA^b. Seguidamente se purificó con una columna de proteína G (columna adecuada para la purificación de anticuerpos) (Figura 12).

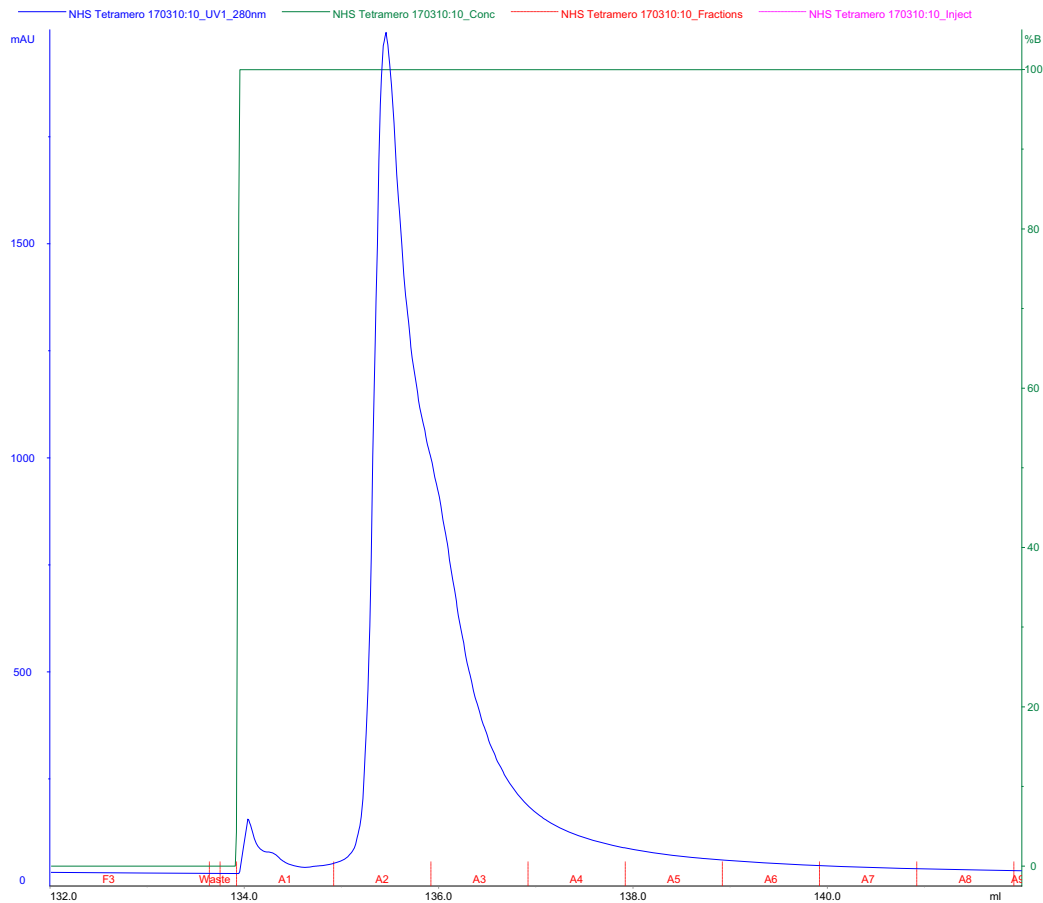
Figura 12. Purificación del anticuerpo anti- IA^b mediante columna de proteína G.



g. Purificación de MHC clase II (IA^b)- MOG₃₅₋₅₅

Se purificaron las proteínas MHC clase II (IA^b)- MOG₃₅₋₅₅ mediante cromatografía con FPLC con una columna de afinidad (HiTrap NHS-activated HP, GE Healthcare) formada por los anticuerpos anti-IA^b obtenidos (Figura 13).

Figura 13: Purificación de MHC clase II (IA^b)-MOG₃₅₋₅₅ en un sistema FPLC con una columna de afinidad (anti-IA^b).



h. Biotinización y Tetramerización

Los complejos IA^b-péptido fueron biotinilados usando un kit que contenía la enzima BirA (Biotin protein ligase. Avidity Inc.) El método de oligomerización consiste en la introducción de biotina unida a la membrana de la molécula soluble MHC. Esto es posible debido a que en la molécula MHC existe una secuencia de unión a la biotina y esta reacción será catalizada por la enzima biotin ligasa BirA. A continuación se dejaron las muestras toda la noche en baño 30° y un día más dializando (*Slide A-lyser mini dialysis units* 10kDa, Fisher).

Posteriormente, se utilizó estreptavidina; la cual se usa para oligomerizar las proteínas MHC biotinizadas. Además, para su uso en citometría (para que sean capaces de teñir la población antígeno específica) fue necesario añadir un fluorocromo; en este caso, aloficocianina (APC). Aunque la estreptavidina presenta 4 sitios de unión para biotina, es posible que en los kits comerciales conjugados algunos de estos sitios de unión se vean comprometidos. Por otra parte, no siempre, aunque se trabaje con verdaderos tetrámeros, podrá producirse una unión de varios linfocitos T en los cuatro complejos MHC-péptido que presenta el tetrámero.

Las proteínas biotiniladas se incubaron con estreptavidina-PE (en un ratio 4:1 estreptavidina PE-proteína) para producir los tetrámeros, en diez tiempos de diez minutos cada uno para aumentar la eficacia de formación de los tetrámeros y disminuir la formación de dímeros o trímeros (*Figura 14 y Figura 15*)

Figura 14. Formación de tetrámeros. a) Exceso de monómeros: poca formación de tetrámeros. Mayoría de monómeros solubles. b) Continúa habiendo exceso de monómeros solubles; c) Equimolar: prácticamente toda la estreptavidina se ha unido a cuatro monómeros. Se encuentran bastantes monómeros solubles; d) Exceso de estreptavidina: Prácticamente todos monómeros se unirán a estreptavidina para formar tetrámeros. Se encuentra algo de estreptavidina soluble.

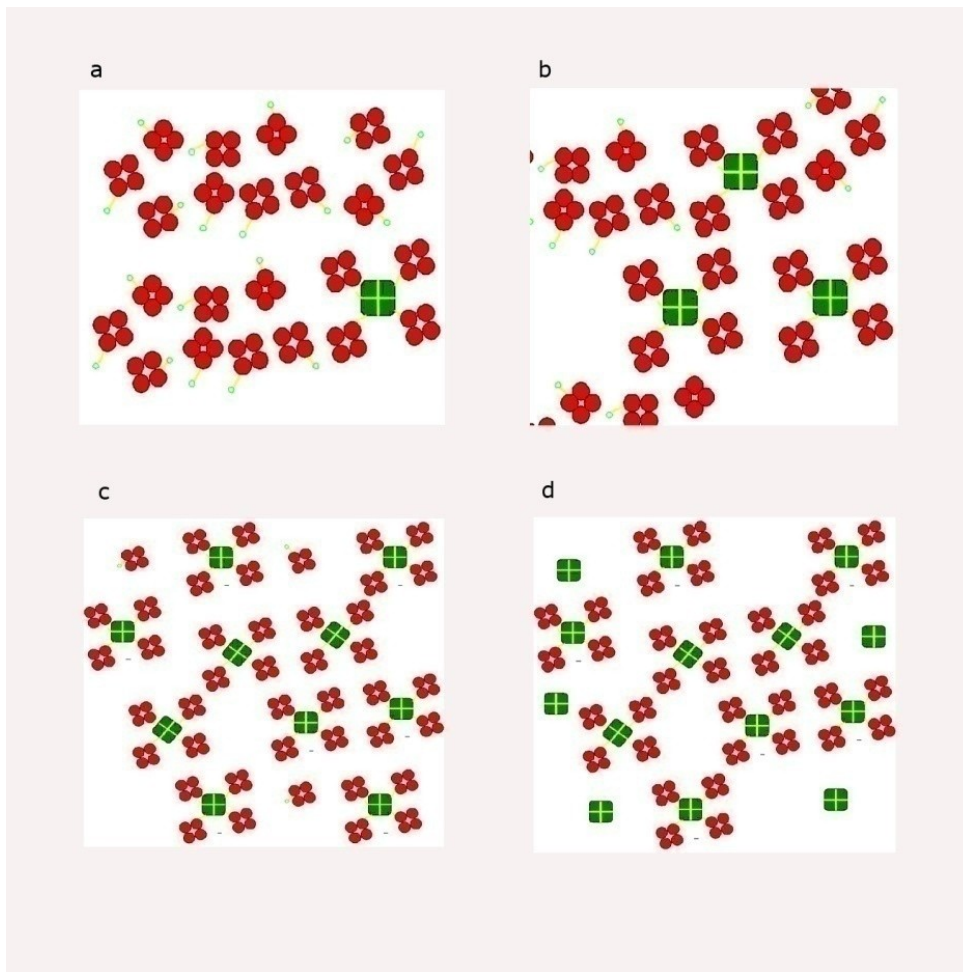
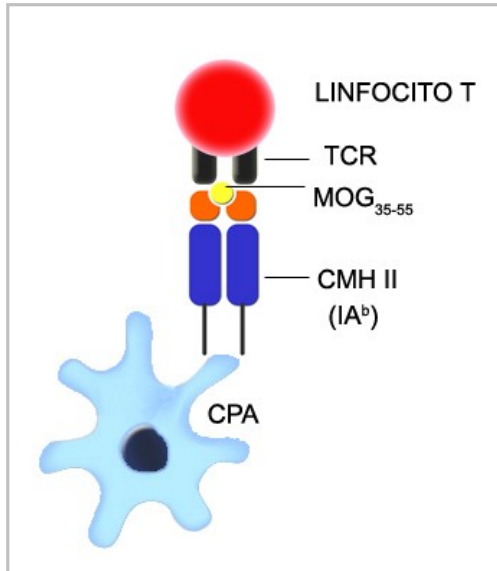
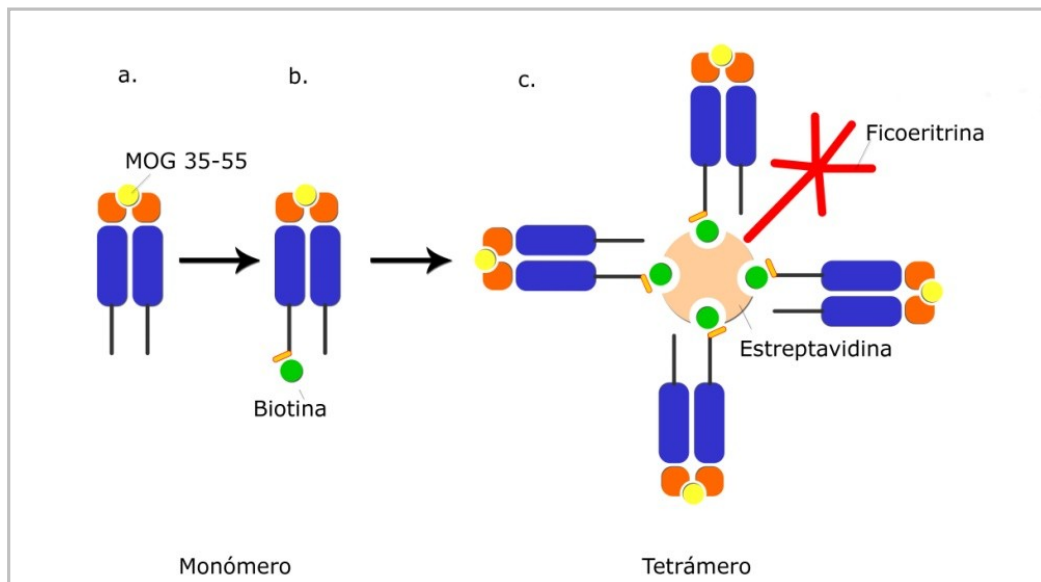


Figura 15: Formación del tetrámero

A) Presentación de MOG₃₅₋₅₅ por la CPA al linfocito T



B) Esquema de formación de tetrámero a partir del monómero de IA^b-MOG



i. **Validación de los tetrámeros MHC MOG₃₅₋₅₅ clase II (IA^b)**

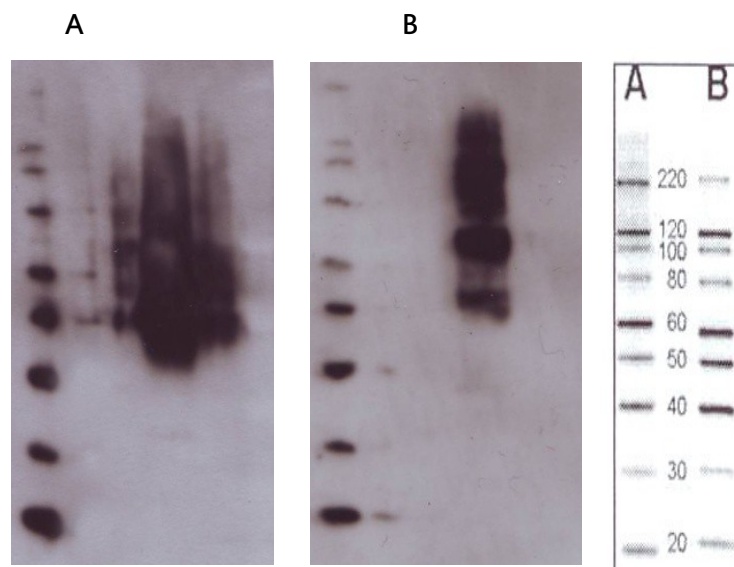
- ***SDS-PAGE***

Se realizó un SDS-PAGE (NuPAGE invitrogen minicell.) en condiciones desnaturalizantes y en condiciones no desnaturalizantes, con el propósito de poder visualizar las diferentes bandas según la condición de cada uno (*Figura 16*).

- ***Streptavidina-Peroxidasa***

Se utilizó estreptavidina peroxidasa (VECTASTAIN Elite ABC system) para poder revelarlo, observándose dos resultados diferentes según se hubiera realizado en condiciones de desnaturalización o no (*Figura 16*)

Figura 16. En la imagen se observan diferentes bandas según las condiciones en las que se haya trabajado. En el caso de la Figura 17B se observan bandas que según su tamaño corresponderán a tetrámeros, dímeros y monómeros; se diferencian de lo que ocurre en condiciones de desnaturalización (Figura 17A). A) Condiciones desnaturalización; B) Sin desnaturalizar



j. Puesta a punto de los tetrámeros MHC MOG₃₅₋₅₅ clase II (IA^b)

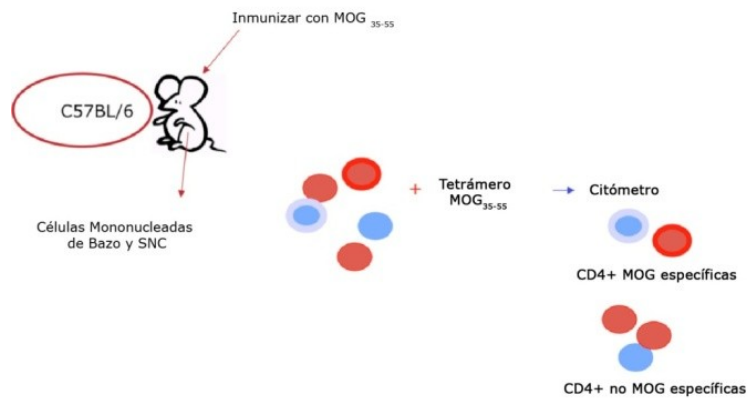
Condiciones del ensayo

- Rastreo de linfocitos de ratón C57BL/6 (IA^b) inmunizado con EAE.
- Durante el marcaje con el tetrámero se utilizó PBS, 0,2% BSA, 0,1% azida sódica para optimizar el resultado.
- Se observó que la incubación de los linfocitos de ratón C57 BL/6 (IA^b) teñidos con el tetrámero durante 3 horas a 37° mejoraba el marcaje.
- Para disminuir el marcaje inespecífico se centrifugó la muestra (1800 rpm; 8 min) tras la incubación de tres horas a 37° procediendo posteriormente a la tinción de los demás marcajes de superficie.
- Los otros anticuerpos monoclonales que se utilizaron fueron CD4 FITC (BD Pharmingen), CD25 APC-Cy7 (BD Pharmingen), CD62L APC (BD Pharmingen), CD69 PE- Cy7 (BD Pharmingen), 7-AAD (BD Pharmingen; como marcador de viabilidad), CD45 (BD Pharmingen).
- Se realizó una titulación (10 µL, 5 µL, 3 µL, 2 µL) del tetrámero para encontrar la concentración óptima del marcaje. Se observó que el marcaje con 5 µL era el más adecuado.

2. Producción de células antígeno- específicas

Para verificar la eficacia del marcaje del tetrámero MOG₃₅₋₅₅, se produjeron células antígeno-específicas mediante cultivo celular y estimulación con el péptido MOG₃₅₋₅₅ como se ha descrito previamente. Se hizo un estudio en paralelo en una población de ratones C57BL/6 no inmunizados con MOG como control negativo y se comparó con el grupo de EAE.

Figura 18 Esquema experimento



3. Dinámica de linfocitos T en EAE

Para poder realizar el estudio de series temporales se indujo EAE en ratones C57BL/6 (IA^b) y se analizaron las frecuencias de las poblaciones T efectoras y reguladoras antígeno específicas, ($T_{\text{eff MOG}^+}$ y $T_{\text{reg MOG}^+}$ respectivamente) y linfocitos T totales en bazo y SNC, y microglía en SNC.

a. Análisis de series temporales de $T_{\text{eff MOG}^+}/T_{\text{reg MOG}^+}$ durante EAE revelan una dinámica oscilatoria de ambas poblaciones

Se analizaron las poblaciones de T_{eff} y $T_{\text{reg MOG}}$ específicas durante el desarrollo de EAE en el bazo y SNC. En la (*Figura 17*) se puede distinguir un comportamiento oscilatorio en las poblaciones de linfocitos T_{eff} y $T_{\text{reg MOG}}$ específicos tanto en bazo como en SNC.

Se observan, en bazo, cinco picos; con un pico marcadamente más alto para $T_{\text{eff MOG}^+}$ en el día 12 (=1,515 %), y para $T_{\text{reg MOG}^+}$ en el día 25 (=0,176%). En el caso de la población $T_{\text{eff MOG}^+}$, tras esta subida en el día 12, se advierte una tendencia general descendente con picos de menor amplitud a lo largo de la enfermedad. Se encontró que durante los 30 días después de la inmunización T_{eff} y $T_{\text{reg MOG}^+}$ aumentaron y desarrollaron una dinámica oscilatoria con un período en torno a 4-5 días (días 5-11,11-16,16-21,21-27, 27-x). Además, la amplitud de oscilación (el porcentaje máximo de las células antígeno-específicas respecto al total de CD4+) de linfocitos $T_{\text{eff MOG}^+}$ fue siempre significativamente mayor de media (de 2 a 6 veces más) que la observada para las células T_{reg} . Además, la amplitud fue mayor en el caso de los dos primeros picos, coincidiendo con el comienzo de la enfermedad y disminuyó después.

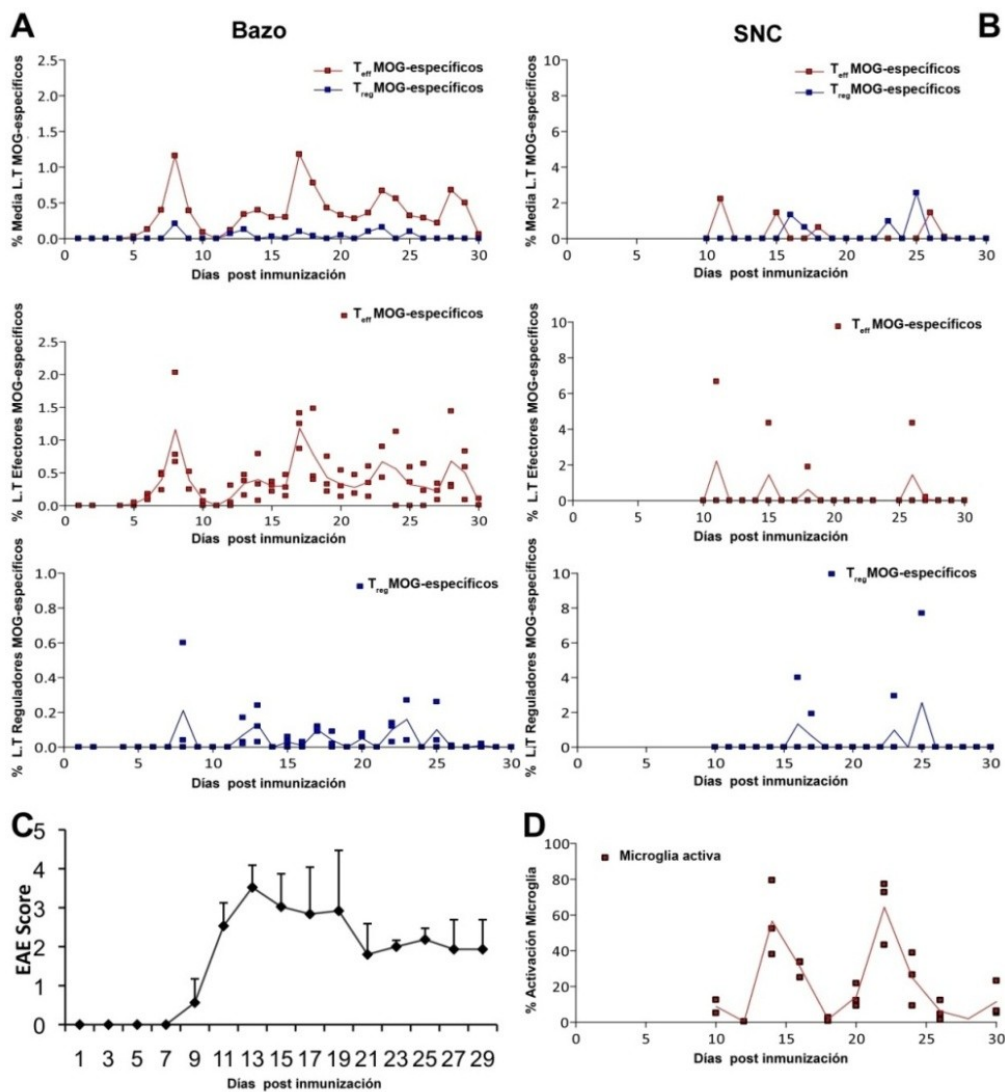
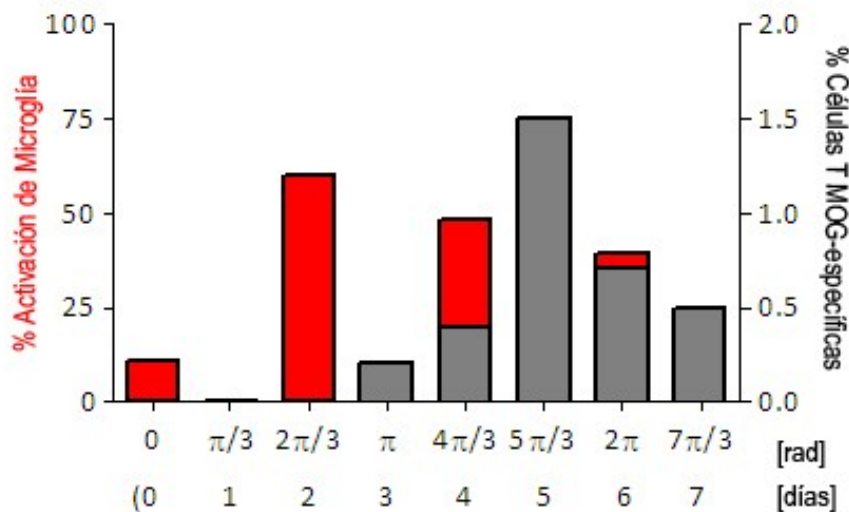


Figura 17. Dinámica de T_{eff} MOG+, T_{reg} MOG+ activados y microglía en órganos linfoides secundarios y SNC durante el curso de EAE. Se puede observar un comportamiento oscilatorio de linfocitos T_{eff} y T_{reg} MOG+ en bazo y SNC. Los resultados se expresan en porcentajes. Las líneas rojas y azules representan a linfocitos T_{eff} y T_{reg} MOG+ respectivamente en bazo o SNC. A) Porcentaje de linfocitos T_{eff} / T_{reg} MOG+ en bazo a lo largo de EAE en el grupo de animales que no recibieron ningún tratamiento. La gráfica superior muestra la media de la medida de 3 animales por día para ambas poblaciones (T_{eff} y T_{reg}). Las gráficas inferiores muestran la distribución de todas las medidas (raw data) de 3 animales por día para cada subpoblación T_{eff} o T_{reg} como puntos, con la media en una línea roja o azul respectivamente. B) Porcentaje de linfocitos T_{eff} MOG+ o T_{reg} MOG+ en SNC desde el día 9 de la inmunización. La gráfica superior muestra la media de las medidas de 3 animales por cada día, mientras que los paneles inferiores muestran la distribución de todas las medidas para cada subpoblación como puntos, con la media en rojo o azul respectivamente. C) Score clínico de los animales con EAE tras la inmunización (media + SD) D) Porcentaje de microglía activada en SNC desde el día 9 de la inmunización.

También se midió la frecuencia de T_{eff} y T_{reg} en el SNC desde el tiempo en que estas células migran al cerebro (desde el día 9). Como las células T activadas migran al órgano diana después de la activación celular, predijimos un comportamiento similar en el SNC infiltrado por linfocitos T a menos que la BHE estuviera atenuando estas oscilaciones. Observamos la presencia de T_{eff} y T_{reg} MOG- específicas en el SNC en varios tiempos, otra vez mostrando una dinámica oscilatoria acoplada. El modelo aproxima/simula el comportamiento oscilatorio de T_{eff} y T_{reg} MOG+ en base a un acoplamiento por la interactividad de aumento y disminución coordinados entre estas dos poblaciones (feedbacks positivos y negativos) y se ajustó, cualitativamente, algunos de sus parámetros según los datos experimentales en bazo. En el SNC el acoplamiento no es tan evidente. Por dicho motivo, se podría tratar como incursiones en los días en los que hubo rotura de la BHE y, por consiguiente, acceso de las células al SNC, en vez de registros temporales como ocurren en el bazo. En la *Figura 18*, se muestra cómo tras un máximo de activación de la microglía aparecen más linfocitos activos en el SNC.

Figura 18 Períodos de activación de la microglía. Se muestran los períodos de activación de la microglía (eje-x), considerando el tiempo de un ciclo entero de activación/desactivación de la microglía (período de unos 6 días) en las dos ocasiones que se registran *versus* la presencia de linfocitos T en SNC o la activación de la microglía (eje-y).



b. Análisis de las series temporales de células T y activación de microglía en SNC

Se ha analizado la población de microglía ($CD45^{lo}$, $CD11B^+$) y su % de activación (aumento de expresión de moléculas MHC-II IA^b) a lo largo de EAE. En la *Figura 17D* se observan tres ciclos de inflamación que corresponden al % de expresión de IA^b en microglía. Estos tres ciclos de unos 6 días de duración suceden en los días 2-10, 12-18 y 19-26, los cuales se correlacionan con los ciclos de linfocitos T_{eff}^{MOG+} mostrados en la *Figura 17A*. Hay que añadir que la activación de la microglía precede la infiltración de linfocitos T_{eff}^{MOG+} en SNC, en ambos eventos de activación y se correlaciona con la clínica y progresión de la EAE (*Figura 17C*).

c. La depleción de la población de células B disminuye la población de T_{eff}^{MOG+} en bazo y altera la dinámica de las células T

Durante el período de observación (30 días) de la dinámica de linfocitos T en EAE, las oscilaciones de ambas poblaciones se acoplaron la una a la otra indicando que la retroalimentación negativa de T_{reg} sobre T_{eff} juega un papel clave en autoinmunidad (*Figura 19*). Dado que se ha descrito que la depleción de linfocitos B altera la dinámica de linfocitos T e influencia el curso de EAE, analizamos el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-CD20 en nuestro modelo. La eliminación de linfocitos B tras el tratamiento con anti-CD20 alteró la expansión de T_{eff} y disminuyó los picos de las mismas en bazo (*Figura 19*). En bazo, tras tratamiento con anti-CD20, se observa una atenuación de la dinámica oscilatoria vista anteriormente y un ajuste de la activación de linfocitos T.

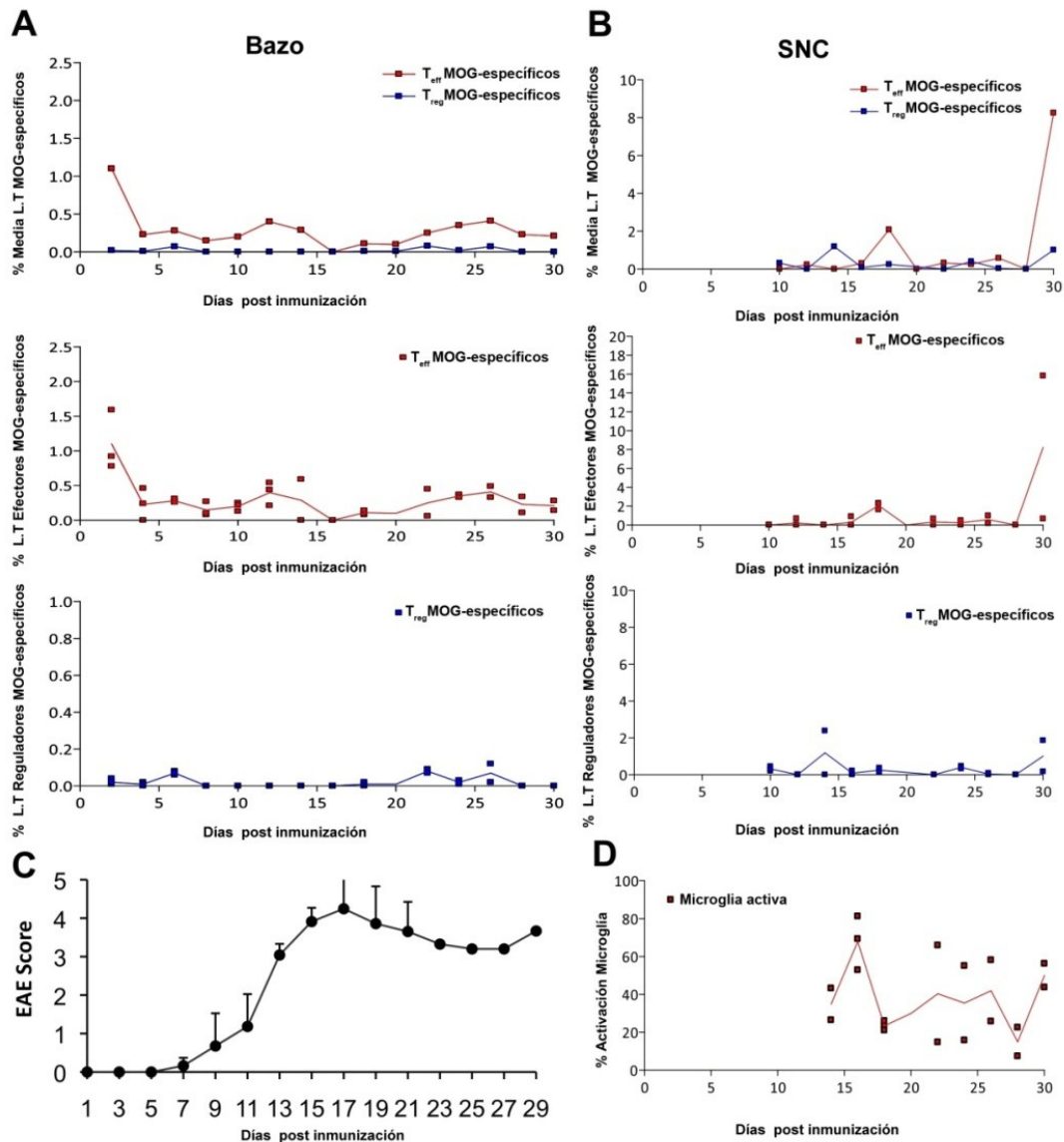


Figura 19. Dinámica de T_{eff} MOG+, T_{reg} MOG+ activados y microglía en órganos linfoides secundarios y SNC durante el curso de EAE después de la depleción de linfocitos B. A) Porcentaje de T_{eff} MOG específicos (rojo) o T_{reg} (azul) en el bazo tras la inmunización. La gráfica superior muestra la media de las medidas de 3 animales por día; los paneles inferiores muestran la distribución de todas las medidas para cada subpoblación como puntos, con la media en rojo o azul respectivamente. B) Porcentaje de T_{eff} (rojo) o T_{reg} (azul) en SNC desde el día 9 de la inmunización. La gráfica superior muestra la media de las medidas realizadas en 3 animales por día y los paneles inferiores muestran la distribución de todas las medidas para cada subpoblación como puntos, con la media en rojo o azul respectivamente. C) Score clínico de los animales con EAE tras la depleción de linfocitos B (media+SD). D) Porcentaje de microglía activada en SNC desde el día 9 de la inmunización.

En SNC se diferencian tres picos de T_{eff} y $T_{\text{reg MOG+}}$ con una tendencia a picos de menor amplitud en ambos casos. Las amplitudes de los picos de linfocitos $T_{\text{MOG+}}$ son claramente más grandes en las primeras etapas de la enfermedad después de la inmunización para disminuir posteriormente (*Figura 19*). Además, observamos una disminución en la amplitud de $T_{\text{reg MOG+}}$ comparada con la observada en la población de $T_{\text{eff MOG+}}$.

Respecto a la activación de microglía, observamos un aumento de la misma, que se corresponde con lesiones más extensas en el tejido nervioso y la aparición de una enfermedad más agresiva. En la *Figura 20* se muestra la población de linfocitos B tanto en bazo como en SNC en aquellos ratones en los cuales se administró anti-CD20. Se vio un agravamiento de EAE en el grupo de ratones que habían recibido tratamiento, como se había descrito previamente en este modelo. El grupo de animales que no fueron tratados presentaron una puntuación máxima clínica en el score de EAE de 3,52, alcanzado en el día 13, y una puntuación máxima acumulada de 25,25; mientras que en aquellos que sí se trataron con anti-CD20 la puntuación máxima clínica fue de 4,24, alcanzado en el día 17, y una puntuación máxima acumulada de 34,12 (*Tabla 2*)

Figura 20. Linfocitos B tras administración de anti-CD20 En la *Figura 20* se muestra el porcentaje de células B a lo largo del experimento en bazo y SNC de los animales inmunizados que recibieron anti-CD20.

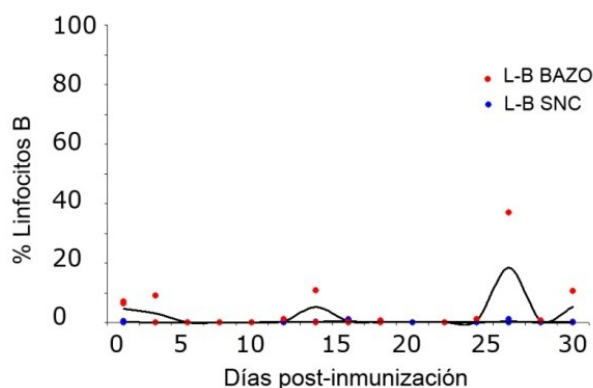


Tabla 2. Inicio, puntuación máxima y puntuación acumulada en el grupo de ratones no tratados y tratados con anti-CD20

Tratamiento	Inicio de EAE	Puntuación máxima clínica	Puntuación acumulada de EAE
Nada	DIA 8	3,52 (Día 13)	25,25
anti-CD20	DIA 6	4,24 (Día 17)	34,12

Se ha visto que los datos experimentales de las dinámicas de poblaciones en el modelo de EAE coinciden con las principales características predichas por el modelo teórico de activación linfocitos T. En este sentido, el efecto de la interacción entre células efectoras y reguladoras se muestra en los experimentos. La terapia de depleción de la población de linfocitos B conlleva una disminución y ajuste de la actividad dinámica de la respuesta de linfocitos T tanto en el modelo como en los experimentos.

Al mismo tiempo, el score clínico máximo se retrasó en comparación con los animales que no recibieron anti-CD20 (día 17, comparado con día 12, respectivamente, *(Figura 19C y 17C)*, siendo la enfermedad más agresiva en el grupo de los que sí recibieron anti-CD20. Ambos grupos muestran diferencias estadísticamente significativas por el test t de muestras pareadas ($p < 0.05$); específicamente en el día 17 (score máximo), día 11 en el debut de la enfermedad (tiempo de scores más altos para el grupo de EAE no tratado con anti-CD20) y entorno al día 21, donde el grupo que sí recibió anti-CD20 mantuvo scores más altos y durante más tiempo *(Figura 17Cy 19C)*. La presencia de un desequilibrio entre T_{eff} y T_{reg} y la persistencia de la activación de microglía podrían inducir al desarrollo

de una EAE más agresiva, pese al tratamiento con anti-CD20 y la depleción de L-B. Además, nuestros resultados sugieren que la depleción de L.B modula la activación del L.T en los órganos linfoides periféricos con un efecto más profundo en la activación de la población de T_{reg} . (*, $p < 0.05$).. La disminución en la activación de T_{reg} se produjo, sobre todo, en SNC (***, $p < 0.0001$). Sin embargo, el hecho de que las dinámicas oscilatorias de T_{eff} $MOG+$ y $T_{reg}MOG+$ persistan sugiere que la depleción de L.B participa mediante el ajuste del umbral de activación de L.T más que revertiendo el proceso autoinmune. Ambas poblaciones de L.T MOG -específicos activados están disminuidas, pero en el caso de $LT_{eff} MOG+$ activados no está tan disminuido como $T_{reg} MOG+$ activados. Probablemente, la disminución en la población $T_{reg} MOG+$ empeore el pronóstico de EAE puesto que disminuye, por tanto, la regulación de T_{eff} (*Tabla 2*)

Tabla 3. Descripción de picos de $T_{eff\ MOG+}$, $T_{reg\ MOG+}$ y score de EAE en ambos grupos, tratados y no tratados con anti-CD20.

	BAZO				SNC			
Primer pico $T_{eff\ MOG+}$	Día 8	0,85	Día 2	1,1	Día 11	2,22	Día 12	0,228
Pico máx. $T_{eff\ MOG+}$	Día 12	1,52	Día 2	1,1	Día 11	2,22	18/30	2,08/ 8,24
Número de picos	5		4-5		5		4-5	
Período de los picos	5-6 días		4-6 días		2-4 días		4 días	
Media % $T_{eff\ MOG+}$ a lo largo de EAE	0,54		0,28		0,64		1,51	

	BAZO				SNC			
Primer pico $T_{reg\ MOG+}$	Día 8	0,11	Día 6	0,07	Día 16	1,78	Día 10	0,32
Pico máx. $T_{reg\ MOG+}$	Día 25	0,18	Día 6	0,07	Día 16	1,78	Día 14	1,19
Número de picos	7		2-3		3		4	
Período de los picos	2-4 días		2 días		2-4 días		4-6 días	
Media % $T_{reg\ MOG+}$ a lo largo de EAE	0,41		0,02		0,24		0,63	

Primeros Síntomas	Día 9	Score = 0,56	Día 7	Score = 0,16
Valor Máximo	Día 13	Score = 3,52	Día 17	Score = 4,24

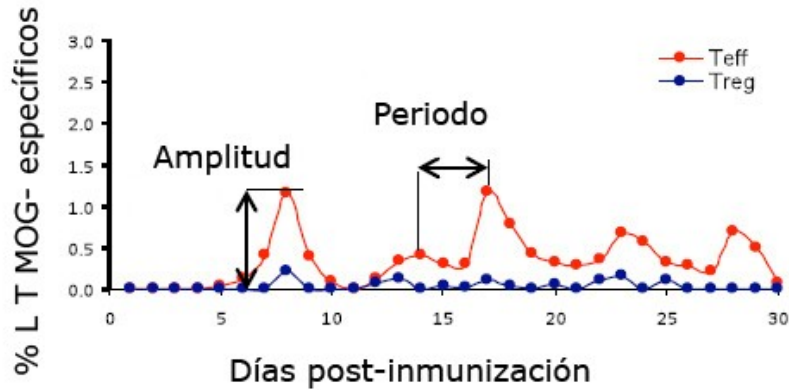
* Grupo de animales no tratados con anti-CD20

* Grupo de animales tratados con anti-CD20

4. Análisis computacional del modelo: simulaciones, sensibilidad y bifurcaciones

a. Amplitud y período de los picos de LT_{MOG+} activados

Figura 21. Amplitud y Período



- Las amplitudes de los picos de LT_{MOG+} activados son **claramente más grandes en las primeras etapas de la enfermedad** después de la inmunización y disminuyen después. Puede suceder porque:

- La disponibilidad de antígenos es considerablemente más alta tras la inmunización
- El efecto de la sincronización de la respuesta inmune permite detectar mejor el pico de respuesta
- La expansión del epítipo en sucesivas activaciones introducirá cambios en la dinámica y reducirá la sincronización de la señal
- Las señales anti-inflamatorias del tejido (IL-10) reducirán los picos de activación

Las sub-poblaciones de LT_{MOG+} y de la microglía presentan **unas dinámicas oscilatorias acopladas e interconectadas** durante el ataque autoinmune en el SNC.

Los modelos matemáticos identifican la **activación de $L T_{reg}$** como un **elemento capital** que gobierna la susceptibilidad a la enfermedad autoinmune.

b. Dinámica de $T_{eff\ MOG+} / T_{reg\ MOG+}$ activados en los órganos linfoides secundarios durante el curso de EAE (Figura 17)

La activación de $L T_{eff}$ y de $L T_{reg\ MOG+}$ sigue un comportamiento oscilatorio

- Período de oscilación → entorno a 4-5 días.
- Dinámicas coordinadas entre las dos poblaciones de $T_{eff\ MOG+} / T_{reg\ MOG+}$.
- La amplitud de oscilación (el porcentaje máximo de $L T_{MOG+}$ en relación a la totalidad de $L T_{CD4+}$) de $T_{eff\ MOG+}$ es considerablemente más grande como media (entre 2 y 6 veces) que la de $T_{reg\ MOG+}$.
- La amplitud fue siempre más grande para los primeros dos picos → coincidiendo con el debut de la enfermedad clínica.

c. Dinámica de $T_{eff\ MOG+} / T_{reg\ MOG+}$ activados en SNC durante el curso de EAE (Figura 17)

Las dinámicas oscilatorias de $L T_{eff\ MOG+}$ y de $L T_{reg\ MOG+}$ en el SNC están acopladas:

- Las amplitudes de las incursiones de $L T_{eff}$ y de $L T_{reg}$ son entorno a un 3% y 4% de la totalidad de la población de $L T_{no\ MOG}$ específicos respectivamente.

- Las amplitudes son más grandes que las observadas en el bazo, indicando una acumulación de células antígeno-específicas en el órgano diana.
- La invasión del SNC por LT_{MOG+} comienza 2-3 días después de la activación de LT_{MOG+} en la periferia (día 9-10 post-inmunización) y se prolonga a lo largo de la enfermedad.

d. Dinámica de la microglía en el SNC a lo largo de EAE (Figura 18)

Se encuentran oscilaciones en la población de microglía tras la inmunización

- La microglía activada presenta dos picos de activación con un período de 8 días y una amplitud máxima de 60%.
- La microglía permanece activada durante 6 días en los dos eventos de activación, indicando un período de activación intrínseco para la microglía y diferente de aquella que fue observada para los linfocitos T_{MOG+} .
- El máximo de activación de la microglía **precede a las apariciones de LT_{MOG+}** en el SNC
- La primera activación de la microglía comienza en el día 10.
- Presenta un primer máximo un día antes del segundo pico de $LT_{eff-MOG+}$ en el SNC (día 14).
- El brote clínico máximo se registró del día 13 al 14.
- El score clínico desciende del día 14 al día 21 y coincide con la desactivación de la microglía a nivel basal.
- El segundo pico de activación de la microglía persiste del día 20 al 26, otra vez precediendo el siguiente pico de $LT_{eff-MOG+}$ activados en el SNC.

Este resultado sugiere una necesidad de señales adicionales para la activación de la microglía, la cual precede a la infiltración de células antígeno-específicas en el SNC y/o un papel de la microglía en el reclutamiento de células T_{MOG+} en el SNC

e. Dinámica de $T_{eff\ MOG+}/T_{reg\ MOG+}$ activados en los órganos linfoides secundarios a lo largo de EAE con depleción de LB (Figura 19)

- Las poblaciones de $T_{eff\ MOG+}$ y $T_{ref\ MOG+}$ mantienen su presencia oscilatoria en los órganos linfoides secundarios.
- La activación de los picos de $LT_{eff\ MOG+}$ está sensiblemente disminuida en amplitud y aparece más pronto.
- La activación de LT_{MOG+} aparece más pronto y más rápido.
- La depleción de LB modula la activación de LT en los órganos inmunes periféricos con efectos más profundos sobre $T_{reg\ MOG+}$.

f. Dinámica de $T_{eff\ MOG+}/T_{reg\ MOG+}$ activados en el SNC a lo largo de EAE con depleción de LB (Figura 19)

- En el SNC hay una disminución de la amplitud de $T_{reg\ MOG+}$ comparada con la de $T_{eff\ MOG+}$.
- Aumento de la activación de la microglía.
- Presencia de una enfermedad más agresiva.
- La bajada en la regulación de T_{reg} ha sido identificada principalmente en el tejido del SNC y ha sido asociada con la persistencia de la activación de la microglía.

g. Dinámica de $T_{\text{eff}}^{\text{MOG+}}$ / $T_{\text{reg}}^{\text{MOG+}}$ activados y de la microglía en SNC a lo largo de EAE con depleción de LB (Figura 19)

- En el SNC, la presencia de un desequilibrio entre los picos de $T_{\text{eff}}^{\text{MOG+}}$ en relación a aquellos de $T_{\text{reg}}^{\text{MOG+}}$ y la persistencia de la activación de la microglía puede explicar el deterioro de la EAE en este modelo a pesar de la terapia con anti-CD20.
- El hecho de que las dinámicas oscilatorias de $LT^{\text{MOG+}}$ persistan sugiere que la depleción de LB provoca más bien un ajuste preciso de los umbrales de activación de los $LT^{\text{MOG+}}$ que una restitución de la salud.

h. El modelo matemático identifica la activación de T_{reg} como un elemento clave en la susceptibilidad a la autoinmunidad

Como se ha descrito anteriormente, el modelo se ajustó a los parámetros obtenidos en los datos experimentales. Dicho modelo se basa en la hipótesis de que existe una retroalimentación negativa muy fuerte entre $T_{\text{eff}}(\text{E})$ y $T_{\text{reg}}(\text{R})$ en la respuesta inmune adaptativa mediante un sistema de cazador-presa (ver ecuaciones en métodos). Los linfocitos T_{eff} activados producirán señales para inducir la expansión de T_{reg} ; mientras, el aumento de la actividad de T_{reg} significará un efecto de supresión en los niveles de T_{eff} activados. El modelo también incluye las células T vírgenes

del timo en reposo (R_r y E_r , *Figura 22A*) llegando a una entrada de células (input estocástico) en el sistema immune, simulando una naturaleza aparentemente aleatoria de los pulsos de las células en reposo (las cuales serán activadas por la presentación antigénica). Se han identificado dos características del modelo de regulación cruzada que claramente son diferentes entre el estado de enfermedad (EAE) o de salud: la amplitud y el período. Se estableció una tasa de activación de T_{reg} (α_{reg}) y un número de T_{eff} necesarias para la mitad de la activación máxima de T_{reg} (K_{eff}). En particular, usando el mismo valor para la tasa de presentación antigenica en ambas poblaciones (δ), se observó un comportamiento oscilatorio después de una bajada de α_{reg} (hasta 1.05 /día; rango: 0.75 a 1.05) y un aumento de K_{eff} (hasta 2,500 células). Por tanto, nuestros datos y modelo apoyan el concepto de que la respuesta autoimmune oscilatoria observada se puede explicar por una disminución en la fuerza de la regulación cruzada de T_{eff} - T_{reg} , una combinación del aumento del umbral de T_{eff} para los linfocitos T_{reg} activados y una reducción del número de linfocitos T_{reg} activados.

Concordando con los datos experimentales, las simulaciones del modelo mostraron que las oscilaciones coordinadas de las poblaciones activadas de T_{eff} y T_{reg} tienen amplitudes para T_{eff} al menos 4 veces mayores que las observadas para T_{reg} . Además, para comparar el modelo con los datos experimentales, se testaron la distribución de las medias de las

desviaciones estándar de las amplitudes de las oscilaciones para tres simulaciones (un punto por día) para 30 días. Las medias de las desviaciones relativas medidas en los datos experimentales fueron $0,62\pm 0,01$ para T_{eff} y $0,40\pm 0,02$ para T_{reg} , mientras que en las simulaciones del modelo fueron $0,61\pm 0,01$ para T_{eff} y $0,30\pm 0,01$ para T_{reg} . Estos resultados encajan cualitativamente con las observaciones vistas en los datos observados de EAE (*Tabla 1*).

El modelo propone un sistema de cazador-presa en el cual T_{reg} y T_{eff} juegan el papel de cazador y presa respectivamente. Se desarrolló una representación de espacio de fases de las trayectorias del modelo matemático en el plano para $T_{\text{eff}}-T_{\text{reg}}$ después de ajustarlo a los datos experimentales de EAE (*Figura 22D*), mostrando que en el estado de salud, las dinámicas están controladas por T_{reg} (eje-x), mientras que en el estado de autoinmunidad, las dinámicas están, sobre todo, gobernadas por T_{eff} (eje-y). En resumen, la combinación de los datos experimentales con el modelo teórico apoya la importancia de la regulación cruzada de las poblaciones de células T en el control de la respuesta inmune, y apunta a que la población de células T_{reg} es crítica para entender las dinámicas en las enfermedades autoinmunes.

A Modelo: ODE system para poblaciones de células T

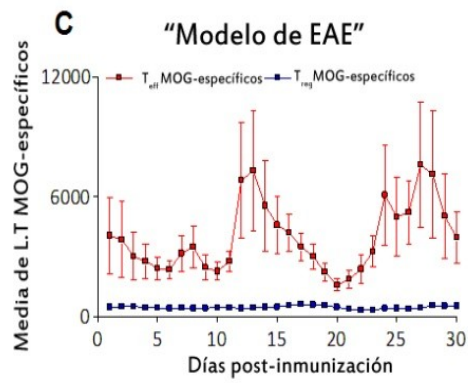
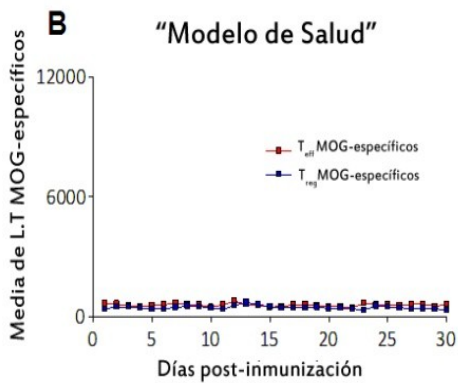
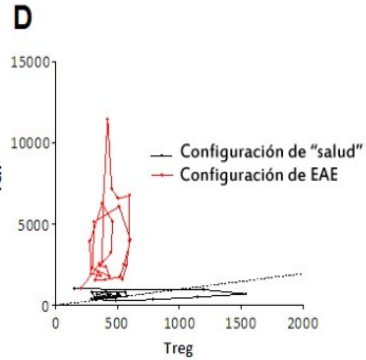
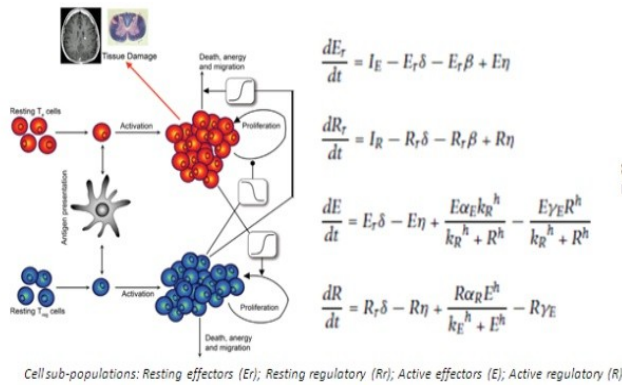


Figura 22. Simulaciones del modelo de regulación cruzada de células T A) Representación gráfica y las ecuaciones del modelo de regulación cruzada de células T. Las simulaciones del curso temporal del número de T_{eff} MOG-específicas (rojo) o T_{reg} (azul) en el bazo (eje-y) después de la inmunización (eje-x, en días) con el modelo de regulación cruzada en estado de "salud" (B) y en 'EAE' (C). Las simulaciones se muestran como medias \pm SD de 3 simulaciones durante 30 días (discretizado por días) para expresar la media de puntos de manera similar a los datos experimentales de la figura 19. El diagrama de espacio de fases muestra las trayectorias de T_{eff}/T_{reg} en las simulaciones (30 días) para ambas configuraciones ('salud' en negro y 'EAE' en rojo).

i. **Análisis de sensibilidad del modelo de regulación cruzada apoyan el papel crítico de la depleción de linfocitos B en la actividad de T_{reg}**

Para analizar la influencia de la depleción de linfocitos B en la dinámica de las subpoblaciones de linfocitos T, se hicieron análisis de sensibilidad del modelo matemático de regulación cruzada con el propósito de identificar los parámetros del modelo que gobiernan la dinámica en células T inducida por esta terapia. Aunque el modelo no incluye las células B, mediante un ajuste de los datos experimentales se analizaron las dinámicas resultantes en ambas poblaciones de linfocitos T después del tratamiento con anti-CD20 para comprender el mecanismo por el cual los linfocitos B influyen en la dinámica de linfocitos T. Encontramos que la dinámica de las subpoblaciones de linfocitos T antígeno-específicos después de administrar anti-CD20 se reprodujo reduciendo el umbral K_{eff} por debajo del estándar de homeostasis (<1,000 células; e.j. 850 cells), independientemente del parámetro α_{reg} (valores α_{reg} estaban en el rango bajo del régimen de autoinmunidad. *(Figura 23)*). En otras palabras, nuestro modelo matemático sugiere que la depleción de células B influye en el proceso autoinmune mediante la prevención de la activación incontrolada de T_{eff} pero sin una fuerte activación de T_{reg} . Las trayectorias experimentales en el diagrama de espacio de fases se han visto dominadas por las células T_{eff} (eje-y. *Figura 23*) en EAE (en azul) y con la

terapia de anti-CD20 (en rojo). Sin embargo, en el grupo de animales tratados con anti-CD20, no se observaron las altas incursiones de gran amplitud características de EAE. Este comportamiento está fácilmente reproducido en el modelo mediante simulaciones durante 30 días, las cuales, muestran que la depleción de linfocitos B, aunque disminuyen las incursiones de T_{eff} , no recuperan las excursiones de T_{reg} observadas en el grupo de régimen sano (*Figura 22D*).

En resumen, las simulaciones sugieren que la depleción de linfocitos B modula las enfermedades autoinmunes, sobre todo afectando a la interacción entre T_{reg} y T_{eff} y, en particular, fortaleciendo la regulación cruzada de T_{eff} - T_{reg} mediante una bajada en el umbral de activación de T_{reg} .

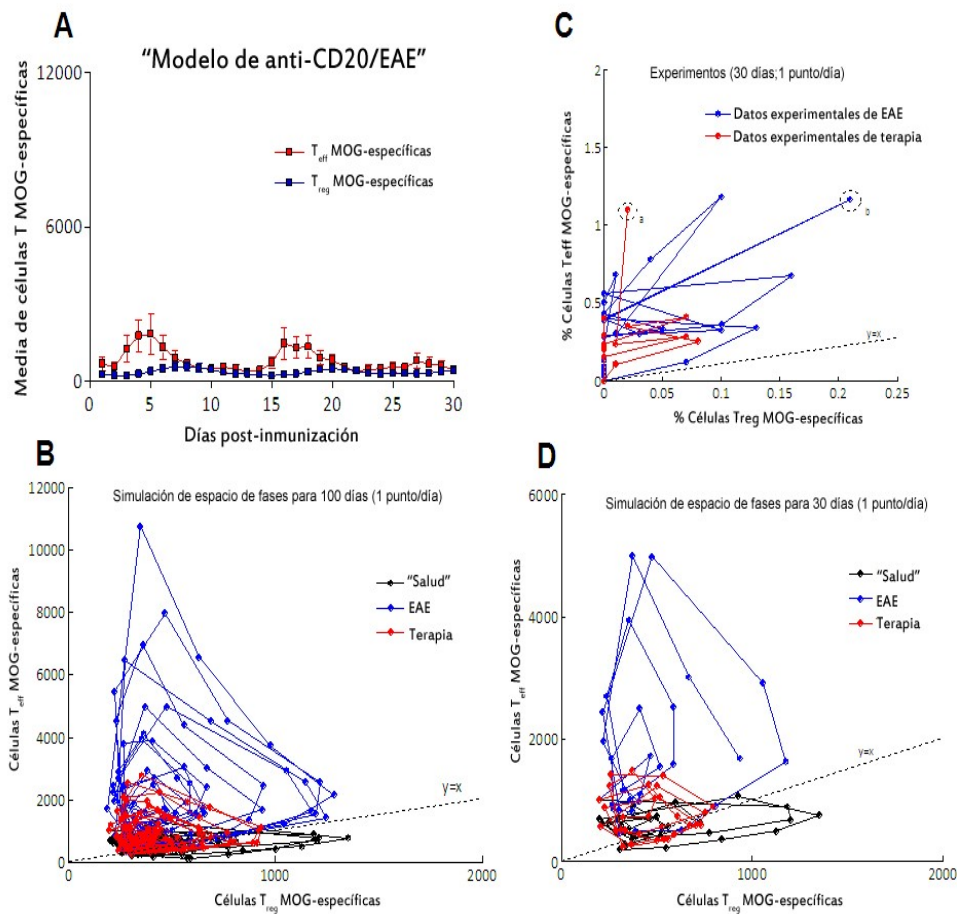


Figura 24. Simulación del efecto de anti-CD20 en el modelo de regulación cruzada de células T A) Simulación del curso temporal del número de células T_{eff} MOG específicas (rojo) y T_{reg} (azul) en el bazo (eje-y) tras la inmunización (eje-x, en días) mediante el modelo de regulación cruzada usando valores para α_{reg} y K_{eff} del régimen de 'EAE'. B) Histogramas de espacio de fases mostrando las trayectorias del número de T_{eff}/T_{reg} en las simulaciones de 100 (B) y 30 (D) días para las simulaciones del estado de "salud" (negro), EAE (azul) y depleción de células B (rojo). La simulación de 30 días (D) se realiza para comparar los datos experimentales en C (en C, puntos 'a' y 'b' están marcados como primeros picos grabados en los experimentos para ambos grupos comparados). Las simulaciones fueron discretizadas en días para mostrar los puntos de manera similar a los datos experimentales en la *figura 20*.

En resumen:

- Los $LT_{\text{eff MOG}^+}$ y los $LT_{\text{reg MOG}^+}$ presentan una dinámica oscilatoria acoplada con un período de 4-5 días y una amplitud decreciente, que es siempre más alta para $T_{\text{eff MOG}^+}$.
- La activación de la microglía sigue las oscilaciones de $LT_{\text{eff MOG}^+}$ en los órganos linfoides secundarios, pero la microglía se activa antes de que aparezcan los picos de LT_{MOG^+} en el SNC.
- La depleción de LB disminuye la expansión de $LT_{\text{eff MOG}^+}$ y esta disminución es más significativa para los $LT_{\text{reg MOG}^+}$ en el SNC, lo cual se corresponde con una posibilidad de daño mayor asociada a la activación de la microglía.
- La modelización matemática de la terapia con anti-CD20 sugiere que la depleción de LB influye en la dinámica de la población de LT mediante un ajuste preciso de su activación.
- Para terminar, las dinámicas oscilatorias de la población de LT tienen un **origen intrínseco en la regulación fisiológica de la respuesta inmune adaptativa**, la cual influye en el fenotipo de la enfermedad y la respuesta a la inmunoterapia.



7-Discusión

1. Homeostasis y regulación cruzada de $T_{\text{eff}}/T_{\text{reg}}$

La naturaleza remitente-recurrente de EM es una de sus características más sorprendentes e intrigantes pero se desconoce todavía por qué empieza y por qué esta enfermedad aparece únicamente en algunos individuos. Lo primero de todo, debemos contestar qué es lo que debe mantener el organismo en un estado de homeostasis, y con ello de salud. La homeostasis es necesaria para sobrevivir; y para obtener esta homeostasis el organismo ha desarrollado complejos sistemas con millones de interacciones reguladoras con el propósito de mantener el sistema bajo control. Por supuesto, el SI, con la capacidad potencial de destruirse a sí mismo mediante la inflamación, tiene que tener un sistema muy bien planificado de regulación y control. La respuesta inmune efectora, la cual es necesaria para combatir la infección o el cáncer, debe estar firmemente frenada para evitar una respuesta inflamatoria fuera de control [1,30]. En las patologías autoinmunes esta regulación de la función efectora parece estar rota. Siendo el SI uno de los sistemas más complejos del cuerpo, parece realmente necesario el profundizar en sus mecanismos reguladores con el propósito de entender la base biológica de la condición autoinmune.

En estado de salud, los linfocitos T_{eff} y T_{reg} tienen una regulación cruzada mediante oscilaciones para mantener la homeostasis como ocurre en diversas situaciones fisiológicas [162-164]. Esta regulación cruzada funciona como un feed back negativo, lo cual permite al sistema ser activado rápidamente cuando es necesario. Pero en las enfermedades autoinmunes, específicamente en aquellas remitentes-recurrentes, el balance entre la respuesta pro-inflamatoria (T_{eff}) y el desarrollo de mecanismos reguladores parece estar roto. De hecho, los linfocitos T_{eff} están sobre-activados mientras que la función de T_{reg} está alterada, produciendo, finalmente, una interrupción de la tolerancia periférica. Por

tanto, esta respuesta autoinmune es el resultado, en parte, de una alteración de la dinámica y balance de $T_{\text{eff}} / T_{\text{reg}}$. Aunque el sistema inmune tiene varios mecanismos de control mediante sistemas de retroalimentación negativa que proveen un control fino de la activación del linfocito T en condiciones de homeostasis, en la enfermedad autoinmune este comportamiento oscilatorio alterado aparece sobre la base de unas dinámicas periódicas intrínsecas al propio diseño del sistema inmune, siendo la propia naturaleza de la dinámica de la respuesta inmune adaptativa suficiente para que aparezca dicha alteración. Por supuesto, esta dinámica alterada terminará en daño tisular y, finalmente, en enfermedad con variables grados de presentación clínica en cada paciente.

Gracias a modelos matemáticos se predice que esta regulación cruzada de $T_{\text{eff}} / T_{\text{reg}}$ genera una dinámica estable oscilatoria de ambas poblaciones que mantiene la homeostasis en estado de salud, pero que promueve las recaídas, brotes y remisiones en situaciones de autoinmunidad [132,165,166]. En este estudio se han analizado las dinámicas de las subpoblaciones de linfocitos T antígeno-específicos después de la inmunización e inducción de EAE y se han relacionado con el resultado, progresión y desarrollo de la enfermedad autoinmune en el SNC. Hemos observado que, después de la inmunización, las poblaciones de linfocitos T_{eff} antígeno-específicos y T_{reg} antígeno-específicos se activan y oscilan de forma acoplada con un período intrínseco. La combinación del análisis experimental y computacional nos ha dado información de cómo las recaídas en las enfermedades autoinmunes son una propiedad intrínseca del propio sistema de regulación del sistema inmune y pueden ser moduladas por factores externos.

El hecho de que las oscilaciones de ambas poblaciones se acoplaran día a día, indica la importancia de la activación en sincronía de la respuesta inmune adaptativa efectora y reguladora para el resultado de

la respuesta inmune. Nuestros datos experimentales muestran que las células T efectoras y reguladoras se activan el mismo día después de la inmunización e indican la importancia de la aparición de la respuesta inmune reguladora de linfocitos T en paralelo con la respuesta T efectora. Después de la activación, los mecanismos de retroalimentación negativa entre ambas poblaciones podrán mantener su oscilación por un largo período de tiempo, aunque se hayan retirado los antígenos causantes u otros factores supresores cancelen las oscilaciones a largo plazo. El análisis del modelo de regulación cruzada entre T_{eff} y T_{reg} , ajustado con los datos experimentales obtenidos, apoya y confirma el papel clave de las dinámicas de los linfocitos T reguladores a la hora de definir la progresión de la respuesta autoinmune [167,168].

2. Linfocitos T autorreactivos en la fisiopatología de EM y EAE

Durante el curso de EAE, linfocitos CD4+ y CD8+ entran en el SNC, lo cual está asociado con la activación de la microglía y la desmielinización y pérdida axonal. En el modelo de EAE, las células T reguladoras tienen un papel crítico en el control de la activación de linfocitos T encefalitogénicos, pero su mecanismo de acción es complejo. Las condiciones locales del SNC regularán la activación y la función supresora de las células T_{reg} [169-171]. Sin embargo, a nivel funcional, el resultado de la enfermedad parece depender del balance entre la supresión de activación y proliferación de las células T_{eff} y la supervivencia de los linfocitos T encefalitogénicos, lo cual promueve su acumulación y rompe el equilibrio entre células T_{reg} y T_{eff} [172].

El SNC debe considerarse no sólo como un sitio inmunoprivilegiado, sino como un órgano inmuno-especializado [173]. La barrera hematoencefálica (BHE) limita el intercambio de células inmunes y sus mediadores, pero los linfocitos activados también pueden cruzar la BHE. Además, la microglía mantiene la integridad de la BHE y permite a las células inmunes acceder al cerebro cuando la activación inmune es necesaria [174,175]. Tenemos que tener en cuenta que en las enfermedades autoinmunes del SNC hay linfocitos encefalitogénicos que han escapado de la tolerancia central [176]. Por tanto, la activación de células T autorreactivas es uno de los primeros pasos en el desarrollo de autoinmunidad, pero también el pool de estos linfocitos específicos de neuroantígeno es limitado porque existen mecanismos de tolerancia. La susceptibilidad a padecer la enfermedad autoinmune reside, por tanto, en la habilidad de algunas moléculas MHC para presentar epítomos de autoantígenos, los cuales no están en el timo. La fuerza de estos complejos peptido-MHC debe no ser estable para haber podido escapar de la

tolerancia central y por tanto estos linfocitos autorreactivos permanecen en un estado de ignorancia y autoinmunidad. El balance entre las células T autorreactivas y el control de las células reguladoras se hace más difícil de mantener a medida que el pool de linfocitos específicos del auto-antígeno aumenta.

El desarrollo de la enfermedad autoinmune se ilustra en EAE. EAE está inducida por la inmunización con un antígeno del SNC, como MBP o MOG. El reconocimiento de MBP o MOG en este contexto activará a las células T naïve que están circulando en la periferia, las cuales entran en el SNC y empiezan la destrucción de la mielina [177,178]. Después de la migración al SNC, las células T encefalitogénicas se encontrarán con el neuroantígeno en CPA, en este caso, macrófagos y microglía, los cuales presentarán el antígeno en moléculas MHC de clase II. Si la inmunización se hizo con mielina, el oligodendrocito será la diana final. Después de varios días, se producirá una oleada de células T activadas, las cuales entrarán en el SNC y, finalmente, producirán daño tisular. En este contexto, la microglía actúa como una CPA (antígeno-específica), pero también dando señales no dependientes de MHC a células inflamatorias, comenzando la fase efectora.

3. Papel de la microglía en EM y EAE

Otra observación interesante de este estudio es que la activación del sistema inmune innato, es decir la activación de la microglía, sigue a las dinámicas oscilatorias de la respuesta inmune adaptativa con una fase muy bien definida, habiéndose encontrado evidencias experimentales sobre oscilaciones en la microglía, no solo en los LT activos. Es muy interesante el hecho de que la microglía se activa justo después de la activación de los linfocitos T en la periferia, pero antes de la infiltración de las células T antígeno específicas en el órgano diana (SNC). Además, el máximo de activación de la microglía suele preceder las medidas de presencia de LT en SNC. Estos resultados sugieren que después de alta activación de microglía hay más LT en el SNC. Los análisis temporales de cambios en la expresión génica durante el curso de EAE demuestran la activación de genes relacionados con la respuesta inmune innata antes de la presencia de infiltrados inflamatorios, apoyando el papel de la activación de la microglía desde etapas precoces e incluso precediendo la invasión del SNC por las células antígeno específicas [179]. Estudios recientes anatómopatológicos de SNC de pacientes con EM o modelos de EAE sugieren que las células T efectoras activadas se acumulan en el espacio subaracnoideo donde pueden ser reestimuladas liberando señales pro-inflamatorias que activan la microglía y contribuyen a la apertura de la BHE y la subsecuente entrada de linfocitos T en el parénquima cerebral [180,181].

4. Amplitudes de los picos de activación del L.T_{MOG+}

Las amplitudes de los picos de activación de L.T_{MOG+} aparecen claramente más grandes en las primeras etapas de la enfermedad siguiendo a la inmunización y después decrecen. Esto podría ser explicado por diversos factores. Después de la inmunización, la disponibilidad de antígenos presentados a los linfocitos T por las CPA es mayor comparado con la concentración de restimulaciones posteriores en el SNC. Además, el hecho de realizar una inmunización provoca un efecto de sincronización que hace que sea más sencillo detectar la activación del linfocito T justo después de la misma, en comparación con lo que ocurre posteriormente ya que aparecerán otros grupos de clones individuales que serán activados de forma desincronizada, lo cual complica la detección de la expansión de la célula T. Otro factor involucrado debe ser el proceso de expansión del epítipo, el cual provoca un reclutamiento de otras especificidades antigénicas una vez hay destrucción tisular que no han podido ser medidas en este estudio. Por último, no se deben olvidar las señales anti-inflamatorias que llegan del tejido diana (por ejemplo, IL-10) que pueden contribuir a disminuir la respuesta inmune y por tanto disminuir los picos de linfocitos T activados [182].

5. T_{reg} y ruptura de tolerancia en autoinmunidad

La tolerancia en el SNC puede verse alterada por varios mecanismos, como infecciones en el SNC y aumento de la expresión de MHC y moléculas co-estimuladoras in situ, también defectos genéticos, infecciones en la periferia pueden alterar la presentación antigénica en SNC y aumentar los mediadores solubles. La tolerancia en la periferia es controlada, en parte, debido a la presencia de células T_{reg} . El presente trabajo apoya la importancia de la regulación cruzada entre las diferentes poblaciones linfocitarias y su contribución al desarrollo de la respuesta inmune. En cuanto a la población de T_{reg} , incluso si estas células suponen una población cuantitativamente pequeña comparada con la población de células *naïve* o la de linfocitos efectoras, su papel crítico en la regulación de la respuesta les confiere una importancia central en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes y, por tanto, las convierte en dianas muy atractivas para la inmunoterapia contra estas enfermedades.

6. Papel del linfocito B en autoinmunidad del SNC

Los linfocitos B parecen tener un papel complejo en la autoinmunidad del SNC. Las células B contribuyen a la patogénesis de la enfermedad ya que, además de su papel en la producción de anticuerpos, a través de la inducción de un medio pro-inflamatorio como es la liberación de IL-6 y de su papel como células presentadoras de antígeno, promueven la activación de linfocitos TH1 y Th17, monocitos o pueden inhibir su activación mediante linfocitos B reguladores (B10) [183]. El papel de la depleción de la población de linfocitos B en la activación de las respuestas antígeno específicas en EAE es complejo porque no altera directamente la función reguladora de los linfocitos T_{reg} , sino que altera el balance entre la función efectora y reguladora lo cual concuerda con nuestros resultados [184]. Nuestros resultados indican que en un modelo en el cual la terapia con anti-CD20 induce una enfermedad más grave, incluso cuando la depleción de linfocitos B disminuye la activación tanto de linfocitos T_{eff} como Treg, la enfermedad dependerá finalmente, al menos en parte, del balance entre las mismas.

Aunque en algunos estudios se han visto anticuerpos anti-MOG en las áreas de desmielinización, y la transferencia de anticuerpos anti-MOG empeora la EAE, la depleción de linfocitos B después de la inmunización de EAE es protectora [185-187]. Se deduce, por tanto, que la población de linfocitos B y anticuerpos deben jugar un papel clave en el daño del SNC en algunos modelos de EAE. Sin embargo, otros grupos han mostrado que la depleción de linfocitos B antes de la inmunización de EAE con MOG³⁵⁻⁵⁵, empeora la enfermedad, como hemos visto en nuestros resultados, probablemente debido a la depleción de B_{reg} y la posterior alteración del balance entre T_{eff} / T_{reg} , debido a que la regulación intrínseca patológica de T_{eff} / T_{reg} debe afectar a la gravedad y frecuencia de EAE [188-190]. Hemos

visto que la activación de los linfocitos T_{MOG} específicos ocurre antes y de manera más rápida en el grupo de animales tratados con anti-CD20. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los linfocitos B efectores modulan la presentación del antígeno a la célula T y los linfocitos B reguladores modulan la expansión del linfocito T [191]. Hemos observado, además, que en el SNC en ratones tratados con anti-CD20 hay un efecto más profundo sobre la población y respuesta de linfocitos T_{reg} que sobre la población de linfocitos T_{eff}, con un subsiguiente aumento en la activación de la microglía, lo cual se ha correlacionado con la aparición de un daño tisular del SNC mayor.

7. Implicaciones en inmunoterapia

Nuestros resultados tienen diversas implicaciones en cuanto a la inmunoterapia. Primero; las terapias inmunomoduladoras, como anti-CD20, no revierten la respuesta patológica de las enfermedades autoinmunes, sino que, en todo caso, las mantienen en un estado menos deletéreo. Por este motivo, el cese de una terapia administrada puede provocar que el SI vuelva al estado original de enfermedad autoinmune y, en algunos casos, dependiendo de los factores genéticos o medio-ambientales, incluso podría empeorar debido a un efecto rebote. Esto se ha podido observar en la terapia con natalizumab, en la cual, una importante proporción de pacientes (un tercio) desarrolla una recaída de rebote varios meses después de la última infusión del tratamiento. Segundo; aunque las células T_{reg} son una diana ideal para la inmunoterapia, con el propósito de aumentar su función reguladora en el caso de autoinmunidad, será necesario un estudio del resto de poblaciones implicadas en la respuesta inmune y del momento en el que el tratamiento comienza. Por esta razón, la terapia ideal, a este nivel, deberá incluir un ajuste preciso de las dinámicas de linfocitos T antígeno-específicos a largo plazo para devolver al paciente a un estado lo más cercano posible al estado inicial de salud.

8. Nuestro modelo, un acercamiento a la patogenia de EM desde la Biología de Sistemas

La EM es una enfermedad autoinmune en la cual se desarrolla una respuesta inmune contra antígenos del SNC. La aproximación más frecuente en cuanto al conocimiento de la EM es una descripción determinista de lo que ocurre a nivel molecular sin ahondar ampliamente en la descripción fisiológica del mecanismo que subyace en la propia enfermedad. Es decir, se tiene un amplio conocimiento molecular y puntual de la enfermedad sin tener en cuenta la relación del tiempo en el que ocurren estos procesos patológicos, el input que los produce, el desarrollo de los mismos y la relación entre las diferentes poblaciones celulares que ejercen un papel clave en la inflamación y posteriormente neurodegeneración del SNC. Esta visión da una información de lo que ocurre en un momento concreto, en una célula concreta, en una fase concreta de la enfermedad autoinmune, por lo que se trata de una información parcial.

La biología de sistemas permite estudiar la naturaleza y, por tanto, también la enfermedad, de una manera completa y globalizada; estudiando sus componentes y su interrelación, es decir, estudiándolo como un todo, no únicamente una parte. Esto significa comprender el sistema, cada una de sus partes y la relación entre ellas y el entorno, teniendo en cuenta el factor tiempo. Hemos querido plantear una aproximación más holística, fisiológica y global de EM. Para ello hemos utilizado un modelo computacional que se ha desarrollado en nuestro grupo en el cual se incluyen las células T_{eff} y T_{reg} y se analiza la pérdida de tolerancia en EM.

Sabiendo que EM se conoce tradicionalmente como una enfermedad mediada, inicialmente, por linfocitos T, hemos querido aplicar un modelo de simulación de linfocitos T_{eff} y T_{reg} a lo largo del tiempo de la enfermedad con la finalidad de poder hacer predicciones de la misma y modificaciones de cara al tratamiento. Ha sido necesario, por tanto, realizar un análisis experimental del modelo, gracias al estudio de la dinámica a lo largo del tiempo de linfocitos T (concretamente, T_{eff} y T_{reg}), su relación con linfocitos B y la aparición de daño del SNC (estudio de la microglía activada). Se ha introducido una perturbación en el sistema con la depleción de la población de linfocitos B, para estudiar profundamente la interacción y el rol de estas poblaciones y sus implicaciones en inmunoterapia.

En esta tesis se ha realizado un estudio experimental de T_{eff} y T_{reg} específicas para MOG gracias a la tecnología de los tetrámeros de clase II y un análisis de la respuesta del sistema a una perturbación como es el tratamiento anti-CD20 que depleciona la población de linfocitos B. Estos datos experimentales se han validado de nuevo en el modelo, para poder llegar a un mejor conocimiento de las variables críticas y a una posible modificación de las mismas.

En conclusión, el curso temporal y la distribución de los eventos inflamatorios y la neurodegeneración nos dan información acerca de la patología de EM, y nos proporciona un nuevo acercamiento para nuevos y diferentes tratamientos[119]. Como EM tiene un curso y una progresión de la incapacidad variable, las recaídas son impredecibles, lo que dificulta un pronóstico ajustado y un diagnóstico personal individual. Nuestro modelo pretende mejorar las herramientas con las que el neurólogo trabaja. Aunque la recaída se mantiene gracias a la existencia de una regulación cruzada de $T_{\text{eff}}/T_{\text{reg}}$, perturbaciones estocásticas aleatorias están presentes; por lo tanto, la predicción se hace más difícil. El bucle $T_{\text{eff}} / T_{\text{reg}}$ patológico

permite la aparición de nuevas células T_{eff} autorreactivas que escapan del control y regulación de T_{reg} . Este fallo en la misión de T_{reg} , finalmente, promueve las recurrencias características de EM. Esto significa que, aunque algún desencadenante debe ser responsable del aspecto aleatorio y la imprevisibilidad e incertidumbre de las recaídas, la agresividad y frecuencia depende de la dinámica intrínseca inmune, lo cual significa que es diferente en cada paciente. Uno de estos detonantes estocásticos puede ser, por ejemplo, alguna infección, lo cual actuaría mediante el proceso de mimetismo molecular. Algunos epítomos del SNC son similares a otros epítomos en varios virus y microorganismos. Se ha demostrado que las infecciones por herpes virus y EBV deben tener algunas implicaciones en la inducción de EM [24]. EBV es un herpes virus humano que está presente en células B en una forma latente con una alta frecuencia en la población sana. Las proteínas de EBV pueden tener una reacción cruzada con antígenos celulares y pueden iniciar una respuesta patogénica a través del proceso de mimetismo molecular que termina en un proceso autoinmune como EM, lupus eritematoso sistémico (LES) o artritis reumatoide (AR). Además, la respuesta inflamatoria permite la aparición de nuevos epítomos que previamente estaban ocultos y su expresión promueve la perpetuación del antígeno y la activación de nuevas poblaciones de linfocitos, por lo que la respuesta inmune podría perpetuarse en algunos individuos vulnerables. Merece la pena tener en cuenta los alelos HLA que confieren esta vulnerabilidad a EM, como HLA-DR15 (haplotipos DRB1*1501 y DRB5*0101) [15]. El hecho de que esta vulnerabilidad a padecer una enfermedad autoinmune resida en el mismo sistema inmune rechaza, en parte, la idea de que una única molécula o evento celular aislado son los responsables de la aparición de autoinmunidad. Hay, sin embargo, un estado patológico que sobrepasa la homeostasis inmunológica. Estos descubrimientos, aunque nos hemos enfocado en concreto, en EM, pueden ser extrapolados a otras enfermedades autoinmunes como LES o AR los cuales también tienen un comportamiento en brotes; pero también hay

otras enfermedades crónicas, las cuales aparentemente no son recurrentes pero que podrían tener también un comportamiento recurrente a nivel molecular o subclínico [192].

Nuestro modelo con la actualización gracias a los datos experimentales, realza algunos aspectos asombrosos de EM; la descripción dinámica de EM, la regulación cruzada de $T_{\text{eff}} / T_{\text{reg}}$ y la ruptura de la misma que produce la disrupción de la tolerancia periférica. La regulación intrínseca patológica de $T_{\text{eff}} / T_{\text{reg}}$, la cual afecta la gravedad de EM y su frecuencia, también nos aporta una explicación sobre su naturaleza cíclica. La aproximación mediante la biología de sistemas abre un nuevo campo de herramientas y tiene unas grandes implicaciones. Lo primero, la autoinmunidad no es sólo un evento aislado de fallo celular, sino una condición compleja que involucra a múltiples y mezclados fallos. Lo segundo, la dinámica inmune adaptativa es patológica y responsable del desarrollo de autoinmunidad, donde la regulación cruzada de $T_{\text{eff}} / T_{\text{reg}}$ está dañada con la presencia de células T_{eff} autorreactivas contra el SNC. Además, todo ello termina en una discapacidad de la tolerancia periférica, producto de esta regulación alterada. Los tratamientos dirigidos y focalizados en restaurar esta dinámica patológica serán un buen acercamiento. En este trabajo se ha utilizado anti-CD20, un anticuerpo monoclonal que elimina la población de linfocitos B mostrándonos que la administración de este tratamiento antes de la inmunización empeora la enfermedad y hablándonos, por tanto, del papel clave de la población de linfocitos B en el desarrollo de EM, ya que su eliminación antes de la inducción de EAE exacerba la enfermedad, probablemente porque B_{regs} controlan el inicio de la misma, mientras que será la población de T_{regs} quien controlará la fase más tardía [51,108]. Se ha dicho que la población de linfocitos B, de hecho, regula las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T, dependientes de anticuerpo, e incluso también mediante mecanismos independientes de anticuerpo [193,194], aunque algunos

estudios han postulado que las células B no eran indispensables a la hora de producir respuestas de linfocitos T antígeno-específicas [195, 196]. Los efectos de la depleción de linfocitos B en autoinmunidad son una disminución de la respuesta CD4⁺ efectora, sobre todo la población de células efectoras autorreactivas, lo cual se correlaciona con nuestros resultados, donde hemos visto que, en bazo, tanto la población de T_{eff} MOG⁺ como la de T_{reg} MOG⁺ disminuyen, aunque la gravedad de la enfermedad es mayor. Este empeoramiento podría deberse a que se elimina a su vez a una población de linfocitos B, B10, que disminuye la capacidad de la célula dendrítica de presentar el antígeno al L-T y, por tanto, modularían su proliferación. Por otra parte, en nuestro estudio, la depleción de LB disminuye la expansión de LT_{eff} MOG⁺ y ésta es más significativa para los LT_{reg} MOG⁺ en el SNC, la cual se corresponde con una posibilidad de daño mayor, correspondiéndose con la activación de la microglía. Sin embargo, esta disminución de células T autorreactivas, en algunos artículos sobre pénfigo, se ha relacionado con una disminución en la presencia de auto-anticuerpos [197]. Probablemente estas diferencias se hayan en el momento en el que se ha administrado el tratamiento; si la depleción de la población de linfocitos B se produce una vez que la inmunización ya ha ocurrido, se observa que hay una mejora en la enfermedad autoinmune. Estos datos y los resultados de nuestro estudio sugieren que las células B contribuyen a la patogenia de la enfermedad autoinmune tanto directamente, mediante la producción de anticuerpos, como indirectamente, mediante la regulación de las células T autorreactivas, aumentando su respuesta, y probablemente, teniendo finalmente un papel clave en la regulación cruzada entre T_{eff} y T_{reg}. Aunque nosotros hemos visto que la depleción de LB ha conllevado a una disminución de la expansión de LT_{reg} MOG⁺ en el SNC, también hay artículos donde se ha visto que la depleción de LB puede conllevar a la mayor producción de T_{reg} mediante una subpoblación de linfocitos B, B10, productora de IL-10 [70]. En este caso, presumiblemente, se trataría de una depleción de LB

autorreactivos, patogénicos, aumentando el repertorio de B_{reg} [198]. La eliminación de células B autorreactivas conllevaría un bloqueo en la producción de linfocitos T antígeno-específicos y, también, disminuiría la producción de células plasmáticas productoras de auto-anticuerpos [198]. Además, la actividad pro-inflamatoria de la CPA en el SNC es controlada, también, por una población de células B, que como hemos dicho anteriormente, también se elimina con anti-CD20; por tanto, éste tratamiento debería avanzar en el sentido de hacerse más dirigido hacia las subpoblaciones de células B patogénicas. Es más, pacientes en los que esté involucrado un nivel bajo de linfocitos B patológicos en el desarrollo de su enfermedad no se beneficiarán de este tratamiento [199-201]. Toda esta información es de gran importancia a la hora de pensar en nuevos tratamientos dirigidos de manera personal e individualizada; con el propósito de resetear el balance patológico de las poblaciones efectoras y reguladoras, restaurar la dinámica patológica y la relación alterada entre T_{eff}/T_{reg} y B_{eff}/B_{reg} , mediante, por ejemplo, la eliminación de la población de linfocitos B en el tiempo y momento de la enfermedad más óptimo y ajustado a cada caso individual [202,203].

Los modelos computacionales nos aportan un mejor conocimiento sobre la fisiopatología, permiten un diagnóstico más preciso, un pronóstico más ajustado y la posibilidad de encontrar puntos diana con el propósito de tratar y cambiar el proceso patológico. En resumen, nos aportan la posibilidad de desarrollar terapias más eficientes y seguras, haciendo posible una medicina más personalizada y estratificada en subgrupos de pacientes.

9. Algunas limitaciones en el análisis experimental

a. Ventajas y desventajas del uso de tetrámeros de clase II

Ventajas en el uso de tetrámero-MHC clase II

- Marcaje de linfocitos antígeno específicos y diferenciación de poblaciones celulares en una única muestra.
- Gracias al uso de tetrámeros MHC- MOG₃₅₋₅₅, se podrán conocer las diferencias en el reconocimiento de lo propio /no propio, y también los diferentes pasos en el desarrollo de autoinmunidad.
- Para que surja la enfermedad autoinmune, además de necesitar linfocitos autorreactivos, deberán fallar los mecanismos de control como los linfocitos T reguladores (T_{reg}). Los tetrámeros MHC- MOG₃₅₋₅₅ permiten que se estudie si esta población tiene una alteración cuantitativa en el tiempo y su relación con la población autorreactiva (T_{eff}), es decir, el estudio de su dinámica y la aplicación de este conocimiento dentro del marco de la biología de sistemas y modelos dinámicos.
- Los linfocitos antígeno específicos CD4⁺ se acumularán en los ganglios linfáticos del sitio de inmunización (similar a la respuesta inmune primaria estándar), después entrarán en el SNC, con marcadores de activación propios que permitirían que se pueda distinguir esta población de la que reside en la periferia.
- Con los complejos MHC- MOG₃₅₋₅₅ se podrá inducir una expansión de T_{reg} para que funcionen de manera antígeno-específica como inmunoterapia celular.

Desventajas del uso de tetrámeros MHC clase II

- Baja afinidad por el TCR. La frecuencia de linfocitos que se unen al tetrámero MHC-MOG₃₅₋₅₅ y la avidéz de la unión del TCR con el tetrámero MHC-MOG₃₅₋₅₅ es más baja cuando se trata del reconocimiento de lo propio.
- Análisis de una población porcentualmente muy pequeña.
- Falsos positivos debido a uniones inespecíficas.
- Problemas con el marcaje citoplasmático para citometría (ejemplo: Foxp3).
- Problemas para fijar las células antes de adquirirlas para su análisis por citometría de flujo.

Mejoras en el marcaje y uso de los tetrámeros MHC clase II

- Incubación a 37° y oscuridad 3 horas tras la tinción con el tetrámero.
- Uso de clon de linfocitos T específicos para el péptido de interés que reconozcan el MHC-II (IA^b) como control positivo.
- Uso de un marcador de viabilidad por la alta probabilidad de que el tetrámero se adhiera a las células muertas.

Aunque, se puede obtener información muy valiosa sobre la dinámica de estas poblaciones durante la enfermedad autoinmune, se debe tener en cuenta al valorar esta información que el reconocimiento temporal y espacial no es completo.

b. Ventajas y desventajas del modelo EAE en ratones C57BL/6 (IA^b)

Ventajas del uso de este modelo animal

Requisitos para el estudio de la enfermedad autoinmune utilizando tetrámeros:

- Inmunización y obtención de las muestras de linfocitos para el análisis accesible.
- Viabilidad de la puesta a punto del proyecto de cuantificación.
- Conocimiento del MHC relevante.
- Conocimiento del epítipo dominante causante de la enfermedad (MOG₃₅₋₅₅).
- Económicamente viable.

Desventajas del uso de este modelo animal

EAE difiere en varios aspectos de la EM

- Una gran diferencia es que en la EM se desconoce el antígeno causante a diferencia de la EAE (MOG₃₅₋₅₅).
- En la EM probablemente ocurre el proceso de expansión del epítipo como también se ha descrito en otras enfermedades autoinmunes cuando en la EAE en ratones C57BL/6(IA^b) siempre se trata del mismo epítipo.
- La EM frecuentemente debuta con la forma remitente recurrente (en un 80% de los casos) mientras que la EAE en ratones C57BL/6(IA^b) es una forma crónica progresiva.



8-Aspectos éticos

EAE crónica en ratón C57BL/6 (I-A^b) como modelo animal de EM

- Procedimientos de anestesia mediante Isoflurano o Ketamina + Xilacina.
- Inmunización de los animales mediante inyección subcutánea de MOG + CFA + *Mycobacterium tuberculosis* en uno de los flancos.
- Inyección intraperitoneal de toxina pertussis.
- Sacrificio, tras anestesia
- Extracción de bazo, sangre periférica, ganglios linfáticos y SNC

Los ratones C57BL/6(I-A^b) (n=90) fueron anestesiados e inmunizados de forma subcutánea con una emulsión que contiene: 300µg de glicoproteína de la mielina del oligodendrocito MOG₃₅₋₅₅ (Espiken) y 500 µg de extracto de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco) en adyuvante completo de Freund (CFA). Los ratones recibieron 0.2 ml de la emulsión en en uno de los flancos del animal. Además, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de toxina *B. Pertussis* (500ng en 200 µl de PBS) en los días 0 y 2. Siguiendo el mismo procedimiento se repitió el experimento en animales que recibieron anti-CD20 previa a la inmunización. Los animales fueron pesados e inspeccionados de forma diaria desde el día de la inmunización (día 0) hasta el día en el que fueron sacrificados. La gravedad de los signos clínicos se evaluó con la siguiente escala: 0, animal normal; 0.5, parálisis parcial de la cola; 1, cola inmóvil; 2, leve parálisis de las extremidades traseras, modo de andar vacilante; 3, parálisis moderada con movimientos voluntarios todavía posibles; 4, tetraparesia pero sin paresia vesical (parálisis muscular vesical); 5, tetraplejia; 6, animal moribundo. Si cualquiera de los animales hubiera llegado a puntuación 5, se hubiera procedido a su sacrificio de forma inmediata.



9-Resumen y Conclusiones

Beneficios de la Investigación

1. Resumen

La EM se ha considerado clásicamente una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T. Los linfocitos T autoinmunes median la aparición de nuevas lesiones en las etapas precoces de la enfermedad y, probablemente, se dirigen contra auto-antígenos del Sistema Nervioso Central (SNC). Las teorías que intentan explicar la patogenia de las enfermedades autoinmunes asumen que el balance entre las células pro-inflamatorias, linfocitos T_{eff} y los mecanismos de células reguladoras, linfocitos T_{reg} están alterados. La susceptibilidad a padecer enfermedades autoinmunes debe estar relacionada con este control defectuoso, ya que los mecanismos reguladores están alterados cuantitativamente o cualitativamente en dichas enfermedades. Durante las recaídas que se observan en estos pacientes el balance entre ambas poblaciones debe estar trastornado con una ruptura de la tolerancia periférica. Se ha postulado que debe depender de la dinámica de las poblaciones de linfocitos T con unos circuitos de retroalimentación negativos alterados. Esto significa que la pauta remitente-recurrente se perpetúa y se convierte en una dinámica oscilatoria estable.

La EAE es un modelo animal de EM ampliamente utilizado que se caracteriza por un ataque inflamatorio frente a componentes de la mielina en el SNC. La EAE está mediada en un primer momento por linfocitos T $CD4+$ que se dirigen contra epítomos propios de la mielina del SNC. El hecho de que los $CD4+$ juegan un papel clave en la EAE ha sido demostrado por su capacidad de transferir la enfermedad al ser inyectados en sujetos deficientes. El propósito de este estudio es la caracterización de las células antígeno específicas (MOG-específicas) en el bazo y el SNC durante la progresión de la EAE ya que el conocimiento de la evolución y la dinámica de los linfocitos T en la historia natural de las enfermedades

autoinmunes no es del todo completo. Gracias a ello se obtendría una mejor comprensión de la enfermedad autoinmune, el papel de cada una de las poblaciones de linfocitos T, la predicción de nuevos brotes aunque no hubiera manifestaciones clínicas. A largo plazo, ayudará a la aparición de una terapia personalizada, prediciendo la respuesta al tratamiento en cuanto a dosis, aparición de efectos secundarios, el momento ideal o fase de la enfermedad en la cual es mejor aplicar el tratamiento o futuros tratamientos dirigidos exclusivamente a una población en concreto [204-206].

2. Conclusiones

- Los datos experimentales de las dinámicas de las poblaciones reguladoras y efectoras en el modelo de EAE en el ratón coinciden con las características principales del modelo teórico de la activación de LT. En este sentido, el efecto de la interacción (regulación cruzada) entre las células reguladoras y efectoras MOG+ se muestra en los experimentos.
- La terapia de depleción de LB provoca una disminución de la actividad dinámica de la respuesta de los LT en el modelo y los experimentos.
- El estudio pone en valor la **regulación cruzada de las poblaciones linfocitarias ($T_{\text{eff}}-T_{\text{reg}}$)** y su contribución al resultado de la respuesta inmune.
- La terapia anti-CD20 no cambia la respuesta patogénica a las enfermedades autoinmunes, sino que las mantiene en un estado dinámico que es menos nocivo **según el momento en el cual la terapia comienza.**
- El estudio muestra la importancia del **papel principal de los LT reguladores** en las dinámicas de la respuesta inmune.

3. Implicaciones para la inmunoterapia

- La terapia ideal a este nivel debería implicar un ajuste preciso de las dinámicas de la población de LT antígeno-específicos a largo plazo para mantenerlas en el nivel más cercano posible al estado de salud.
- El desarrollo de la enfermedad dependerá de las dinámicas de todas las poblaciones implicadas y del momento en el cual la terapia comience.
- **Objetivo terapéutico:** Los LT reguladores son el objetivo ideal para la inmunoterapia incluso en un sentido indirecto como por ejemplo con una terapia con anti-CD20.
- Posible predicción de nuevas recaídas y pronóstico.

4. Conclusiones del estudio y la aproximación dentro del campo de la Biología de Sistemas

- Los conocimientos actuales y, gracias a la fisiología, la biología molecular, la inmunología, la neurobiología y la biología de sistemas nos permiten obtener nuevas perspectivas sobre la patogénesis de la EM.
- Como beneficios se encuentra el desarrollo de terapias más eficaces y seguras, permitiendo una medicina personalizada y estratificada (basándonos en la subdivisión en grupos dentro de la propia enfermedad).
- Pero como limitaciones se encuentran la falta de datos cuantitativos, y la comprensión de la organización de células eucariotas y el SNC, la comprensión de las nuevas herramientas y teoría (análisis de redes dinámicas, análisis topológico a una meso-escala, protocolos de ingeniería reversa, etc..).

a. Planteamiento futuro

Gracias al uso de modelos computacionales obtendremos:

- Mejor conocimiento de la fisiopatología
- Mejoras en el diagnóstico
- Mejorías en tratamientos y terapias más dirigidas como deplecionar poblaciones de manera dirigida o administrar terapia celular en momentos puntuales de la enfermedad



10-Bibliografía

1. Amend, B., et al., Induction of autoimmunity by expansion of autoreactive CD4⁺ T cells in vivo. *The journal of immunology*, 2006. **177**(7): p. 4384.
2. Polman, C.H., et al., Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of Neurology*, 2005. **58**(6): p. 840-846.
3. Polman, C.H., et al., Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*. **69**(2): p. 292-302.
4. Miller, D.H., D.T. Chard, and O. Ciccarelli, Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology*. **11**(2): p. 157-169.
5. Noseworthy, J.H., et al., Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 2000. **343**(13): p. 938-952.
6. Compston, A. and A. Coles, Multiple sclerosis. *The Lancet*, 2002. **359**(9313): p. 1221-1231.
7. McDonald, W.I., et al., Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 2001. **50**(1): p. 121-127.
8. Hauser, S.L. and J.R. Oksenberg, The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron*, 2006. **52**(1): p. 61-76.
9. Salemi, G., et al., The relapse rate of multiple sclerosis changes during pregnancy: a cohort study. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2004. **110**(1): p. 23-26.
10. Alcina, A., et al., Multiple Sclerosis Risk Variant *HLA-DRB1*1501* Associates with High Expression of *DRB1* Gene in Different Human Populations. *PLoS ONE*. **7**(1): p. e29819.
11. Benoist, C. and D. Mathis, Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 797-801.
12. Firsov, D. and O. Bonny, Circadian regulation of renal function. *Kidney Int*. **78**(7): p. 640-645.
13. McElroy, J.P. and J.R. Oksenberg, Multiple Sclerosis Genetics 2010. *Neurologic clinics*. **29**(2): p. 219-231.

14. Sospedra, M. and R. Martin, IMMUNOLOGY OF MULTIPLE SCLEROSIS*. Annual review of immunology, 2005. **23**(1): p. 683-747.
15. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(9): p. 851-862.
16. Oksenberg, J.R. and S.E. Baranzini, Multiple sclerosis genetics[mdash]is the glass half full, or half empty? Nat Rev Neurol. **6**(8): p. 429-437.
17. Oksenberg, J.R., et al., The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. Nat Rev Genet, 2008. **9**(7): p. 516-526.
18. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature. **476**(7359): p. 214-219.
19. Patsopoulos, N.A., et al., Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. Annals of Neurology. **70**(6): p. 897-912.
20. Sergio E, B., Revealing the genetic basis of multiple sclerosis: are we there yet? Current Opinion in Genetics & Development. **21**(3): p. 317-324.
21. Zamvil, S., et al., T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. Nature, 1985. **317**(6035): p. 355-358.
22. Bettelli, E., et al., Myelin Oligodendrocyte Glycoproteinâ€specific T Cell Receptor Transgenic Mice Develop Spontaneous Autoimmune Optic Neuritis. The Journal of experimental medicine, 2003. **197**(9): p. 1073-1081.
23. Steinman, L., et al., Multiple sclerosis: Deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. Annual Review of Neuroscience, 2002. **25**: p. 491-505.
24. Farrell, R.A., et al., Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. Neurology, 2009. **73**(1): p. 32-38.
25. Levin, L.I., et al., Temporal Relationship Between Elevation of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2005. **293**(20): p. 2496-2500.
26. Engelhardt, B., Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. Journal of Neural Transmission, 2006. **113**(4): p. 477-485.

27. Piccio, L., et al., Efficient Recruitment of Lymphocytes in Inflamed Brain Venules Requires Expression of Cutaneous Lymphocyte Antigen and Fucosyltransferase-VII. *The journal of immunology*, 2005. **174**(9): p. 5805-5813.
28. Piccio, L., et al., Molecular Mechanisms Involved in Lymphocyte Recruitment in Inflamed Brain Microvessels: Critical Roles for P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 and Heterotrimeric Gi-Linked Receptors. *The journal of immunology*, 2002. **168**(4): p. 1940-1949.
29. McFarland, H.F. and R. Martin, Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 913-919.
30. Elyaman, W., et al., Distinct functions of autoreactive memory and effector CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology*, 2008. **173**(2): p. 411.
31. Bischof, F., et al., Analysis of autoreactive CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis after primary and secondary challenge using MHC class II tetramers. *The journal of immunology*, 2004. **172**(5): p. 2878.
32. Awasthi, A., G. Murugaiyan, and V.K. Kuchroo, Interplay between effector Th17 and regulatory T cells. *Journal of clinical immunology*, 2008. **28**(6): p. 660.
33. Bettelli, E., M. Oukka, and V.K. Kuchroo, T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature immunology*, 2007. **8**(4): p. 345.
34. Bettini, M., K. Rosenthal, and B.D. Evavold, Pathogenic MOG-reactive CD8+ T cells require MOG-reactive CD4+ T cells for sustained CNS inflammation during chronic EAE. *Journal of neuroimmunology*, 2009. **213**(1-2): p. 60-68.
35. Monteleone, G., F. Pallone, and T.T. MacDonald, Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends in immunology*, 2008. **29**(6): p. 290.
36. Korn, T., et al., Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine*, 2007. **13**(4): p. 423.
37. Krishnamoorthy, G., et al., Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 2009. **15**(6): p. 626-632.

38. Ben-Nun, A., et al., Anatomy of T cell autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): Prime role of MOG44F in selection and control of MOG-reactive T cells in H-2b mice. *European journal of immunology*, 2006. **36**(2): p. 478-493.
39. Bettelli, E., et al., Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *The journal of clinical investigation*, 2006. **116**(9): p. 2393-2402.
40. von Boehmer, H. and F. Melchers, Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nat Immunol.* **11**(1): p. 14-20.
41. Kumar, M., et al., CD4⁺ regulatory T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 2006. **180**(1-2): p. 178.
42. McGeachy, M.J., L.A. Stephens, and S.M. Anderton, Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4⁺ regulatory cells within the central nervous system. *The journal of immunology*, 2005. **175**(5): p. 3025.
43. Martinez-Forero, I., et al., IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *European journal of immunology*, 2008. **38**(2): p. 576.
44. Viglietta, V., et al., Loss of functional suppression by CD4⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*, 2004. **199**(7): p. 971.
45. Bynoe, M.S., P. Bonorino, and C. Viret, Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4 suppressor T cells: peripheral versus in situ immunoregulation. *Journal of neuroimmunology*, 2007. **191**(1-2): p. 61.
46. Haas, J.r., et al., Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *The journal of immunology*, 2007. **179**(2): p. 1322.
47. Fitzgerald, D.C., et al., Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1372-1379.

48. Zozulya, A.L. and H. Wiendl, The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nature clinical practice neurology*, 2008. **4**(7): p. 384.
49. Haribhai, D., et al., Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *The journal of immunology*, 2007. **178**(5): p. 2961.
50. Korn, T., et al., The dynamics of effector T cells and Foxp3+ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*, 2007. **191**(1-2): p. 51-60.
51. Matsushita, T., et al., Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The journal of clinical investigation*, 2008. **118**(10): p. 3420-3430.
52. Yanaba, K., et al., B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunological reviews*, 2008. **223**(1): p. 284-299.
53. Yanaba, K., et al., The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *The journal of immunology*, 2009. **182**(12): p. 7459-7472.
54. Bar-Or, A., et al., Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Annals of Neurology*. **67**(4): p. 452-461.
55. B-cell-derived interleukin-10 in autoimmune disease: regulating the regulators. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(6): p. 486-487.
56. Fillatreau, S., D. Gray, and S.M. Anderton, Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(5): p. 391-397.
57. Owens, T., H. Wekerle, and J. Antel, Genetic models for CNS inflammation. *Nat Med*, 2001. **7**(2): p. 161-166.
58. Guo, B., E.Y. Chang, and G. Cheng, The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *The journal of clinical investigation*, 2008. **118**(5): p. 1680.
59. Korn, et al., IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*, 2009.
60. Korn, T., et al., IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 484.
61. Korn, T., et al., IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3 regulatory T cells.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(47): p. 18460.
62. O'Garra, A., B. Stockinger, and M. Veldhoen, Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta! *Nature immunology*, 2008. **9**(6): p. 588.
 63. Stockinger, B., Good for Goose, but not for Gander: IL-2 interferes with Th17 differentiation. *Immunity*, 2007. **26**(3): p. 278.
 64. Kohm, A.P., et al., Cutting edge: CD4⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *The journal of immunology*, 2002. **169**(9): p. 4712.
 65. Brusko, T.M., et al., Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4⁺ CD25⁺ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*, 2005. **54**(5): p. 1407.
 66. Bettelli, E., et al., Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*, 2008. **453**(7198): p. 1051.
 67. Anderson, A.C., et al., IL-10 plays an important role in the homeostatic regulation of the autoreactive repertoire in naive mice. *The journal of immunology*, 2004. **173**(2): p. 828.
 68. Roncarolo, M.G., et al., Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews*, 2006. **212**: p. 28.
 69. Zhang, X., et al., IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺ regulatory T cells. *International immunology*, 2004. **16**(2): p. 249.
 70. Fillatreau, S., et al., B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*, 2002. **3**(10): p. 944-950.
 71. Zou, W., Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.*, 2006. **6**(4): p. 295-307.
 72. Battaglia, M., et al., Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin.Immunol.*, 2006. **18**(2): p. 120-127.
 73. Meiffren, G., et al., Cutting edge: abortive proliferation of CD46-induced Tr1-like cells due to a defective Akt/Survivin signaling pathway. *J Immunol*, 2006. **177**(8): p. 4957-61.

74. Wildbaum, G., N. Netzer, and N. Karin, Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. *J Clin Invest*, 2002. **110**(5): p. 701-10.
75. Gianfrani, C., et al., Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*, 2006. **177**(6): p. 4178-86.
76. Antel, J.P., et al., Lymphocyte function and the role of regulator cells in multiple sclerosis. *Neurology*, 1978. **28**(9 Pt 2): p. 106-110.
77. Viglietta, V., et al., Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.*, 2004. **199**(7): p. 971-979.
78. Comi, G., et al., Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 2009. **374**(9700): p. 1503-1511.
79. Boggild, M., et al., Multiple sclerosis risk sharing scheme: two year results of clinical cohort study with historical comparator. *BMJ*, 2009. **339**.
80. Conway, D. and J.A. Cohen, Combination therapy in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. **9**(3): p. 299-308.
81. Doggrell, S.A., *Is fingolimod an advancement in the treatment of multiple sclerosis?* Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2007. **8**(3): p. 383-386.
82. Wolinsky, J.S., et al., *Magnetic resonance imaging outcomes from a phase III trial of teriflunomide*. Multiple Sclerosis Journal.
83. Jones, J.L., et al., *Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity*. *Brain*. **133**(8): p. 2232-2247.
84. Giovannoni, G., et al., Sustained disease-activity-free status in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with cladribine tablets in the CLARITY study: a post-hoc and subgroup analysis. *The Lancet Neurology*. **10**(4): p. 329-337.
85. Barun, B. and A. Bar-Or, Treatment of multiple sclerosis with Anti-CD20 antibodies. *Clinical Immunology*. In Press, Corrected Proof.

86. Krieger, S., Multiple Sclerosis Therapeutic Pipeline: Opportunities and Challenges. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*. **78**(2): p. 192-206.
87. Martin, R., et al., Multiple Sclerosis Therapies: Molecular Mechanisms and Future, in *Molecular Basis of Multiple Sclerosis*, Springer Berlin / Heidelberg. p. 259-285.
88. Gawronski, K.M., et al., Treatment Options for Multiple Sclerosis: Current and Emerging Therapies. *Pharmacotherapy*. **30**(9): p. 916-927.
89. Vermersch, P., et al., Clinical outcomes of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. **76**(20): p. 1697-1704.
90. O'Connor, P.W., et al., Disease activity return during natalizumab treatment interruption in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. **76**(22): p. 1858-1865.
91. Fernández-Fernández, O., et al., Revisión de las novedades presentadas en el XXVI Congreso del Comité Europeo para el Tratamiento e Investigación en Esclerosis Múltiple (ECTRIMS) (II). *RevNeurol*. **52**(05): p. 0289-299.
92. Steinman, L., et al., MULTIPLE SCLEROSIS: Deeper Understanding of Its Pathogenesis Reveals New Targets for Therapy*. *Annual Review of Neuroscience*, 2002. **25**(1): p. 491-505.
93. Bluestone, J., Q. Tang, and C. Sedwick, T Regulatory Cells in Autoimmune Diabetes: Past Challenges, Future Prospects. *Journal of clinical immunology*, 2008. **28**(6): p. 677-684.
94. Croxford, A.L., F.C. Kurschus, and A. Waisman, Mouse models for multiple sclerosis: Historical facts and future implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1812**(2): p. 177-183.
95. Kuchroo, V.K., et al., T CELL RESPONSE IN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS (EAE): Role of Self and Cross-Reactive Antigens in Shaping, Tuning, and Regulating the Autopathogenic T Cell Repertoire. *Annual review of immunology*, 2002. **20**(1): p. 101-123.
96. Å-ling, V., et al., A low antigen dose selectively promotes expansion of high-avidity autoreactive T cells with distinct phenotypic characteristics: A study of human autoreactive CD4+T cells specific for GAD65. *Autoimmunity*. **43**(8): p. 573-582.

97. Bonvalet, M., et al., Comparison between major histocompatibility complex class II tetramer staining and surface expression of activation markers for the detection of allergen-specific CD4+ T cells. *Clinical & Experimental Allergy*. **41**(6): p. 821-829.
98. Ge, X., et al., Differences in self-peptide binding between T1D-related susceptible and protective DR4 subtypes. *Journal of autoimmunity*. **36**(2): p. 155-160.
99. Öling, V., et al., GAD65- and proinsulin-specific CD4+ T-cells detected by MHC class II tetramers in peripheral blood of type 1 diabetes patients and at-risk subjects. *Journal of autoimmunity*, 2005. **25**(3): p. 235-243.
100. Sabatino, J.J., et al., High prevalence of low affinity peptide-MHC II tetramer-negative effectors during polyclonal CD4+ T cell responses. *The Journal of experimental medicine*. **208**(1): p. 81-90.
101. Milton, J. and D. Black, Dynamic diseases in neurology and psychiatry. *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*, 1995. **5**(1): p. 8-13.
102. Germain, R.N., Maintaining system homeostasis: the third law of Newtonian immunology. *Nat Immunol*. **13**(10): p. 902-906
103. Shoval, O. and U. Alon, SnapShot: Network Motifs. *Cell*. **143**(2): p. 326-326.e1.
104. Frankenstein, Z., U. Alon, and I. Cohen, The immune-body cytokine network defines a social architecture of cell interactions. *Biology Direct*, 2006. **1**(1): p. 32.
105. Oved, K., et al., Predicting and controlling the reactivity of immune cell populations against cancer. *Mol Syst Biol*, 2009. **5**.
106. Villoslada, P., L. Steinman, and S.E. Baranzini, Systems biology and its application to the understanding of neurological diseases. *Annals of Neurology*, 2009. **65**(2): p. 124-139.
107. Trudeau, J., et al., Prospective prediction of spontaneous but not recurrent autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*, 2007. **50**(5): p. 1015-1023.
108. Weber, M.S., et al., B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Annals of Neurology*. **68**(3): p. 369-383.

109. Lipsky, P.E., Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 764-766.
110. Smith, M.R., Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*. **22**(47): p. 7359-7368.
111. Hamaguchi, Y., et al., The Peritoneal Cavity Provides a Protective Niche for B1 and Conventional B Lymphocytes during Anti-CD20 Immunotherapy in Mice. *The journal of immunology*, 2005. **174**(7): p. 4389-4399.
112. Hauser, S.L., et al., B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 2008. **358**(7): p. 676-688.
113. Monson, N.L., et al., Rituximab Therapy Reduces Organ-Specific T Cell Responses and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS ONE*. **6**(2): p. e17103.
114. Ray, A., et al., A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. **230**(1-2): p. 1-9.
115. Stence, N., M. Waite, and M.E. Dailey, Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 2001. **33**(3): p. 256-266.
116. Santambrogio, L., et al., Developmental plasticity of CNS microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(11): p. 6295-6300.
117. Murphy, Á.C., et al., Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, Behavior, and Immunity*. **24**(4): p. 641-651.
118. Almolda, B., B. González, and B. Castellano, Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. *Journal of neuroimmunology*. **223**(1-2): p. 39-54.
119. Brown, D.A. and P.E. Sawchenko, Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Comparative Neurology*, 2007. **502**(2): p. 236-260.

120. Raivich, G. and R. Banati, Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease. *Brain Research Reviews*, 2004. **46**(3): p. 261-281.
121. Becher, B. and J.P. Antel, Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia*, 1996. **18**(1): p. 1-10.
122. Deng, X. and S. Sriram, Role of microglia in multiple sclerosis. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2005. **5**(3): p. 239-244.
123. Kreutzberg, G.W., Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 1996. **19**(8): p. 312-318.
124. Dalmau, I., et al., Dynamics of microglia in the developing rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 2003. **458**(2): p. 144-157.
125. Lawson, L.J., V.H. Perry, and S. Gordon, Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 1992. **48**(2): p. 405-415.
126. Garden, G. and T. Möller, Microglia Biology in Health and Disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2006. **1**(2): p. 127-137.
127. Ponomarev, E.D., et al., Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *Journal of neuroscience research*, 2005. **81**(3): p. 374-389.
128. Rasmussen, S., et al., Persistent activation of microglia is associated with neuronal dysfunction of callosal projecting pathways and multiple sclerosis-like lesions in relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 2007. **130**(11): p. 2816-2829.
129. Floris, S., et al., Blood–brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis. *Brain*, 2004. **127**(3): p. 616-627.
130. Hugh Perry, V., A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation. *Journal of neuroimmunology*, 1998. **90**(2): p. 113-121.
131. Trudeau, J.D., et al., Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood. *The journal of clinical investigation*, 2003. **111**(2): p. 217-223.

132. Velez de Mendizabal, N., et al., Modeling the effector - regulatory T cell cross-regulation reveals the intrinsic character of relapses in Multiple Sclerosis. *BMC Systems Biology*. **5**(1): p. 114.
133. Moreno, B., et al., Methylthioadenosine reverses brain autoimmune disease. *Annals of Neurology*, 2006. **60**(3): p. 323-334.
134. Irani, D.N. and D.E. Griffin, Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. *The journal of immunology*, 1996. **156**(10): p. 3850-3857.
135. Gimenez, M.A.T., J.E. Sim, and J.H. Russell, TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *Journal of neuroimmunology*, 2004. **151**(1): p. 116-125.
136. Krishnamoorthy, G., et al., Spontaneous optico-spinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *The journal of clinical investigation*, 2006. **116**(9): p. 2385-2392.
137. Mack, C.L., et al., Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 2003. **144**(1): p. 68-79.
138. Almolda, B., et al., Increase in Th17 and T-reg Lymphocytes and Decrease of IL22 Correlate with the Recovery Phase of Acute EAE IN Rat. *PLoS ONE*. **6**(11): p. e27473.
139. Brabb, T., et al., In Situ Tolerance within the Central Nervous System as a Mechanism for Preventing Autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 2000. **192**(6): p. 871-880.
140. Reddy, J., et al., Detection of autoreactive myelin proteolipid protein 139-151-specific T cells by using MHC II (IAs) tetramers. *The journal of immunology*, 2003. **170**(2): p. 870.
141. O'Connor, K.C., et al., Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. *Nature medicine*, 2007. **13**(2): p. 211.
142. Castellanos, M.C., et al., Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. *The journal of immunology*, 1997. **159**(11): p. 5463-5473.

143. Sancho, D., et al., CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor- β production in collagen-induced arthritis. *The journal of clinical investigation*, 2003. **112**(6): p. 872-882.
144. Santis, A.G., et al., Expression of the early lymphocyte activation antigen CD69, a C-type lectin, is regulated by mRNA degradation associated with AU-rich sequence motifs. *European journal of immunology*, 1995. **25**(8): p. 2142-2146.
145. Li, O., et al., CD62L is Required for the Priming of Encephalitogenic T Cells but does not Play a Major Role in the Effector Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2006. **64**(2): p. 117-124.
146. Sulik, A., et al., Increase in Adhesion Molecules in Cerebrospinal Fluid of Children with Mumps and Mumps Meningitis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2006. **64**(4): p. 420-424.
147. Ifergan, I., et al., Central nervous system recruitment of effector memory CD8⁺ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on α 4 integrin. *Brain*. **134**(12): p. 3560-3577.
148. Malipiero, U., et al., TGF β 2 receptor II gene deletion in leucocytes prevents cerebral vasculitis in bacterial meningitis. *Brain*, 2006. **129**(9): p. 2404-2415.
149. Grewal, I.S., et al., CD62L Is Required on Effector Cells for Local Interactions in the CNS to Cause Myelin Damage in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Immunity*, 2001. **14**(3): p. 291-302.
150. Szulc, L., et al., Antigen presenting and effector cell cluster formation in BALB/c mice during mousepox: model studies*. *Journal of Applied Microbiology*. **109**(5): p. 1817-1828.
151. Yang, S., et al., The Shedding of CD62L (L-Selectin) Regulates the Acquisition of Lytic Activity in Human Tumor Reactive T Lymphocytes. *PLoS ONE*. **6**(7): p. e22560.
152. Cottrez, F.o. and H. Groux, Specialization in tolerance: innate CD (4) CD(25) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation*, 2004. **77**(1 Suppl): p. S12.
153. Lindley, S., et al., Defective suppressor function in CD4⁺ CD25⁻ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 2005. **54**(1): p. 92.

154. Akbar, A.N., et al., The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4 T cells in the periphery. *Nature reviews. Immunology*, 2007. **7**(3): p. 231.
155. Vukmanovic-Stejic, M., et al., Human CD4 CD25hi Foxp3 regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *The journal of clinical investigation*, 2006. **116**(9): p. 2423.
156. Yanaba, K., et al., B Cell Depletion Delays Collagen-Induced Arthritis in Mice: Arthritis Induction Requires Synergy between Humoral and Cell-Mediated Immunity. *The journal of immunology*, 2007. **179**(2): p. 1369-1380.
157. Rock, R.B., et al., Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004. **17**(4): p. 942-964.
158. Ford, A.L., et al., Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein- reactive CD4+ T cells compared. *The journal of immunology*, 1995. **154**(9): p. 4309-4321.
159. Sedgwick, J.D., et al., Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991. **88**(16): p. 7438-7442.
160. Kutzelnigg, A., et al., Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 2005. **128**(11): p. 2705-2712.
161. RuÅ©, P. and J. Garcia-Ojalvo, Gene circuit designs for noisy excitable dynamics. *Mathematical Biosciences*. **231**(1): p. 90-97.
162. Neymotin, S.A., et al., Emergence of physiological oscillation frequencies in a computer model of neocortex. *Frontiers in Computational Neuroscience*. **5**.
163. Forger, D.B., Signal processing in cellular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**(11): p. 4281-4285.
164. Postnikov, E.B., et al., Self-sustained biochemical oscillations and waves with a feedback determined only by boundary conditions. *Physical Review E*. **81**(5): p. 052901.

165. LeÅ³n, K., et al., Three-Cell Interactions in T Cell-Mediated Suppression? A Mathematical Analysis of Its Quantitative Implications. *The journal of immunology*, 2001. **166**(9): p. 5356-5365.
166. Carneiro, J., et al., When three is not a crowd: a Crossregulation Model of the dynamics and repertoire selection of regulatory CD4+ T cells. *Immunological reviews*, 2007. **216**(1): p. 48-68.
167. Almeida, A.R.M., B. Zaragoza, and A.A. Freitas, Competition controls the rate of transition between the peripheral pools of CD4+CD25^{hi} and CD4+CD25^{lo} T cells. *International immunology*, 2006. **18**(11): p. 1607-1613.
168. Almeida, A.R.M., B. Zaragoza, and A.A. Freitas, Indexation as a Novel Mechanism of Lymphocyte Homeostasis: The Number of CD4+CD25^{hi} Regulatory T Cells Is Indexed to the Number of IL-2-Producing Cells. *The journal of immunology*, 2006. **177**(1): p. 192-200.
169. Sakaguchi, S., et al., FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. **10**(7): p. 490-500.
170. Long, S.A. and J.H. Buckner, CD4+FOXP3⁺ T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game. *The journal of immunology*. **187**(5): p. 2061-2066.
171. Liu, X., et al., The T Cell Response to IL-10 Alters Cellular Dynamics and Paradoxically Promotes Central Nervous System Autoimmunity. *The journal of immunology*. **189**(2): p. 669-678.
172. Sakaguchi, S., K. Wing, and T. Yamaguchi, Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *European journal of immunology*, 2009. **39**(9): p. 2331-2336.
173. Ransohoff, R.M., P. Kivisakk, and G. Kidd, Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(7): p. 569-581.
174. John, G.R., S.C. Lee, and C.F. Brosnan, Cytokines: Powerful Regulators of Glial Cell Activation. *The Neuroscientist*, 2003. **9**(1): p. 10-22.
175. Gloor, S.M., et al., Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier. *Brain Research Reviews*, 2001. **36**(2-3): p. 258-264.
176. Becher, B., I. Bechmann, and M. Greter, Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *Journal of Molecular Medicine*, 2006. **84**(7): p. 532-543.

177. Voskuhl, R.R., et al., Epitope spreading occurs in active but not passive EAE induced by myelin basic protein. *Journal of neuroimmunology*, 1996. **70**(2): p. 103-111.
178. Martin, R., H.F. McFarland, and J.M. Boggs, Immunological Aspects of Experimental Allergic Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1995. **32**(2): p. 121-182.
179. Takeshita, Y. and R.M. Ransohoff, Inflammatory cell trafficking across the blood–brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunological reviews*. **248**(1): p. 228-239.
180. Varvel, N.H., et al., Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109**(44): p. 18150-18155.
181. Ransohoff, R.M. and M.A. Brown, Innate immunity in the central nervous system. *The journal of clinical investigation*. **122**(4): p. 1164-1171.
182. Sallusto, F., et al., T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunological reviews*. **248**(1): p. 216-227.
183. Mann, M.K., et al., Pathogenic and regulatory roles for B cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmunity*. **45**(5): p. 388-399.
184. Ray, A., et al., A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. **230**(1“2): p. 1-9.
185. Iglesias, A., et al., T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia*, 2001. **36**(2): p. 220-234.
186. Linington, C., et al., T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *European journal of immunology*, 1993. **23**(6): p. 1364-1372.
187. Genain, C.P., et al., Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *The journal of clinical investigation*, 1995. **96**(6): p. 2966-2974.

188. Lampropoulou, V., et al., Suppressive functions of activated B cells in autoimmune diseases reveal the dual roles of Toll-like receptors in immunity. *Immunological reviews*. **233**(1): p. 146-161.
189. Anderton, S.M. and S. Fillatreau, Activated B cells in autoimmune diseases: the case for a regulatory role. *Nat Clin Pract Rheum*, 2008. **4**(12): p. 657-666.
190. Hoehlig, K., et al., Chapter 1 Immune Regulation by B Cells and Antibodies: A View Towards the Clinic, in *Advances in Immunology*. 2008, Academic Press. p. 1-38.
191. Hoehlig, K., et al., Activation of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells proceeds normally in the absence of B cells during EAE. *European journal of immunology*. **42**(5): p. 1164-1173.
192. von Herrath, M., S. Sanda, and K. Herold, Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(12): p. 988-994.
193. Saadoun, D., et al., Restoration of peripheral immune homeostasis after rituximab in mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood*, 2008. **111**(11): p. 5334-5341.
194. Hamel, K., et al., Suppression of Proteoglycan-Induced Arthritis by Anti-CD20 B Cell Depletion Therapy Is Mediated by Reduction in Autoantibodies and CD4⁺ T Cell Reactivity. *The journal of immunology*, 2008. **180**(7): p. 4994-5003.
195. Di Rosa, F. and P. Matzinger, Long-lasting CD8 T cell memory in the absence of CD4 T cells or B cells. *The Journal of experimental medicine*, 1996. **183**(5): p. 2153-2163.
196. Phillips, J.A., et al., CD4⁺ T cell activation and tolerance induction in B cell knockout mice. *The Journal of experimental medicine*, 1996. **183**(4): p. 1339-1344.
197. Eming, R., et al., Rituximab Exerts a Dual Effect in Pemphigus Vulgaris. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(12): p. 2850-2858.
198. Hu, C.-y., et al., Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *The journal of clinical investigation*, 2007. **117**(12): p. 3857-3867.

199. Stasi, R., et al., Response to B-cell-depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*, 2007. **110**(8): p. 2924-2930.
200. Lehmann-Horn, K., et al., Anti-CD20 B-cell depletion enhances monocyte reactivity in neuroimmunological disorders. *Journal of Neuroinflammation*. **8**(1): p. 146.
201. Corcione, A., et al., Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(30): p. 11064-11069.
202. Harris, D.P., et al., Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol*, 2000. **1**(6): p. 475-482.
203. Giacomini, P.S. and A. Bar-Or, Antigen-specific therapies in multiple sclerosis. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2009. **14**(3): p. 551-560.
204. Battaglia, M., et al., Tr1 cells: From discovery to their clinical application. *Seminars in Immunology*, 2006. **18**(2): p. 120-127.
205. Bour-Jordan, H.I.n. and J.A. Bluestone, B cell depletion: a novel therapy for autoimmune diabetes? *The journal of clinical investigation*, 2007. **117**(12): p. 3642-3645.
206. Bar-Or, A., et al., Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A 72-week, open-label, phase I trial. *Annals of Neurology*, 2008. **63**(3): p. 395-400.



11-Abreviaturas

BHE: Barrera hemato-encefálica
CD: Enfermedad de Crohn
CeD: Enfermedad Celíaca
CIS: Síndrome Clínico aislado
CPA: Célula Presentadora de Antígeno
EAE: Encefalitis alérgica experimental
EBV: Virus de Epstein-Barr
EM: Esclerosis Múltiple
EMRR: Esclerosis Múltiple Remitente Recurrente
EMSP: Esclerosis Múltiple Secundariamente Progresiva
GWAS: Genome Wide Association Studies
HLA: Human Leocyte Antigen
L.B: Linfocito B
LCR: Líquido cefalorraquídeo
L.T: Linfocito T
MBP: Proteína básica de la mielina
MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MOG: Glicoproteína de la mielina del oligodendrocito
Ps: Psoriasis
RA: artritis reumatoide
RMI: Resonancia magnética
SI: Sistema Inmunológico
SLE: Lupus Eritematoso Sistémico
SNC: Sistema Nervioso Central
SNP: Single Nucleotide Polymorphisms
T1D: Diabetes tipo 1
T2D: Diabetes tipo 2
T_{eff}: Linfocito T efector
T_{reg}: Linfocito T regulador



12-Anexos

1. Anexo 1

IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell

function are impaired in Multiple Sclerosis

2. Anexo 2

Dynamic cross-regulation of antigen-specific effector

and regulatory T cell subpopulations and microglia in brain autoimmunity

Title: IL-10 suppressor activity and *ex vivo* Tr1 cell function are impaired in Multiple Sclerosis

Authors: Ivan Martinez-Forero^{1,2}; Ricardo Garcia-Munoz³; Sara Martinez-Pasamar²; Susana Inoges³; Ascensión Lopez-Diaz de Cerio³; Ricardo Palacios¹; Jorge Sepulcre¹; Beatriz Moreno¹; Zaira Gonzalez¹; Begoña Fernandez-Diez¹; Ignacio Melero³ ; Mauricio Bendandi³; Pablo Villoslada^{1*}

¹Department of Neurology, ²Immunology and ³Cell Therapy Center. Clinica Universitaria de Navarra and Center for Applied Medical Research, University of Navarra. Pamplona, Spain.

***Corresponding Author:** Pablo Villoslada, Neuroimmunology lab 2.05, Center for Applied Medical Research, Pio XII 55, Pamplona 31008, Spain. Tel +34 948 194700; fax: +34 948 194715; E-mail: pvilloslada@unav.es

Key words: regulatory T cell, Tr1 cells, IL-10, CD46, Stat-3, MS.

Running title: IL-10 and Tr1 in MS

Words: Title: 12; Abstract: 232; Text: 4,430; Tables: 3; Figures: 4;
References: 38.

Abbreviations: MS: Multiple Sclerosis, Treg: regulatory T cells, Tr1: regulatory cells type 1, IL: Interleukin, PCR: Polymerase chain reaction, ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, Stat: signal transducer and activator of transcription, Socs: suppressor of cytokine signaling, R: receptor, DC: dendritic cell, TGF: transforming growth factor, IFN: interferon, RNA: ribonucleic acid, PBMC: Peripheral blood mononuclear cells, Th: T helper, CNS: Central nervous system, HC: healthy control, PE: phycoerythrin, mAb: monoclonal antibody, cDNA: complementary deoxyribonucleic acid, GAPDH: glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase, c(t): cycle threshold, MNE: mean normalized expression, RRMS: relapsing-remitting MS; SPMS: secondary-progressive MS, PPMS: primary-progressive MS, PRMS: progressive-relapsing MS, EDSS: expanded disability status scale, ND: not done.

Summary

Tr1 cells are excellent candidates for cell therapy in Multiple Sclerosis (MS). The aim of our study was to assess the functional state of Tr1 cells and IL-10R signaling in patients with MS. Tr1 cells were induced *in vitro* by activation with anti-CD46 antibodies in controls and patients with MS. Cells were phenotyped by cytometry and suppression assays, and the expression of cytokines and transcription factors was evaluated by real time PCR, ELISA, cytometry and Western blotting. We found that the activity of Tr1 cells and IL-10R signaling is impaired in MS patients since Tr1 cells isolated from MS patients produced less IL-10 than those obtained from controls. Indeed, the supernatants from Tr1 cells from controls did not suppress the proliferation of stimulated CD4+ cells from patients with MS. Furthermore, the IL-10R signaling pathway was not fully active in CD4+ cells from MS patients and these cells had higher baseline levels of *SOCS3* transcripts than controls. Indeed, after *in vitro* IL-10 stimulation the expression of the *STAT1*, *STAT3* and *IL-10RA* genes were higher in MS patients than in controls. Moreover, Stat-3 phosphorylation was lower in controls than patients after IL-10 stimulation. These results indicate that IL-10 regulatory function is impaired in patients with MS.

Introduction

Despite the fact that the immune repertoire of healthy individuals contains autoreactive T cells and natural antibodies, under normal circumstances autoimmune diseases do not develop. For example, in the repertoire of healthy humans [124] and non-human primates [125] Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-reactive T cells exist, that can induce autoimmune encephalomyelitis in marmosets when activated in vitro [125, 126]. Hence, despite their silencing, these autoreactive T cells clearly maintain the ability to mediate autoimmune disease. Thus, as well as central tolerance other mechanisms must be active to prevent autoimmune diseases. One of the most important factors capable of preventing autoimmune diseases is the activity of regulatory T cells (Treg). Over the past few years, several subsets of Treg have been identified, including natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and acquired regulatory T cells such as Tr1 and Th3 [127]. Nevertheless, in order to unravel the pathogenesis of autoimmune conditions we must still better understand how Treg cells function in autoimmune disease, particularly since Treg cell transfer might be exploited as a tool in immunotherapy for autoimmune diseases [128].

Tr1 cells are defined by their ability to produce high levels of IL-10, moderate amounts of TGF β and IFN γ , and no IL-2 or IL-4. In addition, they also have a poor proliferative capacity [129, 130]. Moreover, Tr1 cells display a memory phenotype, and they can suppress naïve and memory Th1 or Th2 responses through the production of IL-10. The suppressive effects of Tr1 cells differentiated *in vitro* are remarkably potent, and fewer than 4,000 Tr1 cells are capable of suppressing the proliferation of 50,000 CD4⁺ T cells by 50% [131]. Tr1 cells participate in the maintenance of peripheral tolerance by suppressing the activation of autorreactive T cells [132, 133]. Tr1 cells can be generated *in vitro* from CD4⁺ by stimulation with high doses of IL-10, alone or in conjunction with IFN α [134, 135], by adding vitamin D and dexamethasone [136] or by stimulating CD46 on CD4⁺ cells with specific monoclonal antibodies [137, 138]. By contrast, generation of Tr1 cells is inhibited by OX40L [139].

Multiple Sclerosis (MS) is an chronic inflammatory disease in which activated T and B cells infiltrate the central nervous system, provoking demyelination and axonal damage, which produces

significant neurological disability [140]. To date, the primary antigens against which the immune response is directed in MS remain unknown, but immunological dysfunction has been identified in patients with MS [141]. Impairment of suppressor cell function has classically been demonstrated in patients with MS [142] and few years ago, the functional impairment of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells has also been demonstrated [143]. Recently, Astier et al [144] demonstrated that Tr1 function is also impaired in patients with MS. Moreover, the expression of the immunosuppressor cytokine IL-10 is diminished in MS patients [145, 146], in accordance with previous studies describing fewer IL-10 secreting PBMCs. Interestingly, there is a reduction in the expression of IL-10 but elevated numbers of PBMC expressing IL-10 transcripts before clinical relapse in MS [147], and there is correlation between IL-10 levels and IgG in the cerebrospinal fluid of MS patients [148]. Engineered Th2/Tr1 cells that produce high levels of IL-10 prevent epitope spreading and ameliorate disease course in animal models of MS [149]. However, it is unknown whether the functional activity of IL-10 in MS is preserved and attempts to treat MS patients with IL-10 have not been successful to date.

In order to explore the functionality of Tr1 regulatory function in MS, we assessed the *ex vivo* induction of Tr1 phenotype and the response of CD4⁺ cells to the IL-10 produced by these cells in patients with MS. We found that CD4⁺ cells from MS patients were less disposed to differentiate into a Tr1 cell phenotype *ex vivo* and that in addition, these cells produces less IL-10. Importantly, CD4⁺ cells from MS patients were more resistant to suppression by IL-10 because the IL-10R signaling cascade is defective in MS patients.

Results

In vitro generation of CD46-induced Tr1 cells is impaired in MS patients

In healthy controls (n = 8), CD4⁺ cells stimulated *in vitro* with anti-CD46 plus anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 3 days acquired a Tr1 phenotype (Fig. 1). The presence of surface CD25 and CD45Ro in these cells increased by up to 68% and 63%, respectively (Fig. 1A), while the intracellular levels of IL-10 rose up to 27% and the cells secreted up to 3,566 pg/ml IL-10 protein (Fig. 1B, $p < 0.05$ in all cases). Unstimulated cells did not augment the expression of these markers of activation and they did not produce higher levels of IL-10 after 3 days in culture (data not shown). Indeed, stimulation of CD4⁺ cells increased the expression of IL-10 and IFN γ RNA ($p < 0.05$ in both cases) but not that of IL-2 (Fig. 1C). Moreover, we assessed whether such CD4⁺ T cell cultures remain stable over time and whether Tr1 cells released large amounts of IL-10 upon further stimulation. The same CD46-induced Tr1 induction protocol was applied to cells from five HC individuals and a second stimulation was applied 10 days later with an anti-CD3 rather than the anti-CD46 antibody. When the Tr1

phenotype was assessed at different intervals, we found that after the first stimulation the majority of the cells had developed an activation and memory phenotype. Moreover, they increased the release of IL-10, the production of which peaked at day 3 and decreased over the following 10 days. Over the next 7 days, the Tr1 cells maintained the activation and memory phenotype but they produced less IL-10. After a second stimulation 10 days later, the majority of the cells showed a CD25⁺CD45Ro⁺ activation/memory phenotype (65%, Fig. 1D) and they also augmented the levels of both intracellular (Fig. 1D) and secreted IL-10 protein (Fig. 1E, $p < 0.05$ in all cases). Finally, we assessed whether Tr1 cells acted as regulatory T cells, by assessing the capacity of the secreted cytokines (mainly IL-10) to suppress the proliferation of CD4⁺ cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. We found that the supernatants from Tr1 cell cultures, containing high levels of IL-10 (in the range of 5,580 to 7,533 pg/ml), as well as recombinant IL-10, were able to suppress the proliferation of CD4⁺ T cells (Fig. 1F, $p < 0.001$). This suppression was impaired in the presence of the anti-IL-10 antibody, confirming that the suppression was mediated by IL-10 (Fig. 1F). Thus, in accordance with earlier data [137], we confirm that CD46 stimulation of CD4⁺ cells induces a Tr1-like

phenotype and that this phenotype is stable in culture for 20 days, although IL-10 production is dependent on further TCR stimulation.

When the same CD46-induced Tr1 induction protocol was applied to CD4⁺ cells from untreated patients with MS (n = 11), we found that there was a similar increase in the expression of the CD25 and CD45Ro activation and memory markers, as well as in intracellular and secreted IFN γ (Fig. 2A, 2B). However, both the intracellular and secreted levels of IL-10 produced by Tr1 cells from MS patients were significantly lower at day 3 than those from HC (Fig. 2A and 2C $p < 0.05$ in both cases). Because CD46 have a pleiotropic activity in the immune system that strongly influences T cell activation and function [150], we compared the levels of CD46 in cells isolated from MS patients and HC. No differences were found in the levels of CD46 expression between MS patients and HC (HC: 70.5%; MS: 72.3%) (Fig. 2A and [Table 1](#)). Thus, our results suggest that Tr1 activity is impaired in MS patients.

CD4⁺ cells from MS patients are hyporesponsive to the suppressive activity of IL-10

Because IL-10 is the mediator of Tr1 cell immunomodulatory activity, we assessed whether the Tr1 activity contributed to peripheral tolerance in MS patients to the same extent as in HC. We studied the response of CD4⁺ cells from MS patients to IL-10 produced by Tr1 cells *in vitro*. We performed suppression assays on CD4⁺ cells stimulated with anti-CD3 antibodies using the supernatant from Tr1 from HC or recombinant IL-10. We found that in contrast to CD4⁺ from HC, proliferation of CD4⁺ from MS patients was not inhibited by the supernatant conditioned by Tr1 cells or recombinant IL-10 (Fig. 2D). Thus, these results suggest that the immunosuppressive activity of IL-10 is defective in MS patients. Moreover, our findings help to explain why clinical trials with IL-10 in MS patients have failed to show an effect in preventing disease activity [151].

Defective regulation of IL-10 signaling in MS patients

Since we found that CD4⁺ cells from MS patients were more resistant to the immunosuppressive activity of IL-10, we studied the IL-10 signaling pathway to identify at which point signaling was impaired. We first measured the *ex vivo* expression of *IL-10*, *IL-10RA*, *STAT1*, *STAT3* and *SOCS3* in PBMCs from HC and MS

patients and we found that PBMCs from MS patients expressed higher levels of *SOCS3* than HC (Fig. 3A, $p = 0.008$). SOCS-3 is a potent suppressor of cytokine production that regulates the negative feedback on IL-10 production after IL-10 receptor stimulation [151]. Hence, the increased levels of *SOCS3* transcripts might inhibit IL-10 production. Accordingly, we investigated the kinetics of gene expression in CD4⁺ cells stimulated with IL-10 for 12 to 24 h. We found a significant increase in the expression of mRNA encoding *IL-10RA* ($p = 0.022$), *STAT1* ($p = 0.03$), and *STAT3* ($p = 0.034$) in PBMCs from MS patients but not from HC 24 hours after IL-10 stimulation. Again, *SOCS3* transcripts also augmented in MS patients when compared to the baseline levels of expression in HC. However, the kinetics of expression in PBMCs from both MS and HC groups was similar (Fig. 3B, $p = 0.1$).

Protein phosphorylation is a critical process in IL-10 signaling [151, 152]. For this reason, we evaluated the phosphorylation of Stat-1, Stat-3 and Socs-3 in PBMCs from MS patients and HC by flow cytometry. In HC we found that after stimulation of PBMCs with IL-10, the phosphorylation of Stat-1, Stat-3 and Socs-3 rise above baseline levels (Fig. 4A). However, in MS patients we found that

Stat-3 showed a different kinetics with lower levels of Stat-3 phosphorylation upon IL-10 stimulation (Fig. 4A, $p = 0.03$). Indeed, we analyzed which were the cell subtypes responsible of such behavior. We found that both CD4⁺ and CD8⁺ cells but not CD56⁺, CD14⁺ and CD19⁺ cell populations showed an impaired phosphorylation of Stat-3 (data not shown). We confirmed the decreased phosphorylation of Stat-3 in PBMCs from MS stimulated with IL-10 by western-blot (Fig 4B). Finally, we performed an IL-10 dose-response by analyzing the phosphorylation of Stat-1, Stat-3 and Socs-3 after stimulation with increasing dose of IL-10. We found that patients and controls display a similar Stat-1 and Socs-3 phosphorylation kinetics when using different doses of IL-10, but we found a trend for a different kinetics in Stat-3 phosphorylation, showing a decrease response to IL-10 stimulation in MS patients (Fig.4C, $p = 0.06$). In summary, our findings suggest that IL-10 signaling is defective in patients with MS.

The most common drug used to treat MS is interferon beta (IFN-beta) [140]. It has been shown that IFN-beta therapy increases the levels of IL-10 in MS patients [153], suggesting that one of the mechanisms of action of IFN-beta treatment may be to promote the

activity of immunosuppressive cytokines. Because we found that the response to IL-10 is impaired in MS patients, we assessed whether IFN-beta might revert such a status and in this way, become a useful adjuvant for Tr1 cell immunotherapy. We initially measured the *ex vivo* expression of *IL-10RA*, *STAT1*, *STAT3* and *SOCS3* in MS patients treated with IFN-beta. We found that patients treated with IFN-beta have higher levels of *STAT1* and *STAT3* than HC (Fig. 3A, $p = 0.019$ and 0.038 respectively), and that there was a trend towards higher levels of *IL-10* when compared to HC (Fig. 3A, $p = 0.06$). Indeed, MS patients treated with IFN-beta displayed higher levels of *IL-10RA* than untreated patients (Fig. 3A, $p = 0.015$). The rise of *IL-10* transcripts in PBMCs from MS patients treated with IFN-beta has been related to the fact that IFN-beta therapy inhibits the proliferation of myelin-reactive T-cells, increasing the frequency of other T cell populations, including Treg [153]. In the kinetic analysis, we found that patients treated with IFN-beta did not differ significantly from untreated patients (Fig 3B). Moreover, we analyzed the effect of IFN-beta therapy in the IL-10 signaling cascade by flow cytometry. We found that phosphorylation of Stat-1, Stat-3 and Socs-3 was similar in IFN-b treated and untreated patients, although we found a

non-significant difference in levels of Stat-3 phosphorylation at 60 min. These results suggest that IFN-beta therapy is unable to recover the response to IL-10 *in vitro* (Fig. 4D).

Discussion

Recently, Astier et al reported the impairment of Tr1 cell function in patients with MS [144]. They found that Tr1 cells from MS patients produce less amounts of IL-10 but they retain their capacity to proliferate and to produce IFN γ . They found this defective response both in IFN-beta treated and untreated MS patients. In our study we found similar findings because we also demonstrate that after CD46 activation, although Tr1 cells from patients with MS display an activate phenotype; they produce less amount of IL-10 and high amounts of IFN γ , both at the RNA and protein level. Indeed, our study and Astier study showed that levels of CD46 receptors were similar between patients and controls. Our result and the findings in Astier et al. study indicates that stimulation with high doses of anti-CD3 or IL-2 did not recover the IL-10 production by Tr1 cells, indicating that differences in the surface levels of this receptor were not the cause of the loss of function. In Astier et al. study, they found that this impaired regulatory phenotype was associated with the presence of an alternative spicing in the CD46 receptor that promotes a pro-inflammatory response. We further explored the implications of the defective Tr1 cell function by

assessing the IL-10R signaling in patients with MS. We found that IL-10R signaling is abnormal in MS patients, contributing to the impairment of Tr1 function because CD4⁺ from such patients will be less susceptible to the action of IL-10 produced by Tr1 cells. Although we did not assess the presence of the CD46 splicing in patients with MS, the Tr1 cell phenotype in both studies are quite similar, indicating a consistent defect in this regulatory T cell function in patients with MS.

CD4 cells from patients with MS were significantly less responsive to suppression when cultured with supernatants from Tr1 cells cultures from healthy controls or recombinant IL-10. This finding suggests that effector cells in MS are being less amenable to suppression. Although such differences might be attributable to differences in the composition of populations taken from the MS and HC groups, we found no differences in the CD4⁺ phenotype assessed by cytometry between MS and HC patients at baseline. Because we did not measure the phenotypic characteristics of the different subpopulations of T cells, levels of IL-10RB, and we did not sort for CD45Ra cells, we could not rule out some other mechanisms explaining the poor response to IL-10 in MS patients.

Our findings suggest that the critical step impairing the response to IL-10 in MS patients is the lack of phosphorylation of Stat-3. Stat-3 activation is the main mediator of IL-10 response [151]. The suppression of Stat-3 activation inhibits the suppression of MHC class II expression mediated by IL-10 [154]. Because antigen presentation is a critical step in the generation of autoimmune responses, the failure of IL-10 in modulating such process might predispose to the generation of autoimmune response. In addition, Stat-3 phosphorylation in macrophages is induced after vagus nerve stimulation through acetylcholine receptors signaling [155]. Thus, the impairment in the neuromodulatory activity of the parasympathic system in patients with MS [156, 157] might prevent the activation of IL-10 pathway in patients with MS. Finally, the lack of Stat-3 phosphorylation might impair the negative feedback of the constitutive high levels of Socs-3 that repress IL-10. However, the complexity of the regulatory network involved in IL-10 signaling will require further experiments to clarify the mechanistic basis of this finding.

Because T cells can be considered as minifactories that might release the right combinations of cytokines in the right place and time, and they are able to sense the tissue environment, they seem to be an ideal candidate for immunotherapy. In this respect, Tr1 cells might be a good candidate for cell immunotherapy for autoimmune diseases since they can be obtained in humans by stimulating CD4+ cells with different protocols. Moreover, their mechanism of action, mainly based on IL-10 secretion, is well defined in order to monitor the response to therapy. Another advantage of using these cells is that the target antigen does not need to be known, as is indeed the case in most autoimmune diseases. However, our results and previous studies suggest that Tr1 function and IL-10R signaling is impaired in patients. The IL-10R signaling impairment would conceptually be expected to limit therapies that aim to merely increase IL-10 levels and for this reason Tr1 cell immunotherapy is not immediately advisable if such impairment is not reverted.

The lack of response to IL-10 in MS patients might be due to the impairment of IL-10 signaling, including the presence of increased levels of SOCS-3 and the poorer phosphorylation of Stat-3 after IL-10 stimulation. The beneficial effects of IFN-beta therapy might be

due to the partially recovery of the response of CD4⁺ cells to IL-10. However, results from Astier et al. study [144] and our study suggest that IFN-beta is unable to recover Tr1 function. However, recent studies showed that a combination of dexamethasone and vitamin D3, a regimen that induce Tr1 cells in vitro, was able to revert the resistance to corticosteroids therapy in patients with asthma, and restoring levels of IL-10 [158], indicating that Tr1 dysfunction might be reversible, at least in patients with asthma. It still remains unclear whether IL-10R signaling and Tr1 dysfunction is either a primary or secondary phenomenon, as it has been suggested that autoimmune diseases might arise because of the deficiencies in Treg function [159]. Alternatively, during autoimmune diseases the Treg activity may become exhausted. In either case, the reconstitution of Treg function in patients with autoimmune disease might improve the disease course. Further studies will be required to assess whether adoptive transfer of Tr1 cells in combination with immunomodulatory therapies may be a useful treatment for MS, as well as for other autoimmune diseases.

Methods and Patients

Subjects: We studied 41 patients with MS [160] and 21 sex and age matched healthy controls (HC), all of whom provided their informed consent. The clinical data of the MS patients is shown in Table 2. Number of individuals used for each experiment is described in the result section and in each figure legend. For Tr1 induction experiments, patients were not receiving any immunomodulatory or immunosuppressive drug. This work was approved by the Ethical Committee of the University of Navarra and informed consent was obtained from all participating subjects.

Media and antibodies: Cells were maintained in RPMI medium with 10% heat-inactivated fetal calf serum and 200 mM L-glutamine, in the presence or absence of recombinant human IL-2 (BioSource International). We assessed three different anti-CD46 antibodies: mAb GB24, mAb TRA-2-10 (both of them generously provided by C. Kemper and J. Atkinson, University of Washington), and the commercial anti-CD46 mAb (RDI-CBL488 from Research Diagnostics Inc, US). We found similar activity for each of these when analyzing the generation of CD46 induced Tr1-like cells (Table 3). The mAbs against human CD3 (HIT3a) and

CD28 (CD28.2), the neutralizing mAb to human IL-10 (JES3-9D7), IL-2 (MQ1-17H12), IL-12 (C8.6), the mAb against human CD4 (RPA-T4) PerceP, CD25 (2A3) FITC, CD45RA (HI100), CD45RO (UCHL1) PE, IL-10 PE, and IFN γ PE were all obtained from Becton Dickinson (BD, San Diego, US). The antibodies against Stat-3 and phospho-Stat-3 were obtained from Santa Cruz (Santa Cruz, US), while that raised against actin was purchased from Sigma (Germany).

CD46- induced Tr1 cell stimulation: CD4⁺ lymphocytes were purified from whole blood by separating mononuclear cells with Ficoll (Amersham), and then applying negative selection using the Miltenyi CD4⁺ T-cell isolation kit (Miltenyi, Germany). Only samples in which the selection process reached >95% CD4⁺ cells were used. *In vitro* primary stimulation was carried out overnight in 96-well culture plates coated with anti-CD46 (5 μ g/ml), anti-CD3 (10 μ g/ml), anti-CD28 (5 μ g/ml) and anti-IL12 (5 μ g/ml) antibodies as described in Kemper et al [137]. CD4⁺ cells (2 x 10⁵ cells per well) were cultured for 3 to 20 days. Subsequently, the cells were washed and expanded for another 6 days in medium supplemented with 40 units/ml of human IL-2 (R&D). On the 7th day, the cells

were subjected to secondary stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 but not with anti-CD46 antibodies. All experiments were carried out at least three times, and each procedure for activation was analyzed in triplicate.

Suppression assays: CD4⁺ cell stimulation was carried out in 96-well culture plates coated with anti-CD3 (10 µg/ml) and anti-CD28 (10 µg/ml) antibodies. CD4⁺ T cells (2×10^5 per well) were incubated in triplicate in the presence of CD46-induced Tr1 culture supernatants from HC, which contain high levels of IL-10 (5,580 – 7,533 pg/ml), rIL-10 (20 ng/ml, R&D) and/or antibodies anti-IL-10 (BD Biosciences, San Jose, CA). The concentration of Tr1 supernatant was adjusted to obtain the same concentration than rIL-10 (20 ng/ml). After 7 days, 0.5 mCi of [³H] thymidine was added to each well and 5 h later, the cells were harvested and the thymidine incorporated into the cells in each well was determined by scintillation counting. Suppression Index was determined as cpm incorporated to culture with Tr1 cell culture supernatant / cpm incorporated to culture with media only.

IL-10 stimulation assays: PBMCs (2×10^5 cells per well) were stimulated with IL-10 (20 ng/ml, R&D Systems) in 96 well culture plates for up to 24 hours. Experiments were repeated at least three times, and each experimental condition was analyzed in triplicate.

Flow Cytometry analysis: cells were phenotyped by three color flow cytometry (FACScan) according to the expression of CD25, CD45, CD46, CTLA4 and the intracellular cytokines iIL-10 and iIFN γ . For intracellular cytokine staining, cells (2×10^5 cells per well) were activated with immobilized anti-CD3 antibodies over 24 or 72 h. Brefeldin A was added for the last 4–8 h in culture before the cells were fixed (Fix and Perm; Caltag), stained with intracellular antibodies (iIL-10 PE or IFN- γ PE), and analyzed by flow cytometry. The phenotypic analysis of PBMCs before CD4+ cell purification (day 0) from the HC and MS patients studied is shown in Table 1.

Phosphorylation analysis by flow cytometry: PBMCs were incubated at 37°C in RPMI 1640 at 10^6 cells/ml and stimulated at different times (15, 30, 60 min) or left unstimulated with 20 ng/ml human recombinant IL-10 (BD Biosciences, San Jose, CA). For the dose response experiments the cells were stimulated with increasing

doses of rIL-10 (10,20,50,100,200,500 ng/ml). Phosphorylated Stat1, Stat3, SOCS3 were detected by flow cytometry as described by He et al. [161]. Briefly, the cells were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with methanol, and stained with PE-conjugated anti-PStat1, Alexa fluor 488-conjugated anti-PStat3 (BD Biosciences, San Jose, CA) and APC conjugated anti-Socs3 (Santa Cruz) and then analyzed with a flow cytometer. Phosphorylation increase is plotted as the mean relative activation of two samples normalized to the activity of the unstimulated control at zero minutes.

ELISA: We assessed the secretion of IL-10 and IFN- γ in the supernatants of CD4⁺ cell cultures by ELISA (BD Opteia™ ELISA kit, BD), following the manufacturer's instructions.

Real-Time quantitative PCR: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) and were immediately submerged in RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen) to preserve gene expression patterns. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). During RNA purification DNA was removed with a DNase treatment using the RNase-Free DNase Set (Qiagen). Synthesis of cDNA from total

RNA was performed using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Primer sequences and target-specific fluorescence labeled TaqMan probes were purchased from Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression Assays). Quantitative real-time PCR (rt-PCR) was performed with the DNA Engine Opticon2 (MJ Research). Each sample was run in triplicate, and in each plate the target and the endogenous control gene (GAPDH) were amplified and placed in different wells. Cycle threshold (c(t)) values were acquired with Opticon Monitor 2.01 software (MJ Research). The normalized gene expression was calculated using the Q-Gene software application [162]. The mean normalized expression (MNE) was given by calculating the average c(t) values of the triplicate of the target, and of the reference.

Western-blot analysis: Western blots were performed as described previously [163] and the membranes were probed with both the corresponding Stat-3 and phosphorylated Stat-3 antibodies. Equal loading of gels and the specificity of the effects observed was demonstrated by hybridizing membranes with an antibody specific for Actin and Stat-3.

Statistical analysis: The differences between groups were assessed with the Mann-Whitney U test. Differences over time were assessed

using the Friedman test and two way analysis of variance (ANOVA). The significance of the difference between each pair of flow cytometry curves was calculated by two-way analysis of variance. Because real time PCR measurements are highly skewed, we performed a logarithmic transformation for the treatment of non-normality. Normality was assessed with the Kolmogorov-Smirnov test and all statistical tests were performed using the SPSS 11.0 Software.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Atkinson and Kemper, from the Division of Rheumatology, Washington University School of Medicine, for generously providing the anti-CD46 antibodies. This work was supported by the University of Navarra Research Program (PIUNA), the Spanish Ministry of Health (FIS PI051201) and the Fundacion Uriach to PV. JS was a fellow of the Spanish Ministry of Health (FIS CM#05/00222). The authors have no conflicting financial interests to disclose.

References

- 1 **Diaz-Villoslada, P., Shih, A., Shao, L., Genain, C. P. and Hauser, S. L.,** Autoreactivity to myelin antigens: myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a prevalent autoantigen. *J.Neuroimmunol.* 1999. **99**: 36-43.
- 2 **Villoslada, P., Abel, K., Heald, N., Goertsches, R., Hauser, S. L. and Genain, C. P.,** Frequency, heterogeneity and encephalitogenicity of T cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein in naive outbred primates. *Eur J Immunol* 2001. **31**: 2942-2950.
- 3 **'t Hart, B. A., van Meurs, M., Brok, H. P., Massacesi, L., Bauer, J., Boon, L., Bontrop, R. E. and Laman, J. D.,** A new primate model for multiple sclerosis in the common marmoset. *Immunol.Today* 2000. **21**: 290-297.
- 4 **Zou, W.,** Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.* 2006. **6**: 295-307.
- 5 **Bluestone, J. A.,** Regulatory T-cell therapy: is it ready for the clinic? *Nat.Rev.Immunol.* 2005. **5**: 343-349.
- 6 **Battaglia, M., Gregori, S., Bacchetta, R. and Roncarolo, M. G.,** Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin.Immunol.* 2006. **18**: 120-127.
- 7 **Meiffren, G., Flacher, M., Azocar, O., Roubourdin-Combe, C. and Faure, M.,** Cutting edge: abortive proliferation of CD46-induced Tr1-like cells due to a defective Akt/Survivin signaling pathway. *J Immunol* 2006. **177**: 4957-4961.
- 8 **Levings, M. K., Sangregorio, R., Sartirana, C., Moschin, A. L., Battaglia, M., Orban, P. C. and Roncarolo, M. G.,** Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp.Med.* 2002. **196**: 1335-1346.
- 9 **Wildbaum, G., Netzer, N. and Karin, N.,** Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. *J Clin Invest* 2002. **110**: 701-710.
- 10 **Gianfrani, C., Levings, M. K., Sartirana, C., Mazzarella, G., Barba, G., Zanzi, D., Camarca, A., Iaquinto, G., Giardullo, N., Auricchio, S., Troncone, R. and Roncarolo, M. G.,** Gliadin-specific type 1 regulatory T cells

- from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol* 2006. **177**: 4178-4186.
- 11 **Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E. and Roncarolo, M. G.,** A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997. **389**: 737-742.
- 12 **Levings, M. K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal, M. R. and Roncarolo, M. G.,** IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol.* 2001. **166**: 5530-5539.
- 13 **Barrat, F. J., Cua, D. J., Boonstra, A., Richards, D. F., Crain, C., Savelkoul, H. F., Waal-Malefyt, R., Coffman, R. L., Hawrylowicz, C. M. and O'Garra, A.,** In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp.Med.* 2002. **195**: 603-616.
- 14 **Kemper, C., Chan, A. C., Green, J. M., Brett, K. A., Murphy, K. M. and Atkinson, J. P.,** Activation of human CD4⁺ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 2003. **421**: 388-392.
- 15 **Barchet, W., Price, J. D., Cella, M., Colonna, M., MacMillan, S. K., Cobb, J. P., Thompson, P. A., Murphy, K. M., Atkinson, J. P. and Kemper, C.,** Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell responses but allow for dendritic-cell maturation. *Blood* 2006. **107**: 1497-1504.
- 16 **Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O. A., Gilliet, M., Qin, F. X. and Liu, Y. J.,** OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. **103**: 13138-13143.
- 17 **Steinman, L.,** Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol* 2001. **2**: 762-764.
- 18 **Sospedra, M. and Martin, R.,** Immunology of multiple sclerosis. *Annu.Rev.Immunol.* 2005. **23**: 683-747.
- 19 **Antel, J. P., Richman, D. P., Medof, M. E. and Arnason, B. G.,** Lymphocyte function and the role of regulator cells in multiple sclerosis. *Neurology* 1978. **28**: 106-110.
- 20 **Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. and Hafler, D. A.,** Loss of functional suppression by

- CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 2004. **199**: 971-979.
- 21 **Astier, A. L., Meiffren, G., Freeman, S. and Hafler, D. A.**, Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2006. **116**: 3252-3257.
- 22 **Soldan, S. S., Alvarez Retuerto, A. I., Sicotte, N. L. and Voskuhl, R. R.**, Dysregulation of IL-10 and IL-12p40 in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004. **146**: 209-215.
- 23 **Huang, W. X., Huang, P., Link, H. and Hillert, J.**, Cytokine analysis in multiple sclerosis by competitive RT - PCR: A decreased expression of IL-10 and an increased expression of TNF-alpha in chronic progression. *Mult Scler* 1999. **5**: 342-348.
- 24 **Navikas, V., Link, J., Palasik, W., Soderstrom, M., Fredrikson, S., Olsson, T. and Link, H.**, Increased mRNA expression of IL-10 in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Scand.J Immunol.* 1995. **41**: 171-178.
- 25 **Nakashima, I., Fujihara, K., Misu, T., Okita, N., Takase, S. and Itoyama, Y.**, Significant correlation between IL-10 levels and IgG indices in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000. **111**: 64-67.
- 26 **Yin, L., Yu, M., Edling, A. E., Kawczak, J. A., Mathisen, P. M., Nanavati, T., Johnson, J. M. and Tuohy, V. K.**, Pre-emptive targeting of the epitope spreading cascade with genetically modified regulatory T cells during autoimmune demyelinating disease. *J Immunol.* 2001. **167**: 6105-6112.
- 27 **Riley-Vargas, R. C., Gill, D. B., Kemper, C., Liszewski, M. K. and Atkinson, J. P.**, CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* 2004. **25**: 496-503.
- 28 **Moore, K. W., de Waal, M. R., Coffman, R. L. and O'Garra, A.**, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 2001. **19**: 683-765.
- 29 **Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y. and Fisher, P. B.**, Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2004. **22**: 929-979.
- 30 **Kozovska, M. E., Hong, J., Zang, Y. C., Li, S., Rivera, V. M., Killian, J. M. and Zhang, J. Z.**, Interferon beta induces

- T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology* 1999. **53**: 1692-1697.
- 31 **Williams, L., Bradley, L., Smith, A. and Foxwell, B.**, Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 2004. **172**: 567-576.
- 32 **de Jonge, W. J., van der Zanden, E. P., The, F. O., Bijlsma, M. F., van Westerloo, D. J., Bennink, R. J., Berthoud, H. R., Uematsu, S., Akira, S., van den Wijngaard, R. M. and Boeckxstaens, G. E.**, Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005. **6**: 844-851.
- 33 **Giorelli, M., Livrea, P. and Trojano, M.**, Post-receptorial mechanisms underlie functional dysregulation of beta2-adrenergic receptors in lymphocytes from Multiple Sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2004. **155**: 143-149.
- 34 **Cosentino, M., Zaffaroni, M., Giorelli, M., Marino, F., Ferrari, M., Bombelli, R., Rasini, E., Trojano, M., Lecchini, S., Livrea, P., Comi, G. and Frigo, G.**, Adrenergic mechanisms in multiple sclerosis: the neuro-immune connection? *Trends Pharmacol Sci* 2004. **25**: 350-351; author reply 351-352.
- 35 **Xystrakis, E., Kusumakar, S., Boswell, S., Peek, E., Urry, Z., Richards, D. F., Adikibi, T., Pridgeon, C., Dallman, M., Loke, T. K., Robinson, D. S., Barrat, F. J., O'Garra, A., Lavender, P., Lee, T. H., Corrigan, C. and Hawrylowicz, C. M.**, Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 2006. **116**: 146-155.
- 36 **Baecher-Allan, C. and Hafler, D. A.**, Suppressor T cells in human diseases. *J Exp. Med.* 2004. **200**: 273-276.
- 37 **McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B. Y. and Wolinsky, J. S.**, Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001. **50**: 121-127.

- 38 **He, X. S., Ji, X., Hale, M. B., Cheung, R., Ahmed, A., Guo, Y., Nolan, G. P., Pfeffer, L. M., Wright, T. L., Risch, N., Tibshirani, R. and Greenberg, H. B.,** Global transcriptional response to interferon is a determinant of HCV treatment outcome and is modified by race. *Hepatology* 2006. **44**: 352-359.
- 39 **Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R. and Dobbie, Z.,** Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2002. **32**: 1372-1374.
- 40 **Moreno, B., Hevia, H., Santamaria, M., Sepulcre, J., Munoz, J., Garcia-Trevijano, E. R., Berasain, C., Corrales, F. J., Avila, M. A. and Villoslada, P.,** Methylthioadenosine reverses brain autoimmune disease. *Ann.Neurol* 2006. **60**: 323-334.

Table 1. Baseline phenotypic analysis in MS patients and HC by flow cytometry.

	MS	HC	p value
CD4+	29.65(11.33)	36.20(16.03)	ns
CD25+	10.99(8.91)	17.37(15.18)	ns
CD4+CD25+	8.40(6.13)	14.39(13.46)	ns
CD46+	77.48(22.71)	72.52(19.77)	ns
CD4+CD46+	29.51(11.30)	36.00(15.93)	ns
CD46+CD25+	11.84(9.07)	16.89(14.69)	ns
CD45RA+	57.40(19.75)	45.49(13.67)	ns
CD45RO+	20.17(7.89)	33.20(20.25)	ns
CD4+CD45RA+	18.57(11.95)	17.15(3.67)	ns
CD4+CD45RO+	14.22(5.59)	22.22(16.82)	ns
CD45RA+RO+	2.82(2.45)	6.07(3.90)	ns

We studied PBMCs from MS patients (n=11) and HC (n=8), and found no differences between either group for any of the markers tested. The results are expressed as mean (standard deviation) of the percentage of cells expressing each marker and each group was compared by means of the Mann-Whitney test. In addition, no

differences were found in phenotype when compared between MS disease subtypes (data not shown).

Table 2. Clinical characteristics of MS patients and healthy controls

	MS	HC
No.	41	20
Sex (male/female)	12 / 29	6 / 14
Age (years)	38.15 + 11.32	41.8 + 13.2
Disease duration (years)	8.93 + 8.64	--
EDSS	3.1 + 2.2 (0 – 7)	--
Disease Subtype:		
RRMS	28	--
SPMS	6	--
PRMS	3	--
PPMS	4	--
IFN-beta therapy (yes / no)	14 / 21	--

EDSS: Expanded Disability Status Score; RRMS: Relapsing-

Remitting MS; SPMS: Secondary-Progressive MS; PRMS:

Progressive-Relapsing MS; PPMS: Primary-Progressive MS. IFN-

beta: Interferon beta

Table 3. Comparison between the three anti-CD46 antibodies in the induction of Tr1 cells

Antibody	CD25		CD45Ro		iIL-10		IL-10	
	% of cells		% of cells		% of cells		pg /ml	
	Day 0	Day 3	Day 0	Day 3	Day 0	Day 3	Day 0	Day 3
GB24¹	19.9	67.5	31.0	61.0	0.39	27.2	350	2,731
Tra-2-10¹	11.0	92.0	22.0	54.0	1.4	32	ND	915
J4-48²	13.0	80.5	33.5	61.0	0.94	50.0	ND	6,561

¹ generously provided by Dr Kemper and Atkinson, Washington University

² purchased from Research Diagnostic Inc, US (catalogue number RDI-CBL488)

ND: not done

We found that each of the three antibodies tested efficiently induced a Tr1 phenotype in CD4+ cells from HC after 3 days of activation.

The results show the change in the percentage of cells expressing markers of activation (either CD25 or CD45Ro) or IL-10 (either intracellular [iIL-10] or secreted IL-10) from day 0 to day 3 after activation with each antibody.

Figures

Figure 1. Induction of Tr1 phenotype in CD4⁺ from healthy controls (n=8). (A) Stimulated CD4⁺ cells expressed significantly higher levels of CD25, CD45Ro, and both intracellular and secreted IL-10 (B), at day 2 and 3 than at baseline (day 0), indicated by *. The results are expressed as the percentage of cells displaying each marker in terms of flow cytometry, or in pg/ml in the case of secreted IL-10 protein. C) *IL-10*, *IFN γ* and *IL-2*, increased in Tr1 cultures, * indicates significant differences between day 0 and day 3. D) Kinetics of Tr1 cultures induction. The results are expressed as the percentage of cells displaying each marker in flow cytometry assays. E) Levels of IL-10 protein in the supernatant of Tr1 cultures assessed by ELISA. Arrows indicate the antibody stimulation (see above) and the results are the summary of three different experiments on PBMCs from eight HC individuals. * indicates significant differences from day 0 to day 3 and 15. F) Tr1 cultures suppression. In order to confirm the involvement of IL-10 in the suppressive activity, blocking antibodies against IL-10 were added. Proliferation was assessed on the basis of H-Thymidine incorporation and the results are expressed as the mean \pm standard

deviation of the cpm for each group. Non-responder: unstimulated CD4⁺ cells; responder cells + Tr1: responder cells incubated with supernatant from CD46-induced Tr1-like cells. Results are expressed as the mean \pm standard deviation. Differences between groups were assessed with the Mann-Whitney U test and differences along time were assessed with Friedman test. * $p < 0.05$.

Figure 2. Differences in the induction of the CD46-induced Tr1 phenotype between untreated MS patients (n = 11) and HC (n = 8) after stimulation of CD4⁺ cells with anti-CD46, anti-CD3 and anti-CD28 for 3 days. A) expression of CD25⁺ and CD45Ro, and intracellular cytokines by day 3 . B) Representative histograms from flow cytometry studies showing the levels of the intracellular IL-10 (top) and IFN γ (medium) staining 3 days after CD46 stimulation in patients with MS and HC. A representative IL-10 flow-cytometry stain from a HC is shown (bottom) (y axis: anti-CD25; X axis: anti-IL10). C) Levels of IL-10 secreted protein. D) Suppression essays in CD4 stimulated cultures using Tr1 cell culture supernatants containing large amounts of IL-10 or recombinant IL-10, with or without adding the blocking antibody anti-IL-10. Results are the

summary of three different experiments in HC (n=8) and MS (n=11). Results are expressed as the mean cpm + standard deviation. Differences between groups were assessed with the Mann-Whitney U test. * indicates significant differences between HC and MS patients cpm in Tr1 supernatant and rIL10 assays $p < 0.05$.

Figure 3. Gene expression analysis of *IL-10*, *IL-10RA*, *STAT1*, *STAT3* and *SOCS3* in HC (n = 21), untreated MS patients (n = 20), and MS patients treated with IFN-beta (MS-IFNB, n= 19). Total RNA was reverse transcribed and the cDNA obtained was amplified using TaqMan probes. Each sample was run in triplicate and in each plate the target and the endogenous control were amplified in different wells. The expression of the different genes tested was quantified relatively to the level of the housekeeping gene GAPDH. Results are expressed as the logarithm of the mean normalized expression (MNE) \pm standard deviation. A) Gene expression was assessed *ex vivo* in PBMC RNA. B) Kinetics of *IL-10RA*, *STAT1*, *STAT3* and *SOCS3* gene expression in PBMCs from HC and MS patients stimulated *in vitro* with IL-10 for up to 24 hours. C)

Kinetics of *IL-10RA*, *STAT1*, *STAT3* and *SOCS3* gene expression in PBMCs from untreated and IFN- β treated MS patients stimulated *in vitro* with IL-10 for up to 24 hours. Differences between groups were assessed with the Mann-Whitney U test and differences along time were assessed with Friedman test. * $p < 0.05$.

Figure 4: IL-10 signaling response. Kinase activity time courses were assessed by measuring Stat-1, Stat-3 and Socs-3 phosphorylation after stimulating PBMCs from controls (n=6) and MS patients (n=6) *in vitro* with IL-10 (20 ng/ml) by flow cytometry and western-blot. A) Kinase activity time courses in controls and MS patients: Ai) pStat-1, Aii) pStat-3 and Aiii) pSocs-3 phosphorylation, at 0, 10, 30 and 60 min. poststimulation with IL-10. Phosphorylation levels are plotted as the mean relative activation normalized to the activity of the unstimulated control at zero minutes (fold activation). Representative histograms of every phosphoprotein at 60 min are shown below each graph for controls (left) and MS (right). B) Western-blot analysis of the kinetics of Stat-3 phosphorylation after stimulation of PBMCs from MS patients and HC with IL-10. Representative phospho-Stat-3 (p-Stat-3) stains are shown from 4 controls (left) and 4 untreated MS

patients (right). Stat-3 (total protein, first row) is shown for load control from one control and one patient. C) Dose-response curve for IL-10 signaling pathway: PBMCs were stimulated with increasing concentrations of IL-10 (10, 20, 50, 200 and 500 ng/ml) and phosphorylation activity of Stat-1 (Ci), Stat-3 (Cii) and Socs-3 (Ciii) was analyzed 30 min. after stimulation. D) Kinase activity time courses in INF- β treated (n=8) and untreated MS patients (n=6): Di) pStat-1, Dii) pStat-3 and Diii) pSocs-3 levels at 0, 10, 30 and 60 min. poststimulation with IL-10). Representative histograms of every phosphoprotein at 60 min are shown below each graph for controls (left) and MS (right). Differences between each pair of curves was evaluated by two way analysis of variance (ANOVA); * indicates significant differences ($p < 0.05$) along the curve.

Figure 1

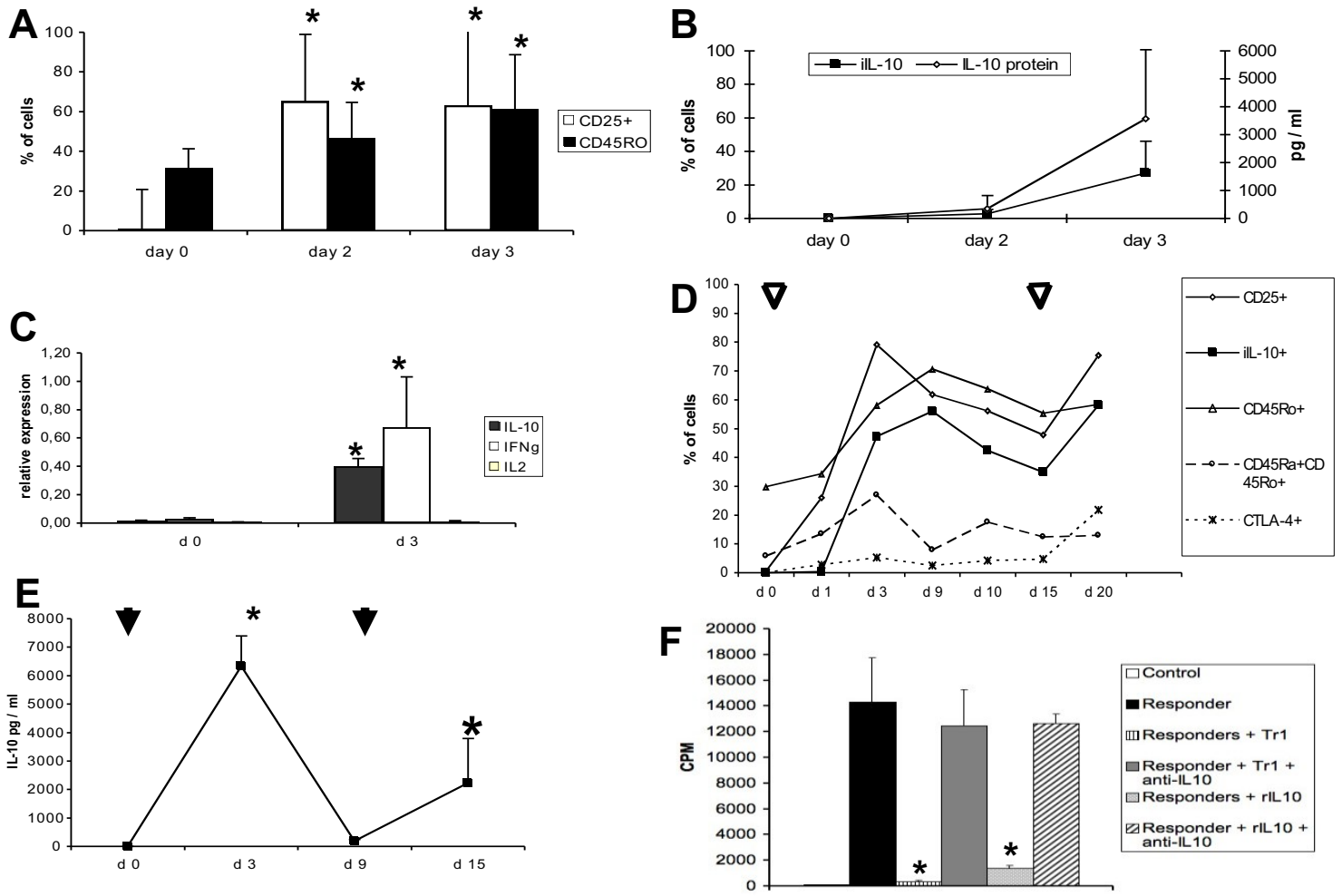


Figure 2

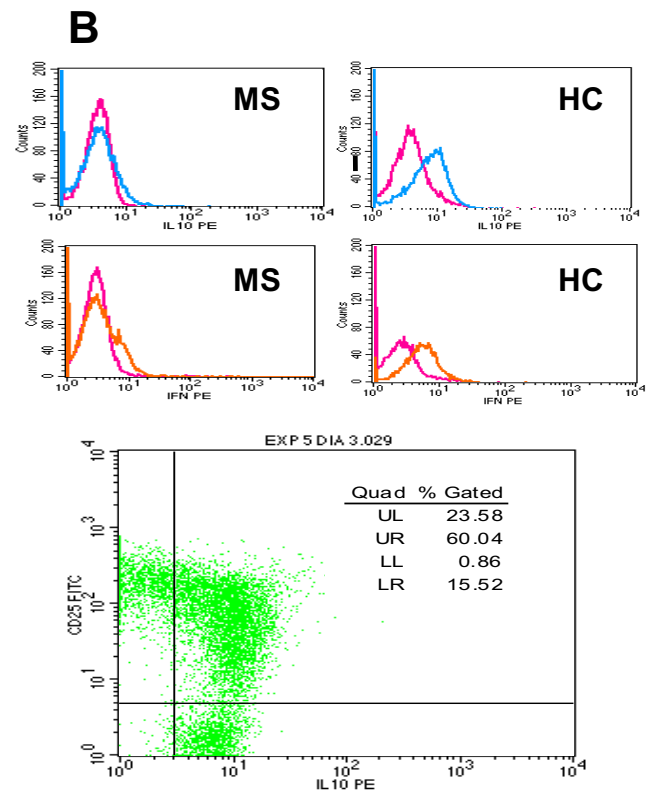
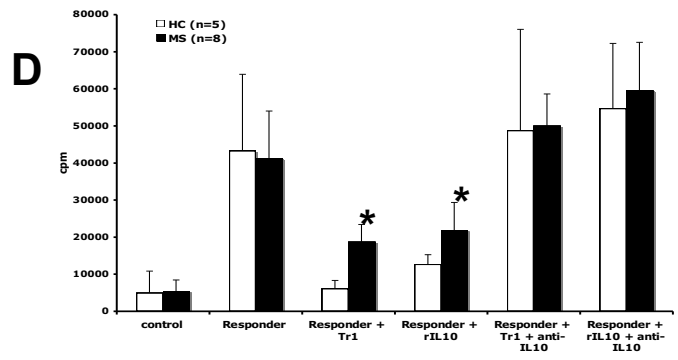
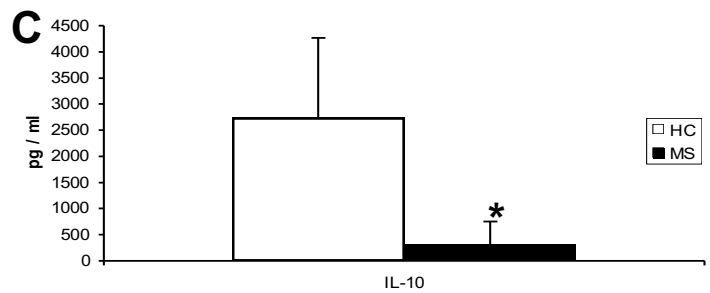
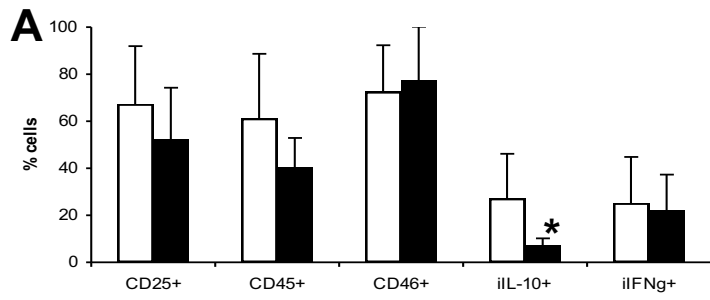


Figure 3

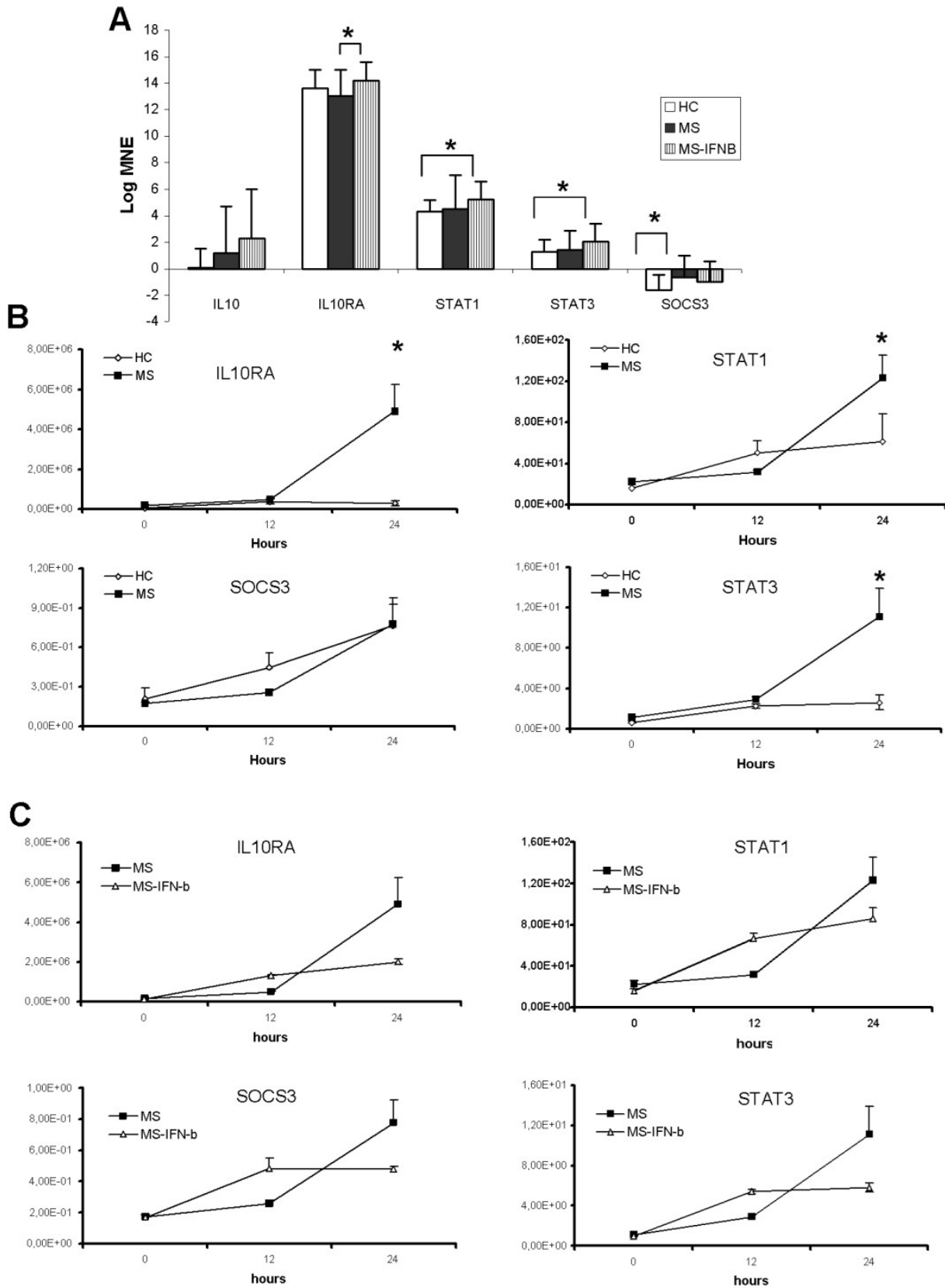
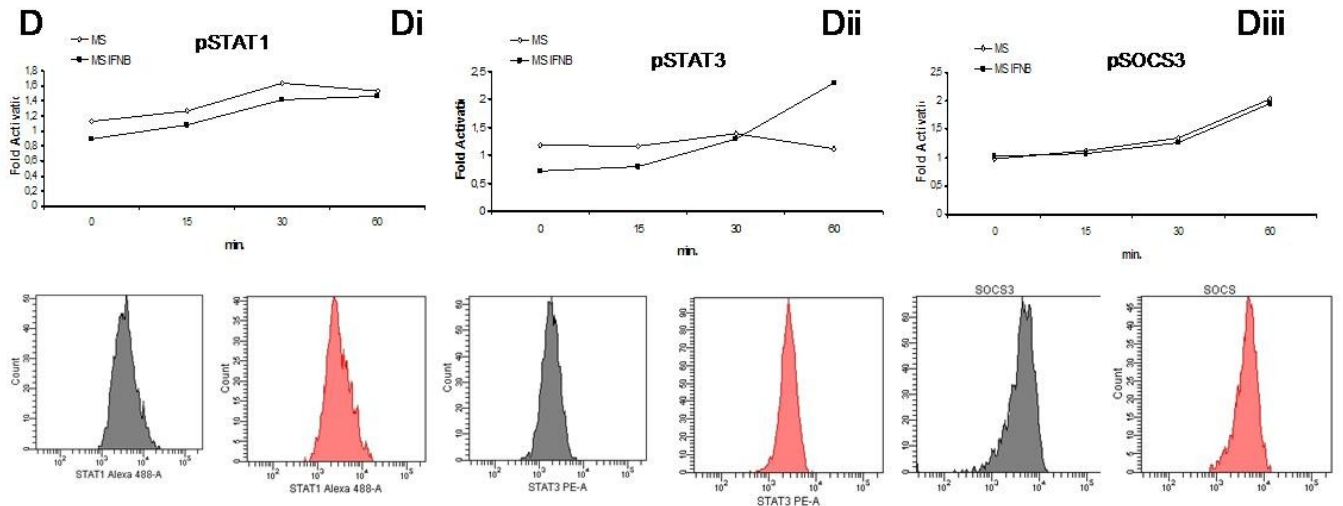
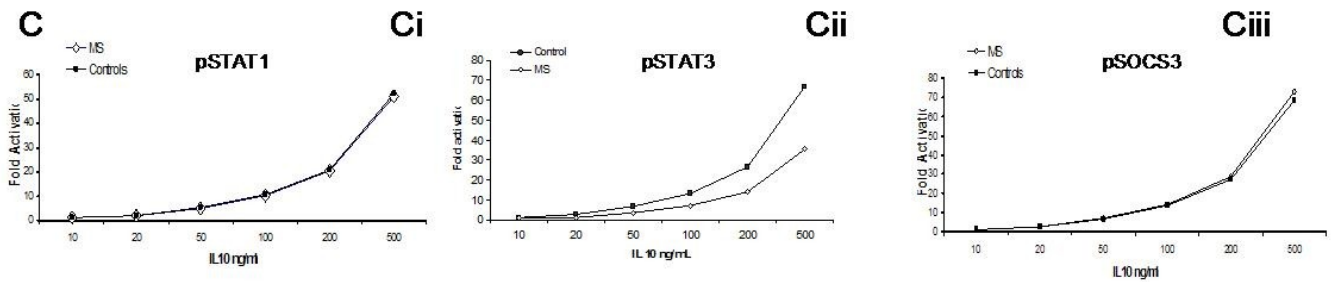
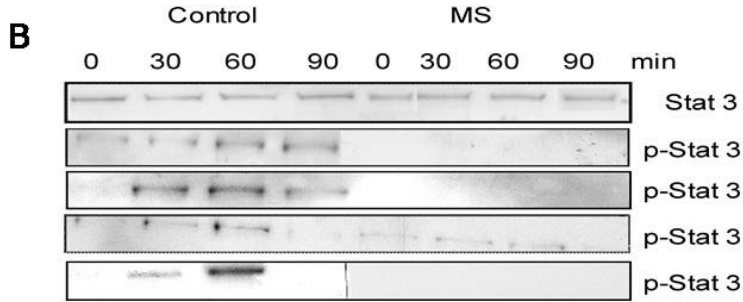
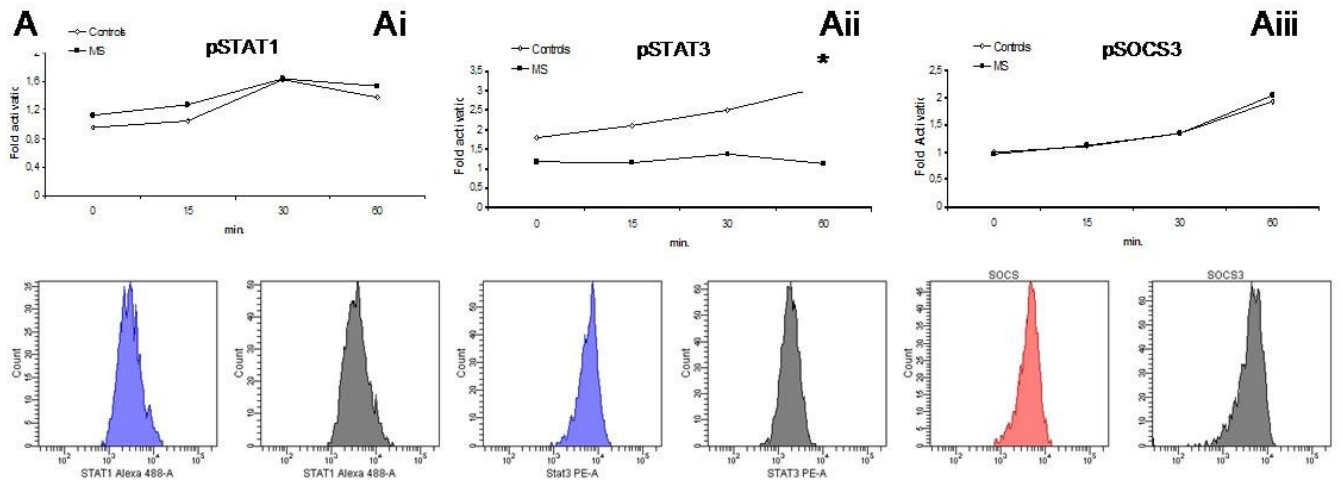


Figure 4



Dynamic cross-regulation of antigen-specific effector and regulatory T cell subpopulations and microglia in brain autoimmunity

Sara Martinez-Pasamar^{1*}, Elena Abad^{2,3*}, Beatriz Moreno¹, Nieves Velez de Mendizabal⁴, Ivan Martinez-Forero⁵, Jordi Garcia-Ojalvo^{2,3}, Pablo Villoslada¹⁺

¹Center of Neuroimmunology. Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer (IDIBAPS) - Hospital Clinic of Barcelona, Spain; ²Departament of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Spain; ³Department of Physics and Nuclear Engineering, Universitat Politecnica de Catalunya, Spain; ⁴School of Medicine and Indiana Clinical and Translational Sciences Institute, Indiana University, Indianapolis, IN, USA; ⁵Hospital Pablo Tobón Uribe, Colombia.

* both authors contributed equally as first authors

⁺**Corresponding author:** Pablo Villoslada. Department of Neurology. Hospital Clinic of Barcelona. Villarroel 170. 08036 Barcelona, Spain. pvilloslada@clinic.ub.es

Word count: Abstract: 258; Text: 4,936; References: 49; Tables: 1; Figures: 6

Key words: T cells, effector, regulatory, B cells, dynamics,
autoimmunity, multiple Sclerosis, systems biology,
immunotherapy, anti-CD20

Abstract

Multiple Sclerosis (MS) is considered a T-cell-mediated autoimmune disease with a prototypical oscillatory behavior, evidenced by the presence of clinical relapses. Understanding the dynamics of immune cells governing the course of MS would have implications for immunotherapy. Here, we analyzed by flow cytometry the time behavior of antigen-specific effector (T_{eff}) and regulatory (T_{reg}) T cells and microglia in mice suffering Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), and compared the observations with a mathematical cross-regulation model of T-cell dynamics in autoimmune disease. We found that T_{eff} and T_{reg} cells specific to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) developed coupled oscillatory dynamics with a 4- to 5-day period and decreasing amplitude that was always higher for the T_{eff} populations, in agreement with the mathematical model. Microglia activation followed the oscillations of MOG-specific T_{eff} cells in the secondary lymphoid organs, but they were activated before MOG-specific T cells peaks in the CNS. Finally, we assessed the role of B-cell depletion induced by anti-CD20 therapy in the dynamics of T cells in an EAE model with more severe disease after therapy. We observed that B-cell depletion decreases T_{eff} expansion, although its

oscillatory behavior persists. However, the effect of B cell depletion was more significant in the T_{reg} population within the CNS, which matched with activation of microglia and worsening of the disease. Mathematical modeling of anti-CD20 therapy indicates that B cell depletion influences T-cell dynamics by fine tuning T-cell activation. In summary, the oscillatory dynamics of T cells has an intrinsic origin in the physiological regulation of the adaptive immune response, which influences disease phenotype and response to immunotherapy.

Introduction

Relapsing-remitting (oscillatory) behavior is a hallmark of autoimmune diseases such as Multiple Sclerosis (MS) [8, 124]. At the clinical level, presence of relapses defines the subtypes of MS. The clinical relapse rate is about 0.5-1 per year, with around a month of duration and self-resolution. At the pathological level a relapse is the result of an acute inflammatory process within the central nervous system (CNS), which produces myelin and axonal damage and impairs neural conduction, leading to clinical symptoms. Acute inflammatory lesions are revealed by magnetic resonance imaging (MRI) as contrast-enhancing lesions (CEL). The number of clinically defined relapses represents only one in every 5-10 CEL, as has been shown by MRI studies [125], because many brain regions are silent and brain plasticity copes tissue damage. It is not known what triggers relapse onset, although one third of the relapses are preceded by common infections or stressful events [126, 127]. Understanding the biological basis of relapses in MS may have implications for immunotherapy.

In autoimmune diseases the balance between the pro-inflammatory response and regulatory factors seems to be disrupted. As such,

antigen specific effector T cells (T_{eff}) are over-activated, whereas the function of regulatory lymphocytes (T_{reg}) is altered [128-130], indicating impairment of peripheral tolerance. It could be expected that this impaired immune response would produce a chronic inflammatory process leading a progressive clinical course. However, in MS and other autoimmune diseases the predominant behavior is oscillatory, with periods of T-cell activation and tissue damage followed by deactivation and repair. Although this behavior could be partially accounted for by external triggers (e.g. viral infections, stress, changes in light exposure and vitamin D levels), its robustness among pathologies, resilience in front of immunotherapies and the lack of closely related triggers suggest that this may not be the only explanation. We have postulated that the oscillatory behavior of the autoimmune response is intrinsic to the design of the immune system, with several control mechanisms providing negative feedbacks that tightly control T-cell activation [131]. Mathematical models predict that cross-regulation of T_{eff} and T_{reg} cells generates a stable oscillatory dynamic of both populations that maintains homeostasis in health, but which also promotes relapsing-remitting flares under autoimmune conditions [131-133]. The generation of an autoimmune response seems to be based in the

presence of susceptibility factors such as genetic polymorphisms, levels of modulators of the immune response such as vitamin D, or previous infections that would change the thresholds of T-cell activation and differentiation, defining the autoimmune regime. However, the presence of environmental (e.g. vitamin D levels, acute infections or stress) or genetic (e.g. polymorphism specific for non-relapsing disease) factors have not been convincingly associated with this oscillatory behavior, supporting the concept that such oscillations are inherent to the organization of the adaptive immune system.

B-cell depletion has recently emerged as a powerful immunotherapy for treating autoimmune diseases such as Rheumatoid Arthritis (RA), Lupus or MS [134, 135]. Although originally conceived for targeting the role of antibodies in the pathogenesis of autoimmune diseases, the quick and profound response observed in clinical trials in patients with MS and RA suggest that instead of decreasing antibody production, B-cell depletion may work by modulating the pro-inflammatory environment created by B cells, the antigen presentation function they provide to T cells or the function of regulatory B cells [136, 137]. Moreover, anti-CD20 therapy

ameliorates the condition of the animal model of MS, Experimental Autoimmune Encephalitis (EAE)), preventing the pro-inflammatory environment (Th1/Th17 responses) promoted by B cells [138]. According to the timing of anti-CD20 therapy and the EAE model used, B cell depletion consequences on EAE fluctuate from prevention to disease exacerbation. As such, in an EAE model in which B cells do not play a pathogenic role, B-cell depletion decreases T_{reg} and regulatory B cells, worsening the disease course [138]. Understanding the effects of B-cell depletion in T-cell activation would improve our understanding of the mechanisms governing peripheral tolerance and their role in autoimmune diseases.

Here we validate at the experimental level the hypothesis that the relapsing-remitting behavior of autoimmune diseases is highly dependent on the cross-regulation of the lymphocyte populations, showing that this oscillatory behavior is intrinsic to the design of the immune system. We have analyzed the dynamics of Myelin Oligodendrocyte (MOG)-specific T_{eff} and T_{reg} cells in secondary lymphoid organs (spleen) and in the target tissue (CNS), as well as the activation of microglia, in the EAE model. Moreover, we used

our experimental and mathematical model to obtain insights into the role of anti-CD20 therapy in the regulation of T-cell dynamics and the generation of autoimmune response.

Methods

Animals and induction of EAE

EAE was induced in C57BL/6 (I-A^b) mice by injecting them with an emulsion containing 300 µg of MOG₃₅₋₅₅ peptide and 500 µg of *M. Tuberculosis* extract in incomplete Freund adjuvant subcutaneously into the flanks as described before [139]. Mice receive 0.2 ml of the emulsion in the flank. In addition, the mice receive 500 ng of *B. Pertussis* toxin intraperitoneal (i.p) in 200 µl PBS, on days 0 and 2. Clinical signs of EAE were assessed according to the following score: 0, no signs of disease; 0.5, partial loss of the tone in the tail; 1, loss of tone in the tail; 2, hind limb paresis; 3, hind limb paralysis; 4, tetraparesia; 5, tetraplegia; 6, moribund [140]. Moribund mice were given disease severity scores of 6 and euthanized. For each experiment, we made use of 3 animals per day (or every other day for repetitions) for 30 days, and the experiments were repeated twice. The study was approved by

the ethical committee on animal research of the University of Barcelona.

Tissue preparation and T-cell isolation

Splenocytes were obtained from the spleen by digesting it with collagenase D (Roche) and Dnase I (Roche) at 37° C for 45 min. Mononuclear cells were isolated by passing the tissue through a cell strainer (70 µm) followed by a Ficoll (Sigma) gradient centrifugation. T cells from the CNS were obtained by collecting the forebrain, cerebellum and spinal cord. CNS tissue was cut into small pieces and digested with collagenase D (Roche) and Dnase I (Roche) at 37° C for 45 min. Mononuclear cells were isolated by passing the tissue through a cell strainer (70 µm) to obtain single cell suspensions. Leukocytes were isolated from the CNS by gradient centrifugation. Briefly, a Percoll (Sigma) gradient (70/37 %) centrifugation was made and inter-phase between 70% and 37% phase was taken. Myelin in the upper layer was removed. Cells harvested from the gradient inter-phase and the upper-phase was washed in PBS and resuspended.

Tetramers purification and cell staining

MOG₃₅₋₅₅/IA^b tetramer construct was generously provided by Prof. Vijay Kuchroo, from Harvard University, and purified as previously described [37]. Tetramers were incubated with PBS, 0.2% BSA, 0.1% sodium azide for three hours at 37°C at darkness. After washing, cells were stained with 7-AAD, (BD Pharmingen) and antibodies against CD4 (BD Pharmingen), CD62L (BD Pharmingen), CD25 (BD Pharmingen), CD69 (BD Pharmingen), and CD45 (BD Pharmingen). For microglia activation, cells were stained with anti-MHC class II (IA^b) (Abcam), CD11b (BD Pharmingen) and CD45 (BD Pharmingen). B cell staining was performed using anti CD45R/B220 (BD Pharmingen) and anti-CD21 (BD Pharmingen) antibodies. Stained cells were analyzed on a FACSCanto machine (BD biosciences) and data analysis was performed with FACS Diva software.

Lymphocyte and microglia subpopulations analysis

Antigen specific T cells were characterized by being tetramer positive (IA^b-MOG⁺). MOG-specific T_{eff} cells were gated as the CD45⁺CD4⁺CD25⁻CD69⁺IA^b-MOG⁺ population [37, 141-143] (Fig. 1A). MOG-specific T_{reg} cells were gated as the

CD45⁺CD4⁺CD25^{hi}IA^b-MOG⁺ population [129, 144, 145] (Fig. 1B). We did not check Foxp3 expression on the T_{reg} population because it requires cellular permeabilization, which was not compatible with the tetramer staining. Nevertheless the subset analyzed corresponds to T_{reg} population as described before [37]. Also, we analyzed the expression of CD69 and CD62 since there is a subpopulation of T_{reg} cells that expressed CD69. Non-encephalitogenic T_{eff} lymphocytes were characterized by being CD45⁺CD4⁺CD25⁻IA^b-MOG⁻ (Fig. 1C). Non-encephalitogenic T_{reg} lymphocytes were characterized by being CD45⁺CD4⁺CD25^{hi}IA^b-MOG⁻ (Fig. 1D). CD69 and CD62 expression was also analyzed in non-encephalitogenic T cells. B cells were analyzed after staining with B220 and CD21 antibodies [146, 147]. Depletion of mature B cells (B220⁺CD21⁺) was examined in the spleen and CNS each day over the disease in the group of mice that received anti-CD20 treatment [138]. Activated microglia was defined as the CD45^{low}CD11B⁺MHC-II-IA^{b+} population (Fig. 1C) [148, 149]. MOG-specific T cells and non-encephalitogenic T cells (either T_{eff} or T_{reg}) are shown as percentages with respect to the CD4⁺ population (MOG-Teff/CD4⁺; MOG-Treg/CD4⁺; Teff/CD4⁺; Treg /CD4⁺) in order to adjust for differences in total cell count per day. B lymphocyte results are shown as percentages of total

lymphocytes (B Lymphocytes/Total Lymphocytes). Microglia activation is shown as the IA^b percentage of total microglia.

Anti-CD20 therapy

Mouse anti-CD20 monoclonal antibody was generously provided by Andrew Chan from Genentech. To deplete B lymphocytes in vivo, animals received anti-CD20 antibody 200 µg in 250 µl PBS one week before immunization as described before [138, 147].

Mathematical model, simulations and sensitivity analysis

We make use of a model of active T_{eff}-T_{reg} cross-regulation developed previously to describe the dynamics of T-cells in humans [131], updating here the model parameters to reproduce experimental data from mice EAE studies. Specifically, time scaling was performed in order to adapt the characteristic period of T-cell oscillations from the values observed experimentally, with respect to previous theoretical values for humans used in [131] (supplementary Table S1). In this new version of the model we also represent the pulse train input of naïve T cells from the thymus by means of a noise-driven excitable dynamics [150]. We simulated all

stochastic differential equations of the model by means of a stochastic Runge-Kutta method of second order (Heun method) using Matlab software.

We performed a sensitivity analysis of the model by increasing and decreasing the baseline parameters (Table S1) by 20% and 50%, and collecting the statistics of the average amplitude and period of activated T_{eff} and T_{reg} populations. This sensitivity analysis was performed by running simulations over a time of 300 days in model units, using the Matlab software. Simulations are initiated with no resting T_{eff} and T_{reg} cells, and 1,000 and 200 activated T_{eff} and T_{reg} cells, respectively, as described before [131].

Statistical analysis

All experiments were performed at least two times. The values are expressed as the means \pm SEM. We use the Mann-Whitney test to determine statistical significance between groups and Wilcoxon signed-rank test for differences in time series. Statistical analyses were performed using PASW 18.0 software (IBM).

Results

Antigen specific T cell subpopulations and microglia display coupled and interlinked oscillatory dynamics during brain autoimmune attack

In order to assess the presence of oscillation in T cell populations, their relationship and their behavior during the autoimmune response, we measured the frequency of both total and active MOG-specific T_{eff} and T_{reg} cell populations (compared with the non-specific T cells and the overall CD4⁺ cell population) using MOG-specific MHC class II tetramers during the course of EAE in the C57BL/6 mice immunized with MOG. T cells were measured in the spleen and CNS daily in series of animals (3 animals per day) immunized at same time. As predicted by the cross-regulation model of T cell dynamics [131-133], we observed that the activation of MOG-specific T_{eff} and T_{reg} cells in peripheral lymphoid organs follows an oscillatory behavior (spleen; Fig. 2A). During the 30 days after immunization, we observed a consistent average time between peaks (period of oscillation) around 4-5 days (Table 1), with a coordinated dynamics between the two T-cell populations. Also, the oscillation amplitude (maximum percentage of antigen-specific cells with respect to total CD4⁺ cells) of MOG-

specific T_{eff} cells was always significantly larger in average (between 2 and 6 fold) than the one for MOG-specific T_{reg} cells (Table 1). Additionally, the amplitude was always larger for the first two peaks, coinciding with the onset of clinical disease, and was attenuated along the course of the disease. We observed that both T cell populations were phase-locked, with differences between the time peaks being always smaller than 1 day, which indicates that the oscillations of T_{eff} and T_{reg} are tightly controlled by common mechanisms. In summary, after immunization, antigen-specific T_{eff} and T_{reg} populations display an oscillatory behavior. The robustness of the period observed also suggests the presence of a common regulatory mechanism, supporting the cross-regulation model.

We also measured the frequency of MOG-specific T_{eff} and T_{reg} cells in the CNS of animals suffering EAE from the time at which cells migrate to the brain (from day 9). Because activated T cells migrate to the target tissue after T-cell activation, we would predict a similar oscillatory behavior in the CNS by infiltrating T cells unless the blood-brain barrier (BBB) would be able to buffer these oscillations. Accordingly, we observed the presence of MOG-specific T_{eff} and T_{reg} cells in the CNS at various times again

showing a coupled oscillatory dynamics. Amplitudes of T cells incursions were around 3% and 4% of the total population of non-specific T cells for T_{eff} and T_{reg} , respectively (Fig. 2B, Table 1) and always significantly larger than the one observed in the spleen, indicating the accumulation of antigen-specific cell in the target tissue. This is in agreement with previous observations in the same animal model showing that T-cell invasion of the CNS starts 2-3 days after T-cell activation in the periphery (day 9-10 post-immunization) and extends along the course of the disease (Fig. 2C) [151].

Considering that microglia is activated in response to CNS damage or by immunological mediators, we predict a similar oscillatory behavior of activated microglia ($CD45^{\text{low}}CD11B^+MHC-IA^b$) population following CNS invasion by MOG-T cells. As such, we observed the presence of oscillations in microglia activation after EAE induction (Fig. 2D). Activated microglia shows two peaks of activation with a period of 8 days and a maximum amplitude of 60% (Table 1). Microglia remains activated for 6 days in both activation events, indicating an intrinsic activation period for microglia as well (Fig. 2D). However, microglia activation started

at day 10, preceding the appearance of MOG-specific T cells within the CNS, and exhibits a first maximum at day 14, one day before the following peak of MOG- T_{eff} . At same time, the maximum of clinical relapse was registered on day 13 to 14. Clinical score ameliorates from day 14 to day 21 (Fig. 2C), coinciding with the microglia deactivation to baseline levels. The second microglia activation peak spans from days 20 to 26, again preceding the following peak of activated MOG- T_{eff} cells in the CNS (Fig. 2B). Overall, our data indicates activation of microglia preceding or concomitant to the invasion of CNS by MOG specific T cells. In order to quantify the dependence of microglia activation on CNS infiltration by MOG-specific T cells, we plotted the distribution of phases within a microglia cycle for which a MOG-specific T-cell incursion is observed in the CNS, observing again that peaks of microglia activation precedes MOG-specific T cell infiltration of the CNS (Fig. 3). Together, these findings indicate that microglia activation also oscillates during brain autoimmunity, following MOG-specific T-cell activation in the periphery but preceding the incursion of those cells into the CNS. This result suggests the need of additional signals for microglia activation preceding antigen-

specific T cell infiltration of the CNS and/or a role of microglia for the recruitment of MOG-specific T cell within the CNS.

Mathematical modeling identifies T_{reg} activation as a major element governing autoimmune susceptibility

In order to interpret the experimental data described above, we make use of a cross-regulation model of T cell activation previously described (Fig. 4A) [131] after adapting it to reproduce mice data (Table S1). We identified two key parameters of the cross-regulation model that clearer accounted for the difference between the healthy and EAE behavior by characterizing amplitude and period averages. Specifically, the rate of T_{reg} activation (α_{reg}) and the number of T_{eff} cells required for half-maximal activation of T_{reg} cells (K_{eff}), were found to be critical for reproducing the autoimmune behavior in the data. In particular, considering the same value for the rate of antigen presentation in both sub-populations (δ), we observed an autoimmune behavior after a decrease of α_{reg} (down to 1.05 /day (range: 0.75 to 1.05)) and an increase of K_{eff} (up to 2,500 cells) (Fig. 4 B, C). Thus our results support the concept that autoimmunity requires a decrease in the strength of the T_{eff} - T_{reg} cross-regulation, by increasing the T_{eff}

threshold for activating T_{reg} and decreasing the number of activated T_{reg} .

Simulations revealed, in agreement with experimental data, coordinated oscillations between both active populations of T_{eff} and T_{reg} cells with a period of 4-5 days and decreasing amplitudes for T_{eff} at least 4 times larger in average than T_{reg} , and around 2 times larger than T_{eff} in the healthy regime (Fig 4, Table 1), which are in agreement with our experimental observations. Also, in order to compare model simulations with experimental data statistics, we tested the average distribution of standard deviations against the means of the oscillation amplitudes for three simulations (1 point per day) for 30 days. Means of relative deviations measured in the experimental data was 0.62 ± 0.01 for T_{eff} cells and 0.40 ± 0.02 for T_{reg} cells, while in model simulations it was 0.61 ± 0.01 for T_{eff} and 0.30 ± 0.01 for T_{reg} cells. These results fit qualitatively with the experimental observations in the EAE dataset.

The model proposes a prey-predator system in which T_{eff} and T_{reg} play the active-subsets of prey and predator populations, respectively. We performed a phase-space representation of the

mathematical model trajectories in the plane for $T_{\text{eff}}-T_{\text{reg}}$ after fitting to experimental EAE data (Fig. 4D), which shows that the healthy-state dynamics are controlled by T_{reg} (x-axis), while the autoimmune-state dynamics is mainly governed by T_{eff} (y-axis). In summary, the combination of experimental data with theoretical modeling supports the importance of cross-regulation of T-cell populations in the control of the immune response, and points to T_{reg} as a critical population in order to understand dynamics of autoimmune diseases.

B cell depletion modulates T cell subpopulation dynamics differentially, influencing the outcome of EAE

Recently, it has been shown that B-cell depletion by anti-CD20 antibodies has a strong effect in suppressing the relapsing-remitting course of autoimmune diseases such as Rheumatoid Arthritis and MS [134, 135], modulating the frequency of T-cell subpopulations [136]. In order to analyze the influence of B cells in T cell dynamics we analyzed the frequency of antigen-specific T_{eff} and T_{reg} subpopulations in mice during the course of EAE after B-cell depletion. We made use of C57BL/6 mice immunized with MOG peptide, since in this model B cells are not encephalitogenic per se,

but collaborate in T cell activation [138]. In this model, changes in T cells will be secondary to the helper effect of B cells in T-cell activation, and not to the shutdown of the antigen-specific pro-inflammatory B-cell response, which is present in the model immunized with recombinant MOG. As expected, we observed that anti-CD20 therapy induced a rapid, almost complete depletion of B cells in the peripheral lymphoid organs (supplementary Fig. S1). Regarding the dynamics of T cells, we observed that after B-cell depletion, MOG-specific T_{eff} and T_{reg} subpopulations maintained their oscillatory presence in secondary lymphoid organs, although in this case the large activation peaks of T_{eff} that appeared in non-treated animals suffering EAE were significantly decreased in amplitude but appeared at earlier times (Fig. 5A). However and similarly to untreated animals suffering EAE, the peaks of T_{eff} and T_{reg} were phase-locked. Interestingly, in the CNS T_{eff} and T_{reg} incursions were present as well, but with a significant decrease in the amplitude of T_{reg} cells compared to T_{eff} cells (Fig. 5B, Table 1). Surprisingly, even if the frequency of both MOG-T cell subpopulations were decreased, microglia was activated to a similar extent than in untreated animals with EAE (~60% in the first peak

with a maximum at day 16), followed by oscillations without a clear period or phase, and do not falling to baseline levels (Fig. 5D), suggesting a transition to chronic activation and contributing to the worsening of the disease. At the same time, the maximum clinical score was delayed compared to untreated animals with EAE (day 17 compared to day 12, Fig. 5C) and disease was more severe, as previously described in this model. The presence of an imbalance into the CNS in the peaks of antigen-specific T_{eff} compared to T_{reg} and the persistence of microglia activation may account for the impairment of EAE in this model despite anti-CD20 therapy. Therefore, our results indicate that B-cell depletion modulates T cell activation in peripheral immune organs with more profound effects in T_{reg} . Down regulation of T_{reg} was mainly revealed in the CNS tissue, and was associated with persistent microglia activation. However, the fact that the oscillatory dynamics of MOG-specific T cells remains, suggests that B-cell depletion works by tuning T-cell activation thresholds but without reverting the autoimmune process itself.

Sensitivity analysis of the cross-regulation model support the critical role of B-cell depletion on T_{reg} activity

In order to analyze the influence of B-cell depletion on the dynamics of T-cell subpopulations, we performed a sensitivity analysis of our mathematical cross-regulation model with the aim of identifying the model parameters governing the dynamics induced by this therapy in T cells. Although our model does not include B cells, by fitting the model with the experimental data, we were able to analyze the resulting dynamics of both T cell populations after anti-CD20 therapy and obtain insights into a possible mechanism for explaining how B cells influence T cell dynamics. We found that the dynamics of the antigen-specific T cell subpopulation after anti-CD20 therapy was reproduced by reducing the K_{eff} threshold below the healthy standard (<1,000 cells; e.g. 850 cells), independently of the α_{reg} parameter (α_{reg} values were in the low range of autoimmune regime; Fig. 6). In other words, our mathematical model suggests that B-cell therapy may influence the autoimmune process by preventing uncontrolled activation of T_{eff} without strengthening T_{reg} activation. Experimental trajectories through the phase-space were dominated by the T_{eff} cells (y-axis, Fig. 6C) in EAE (in blue) and in therapy (in red). However, in the anti-CD20 treated group, it is not observed the high excursions characteristic of EAE. This behavior can be easier compared by

performing simulations for 30 days, which highlights the fact that B cell depletion although suppressed the T_{eff} excursions, did not recover the T_{reg} excursions observed in the healthy status (Fig. 6D). In summary, our simulations suggest that B-cell depletion modulate autoimmune diseases mainly by affecting the interaction between T_{reg} and T_{eff} , and in particular strengthening the $T_{\text{eff}}-T_{\text{reg}}$ cross-regulation by lowering levels of T_{reg} activation rate.

Discussion

In this study we have assessed the dynamics of antigen-specific T cell subpopulations after immunization and related them to the outcome of brain autoimmunity. We observed that, after immunization, antigen-specific effector and regulatory T cells are activated and oscillate in a coupled manner with an intrinsic period. The combination of experimental and computational analysis supports the concept that relapses in autoimmune diseases are an intrinsic property of the regulation of the immune system, that can be modulated by environmental factors [131]. The fact that oscillations of both populations were matched day-to-day (phase-locked), indicates the importance of synchronous activation of

effector and regulatory adaptive immune response for the outcome of the immune response [152]. Previous models of T cell activation suggest that regulatory T cell activation follows effector T activation with some delay [153-155]. However, the fact that our experimental data shows that regulatory T and effector T cells become activated the same day after immunization points the importance of triggering the regulatory T cell response at the same time and in parallel than the effector response. After activation, the negative feedback between both populations would maintain their oscillation for long period of time, although removal of the antigens and other suppressive factors will cancel the oscillations in the long term. The analysis of the T cell cross-regulation model after fitting with the experimental data supports a key role of regulatory T cell dynamics in defining the outcome of the autoimmune response [155, 156].

During the course of EAE, activated CD4⁺ and CD8⁺ cells enter the brain, which is associated with microglia activation that mediates demyelination and axonal loss [151]. In the EAE model, regulatory T cells have a critical role in controlling the activation of

encephalitogenic T cells, but their mechanism of action is complex. Regulatory T cells are dependent on the local (CNS) conditions that regulate their activation and suppressive activity [157, 158]. However, the functional outcome seems to be dependent on balancing the suppression of the effector T-cell activation and proliferation with the survival and activity of encephalitogenic T cells, promoting their accumulation and distorting the regulatory and effector T cell balance [159].

Another interesting observation from our results is that the activation of the innate immune system, namely microglia activation, follows the oscillatory dynamics of the adaptive immune response with a well-defined phase. Interestingly, we observed that microglia becomes activated closely after activation of T cells in the periphery, but before the infiltration of antigen-specific T cells into the CNS. This results points towards a model in which the autoimmune response organized in secondary lymphoid organs or in the circumventricular organs of the brain delivers signals (probably soluble factors) to the brain parenchyma, activating microglia. Time series analysis of gene expression changes along the course of EAE

have shown activation of genes related with the innate immune response before the presence of inflammatory infiltrates, supporting the role of microglia activation from the early stages of the disease and even preceding antigen-specific T cell invasion of the CNS [160]. Recent pathological studies in the brain of patients with MS as well EAE models suggest that activated effector T cells accumulate in subarachnoid space where they can be restimulated, releasing pro-inflammatory signals that activates microglia and contributes to the opening of the BBB and subsequent infiltration by T cells of CNS parenchyma [161-163].

Amplitudes of MOG-T cell activation peaks were clearly larger in the early stages of the disease following immunization and then decreased. This could be explained by several factors. After immunization, the availability of antigen to be presented to T cells by antigen presenting cells is significantly larger compared with concentration of the antigen in consecutive restimulations within the CNS. Also, immunization exerts a synchronization effect that makes it easier to detect the activation of T cells right after the animal is immunized, in comparison with later times at which

individual clones become increasingly desynchronized, which complicates the detection of T cell expansion. Other factor involved may be the effect of epitope spreading, which involves the recruitment of other antigen specificities that were not measured here. Also, anti-inflammatory signals from the tissue, such as IL-10 would contribute to shutdown the immune response and therefore the peaks of activated T cells.

B cells seem to have a complex role in brain autoimmunity. B cells may contribute to the pathogenesis of the disease, in addition to its role as antibody producing cells, through the production of a pro-inflammatory environment such as IL-6, helping as antigen presenting cells, activating pro-inflammatory Th1 and Th17 cells, monocytes or inhibiting T cell activation by regulatory B (B10) cells [136, 138, 147, 164-166]. The role of B cell depletion in the activation of antigen specific T cells responses in EAE is complex because it does not impair directly regulatory T cell function, but alters the balance between effector and regulatory function [167, 168], which is in agreement with our findings. Our results indicates that in a model in which anti-CD20 therapy induce a more severe

disease, even if B cell depletion decreases the activation of both effector and regulatory T cells, the disease outcome is dependent, at least in part, on the balance of these two populations. As such, in our study the activation of MOG-specific T cells happens earlier and faster in anti-CD20 treated animals than in non-depleted animals. This is agreement with the view that effector B cells modulate antigen presentation to T cells and regulatory B cells modulates T cell expansion [169]. We observed in the CNS of B cell depleted animals a more significant effect on regulatory than effector response and a subsequent enhancement of microglia activation, which correlates with more severe CNS tissue damage.

Our results have several implications for immunotherapy. First, immunomodulatory therapies, such as anti-CD20 therapy, do not revert the pathogenic response in autoimmune diseases, but maintain them in a dynamic state that is less deleterious. For this reason, cessation of the therapy would allow to the immune system to come back to its original autoimmune dynamics and in some cases, depending on the genetic background and changes in environmental factors, even worsening the disease due to a rebound

effect. This is now well noticed in the case of stopping natalizumab therapy, in which a significant proportion of patients (up to one third) develop a rebound relapse few months after the last infusion. Second, although regulatory T cells are an ideal target for immunotherapy, in order to enhance its function in the case of autoimmunity (or decrease it for cancer immunotherapy), the outcome of the disease will be dependent on the dynamics of all populations implicated and the timing in which the therapy is started. For this reason, the ideal therapy at this level would involve fine-tuning the long-term dynamics of antigen-specific T cells close to the healthy state.

Our study has several limitations. First, we have quantified antigen-specific T cells using MHC class II tetramers by flow cytometry, which has a resolution for identifying the target cells of 1 every 10^4 cells in the tissue from a standard acquisition of $2-5 \times 10^5$ leukocytes [170]. Moreover, because we attempted to quantify MOG specific T cells within the context of the natural repertoire of a rodent, instead of using transgenic animals with single TCR specific for MOG (which may have simplified the identification of

MOG specific T cells), quantification was done in different animals and individual dynamics were extrapolated from the population analysis. For this reason, we analyzed results as proportions to the reference CD4⁺ cell population instead using absolute numbers. While the presence of noise created by technical limitations might have prevented us from observing more cycles due to desynchronization of the T-cell activation between animals, the oscillations reported here were robust enough to be captured with this technique. Also, we focused in the immune response specific to the single antigen used for immunization (MOG), but did not assess the role of epitope spreading in the dynamics of autoimmune T cells nor in the dynamics of other lymphocyte subpopulations (e.g. CD8⁺ cells) with other specificities, which may have a role in the outcome of the autoimmune response. Finally, anti-CD20 produces profound but not complete B cell depletion, and it is not targeting MOG-specific B cells. For this reason, residual B cells may have played a role in the worsening of EAE. Alternatively, anti-CD20 therapy may preferentially target some B-cell subpopulations such as IL-10- or IL-6-producing B cells, or cells at different stage of differentiation that may have a specific effect on T cell dynamics. However, the results from our study support previous models of the

regulation of T cell populations and their role in the immune response.

In summary, our study supports the importance of the cross-regulation between lymphocyte populations and their contribution to the outcome of the immune response. Moreover, it contributes to highlight the role of regulatory T cells in driving the dynamics of the immune response. Even if these cells are a smaller population compared with naive and effector cells, its critical role in the regulation of immune response makes them central in the pathogenesis of autoimmune diseases, and thus attractive targets for immunotherapy against these diseases, even in an indirect way such is the case of anti-CD20 therapy.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Spanish network of excellence in MS of the Instituto de Salud Carlos III, Spain to PV and JGO, by an unrestricted grant from Roche to PV and a grant of the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain, project FIS2009-

13360) and by the ICREA Academia program to JGO. We would like to thank Ali Taubes for the review of the article.

References

1. Hauser, S. L., and J. R. Oksenberg. 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 52:61-76.
2. Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 23:683-747.
3. Vollmer, T. 2007. The natural history of relapses in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 256 Suppl 1:S5-13.
4. Buljevac, D., H. Z. Flach, W. C. Hop, D. Hijdra, J. D. Laman, H. F. Savelkoul, F. G. Der Meche, P. A. van Doorn, and R. Q. Hintzen. 2002. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 125:952-960.
5. Buljevac, D., W. C. Hop, W. Reedeker, A. C. Janssens, F. G. van der Meche, P. A. van Doorn, and R. Q. Hintzen. 2003. Self reported stressful life events and exacerbations in multiple sclerosis: prospective study. *BMJ* 327:646.

6. Martin, R., H. F. McFarland, and D. E. McFarlin. 1992. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu.Rev.Immunol.* 10:153-87:153-187.
7. Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H. L. Weiner, and D. A. Hafler. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 199:971-979.
8. Martinez-Forero, I., R. Garcia-Munoz, S. Martinez-Pasamar, S. Inoges, A. Lopez-Diaz de Cerio, R. Palacios, J. Sepulcre, B. Moreno, Z. Gonzalez, B. Fernandez-Diez, I. Melero, M. Bendandi, and P. Villoslada. 2008. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 38:576-586.
9. Velez de Mendizabal, N., J. Carneiro, R. V. Sole, J. Goni, J. Bragard, I. Martinez-Forero, S. Martinez-Pasamar, J. Sepulcre, J. Torrealdea, F. Bagnato, J. Garcia-Ojalvo, and P. Villoslada. 2011. Modeling the effector - regulatory T cell cross-regulation reveals the intrinsic character of relapses in Multiple Sclerosis. *BMC Syst Biol* 5:114.
10. Leon, K., R. Perez, A. Lage, and J. Carneiro. 2001. Three-cell interactions in T cell-mediated suppression? A

mathematical analysis of its quantitative implications. *J Immunol* 166:5356-5365.

11. Carneiro, J., K. Leon, I. Caramalho, C. van den Dool, R. Gardner, V. Oliveira, M. L. Bergman, N. Sepulveda, T. Paixao, J. Faro, and J. Demengeot. 2007. When three is not a crowd: a Crossregulation Model of the dynamics and repertoire selection of regulatory CD4(+) T cells. *Immunol Rev* 216:48-68.
12. Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C. H. Smith, and H. T. Group. 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358:676-688.
13. Kappos, L., D. Li, P. A. Calabresi, P. O'Connor, A. Bar-Or, F. Barkhof, M. Yin, D. Leppert, R. Glanzman, J. Tinbergen, and S. L. Hauser. 2011. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*.
14. Bar-Or, A., L. Fawaz, B. Fan, P. J. Darlington, A. Rieger, C. Ghorayeb, P. A. Calabresi, E. Waubant, S. L. Hauser, J. Zhang, and C. H. Smith. 2010. Abnormal B-cell cytokine

responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol* 67:452-461.

15. Disanto, G., J. M. Morahan, M. H. Barnett, G. Giovannoni, and S. V. Ramagopalan. 2012. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 78:823-832.
16. Weber, M. S., T. Prod'homme, J. C. Patarroyo, N. Molnarfi, T. Karnezis, K. Lehmann-Horn, D. M. Danilenko, J. Eastham-Anderson, A. J. Slavin, C. Linington, C. C. Bernard, F. Martin, and S. S. Zamvil. 2010. B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol* 68:369-383.
17. Palacios, R., J. Goni, I. Martinez-Forero, J. Iranzo, J. Sepulcre, I. Melero, and P. Villoslada. 2007. A network analysis of the human T-cell activation gene network identifies JAGGED1 as a therapeutic target for autoimmune diseases. *PLoS ONE* 2:e1222.
18. Moreno, B., H. Hevia, M. Santamaria, J. Sepulcre, J. Munoz, E. R. Garcia-Trevijano, C. Berasain, F. J. Corrales, M. A. Avila, and P. Villoslada. 2006. Methylthioadenosine reverses brain autoimmune disease. *Ann Neurol* 60:323-334.

19. Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T. R. Petersen, B. T. Bröckström, R. A. Sobel, K. W. Wucherpfennig, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine* 13:423.
20. Amend, B., H. Doster, C. Lange, E. Dubois, H. Kalbacher, A. Melms, and F. Bischof. 2006. Induction of autoimmunity by expansion of autoreactive CD4⁺CD62L^{low} cells in vivo. *J Immunol* 177:4384-4390.
21. Elyaman, W., P. Kivisakk, J. Reddy, T. Chitnis, K. Raddassi, J. Imitola, E. Bradshaw, V. K. Kuchroo, H. Yagita, M. H. Sayegh, and S. J. Khoury. 2008. Distinct functions of autoreactive memory and effector CD4⁺ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 173:411-422.
22. Bischof, F., M. Hofmann, T. N. Schumacher, F. A. Vyth-Dreese, R. Weissert, H. Schild, A. M. Kruisbeek, and A. Melms. 2004. Analysis of autoreactive CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis after primary

and secondary challenge using MHC class II tetramers. *J Immunol* 172:2878-2884.

23. Kohm, A. P., P. A. Carpentier, H. A. Anger, and S. D. Miller. 2002. Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 169:4712-4716.
24. Vukmanovic-Stejic, M., Y. Zhang, J. E. Cook, J. M. Fletcher, A. McQuaid, J. E. Masters, M. H. Rustin, L. S. Taams, P. C. Beverley, D. C. Macallan, and A. N. Akbar. 2006. Human CD4⁺ CD25^{hi} Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest* 116:2423-2433.
25. Yanaba, K., Y. Hamaguchi, G. M. Venturi, D. A. Steeber, E. W. St Clair, and T. F. Tedder. 2007. B cell depletion delays collagen-induced arthritis in mice: arthritis induction requires synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* 179:1369-1380.
26. Matsushita, T., K. Yanaba, J. D. Bouaziz, M. Fujimoto, and T. F. Tedder. 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation

in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest* 118:3420-3430.

27. Ponomarev, E. D., L. P. Shriver, K. Maresz, and B. N. Dittel. 2005. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res* 81:374-389.
28. Mack, C. L., C. L. Vanderlugt-Castaneda, K. L. Neville, and S. D. Miller. 2003. Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144:68-79.
29. Rue, P., and J. Garcia-Ojalvo. 2011. Gene circuit designs for noisy excitable dynamics. *Math Biosci* 231:90-97.
30. Soulika, A. M., E. Lee, E. McCauley, L. Miers, P. Bannerman, and D. Pleasure. 2009. Initiation and progression of axonopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 29:14965-14979.
31. Almeida, A. R., B. Zaragoza, and A. A. Freitas. 2006. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells

is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol* 177:192-200.

32. Fouchet, D., and R. Regoes. 2008. A population dynamics analysis of the interaction between adaptive regulatory T cells and antigen presenting cells. *PloS ONE* 3:e2306.
33. Sakaguchi, S., K. Wing, and T. Yamaguchi. 2009. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *Eur J Immunol* 39:2331-2336.
34. Sakaguchi, S., M. Miyara, C. M. Costantino, and D. A. Hafler. 2010. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10:490-500.
35. Long, S. A., and J. H. Buckner. 2011. CD4⁺FOXP3⁺ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol* 187:2061-2066.
36. Korn, T., A. C. Anderson, E. Bettelli, and M. Oukka. 2007. The dynamics of effector T cells and Foxp3⁺ regulatory T cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 191:51-60.
37. Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T. R. Petersen, B. T. Backstrom, R. A. Sobel, K. W. Wucherpfennig, T. B. Strom, M. Oukka, and V. K. Kuchroo.

2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* 13:423-431.
38. Liu, X., R. Alli, M. Steeves, P. Nguyen, P. Vogel, and T. L. Geiger. 2012. The T cell response to IL-10 alters cellular dynamics and paradoxically promotes central nervous system autoimmunity. *J Immunol* 189:669-678.
39. Baranzini, S. E., C. C. Bernard, and J. R. Oksenberg. 2005. Modular transcriptional activity characterizes the initiation and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.* 174:7412-7422.
40. Ransohoff, R. M., and M. A. Brown. 2012. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest* 122:1164-1171.
41. Lucchinetti, C. F., B. F. Popescu, R. F. Bunyan, N. M. Moll, S. F. Roemer, H. Lassmann, W. Bruck, J. E. Parisi, B. W. Scheithauer, C. Giannini, S. D. Weigand, J. Mandrekar, and R. M. Ransohoff. 2011. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365:2188-2197.
42. Sallusto, F., D. Impellizzieri, C. Basso, A. Laroni, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, and B. Engelhardt. 2012. T-cell

trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev* 248:216-227.

43. Ray, A., M. K. Mann, S. Basu, and B. N. Dittel. 2011. A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 230:1-9.
44. Lehmann-Horn, K., E. Schleich, D. Hertenberg, A. Hapfelmeier, T. Kumpfel, N. von Bubnoff, R. Hohlfeld, A. Berthele, B. Hemmer, and M. S. Weber. 2011. Anti-CD20 B-cell depletion enhances monocyte reactivity in neuroimmunological disorders. *J Neuroinflammation* 8:146.
45. Barr, T. A., P. Shen, S. Brown, V. Lampropoulou, T. Roch, S. Lawrie, B. Fan, R. A. O'Connor, S. M. Anderton, A. Bar-Or, S. Fillatreau, and D. Gray. 2012. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 209:1001-1010.
46. Hoehlig, K., P. Shen, V. Lampropoulou, T. Roch, B. Malissen, R. O'Connor, S. Ries, E. Hilgenberg, S. M. Anderton, and S. Fillatreau. 2012. Activation of CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells proceeds normally in the

absence of B cells during EAE. *Eur J Immunol* 42:1164-1173.

47. von Budingen, H. C., A. Bar-Or, and S. S. Zamvil. 2011. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr Opin Immunol* 23:713-720.
48. Lund, F. E., and T. D. Randall. 2010. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat Rev Immunol* 10:236-247.
49. Craig, F. E., and K. A. Foon. 2008. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111:3941-3967.

Tables

Table 1. Period and amplitude of the oscillation of MOG-specific T cells and microglia in EAE. Period and amplitude of the peaks of active MOG-T_{eff}, MOG-T_{reg} and activated microglia in secondary lymphoid organs (spleen) and the CNS in animals developing EAE (as described in figure 2), in model simulations (as described in figure 4) and animals with EAE and treated with anti-CD20 therapy (as described in figure 6). Amplitudes of MOG-specific T cells or activated are shown as percentages with respect to the CD4⁺ population or microglia population; amplitudes in model simulations are expressed as relative percentage to the amplitudes in the healthy state of the model. Data is shown as the mean ± SEM.

			Period (days)	Amplitude (%)
EAE	Spleen	MOG-T _{eff}	5 ± 0.7	0.8 ± 0.2
		MOG-T _{reg}	4.3 ± 0.9	0.14 ± 0.02
	CNS	MOG-T _{eff}	4 ± 1	3.3 ± 0.9
		MOG-T _{reg}	2.3 ± 0.9	4.0 ± 0.9
		Microglia (activated)	8	60 ± 7
Model simulations EAE	Spleen	MOG-T _{eff}	5.2 ± 0.2	--
		MOG-T _{reg}	4.9 ± 0.2	--
EAE anti-CD20 therapy	Spleen	MOG-T _{eff}	6.7 ± 0.7	0.3 ± 0.1
		MOG-T _{reg}	6.7 ± 2.7	0.06 ± 0.02
	CNS	MOG-T _{eff}	3.0 ± 0.4	2.4 ± 1.4
		MOG-T _{reg}	3.3 ± 0.7	0.5 ± 0.2
		Microglia (activated)	--	57 ± 9
Model simulations EAE anti-CD20 therapy	Spleen	MOG-T _{eff}	6.5 ± 0.5	--
		MOG-T _{reg}	5.5 ± 0.4	--

Supplementary Table S1. Parameters of the model and initial conditions

Initial Conditions	Symbol	Values (Mice)	Values (Human)
Resting Teff cell population size	E_r	$E_{n0} = 0$ cells	$E_{n0} = 0$ cells
Resting Treg cell population size	R_r	$R_{n0} = 0$ cells	$R_{n0} = 0$ cells
Activated Teff cell population size	E	$E_{a0} = 1,000$ cells	$E_{a0} = 1,000$ cells
Activated Treg cell population size	R	$R_{a0} = 200$ cells	$R_{a0} = 200$ cells

Parameter description	Symbol	Values	Values
Antigen Presentation	δ	3 day^{-1}	1 day^{-1}
Anergy	β	0.03 day^{-1}	0.01 day^{-1}
Memory	η	0.03 day^{-1}	0.01 day^{-1}
Maximum Teff proliferation rate	α_{eff}	$[3:6] \text{ day}^{-1}$	$[1:3] \text{ day}^{-1}$
Maximum Treg proliferation and activation rate	α_{reg}	$[0.75:6] \text{ day}^{-1}$	$[0.25:2] \text{ day}^{-1}$
Teff death, anergy and migration Rate	γ_{eff}	0.6 day^{-1}	0.2 day^{-1}
Treg death, anergy and migration Rate	γ_{eff}	0.6 day^{-1}	0.2 day^{-1}
Teff cell population sizes leading to half maximal effect counterpart	K_{eff}	1,000 cells	1,000 cells
Treg cell population sizes leading to half maximal effect	K_{reg}	200 cells	200 cells
Hill coefficient	h	5	5

Figure legends

Figure 1. MOG-specific T cells and microglia subpopulations analyzed by flow cytometry in mice with EAE. Leukocytes were obtained from the spleen and the CNS from MOG₃₅₋₅₅ immunized C57BL/6 mice at different stages of EAE as indicated. A) T_{eff} and T_{reg} lymphocytes are shown. Numbers indicate the percentage of cells within the CD4⁺ cell gate. The histogram on the right shows the expression of CD69 on the surface of T_{eff} and T_{reg} cell subsets in the spleen. Numbers indicate the percentage of CD69⁺ cells. B) CD4⁺ cells stained with MOG₃₅₋₅₅/IA^b tetramer. MOG-specific T_{eff} and T_{reg} cells are shown. C) Dot-plots showing CD45⁺CD11b⁺MCH-II(IA^b)⁺ microglia population. D) Antigen-specific T_{eff} and T_{reg} oscillate over the course of EAE. Numbers indicate the percentage within the CD4⁺ cell gate. MOG-specific T cells from spleen (a, b) and CNS (c, d) in the onset, peak and recovery stages of EAE are shown. Animals were not treated (a, c) or treated with anti-CD20 antibody before immunization (b, d).

Figure 2. Dynamics of activated MOG-T_{eff}, MOG-Treg cells and microglia in secondary lymphoid organs and CNS during the course of EAE. A) Percentage of MOG-specific T_{eff} (red) or T_{reg} (blue) in the spleen after immunization. The upper graph shows the

mean of the measurements from 3 animals each day for both populations (T_{eff} and T_{reg}) together. The bottom panels show the distribution of all measurements (raw data) from 3 animals per day for each subpopulation as dots, with the mean in black; B) percentage of MOG-specific T_{eff} (red) or T_{reg} (blue) in the CNS from day 9 after immunization. The upper graph shows the mean of the measurements from 3 animals each day, while the bottom panels show the distribution of all measurements for each subpopulation as dots, with the mean in black; C) Clinical score of animals suffering EAE after immunization (mean + SD); D) Percentage of activated microglia in the CNS from day 9 after immunization.

Figure 3. Analysis of the time dependence between microglia activation and MOG-specific T cell infiltration of the CNS.

Distribution of the phase of the microglia cycle at which incursion of MOG-specific T cells into the CNS reaches a peak.

Figure 4. Simulations from the cross-regulation T cell model.

A) Graphical representation and the equations of the T cell cross-regulation model as described in [131]. Parameters of the model are described in supplementary Figure 1. Simulation of the time course of the number of MOG-specific T_{eff} (red) or T_{reg} (blue) cells in the spleen (y-axis) after immunization (x-axis, in days) by the cross-

regulation model in ‘healthy’ (B) and in ‘EAE’ configuration regimes (C). Simulations were discretized by days to express it similarly to experimental data; D) Phase-space plot shows $T_{\text{eff}}/T_{\text{reg}}$ trajectories in simulations (300 days) for both configurations (‘healthy’ in black and ‘EAE’ in red).

Figure 5. Dynamics of activated MOG- T_{eff} , MOG- T_{reg} cells and microglia in secondary lymphoid organs and CNS during the course of EAE after B cell depletion. A) Percentage of MOG-specific T_{eff} (red) or T_{reg} (blue) cells in the spleen after immunization. The upper graph shows the mean of measurements from 3 animals each day, and the bottom panels show the distribution of all measurements for each subpopulation as dots, with the mean in black; B) percentage of MOG-specific T_{eff} (red) or T_{reg} (blue) cells in the CNS from day 9 after immunization. The upper graph shows the mean of measurements from 3 animals each day, and the bottom panels show the distribution of all measurements for each subpopulation as dots, with the mean in black; C) clinical score of animals suffering EAE after B cell depletion (mean + SD); D) percentage of activated microglia in the CNS from day 9 after immunization.

Figure 6. Modeling the effect of anti-CD20 mediate B-cell depletion in the cross-regulation T-cell model. A) Simulation of the time course of the number of MOG -specific T_{eff} (red) or T_{reg} (blue) cells in the spleen (y-axis) after immunization (x-axis, in days) by the cross-regulation model using values for α_{reg} and K_{eff} from the ‘EAE’ regime (see Results section). B) Phase-space plots showing $T_{\text{eff}}/T_{\text{reg}}$ cell counts trajectories in simulations of 300 (B) and 30 (C) days for ‘healthy’ (black), EAE (blue) and B-cell depletion (red) simulations. A 30 days simulation (D) was performed in order to compare with experimental data. Simulations were discretized by days to express it similarly to experimental data.

Supplementary Figure S1. B cell counts after anti-CD20 therapy. Percentage of B cells in the spleen (L-B spleen) and the CNS (L-B CNS) from two immunized animal per day are plotted along the duration of the experiment (30 days).

Figure 1

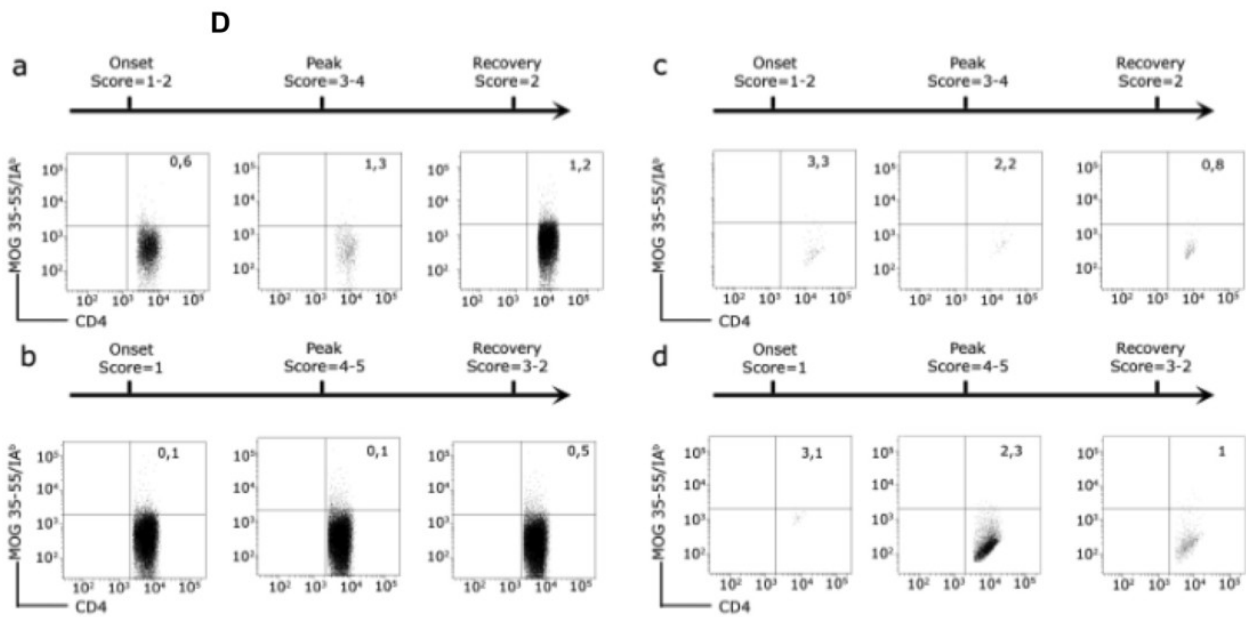
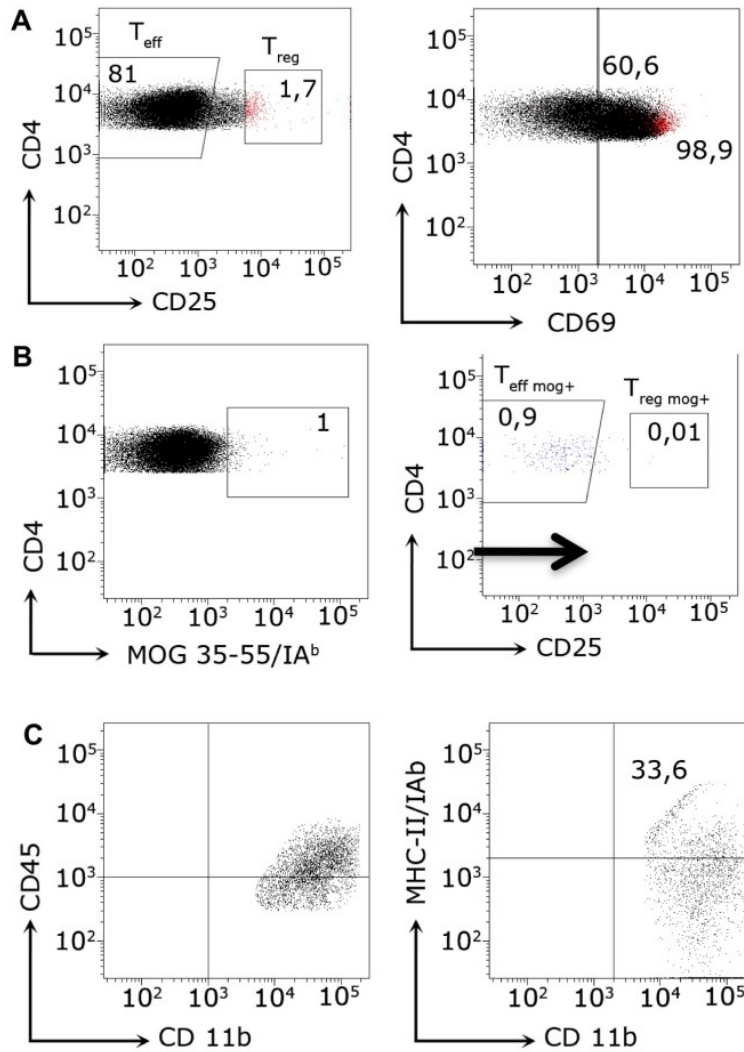


Figure 2

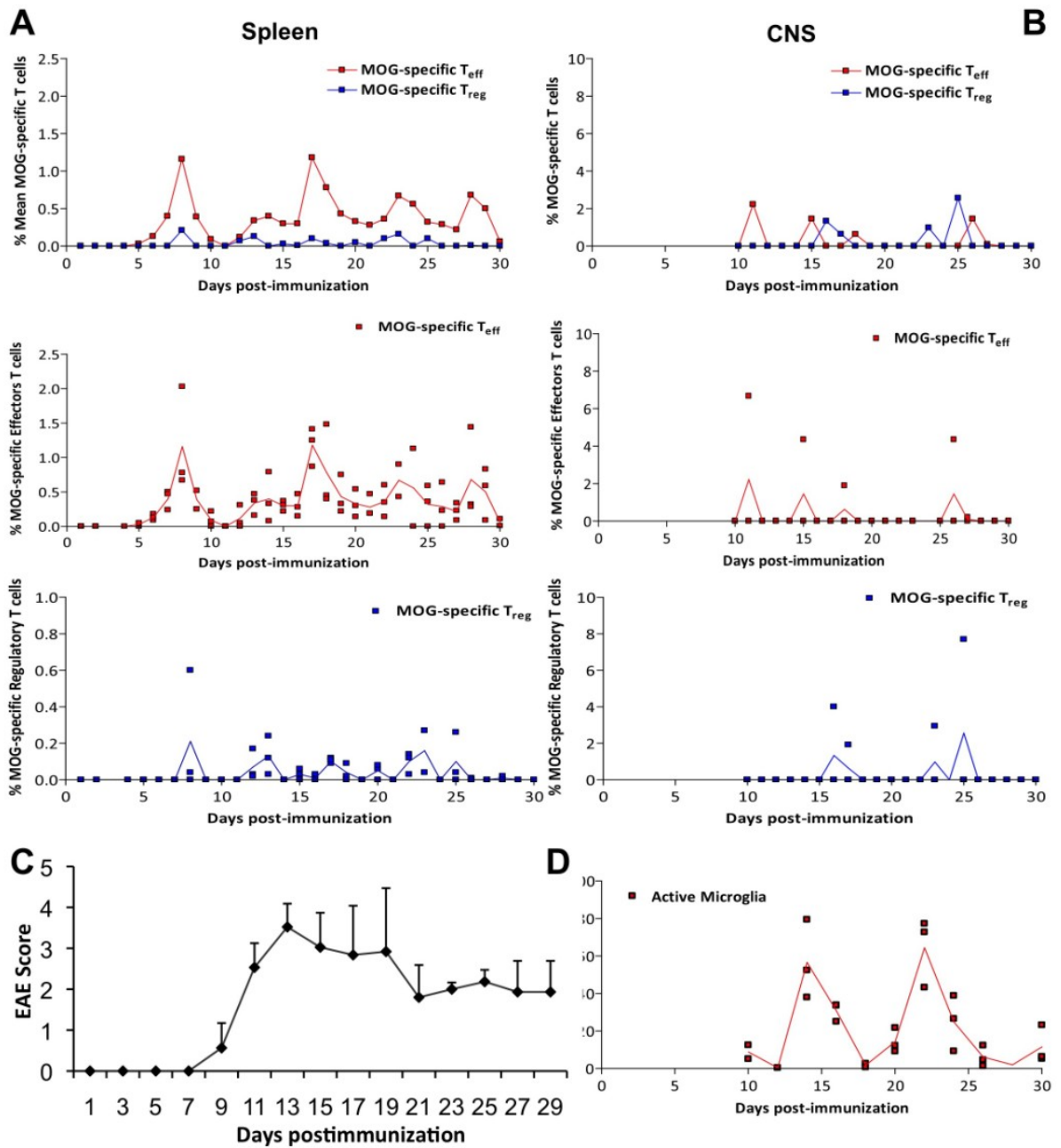


Figure 3

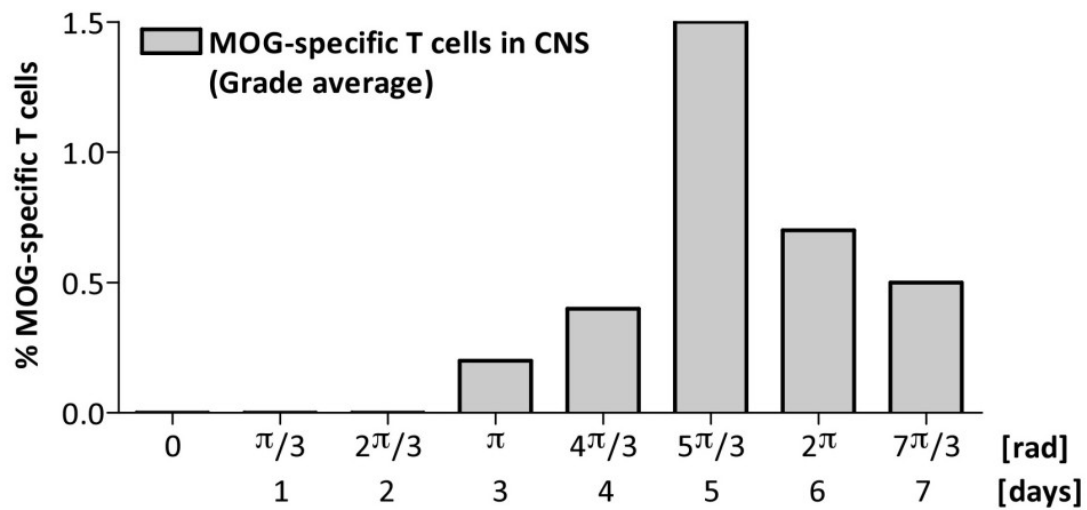


Figure 4

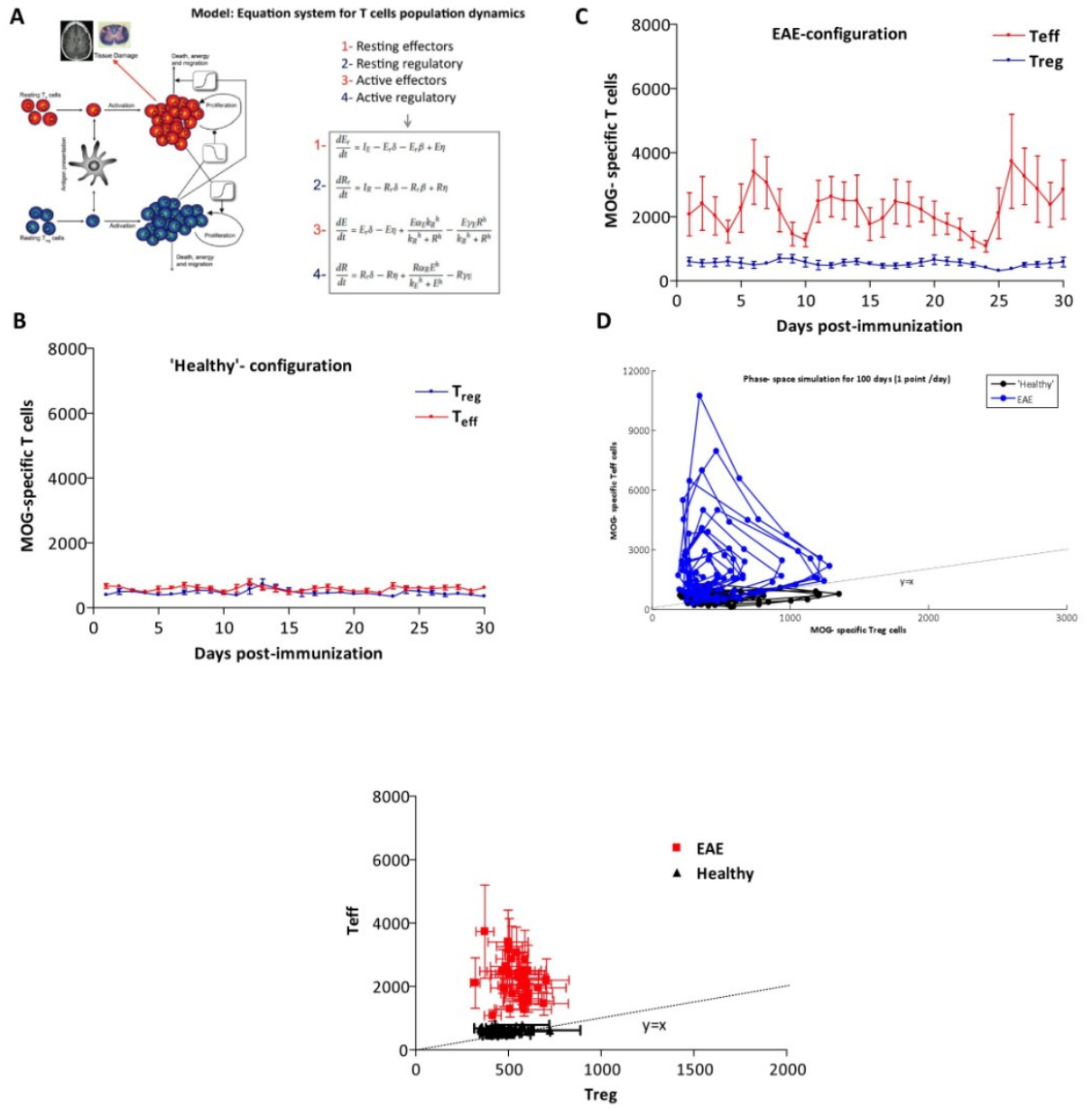


Figure 5

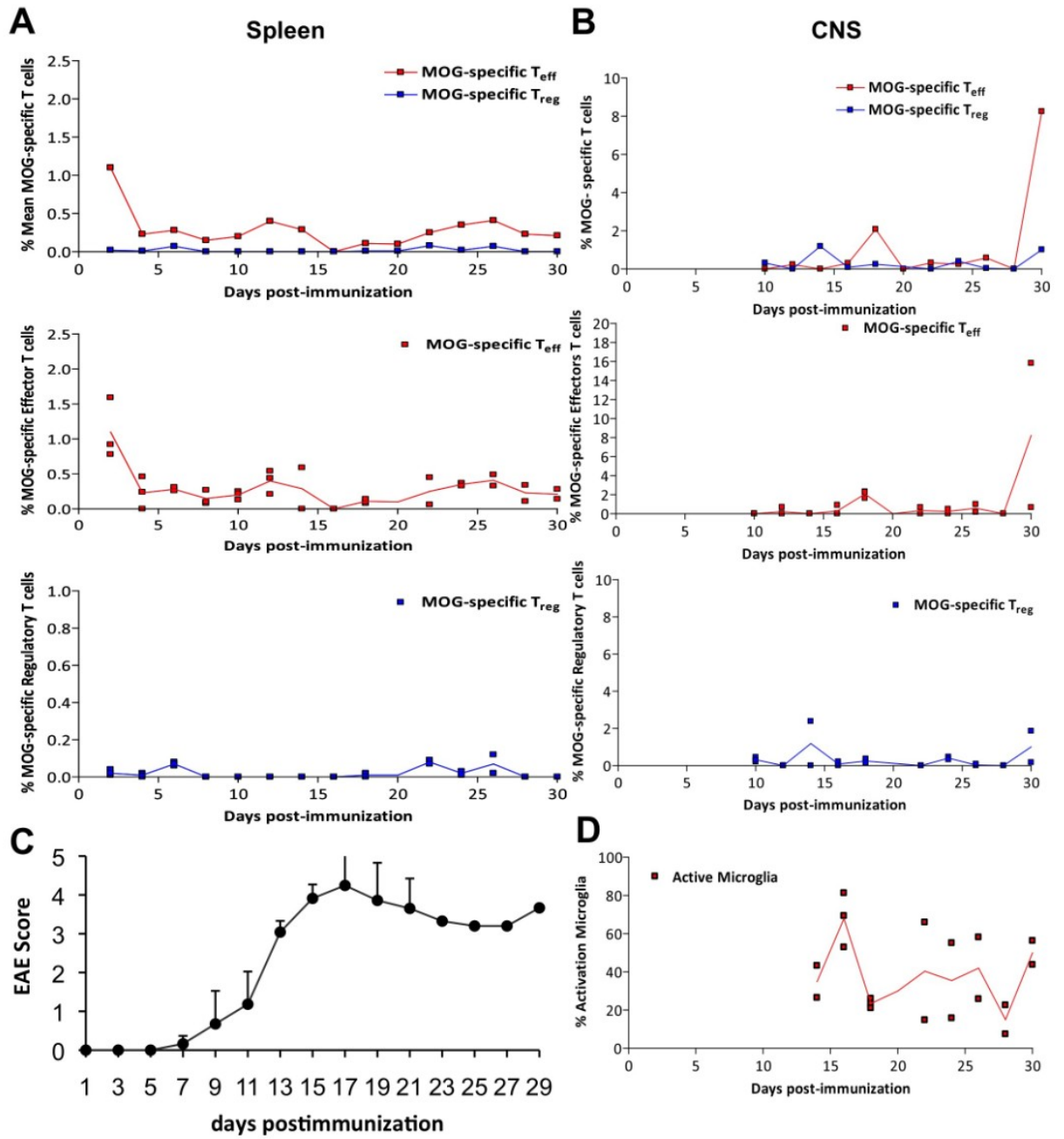
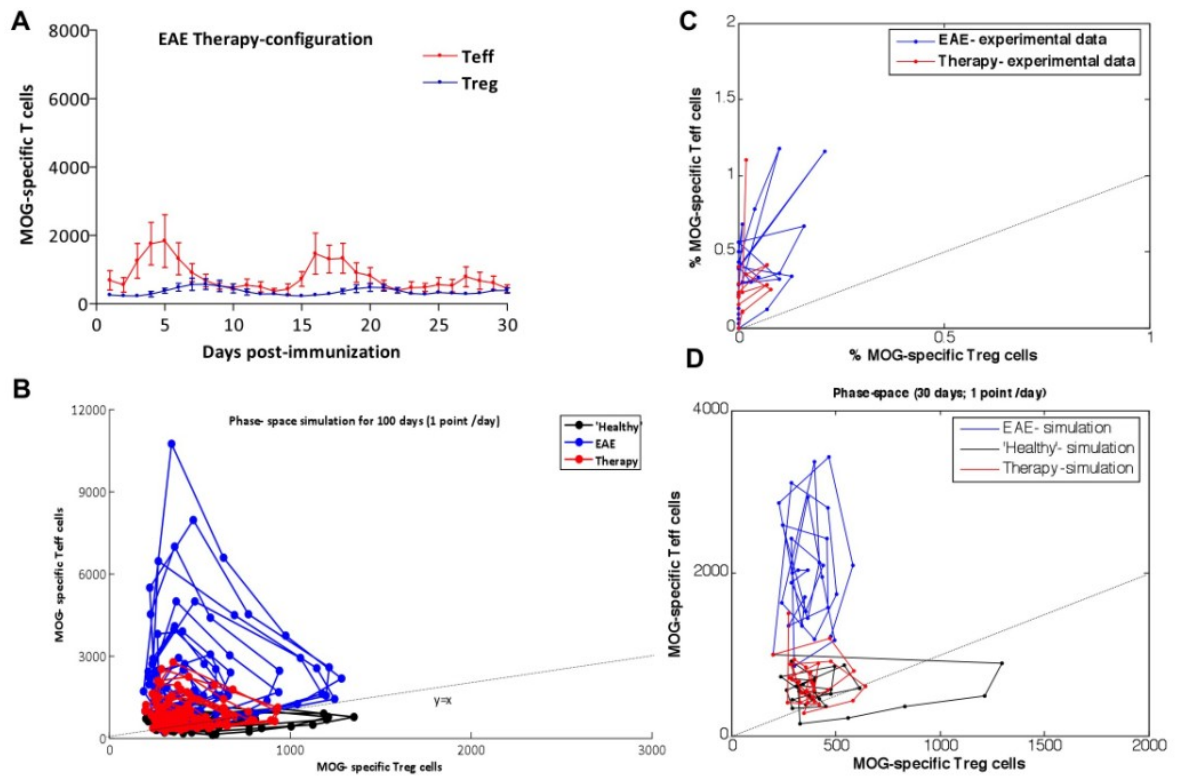


Figure 6



Supplementary Figure S1.

