



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Modelo Booleano de la red de regulación que
controla la diferenciación de los linfocitos B**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA

Akram Sharim Méndez Rangel

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra

Instituto de Investigaciones Biomédicas

COMITÉ TUTOR

Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Gabriel Del Río Guerra

Instituto de Fisiología Celular

MÉXICO, D.F., 2014

It is through science that we prove,
but through intuition that we discover.

J.H. Poincaré

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra a quien agradezco la confianza, paciencia y apoyo desde el inicio. Gracias por compartir su visión, entusiasmo y dedicación conmigo.

Durante el desarrollo de este proyecto se contó con la Beca de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (No. de registro 384318).

Asimismo, agradezco a la Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo y al Dr. Gabriel del Río Guerra, miembros de mi comité tutor, por sus valiosas aportaciones realizadas durante cada examen tutorial para el desarrollo de este trabajo y por compartir su experiencia conmigo.

También agradezco a los miembros de mi laboratorio, Carlos Ramírez, Fernando Andrade y Nathan Weinstein así como a nuestros compañeros Alfredo Rodríguez, Osiris Ríos, Mónica García y Mariana Martínez por las discusiones en las que compartimos nuestras ideas, técnicas y experiencia para el desarrollo de nuestros proyectos.

Agradezco a la Dra. Rosana Pelayo, Dr. Héctor Mayani, Dr. Enrique Ortega y al Dr. Osbaldo Resendis por su dedicación y tiempo para la revisión de este trabajo así como las aportaciones tan valiosas para el mejoramiento del mismo.

Contenido

Agradecimientos	ii
Resumen	viii
Abstract	x
1. Introducción	1
1.1 Sistema Inmunológico	1
1.1.1 Inmunidad Innata	1
1.1.2 Inmunidad Adaptativa	2
1.2 Linfocitos	2
1.2.1 Linfocitos T	4
1.2.2 Linfocitos B	6
1.2.2.1 Diferenciación terminal de los linfocitos B	10
1.2.2.2 Factores que promueven la especificación de los tipos progeni- tores Naive y GC.	13
1.2.2.3 Factores que promueven la diferenciación terminal hacia los tipos celulares Mem y PC.	16
1.3 Redes	17
1.3.1 Modelos Booleanos	21
1.3.2 Dinámica de los modelos Booleanos	23
1.4 Modelado de la diferenciación de linfocitos B utilizando modelos Booleanos	25
2. HIPÓTESIS	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos particulares	28
4. METODOLOGÍA	29
4.1 Inferencia de la red	29

4.2 Bases moleculares de la red	38
4.3 La red de regulación de los linfocitos B como un sistema dinámico Booleano	42
4.4 Comportamiento del modelo Booleano	46
4.5 Análisis de mutantes	47
4.6 Respuesta a señales externas	47
4.7 Análisis de perturbaciones	49
5. RESULTADOS	50
5.1 Los atractores obtenidos por el modelo Booleano recuperan los patrones de expresión reportados en la literatura para el tipo silvestre	50
5.2 Análisis de mutantes	52
5.2.1 Mutantes de expresión constitutiva.	54
5.2.2 Mutantes de expresión nula	57
5.3 Respuesta a señales extracelulares	61
5.3.1 Estimulación de células Naive	62
5.3.2 Estimulación de células GC	65
5.3.3 Estimulación de células Mem	66
5.3.4 Estimulación de células PC	69
5.4 Análisis de perturbaciones	71
6. DISCUSIÓN	74
7. CONCLUSIONES	80
7.1 Perspectivas	81
8. REFERENCIAS	82

Lista de figuras

Figura 1. Respuesta inmune.	3
Figura 2. Esquema simplificado de la Hematopoyesis.	5
Figura 3. Diferenciación terminal de los linfocitos T	7
Figura 4. Desarrollo de los linfocitos B.	8
Figura 5. Diferenciación terminal de los linfocitos B	12
Figura 6. Patrones de expresión característicos de los linfocitos B. . .	14
Figura 7. Operadores Lógicos.	23
Figura 8. Comportamiento dinámico de las redes.	25
Figura 9. Red de regulación de los linfocitos B.	38
Figura 10. Modelo mínimo de la red de regulación.	43
Figura 11. Inferencia de las reglas lógicas.	45
Figura 12. Atractores silvestres obtenidos a partir del modelo mínimo. .	51
Figura 13. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de PAX5.	54
Figura 14. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de BCL6.	55
Figura 15. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de BLIMP1.	55
Figura 16. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de IRF4.	56
Figura 17. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de BACH2.	57
Figura 18. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de PAX5.	58
Figura 19. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de BCL6	59
Figura 20. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de BLIMP1.	60

Figura 21. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de IRF4.	60
Figura 22. Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de BACH2.	61
Figura 23 Estimulación de células Naive por la presencia de la citocina IL-2.	62
Figura 24. Estimulación de células Naive por la presencia de la citocina IL-4.	63
Figura 25. Estimulación de células Naive mediada por la activación del BCR.	63
Figura 26. Estimulación de células Naive por IL-21.	64
Figura 27. Estimulación de células Naive por CD40.	64
Figura 28. Diferenciación de las células GC por la activación de BCR.	65
Figura 29. Estimulación de células GC con IL-21.	65
Figura 30. Estimulación de células GC por la señal de CD40.	66
Figura 31. Estimulación de células GC por IL-2.	66
Figura 32. Estimulación de células GC por IL-4.	67
Figura 33. Estimulación de células Mem por la activación de BCR.	67
Figura 34. Estimulación de células Mem por la activación de IL-21.	68
Figura 35. Estimulación de células Mem por la activación de IL-2.	68
Figura 36. Estimulación de células Mem por la activación de IL4.	68
Figura 37. Estimulación de células Mem por la activación de CD40.	69
Figura 38. Estimulación de células PC por la activación del BCR.	70
Figura 39. Estimulación de células PC por la activación de CD40.	70
Figura 40. Estimulación de células PC por IL-21	70
Figura 41. Estimulación de células PC por IL-2.	70
Figura 42. Estimulación de células PC por IL-4.	70
Figura 43. Mapa de destinos celulares.	73

Lista de tablas

Tabla 1. Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B.	30
Tabla 2. Reglas lógicas para el modelo mínimo.	44
Tabla 3. Reglas lógicas para el modelo completo.	49
Tabla 4. Proporción de estados asociados con un atractor.	51
Tabla 5. Comportamiento de la red para todas las mutantes simuladas.	53

Resumen

La respuesta humoral del sistema inmune en vertebrados depende de la rápida maduración y diferenciación de los linfocitos B para dar lugar a la formación de células productoras de anticuerpos y células de memoria capaces de detectar con absoluta especificidad a una gran variedad de moléculas ajenas al organismo y a su vez, reaccionar con rapidez y eficacia ante posteriores encuentros con estos agentes.

La diferenciación de los linfocitos B se lleva a cabo de manera controlada por la acción concertada de factores de transcripción y diversas moléculas de señalización que interaccionan entre si formando una red de regulación. Existe suficiente información disponible referente a las moléculas que participan en este proceso así como de su respuesta a múltiples señales extracelulares, sin embargo, no existe un consenso acerca de la arquitectura de esta red de regulación y poco se sabe de su comportamiento dinámico y la manera en que esta red controla las decisiones del destino celular de los linfocitos B.

En este trabajo se se infirió la arquitectura de la red de regulación que controla la diferenciación de los linfocitos B a partir del tipo precursor de las células B maduras (Naive), hacia los destinos celulares de los centros germinales (GC), células plasmáticas (PC) y células de memoria (Mem). Esta red se modeló como un sistema dinámico Booleano, el cual incorpora la estructura de la red de regulación inferida así como a las reglas lógicas de regulación que determinan la activación de cada uno de los elementos moleculares que conforman a la red. Este modelo recupera cuatro estados estacionarios de punto fijo, los cuales corresponden a los patrones de expresión genética observados experimentalmente para los siguientes tipos de linfocitos B: Naive, GC, Mem y PC.

También se estudió el efecto de la delección o la activación constitutiva para cada uno de los nodos de la red para simular todas las mutantes de ganancia o pérdida de función de la red y se observó que los estados estables de activación obtenidos

concuerdan con los efectos reportados en la literatura para las diversas mutantes de los linfocitos B, lo que corrobora el papel central que tienen los factores PAX5, BCL6, BACH2, IRF4 y BLIMP1 como reguladores maestros en la diferenciación de los linfocitos B. Además, se estudió el efecto de señales extracelulares específicas sobre el comportamiento de la red y se observó el papel de estas señales en la especificación y el mantenimiento del destino celular. Se propone que mientras que la red de regulación es importante para la determinación de los destinos celulares Naive, GC, Mem y PC, es necesaria también la presencia de señales extracelulares específicas para asegurar que la diferenciación se lleve a cabo de manera específica y robusta.

Finalmente, se propusieron cuatro interacciones entre los factores transcripcionales que integran a esta red de regulación que podrían servir como predicciones del modelo.

Se espera que el presente modelo sirva como punto de partida para el estudio de la red de regulación que controla la diferenciación de los linfocitos B y contribuya a nuestro entendimiento acerca de este proceso de diferenciación en particular y sobre la manera en que la desregulación de las moléculas que subyacen a esta red puede dar lugar al desarrollo de diversas enfermedades inmunes.

Abstract

The humoral immune response in vertebrates depends on the rapid maturation and differentiation of B cells to give rise to the formation of antibody-producing cells and memory cells able to detect with absolute specificity a variety of foreign molecules and to react quickly and effectively to subsequent encounters with these agents.

Differentiation of B cells is conducted in a controlled manner by the concerted action of several transcription factors and signaling molecules that interact with each other forming a regulatory network. There is a wealth of information regarding the molecules involved in this process and its response to multiple extracellular signals, however, there is no general agreement on the architecture of this regulatory network and little is known about their dynamic behaviour and how this network controls cell fate decisions of B lymphocytes.

In this work, the architecture of the regulatory network that controls the differentiation of B cells from precursor type mature B cells (Naive) towards cell fates germinal center (GC), plasma cells (PC) and memory cells (Mem), was inferred from publicly available information. This network was modeled as a Boolean dynamic system, which incorporates the structure of the network as well as the inferred regulatory logical rules that determine the activation states for each of the molecular elements that conforms the network.

This model recovers four fixed point stationary states, which corresponds to the gene expression patterns observed experimentally for the following types of B lymphocytes: Naive, GC, and PC Mem. Also, we studied the effect of the deletion or constitutive activation for each node of the network by simulating all possible gain- and loss-of-function mutants. We found that the obtained stable states match with the expression patterns reported in the literature for the various mutants of B lymphocytes, which confirms the central role of the factors PAX5, BCL6, BACH2, IRF4 and BLIMP1 as master regulators in the terminal differentiation of B lympho-

cytes.

Furthermore, we studied the effect of specific extracellular signals on network dynamics and observed the role these signals for the specification and maintenance of cell fate. We propose that while the regulatory network is important in determining cell fates: Naive, GC, Mem and PC, the presence of specific extracellular signals is necessary to ensure that the differentiation is carried out in a specific and robust way. Finally, four interactions between the transcription factors involved in this regulatory network were proposed and could serve as predictions of the model.

It is expected that this model serves as a starting point for the study of the regulatory network that controls the differentiation of B lymphocytes and contributes to our understanding of this differentiation process, and particularly the manner in which deregulation of molecules that underlie this network may lead to the development of various immune diseases.

1. Introducción

1.1 Sistema Inmunológico

Los organismos multicelulares se encuentran constantemente expuestos a una gran variedad de agentes potencialmente dañinos, tales como virus, bacterias, hongos, toxinas, entre otros, por lo que para defender al organismo, existen diversos mecanismos celulares y moleculares encargados del reconocimiento y la eliminación de estos agentes. Es necesario detectar con absoluta especificidad a los agentes extraños y efectuar una respuesta adecuada que permita su neutralización y eliminación de manera regulada para evitar el daño a las células propias del organismo. Una vez que se lleva a cabo una respuesta, el sistema inmune debe ser capaz de contender ante posteriores encuentros con el mismo patógeno de manera rápida y eficiente, fenómeno conocido como memoria. El sistema inmune consta de dos tipos principales de respuesta: la respuesta innata y la respuesta adaptativa, ambas se distinguen por su especificidad y tiempo de acción.

1.1.1 Inmunidad Innata

La inmunidad innata se refiere a los mecanismos básicos de defensa del organismo que conforman una respuesta inmediata e inespecífica. Estos mecanismos están presentes de manera previa al encuentro con cualquier agente y responden básicamente de la misma forma cada vez que se repite una infección. Los mecanismos básicos que componen a la respuesta inmune innata consisten en barreras anatómicas, como los tejidos epiteliales y mucosas, que impiden la entrada de agentes extraños al organismo, barreras fisiológicas, como cambios de temperatura, pH y la producción de algunos factores antimicrobianos que a su vez generan condiciones adversas para organismos ajenos o patógenos (Janeway & Medzhitov, 2002).

En la respuesta innata participan diversos tipos de células especializadas, como macrófagos y neutrófilos, que se encargan de internalizar y degradar macromoléculas y microorganismos por medio de fagocitosis y endocitosis. Estos procesos primarios

de reconocimiento promueven la acción por parte de las células involucradas en la respuesta adaptativa para eliminar de manera selectiva a microorganismos y moléculas ajenas al organismo (Dranoff, 2004), (Figura 1).

1.1.2 Inmunidad Adaptativa

A diferencia de la respuesta inmune innata, la respuesta adaptativa se distingue por su especificidad, diversidad y memoria. La respuesta adaptativa le permite al sistema inmune detectar diferencias sutiles entre múltiples antígenos, moléculas que desencadenan una respuesta inmune, a tal grado que se pueden distinguir dos proteínas que difieran sólo en uno de sus aminoácidos y por otra parte, discriminar lo propio de lo ajeno evitando el ataque a los tejidos del organismo (Bonilla & Oettgen, 2010).

El reconocimiento de diversos antígenos promueve la coordinación entre distintos tipos de células para lograr la eliminación de los patógenos así como la formación de células de memoria capaces de responder de manera más rápida ante subsecuentes retos inmunológicos (McHeyzer-Williams et al., 2006). Tanto la respuesta innata como la adaptativa funcionan de manera coordinada. La respuesta inmune adaptativa se lleva a cabo por dos grupos principales de células: Células presentadoras de antígeno (APCs), involucradas también en la respuesta innata, y linfocitos. A su vez, los linfocitos se dividen en linfocitos T y linfocitos B (Medzhitov, 2007).

1.2 Linfocitos

Los linfocitos son los principales efectores de la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T promueven y coordinan diferentes tipos de respuesta mediadas por las células del sistema inmune, mientras que los linfocitos B están encargados de la respuesta humoral por medio de la generación, producción y secreción de anticuerpos útiles para la neutralización y eliminación de los patógenos (Bonilla & Oettgen 2010).

Los linfocitos se generan en la médula ósea a partir de las células troncales hematopoyéticas (HSC), cuya diferenciación progresiva da lugar a dos linajes celulares

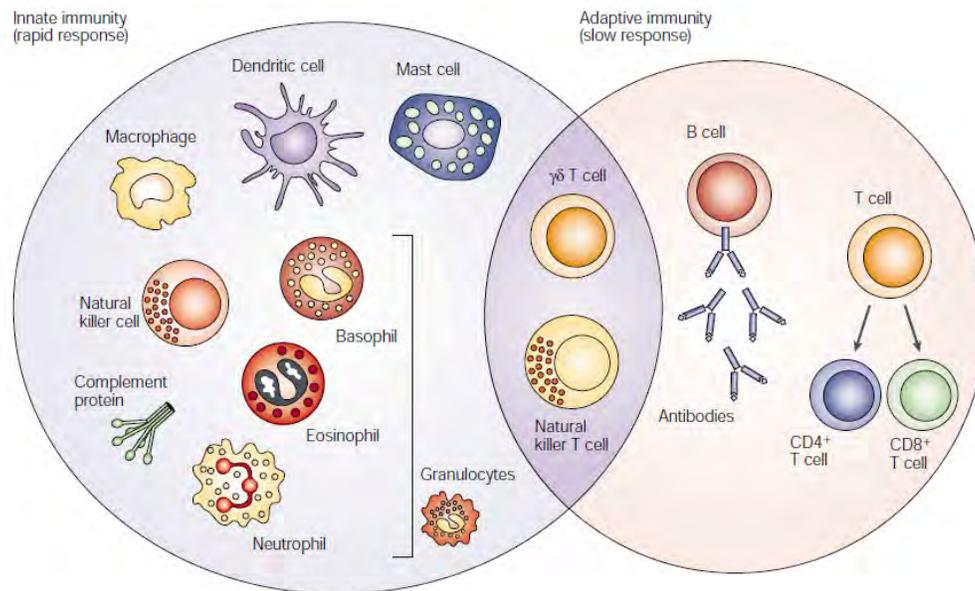


Figura 1: Respuesta inmune.

El sistema inmunológico lleva a cabo dos tipos de respuesta, innata y adaptativa, cada una se distingue por su especificidad, tiempo de acción y la participación de distintos grupos de células especializadas (Dranoff, 2004).

principales, el linaje mieloide y el linaje linfoide. El linaje mieloide comprende a los granulocitos, macrófagos, células cebadas y células dendríticas, que son los principales efectores de la respuesta inmune innata, además de megacariocitos y eritrocitos (Fisher, 2002; Orkin & Zon, 2008), (Figura 2).

Por otra parte, las células del linaje linfoide se originan a partir de un progenitor linfoide común (CLP) cuyo desarrollo y diferenciación da lugar a la formación de los linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos son los efectores de la respuesta inmune adaptativa (Bryder & Sigvardsson, 2010).

Ante una posible infección, un patógeno es reconocido en primer lugar por las APCs mediadoras de la respuesta innata. Estas células se encargan de la internali-

zación y degradación de los patógenos para posteriormente migrar hacia los órganos linfáticos secundarios donde las APCs procesan y exhiben en su superficie fragmentos de las moléculas extrañas ingeridas, o antígenos, en conjunción con las moléculas del sistema de complemento, como las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), lo que facilita el reconocimiento por parte de los linfocitos T y B (Medzhitov, 2007).

Cada linfocito posee un solo tipo de receptor capaz de reconocer un antígeno de manera específica. El receptor de las células T o TCR, reconoce antígenos unidos a la membrana de las APCs, mientras que el receptor de las células B (BCR) se une principalmente con antígenos presentes de manera soluble (Pierce & Liu, 2010). La unión de un antígeno con los receptores de los linfocitos promueve su activación y proliferación. Una vez activados, los linfocitos T y B maduran y son seleccionados para su posterior diferenciación hacia dos tipos de células: efectoras y de memoria (Kalia et al., 2006).

1.2.1 Linfocitos T

Las células precursoras de los linfocitos T migran de la médula ósea hacia el timo donde se lleva a cabo su maduración. Cada célula T expresa en su superficie una versión única de TCR, que es capaz de reconocer antígenos asociados a las proteínas de membrana MHC I de las APCs. Las células T que interactúan con un antígeno en conjunción con las moléculas MHC son seleccionadas de manera positiva, únicamente aquellas que posean un TCR apropiado y que no reaccionen ante moléculas propias del organismo, proliferan y se diferencian a células T de memoria o hacia uno de los tipos de células T efectoras.

Existen dos poblaciones de linfocitos T: células T citotóxicas (Tc) y cooperadoras (Th). Cada población realiza funciones específicas y se distingue por la expresión de factores transcripcionales, la presencia de los marcadores de superficie CD4 y CD8 y la producción de citocinas específicas. Las células T CD8+ dan lugar a la formación

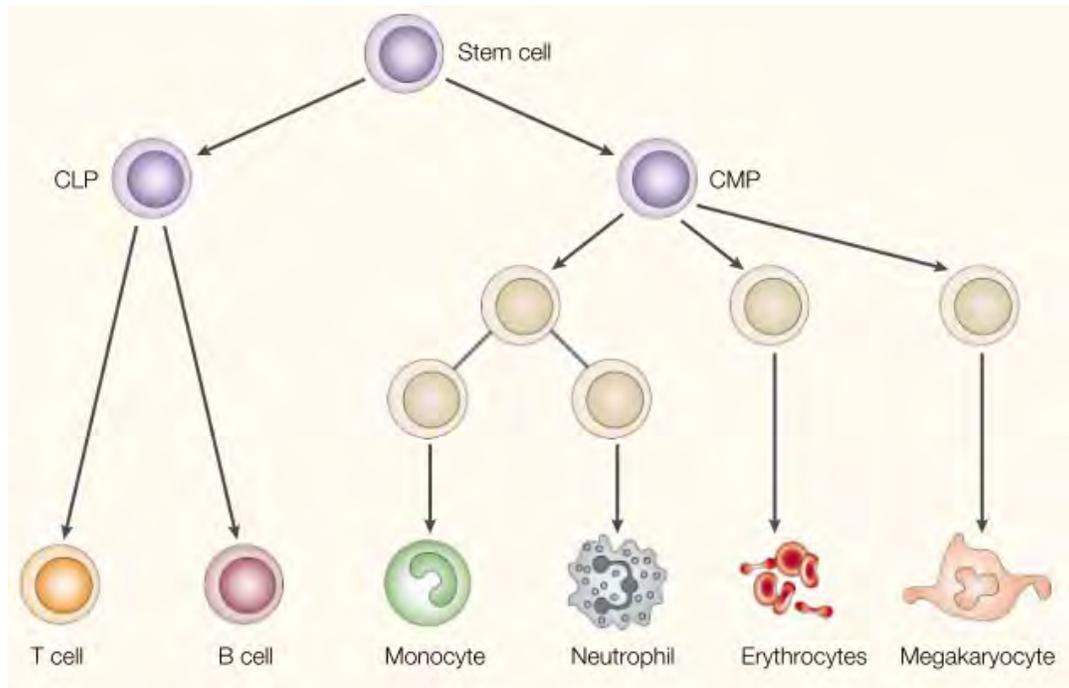


Figura 2: Esquema simplificado de la Hematopoyesis.

Una población de HSCs auto renovables se diferencia en distintos progenitores, CLP y CMP, dando lugar a la formación de dos linajes principales: el linaje linfoide y el linaje mieloide. A su vez los progenitores CLP se diferencian a linfocitos T y B (Fisher, 2002).

de células Tc, mientras que las células CD4+ pueden diferenciarse a su vez en múltiples subpoblaciones de células T cooperadoras Th1, Th2, Th17 y Treg a partir de un tipo precursor Th0, (Figura 3).

Las células Tc reconocen antígenos presentados en combinación con moléculas MHC I por las APCs y son capaces de inducir apoptosis en células cancerosas o infectadas por virus. Por otra parte, las células efectoras Th promueven distintos tipos de respuestas celulares por medio de la secreción de citocinas y otros factores de crecimiento.

A su vez, las células Th1 se caracterizan por la expresión de T-bet e IFN- γ ,

participan en la activación de macrófagos para controlar la eliminación de células infectadas por bacterias o virus intracelulares. La coordinación de respuestas contra patógenos extracelulares como helmintos, se lleva a cabo por las células Th2 que producen GATA-3 y secretan la citocina IL-4. Además favorecen la proliferación de los linfocitos B y el cambio de isotipo de los genes de inmunoglobulina (Ig).

Las células Th17 producen IL-17, regulan el reclutamiento de neutrófilos hacia los sitios de infección y son necesarios para la eliminación de patógenos extracelulares como bacterias y hongos. Las células Treg son mediadoras de la autotolerancia y poseen actividad inmunosupresora.

Por otra parte, una subpoblación de los linfocitos T CD4+ que expresan altos niveles de CXCR5, denominados linfocitos T foliculares o TFH, son esenciales para promover la diferenciación de las células B por medio del contacto directo del receptor CD40 con su ligando CD40L y por medio de la secreción de IL-21.

1.2.2 Linfocitos B

Al igual que las células T, los linfocitos B se desarrollan a partir de las células troncales HSC en la médula ósea a través de una serie de progenitores que a su vez poseen una capacidad decreciente para diferenciarse a otros tipos celulares. Las HSCs se diferencian hacia los progenitores multipotentes (MPPs) que posteriormente dan lugar a los progenitores mieloides (CMP) y linfoides comunes CLP. Gracias a la ayuda de las células estromales de la médula ósea, los CLPs se diferencian a linfocitos B por medio de la señalización por el receptor Flt3 y la estimulación por IL-7 en conjunto con la actividad del factor transcripcional PU.1 (Bryder & Sigvardsson, 2010).

Durante su etapa temprana de desarrollo (pro-B) las células B llevan a cabo la generación de un amplio repertorio de anticuerpos como resultado del rearrreglo de los genes que codifican la cadena pesada de los receptores de inmunoglobulina Ig

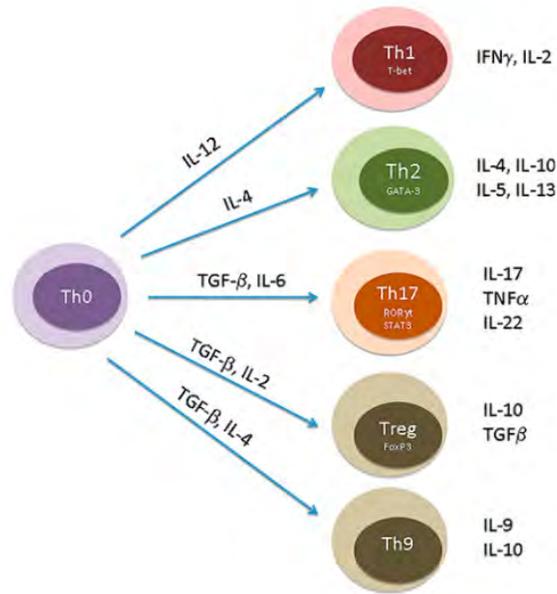


Figura 3: Diferenciación terminal de los linfocitos T

Las células Th0 pueden diferenciarse en cuatro distintas subpoblaciones celulares: Th1, Th2, Th17, Treg y Th9 dependiendo de la presencia de citocinas específicas. Cada tipo celular se caracteriza por un patrón de expresión de factores transcripcionales y producción de citocinas particulares (Bonilla & Oettgen, 2010).

(Isakson & Puré, 2013); (Figura 4). La expresión intracelular de una cadena pesada de Ig funcional y su asociación con las cadenas ligeras sustitutas de Ig conforman el receptor precursor de las células B o pre-BCR, que se traslada hacia la membrana externa y promueve la proliferación y diferenciación a células pre-B. Este evento favorece la recombinación de los genes de Ig que codifican para las cadenas ligeras, lo que permite la generación de una amplia gama de receptores BCR maduros o IgM que poseen especificidad única (Johnson et al., 2005).

La expresión de los BCRs en la superficie de las células pre-B da lugar a la formación de células B inmaduras (IgM+, IgD-, CD19+, CD27-). A partir de este momento las células B son capaces de interactuar con diferentes antígenos y sufren un proceso de selección negativa donde aquellas células que posean receptores afines

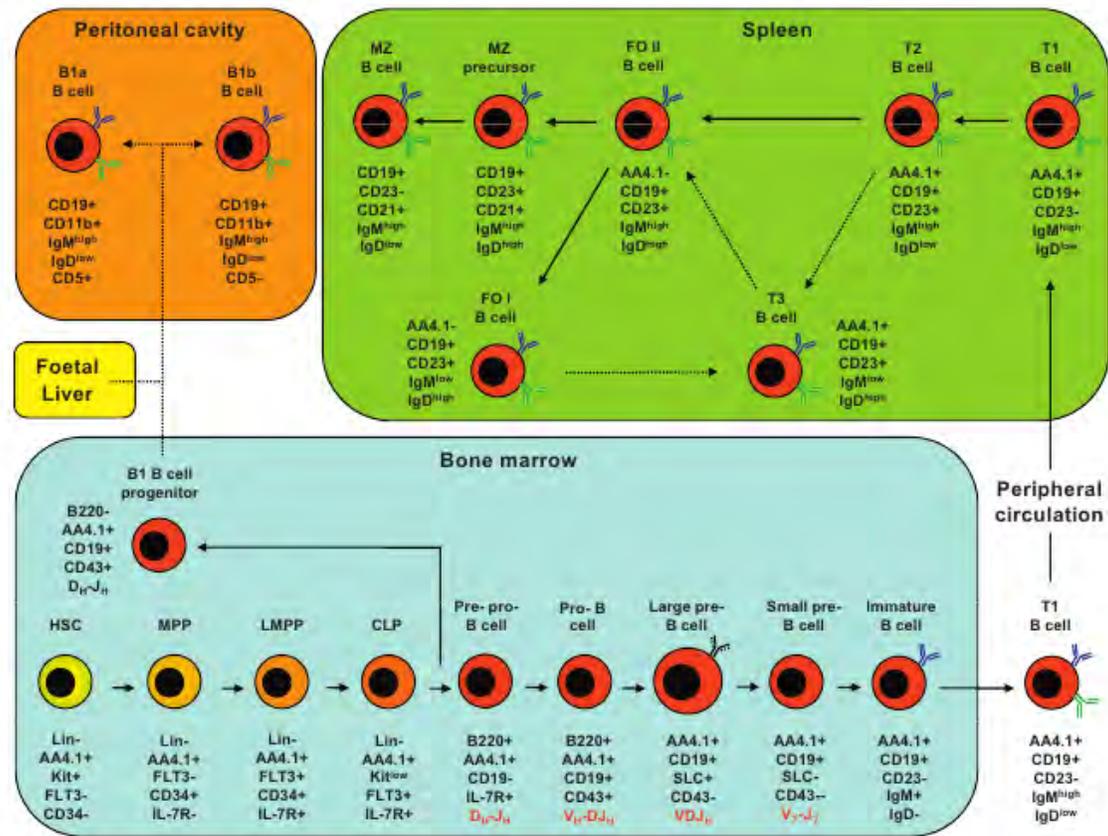


Figura 4: Desarrollo de los linfocitos B.

Los linfocitos B se desarrollan en la médula ósea a partir de los CLPs, donde llevan a cabo la generación de nuevos anticuerpos. Posteriormente migran hacia los órganos linfáticos secundarios donde completan su maduración (Vaughan, 2011).

a los antígenos propios del organismo llevan a cabo la edición de sus receptores para modificar su especificidad o son eliminadas por medio de apoptosis (von Boehmer & Melchers, 2010).

Además, las células autoreactivas pueden ser eliminadas por la inducción de un estado de no respuesta al antígeno, o anergia, donde las células B permanecen en un estado inactivo a pesar de haber contactado un antígeno, por lo que son incapaces de

desarrollarse y eventualmente mueren. De esta manera se asegura exclusivamente la maduración de las células B que reconozcan antígenos ajenos al organismo (Cambier et al., 2007).

Una vez que las células B han completado su desarrollo en la médula ósea, se desplazan hacia el torrente sanguíneo y son transportadas a los órganos linfáticos secundarios (bazo, ganglios linfáticos, amígdalas y tejido linfoide asociado a mucosas) donde completan su maduración y expresan el isotipo IgD en conjunción con IgM.

En los órganos linfáticos secundarios, los linfocitos B maduros o Naive (IgM+, IgD+, CD19+, CD27-) son activados por el encuentro con diversos antígenos presentes de manera libre o por el contacto directo con antígenos exhibidos en la superficie de los linfocitos T. Este evento determina su diferenciación terminal hacia células efectoras plasmáticas (PC) o células de memoria (Mem) (LeBien & Tedder, 2008).

La diferenciación terminal es generalmente un proceso irreversible que conlleva la adquisición de funciones efectoras específicas mediante cambios profundos en el ciclo celular, morfología, tiempo de vida y patrones de expresión genética comparados con los de las células predecesoras (Kallies & Nutt, 2007).

Las células PC secretan anticuerpos solubles que promueven la neutralización y destrucción de los patógenos (Fairfax et al., 2008). Las células Mem viven largos periodos de tiempo y son capaces de reaccionar de manera rápida y eficiente ante posteriores retos inmunológicos diferenciándose a su vez a células PC (McHeyzer-Williams et al., 2006). Dependiendo de su localización anatómica y función, las células B maduras pueden dividirse en tres subpoblaciones: células B1, células de la zona marginal (MZ) o células foliculares (B2), (Figura 4).

Las subpoblaciones B1 y MZ contribuyen a la producción de anticuerpos que circulan continuamente en el organismo previamente a cualquier infección y actúan durante las primeras etapas de la respuesta adaptativa. Las células B1 (IgM+, IgD

bajo, CD19+, CD5+) se encuentran en las cavidades peritoneales y pleurales, al ser activadas por antígenos de origen bacteriano se diferencian a células PC de vida corta (Rauch et al., 2012).

De manera similar, las células MZ (IgM+, IgD bajo, CD19+, CD23-, CD27+) poseen especificidad restringida por antígenos bacterianos y autoreactivos. Estas células maduran en la periferia del bazo cercanas a regiones ricas en células T, no obstante, su diferenciación a células efectoras PC puede llevarse a cabo de manera independiente a la interacción con los linfocitos T por antígenos provenientes del torrente sanguíneo (Allman & Pillai, 2008).

Por otra parte, las células foliculares B2 (IgM+, IgD+, CD19+, CD23+, CD27-) se encargan de ampliar el repertorio de anticuerpos e incrementar la afinidad de los estos por medio de los procesos de hipermutación somática (SHM) y ampliar la diversidad de sus funciones efectoras por la recombinación de cambio de isotipo (CSR). Además son responsables de su producción en grandes cantidades así como de la generación y el mantenimiento de la memoria inmunológica, lo que contribuye a una defensa más eficiente (Kurosaki, 2010).

1.2.2.1 Diferenciación terminal de los linfocitos B

Las células B2 dan lugar a la mayoría de las células PC y Mem presentes en el organismo, por lo que son consideradas las principales mediadoras de la respuesta humoral adaptativa. La diferenciación de las células B2 se lleva a cabo dentro de los centros germinales (GCs), que son compartimentos especializados dentro de los órganos linfáticos secundarios esenciales para la respuesta humoral adaptativa (Klein & Dalla-Favera, 2008). En ellos se lleva a cabo la maduración de la afinidad de los anticuerpos mediante los procesos de SHM y CSR, así como la selección positiva de los receptores con mayor afinidad que depende de la ayuda de los linfocitos T CD4+ cooperadores (McHeyzer-Williams et al., 2009).

El reconocimiento de antígenos por el BCR de los linfocitos B resulta en la internalización, procesamiento y exhibición de estos en la superficie celular junto con moléculas MHC II, así como el receptor CD40 (Benson et al., 2007). Los linfocitos T CD4+ se unen a estos receptores y secretan citocinas, como IL-2, IL-4 e IL-21. Tanto IL-4 como IL-21 son esenciales para la diferenciación terminal de los linfocitos B (Figura 5).

Al ser activados por el BCR y entrar en contacto directo con los linfocitos T CD4+, los linfocitos B pueden dirigirse a dos destinos potenciales: diferenciarse a células PC de manera extrafolicular o proliferar dentro de los GCs llevando a cabo la edición de sus receptores por medio de los procesos de SHM y CSR, para posteriormente diferenciarse a células PC y Mem (McHeyzer-Williams et al., 2006), (Figura 5).

Las células PC que se forman por la vía extrafolicular producen anticuerpos de baja afinidad de clase IgM y viven cortos periodos de tiempo. En contraste, las células PC y Mem que se originan a partir de las células GC, son de vida larga, pueden expresar isotipos IgM o IgG, IgA, e IgE si han llevado a cabo SHM y CSR, y poseen una alta especificidad gracias a que son seleccionadas con la ayuda de los linfocitos T CD4+ cooperadores para lograr respuestas más eficientes (Good-Jacobson & Shlomchik, 2010).

Como resultado de múltiples experimentos, se han descrito a lo largo del tiempo diversos aspectos importantes, tanto a nivel celular como molecular, acerca de cómo se regula la diferenciación de los linfocitos B, así como de los factores y señales que intervienen en este proceso.

Adicionalmente a la estimulación por citocinas mediada por los linfocitos T cooperadores, la diferenciación terminal de los linfocitos B está regulada por la acción concertada de diversos factores de transcripción, formando una compleja red de regulación genética, que controla el mantenimiento de la identidad celular, la especificación y el compromiso hacia los distintos tipos celulares; Naive, GC, Mem y PC (Igarashi

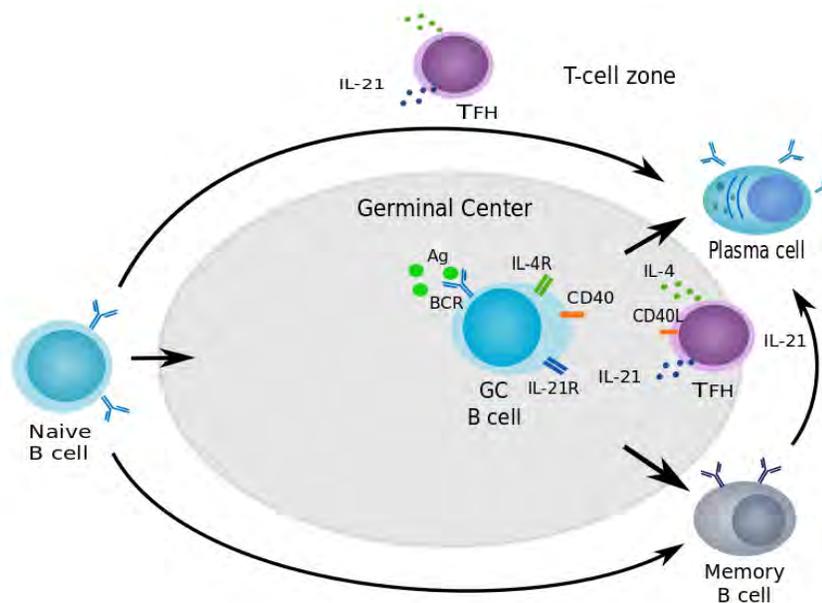


Figura 5: Diferenciación terminal de los linfocitos B

La diferenciación de los linfocitos B se lleva a cabo principalmente en los centros germinales en los folículos de los órganos linfáticos secundarios, donde compiten por la ayuda de los linfocitos T cooperadores para diferenciarse a células PC y Mem. También pueden diferenciarse de manera extrafolicular dando lugar a células PC y Mem de vida corta. Adaptada de (Klein & Dalla-Favera, 2008).

et al., 2007).

Se ha observado que estos reguladores maestros actúan de manera antagónica asegurando el establecimiento de patrones de expresión genética mutuamente excluyentes y pueden agruparse en aquellos que promueven los programas característicos de los tipos progenitores Naive y GC, y aquellos que promueven la diferenciación terminal a los tipos Mem y PC (Shapiro-Shelef & Calame, 2005).

Cada tipo celular se distingue por la expresión de una combinación única de estos factores que a su vez se encargan del mantenimiento de la identidad celular y de coordinar los programas característicos para que la célula lleve a cabo sus funciones (Figura 6).

1.2.2.2 Factores que promueven la especificación de los tipos progenitores Naive y GC.

Los progenitores Naive se caracterizan por la expresión de PAX5 (Figura 6), que es inducido desde las primeras etapas de desarrollo en la médula ósea donde es requerido para el compromiso de los progenitores linfoides con el linaje de las células B y el mantenimiento de la identidad en etapas posteriores (Revilla-I-Domingo et al., 2012). La inactivación de *Pax5* en células B maduras resulta en la pérdida de la identidad de los linfocitos B y la adquisición de un mayor potencial para diferenciarse a otros linajes así como en la activación de genes que promueven la diferenciación a células PC (Nera et al., 2006).

El factor transcripcional PAX5 funciona como activador y represor, se une a regiones reguladoras de sus genes blanco y recluta complejos remodeladores de la cromatina, controlando la activación de un gran número de genes que participan en la especificación del linaje de las células B, incluyendo aquellos que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, genes involucrados en el ensamblado y la señalización por los BCRs, así como marcadores celulares característicos (McManus et al., 2011; Schebesta et al., 2007). Al mismo tiempo, PAX5 reprime genes que son mediadores de otros linajes hematopoyéticos o que participan en la diferenciación de las células PC (Horcher et al., 2001).

Al entrar a la vía de diferenciación dentro de los folículos, los linfocitos B se diferencian a células GC y expresan BCL6 en conjunción con PAX5. BCL6 es una fosfoproteína nuclear perteneciente a la familia de factores transcripcionales BTB/POZ

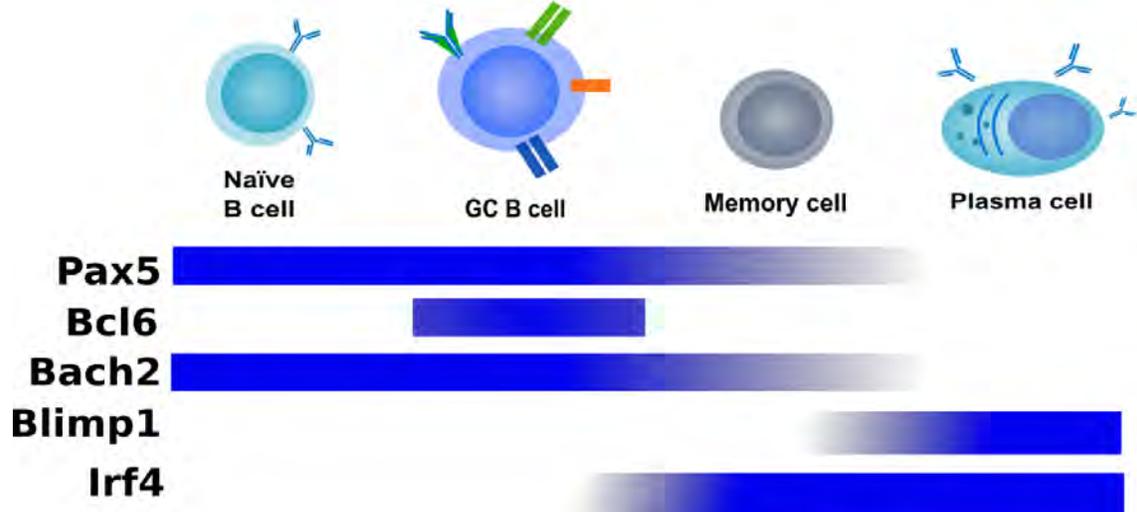


Figura 6: Patrones de expresión característicos de los linfocitos B.

Cada tipo celular expresa una combinación única de factores de transcripción que actúan como reguladores maestros para controlar programas celulares específicos. Se muestran los patrones de expresión característicos de las células Naive (PAX5+, BCL6-, BACH2+, BLIMP1-, IRF4-), GC (PAX5+, BCL6+, BACH2+, BLIMP1-, IRF4-), Mem (PAX5+, BCL6-, BACH2+, BLIMP1-, IRF4+) y PC (PAX5-, BCL6-, BACH2-, BLIMP1+, IRF4+). Adaptada de (Nera et al., 2006).

con dedos de zinc que se une a secuencias específicas de DNA en las regiones reguladoras de sus genes blanco e interacciona con diferentes correpresores inhibiendo la transcripción (Basso & Dalla-Favera, 2012).

Se ha observado que la deficiencia de *Bcl6* resulta en la ausencia total de GCs, por lo que la activación de *Bcl6* es esencial para la formación de los centros germinales (Toyama et al., 2002). Al igual que PAX5, BCL6 participa en la inhibición del programa de las células PC. En células GC, reprime la expresión de genes involucrados en apoptosis y arresto del ciclo celular así como genes de respuesta a daño en DNA, lo que permite el mantenimiento de un estado de proliferación que favorece las reacciones de CSR y SHM, cruciales para la generación de anticuerpos de alta afinidad (Basso et al., 2010).

Otro factor importante involucrado en el control de la diferenciación de los linfocitos B es BACH2, el cual se expresa en células Naive, GC y Mem pero está ausente en las PC. BACH2 es un represor transcripcional perteneciente a la familia BTB con cremallera de leucina, su inactivación provoca la rápida diferenciación a células PC y la terminación prematura de las reacciones de SHM y CSR (Muto et al., 2010; Muto et al., 2004), por lo que su función es importante para favorecer el mejoramiento de los anticuerpos y en conjunción con PAX5 y BCL6, reprime los programas de diferenciación a células PC (Ochiai et al., 2006).

Para que los eventos de CSR y SHM se lleven a cabo, es esencial la actividad de AID, que es una desaminasa de citidinas que modifica los residuos de citocina en las regiones variables IgV de los genes de inmunoglobulina así como en las cadenas pesadas IgH (Muramatsu et al., 2000). Las modificaciones nucleotídicas producidas por AID son reconocidas por los mecanismos de reparación de DNA propensos a errores, lo que favorece la introducción de mutaciones puntuales (SHM) o el corte en doble cadena y la recombinación no homóloga (CSR) que da como resultado la unión de una nueva región variable con las regiones constantes de IgH o el cambio de isotipo por la sustitución de una cadena pesada por otra. De esta manera se generan nuevas variantes de anticuerpos que pueden tener mayor afinidad (Honjo et al., 2004).

Los procesos SHM y CSR ocurren mayoritariamente en las células GC, sin embargo, se ha reportado que las células Mem también pueden llevar a cabo el mejoramiento de sus receptores (Dogan et al., 2009), por lo que la expresión de AID está restringida a estos dos tipos celulares.

1.2.2.3 Factores que promueven la diferenciación terminal hacia los tipos celulares Mem y PC.

Las células GC que han sufrido cambio de clase e hipermutación somática son seleccionados por la afinidad de sus receptores y compiten por la ayuda de los linfocitos T, lo que favorece su diferenciación a células PC o Mem (Victora & Nussenzweig, 2012).

El contacto con los linfocitos T promueve la proliferación de las células más afines, las cuales pueden permanecer en un estado de inactivación por tiempos prolongados dando lugar a la formación de células Mem o si son estimuladas por la unión de sus BCRs por un antígeno, diferenciarse a células PC. Ambas señales desencadenan la terminación de los programas de las células progenitoras y son esenciales para el compromiso con los destinos terminales (Kurosaki et al. 2009).

La diferenciación a los tipos celulares Mem y PC está a cargo de dos factores principales, BLIMP1 e IRF4. BLIMP1 es un represor transcripcional requerido para la generación de las células PC y la secreción de anticuerpos (Shapiro-Shelef et al., 2003), reprime genes involucrados en la regulación del ciclo celular y mantenimiento de la identidad de las células B, incluyendo genes que regulan la señalización por BCR y las interacciones B-T (Shaffer et al., 2002). La expresión forzada de *Blimp1* en células Naive dirige la diferenciación a PCs mientras que su inactivación suprime completamente la formación de estas células efectoras (Kallies & Nutt, 2007).

IRF4 es un regulador transcripcional que controla varios aspectos de la diferenciación de los linfocitos B, se expresa en todas las etapas de desarrollo con excepción de las células maduras Naive y GC, participa en CSR y extingue los programas de diferenciación de las células GC por lo que su función es esencial durante la especificación a los tipos efectoras (Klein et al., 2006). Debido a su importancia en estos procesos mutuamente excluyentes, se ha propuesto que la expresión gradual de *Irf4* promueve por un lado el mejoramiento de la afinidad durante las etapas tardías de las células GC y que su inducción está regulada por el contacto directo con los linfocitos

T cooperadores, y por otra parte, los niveles altos de *Irf4* promueven la diferenciación a células Mem y PC (Kwon et al., 2009; Sciammas et al., 2006).

Una vez que se han formado las células PC, comienzan a sintetizar grandes cantidades de anticuerpos, esto incrementa la demanda de la maquinaria de traducción y secreción celular pudiendo exceder su capacidad de procesamiento y dando lugar a la acumulación de proteínas mal plegadas, lo que genera estrés de retículo endoplásmico y muerte celular (Todd et al., 2008).

Para contender contra el estrés y regular la secreción de anticuerpos, las células PC dependen de la expresión de XBP1, un regulador transcripcional de la familia b-ZIP que activa genes involucrados en tráfico vesicular, aparatos de secreción, degradación, plegamiento y glicosilación de proteínas. La expresión ectópica de *Xbp1* induce la expansión del retículo endoplásmico (Shaffer et al., 2004), se ha reportado también que su deficiencia no afecta la diferenciación de las células PC pero extingue la secreción de anticuerpos (Todd et al., 2009).

Como se menciona anteriormente, estos factores interaccionan entre sí formando una compleja red de regulación. La desregulación de los componentes de esta red conlleva a la generación de múltiples enfermedades como linfomas (Shaffer et al., 2008), leucemia linfocítica crónica (Hurtz et al., 2011) y un gran número de enfermedades autoinmunes relacionadas con la producción de anticuerpos autoreactivos como es el caso del lupus eritematoso (Vinuesa et al., 2009). Por lo tanto, el correcto funcionamiento de esta red de regulación es esencial para asegurar una respuesta inmune eficiente.

1.3 Redes

Pese a la gran cantidad de información disponible, se desconoce la manera en que la acción concertada de los factores PAX5, BCL6, BLIMP1, IRF4 y BACH2, regula las

transiciones entre los destinos celulares Naive, GC, Mem y PC en respuesta a señales extracelulares. Más aún, debido al creciente número de factores involucrados y a la multiplicidad de sus interacciones, resultan insuficientes los modelos estáticos para explicar cómo se lleva a cabo el proceso de diferenciación de los linfocitos B.

Los modelos computacionales son una herramienta adecuada para el estudio de las redes de regulación genética ya que permiten integrar la información disponible en una estructura formal de elementos que interactúan entre sí (Albert, 2007). Se han elaborado varios modelos de redes booleanas con base en datos experimentales para estudiar diferentes procesos biológicos, como el control de la morfogénesis floral en *Arabidopsis thaliana* (Mendoza et al., 1999), el ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae* (Davidich & Bornholdt, 2008), la red de regulación genética de polaridad de segmento en *Drosophila melanogaster* (Albert & Othmer, 2003), y el control de la diferenciación de los linfocitos T cooperadores (Mendoza, 2006; Mendoza & Pardo, 2010).

Estos modelos han sido útiles para describir los aspectos cualitativos más relevantes de la dinámica de diferentes procesos biológicos ya que integran una gran cantidad de información experimental, su estructura basada en reglas les permite capturar las características que subyacen a la regulación de estos sistemas, como las relaciones de activación e inhibición entre sus componentes así como circuitos de retroalimentación, entre otros. Los modelos desarrollados para estudiar el comportamiento de las redes de regulación genética de diferentes organismos han sido capaces de predecir el comportamiento de estos sistemas bajo condiciones que no han sido probadas experimentalmente, ofreciendo la oportunidad de medir el efecto de diferentes perturbaciones, como mutaciones de ganancia o pérdida de función, o cambios en las interacciones y compararlos con condiciones silvestres.

Para construir un modelo de red de regulación es necesario cumplir con ciertos requisitos:

- Se debe conocer la identidad de los componentes moleculares que constituyen el sistema biológico de interés, así como las interacciones de regulación entre estos.
- Es necesario conocer los cambios de abundancia o actividad de estos componentes a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones.

Con base en esta información puede construirse un modelo que debe ser consistente con el conocimiento actual sobre un proceso biológico y que además genere predicciones acerca del comportamiento del sistema bajo condiciones que aún no hayan sido exploradas.

Los modelos de red son una abstracción matemática de los elementos que participan en un proceso y las interacciones entre ellos. Una red puede visualizarse como un conjunto de nodos y aristas. Existen distintos tipos de redes dependiendo de la naturaleza de sus componentes, como redes metabólicas, redes de interacción entre proteínas, redes de regulación genética, entre otras.

Dependiendo del tipo de red, los nodos y las aristas pueden representar diferentes entidades moleculares, por ejemplo, en las redes metabólicas los nodos pueden representar sustratos o metabolitos, mientras que las aristas representan las distintas reacciones bioquímicas que son catalizadas por enzimas específicas para convertir un sustrato en otro. En una red de interacción entre proteínas, los nodos y las aristas representan a las proteínas y el contacto directo entre estas mediado por sus distintos dominios de unión, respectivamente. En particular, las redes de regulación integran la información referente a la naturaleza regulatoria de las moléculas que la conforman, es decir, las relaciones de regulación pueden ser de activación o de inhibición y los nodos representan elementos moleculares tales como genes, proteínas, células, entre otros (Albert, 2007).

Además de conocer la estructura y el tipo de interacciones que conforman a una red de regulación, también es necesario estudiar su comportamiento dinámico. Para ello, se requiere asignar un estado de activación a cada nodo en función de los estados de sus reguladores, lo que permite representar los cambios en las concentraciones de las moléculas que conforman a la red y estudiar la manera en que los cambios en los estados de activación de uno o varios elementos pueden modificar el funcionamiento de otros, lo que a su vez se ve reflejado en la generación de distintas configuraciones de activación para toda la red (de Jong, 2002).

Las redes de regulación pueden ser modeladas como un sistema dinámico. Los sistemas dinámicos describen el comportamiento del sistema a través del tiempo. En una red dinámica, el valor de los nodos de la red cambia con respecto al tiempo dependiendo de sus interacciones con otros nodos (Albert, 2007).

Los modelos dinámicos de las redes de regulación pueden agruparse en dos categorías: modelos discretos y modelos continuos, dependiendo del tipo de variable utilizada para describir al tiempo. En los modelos continuos el tiempo describe por medio de variables que pueden tomar valores dentro de los números reales, es decir, el comportamiento del sistema puede estudiarse considerando intervalos infinitesimales de tiempo.

Los modelos continuos describen la dinámica de las redes de regulación haciendo uso de ecuaciones diferenciales ordinarias (ODEs), no obstante para su construcción se requiere disponer de datos experimentales cuantitativos, que son generalmente escasos, por lo que se han desarrollado diversas metodologías para generar modelos continuos que describan los aspectos cualitativos relevantes de las redes de regulación genética en ausencia de información cuantitativa (Mendoza & Xenarios, 2006). Por otra parte, los modelos discretos describen la dinámica del sistema a intervalos determinados de tiempo. Los modelos dinámicos discretos son útiles para integrar la información disponible, frecuentemente cualitativa, referente a las redes de regulación y permiten generar descripciones sobre la actividad colectiva de varios genes y

otros elementos moleculares. (Bornholdt, 2008).

Sin embargo, debido al gran número de componentes moleculares que intervienen en el control de diversos procesos biológicos y que interaccionan entre sí de manera no lineal produciendo comportamientos complejos, es necesario generar descripciones en términos de estos componentes así como de las interacciones entre ellos. Una aproximación se basa en hacer simplificaciones que ayuden a capturar la naturaleza cualitativa de un proceso biológico de interés. Por ejemplo, puede considerarse que en una red de regulación genética, los genes actúan activando o inhibiendo la transcripción de otros genes, no importando si estas interacciones son directas, por medio del contacto físico entre moléculas, o indirectas a través de intermediarios.

Otra suposición es que los eventos ocurren en tiempos discretos, es decir ocurren a intervalos determinados en lugar de ocurrir continuamente, asegurando que el estado del sistema al tiempo que se observa dependa exclusivamente de su estado en el tiempo anterior (Shmulevich & Aitchison, 2009). Por otra parte, la información experimental disponible generalmente es de naturaleza cualitativa, por ejemplo, la expresión de un gen puede tener dos estados: “*activo*” o “*inactivo*”, es decir, poseen un número finito o discreto de estados de activación (Albert & Wang, 2009).

Estas consideraciones son necesarias para modelar una red como un sistema dinámico discreto, donde el tiempo transcurre a intervalos fijos y el estado de cada nodo cambia de manera discreta siguiendo reglas lógicas que describan sus mecanismos de regulación.

1.3.1 Modelos Booleanos

El caso más simple de los modelos dinámicos discretos lo representan los modelos Booleanos (MBs) (Kauffman, 1969). Un MB puede representarse como un grafo dirigido $G = (V, E)$ formado por un conjunto de vértices $V = v_1, v_2, v_3, \dots, v_n$ y aristas E , que conectan los vértices, donde su comportamiento está determinado por un conjunto de reglas lógicas, o funciones booleanas $F = F_1, F_2, F_3, \dots, F_n$, específicas

para cada nodo.

Un nodo vi , puede representar un gen, una proteína o un complejo molecular, con un nivel de expresión asociado Xi descrito por una variable booleana (0 o 1). Por ejemplo, si $Xi = 1$, significa que el gen vi de la red se expresa y tiene una alta concentración, o $Xi = 0$ si el gen no se expresa, es decir, su concentración está en un nivel basal o por debajo de este (Albert & Wang, 2009).

Concretamente, el estado de un gen está representado por una variable booleana X , que puede tomar el valor de 1 (“encendido”) o 0 (“apagado”). Las interacciones regulatorias que determinan los cambios entre los estados de activación de los genes, son definidas como un conjunto de reglas lógicas F utilizando las funciones AND, OR y NOT (Figura 7). Las reglas lógicas pueden resumirse en una tabla que muestre una función de salida de acuerdo a los valores de los estados de entrada correspondientes a los nodos de la red.

El comportamiento de la red a lo largo del tiempo, descrito en términos de las variables booleanas se denomina “estado de la red”. Este estado se representa por un vector $(x1, x2, x3, \dots, xn)$ que contiene los estados de activación de los genes $X1, X2, X3, \dots, Xn$, que pueden estar activos ‘1’ o inactivos ‘0’. Así, el estado de una red booleana en un momento determinado, se caracteriza por un vector que captura los estados de los genes que integran a la red.

Puesto que cada nodo puede tener dos estados (0 y 1), existen 2^n estados posibles para una red con n nodos. Al conjunto de todos los estados posibles se le denomina “espacio de estados” de la red (Karlach & Shamir, 2008); (Figura 8).

A	B	$A \text{ and } B$	$A \text{ or } B$	A	$\text{not } A$
0	0	0	0	0	1
0	1	0	1	1	0
1	0	0	1		
1	1	1	1		

Figura 7: Operadores Lógicos.

Las reglas lógicas se construyen utilizando las funciones AND, OR y NOT, que de manera conjunta con los tipos de interacciones (activación o inhibición), determinan los estados de activación de los nodos de la red.

1.3.2 Dinámica de los modelos Booleanos

Un MB puede modelarse como un sistema aislado cuyo comportamiento depende únicamente de los nodos que integran a la red. De esta manera, el comportamiento del sistema está definido en función de los estados de los nodos en un tiempo anterior, como se representa en la siguiente ecuación:

$$A_{t+1} = f(A_t, B_t, C_t, \dots)$$

Donde A_{t+1} , el valor del nodo A al siguiente tiempo, está determinado por los estados de todos los nodos en el tiempo anterior, y $f(x)$ es la función que los relaciona.

La dinámica de una red de regulación genética está determinada por los estados de expresión de los genes a lo largo del tiempo, la expresión o inhibición de grandes conjuntos de genes determina características fenotípicas importantes, como el destino celular o en general el “estado funcional” de la célula (Huang et al., 2005). El comportamiento de las redes de regulación depende fundamentalmente de tres elementos: la estructura de la red, la naturaleza activadora o represora de los genes, factores de transcripción, proteínas, entre otros, y las señales que la célula recibe de su entorno (Kerlebach & Shamir, 2008).

Debido a que la red puede tomar un número finito de estados posibles (2^n estados), eventualmente el sistema recorrerá repetidamente varios estados ya antes visitados hasta alcanzar distintas configuraciones de estados que no cambien una vez que se ha llegado a ellos, es decir, hasta alcanzar múltiples estados estacionarios. A los estados estacionarios del sistema se les denomina “*atractores*” y a los estados transitorios asociados con un atractor se les denomina cuenca de atracción. Se ha propuesto que los atractores de las redes de regulación genética representan las configuraciones estables de activación de genes, u otros elementos moleculares, observadas experimentalmente para células diferenciadas y para diversos procesos celulares que requieren de la acción concertada de genes de manera sostenida a lo largo del tiempo (Kauffman, 1969).

Existen diversos tipos de atractores definidos por el número de pasos de tiempo que transcurren antes de que un estado de la red se repita. Si un estado de la red se repite después del primer tiempo, entonces el atractor tiene un periodo de tamaño 1, también conocido como atractor de punto fijo. Un periodo puede ser tan grande como el número de estados posibles de la red booleana, 1 a 2^n .

En el caso de una red de regulación genética, la direccionalidad de las interacciones determina el flujo de información y puesto que cada gen obedece una regla lógica de activación en función de los genes que lo regulan, entonces la red se comportará como un sistema dinámico. Dada una configuración inicial, algunos genes se encontrarán activos o inactivos, la red transitará por una serie de estados hasta llegar a un atractor, lo que significa que los genes de la red alcanzarán un estado estable de expresión (Figura 8).

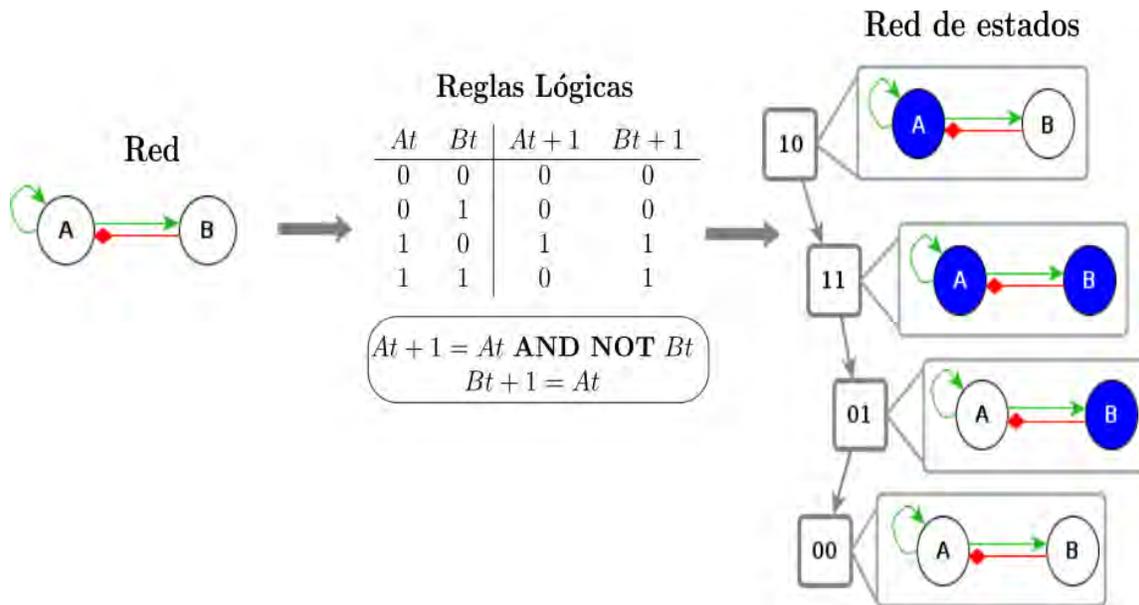


Figura 8: Comportamiento dinámico de las redes

Las redes de regulación pueden ser estudiadas como sistemas dinámicos donde cada nodo se activa dependiendo de los estados de sus reguladores. Dado un conjunto de reglas lógicas de transición que determinan la manera en que se activan los nodos de la red de acuerdo con sus interacciones de regulación, la red transitará entre diversos estados hasta llegar a un estado estacionario o atractor. A la red que representa las transiciones entre los estados por los que transita el sistema se le denomina red de estados.

1.4 Modelado de la diferenciación de linfocitos B utilizando modelos Booleanos

Los MBs ofrecen una estrategia simple para describir la dinámica de las redes biológicas cuando no se tiene mucho detalle acerca de los parámetros cinéticos de las moléculas involucradas. Por esta razón, son útiles para estudiar de una manera cualitativa el comportamiento del sistema. Existen propiedades estructurales y dinámicas específicas de las redes que son relevantes para el estudio de los sistemas biológicos, tales como la robustez, redundancia, evolucionabilidad, homeostasis y multiestacionariedad (Garg et al., 2009).

El proceso de diferenciación de los linfocitos B posee características importantes para su modelado, debido a que este sistema ha sido ampliamente estudiado, existe suficiente información experimental disponible, tanto a nivel celular como molecular, referente a los mecanismos moleculares importantes para la regulación de este proceso biológico, así como su respuesta bajo diferentes condiciones mutantes y el tipo de señales que inducen la formación de los destinos celulares Naive, GC, Mem y PC.

Sin embargo, no existe un consenso sobre la arquitectura de la red de regulación y si las interacciones reportadas son suficientes para describir cómo se regula el establecimiento de los patrones de expresión genética observados experimentalmente para los distintos tipos celulares Naive, GC, Mem y PC. Más aún, se desconoce la manera en que esta red integra distintos tipos de señales para dirigir el proceso de diferenciación.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo nos planteamos estudiar de manera sistemática el comportamiento dinámico de la red de regulación que controla el proceso de diferenciación de los linfocitos B. Para ello proponemos la construcción de un modelo dinámico discreto basado en reglas lógicas, que permita estudiar la acción concertada de los factores y señales extracelulares que controlan este proceso y a su vez genere predicciones sobre el comportamiento de este sistema bajo diferentes condiciones, lo que contribuye a nuestro entendimiento acerca de cómo se regula el proceso de diferenciación de los linfocitos B y sirva en el planteamiento de nuevas hipótesis susceptibles de ser probadas experimentalmente.

2. HIPÓTESIS

Existe suficiente información experimental disponible en la literatura para inferir la arquitectura de la red de regulación que controla la diferenciación terminal de los linfocitos B. Esta red, al ser modelada como un sistema dinámico discreto presentará diferentes puntos estacionarios fijos que corresponderán a los patrones de expresión genética característicos de los tipos celulares de linfocitos B: Naive, GC, Mem y PC, observados experimentalmente. El modelo podrá además describir la diferenciación a partir del precursor Naive hacia los tipos celulares GC, Mem y PC en respuesta a señales extracelulares específicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Construir un modelo Booleano de red que describa el control del proceso de diferenciación de los linfocitos B a partir del precursor Naive hacia los tipos celulares GC, Mem y PC.

3.2 Objetivos particulares

- Inferir los elementos moleculares y las interacciones de regulación entre ellos, involucrados en el control de la diferenciación de los linfocitos B utilizando la información reportada en la literatura.
- Construir una red de regulación que incluya las moléculas e interacciones reportadas.
- Construir un modelo Booleano mínimo que incluya en primer lugar a los genes reportados como reguladores maestros del proceso de diferenciación de los linfocitos B así como las interacciones entre estos.
- Definir las reglas lógicas de regulación para cada elemento de la red.
- Analizar las propiedades dinámicas de la red modelándola como un sistema dinámico discreto determinista.
- Evaluar el modelo por medio de simulaciones computacionales.
- Estudiar el efecto de diferentes perturbaciones sobre el comportamiento de la red simulando el modelo bajo condiciones de ganancia o pérdida de función de cada uno de sus nodos.
- Construir un modelo extendido que incluya a los principales reguladores de la diferenciación de los linfocitos B así como a las señales extracelulares reportadas que dirigen este proceso.

- Estudiar el comportamiento dinámico de la red de regulación en respuesta a señales extracelulares específicas.
- Generar predicciones acerca de algunas interacciones importantes para el funcionamiento de la red de regulación.
- Validar los resultados de las simulaciones comparándolos contra patrones silvestres y mutantes reportados en la literatura.

4. METODOLOGÍA

4.1 Inferencia de la red

Con base en información disponible en la literatura, se infirió la estructura de la red de regulación que controla la diferenciación de los linfocitos B (Figura 9). Para ello se consideraron diversas evidencias experimentales referentes a interacciones entre las moléculas que conforman a la red, tales como unión a regiones regulatorias, formación de complejos de regulación transcripcional, niveles de expresión de mRNAs y proteínas, estudios de mutantes de ganancia o pérdida de función, entre otros. Esta información se recopiló en una tabla de interacciones (Tabla 1).

La red consta de 22 nodos y 38 interacciones e integra la información reportada referente a las principales moléculas involucradas en este proceso (Figura 9). No todas las interacciones que aparecen en la red han sido reportadas en la literatura. De las 22 interacciones del modelo, 4 fueron inferidas durante el proceso de modelado para obtener un comportamiento dinámico consistente con los datos experimentales. A continuación se describen con mayor detalle las distintas interacciones que conforman a la red, así como la evidencia experimental que las sustentan.

Tabla 1: Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B.

Interacción		Comentarios	Referencias	
PAX5	−	BLIMP1	El factor de transcripción BSAP, codificado por el gen <i>Pax5</i> en humano, se une a un sitio en el promotor de <i>Prdm1</i> e inhibe la expresión de BLIMP1. La inactivación condicional de <i>Pax5</i> en células B maduras resulta en la activación de <i>Prdm1</i> .	Mora-López et al., 2007; De-logu et al., 2006; Nera et al., 2006
BLIMP1	−	PAX5	BLIMP1 se une a un sitio en el promotor de <i>Pax5</i> , in vitro e in vivo reprimiendo su transcripción. La expresión ectópica de <i>Blimp1</i> inhibe la transcripción de <i>Pax5</i> y promueve la diferenciación a células PC. Estudios de microarreglo muestran la represión por BLIMP1 de genes blanco de PAX5.	Mora-López et al., 2007; Lin et al., 2002; Shaffer et al., 2002
BLIMP1	−	BCL6	BLIMP1 reprime la expresión de <i>Bcl6</i> por medio de la unión a su región promotora. Mutantes <i>Blimp1</i> ^{-/-} muestran incremento en la expresión de BCL6 en células PC mientras que la expresión forzada de <i>Blimp1</i> restablece la secreción de Ig.	Kuo et al., 2007; Sciammas & Davis, 2004; Shaffer et al., 2002

Tabla 1 : Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B (Continuación)

Interacción	Comentarios	Referencias
BCL6 - BLIMP1	<p>El gen <i>Blimp1</i>, es un blanco directo de BCL6. BCL6 se une al quinto intrón de <i>Blimp1</i> en estudios <i>in vitro</i> así como <i>in vivo</i>. La represión de <i>Bcl6</i> es suficiente para inducir la expresión de <i>Blimp1</i> en linfomas. La represión de <i>Bcl6</i> por tratamiento con un inhibidor desacetilador de histonas favorece la expresión de <i>Blimp1</i> y promueve la diferenciación a células PC. Ratones <i>Bcl6</i> <i>-/-</i> muestran un elevado número de células PC y secreción de Ig. BCL6 reprime a AP-1 que es un activador de <i>Blimp1</i>, por lo que existe un mecanismo indirecto de represión entre BCL6 y BLIMP1.</p>	<p>Shaffer et al., 2000; Reljic et al., 2000; Vasanwala et al. 2002; Tunyaplin et al., 2004</p>
IRF4 -> BLIMP1	<p>Ratones mutantes <i>Irf4</i> <i>-/-</i> no llevan a cabo SHM y carecen de células plasmáticas, la expresión ectópica de BLIMP1 en ratones <i>Irf4</i> <i>-/-</i> reestablece la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas. La ausencia de <i>Irf4</i> a su vez, resulta en la inhibición de genes blanco de BLIMP1. IRF4 se une tanto al promotor así como a los exones 4, 5 y 6 del gen <i>Prdm1</i> que codifica para BLIMP1. .</p>	<p>Sciammas et al., 2006; Shaffer et al., 2008; Kwon et al., 2009</p>

Tabla 1 : Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B (Continuación)

Interacción		Comentarios	Referencias
IRF4	- BCL6	Estimulación de CD40 por su ligando CD40L promueve la represión transcripcional de <i>Bcl6</i> por medio de la activación de NF-kB que a su vez activa a <i>Irf4</i> . IRF4 se une a regiones reguladoras de <i>Bcl6</i> reprimiendo su transcripción. La inhibición de <i>Bcl6</i> es necesaria para la formación de las células Mem in vitro. Puesto que las células Mem no expresan BLIMP1, la represión de <i>Bcl6</i> en estas células puede ser mediada por IRF4.	Toyama et al., 2002; Saito et al., 2007; Kuo et al., 2007
IRF4	-> IRF4	IRF4 regula positivamente la transcripción de <i>Myc</i> por medio de su unión a regiones reguladoras, MYC por su parte se une al promotor de <i>Irf4</i> promoviendo su transcripción, por lo que se propone un circuito de regulación positiva entre MYC e IRF4.	Shaffer et al., 2008
BCL6	- IRF4	BCL6 se une a sitios en el primer, tercero y cuarto exón de <i>Irf4</i> . Estudios de inmunoprecipitación muestran que BCL6 interacciona con IRF4 y reprime la activación mediada por IRF4 de diversos genes. Asimismo, el tratamiento con un inhibidor de BCL6 promueve la expresión de <i>Irf4</i> . Además, BCL6 reprime de manera indirecta a <i>Irf4</i> por medio de la activación de MITF que es un represor transcripcional de <i>Irf4</i> .	Gupta et al., 1999; Ci et al., 2009; Basso et al., 2010; Alinikula et al., 2011
BCL6	-> PAX5	Interacción propuesta	Este trabajo

Tabla 1 : Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B (Continuación)

Interacción		Comentarios	Referencias	
PAX5	->	BACH2	La inactivación de <i>Pax5</i> en células B maduras y plasmáticas afecta la transcripción de <i>Bach2</i> . Por otra parte, la inducción de <i>Pax5</i> promueve la expresión de <i>Bach2</i> . PAX5 se une a sitios en el promotor de <i>Bach2</i> y regula positivamente su transcripción.	Basso et al., 2004; Saito et al. 2007
BACH2	-	BLIMP1	BACH2 reprime al gen <i>Blimp1</i> formando un heterodímero con la proteína MAFK y se une a sitios de reconocimiento en el promotor de <i>Blimp1</i> . La delección de <i>Bach2</i> resulta en la inhibición de CSR y SHM.	Ochiai et al., 2006; Ochiai et al., 2008; Muto et al., 2010
BLIMP1	-	BACH2	La expresión de <i>Blimp1</i> en células mutantes <i>Bach2</i> ^{-/-} incrementa e induce la diferenciación a células PC. La expresión forzada de <i>Blimp1</i> en células B maduras después de la estimulación con un antígeno disminuye la transcripción de <i>Bach2</i> .	Muto et al., 2010
NFkB	->	AID	NF-kB se une directamente a la región promotora del gen <i>Aicda</i> , que codifica a AID, e induce su transcripción de manera concertada con PAX5 en respuesta a la estimulación por CD40.	Sciammas et al., 2006; Klein et al., 2006, Tran et al. 2010

Tabla 1 : Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B (Continuación)

Interacción			Comentarios	Referencias
PAX5	->	AID	PAX5 se une directamente al promotor de <i>Aicda</i> y regula positivamente su transcripción en conjunción con NF-kB y STAT6 que a su vez reconocen elementos de respuesta en la región reguladora de <i>Aicda</i> .	Gonda et al., 2003; Tran et al., 2010
STAT6	->	AID	STAT6 se une a sitios específicos en la región reguladora del gen <i>Aicda</i> regulando positivamente su transcripción en respuesta a la estimulación por IL-4.	Dedeoglu et al., 2004; Scheeren et al., 2005
BLIMP1	-	AID	Interacción propuesta	Este trabajo
PAX5	-	XBP1	La ausencia de PAX5 en células B maduras resulta en la activación de <i>Xbp1</i> . La sobre expresión de <i>Pax5</i> inhibe la actividad del promotor de <i>Xbp1</i> . PAX5 se une <i>in vitro</i> a secuencias reguladoras de <i>Xbp1</i> . Sin embargo, la expresión de <i>Xbp1</i> en mutantes <i>Pax5</i> ^{-/-} puede deberse a la inducción de BLIMP1 que es activador directo de <i>Xbp1</i> .	Todd et al., 2009; Reimold et al., 1996
PAX5	->	PAX5	Interacción propuesta	Este trabajo
BLIMP1	->	XBP1	<i>Xbp1</i> no se expresa en células B <i>Blimp1</i> ^{-/-} , por otra parte, <i>Blimp1</i> se expresa en niveles normales en células <i>Xbp1</i> ^{-/-} por lo que XBP1 no tiene efecto sobre <i>Blimp1</i> . La expresión ectópica de <i>Xbp1</i> favorece la secreción de anticuerpos.	Shaffer et al., 2004; Klein et al., 2006; Teng et al., 2007

Tabla 1 : Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B (Continuación)

Interacción		Comentarios	Referencias	
BLIMP1	->	IRF4	Disminución de la expresión de <i>Irf4</i> en células <i>Blimp1</i> ^{-/-} . La expresión ectópica de <i>Blimp1</i> en células de linfoma B induce la expresión de <i>Irf4</i> .	Kallies et al., 2004; Sciammas & Davis, 2004
BCL6	->	BCL6	Interacción propuesta	Este trabajo
BCR	->	ERK	La activación del BCR promueve la fosforilación de las cinasas activadas por mitógeno ERK1 y ERK2 que transducen esta señal de activación y regulan la expresión de genes involucrados en la diferenciación de los linfocitos B.	Niu et al., 1998; Yasuda et al. 2011; Yasuda et al. 2012
NFkB	->	IRF4	NF-kB se une directamente a la región promotora de <i>Irf4</i> e induce su transcripción en respuesta a la estimulación por CD40L.	Saito et al., 2007; Sciammas et al., 2006
ERK	->	BLIMP1	La estimulación por BCR es transducida por ERK1/2, se ha observado que la activación de <i>Blimp1</i> es dependiente de la fosforilación de ERK1/2.	Yasuda et al., 2011
ERK	-	PAX5	En respuesta a la activación por BCR, ERK1/2 fosforilan a PAX5 impidiendo que esta se una a las regiones promotoras de sus genes blanco.	Yasuda et al., 2012

Tabla 1 : Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B (Continuación)

Interacción			Comentarios	Referencias
ERK	⊥	BCL6	La estimulación por BCR promueve la fosforilación de BCL6 mediada por ERK1/2, lo que a su vez promueve su ubiquitinación y degradación de BCL6 por vía proteosomal.	Niu et al., 1998
STAT3	->	BLIMP1	STAT3 se une directamente al promotor de <i>Blimp1</i> en respuesta a la estimulación por IL-21.	Diehl & Schmidlin, 2008; Kwon et al., 2009
STAT5	->	BCL6	STAT5 se une directamente a un sitio en la región promotora de <i>Bcl6</i> , y promueve su transcripción en respuesta a IL-2	Scheeren et al., 2005
STAT6	->	BCL6	STAT6 reconoce sitios en el promotor de <i>Bcl6</i> , e induce su expresión en presencia de IL-4	Scheeren et al., 2005; Arguni et al., 2006
CD40	->	NFkB	La activación del receptor CD40 por su ligando CD40L promueve la activación de NF-kB que a su vez induce la expresión de <i>Irf4</i> .	Basso et. al, 2004; Saito et al., 2007
IL21R	->	STAT3	Las señales inducidas por la unión de IL-21 al receptor IL-21R son transducidas principalmente por STAT3	Kwon et al., 2009, Linterman et al., 2010 ; Zotos et al., 2010; Rankin et al., 2011
IL4R	->	STAT6	La unión de IL-4 con el receptor IL-4R activa a STAT6.	Dedoglu et al., 2004; Scheeren et al., 2005

Tabla 1 : Tabla de interacciones de la red de regulación de los linfocitos B (Continuación)

Interacción			Comentarios	Referencias
IL2R	->	STAT5	STAT5 transduce las señales provenientes principalmente de la activación por IL-2	Scheeren et al., 2005
Ag	->	BCR	La señalización por BCR es crucial para el desarrollo y diferenciación de los linfocitos B. La unión de un antígeno con los BCRs promueve su translocación y la diferenciación terminal a células PC	Schmidt et al. 2009
CD40L	->	CD40	CD40L se une al receptor CD40 en linfocitos B, es esencial para el contacto B-T	Saito et al., 2007
IL2	->	IL2R	IL-2 se une específicamente a su receptor IL-2R, IL-2 promueve el mantenimiento y proliferación de las células GC.	Linterman et al., 2010 ; Zotos et al., 2010; Rankin et al., 2011
IL4	->	IL4R	IL-4 se une específicamente a su receptor IL-4R. IL-4 favorece la formación de las células GC así como su proliferación.	Linterman et al., 2010 ; Zotos et al., 2010; Rankin et al., 2011
IL21	->	IL21R	IL-21 se une específicamente a su receptor IL-21R. IL-21 es un fuerte inductor de la diferenciación a células PC.	Linterman et al., 2010 ; Zotos et al., 2010; Rankin et al., 2011

Los linfocitos B Naive, GC y Mem expresan PAX5 (Delogu et al., 2006; Revilla-I-Domingo et al., 2012) pero no BLIMP1, que se expresa exclusivamente en las células PC (Cattoretti et al., 2005). La inactivación de PAX5 es necesaria para que se lleve a cabo la diferenciación células PC (Nera et al., 2006). A su vez, la expresión de BLIMP1 en células B maduras promueve su diferenciación a células PC (Shaffer et al., 2002).

La expresión ectópica de PAX5 en células PC inhibe la expresión de BLIMP1 y la producción de Ig (Delogu et al., 2006). PAX5 se une directamente al promotor del gen que codifica a BLIMP1, recluta complejos remodeladores de la cromatina reprimiendo la transcripción de *Blimp1* (Mora-López et al., 2007; McManus et al., 2011). Por otra parte, BLIMP1 inhibe la transcripción de *Pax5* por medio de su unión al promotor (Lin et al., 2002). En conjunto, estos datos sugieren la existencia de un circuito de retroalimentación por la inhibición mutua entre Pax5 y Blimp1.

Las células B vírgenes se diferencian a células GC, las cuales se caracterizan por la expresión del factor BCL6 que es crítico para la formación y mantenimiento de los centros germinales (Basso & Dalla-Favera, 2012; Toyama et al., 2002). La activación de BCL6 depende de la unión de un Ag con los BCRs, lo que promueve la fosforilación de p38 e induce la expresión de BCL6 (Batlle et al., 2009). No obstante, la activación del BCR no sólo promueve la inducción de BCL6 sino que también activa vías de señalización que regulan la supresión de BCL6 por diversos mecanismos permitiendo la posterior diferenciación de las células GC a células Mem y PC (Kuo et al., 2007). La translocación del BCR activa a ERK1 y ERK2 (representadas por el nodo ERK) que a su vez fosforilan a BCL6 favoreciendo su ubiquitinación y degradación por la vía proteosomal (Niu et al., 1998).

ERK1/2 fosforilan también a PAX5 impidiendo que se una a las regiones reguladoras de sus genes blanco (Yasuda et al., 2012). Además, la estimulación por linfocitos Th mediada por la interacción del receptor CD40 y su ligando CD40L activa la vía de NF- κ B e induce la transcripción de IRF4 que a su vez reprime la

transcripción de BCL6 en células GC (Saito et al., 2007). La represión de BCL6 es mantenida por la acción de BLIMP1, activado por ERK (Yasuda et al., 2011), que suprime directamente a BCL6 (Sciammas & Davis, 2004; Shaffer et al., 2002).

Por su parte, BCL6 reprime genes importantes para la diferenciación de las células PC, incluyendo BLIMP1 y IRF4 (Shaffer et al., 2000). BCL6 no se expresa en células PC que expresan BLIMP1.

Respectivamente, la expresión ectópica de BCL6 en células PC inhibe la expresión de BLIMP1 (Reljic et al., 2000). BCL6 se une directamente al promotor de *Blimp1* impidiendo su transcripción (Tunyaplin et al., 2004). La represión de BCL6 es necesaria para la formación de las células Mem (Toyama et al., 2002).

Puesto que las células Mem expresan IRF4 pero no BLIMP1, la represión de BCL6 en estas células probablemente está mediada por IRF4 (Cattoretti et al., 2006; Kuo et al., 2007). Estos datos en conjunto sugieren la existencia dos circuitos de inhibición mutua, el primero entre BCL6 y IRF4, durante la transición de células GC a células Mem, y otro entre BCL6 y BLIMP1, durante la diferenciación de células GC a células PC.

La activación y represión de estos factores y consecuentemente la diferenciación de las células GC a células Mem o PC requiere de la presencia de distintas citocinas producidas por las células Th, además de la activación de los receptores CD40 y BCR por su unión con el ligando CD40L y un antígeno, respectivamente.

IL-2 es transducida por STAT5 y es necesaria para el mantenimiento de la expresión de BCL6 en células GC y Mem (Scheeren et al., 2005). Adicionalmente, la señalización por IL-4 es transducida principalmente por STAT6 y regula positivamente a BCL6 en células GC (Arguni et al., 2006; Delogu et al., 2006). Por otra parte, IL-21 dirige la diferenciación a células PC, activando principalmente a STAT3 que regula la expresión de BLIMP1 junto con IRF4 (Diehl & Schmidlin, 2008; Kwon

et al., 2009; Zotos et al., 2010).

La maduración y selección de anticuerpos es crucial para que las células B puedan llevar a cabo su función en el sistema inmune. Por lo tanto, la regulación de los procesos de CSR y SHM en las células GC es importante para asegurar que las células que posteriormente se diferencien a células Mem o PC tengan alta afinidad por un antígeno. Algunos de los factores involucrados en el control de la diferenciación de los linfocitos B también son necesarios para CSR y SHM.

PAX5 regula la expresión de AID, una desaminasa de citidinas requerida para CSR y SHM (Muramatsu et al., 2000). PAX5 se une directamente al promotor de AID promoviendo su transcripción (Gonda et al., 2003). Sin embargo, la activación de AID depende también de la acción de BACH2, NF- κ B y STAT6. La ausencia de BACH2 impide la inducción normal de AID y promueve la activación de BLIMP1, IRF4 y XBP1 (Muto et al., 2004).

La activación de BACH2 es necesaria para la supresión de BLIMP1 (Muto et al., 2010; Ochiai et al. 2008). Así mismo, STAT6 está involucrado en la regulación de AID posiblemente en conjunción con IRF4 (Dedeoglu, 2004). IRF4 se une directamente al promotor del gen que codifica a AID, se ha propuesto que los niveles bajos de IRF4 promueven la activación de AID, mientras que los niveles altos inducen la expresión de BLIMP1, la regulación de AID por IRF4 puede ser necesaria para mantener los procesos de CSR y SHM en células Mem (Klein et al., 2006; Sciammas et al., 2006).

La diferenciación a células Mem requiere de la supresión de BCL6 (Kuo et al., 2007) así como de la ausencia de BLIMP1 y la presencia de PAX5 y IRF4 (Jourdan et al., 2009). *Irf4* es inducido por el contacto entre los linfocitos T y B mediante la activación de CD40 que es transducida por NF- κ B. NF- κ B se une directamente a sitios en la región promotora de *Irf4* regulando positivamente su transcripción (Saito et al., 2007).

La diferenciación hacia células PC depende de los factores BLIMP1, IRF4 y XBP1. BLIMP1 induce la expresión de IRF4 (Sciammas & Davis, 2004). IRF4 junto con STAT3 induce la expresión de BLIMP1 (Diehl & Schmidlin, 2008) por lo que existe un circuito de retroalimentación positiva entre IRF4 y BLIMP1. A su vez, BLIMP1 y IRF4 son necesarios para la activación de XBP1, un factor esencial para la secreción de anticuerpos, la ausencia de BLIMP1 impide la expresión de XBP1 (Shaffer et al., 2004), en ausencia de IRF4 no se produce la forma activa de la proteína codificada por *Xbp1* (Klein et al., 2006). Se sabe además que la ausencia de PAX5 en células GC resulta en la activación de *Xbp1*.

El restablecimiento de PAX5 inhibe la expresión de XBP1, posiblemente de manera indirecta por la represión de BLIMP1. Sin embargo, la proteína codificada por *Pax5* se une *in vitro* a secuencias reguladoras de *Xbp1*, lo que implica un posible papel de PAX5 en la represión de XBP1 (Reimold et al., 1996; Todd et al., 2009).

4.3 La red de regulación de los linfocitos B como un sistema dinámico Booleano

Cada tipo celular de linfocitos B se distingue por un patrón de expresión de factores transcripcionales maestros que, además de servir como marcadores moleculares, participan en la regulación de diferentes procesos celulares, entre ellos el mantenimiento de la identidad celular, generación y secreción de anticuerpos, ciclo celular, entre otros (Nutt et al., 2011). Debido su importancia en estos procesos y para estudiar la manera en que estos factores controlan la formación de múltiples destinos celulares, en primer lugar se construyó un modelo mínimo de red que incorpora únicamente a los factores transcripcionales maestros y las interacciones entre estos (Figura 10).

En conjunción con la inferencia arquitectura de la red y para la construcción del modelo Booleano se infirieron las reglas lógicas necesarias para determinar el funcionamiento de cada uno de los nodos de la red. Dichas reglas capturan las relaciones

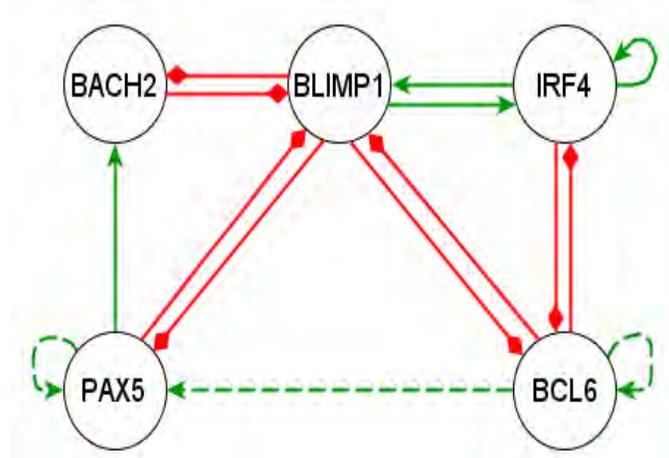


Figura 10: Modelo mínimo de la red de regulación.

Para estudiar el papel de los factores transcripcionales reportados como reguladores maestros en la diferenciación de los linfocitos B, se construyó un modelo mínimo de red que incorpora únicamente nodos correspondientes a los factores de transcripción así como las interacciones entre estos. En líneas continuas de color rojo con extremos de diamante se representan las relaciones de inhibición entre los nodos de la red, en flechas verdes las relaciones de activación, mientras que en líneas discontinuas se representan las interacciones no reportadas predichas para este modelo.

de regulación entre las diferentes moléculas que conforman a la red (Tablas 2 y 3).

Para elaborar las reglas lógicas se hace uso de los operadores lógicos AND, OR y NOT. Si el estado de activación de un nodo depende de uno o varios reguladores, entonces pueden relacionarse por medio del operador OR, esto implica que los reguladores pueden tener el mismo efecto sobre un nodo, es decir, la presencia de cualquiera de los reguladores puede resultar en la activación o inhibición del nodo regulado. Por otra parte, si el cambio en la expresión de uno de los componentes de la red depende de la acción simultánea de varios reguladores, como puede ser en el caso en que dos moléculas formen un dímero, entonces la lógica de esta relación se expresa por medio del operador AND. Finalmente, la inhibición se representa utilizando la función NOT (Figura 7).

nodos	Reglas lógicas
PAX5	$((PAX5 \mid BCL6) \& !BLIMP1) \mid$ $!(IRF4 \mid BLIMP1 \mid BCL6 \mid BACH2)$
BCL6	$BCL6 \& !(BLIMP1 \mid IRF4)$
BLIMP1	$IRF4 \& !(PAX5 \mid BCL6 \mid BACH2)$
IRF4	$(IRF4 \mid BLIMP1) \& !BCL6$
BACH2	$PAX5 \& !BLIMP1$

Tabla 2: Reglas lógicas para el modelo mínimo.

Se construyó un modelo mínimo para estudiar el papel de los factores de transcripción que conforman a la red de regulación y actúan como reguladores maestros del proceso de diferenciación de los linfocitos B. Este modelo incorpora las reglas lógicas de activación entre los distintos factores.

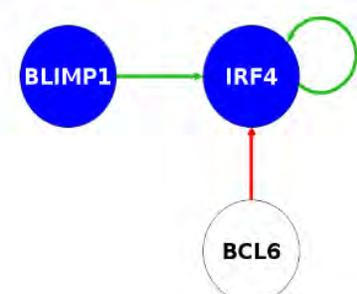
Puede considerarse el siguiente ejemplo para la inferencia de una regla lógica:

$$IRF4 = (IRF4 \text{ OR } BLIMP1) \text{ AND NOT } BCL6$$

Esta regla determina el estado de activación del nodo IRF4 y captura la lógica de regulación que existe entre los factores IRF4, BLIMP1 y BCL6. El factor BLIMP1 es un activador transcripcional de IRF4 (Kallies et al., 2004; Sciammas & Davis, 2004). A su vez, IRF4 regula de manera positiva su propia expresión (Shaffer et al., 2008), mientras que el factor BCL6 es un represor transcripcional de IRF4 (Gupta et al., 1999; Ci et al. 2009). Por lo tanto, para que en el modelo Booleano el nodo que representa al factor IRF4 se active, es necesario que también esté activo alguno de los nodos BLIMP1 o IRF4 y que a su vez el nodo BCL6 no esté encendido. De esta manera pueden analizarse todas las posibles combinaciones de estados de los nodos reguladores que resultan en la activación de cada uno de sus nodos blanco, lo que permite generar una tabla de transición para todos los nodos de la red (Figura 11).

Una vez que se ha propuesto un conjunto de reglas lógicas, estas determinarán el estado de todo el sistema en el tiempo siguiente a partir de su estado inicial. El sistema se actualizará siguiendo estas reglas a partir de todos los estados iniciales posibles

IRF4(t)	BLIMP1 (t)	BCL6 (t)	IRF4 (t+1)
0	0	0	0
0	0	1	0
0	1	0	1
0	1	1	0
1	0	0	1
1	0	1	0
1	1	0	1
1	1	1	0



IRF4 = (IRF4 OR BLIMP1) AND NOT BCL6

Figura 11: Inferencia de las reglas lógicas.

hasta alcanzar distintos atractores. Los atractores pueden luego ser comparados con los estados en el equilibrio observados experimentalmente para el sistema biológico de interés. Cabe mencionar que para la construcción del modelo Booleano se hace uso tanto de la arquitectura de la red como de las reglas lógicas de regulación (Figura 11).

Las reglas lógicas determinan los cambios en la activación de cada uno de los nodos de la red en función de los nodos que lo regulan. Estas reglas incorporan la información disponible referente a la naturaleza de activación o inhibición de los reguladores de un factor transcripcional en particular. De todos los estados iniciales de activación posibles de los nodos reguladores, únicamente algunas combinaciones de ellos promoverán la activación del nodo que regulan en el tiempo siguiente. En la parte superior se muestra la regla lógica de regulación inferida para el factor IRF4, esta regla define las combinaciones de los reguladores (IRF4, BLIMP1 y BCL6) que

dan lugar a la activación de IRF4 de entre todas los estados de activación posibles, recuadros grises en tabla izquierda. En color azul se representan los nodos que se encuentran en un estado activo, mientras que el color blanco representa un nodo inactivo.

4.4 Comportamiento del modelo Booleano

Para estudiar el comportamiento dinámico de la red de regulación inferida, se consideró que el estado de un nodo X_i en el tiempo t depende de los estados actuales de los otros nodos de la red, esta dependencia se expresa como una función booleana de sus N reguladores en el tiempo anterior, tal que:

$$X_{t+1} = f(A_t, B_t, C_t, \dots)$$

Para realizar las simulaciones del modelo y obtener los estados estables de la red, se utilizó el paquete “*BoolNet*” del lenguaje de programación R (Müssel et al., 2010), el cual implementa diferentes herramientas que permiten el análisis y la visualización de redes Booleanas. La red de los linfocitos B se simuló de manera síncrona, es decir, se asume que todos los genes de la red se actualizan al mismo tiempo, esta simplificación facilita el análisis de las redes.

Las redes booleanas síncronas consisten de un conjunto de variables booleanas X , las cuales representan a los genes, y un conjunto de funciones lógicas por cada variable. Estas funciones transforman un valor de entrada del conjunto de genes X a un valor booleano, 0 o 1. El estado de la red es un vector de valores para cada una de las variables en X . El siguiente estado de la red es calculado aplicando todas las funciones de transición al estado actual.

Para encontrar los atractores de la red se utilizó la función *getAttractors()* de BoolNet (Müssel et al., 2010), esta función realiza una búsqueda exhaustiva, a partir de todos los estados iniciales posibles de activación de la red y aplica de manera síncrona las funciones lógicas de transición para cada nodo de la red hasta alcanzar un

estado estacionario, ya sea de punto fijo o cíclico, es decir, hasta alcanzar un atractor.

A partir de los resultados obtenidos, se clasificó cada atractor de acuerdo a si su patrón de activación correspondía con alguno de los patrones de expresión genética de tipo silvestre reportados experimentalmente para los tipos celulares Naive, GC, Mem y PC, y se determinó el tamaño de la cuenca de atracción correspondiente a cada punto estacionario.

4.5 Análisis de mutantes

Asimismo, se analizó el efecto de diversas perturbaciones en la red, para ello se estudió el comportamiento de la red bajo condiciones de ganancia o pérdida de función para cada uno de sus nodos, simulando el efecto de mutantes de expresión constitutiva o mutantes nulas de los factores PAX5, BCL6, BLIMP1, IRF4 y BACH2; para las simulaciones de ganancia de función se determinó el valor constante de 1 para un nodo utilizando la función *fixGenes()* del paquete BoolNet (Müssel et al., 2010), de esta manera se representó la activación constitutiva de un gen y se buscaron todos los atractores del sistema de manera exhaustiva.

Respectivamente, la pérdida de función se simuló fijando el valor de cada nodo como 0, es decir, se consideró que un gen de la red de regulación permanece inactivo debido al efecto de mutaciones o algún otro mecanismo que interrumpa su función.

4.6 Respuesta a señales externas

Posteriormente, se estudió el comportamiento dinámico de la red ante la presencia de distintos estímulos ambientales, tales como las señales provenientes de los linfocitos T cooperadores, que dirigen el proceso de diferenciación celular hacia los diferentes destinos. Para realizar estas simulaciones, se incluyeron en el modelo las reglas lógicas de activación para los nodos correspondientes a las entradas de la red por lo que se consideraron los estímulos como resultado de la unión de un antígeno al BCR de las

células B, el contacto con los linfocitos T cooperadores mediado por el receptor CD40, así como la presencia de las interleucinas IL-2, IL-4, IL-21 y la transducción de estas señales por ERK, NFκB, STAT5, STAT6 y STAT3, (Tabla 3). Las interacciones y la evidencia que las soporta también se muestran en la Tabla 1.

Para simplificar el modelo, se agruparon los elementos de la red que representan la presencia de una señal externa con los que representan a los receptores de estas señales. Por ejemplo, la unión de un antígeno, nodo Ag en la Figura 9, con el receptor de las células B, BCR, se representó en el modelo extendido por medio del nodo BCR. A continuación se muestra una lista con los elementos agrupados:

- **BCR: Ag, BCR.** Se representa la activación del BCR por su unión con un antígeno (Ag), lo que promueve la activación de los linfocitos B y su rápida diferenciación a células productoras de anticuerpos (Schmidt et al., 2009).
- **CD40: CD40L, CD40.** Unión del ligando CD40L con el receptor de los linfocitos B CD40 simulando la interacción entre los linfocitos B y Th mediada por estos receptores (Saito et al., 2007).
- **IL21: IL21, IL21R.** Representa la unión de la citocina IL-21 al receptor IL-21R, esta unión promueve la diferenciación de las células precursoras y de memoria a células productoras de anticuerpos (Ettinger et al., 2005).
- **IL2: IL2, IL2R.** La unión de IL-2 al receptor IL-2R induce la proliferación celular de los linfocitos B (Scheeren et al., 2005).
- **IL4: IL4, IL4R.** La activación del receptor IL-4R por IL-4 promueve la supervivencia de los linfocitos B durante la reacción de los centros germinales (Dedeoglu, 2004).

Para estudiar el comportamiento de la red bajo diferentes señales extracelulares, se incluyeron en el conjunto de reglas lógicas aquellas relacionadas con la activación de los nodos correspondientes a las entradas de la red. Estas reglas representan las diferentes señales brindadas por los linfocitos T cooperadores, como IL-2, IL-4, IL-21

Nodos	Reglas lógicas
PAX5	$((\text{PAX5} \mid \text{BCL6}) \& \! (\text{BLIMP1} \mid \text{ERK}) \mid \! (\text{IRF4} \mid \text{BLIMP1} \mid \text{BCL6} \mid \text{BACH2}))$
BCL6	$(\text{STAT5} \mid \text{STAT6} \mid \text{BCL6}) \& \! (\text{BLIMP1} \mid \text{IRF4} \mid \text{ERK})$
BLIMP1	$\text{IRF4} \& \! (\text{PAX5} \mid \text{BCL6} \mid \text{BACH2})$
IRF4	$(\text{NFkB}) \mid ((\text{IRF4} \mid \text{BLIMP1}) \& \! \text{BCL6})$
BACH2	$\text{PAX5} \& \! \text{BLIMP1}$
AID	$(\text{STAT6} \mid (\text{NFkB} \& \text{PAX5})) \& \! \text{BLIMP1}$
XBP1	$\text{BLIMP1} \& \! \text{PAX5}$
STAT3	IL21
STAT5	IL2
STAT6	IL4
NFkB	CD40
ERK	BCR

Tabla 3: Reglas lógicas para el modelo completo.

y CD40, además se incluyó la activación de los linfocitos B debida al reconocimiento de un antígeno por el BCR.

4.7 Análisis de perturbaciones

Finalmente, para lograr un análisis más completo sobre las rutas de diferenciación entre los destinos celulares Naive, GC, Mem y PC, se realizó un análisis de perturbación de la red de regulación en el que, tomando como punto de partida un atractor, se alteró el valor de cada uno de los nodos durante un tiempo de actualización en las simulaciones, es decir, se intercambió su valor de 0 a 1 o viceversa durante una unidad de tiempo con la finalidad de encontrar pequeños cambios capaces de llevar a la red de un atractor a otro. Con base en los resultados de estas simulaciones se infirió un mapa de destinos.

5. RESULTADOS

Con el propósito de entender cómo se establecen los patrones de expresión característicos durante la diferenciación de los linfocitos B Naive a células GC, Mem y PC, se construyó un modelo Booleano con base en la información reportada en la literatura (Tabla 1). La red reconstruida incorpora las principales interacciones entre las moléculas que participan en este proceso (Figura 9). De igual manera, se infirieron las reglas lógicas de activación que capturan la naturaleza reguladora de los componentes de la red (Tablas 2 y 3).

5.1 Los atractores obtenidos por el modelo Booleano recuperan los patrones de expresión reportados en la literatura para el tipo silvestre

En primer lugar se analizó de manera exhaustiva el modelo mínimo que incorpora únicamente a los factores de transcripción (Figura 10), y se determinaron los estados estables del sistema. Se encontraron cuatro puntos estables fijos, los cuales corresponden con los patrones de expresión característicos de los cuatro tipos celulares de linfocitos B: Naive, GC, Mem y PC, por lo que puede considerarse que el modelo mínimo de red booleana describe los patrones de expresión observados experimentalmente para estos destinos celulares (Figura 12).

Es importante mencionar que únicamente se obtuvieron estos cuatro atractores los cuales, al ser consistentes con los patrones de expresión reportados en la literatura soportan la idea de que esta red de regulación es suficiente y necesaria para controlar el establecimiento de los patrones de expresión característicos durante la diferenciación terminal de los linfocitos B, lo que valida parcialmente este modelo.

Al simular el modelo mínimo de manera síncrona y exhaustiva, se obtuvieron cuatro atractores de punto fijo. Estos atractores corresponden con los patrones de expresión genética reportados experimentalmente para los tipos celulares silvestres

Atractores	Nodos				
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2
Naive	1	0	0	0	1
GC	1	1	0	0	1
Mem	1	0	0	0	1
PC	0	0	1	1	0

Figura 12: Atractores silvestres obtenidos a partir del modelo mínimo.

Atractor	Tamaño de la cuenca (%)
Naive	50
GC	12.5
Mem	6.25
PC	31.25

Tabla 4: Proporción de estados asociados con un atractor.

Se muestra el tamaño de las cuencas de atracción para cada uno de los atractores obtenidos, los destinos celulares Naive y PC presentan una mayor proporción de estados asociados, lo que sugiere que poseen mayor estabilidad ante posibles perturbaciones.

Naive, GC, Mem y PC. Los nodos activos en el atractor se representan con un valor de 1, cajas oscuras, y 0 si su estado es inactivo, cajas claras.

Asimismo, se determinó la proporción de estados iniciales que llegan a cada uno de los atractores (Tabla 4). Se ha sugerido que una mayor proporción de estados asociados con un atractor, es decir una mayor cuenca de atracción, confieren mayor estabilidad a los destinos celulares ante posibles perturbaciones (Huang, 2009).

En el modelo mínimo los puntos estables con una mayor cuenca de atracción corresponden a los tipos celulares Naive y PC. Esto sugiere que un gran número de

estados iniciales pueden llevar a los destinos Naive y PC mientras que una menor proporción de estados puede llevar a los destinos GC y Mem.

Por lo tanto los destinos celulares Naive y PC podrían ser más robustos a perturbaciones debido a que los cambios que llevaran al sistema hacia otros estados podrían ser fácilmente amortiguados por la red de regulación y dirigirse hacia los destinos celulares Naive y PC nuevamente, mientras que los puntos estables GC y Mem con una menor cuenca de atracción podrían ser llevados a otros destinos celulares al ser menos robustos ante cambios en los estados de activación de la red.

5.2 Análisis de mutantes

Para analizar el comportamiento de la red ante posibles perturbaciones, se estudió el efecto de todas las mutantes bajo condiciones de ganancia o pérdida de función para cada nodo de la red y se analizaron todos los atractores obtenidos. Para ello, se llevó a un valor constante de 0 o 1 en las simulaciones dependiendo si la mutante era nula o de expresión constitutiva respectivamente. El efecto de la activación constitutiva o la pérdida de función para cada nodo se resume en la Tabla 5.

Como se muestra en la Tabla 5, los atractores obtenidos para cada mutante pueden agruparse en diferentes categorías de acuerdo a sus cambios respecto a los atractores silvestres. En primer lugar, existen dos mutantes simuladas (BCL6-, PAX5+) en las que se pierde uno de los atractores silvestres. Por otra parte, la activación constitutiva de BCL6 y BLIMP1 da lugar a la pérdida de tres de los cuatro atractores silvestres y de manera similar la expresión constitutiva del nodo IRF4 promueve la pérdida de los atractores correspondientes a los tipos progenitores Naive y GC, mientras que su inactivación total impide la formación de los tipos efectoros Mem y PC.

Las simulaciones para las mutantes PAX5+ y BACH2+ muestran la pérdida del

Mutante	Efecto de la mutación simulada
BCL6-	Pérdida del atractor GC
PAX5+, BACH2+	Pérdida del atractor PC
BCL6+	Pérdida de los atractores Naive, Mem y PC
BLIMP1+	Pérdida de los atractores Naive, GC y PC
IRF4+	Pérdida de los atractores Naive y GC
IRF4-	Pérdida de los atractores Mem y PC
BACH2+, BACH2-, PAX5+	Se encuentra un atractor similar al tipo Naive
BACH2+, BACH2-	Se encuentra un atractor similar al tipo Mem
BACH2-, PAX5-	Se encuentra un atractor similar al tipo GC
BLIMP1-	Se encuentra un atractor similar al tipo PC

Tabla 5: Comportamiento de la red para todas las mutantes simuladas.

Se simuló el efecto de las mutantes de ganancia y pérdida de función para cada nodo de la red. Todos los atractores obtenidos para las diferentes mutantes se muestran con mayor detalle en el texto.

atractor tipo PC debido a la represión constante de PAX5 o BACH2 sobre BLIMP1, asimismo, las mutaciones en BACH2 reemplazan los atractores silvestres por atractores similares, esto sugiere que la red es robusta ante los cambios en BACH2, pero que la función de BACH2 es complementaria a la de PAX5 impidiendo la diferenciación a células PC.

La pérdida de BLIMP1 impide la formación de las células PC pero no afecta la diferenciación hacia los otros destinos celulares. De manera interesante, en las simulaciones de mutantes nulas BLIMP1-, se encuentra un atractor similar al PC en el que se expresa únicamente IRF4, este atractor es similar a un estado de diferenciación transitorio correspondiente a los plasmablastos, que son los precursores de las células PC (Kallies et al., 2007), esto soporta la idea de que BLIMP1 no es necesario para iniciar ella diferenciación terminal de los linfocitos B pero si para su mantenimiento y que además la inducción hacia el destino PC está mediada por la activación de IRF4.

A continuación se muestran con mayor detalle los resultados obtenidos en las

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	1	0	0	0	1	Naive
2	1	1	0	0	1	GC
3	1	0	0	1	1	Mem

Figura 13: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de PAX5. (PAX5 = 1).

simulaciones para la ganancia o pérdida de función de cada uno de los nodos de la red en el modelo Booleano mínimo.

5.2.1 Mutantes de expresión constitutiva.

En las simulaciones donde se expresa de manera constitutiva el nodo correspondiente a PAX5, se mantiene con un valor constante de 1, se obtuvieron unicamente tres atractores (Figura 13). Estos atractores coinciden con los patrones de expresión característicos de las células Naive, GC y Mem. A diferencia de los atractores de tipo silvestre (Figura 12), la activación permanente del nodo PAX5 resulta en la desaparición del atractor de las células PC. Se ha reportado que la expresión constitutiva de *Pax5* reprime diferenciación terminal a células PC, por lo que la pérdida del atractor PC en las simulaciones es consistente con los datos experimentales (Mora-lópez et al., 2007; Usui et al., 1997).

En las simulaciones para la expresión constitutiva de BCL6 se obtuvo un único atractor (Figura 14). Este atractor corresponde al patrón de expresión de las células GC. La pérdida de los atractores Mem y PC es consistente con la información disponible donde la expresión constitutiva de BCL6 en células B maduras impide su diferenciación terminal a células Mem o PC (Reljic et al., 2000; Shaffer et al., 2000).

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	1	1	0	0	1	GC

Figura 14: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de BCL6. (BCL6 = 1).

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	0	0	1	1	0	PC

Figura 15: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de BLIMP1. (BLIMP1 = 1).

Además, la expresión de Bcl6 induce la formación y el mantenimiento de las células GC a partir del progenitor Naive (Duy et al., 2010).

Por otra parte, al simular el efecto de la expresión constitutiva de BLIMP1, se obtuvo únicamente un atractor (Figura 15). Este atractor corresponde al patrón de expresión de las células PC. Esto sugiere que la presencia constante de BLIMP1 evita la activación de los otros factores en la red y lleva a la red a un solo estado estacionario, lo que a su vez concuerda con experimentos *in vivo* e *in vitro* en los que la expresión de BLIMP1 es suficiente y necesaria para inhibir directamente la expresión de PAX5 y BCL6 promoviendo la diferenciación de las células B maduras a células PC (Turner et al., 2010; Mora-lópez et al., 2007; Lin et al., 2002).

De igual manera, se analizó el efecto de la ganancia de función de IRF4 sobre el comportamiento de la red y se encontró que la activación constante de este nodo da lugar únicamente a dos puntos estacionarios fijos que coinciden con los patrones de

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	1	0	0	1	1	Mem
2	0	0	1	1	0	PC

Figura 16: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de IRF4. (IRF4 = 1).

expresión de las células Mem y PC (Figura 16). Esto sugiere que la activación de IRF4 promueve el establecimiento de los patrones de activación característicos de los tipos celulares efectoros y concuerda con las observaciones reportadas donde la expresión de IRF4 promueve la diferenciación de las células Naive o GC a células de memoria o plasmáticas (Sciammas et al., 2006; Teng et al., 2007).

Alternativamente, se analizó el efecto de la expresión constitutiva de BACH2. Se obtuvieron cinco atractores de punto fijo (Figura 17), tres de los cuales coinciden con los patrones de expresión reportados para los tipos celulares Naive, GC y Mem. La desaparición del estado estable de las células PC es consistente con la información disponible en la literatura donde se ha reportado que la activación de BACH2 promueve la inhibición de BLIMP1 e impide la diferenciación de los linfocitos B hacia el tipo terminal PC (Ochiai et al., 2006).

No obstante, pese a que los otros dos atractores obtenidos son semejantes a los atractores Naive y Mem, respectivamente, no describen exactamente los patrones característicos de estos tipos celulares, lo que sugiere que la activación constitutiva de BACH2 podría dar lugar a la formación de un estado celular en el que no es necesaria la presencia de PAX5 ni BCL6 en conjunción con la ausencia de BLIMP1. Se ha sugerido que durante la transición a células PC y Mem, la expresión de PAX5 y BCL6 disminuye (Kallies et al., 2007). Por lo tanto, la inhibición de BLIMP1 durante

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	0	0	0	0	1	otro
2	1	0	0	0	1	Naive
3	1	1	0	0	1	GC
4	0	0	0	1	1	otro
5	1	0	0	1	1	Mem

Figura 17: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión constitutiva de BACH2. (BACH2 = 1).

esta etapa podría estar mediada por BACH2 (Muto et al., 2010).

5.2.2 Mutantes de expresión nula

En conjunción con los análisis de mutantes de expresión constitutiva, también se estudió el efecto de la expresión nula para cada uno de los nodos de la red. Para ello, se simuló la pérdida de función un nodo asignando a este un valor constante de 0 durante toda la simulación.

En primer lugar se analizó el comportamiento de la red bajo la eliminación de PAX5 y se obtuvieron tres puntos estables fijos (Figura 18). Uno de estos atractores coincide con el patrón de activación de las células PC, lo que es consistente con lo reportado en la literatura donde la pérdida de PAX5 en células Naive o GC promueve la activación de BLIMP1 y la rápida diferenciación a células PC (Nera et al., 2006). Por otra parte, los otros dos atractores obtenidos corresponden a estados no determinados. Se ha reportado que la eliminación condicional de PAX5 en células B maduras abate completamente su diferenciación a etapas posteriores (Horcher et al.,

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	0	0	0	0	0	otro
2	0	1	0	0	0	otro
3	0	0	1	1	0	PC

Figura 18: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de PAX5. (PAX5 = 0).

2001) , por lo que estos atractores podrían corresponder a estados de no respuesta de las células B.

Asimismo, se simuló el efecto de la pérdida de función del nodo BCL6. Se obtuvieron tres estados estacionarios de punto fijo (Figura 19), estos concuerdan con los patrones de expresión de las células Naive, Mem y PC. Por lo tanto, la ausencia de BCL6 resulta en la desaparición del atractor de las células GC y es consistente con las observaciones donde la pérdida de BCL6 impide la formación de las células GC pero no la maduración de los otros tipos celulares (Toyama et al., 2002) y soporta la idea acerca de que BCL6 es esencial para el correcto establecimiento y función de los centros germinales (Dent, 1997; Duy et al., 2010).

Como resultado de la inactivación permanente de BLIMP1 durante las simulaciones, se encontraron específicamente cuatro atractores (Figura 20). Tres de ellos corresponden a los patrones de expresión de los tipos celulares Naive, GC y Mem, mientras que el cuarto punto estacionario es similar al patrón de expresión de las células PC. La existencia de este atractor sugiere que la diferenciación a células PC no depende estrictamente de la expresión de BLIMP1 sino también de la presencia de IRF4. Se ha reportado que durante la transición de las células GC a células PC , en plasmablastos, que son los precursores inmediatos de las células PC, la represión

Atractor	Nodos				Tipo Celular	
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4		BACH2
1	1	0	0	0	1	Naive
2	1	0	0	1	1	Mem
3	0	0	1	1	0	PC

Figura 19: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de BCL6. (BCL6 = 1)

de BCL6 está mediada por IRF4 que a su vez promueve la activación de BLIMP1 (Klein et al., 2006).

También se ha observado que la inactivación de BLIMP1 impide la diferenciación terminal a células PC, pero no abate la formación de los tipos celulares Naive, GC, Mem y plasmablastos (Sciammas et al., 2006; Kallies & Nutt, 2007).

De igual manera, se estudió el efecto de la pérdida de función del IRF4 sobre el comportamiento de la red. Se obtuvieron dos atractores fijos que corresponden a los tipos celulares Naive y GC (Figura 21), lo que sugiere que la activación de IRF4 es necesaria para la formación de las células Mem y PC. Esto coincide con las observaciones reportadas donde la inactivación de Irf4 abate la diferenciación terminal de los linfocitos B (Mittrucker, 1997; Klein et al., 2006).

Finalmente, se analizó el efecto de la pérdida de función del nodo BACH2. Como resultado de las simulaciones se obtuvieron únicamente cuatro atractores (Figura 22), los cuales, a excepción de la ausencia de BACH2, son similares a los patrones de expresión de las células Naive, GC, Mem y PC.

El hecho de que tanto la delección como la expresión constitutiva de BACH2 no afecte drásticamente el establecimiento de estos patrones de expresión en comparación con los de tipo silvestre sugiere que su función no es esencial para la formación

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	1	0	0	0	1	Naive
2	1	1	0	0	1	GC
3	0	0	0	1	0	otro
4	1	0	0	1	1	Mem

Figura 20: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de BLIMP1. ($BLIMP1 = 0$).

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	1	0	0	0	1	Naive
2	1	1	0	0	1	GC

Figura 21: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de IRF4. ($IRF4 = 0$).

Atractor	Nodos					Tipo Celular
	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	
1	1	0	0	0	0	Tipo Naive
2	1	1	0	0	0	Tipo GC
3	1	0	0	1	0	Tipo Mem
4	0	0	1	1	0	PC

Figura 22: Atractores de la red obtenidos bajo una mutante de expresión nula de BACH2. (BACH2 = 0)

de estos tipos celulares, sin embargo, esto no excluye su participación como regulador durante la diferenciación de los linfocitos B. Como se ha reportado, BACH2 es importante para la represión de BLIMP1 (Ochiai et al., 2006) y se ha sugerido que juega un papel importante durante la diferenciación terminal de los linfocitos B al evitar la rápida diferenciación a células PC y al mismo tiempo permitir que se lleve a cabo el mejoramiento de la afinidad de los anticuerpos (Muto et al., 2010).

5.3 Respuesta a señales extracelulares

Posteriormente se analizó el comportamiento de la red bajo la presencia de señales extracelulares específicas, las cuales en condiciones fisiológicas son provistas por los linfocitos T cooperadores y en conjunción con la activación por un antígeno, favorecen la diferenciación de los linfocitos B. Para ello se amplió el modelo mínimo de la red (Figura 9) ; (Tabla 3), de manera que se incorporaran las reglas de activación para las citocinas IL-2, IL-4 e IL-21 así como los receptores CD40 y BCR. Cada señal es transducida a su vez por STAT5, STAT6, STAT3, NFkB y ERK respectivamente, y afectan directamente la actividad de los factores transcripcionales maestros estudiados en el modelo mínimo.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFKB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
3	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0

Figura 23: Estimulación de células Naive por la presencia de la citocina IL-2. Se observa el comportamiento de la red bajo la presencia de un pulso constante de IL-2. A partir del atractor de las células Naive la red transita por diferentes estados hasta llegar al atractor de las células GC.

Para ello, se realizaron distintas simulaciones en las que a partir de un atractor de tipo silvestre, Naive, GC, Mem o PC, se mantuvo un pulso constante de las señales que dirigen el proceso de diferenciación, es decir, se simuló la presencia de una señal externa como: la unión del receptor BCR con un antígeno (Ag), la presencia de citocinas (IL-2, IL-4 o IL-21) así como la interacción directa entre los linfocitos T y B por la unión del ligando CD40L con el receptor CD40, respectivamente. Una vez dado este pulso, se observaron los atractores a los que llegaba la red después de varios pasos de actualización.

5.3.1 Estimulación de células Naive

Como se menciona anteriormente, las interleucinas IL-2 e IL-4 son importantes para la formación y el mantenimiento de los centros germinales (LeGallou et al., 2012; Scheeren et al., 2005), por lo tanto se simuló el efecto de un pulso constante de estas interleucinas sobre las células Naive. Se observó que la presencia de IL-2 favorece la transición del tipo celular Naive al GC. Además, la estimulación por IL-4 a partir del atractor Naive promueve la activación de AID mediante la inducción de STAT6, de manera consistente con lo ya reportado (Dedeoglu, 2004) (Figuras 23 y 24).

También se analizó el comportamiento de la red a partir del estado de las células Naive por la estimulación del BCR. En congruencia con lo reportado en la literatu-

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
3	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

Figura 24: Estimulación de células Naive por la presencia de la citocina IL-4. Se observa el comportamiento de la red bajo la presencia de un pulso constante de IL-4. A partir del atractor de las células Naive la red transita por diferentes estados hasta llegar al atractor de las células GC.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
4	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Figura 25: Estimulación de células Naive mediada por la activación del BCR. Se observa el comportamiento de la red bajo la presencia de un pulso constante de BCR, simulando su activación por un antígeno. Esta señal promueve la transición del atractor de las células Naive hacia el atractor de las células PC.

ra, la activación del BCR favorece la rápida diferenciación a células PC (Niu et al., 1998), (Figura 25).

Además de la señalización por BCR, IL-2 e IL-4 para la diferenciación de las células Naive, se estudió el efecto de la señalización por CD40 e IL-21 que favorecen la diferenciación terminal de los progenitores Naive, como se ha reportado en modelos *in vitro* e *in vivo* (Ding et al., 2013; Ettinger et al., 2005; Kwakkenbos et al., 2010), corroborando que estas señales son capaces de dirigir la formación a células Mem y PC respectivamente a partir del progenitor Naive (Figuras 26 y 27).

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFKB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
5	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Figura 26: Estimulación de células Naive por IL-21. La presencia de IL-21 promueve la diferenciación de células Naive a PC. Se observa como la red transita por diferentes estados debido a la estimulación por IL-21 hasta alcanzar el atractor de las células PC.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFKB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
3	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

Figura 27: Estimulación de células Naive por CD40. La estimulación constante de CD40 en células Naive promueve la diferenciación a células Mem.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
4	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Figura 28: Diferenciación de las células GC por la activación de BCR. La estimulación constante de BCR en células GC promueve su diferenciación a células PC.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
5	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Figura 29: Estimulación de células GC con IL-21. La red transita del atractor de las células GC hacia el de las células PC bajo la presencia de IL-21.

5.3.2 Estimulación de células GC

De igual manera, se estudió el efecto de señales externas sobre el comportamiento de la red para cada uno de los otros tipos celulares: GC, Mem y PC.

Se corroboró que la señalización por BCR, así como la presencia de IL-21, induce la diferenciación de las células GC en células PC (Figuras 29 y 30), consistente con lo ya reportado (Zotos et al., 2010; Niu et al., 1998; Ding et al., 2013).

Por otra parte, se observó que la presencia de CD40 en células GC induce su diferenciación a células Mem (Figura 30). Esto coincide con la información disponible en la literatura donde la estimulación por CD40 promueve la supervivencia de las células GC y favorece la formación de células de memoria (Toyama et al., 2002; Basso et al., 2004), y que además, en presencia de la activación por BCR o IL-21 promueve la diferenciación terminal de los linfocitos B (Ding et al., 2013; Rankin et al., 2011).

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
3	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
4	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

Figura 30: Estimulación de células GC por la señal de CD40. La activación de CD40 promueve la formación de células Mem a partir de células GC.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0

Figura 31: Estimulación de células GC por IL-2. La activación de IL-2 no induce la transición del atractor de las células GC hacia algún atractor de los otros tipos celulares, lo que sugiere que este tipo celular es estable y su diferenciación requiere de la presencia de otras señales específicas.

De manera interesante, se observó que las señales conocidas como de mantenimiento de los centros germinales IL-2 e IL-4 (Roy et al., 2002), no inducen cambios en los estados de la red a partir del atractor de las células GC (Figuras 32 y 33), lo que sugiere que este tipo celular es estable y su diferenciación requiere de la presencia de otras señales específicas. No obstante, la presencia de IL4 promueve la activación de AID en células GC, lo que es consistente con la información reportada referente a la participación de IL-4 en la regulación de la recombinación de cambio de clase y maduración de la afinidad de los anticuerpos mediada por AID (Dedeoglu, 2004).

5.3.3 Estimulación de células Mem

Se analizó también el comportamiento de la red bajo las mismas señales extracelulares a partir del atractor de las células Mem y se encontró que la activación de BCR así como la activación por IL-21 inducen la transición de las células Mem al atractor de las células PC (Figuras 34 y 35), lo que concuerda con los modelos

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
3	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

Figura 32: Estimulación de células GC por IL-4. La activación de IL4 no induce la transición del atractor de las células GC hacia algún atractor de los otros tipos celulares. No obstante, se observa que la presencia de IL4 induce la activación de AID, lo que promueve los eventos de CSR y SHM en células GC, consistente con la información reportada en (Dedeoglu, 2004).

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
3	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
4	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Figura 33: Estimulación de células Mem por la activación de BCR. La activación del BCR en células Mem induce su diferenciación a células PC.

experimentales donde la estimulación por IL-21 induce la diferenciación terminal de las células Mem (Ettinger et al., 2005; Karnell & Ettinger, 2012; Rankin et al., 2011).

Además, se observó que la presencia de señales como IL-2 e IL-4, que normalmente juegan un papel importante en la diferenciación de las células GC a células Mem, pero no tienen un efecto sobre la diferenciación de las células Mem a otros tipos celulares (Roy et al., 2002), no inducen ningún cambio en el comportamiento de la red que promueva la transición del punto estacionario de las células Mem hacia algún otro (Figuras 36 y 37).

Por otra parte, la señalización por CD40, que a su vez es importante para la formación de las células Mem y la regulación de AID mediada por la activación de NF-kB (Dedeoglu, 2004; Basso et al., 2004), mantiene al sistema en el mismo atrac-

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
5	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Figura 34: Estimulación de células Mem por la activación de IL-21. La presencia de IL-21 promueve la diferenciación de las células Mem a células PC.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0

Figura 35: Estimulación de células Mem por la activación de IL-2. La presencia de IL-2 no induce la transición del atractor de las células Mem al de algún otro tipo celular.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
3	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

Figura 36: Estimulación de células Mem por la activación de IL4. Un pulso continuo de IL4 no promueve la transición del tipo celular Mem a algún otro, pero sí induce la activación de AID, lo que describe el estado de diferenciación de las células Mem cuando llevan a cabo los eventos de maduración de la afinidad de los anticuerpos.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
3	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

Figura 37: Estimulación de células Mem por la activación de CD40. La estimulación de las células Mem por la activación de CD40 no provoca el cambio del atractor de las células Mem por otro, en cambio se induce la activación de AID, lo que describe el estado celular donde las células Mem pueden llevar a cabo la maduración de la afinidad de los anticuerpos, como se describe en (Dedeoglu, 2004).

tor (Figura 37). Estos datos sugieren que el punto estacionario correspondiente a las células Mem es estable y robusto ante la presencia de señales características de etapas previas a la formación de este tipo celular.

5.3.4 Estimulación de células PC

Posteriormente, se analizó el comportamiento de la red tomando como punto de partida el atractor correspondiente a las células PC. De igual manera se simuló la presencia continua de alguna de las señales extracelulares externas, como la activación del BCR, señalización por CD40, IL-2, IL-4 y IL-21, y se observó la manera en que estas señales modifican las transiciones entre los estados de la red. No obstante, la presencia de estas señales no induce ninguna transición del atractor de las células PC al de cualquier otro tipo celular (Figuras 39 a 43). Estos datos sugieren que el estado estacionario de las células PC es estable y concuerda con la idea de que la diferenciación terminal hacia este tipo celular se lleva a cabo generalmente de manera irreversible, como se ha descrito en varios trabajos previos (Sciammas et al., 2011; Shaffer et al., 2002; Yasuda et al., 2011).

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

Figura 38: Estimulación de células PC por la activación del BCR. La activación del BCR no induce ningún cambio de atractor a partir del estado estacionario de las células PC.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0

Figura 39: Estimulación de células PC por la activación de CD40. La señalización por CD40 no modifica al atractor de las células PC, la red se mantiene en el atractor PC.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Figura 40: Estimulación de células PC por IL-21. La presencia continua de IL-21 promueve la permanencia del sistema en el atractor de las células PC.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
2	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0

Figura 41: Estimulación de células PC por IL-2. La estimulación de las células PC por IL-2 no induce su desdiferenciación hacia alguno de los tipos celulares precursores. El estado estacionario de las células PC es estable y robusto ante la presencia de señales que promueven la activación de factores característicos de los linfocitos B Naive, GC o Mem.

Tiempo	PAX5	BCL6	BLIMP1	IRF4	BACH2	AID	XBP1	STAT3	STAT5	STAT6	NFkB	ERK	IL21	IL2	IL4	CD40	BCR
1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
2	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

Figura 42: Estimulación de células PC por IL-4. La estimulación de las células PC en presencia de IL-4 no induce su desdiferenciación hacia alguno de los tipos celulares precursores, lo que sugiere que la diferenciación terminal a células PC es robusta e irreversible.

5.4 Análisis de perturbaciones

Finalmente, se analizó el comportamiento de la red ante pequeñas perturbaciones, para ello se tomó como punto de partida en las simulaciones a cada uno de los atractores correspondientes a las células Naive, GC, Mem y PC, y se intercambié el valor de activación de cada uno de los nodos en el punto estacionario, es decir, si el estado de activación de un nodo de un punto estacionario es 1, entonces se cambia a 0 por una unidad de tiempo durante la simulación y se observan los cambios que ocasiona esta perturbación sobre el comportamiento de la red. Con base en los resultados de estas simulaciones se infirió un mapa de destinos (Figura 43).

El mapa de destinos recupera las rutas de diferenciación observadas experimentalmente así como las señales necesarias para que se lleven a cabo las transiciones entre los cuatro destinos celulares. Se observó que la transición entre los destinos celulares Naive y GC puede inducirse por la activación de BCL6 o por la presencia temporal de las señales de IL-2 y IL-4 así como de sus transductores STAT5 y STAT6, respectivamente. Como se menciona anteriormente, la activación de BCL6 demarca el establecimiento y la formación de los centros germinales (Duy et al., 2010), mientras que las interleucinas IL-2 y IL-4 son importantes para el mantenimiento de las células en esta etapa de diferenciación (Roy et al., 2002).

El mapa de destinos inferido en el análisis de perturbaciones describe la diferenciación del tipo precursor Naive a células Mem por la activación de IRF4 o la presencia de CD40 y NFkB, en línea con lo ya reportado (Saito et al., 2007). La transición del atractor de las células Naive así como de las células Mem al de las células PC puede favorecerse por la activación de Blimp1 o la señalización por BCR, IL21 así como sus transductores ERK y STAT3, respectivamente (Ettinger et al., 2005; Karnell & Ettinger, 2012; Rankin et al., 2011). Estas rutas de diferenciación coinciden con las rutas canónicas descritas experimentalmente en las que los linfocitos B se diferencian de manera dirigida e irreversible a partir del precursor Naive hacia las células GC o Mem y posteriormente a células PC.

Además, a partir de este análisis se encontraron dos rutas no canónicas de transición entre los atractores de la red: una que va del tipo celular GC hacia el precursor Naive y otra del atractor de las células Mem hacia el precursor Naive. La transición entre el estado estacionario GC y el Naive se alcanza por la inactivación temporal de BCL6 o por la activación de BLIMP1, IRF4, STAT3 o NFkB. Por otro lado, la ruta que lleva del atractor de las células Mem hacia el de los precursores Naive, se alcanza por la inactivación temporal de IRF4 o por la presencia de BCL6. Experimentalmente no se ha descrito que la presencia o ausencia temporal de estas moléculas favorezca la desdiferenciación de estos tipos celulares hacia el precursor Naive, por lo que los resultados de este análisis de perturbaciones podrían servir como una predicción del modelo.

En conjunción, los datos obtenidos de las simulaciones sobre comportamiento dinámico de la red que regula el proceso de diferenciación de los linfocitos B bajo diferentes condiciones como mutantes de ganancia o pérdida de función así como bajo pequeñas perturbaciones, muestran que los factores transcripcionales maestros así como las interacciones entre ellos, regulan el establecimiento de los patrones de expresión característicos de los destinos celulares Naive, GC, Mem y PC, por lo que puede considerarse que la arquitectura de la red propuesta en el presente trabajo es correcta.

No obstante, para que el proceso de diferenciación se lleve a cabo de una manera dirigida se requiere de la acción directa de diferentes señales extracelulares, que al ser integradas por la red de regulación controlan el compromiso hacia los distintos tipos celulares. De esta manera puede estudiarse el comportamiento de la red ante perturbaciones en los estados de activación de los factores transcripcionales involucrados en este proceso y además bajo la presencia o ausencia de señales extracelulares específicas.

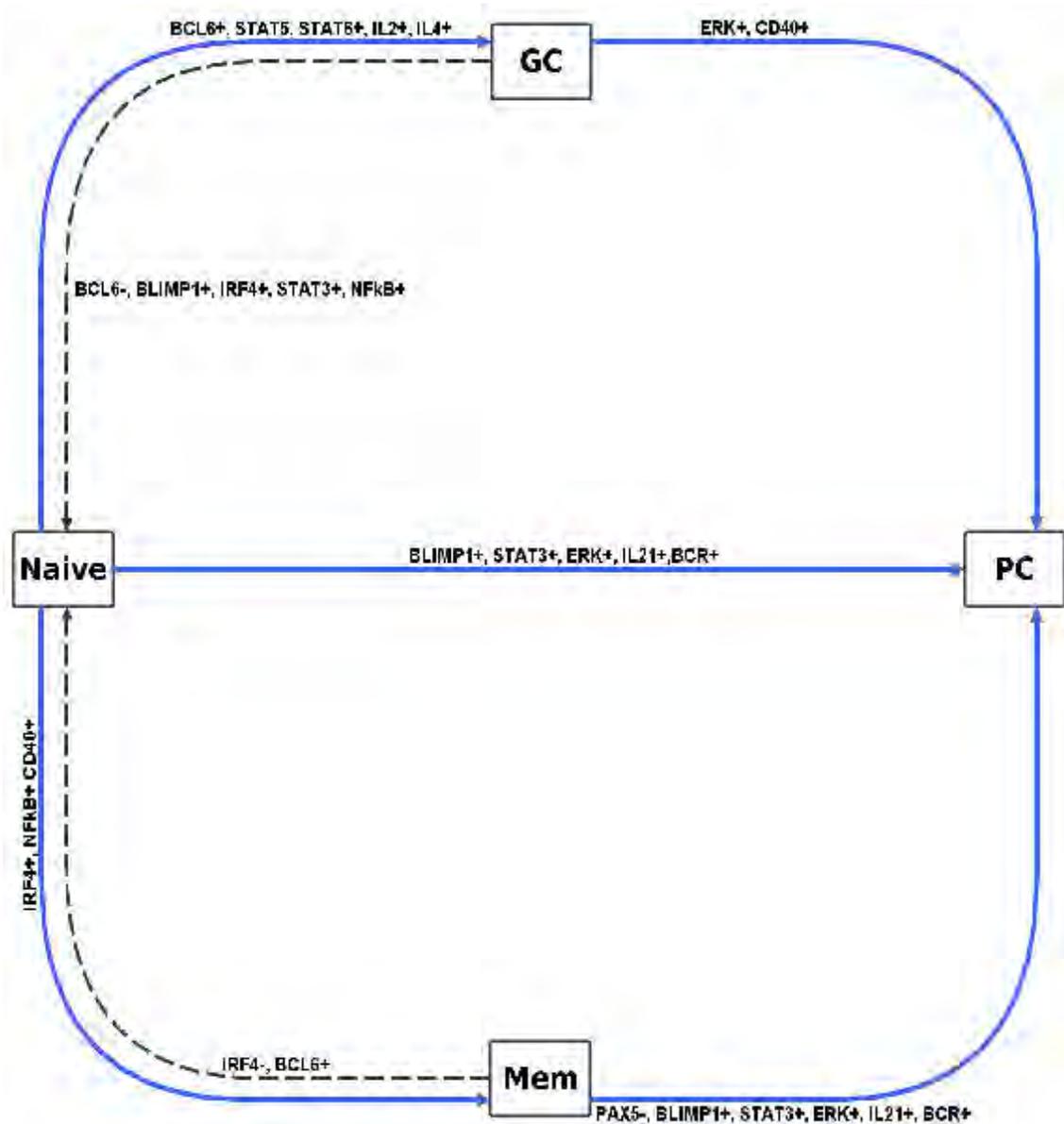


Figura 43: Mapa de destinos celulares. Se infirió un mapa de destinos a partir de los resultados obtenidos por la perturbación en el valor de cada nodo en un solo tiempo de activación de las simulaciones. Estas perturbaciones favorecen la transición de un tipo celular a otro. En color azul se muestran las rutas de diferenciación canónicas reportadas para los linfocitos B. En color gris y líneas punteadas se representan las vías no canónicas encontradas con el modelo.

6. DISCUSIÓN

Existen numerosos esfuerzos para reconstruir y estudiar las propiedades las redes de regulación que subyacen a la diferenciación de las diferentes poblaciones celulares que conforman al sistema hematopoyético, como es el caso de la diferenciación de las células troncales hematopoyéticas (Bonzanni et al., 2013), la diferenciación de los progenitores mieloides (Krumtsiek et al., 2011), la decisión entre los linajes eritroide y mieloide (Chickarmane et al., 2009) y los modelos en los que se ha reconstruido y ampliado la red de regulación que controla la diferenciación de los linfocitos T (Martínez-Sosa & Mendoza, 2013; Mendoza & Pardo, 2010; Mendoza, 2006; Naldi et al., 2010), estos modelos han sido útiles para describir aspectos relevantes de la diferenciación de las células hematopoyéticas, como el comportamiento de la red bajo diferentes contextos mutantes y señales, y además han sido útiles para hacer predicciones acerca de interacciones o estados que no han sido observados experimentalmente.

En el caso de los linfocitos B, estos representan un sistema adecuado para el modelado de las redes de regulación y para el estudio de la diferenciación celular debido a que se dispone de suficiente información proveniente de experimentos detallados, tanto *in vivo* como *in vitro*, en los que se modifica el proceso de diferenciación terminal de los linfocitos B bajo diferentes tratamientos o señales extracelulares específicas y en los que se ha estudiado su diferenciación bajo distintos contextos mutantes. En estos experimentos, se ha descrito ampliamente la diferenciación terminal de los linfocitos B a partir de un tipo precursor Naive hacia las células de los centros germinales, de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos. Además, se han caracterizado las principales moléculas involucradas en el control de este proceso así como algunas de las interacciones entre estas. Sin embargo, no existe aún un consenso acerca de la estructura de esta red de regulación ni sobre la manera en que esta red integra múltiples señales extracelulares que dirigen la diferenciación de un tipo celular a otro.

En el presente trabajo, se utilizó la información disponible en la literatura para

inferir la arquitectura de la red de regulación que controla el proceso de diferenciación de los linfocitos B a partir de un tipo precursor Naive hacia los destinos celulares GC, Mem y PC. Esta red consta de 22 nodos y 38 interacciones e integra los principales factores transcripcionales reportados en la literatura como reguladores maestros del proceso de diferenciación terminal así como las interacciones entre ellos e incluye algunas de las vías de señalización conocidas que son activadas en respuesta a citocinas específicas producidas por los linfocitos T cooperadores, que son importantes para favorecer la diferenciación de los linfocitos B.

De las 38 interacciones incluidas en la red de regulación, 34 han sido reportadas en la literatura y 4 fueron incorporadas a lo largo del proceso de modelado de forma que la red se comporte de manera estable. Estas interacciones no han sido descritas experimentalmente por lo que podrían servir como predicciones del modelo.

Con base en la información disponible, también se infirieron las reglas lógicas (Tablas 2 y 3), que capturan la naturaleza regulatoria de los componentes moleculares involucrados en este proceso y determinan las transiciones entre los estados de activación para cada uno de los nodos de la red. En primer lugar se construyó un modelo de red que incluyera exclusivamente a los factores transcripcionales maestros: PAX5, BACH2, BCL6, IRF4, BLIMP1 y las interacciones entre estos. Este modelo, denominado modelo mínimo, consiste de 5 nodos y 15 interacciones (Figura 10), de las cuales 3 representan interacciones predichas a lo largo del proceso de modelado, como se mencionó anteriormente.

La red inferida se trasladó a un sistema dinámico Booleano, es decir, el estado de activación de cada nodo puede tomar únicamente dos valores, 0 o 1 dependiendo si su estado es “activo” o “inactivo”. Con base en la arquitectura de la red de regulación así como las reglas lógicas inferidas, se estudió el comportamiento de este sistema de manera cualitativa a partir de todos los estados iniciales de activación posibles de los nodos de la red y se determinó que el sistema siempre converge a cuatro estados estacionarios fijos o atractores.

Estos atractores se caracterizan por:

1. Altos niveles de PAX5 y BACH2, los nodos BCL6, IRF4 y BLIMP1 poseen un nivel bajo.
2. Altos niveles de BCL6, PAX5 y BACH2, los nodos IRF4 y BLIMP1 inactivos.
3. Altos niveles IRF4, PAX5 y BACH2, los nodos BCL6 y BLIMP1 poseen un nivel bajo.
4. Altos niveles de BLIMP1 y IRF4, los nodos PAX5, BACH2 y BCL6 permanecen inactivos.

Los estados estacionarios obtenidos con el modelo mínimo recuperan los patrones de expresión observados experimentalmente para los tipos celulares de linfocitos B Naive, GC, Mem y PC. Este modelo intenta mostrar que la arquitectura de la red de regulación inferida captura los aspectos cualitativos más relevantes sobre la manera en que se establecen los patrones de expresión genética característicos de cada tipo celular debido a las interacciones entre las principales moléculas que controlan el proceso de diferenciación de los linfocitos B.

Por otra parte, las simulaciones de mutantes de ganancia o pérdida de función para cada uno de los nodos de la red corresponden con los efectos reportados experimentalmente para los diferentes tipos celulares, lo que valida parcialmente el modelo y corrobora la importancia de los factores transcripcionales PAX5, BCL6, BACH2, IRF4 y BLIMP1 como reguladores maestros del proceso de diferenciación y muestra que el papel de BACH2 durante el proceso de diferenciación a células plasmáticas es importante para reprimir a BLIMP1 pero no es esencial para el establecimiento de los patrones de expresión de las células Naive, GC o Mem.

A su vez, la activación de BLIMP1 es indispensable para la formación de las células PC pero la activación de IRF4 debe preceder a la activación de BLIMP1, evento que demarca la diferenciación terminal a células plasmáticas. De manera importante,

el efecto de algunas de las mutantes analizadas con el modelo booleano aún no ha sido reportado, por lo que los estados estacionarios encontrados como resultado de las simulaciones para estas mutantes podrían servir como predicciones del modelo susceptibles de ser verificadas experimentalmente.

Otro aspecto importante de la diferenciación de los linfocitos B es que se lleva a cabo de manera dirigida por diversas señales extracelulares producidas por los linfocitos T cooperadores (Figura 5), por lo que uno de los objetivos del modelo es entender la manera en que los patrones de activación característicos de los diferentes destinos celulares se establecen debido a la acción de señales externas que inducen la diferenciación terminal de los linfocitos B a partir de un progenitor Naive hacia los tipos GC, Mem y PC.

Pese a que el modelo mínimo describe el establecimiento de los patrones de expresión característicos de los linfocitos B, este sistema no es capaz por sí solo de describir la diferenciación a partir de un tipo celular precursor hacia los otros destinos celulares efectores, por lo que para entender la manera en que la red de regulación controla la formación de los patrones de expresión de los destinos celulares bajo la presencia de señales extracelulares, se incluyeron en el modelo nodos que representan las principales vías de señalización que dirigen el proceso de diferenciación terminal y se construyó un modelo extendido de la red de regulación (Figura 9).

Se analizó el comportamiento del modelo de red de regulación extendida bajo la presencia continua de señales externas específicas, como IL-2, IL-4, IL-21, CD40L y Ag, y se estudió su efecto sobre el establecimiento de los patrones de expresión de un tipo celular a otro. Se observó que la presencia continua de señales extracelulares como IL-2 e IL-4, que promueven la activación de BCL6 en la red, favorecen la transición del estado estacionario del progenitor Naive hacia el atractor de las células GC, lo cual coincide con el comportamiento observado experimentalmente, donde las citocinas IL-2 e IL-4 son necesarias para la formación y el mantenimiento de los linfocitos B de los centros germinales.

La activación del nodo CD40 promueve la transición de los estados estacionarios Naive y GC hacia el estado estacionario de las células Mem, que a su vez es mediado por la activación del nodo IRF4, no obstante, si el estado estacionario de las células Mem es perturbado por la presencia continua de IL-21 o un antígeno Ag, que a su vez favorecen la activación del nodo BLIMP1, entonces el sistema transita del atractor de las células Mem hacia el de las células PC. De manera similar, la presencia de IL-21 y Ag a partir de los estados estacionarios Naive y GC promueve su transición hacia el atractor PC.

Con base en los resultados de estas simulaciones, se observó que la activación de los factores transcripcionales maestros que controlan la formación de los destinos celulares de los linfocitos B por la acción de señales externas resulta en la transición del sistema de un estado estacionario a otro, partiendo del atractor correspondiente al tipo progenitor Naive hacia los atractores de las células Mem, GC o PC, siempre de manera dirigida, es decir, el sistema nunca transita bajo la presencia constante de señales externas, del atractor correspondiente a las células efectoras hacia los atractores de las células progenitoras. Esto sugiere que la red de regulación conformada por los factores transcripcionales maestros es necesaria para controlar la formación de los patrones de expresión característicos de los linfocitos B, pero que además, es necesaria la acción de señales externas para favorecer la transición entre los estados de la red a partir de un tipo progenitor, lo que corrobora la idea acerca de que la arquitectura de la red es suficiente y necesaria para determinar la formación de los diferentes tipos celulares pero que además, para que el proceso de diferenciación se lleve a cabo de manera dirigida, se requiere también de la presencia de señales externas específicas que influyan sobre el comportamiento de la red de regulación y favorezcan el establecimiento de los patrones de expresión característicos de un tipo celular u otro.

Sin embargo, pese a que este modelo describe como se establecen los patrones de expresión característicos de las células Naive, GC, Mem y PC debido a la acción concertada entre los principales factores transcripcionales que regulan la diferencia-

ción de los linfocitos B y la manera en que la red responde a señales extracelulares específicas que promueven la activación de estos factores, no contempla aún otros factores y estímulos microambientales que también juegan un papel importante en la determinación de los destinos celulares de los linfocitos B.

Más aún, se ha observado que la diferenciación de los linfocitos B es un fenómeno que posee plasticidad ya que pueden diferenciarse a células correspondientes a etapas tempranas del desarrollo e incluso a otros tipos celulares que no pertenecen al linaje linfoide. Esta plasticidad refleja un fenómeno altamente dinámico de la red de regulación que subyace al control de la diferenciación celular donde entran en juego muchos factores como las interacciones no lineales entre las moléculas que participan en este proceso, la diferencia en sus niveles y tiempos de expresión, la presencia de diversos estímulos ambientales que modifican el comportamiento de la red, restricciones espaciales y gradientes de señales, entre otros, los cuales ofrecen grandes retos para entender la manera en que las redes de regulación actúan a distintas escalas de organización, tanto a nivel celular como molecular, donde sin duda será necesario desarrollar nuevos modelos que incluyan estos aspectos y describan el papel de otras moléculas e interacciones en la red de regulación para generar nuevas predicciones que describan con mayor detalle el proceso de diferenciación terminal de los linfocitos B y que además contribuyan al estudio de diversas enfermedades inmunes relacionadas con el mal funcionamiento de la red de regulación y al planteamiento de hipótesis que puedan ser verificadas experimentalmente.

Cabe mencionar que uno de los propósitos del presente modelo es servir como punto de partida para incorporar una mayor cantidad de información referente a otras moléculas involucradas en el proceso de diferenciación de los linfocitos B, por lo que la red de regulación puede ampliarse sucesivamente de manera que puedan describirse con mayor detalle otros fenotipos silvestres y mutantes así como la manera en que esta red controla el establecimiento de los patrones de activación característicos de los distintos destinos celulares.

Por otra parte, debido a que la información cuantitativa es generalmente escasa, es necesario estudiar de manera cualitativa este sistema pero al mismo tiempo poder incluir la información referente a los parámetros cinéticos de los componentes de la red conforme estén disponibles. Para ello, se trasladará el modelo Booleano a un modelo continuo en la forma de un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias para describir con mayor detalle los estados de activación y decaimiento para cada uno de los nodos y estudiar la robustez de la red ante la variación de distintos parámetros y a su vez incluir aquellos parámetros que hayan sido medidos experimentalmente y se encuentren disponibles en la literatura, lo cual será útil para contribuir al estudio de las redes de regulación y corroborar las observaciones en otros modelos donde se muestra que el comportamiento cualitativo de los sistemas biológicos está determinado en gran medida por la arquitectura de la red.

Se espera que este modelo contribuya al entendimiento del proceso de diferenciación de los linfocitos B en particular y sirva como punto de partida para crear modelos más detallados acerca de la red de regulación y de otros procesos de diferenciación.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se reconstruyó la red de regulación que controla la diferenciación terminal de los linfocitos B, y se implementó como un modelo dinámico Booleano. Se estudió el comportamiento dinámico de esta red de regulación bajo condiciones silvestres y mutantes. El modelo fue capaz de reproducir los patrones de expresión de los factores transcripcionales PAX5, BCL6, BLIMP1, IRF4 y BACH2, lo que sugiere que la red de regulación propuesta posee una función canalizadora que es importante para dirigir la diferenciación terminal de los linfocitos B. Además, se estudió el comportamiento de la red bajo la presencia de señales externas. El modelo recuperó diversas rutas de diferenciación entre los atractores de tipo silvestre, lo que indica que la red de regulación procesa estas señales externas asegurando que la diferenciación

terminal de los linfocitos B se lleve a cabo de manera dirigida y robusta. Se generaron cuatro predicciones con este modelo acerca de posibles interacciones funcionales que son necesarias para el establecimiento de los patrones de expresión de tipo silvestre, las cuales son susceptibles de ser probadas experimentalmente.

7.1 Perspectivas

El modelo aquí reportado servirá como base para integrar nuevos datos referentes a la regulación del proceso de diferenciación de los linfocitos B en particular, así como para la calibración de métodos de inferencia de redes en general. No obstante, para entender mejor la manera en que se regula la formación de los distintos tipos de linfocitos B será necesario construir un modelo basado en ecuaciones diferenciales ordinarias que describa de manera continua y cualitativa los niveles de expresión y degradación de las moléculas que conforman a la red de regulación, el cual será útil para integrar la información detallada referente a los parámetros cinéticos de los componentes de la red a partir de la información experimental disponible.

A su vez, también es necesario construir modelos que describan aspectos relevantes acerca del contexto espacial donde se lleva a cabo la diferenciación de los linfocitos B, como la competencia por las señales extracelulares brindadas por los linfocitos T, la disponibilidad de antígenos, la proliferación y muerte celular en respuesta a estas señales, entre otras. En conjunción, los modelos desarrollados integrarán la información experimental disponible para describir con mayor detalle los aspectos más relevantes para la regulación de la diferenciación de los linfocitos B y que contribuyan al estudio de múltiples enfermedades asociadas con la desregulación de este proceso, como es el caso de los linfomas de las células B maduras, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Hodgkin y linfomas foliculares.

8. REFERENCIAS

Albert, R. (2007). Network inference, analysis, and modeling in systems biology. *The Plant cell*, 19(11), 3327–38. doi:10.1105/tpc.107.054700

Albert, R., & Othmer, H. G. (2003). The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Theoretical Biology*, 223(1), 1–18. doi:10.1016/S0022-5193(03)00035-3

Albert, R., & Wang, R. (2009). Discrete dynamic modeling of cellular signaling networks. *Methods in enzymology*, 467(09), 281–306. doi:10.1016/S0076-6879(09)67011-7

Allman, D., & Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Current opinion in immunology*, 20(2), 149–57. doi:10.1016/j.coi.2008.03.014

Arguni, E., Arima, M., Tsuruoka, N., Sakamoto, A., Hatano, M., & Tokuhisa, T. (2006). JunD/AP-1 and STAT3 are the major enhancer molecules for high Bcl6 expression in germinal center B cells. *International immunology*, 18(7), 1079–89. doi:10.1093/intimm/dxl041

Basso, K., & Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunological reviews*, 247(1), 172–83. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01112.x

Basso, K., Klein, U., Niu, H., Stolovitzky, G. a, Tu, Y., Califano, A., Dalla-Favera, R. (2004). Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood*, 104(13), 4088–96. doi:10.1182/blood-2003-12-4291

Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A. a, Wang, K., Lim, W.-K., Dalla-

Favera, R. (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood*, 115(5), 975–84. doi:10.1182/blood-2009-06-227017

Batlle, A., Papadopoulou, V., Gomes, A. R., Willimott, S., Melo, J. V., Naresh, K., Wagner, S. D. (2009). CD40 and B-cell receptor signalling induce MAPK family members that can either induce or repress Bcl-6 expression. *Molecular immunology*, 46(8-9), 1727–35. doi:10.1016/j.molimm.2009.02.003

Benson, M. J., Erickson, L. D., Gleeson, M. W., & Noelle, R. J. (2007). Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate. *Current opinion in immunology*, 19(3), 275–80. doi:10.1016/j.coi.2007.04.009

Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S33–40. doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017

Bonzanni, N., Garg, A., Feenstra, K. A., Schu, J., Xenarios, I., Kinston, S., Heringa, J. (2013). Hard-wired heterogeneity in blood stem cells revealed using a dynamic regulatory network model, 29, 80–88. doi:10.1093/bioinformatics/btt243

Bornholdt, S. (2008). Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 5 Suppl 1(May), S85–94. doi:10.1098/rsif.2008.0132.focus

Bryder, D., & Sigvardsson, M. (2010). Shaping up a lineage - lessons from B lymphopoiesis. *Current opinion in immunology*, 22(2), 148–53. doi:10.1016/j.coi.2010.02.001

Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T., & Vilen, B. J. (2007). B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature reviews. Im-*

munology, 7(8), 633–43. doi:10.1038/nri2133

Cattoretti, G., Angelin-Duclos, C., Shaknovich, R., Zhou, H., Wang, D., & Alo-
beid, B. (2005). PRDM1/Blimp-1 is expressed in human B-lymphocytes committed
to the plasma cell lineage. *The Journal of pathology*, 206(1), 76–86. doi:10.1002/path.1752

Cattoretti, G., Shaknovich, R., Smith, P. M., Jäck, H.-M., Murty, V. V., & Alo-
beid, B. (2006). Stages of germinal center transit are defined by B cell transcription
factor coexpression and relative abundance. *Journal of immunology (Baltimore, Md.:
1950)*, 177(10), 6930–9.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17082608>

Chickarmane, V., Enver, T., & Peterson, C. (2009). Computational modeling of
the hematopoietic erythroid-myeloid switch reveals insights into cooperativity, pri-
ming, and irreversibility. *PLoS computational biology*, 5(1), e1000268. doi:10.1371/journal.pcbi.1000268

Ci, W., Polo, J. M., Cerchietti, L., Shaknovich, R., Wang, L., Yang, S. N., Mel-
nick, A. (2009). The BCL6 transcriptional program features repression of multiple
oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood*, 113(22), 5536–48.
doi:10.1182/blood-2008-12-193037

Davidich, M. I., & Bornholdt, S. (2008). Boolean network model predicts cell cy-
cle sequence of fission yeast. *PloS one*, 3(2), e1672. doi:10.1371/journal.pone.0001672

De Jong, H. (2002). Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a
literature review. *Journal of computational biology: a journal of computational mo-
lecular cell biology*, 9(1), 67–103. doi:10.1089/10665270252833208

Dedeoglu, F. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene ex-
pression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NF kB. *International
Immunology*, 16(3), 395–404. doi:10.1093/intimm/dxh042

Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., & Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity*, 24(3), 269–81.

doi:10.1016/j.immuni.2006.01.012

Dent, a. L. (1997). Control of Inflammation, Cytokine Expression, and Germinal Center Formation by BCL-6. *Science*, 276(5312), 589–592.

doi:10.1126/science.276.5312.589

Diehl, S. A., Schmidlin, H., Nagasawa, M., van Haren, S. D., Kwakkenbos, M. J., Yasuda, E., Spits, H. (2008). STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 Is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 180(7), 4805–15.

Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/180/7/4805.short>

Ding, B. B., Bi, E., Chen, H., Yu, J. J., & Ye, B. H. (2013). IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 190(4), 1827–36. doi:10.4049/jimmunol.1201678

Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., M egret, J., Storck, S., Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nature immunology*, 10(12), 1292–9. doi:10.1038/ni.1814

Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 4(1), 11–22. doi:10.1038/nrc1252

Duy, C., Yu, J. J., Nahar, R., Swaminathan, S., Kweon, S.-M., Polo, J. M., M uschen, M. (2010). BCL6 is critical for the development of a diverse primary B cell repertoire. *The Journal of experimental medicine*, 207(6), 1209–1221. doi:10.1084/jem.20091299

Ettinger, R., Sims, G. P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y. S., Spolski, R., Warren, J. (2005). IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 175(12), 7867–79.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339522>

Fairfax, K. a, Kallies, A., Nutt, S. L., & Tarlinton, D. M. (2008). Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches. *Seminars in immunology*, 20(1), 49–58. doi:10.1016/j.smim.2007.12.002

Fisher, A. G. (2002). Cellular identity and lineage choice. *Nature reviews. Immunology*, 2(12), 977–82. doi:10.1038/nri958

Le Gallou, S., Caron, G., Delaloy, C., Rossille, D., Tarte, K., & Fest, T. (2012). IL-2 requirement for human plasma cell generation: coupling differentiation and proliferation by enhancing MAPK-ERK signaling. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 189(1), 161–73. doi:10.4049/jimmunol.1200301

Garg, A., Mohanram, K., Di Cara, A., De Micheli, G., Xenarios, I., Cara, A. Di, & Micheli, G. De. (2009). Modeling stochasticity and robustness in gene regulatory networks. *Bioinformatics* (Oxford, England), 25(12), i101–9. doi:10.1093/bioinformatics/btp214

Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K. J., Shimizu, A. (2003). The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *The Journal of experimental medicine*, 198(9), 1427–37. doi:10.1084/jem.20030802

Good-Jacobson, K. L., & Shlomchik, M. J. (2010). Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 185(6), 3117–25. doi:10.4049/jimmunol.1001155

Gupta, S., Jiang, M., Anthony, A., & Pernis, A. B. (1999). Lineage-Specific Modulation of Interleukin 4 Signaling by Interferon Regulatory Factor 4. *Journal of Experimental Medicine*, 190(12), 1837–1848. doi:10.1084/jem.190.12.1837

Honjo, T., Muramatsu, M., & Fagarasan, S. (2004). AID: how does it aid antibody diversity? *Immunity*, 20(6), 659–68. doi:10.1016/j.immuni.2004.05.011

Horcher, M., Souabni, A., & Busslinger, M. (2001). Pax5/BSAP Maintains the Identity of B Cells in Late B Lymphopoiesis. *Immunity*, 14(6), 779–790. doi:10.1016/S1074-7613(01)00153-4

Huang, S. (2009). Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 31(5), 546–60. doi:10.1002/bies.200800189

Huang, S., Eichler, G., Bar-Yam, Y., & Ingber, D. D. (2005). Cell Fates as High-Dimensional Attractor States of a Complex Gene Regulatory Network. *Physical Review Letters*, 94(12), 1–4. doi:10.1103/PhysRevLett.94.128701

Hurtz, C., Hatzi, K., Cerchietti, L., Braig, M., Park, E., Kim, Y., Müschen, M. (2011). BCL6-mediated repression of p53 is critical for leukemia stem cell survival in chronic myeloid leukemia. *The Journal of experimental medicine*, 208(11), 2163–74. doi:10.1084/jem.20110304

Igarashi, K., Ochiai, K., & Muto, A. (2007). Architecture and dynamics of the transcription factor network that regulates B-to-plasma cell differentiation. *Journal of biochemistry*, 141(6), 783–9. doi:10.1093/jb/mvm106

Isakson, P., & Puré, E. (2013). Pillars Article: T Cell-Derived B Cell Differentiation Factor (s). Effect on the Isotype Switch of Murine B Cells. *J. Exp. Med.* 1982.

155: 734-748. *Journal of immunology*.

Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/190/3/849.citation>

Janeway, C. a, & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20(2), 197–216. doi:10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359

Johnson, K., Shapiro-Shelef, M., Tunyaplin, C., & Calame, K. (2005). Regulatory events in early and late B-cell differentiation. *Molecular immunology*, 42(7), 749–61. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.039

Jourdan, M., Caraux, A., Vos, J. De, Fiol, G., Larroque, M., Cognot, C., De Vos, J. (2009). An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood*, 114(25), 5173–81. doi:10.1182/blood-2009-07-235960

Kalia, V., Sarkar, S., Gourley, T. S., Rouse, B. T., & Ahmed, R. (2006). Differentiation of memory B and T cells. *Current opinion in immunology*, 18(3), 255–64. doi:10.1016/j.coi.2006.03.020

Kallies, A., Hasbold, J., Fairfax, K., Pridans, C., Emslie, D., McKenzie, B. S., Nutt, S. L. (2007). Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity*, 26(5), 555–66.

doi:10.1016/j.immuni.2007.04.007

Kallies, A., & Nutt, S. L. (2007). Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1. *Current opinion in immunology*, 19(2), 156–62.

doi:10.1016/j.coi.2007.01.003

Karlebach, G., & Shamir, R. (2008). Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(10), 770–80.

doi:10.1038/nrm2503

Karnell, J. L., & Ettinger, R. (2012). The Interplay of IL-21 and BAFF in the Formation and Maintenance of Human B Cell Memory. *Frontiers in immunology*, 3(January), 2. doi:10.3389/fimmu.2012.00002

Kauffman, S. A. (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *Journal of Theoretical Biology*, 22(3), 437–467. doi:10.1016/0022-5193(69)90015-0

Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nature immunology*, 7(7), 773–82. doi:10.1038/ni1357

Klein, U., & Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nature reviews. Immunology*, 8(1), 22–33. doi:10.1038/nri2217

Krumsiek, J., Marr, C., Schroeder, T., & Theis, F. J. (2011). Hierarchical differentiation of myeloid progenitors is encoded in the transcription factor network. (M. Pesce, Ed.) *PloS one*, 6(8), e22649. doi:10.1371/journal.pone.0022649

Kuo, T. C., Shaffer, A. L., Haddad, J., Choi, Y. S., Staudt, L. M., & Calame, K. (2007). Repression of BCL-6 is required for the formation of human memory B cells in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 204(4), 819–30. doi:10.1084/jem.20062104

Kurosaki, T. (2010). B-lymphocyte biology. *Immunological reviews*, 237(1), 5–9. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00946.x

Kurosaki, T., Shinohara, H., & Baba, Y. (2009). B cell signaling and fate decision. *Annual review of immunology*, 28, 21–55. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132541

Kwakkenbos, M. J., Diehl, S. a, Yasuda, E., Bakker, A. Q., van Geelen, C. M.

M., Lukens, M. V, Beaumont, T. (2010). Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nature medicine*, 16(1), 123–8. doi:10.1038/nm.2071

Kwon, H., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Kim, H.-P., Oh, J., Tunyaplin, C., Leonard, W. J. (2009). Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors. *Immunity*, 31(6), 941–52. doi:10.1016/j.immuni.2009.10.008

LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570–80. doi:10.1182/blood-2008-02-078071

Lin, K.-I., Angelin-Duclos, C., Kuo, T. C., & Calame, K. (2002). Blimp-1-Dependent Repression of Pax-5 Is Required for Differentiation of B Cells to Immunoglobulin M-Secreting Plasma Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 22(13), 4771–4780. doi:10.1128/MCB.22.13.4771-4780.2002

Linterman, M. a, Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R. R., Srivastava, M., Hogan, J. J., Vinuesa, C. G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *The Journal of experimental medicine*, 207(2), 353–63. doi:10.1084/jem.20091738

Martínez-Sosa, P., & Mendoza, L. (2013). The regulatory network that controls the differentiation of T lymphocytes. *Bio Systems*, 113(2), 96–103. doi:10.1016/j.biosystems.2013.05.007

McHeyzer-Williams, L. J., Malherbe, L. P., & McHeyzer-Williams, M. G. (2006). Checkpoints in memory B-cell evolution. *Immunological reviews*, 211, 255–68. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00397.x

McHeyzer-Williams, L. J., & McHeyzer-Williams, M. G. (2005). Antigen-specific

memory B cell development. *Annual review of immunology*, 23(9), 487–513. doi:10.1146/annurev.immunol.23.9.487

McHeyzer-Williams, L. J., Pelletier, N., Mark, L., Fazilleau, N., & McHeyzer-Williams, M. G. (2009). Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. *Current opinion in immunology*, 21(3), 266–73. doi:10.1016/j.coi.2009.05.010

McManus, S., Ebert, A., Salvagiotto, G., Medvedovic, J., Sun, Q., Tamir, I., Busslinger, M. (2011). The transcription factor Pax5 regulates its target genes by recruiting chromatin-modifying proteins in committed B cells. *The EMBO journal*, 1–17. doi:10.1038/emboj.2011.140

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–26. doi:10.1038/nature06246

Mendoza, L., Thieffry, D., & Alvarez-Buylla, E. R. (1999). Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis. *Bioinformatics*, 15(7), 593–606. doi:10.1093/bioinformatics/15.7.593

Mendoza, L. (2006). A network model for the control of the differentiation process in Th cells. *Bio Systems*, 84(2), 101–14. doi:10.1016/j.biosystems.2005.10.004

Mendoza, L., & Pardo, F. (2010). A robust model to describe the differentiation of T-helper cells. *Theory in biosciences*, 283–293. doi:10.1007/s12064-010-0112-x

Mendoza, L., & Xenarios, I. (2006). A method for the generation of standardized qualitative dynamical systems of regulatory networks. *Theoretical biology & medical modelling*, 3, 13. doi:10.1186/1742-4682-3-13

Mittrucker, H.-W. (1997). Requirement for the Transcription Factor LSIRF/IRF4 for Mature B and T Lymphocyte Function. *Science*, 275(5299), 540–543. doi:10.1126/science.275.5299.540

Mora-lópez, F., Reales, E., Brieva, J. A., Campos-Caro, A., De, W., Mora-lo, F., & Brieva, A. (2007). Human BSAP and BLIMP1 conform an autoregulatory feedback loop. *Blood*, 110(9), 3150–7. doi:10.1182/blood-2007-05-092262

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., & Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102(5), 553–63.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11007474>

Müssel, C., Hopfensitz, M., & Kestler, H. a. (2010). BoolNet - an R package for generation, reconstruction, and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(10), 1378–1380. doi:10.1093/bioinformatics/btq124

Muto, A., Ochiai, K., Kimura, Y., Itoh-Nakadai, A., Calame, K. L., Ikebe, D., Igarashi, K. (2010). Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *The EMBO journal*, 29(23), 4048–4061. doi:10.1038/emboj.2010.257

Muto, A., Tashiro, S., & Nakajima, O. (2004). The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature*, 429(June). doi:10.1038/nature02549.1.

Naldi, A., Carneiro, J., Chaouiya, C., & Thieffry, D. (2010). Diversity and Plasticity of Th Cell Types Predicted from Regulatory Network Modelling. (R. Bonneau, Ed.) *PLoS Computational Biology*, 6(9), e1000912.

doi:10.1371/journal.pcbi.1000912

Nera, K.-P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Lassila, O. (2006). Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity*, 24(3), 283–93. doi:10.1016/j.immuni.2006.02.003

Niu, H., Ye, B. H., & Dalla-Favera, R. (1998). Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes & Development*, 12(13), 1953–1961.

doi:10.1101/gad.12.13.1953

Nutt, S. L., Taubenheim, N., Hasbold, J., Corcoran, L. M., & Hodgkin, P. D. (2011). The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Seminars in immunology*, 23(5), 341–9. doi:10.1016/j.smim.2011.08.010

Ochiai, K., Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Noda, T., Karasuyama, H., Igarashi, K. (2006). Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(50), 38226–34. doi:10.1074/jbc.M607592200

Ochiai, K., Muto, A., Tanaka, H., Takahashi, S., & Igarashi, K. (2008). Regulation of the plasma cell transcription factor Blimp-1 gene by Bach2 and Bcl6. *International immunology*, 20(3), 453–60. doi:10.1093/intimm/dxn005

Orkin, S., & Zon, L. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4), 631–44. doi:10.1016/j.cell.2008.01.025

Paus, D., Phan, T. G., Chan, T. D., Gardam, S., Basten, A., & Brink, R. (2006). Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *The Journal of experimental medicine*, 203(4), 1081–91. doi:10.1084/jem.20060087

Pierce, S. K., & Liu, W. (2010). The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences. *Nature reviews. Immunology*, 10(11), 767–777. doi:10.1038/nri2853

Rankin, A. L., MacLeod, H., Keegan, S., Andreyeva, T., Lowe, L., Bloom, L., Guay, H. (2011). IL-21 Receptor Is Critical for the Development of Memory B

Cell Responses. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 186(2), 667–74. doi:10.4049/jimmunol.0903207

Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Robbins, C. S., Weber, G. F., Etzrodt, M., Hilgen-
dorf, I., Swirski, F. K. (2012). Innate response activator B cells protect against micro-
bial sepsis. *Science* (New York, N.Y.), 335(6068), 597–601. doi:10.1126/science.1215173

Reimold, a M., Ponath, P. D., Li, Y. S., Hardy, R. R., David, C. S., Strominger,
J. L., & Glimcher, L. H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activa-
tor protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *The Journal of*
experimental medicine, 183(2), 393–401.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=8627152>

Reljic, R., Wagner, S. D., Peakman, L. J., & Fearon, D. T. (2000). Suppression of
Signal Transducer and Activator of Transcription 3-Dependent B Lymphocyte Termi-
nal Differentiation by Bcl-6. *Journal of Experimental Medicine*, 192(12), 1841–1848.
doi:10.1084/jem.192.12.1841

Revilla-I-Domingo, R., Bilic, I., Vilagos, B., Tagoh, H., Ebert, A., Tamir, I. M.,
Busslinger, M. (2012). The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcrip-
tional programmes in early and late B lymphopoiesis. *The EMBO journal*, 31(14),
3130–46. doi:10.1038/emboj.2012.155

Roy, M. P., Kim, C. H., & Butcher, E. C. (2002). Cytokine control of memory
B cell homing machinery. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 169(4),
1676–82.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12165486>

Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P. M., Bhagat, G., Dalla-
Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germi-
nal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer*

cell, 12(3), 280–92. doi:10.1016/j.ccr.2007.08.011

Schebesta, A., McManus, S., Salvagiotto, G., Delogu, A., Busslinger, G. a, & Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity*, 27(1), 49–63. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.019

Scheeren, F. a, Naspetti, M., Diehl, S., Schotte, R., Nagasawa, M., Wijnands, E., Spits, H. (2005). STAT5 regulates the self-renewal capacity and differentiation of human memory B cells and controls Bcl-6 expression. *Nature immunology*, 6(3), 303–13. doi:10.1038/ni1172

Schmidt, C., Kim, D., Ippolito, G. C., Naqvi, H. R., Probst, L., Mathur, S., Tucker, P. W. (2009). Signalling of the BCR is regulated by a lipid rafts-localised transcription factor, Bright. *The EMBO journal*, 28(6), 711–24. doi:10.1038/emboj.2009.20

Sciammas, R., & Davis, M. M. (2004). Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation. *The Journal of Immunology*. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/172/9/5427.short>

Sciammas, R., Li, Y., Warmflash, A., Song, Y., Dinner, A. R., & Singh, H. (2011). An incoherent regulatory network architecture that orchestrates B cell diversification in response to antigen signaling. *Molecular systems biology*, 7(495), 495. doi:10.1038/msb.2011.25

Sciammas, R., Shaffer, a L., Schatz, J. H., Zhao, H., Staudt, L. M., & Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity*, 25(2), 225–36. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.009

Shaffer, A. L., Lin, K.-I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A.,

Staudt, L. M. (2002). Blimp-1 Orchestrates Plasma Cell Differentiation by Extinguishing the Mature B Cell Gene Expression Program. *Immunity*, 17(1), 51–62. doi:10.1016/S1074-7613(02)00335-7

Shaffer, A. ., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P., & Staudt, L. M. (2000). BCL-6 Represses Genes that Function in Lymphocyte Differentiation, Inflammation, and Cell Cycle Control. *Immunity*, 13(2), 199–212. doi:10.1016/S1074-7613(00)00020-0

Shaffer, A L, Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N. N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Staudt, L. M. (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity*, 21(1), 81–93. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.010

Shaffer, Arthur L, Emre, N. C. T., Lamy, L., Ngo, V. N., Wright, G., Xiao, W., Staudt, L. M. (2008). IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature*, 454(7201), 226–31. doi:10.1038/nature07064

Shapiro-Shelef, M., & Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nature reviews. Immunology*, 5(3), 230–42. doi:10.1038/nri1572

Shapiro-Shelef, M., Lin, K.-I., McHeyzer-Williams, L. J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M. G., & Calame, K. (2003). Blimp-1 Is Required for the Formation of Immunoglobulin Secreting Plasma Cells and Pre-Plasma Memory B Cells. *Immunity*, 19(4), 607–620. doi:10.1016/S1074-7613(03)00267-X

Shmulevich, I., & Aitchison, J. D. (2009). Deterministic and stochastic models of genetic regulatory networks. *Methods in enzymology* (1st ed., Vol. 467, pp. 335–56). Elsevier Inc. doi:10.1016/S0076-6879(09)67013-0

Tran, T. H., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, N. a, Shinkura, R., Fagarasan, S.,

Nagaoka, H. (2010). B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers. *Nature immunology*, 11(2), 148–54. doi:10.1038/ni.1829

Teng, Y., Takahashi, Y., Yamada, M., Kurosu, T., Koyama, T., Miura, O., & Miki, T. (2007). IRF4 negatively regulates proliferation of germinal center B cell-derived Burkitt's lymphoma cell lines and induces differentiation toward plasma cells. *European journal of cell biology*, 86(10), 581–9. doi:10.1016/j.ejcb.2007.05.006

Todd, Derrick J, Lee, A.-H., & Glimcher, L. H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology*, 8(9), 663–74. doi:10.1038/nri2359

Todd, Derrick J, McHeyzer-Williams, L. J., Kowal, C., Lee, A.-H., Volpe, B. T., Diamond, B., Glimcher, L. H. (2009). XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *The Journal of experimental medicine*, 206(10), 2151–9. doi:10.1084/jem.20090738

Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Tokuhisa, T. (2002). Memory B Cells without Somatic Hypermutation Are Generated from Bcl6-Deficient B Cells. *Immunity*, 17(3), 329–339. doi:10.1016/S1074-7613(02)00387-4

Tunypalin, C., Shaffer, a L., Angelin-Duclos, C. D., Yu, X., Staudt, L. M., & Calame, K. L. (2004). Direct repression of prdm1 by Bcl-6 inhibits plasmacytic differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(2), 1158–65.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240705>

Turner, C. A., Mack, D. H., & Davis, M. M. (2010). Pillars article: Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. 1994. *Journal of immunology (Baltimore, Md.:*

1950), 185(1), 5–14. doi:10.4049/jimmunol.1090043

Usui, T., Wakatsuki, Y., Matsunaga, Y., Kaneko, S., Koseki, H., Kita, T., & Kosek, H. (1997). Overexpression of B cell-specific activator protein (BSAP/Pax-5) in a late B cell is sufficient to suppress differentiation to an Ig high producer cell with plasma cell phenotype. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 158(7), 3197–204.

Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/158/7/3197.short>

Vasanwala, F. H., Kusam, S., Toney, L. M., & Dent, A. L. (2002). Repression of AP-1 function: a mechanism for the regulation of Blimp-1 expression and B lymphocyte differentiation by the B cell lymphoma-6 protooncogene. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 169(4), 1922–9.

Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/169/4/1922.short>

Vaughan, A. T., Roghanian, A., & Cragg, M. S. (2011). B cells - masters of the immunoverse. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(3), 280–5. doi:10.1016/j.biocel.2010.12.005

Victoria, G. D., & Nussenzweig, M. C. (2012). Germinal centers. *Annual review of immunology*, 30, 429–57. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075032

Vinuesa, C. G., Sanz, I., & Cook, M. C. (2009). Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nature reviews. Immunology*, 9(12), 845–57. doi:10.1038/nri2637

Von Boehmer, H., & Melchers, F. (2010). Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease. *Nature immunology*, 11(1), 14–20. doi:10.1038/ni.1794

Wang, R.-S., Saadatpour, A., & Albert, R. (2012). Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. *Physical biology*, 9(5), 055001. doi:10.1088/1478-3975/9/5/055001

Yasuda, Takahiko, Hayakawa, F., Kurahashi, S., Sugimoto, K., Minami, Y., Tomita, A., & Naoe, T. (2012). B cell receptor-ERK1/2 signal cancels PAX5-dependent repression of BLIMP1 through PAX5 phosphorylation: a mechanism of antigen-triggering plasma cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(12), 6127–34. doi:10.4049/jimmunol.1103039

Yasuda, Tomoharu, Kometani, K., Takahashi, N., Imai, Y., Aiba, Y., & Kurosaki, T. (2011). ERKs induce expression of the transcriptional repressor Blimp-1 and subsequent plasma cell differentiation. *Science signaling*, 4(169), ra25. doi:10.1126/scisignal.2001592

Zotos, D., Coquet, J. M., Zhang, Y., Light, A., D'Costa, K., Kallies, A., Tarlinton, D. M. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *The Journal of experimental medicine*, 207(2), 365–78. doi:10.1084/jem.20091777

Zotos, D., & Tarlinton, D. M. (2012). Determining germinal centre B cell fate. *Trends in immunology*, 33(6), 281–8. doi:10.1016/j.it.2012.04.003