

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



**CARACTERIZACIÓN DE AUTOANTÍGENOS EN LA
DIABETES TIPO 1. PAPEL DE LAS GALECTINAS EN LA
ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD.**

Tesis doctoral.

IRIA MARÍA GÓMEZ TOURIÑO

ISBN 978-84-9887-830-1 (edición digital PDF)

Rubén Varela Calviño, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.

Manuel Félix Camiña Darriba, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad”, que presenta Iria María Gómez Touriño para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizada en este Departamento bajo su dirección y que, considerando que se halla concluida, autorizan su presentación para que sea evaluada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman el presente informe,

Fdo: Rubén Varela Calviño

Fdo: Manuel Félix Camiña Darriba

Fdo: Iria María Gómez Touriño

Santiago de Compostela, 22 de Junio de 2011.

El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo la dirección del Doctor Rubén Varela Calviño y del Doctor Manuel Félix Camiña Darriba.

Iria María Gómez Touriño ha disfrutado de las becas para la realización de los estudios de tercer ciclo de la Xunta de Galicia, del contrato María Barbeito para la formación de doctores de la Xunta de Galicia, y de una beca de la Xunta de Galicia para realizar una estancia predoctoral de 6 meses en el Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (Badalona).

A Marcos.

A mis padres y mi hermano.

Agradecimientos.

A Marcos, por estar ahí en los momentos buenos, en los malos y en los regulares. Por sacarme una sonrisa cuando todo está oscuro. Por compartir mis momentos de felicidad. Por aguantar mis “apasionantes” explicaciones sobre linfocitos... Gracias.

A mis padres y mi hermano, por apoyarme en todo momento en este largo viaje, por entender mis extraños horarios de trabajo y mi mal humor cuando un experimento no quería salir bien. Por orientarme en mi camino y por enseñarme a vivir.

A Rubén y a Félix, por haber creado juntos todo lo que aparece (y lo que no aparece) en esta tesis. Por enseñarme todo lo que sé sobre técnicas de laboratorio. Por no desesperar conmigo cuando en los comienzos hacía casi todo al revés☺. Por permitirme hacer los experimentos que se me ocurren. Por las conversaciones buscando explicaciones a los resultados sorprendentes. Por los truquis de fontanería, de electricidad y de informática para que HPLC y ordenadores decidieran funcionar como debían (¡el ajo sirvió de mucho!). Gracias, sin vosotros esto no hubiera sido posible.

A mis amigas de toda la vida (Adela, Ana y las Marías), por las largas conversaciones de los viernes donde desahogarnos de nuestras cosas. Por todo lo que hemos vivido juntas (media vida ya), ¡y lo que nos queda! Por seguir compartiendo juntas todos los momentos importantes que nos esperan. A l@s biólog@s (Vane, Sara, Raquel, Teresa, Lorena, Marta y Martín), por haber sobrevivido junt@s a las fisiologías y las FBAs, y por seguir junt@s desde entonces. Por esas charlas apasionantes sobre células, PCRs a tiempo real y *western blots*. Por su apoyo estén donde estén.

A Iria y Ramón, por los momentos de laboratorio juntos. A los que estáis o habéis estado en el laboratorio de enfrente (Rebe, Irene, Javi, Alberto, Lisa, Leti, los dos Joses, Javier, Mark, Pablo, Sergio, las dos Patricias, Lois...) por la compañía, las conversaciones, ¡y los paseos en barco! Al resto de compañeros del departamento (Óscar, Antonio, Lina, Paz, Luis, Malú, Víctor, Verónica, Montse) por tener siempre un saludo cariñoso conmigo. A Rosa por las risas y los momentos marujiles de las tardes...

A Joan, por acogerme tan bien y con tanto cariño en su grupo, y enseñarme tantas cosas. Por darme la oportunidad de aprender y compartir con ellos. A todos los compañeros de Can Ruti (Jorge Carrascal, Silvia, Raquel, Rosa, Darnel, Aroa, las dos Martas, Patricia, Begoña, Dàlia, Irma, Eva, Ricardo, Jorge Carrillo, Maricarmen, las dos M^a Josés, Marga, Francesc, Eduard...) por tantos momentos especiales (las comidas en el hospital, sus

traducciones del menú del día, las conversaciones, los *Journal clubs* a mediodía☺...) y especialmente por su amistad.

A todos los que me habéis ayudado con diversas técnicas empleadas en esta tesis: a Jana por su ayuda en el “complejo e inabarcable” mundo de la espectrometría de masas, por intentar ayudarme en todo lo que estaba de su mano (¡gracias!); a Raquel, Mari y Ángel por su ayuda con la PCR en tiempo real; a Miguel Ángel por las tinciones de inmunofluorescencia en rata; a Juan por la ayuda con el citómetro; a Javier, Luis, Santiago y todas las enfermeras de Bioquímica Especial, Marcos, África, Christian, Andrea y Eduardo por ayudarnos a conseguir muestras para nuestros estudios.

Y por supuesto a todos los pacientes diabéticos y controles sanos (los voluntarios y los no tan voluntarios☺) por donar sangre para mis investigaciones. Porque sin gente solidaria como ellos no se podría hacer ciencia. Muchas gracias.

ABREVIATURAS

A2.1: molécula de histocompatibilidad HLA-A*02:01.

aa: aminoácido.

ACN: acetonitrilo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

Biotag: epitopo de biotinización.

b-PWM: PWM biotinizada.

BSA: seroalbúmina bovina.

CFSE: 5(6)-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil éster.

CPA: célula presentadora de antígeno.

CRD: dominio de unión a carbohidrato.

DAB: diaminobenzidina.

DAISY: *Diabetes AutoImmunity Study in the Young*.

DMSO: dimetilsulfóxido.

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato.

DR4: molécula de histocompatibilidad HLA-DRB1*04:01.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima.

ELISPOT:

FCS: suero fetal de ternera.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

G418: geneticina.

GAD: decarboxilasa del ácido glutámico.

GADA: anticuerpos anti-GAD.

GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

GFAP: proteína ácida de la glía.

HBSS: tampón salino de Hank.

HLA: antígeno leucocitario humano.

HRP: peroxidasa de rábano.

IA-2: antígeno 2 asociado a insulinoma.

IA-2A: anticuerpos anti-IA-2.

IAA: anticuerpos anti-insulina.

ICA: anticuerpos anti-islole.

IE: índice de estimulación.

IFN- γ : interferón gamma.

Ig: inmunoglobulina.

IGRP: glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes.

IL: interleucina.

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

K562/A2.1: línea celular K562 que expresa A2.1.

K562/A2.1-S100 β : línea celular K562 que expresa A2.1 y S100 β .

kDa: kilodalton.

LB: medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani.

m/z: valor de masa/carga.

MBP: proteína de unión a maltosa.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

MS/MS: espectrometría de masas/masas.

MS: espectrometría de masas.

NOD: ratón no obeso diabético (*non obese diabetic mouse*).

OPD: ortofenilendiamina.

PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

PBS: tampón fosfato salino.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PE: ficoeritrina.

PFR: residuos flanqueantes.

PHA-L: lectina de *Phaseolus vulgaris*.

PMA/I: forbol 12-miristato 13-acetato/ionomicina.

PPPMN: péptido procesado y presentado de manera natural.

pSC: célula peri-islole de Schwann.

PWM: lectina de la hierba carmín (*pokeweed mitogen*).

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa.

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico.

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.

SPA: sistema de presentación de antígeno.

SPF: condiciones libres de patógenos específicos.

SW: swainsonina.

T1DM: diabetes tipo 1.

TAP: transportador de péptidos antigénicos.

TCR: receptor de linfocitos T.

TDG: D-galactopiranosil- β -D-tiogalactopiranosido.
Tiodigalactósido.

TFA: ácido trifluoroacético.

TGF- β : factor de crecimiento transformante β .

Th: linfocito T colaborador (*helper*).

T_h: temperatura de hibridación.

TMB: 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina.

TNF- α : factor de necrosis tumoral α .

TNF- β : factor de necrosis tumoral β .

Treg: linfocito T regulador.

Δ Da: diferencia en daltons entre el m/z teórico y el m/z experimental.

$\Delta\Delta$ Ct: diferencial del diferencial del ciclo umbral.

Índice

1. Capítulo 1: Introducción	1
1.1. Introducción histórica	3
1.2. Clasificación de la diabetes	4
1.3. Etiología de la diabetes tipo 1	5
1.3.1. Factores genéticos	6
1.3.1.1. Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)	7
1.3.1.2. Gen de la insulina	10
1.3.1.3. Gen de la tirosina fosfatasa LYP (<i>PTPN22</i>)	11
1.3.1.4. Gen de la cadena α del receptor de IL-2 (<i>IL-2Rα</i>)	11
1.3.1.5. Gen del antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (<i>CTLA-4</i>)	12
1.3.1.6. Otros <i>loci</i> que incrementan el riesgo de padecer diabetes tipo 1	12
1.3.2. Factores ambientales	13
1.3.2.1. Agentes infecciosos	13
1.3.2.2. Factores dietéticos	16
1.3.2.3. Factores perinatales	17
1.3.2.4. Ambiente psicosocial	17
1.4. El sistema inmune: su papel en la diabetes tipo 1	18
1.4.1. Procesamiento de antígenos y su presentación a linfocitos T CD4 ⁺	18
1.4.2. Procesamiento de antígenos y su presentación a linfocitos T CD8 ⁺	20
1.4.3. Diferenciación y subtipos de linfocitos T CD4 ⁺ : plasticidad de los diferentes linajes	23
1.4.4. Respuesta inmune en la diabetes tipo 1	25
1.4.4.1. Síntesis de autoanticuerpos contra los islotes por parte de los linfocitos B	27
1.4.4.2. Presencia de linfocitos T diabetogénicos en la periferia	27
1.4.4.3. Dirección de la respuesta inmune adaptativa por parte de células del sistema inmune innato	28
1.4.4.4. Posibles mecanismos que expliquen la activación de los linfocitos T durante la respuesta autoinmune	28
1.5. Autoanticuerpos y autoantígenos	31
1.5.1. Autoanticuerpos clásicos	31
1.5.2. Nuevos autoanticuerpos	35
1.5.3. Utilidad de los autoanticuerpos	36
1.5.4. Nuevos autoantígenos en la diabetes tipo 1 humana	38
1.5.4.1. Subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP)	38
1.5.4.2. Proteína ácida de la glía (GFAP)	40
1.5.4.3. S100 β	42
1.5.5. Identificación y cuantificación de linfocitos T autorreactivos y sus dianas moleculares	43
1.5.5.1. Estrategias en la identificación de las dianas moleculares de linfocitos T	43
1.5.5.2. Estrategias en la identificación y caracterización de linfocitos T autorreactivos	46
1.6. Las galectinas y su papel en el sistema inmune	50
1.6.1. Galectina-1	51
1.6.2. Galectina-3	54
1.7. Objetivos	56
2. Capítulo 2: Materiales y Métodos	57
1.1. 2.1. Materiales	59
2.1.1. Materiales biológicos	59
2.1.1.1. Cepas bacterianas	59
2.1.1.2. Plásmidos	59
2.1.1.3. Líneas celulares	61
2.1.1.4. Muestras humanas	62
2.1.1.5. Animales	62
2.1.2. Materiales no biológicos	63
2.1.2.1. Disoluciones y tampones	63
2.1.2.2. Medios de cultivo	64
2.1.2.3. Cebadores	64
2.2. Métodos generales	66
2.2.1. Manipulación de ácidos nucleicos	66
2.2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	66
2.2.1.2. Electroforesis en gel de agarosa	67
2.2.1.3. Purificación de ADN	68
2.2.1.4. Corte de ADN con enzimas de restricción	68

2.2.1.5. Ligación, transformación, selección de clones positivos y secuenciación	68
2.2.2. Manipulación de proteínas	69
2.2.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE)	69
2.2.2.2. <i>Western blot</i>	69
2.2.3. Manipulación de células	70
2.2.3.1. Condiciones de manipulación	70
2.2.3.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.....	70
2.2.3.3. Propagación y conservación de líneas celulares.....	71
2.2.4. Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC)	71
2.2.5. Espectrometría de masas (MS y MS/MS)	72
2.2.6. Análisis estadístico	73
2.3. Métodos específicos.....	74
2.3.1. Clonaje, expresión y purificación de autoantígenos.....	74
2.3.1.1. Glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP)	74
2.3.1.2. Proteína ácida de la glía	76
2.3.1.3. S100 β	78
2.3.2. Determinación de autoanticuerpos contra GFAP y S100 β en pacientes con diabetes tipo 1	80
2.3.2.1. Diseño de un ensayo de ELISA y <i>western blot</i> para la detección de autoanticuerpos contra GFAP	80
2.3.2.2. Detección <i>ex vivo</i> de autoanticuerpos anti-GFAP por inmunofluorescencia	81
2.3.2.3. Diseño de un ensayo de ELISA y <i>western blot</i> para la detección de autoanticuerpos contra S100 β	82
2.3.3. Péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por el alelo de histocompatibilidad HLA-DRB1*04:01	84
2.3.3.1. Puesta a punto del sistema de presentación de antígeno (SPA)	84
2.3.3.2. Crecimiento de células Priess con el SPA	85
2.3.3.3. Preparación de la columna de afinidad anti-DR/proteína A	86
2.3.3.4. Inmunopurificación de DR4 de extractos de células Priess.Fraccionamiento por RP-HPLC	88
2.3.3.5. Espectrometría de masas. Selección de péptidos consenso	89
2.3.3.6. Unión de los péptidos consenso derivados de S100 β a la molécula DR4. Estabilidad del complejo péptido/DR4.....	91
2.3.3.7. Análisis por ELISPOT (IFN- γ , IL-10, IL-17) de la inmunogenicidad de los péptidos consenso derivados de S100 β en sujetos control y pacientes diabéticos.....	92
2.3.4. Péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por el alelo de histocompatibilidad HLA-A*02:01	94
2.3.4.1. Clonaje de S100 β en pcDNA 3.1 (+)/Zeo	94
2.3.4.2. Transfección de las células A2.1/K562 con S100 β . Comprobación de la expresión de S100 β	94
2.3.4.3. Crecimiento de K562/A2.1 y K562/A2.1-S100 β . Preparación de extractos con citrato	98
2.3.4.4. Purificación de péptidos por extracción por fase sólida. Fraccionamiento por RP-HPLC	99
2.3.4.5. Espectrometría de masas. Síntesis de péptidos candidatos	99
2.3.4.6. Digestión <i>in vitro</i> de S100 β por el proteosoma. Identificación de extremos carboxi-terminales.....	100
2.3.4.7. Ensayo de estabilización de A2.1 de los péptidos candidatos.....	101
2.3.5. Generación de hibridomas de linfocitos T infiltrantes de islotes de Langerhans de NOD: estudio preliminar de su especificidad	102
2.3.6. Análisis de la expresión de galectinas.....	107
2.3.6.1. Aislamiento celular, cultivo y polarización	107
2.3.6.2. Cuantificación de ARNm de galectina-1 y -3, Tbet, GATA3 y RORC2.....	108
2.3.6.3. <i>Western blot</i> de extractos celulares para galectina-1 y -3	110
2.3.6.4. Cuantificación de galectinas y citocinas en medio de cultivo mediante ELISA.....	111
2.3.6.5. Detección de galectina-1 de superficie y tinción con PHA-L	112
2.3.6.6. Eliminación de los ligandos de las galectinas de la superficie de linfocitos T	112
3. Capítulo 3: Clonación, expresión y purificación de autoantígenos importantes en la diabetes tipo 1	113

3.1. Clonaje, expresión y purificación de la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP).....	115
3.2. Clonaje, expresión y purificación de la proteína ácida de la glía (GFAP)	118
3.3. Clonaje, expresión y purificación de S100 β	120
3.4. Resumen.....	122
4. Capítulo 4: Determinación de autoanticuerpos contra GFAP y S100 β en pacientes con diabetes tipo 1	123
4.1. Determinación de autoanticuerpos contra GFAP	125
4.2. Determinación de autoanticuerpos contra S100 β	133
4.3. Resumen	140
5. Capítulo 5: Péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por el alelo de histocompatibilidad de clase II DRB1*04:01	141
5.1. Optimización del sistema de presentación de antígeno (SPA)	143
5.2. Crecimiento de células Priess con el SPA, inmunopurificación de DR4 y elución de péptidos presentados por dichas moléculas de histocompatibilidad	146
5.3. Fraccionamiento de péptidos por RP-HPLC y análisis mediante espectrometría de masas.....	148
5.4. Unión a la molécula de histocompatibilidad DR4 de los péptidos consenso derivados de S100 β . Estabilidad del complejo péptido/DR4	162
5.5. Análisis mediante ELISPOT (IFN- γ , IL-10, IL-17) de la inmunogenicidad de los péptidos consenso de S100 β en sujetos control y pacientes diabéticos	170
5.6. Resumen.....	181
6. Capítulo 6: Péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por el alelo de histocompatibilidad de clase I HLA-A*02:01	183
6.1. Clonaje de S100 β y generación de la células presentadoras de antígeno K562/A2.1-S100 β	185
6.2. Crecimiento de K562/A2.1 y K562/A2.1-S100 β : purificación y fraccionamiento de epitopos procesados y presentados de manera natural por la molécula HLA-A*02:01	189
6.3. Espectrometría de masas e identificación de masas únicas.....	191
6.4. Determinación de la capacidad de generación por proteosoma y de la unión a HLA-A*02:01 por parte de los péptidos identificados por espectrometría de masas	195
6.5. Resumen.....	200
7. Capítulo 7: Obtención de hibridomas de linfocitos T infiltrantes de islotes de Langerhans en NOD: determinación de su reactividad frente a S100 β	201
7.1. Obtención de hibridomas de linfocitos T a partir de linfocitos T infiltrantes de islotes de Langerhans de ratones NOD	203
7.2. Determinación preliminar de la especificidad antigénica de hibridomas de linfocitos T	205
7.3. Resumen.....	209
8. Capítulo 8: Importancia de las galectinas en los linfocitos T colaboradores: síntesis de galectina-1 en la diabetes tipo 1	211
8.1. Estudio del patrón de síntesis de galectina-1 y -3 por parte de diferentes subtipos de linfocitos T colaboradores (Th)	213
8.2. Síntesis <i>in vitro</i> de las galectinas-1 y -3 en pacientes con diabetes tipo 1 y controles sanos	219
8.3. Estudio de la secreción de galectina-1 y citocinas por distintos tipos celulares en sujetos control y pacientes diabéticos: células CD4 ⁻ , CD4 ⁺ , Th17 y linfocitos T reguladores	222
8.4. Estudio del nivel de galectina-1 en la superficie celular y su relación con azúcares de superficie en distintos tipos celulares	229
8.5. Efecto de la eliminación de los ligandos naturales de las galectinas sobre el comportamiento <i>in vitro</i> de linfocitos T	238
8.6. Resumen	240
9. Capítulo 9: Discusión	241
10. Conclusiones	263
11. Publicaciones derivadas de la presente investigación	267
12. Bibliografía	271

Capítulo 1:
Introducción.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

1.1. Introducción histórica.

“Agua del lago donde beben los pájaros, fibras de la planta asit, leche fresca, arbusto remojado en cerveza, flores del pepino y dátiles no maduros”. Éste es el primer tratamiento conocido para la diabetes, descrito en el papiro de Ebers encontrado en 1862 en Luxor, Egipto. Este papiro constituye uno de los primeros tratados médicos conocidos (siglo XV antes de Cristo), con 110 páginas conteniendo 700 fórmulas magistrales y remedios para distintas patologías. En él se describe una enfermedad de características muy semejantes a las de la diabetes, así como su tratamiento, cuya finalidad principal era disminuir la poliuria observada en los enfermos.

También la antigua literatura hindú en los Vedas describe pacientes cuya orina atrae a las hormigas, resultando ser pegajosa y con sabor a miel. De hecho Súsruta, el padre de la medicina hindú, ya describió la enfermedad y clasificó a los pacientes en pacientes jóvenes y delgados y que morían pronto, y pacientes obesos y mayores, lo que claramente se relaciona con la diabetes tipo 1 y la tipo 2. El término “diabetes” fue probablemente acuñado por Areteo de Capadocia de los términos Dia "a través" y Betes "pasar", para describir que el agua pasaba a través del paciente sin permanecer en él mucho tiempo, generando un estado de debilidad, sed y poliuria. No fue hasta finales del siglo XVIII cuando John Rollo añadió el término “mellitus” (miel en latín) para diferenciar la poliuria producida por diabetes de otros tipos de poliuria.

Hasta el siglo XIX se pensó que la causa de la diabetes provenía del riñón, pero en ese siglo Minskowski y von Mering pancreatomizaron un perro, descubriendo que el animal acababa desarrollando todos los síntomas de una diabetes severa, con poliuria, polidipsia, polifagia, hiperglucemia y glucosuria. Este descubrimiento llevó a muchos investigadores a intentar purificar del páncreas la sustancia que regulaba los niveles de azúcar. Por ese entonces Paul Langerhans había observado unos racimos de células pancreáticas bien diferenciadas de las demás y que finalmente se llamaron islotes de Langerhans, descubriéndose que presentaban actividad exocrina.

Shafer y otros observaron que la diabetes estaba ocasionada por la carencia de una proteína producida en las células de los islotes de Langerhans y que denominaron insulina. Sus intentos por tratar a pacientes diabéticos con extractos de páncreas fueron infructuosos, seguramente por la presencia de proteasas en los extractos. Uno de los descubrimientos importantes y críticos en el tratamiento de esta enfermedad, y que les valió el premio Nobel,

fue llevado a cabo por Banting y Best cuando consiguieron obtener un extracto de páncreas de perro libre de tripsina, el cual comprobaron que reducía o anulaba la glucosuria en perros donde se había inducido una diabetes experimental. Tiempo después aplicaron este extracto a un paciente de 14 años, alargando su vida en 12 años más.

A partir de entonces los descubrimientos acerca de la etiología y tratamiento de la diabetes han ido creciendo exponencialmente hasta nuestros días, desde el descubrimiento de la estructura primaria de la insulina a la producción de insulina recombinante y mecanismos de detección más tempranos, mejorando significativamente la esperanza y calidad de vida de estos enfermos.

1.2. Clasificación de la diabetes.

La diabetes se puede definir como un desorden metabólico provocado bien por una deficiencia en la producción de insulina por parte de las células β de los islotes de Langerhans o por una resistencia de los tejidos periféricos al efecto de la insulina, cursando con hiperglicemia y glucosuria.

A día de hoy se distinguen diferentes tipos de diabetes en función de su etiología y cuya clasificación ha sido establecida por la Asociación Americana para la Diabetes (ADA) (*Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. 2003*):

- **Diabetes tipo 1.** Caracterizada por la destrucción de las células β del páncreas con la consiguiente deficiencia absoluta de insulina. Se consideran dos subtipos:
 - **Diabetes tipo 1 autoinmune.** También denominada T1DM (“*type 1 diabetes mellitus*”) o diabetes insulino-dependiente, la cual se caracteriza por estar fuertemente asociada al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), por la presencia de autoanticuerpos específicos contra antígenos de los islotes de Langerhans y por la dependencia de insulina. Los pacientes suelen desarrollar la enfermedad antes de los 30 años.
 - **Diabetes tipo 1 idiopática.** De etiología desconocida y en la que no existe evidencia de autoinmunidad contra la célula β . Tiene un carácter fuertemente hereditario y no se ha encontrado asociación con ningún haplotipo del sistema HLA. Los pacientes con este tipo de diabetes son de origen africano o asiático.

- **Diabetes tipo 2.** También denominada diabetes no insulino dependiente. Este tipo de diabetes comprende situaciones que van desde una fuerte resistencia a la insulina con deficiencia relativa en la secreción a una secreción fuertemente disminuida de insulina con resistencia moderada. Aparece de manera más habitual en adultos, siendo la mayoría de ellos obesos, y sólo una porción de los pacientes acaba necesitando tratamiento crónico con insulina.
- **Otros tipos de diabetes.** Causados por defectos en la función de las células β o en la propia insulina, como por ejemplo la diabetes juvenil de debut tardío (MODY, “*maturity onset diabetes of the young*”); enfermedades del páncreas exocrino como las pancreatitis; endocrinopatías como la acromegalia; la diabetes inducida por drogas o compuestos químicos como por ejemplo la diabetes inducida por el raticida 1-(4-nitrofenil)-3-(3-piridilmetil) urea (“*Vacor*”); la diabetes inducida por infecciones como la rubéola congénita; formas poco frecuentes de diabetes inmune como el síndrome de la persona rígida (“*Stiff-man syndrome*”); y otros síndromes genéticos asociados a veces con la diabetes como es el síndrome de Down.
- **Diabetes gestacional.** Intolerancia a la glucosa que comienza o es detectada por primera vez durante el embarazo y que en la mayoría de los casos desaparece tras el parto.

En el presente estudio nos hemos centrado en el estudio de la diabetes tipo 1 autoinmune (T1DM), enfermedad causada por la muerte de las células β iniciada y/o acelerada por desencadenantes ambientales aún por definir y que tiene lugar en individuos con una predisposición genética a la enfermedad (Winter y cols. 2010). Aunque este tipo de diabetes se puede controlar con inyecciones de insulina, los pacientes que la presentan pueden desarrollar complicaciones a largo plazo como ceguera, fracaso renal, y complicaciones micro y macrovasculares que pueden conducir a la muerte. En esta patología las células β del páncreas, productoras de insulina, son atacadas por el sistema inmune del propio individuo, ataque en el que parecen participar tanto linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ autorreactivos (Yoon y cols. 2005), siendo las dianas moleculares sobre las que actúan muy dispares y heterogéneas (Lieberman y cols. 2003a).

1.3. Etiología de la diabetes tipo 1.

En el desarrollo de la T1DM autoinmune están implicados tanto factores genéticos como ambientales. El concepto tradicional sobre el origen de esta enfermedad es que factores

ambientales, tales como agentes microbianos y químicos, pudieran actuar como iniciadores de la respuesta inmune contra la célula β en un individuo genéticamente predispuesto al desarrollo de la enfermedad (Peng y cols. 2006; Rabinovich. 1994). Esta enfermedad constituye el paradigma de la autoinmunidad órgano-específica (Somoza y cols. 1994). Comprender la compleja relación que existe entre los factores genéticos, los factores ambientales y los componentes inmunológicos de la enfermedad en relación con los antígenos propios y extraños es la *conditio sine qua non* para proponer estrategias válidas contra la diabetes y eventualmente plantear aproximaciones terapéuticas posibles y seguras (Bertera y cols. 1999).

Con la idea de entender mejor dicha relación repasaremos a continuación los factores genéticos, ambientales y los aspectos inmunológicos que se han relacionado con la patogénesis de la T1DM quedando, no obstante, muchas lagunas en el conocimiento de la misma.

1.3.1. FACTORES GENÉTICOS.

La susceptibilidad de desarrollar T1DM es hereditaria y existen diferencias marcadas en el riesgo de padecerla en función de la relación familiar con el paciente diabético. En este sentido, el riesgo máximo se produce en los gemelos monocigóticos de los pacientes afectados, seguido de los familiares en primer, segundo y tercer grado. Si el paciente es el padre, el riesgo de que el hijo desarrolle la enfermedad es del 6%; sin embargo, si es la madre este riesgo se encuentra entre el 1 y el 4%, variando en función de la edad a la que se conciba el hijo. Si el debut diabético de la madre tuvo lugar antes de los 11 años de edad este riesgo se duplica (American Diabetes Association). Se sabe que hijos de madres con autoanticuerpos relacionados con la diabetes poseen al nacer títulos detectables de anti-GAD65 o anti-IA2, los cuales desaparecen con el tiempo, y estos niños presentan un menor riesgo de desarrollar la enfermedad en los siguientes 5-8 años, de forma que parece que la presencia de estos autoanticuerpos en el nacimiento transferidos vía materna protege o retrasa, al menos parcialmente, la aparición de la T1DM. Quizás esto influya en el distinto porcentaje de riesgo observado según si el progenitor diabético del individuo en consideración sea el padre o la madre (Peng y cols. 2006).

Existen varios *loci* que confieren susceptibilidad a padecer T1DM de los cuales la región del antígeno leucocitario humano (HLA; *locus IDDM1* o “*insulin-dependent diabetes mellitus 1*”) es el más importante; otros *loci* importantes identificados hasta la fecha son el

locus del gen de la insulina o *IDDM2*, el *locus* del gen de la tirosina fosfatasa LYP (*PTPN22*), el *locus* del antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (*CTLA-4*) o el *locus* para la cadena α del receptor de la IL-2 (*IL2RA*), aunque existen otros *loci* minoritarios que también aportan cierto riesgo (para una revisión de los datos expuestos a continuación consultar Jahromi y cols. 2006).

1.3.1.1. El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

La principal región génica asociada con la predisposición o protección frente al desarrollo de la T1DM es la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la cual aporta el 40-50% del riesgo genético a padecer la enfermedad. Incluye una región única de genes estrechamente ligados en el cromosoma 6 humano (6p21.31), cuyos productos aparecen representados de forma notable en las superficies celulares y constituyen una barrera frente a los transplantes. En el ser humano la región del MHC se denomina también región del antígeno leucocitario humano (HLA o “*human leukocyte antigen*”). Dentro de esta región del MHC se distinguen tres regiones importantes en función de los productos génicos codificados:

- **Región del MHC de clase I.** Se encuentran los *loci* para las denominadas moléculas de histocompatibilidad de clase I. Estas moléculas se expresan en la superficie celular de casi todas las células. De todos los *loci* identificados, tres de ellos (HLA-A, -B y -C) codifican antígenos importantes en la respuesta inmune y definidos a nivel serológico. Cada uno de estos antígenos de clase I consta de una cadena pesada polimorfa (cadena α) con tres dominios extracelulares, de los cuales dos de ellos determinan la especificidad de unión a antígenos de la molécula; y una subunidad β 2-microglobulina invariable, común para los tres *loci* de clase I y cuyo gen se encuentra en el cromosoma 2 (Figura 1A y 1C).
- **Región del MHC de clase II.** Los antígenos expresados por los genes presentes en estos *loci* se expresan, en condiciones normales, sólo en los linfocitos B, algunos monocitos y los linfocitos T activados. También en este caso, tres de los *loci* presentes en esta región (HLA-DR, -DQ y -DP) codifican antígenos que participan directamente en la respuesta inmune. Los antígenos de clase II constan de dos cadenas polipeptídicas polimorfas (α y β), con la excepción de las moléculas de histocompatibilidad DR donde sólo la cadena β es polimorfa. Ambas cadenas

polipeptídicas poseen dos dominios extracelulares cada una de las cuales define la especificidad de unión a antígeno de la molécula (Figura 1B y 1C).

- **Región del MHC de clase III.** Localizada entre las regiones I y II (Figura 1C) y donde se encuentran toda una serie de *loci* que codifican productos que participan en la respuesta inmune como son los componentes C4, C2 y Bf del complemento y algunas citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) α y β .

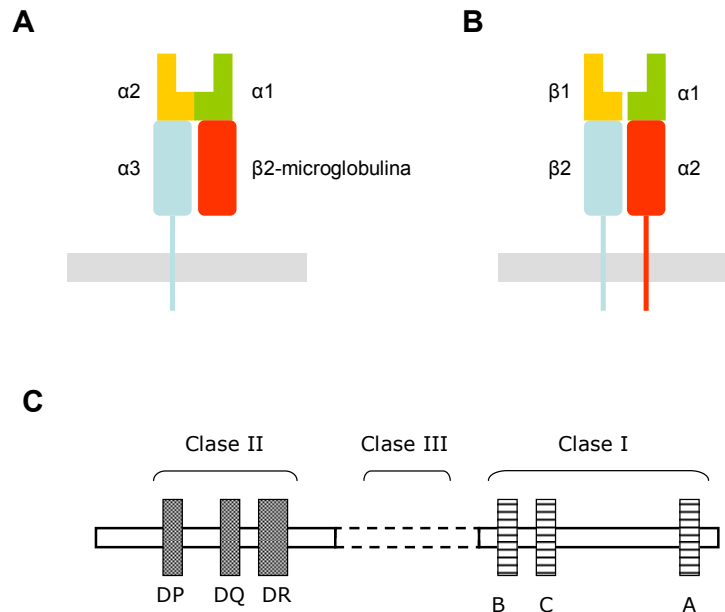


Figura 1. Estructura de las moléculas de histocompatibilidad de clase I y clase II y esquema de la región del MHC humano. A. Las moléculas de histocompatibilidad de clase I constan de una cadena α polimorfa la cual posee 3 dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), de los cuales los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ determinan la especificidad de unión de la molécula, y una cadena invariable denominada $\beta 2$ -microglobulina. B. Las moléculas de histocompatibilidad de clase II constan de 2 cadenas polimorfas cada una de ellas con dos dominios extracelulares, una cadena α (dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$) y una cadena β (dominios $\beta 1$ y $\beta 2$); la yuxtaposición de los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ determinan la especificidad de unión antigénica de la molécula. C. Esquema de la región HLA del cromosoma 6 humano, mostrando los grupos de genes de la región del MHC de clase II (DP, DQ y DR), de la región del MHC de clase I (B, C y A) y, entre ambas, la región del MHC de clase III.

Los *loci* del MHC de clase I y II son uno de los más polimorfos del genoma humano; a modo de ejemplo para el *locus* A de clase I se han identificado hasta la fecha 1.601 alelos para la cadena α los cuales codifican para unos 1.176 polipéptidos (IMGT/HLA Database; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). A pesar de la existencia de un enorme número de variantes alélicas circulando por la población, el número de combinaciones alélicas es reducida ya que una característica importante de esta región del MHC es que existe un gran desequilibrio de ligamiento entre los diferentes *loci* aquí localizados, de forma que el conjunto de alelos

presentes en un cromosoma se heredan en bloque, sin que exista recombinación entre el cromosoma materno y paterno durante la meiosis, formando conjuntos estables de alelos que reciben el nombre de haplotipos, y son estos haplotipos o conjuntos de alelos los que confieren predisposición o protección frente al desarrollo, no sólo de la T1DM, sino frente a las distintas enfermedades autoinmunes.

A día de hoy se conocen haplotipos y moléculas HLA concretas que confieren susceptibilidad frente al desarrollo de la T1DM humana, de forma que el 96% de los pacientes caucásicos poseen los haplotipos DR3/DQ2 (DRB1*03:01 / DQA1*05:01-DQB1*02:01) y DR4/DQ8 (DRB1*04 / DQA1*03:01-DQB1*03:02), siendo entre el 30-50% de ellos heterocigotos DR3/4-DQ2/8. Además, parece que diferentes alelos del *locus* DRB1 modulan el riesgo introducido por alelos DQ, ya que mientras que DRB1*04:05-DQB1*03:02 es un haplotipo de riesgo, el haplotipo DRB1*04:03-DQB1*03:02 es neutral o protector. Además de los haplotipos que confieren susceptibilidad, se han identificado también haplotipos que se asocian con la protección frente al desarrollo de la T1DM como el DRB1*15:01 / DQA1*01:02-DQB1*06:02, el cual se encuentra presente en el 20% de la población general pero sólo en un 1% de los pacientes diabéticos caucásicos (She, 1996). En el estudio DAISY (*Diabetes AutoImmunity Study in the Young*), realizado mediante identificación de antígenos HLA en sangre de cordón umbilical de 5.000 recién nacidos de la población general de Denver, se encontró que el genotipo de mayor riesgo de desarrollar diabetes mellitus (DRB1*03/ DRB1*04, DQB1*0302) estaba presente en la población general en el 2,4% de blancos no hispanos, en el 2,8% de hispanos y en el 1,6% de afroamericanos. Los genotipos de riesgo moderado (DRB1*04, DQB1*0302/DRB1*04, DQB1*0302, DRB1*04, DQB1*0302/x o DRB1*03/DRB1*03) estaban presentes en estos mismos grupos en el 17%, 24% y 10% respectivamente (Rewers y cols. 1996).

La susceptibilidad, o protección, que confieren los antígenos HLA de clase II parece estar asociada con polimorfismos en determinadas posiciones aminoacídicas de la secuencia de la cadena β de DQ, polimorfismos situados en la región de unión a los péptidos antigénicos y que por tanto podrían afectar al conjunto de péptidos que podría presentar una molécula HLA concreta. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos más frecuente de DQ β contiene un ácido aspártico en la posición 57, capaz de formar un puente salino a través de uno de los extremos de la hendidura de unión a péptidos de la molécula DQ. En poblaciones euroasiáticas los pacientes diabéticos suelen tener otro aminoácido en esa posición (valina, serina o alanina), produciendo moléculas DQ que carecen de ese puente salino, y que

previsiblemente presentarán péptidos con características diferentes a los de individuos sin T1DM, de tal modo que se postula que la variación poblacional en la distribución de estos alelos sin ácido aspártico en posición 57 podría explicar en gran medida la variación geográfica de la incidencia de la T1DM. De hecho se propone que la asociación entre la diabetes tipo 1 y los alelos DR3 y DR4 se debe principalmente a su asociación con alelos DQ que no presentan ácido aspártico en la posición 57 (Todd y cols. 1987; Dorman y cols. 1990).

Además de esta asociación con los antígenos del MHC de clase II también se ha encontrado una asociación, si bien menos evidente probablemente debido al desequilibrio de ligamiento, entre el desarrollo de la T1DM y determinados alelos para moléculas de HLA de clase I. Así, la presencia del alelo HLA-B*39 se asocia con una aparición de la enfermedad a una edad más temprana, mientras que el alelo HLA-A*02 aumenta el riesgo en pacientes con el haplotipo DR3/4-DQ8. De hecho el alelo HLA-A*02:01 (A2.1) se halla presente en más del 60% de los pacientes con diabetes tipo 1 y se ha demostrado la presencia de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos que reaccionan contra autoantígenos como la insulina, la isoforma 65 de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD₆₅), la glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes (IGRP) o la IAPP (polipéptido amiloide de islote) presentados por esta molécula de clase I (Pinkse y cols. 2005; Panina-Bordignon y cols. 1995; Lieberman y cols. 2003b; Panagiotopoulos y cols. 2003; van Belle y cols. 2011). Es más, existe una prueba funcional de que A*02:01 selecciona linfocitos CD8⁺ autorreactivos capaces de destruir los islotes, ya que ratones NOD transgénicos para este antígeno HLA humano desarrollan síntomas clínicos a una edad más temprana que ratones NOD no transgénicos (Marron y cols. 2002).

1.3.1.2. Gen de la insulina.

El *locus IDDM2* conteniendo el gen para la insulina también se ha asociado con el riesgo a padecer diabetes, explicando un 10% del riesgo hereditario. Todos los polimorfismos detectados se encuentran fuera de la región codificante en forma de repeticiones en tándem de número variable (VNTR) en la región promotora del gen; el número de repeticiones parece determinar el nivel de expresión del gen, ya que afectan a la unión del producto del gen *AIRE* (proteína de regulación de autoinmunidad –*autoimmune regulator protein*–) a la región promotora, de tal modo que un menor número de estas repeticiones (variante corta) induce menores niveles de expresión del gen respecto de la variante conteniendo mayor número de repeticiones (variante larga) (Pugliese y cols. 1997).

Se postula que el aumento de la susceptibilidad aportado por esta región podría venir determinado por una reducción en la expresión del gen de la insulina por células presentadoras de antígeno (CPAs) en el timo y los tejidos linfoides periféricos, donde la producción de autoantígenos como la insulina pueden ser cruciales para el mantenimiento de la tolerancia, de tal modo que los sujetos homocigotos para la variante corta presentan mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad, quizás por presentar una cantidad deficiente de insulina en el timo, permitiendo la salida hacia la periferia de linfocitos T autorreactivos específicos contra la insulina (Jahromi y cols. 2006).

1.3.1.3. Gen de la tirosina fosfatasa LYP (*PTPN22*).

En cuanto al *locus* del gen de la tirosina fosfatasa LYP (*PTPN22*), existen variantes alélicas, concretamente el alelo LYP-Trp 620, que confieren susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. En este alelo una mutación lleva a un cambio de una arginina por un triptófano en la posición 620, haciendo que la fosfatasa no se pueda unir a la molécula de señalización Csk (Bottini y cols. 2004).

Los estudios que intentar explicar el mecanismo por el cual esta mutación es importante en la T1DM son contradictorios: por una parte se sugiere que la mutación podría conllevar una pérdida de función por parte de esta fosfatasa, provocando una reducción en el umbral necesario para inducir la activación de células T autorreactivas en la periferia (van Belle y cols. 2011). Por otro lado, también se sugiere que podría llevar a una ganancia de función, que haría que la fosfatasa suprimiera la señalización a través del receptor del linfocito T (TCR) durante su desarrollo en el timo, pudiendo permitir el escape de la selección negativa de linfocitos T autorreactivos (Vang y cols. 2005). Este alelo también se halla asociado a otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o el lupus eritematoso sistémico (Begovich y cols. 2004; Kyogoku y cols. 2004).

1.3.1.4. Gen de la cadena α del receptor de IL-2 (*IL-2R α*).

La cadena α del receptor de la interleucina-2 (IL-2) (*IL-2R α* ; CD25) se expresa en linfocitos T reguladores (Treg) y en linfocitos T activados. La IL-2 es necesaria para el crecimiento y supervivencia de los linfocitos Treg, por lo que un defecto en el receptor podría suponer un problema en su funcionalidad, ya que la presencia de la subunidad *IL-2R α* aumenta la afinidad del receptor de IL-2 por esta citocina. Variaciones alélicas en la región que contiene el gen *IL-2R α* en el intrón 1 y región 5' del gen por polimorfismos en un solo nucleótido (SNPs) parecen conferir riesgo a padecer T1DM, encontrándose además

asociación entre estas variantes y menores niveles de IL2R α soluble (Lowe y cols. 2007). Niveles disminuidos de IL2R α soluble también han sido detectados en otras enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Maier y cols. 2009).

De todos modos hoy en día aún no se conoce por medio de qué mecanismo/s mutaciones en el gen de IL2R α aumentan el riesgo de padecer diabetes tipo 1 (Vella y cols. 2005).

1.3.1.5. Gen del antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (*CTLA-4*).

Finalmente, otro *locus* importante a la hora de conferir susceptibilidad a padecer T1DM es el gen *CTLA-4* (*ITIM2*), que codifica para el antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (Nisticò y cols. 1996). Esta proteína posee una estructura similar a la molécula coestimuladora CD28 pero, al contrario que ella, actúa impidiendo que tenga lugar la coestimulación mediada por CD28 y B7, necesaria para la activación del linfocito T, restringiendo con ello la activación del linfocito, limitando la activación linfocitaria y, con ello, la respuesta inmune. Su papel en la regulación negativa del sistema inmune es clave, ya que ratones deficientes en *CTLA-4* desarrollan graves síndromes linfoproliferativos (Waterhouse y cols. 1995).

Diversos polimorfismos SNPs tanto en la región promotora como en el exón 1 del gen *CTLA-4* están asociados al desarrollo de T1DM. El más importante es el polimorfismo A49G, que cambia la secuencia aminoacídica primaria de *CTLA-4* de forma que la variante codificada por este alelo es procesada incorrectamente en el retículo endoplasmático y presenta a una expresión reducida en la superficie celular (Anjos y cols. 2002) al verse afectada la oligomerización de la proteína y/o su retención en la superficie (Teft y cols. 2006). De todos modos la hipótesis predominante es que las variantes alélicas disminuyen los niveles de ARN mensajero de la variante soluble de *CTLA-4* (Ueda y cols. 2003).

La asociación entre ciertas variantes alélicas del gen *CTLA-4* y otras enfermedades autoinmunes también ha sido demostrada, como es el caso de la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide (Mäurer y cols. 2002; Barreto y cols. 2004; Vaidya y cols. 2002).

1.3.1.6. Otros *loci* que incrementan el riesgo de padecer diabetes tipo 1.

La realización de estudios de asociación en genoma completo (*genome-wide genome association; GWA*) ha permitido identificar hasta 40 *loci* que aumentan, en mayor o menor

medida, el riesgo a padecer T1DM, como la región codificante de la IL-10 (Barrett y cols. 2009), el gen *TYK2*, cuyo producto interviene en procesos de señalización inducidos por IFN- α , IL-6, IL-10 e IL-12 (Wallace y cols. 2009), o la helicasa I inducida por interferón (IFIH1) (Smyth y cols. 2006). Esta última proteína contribuye al reconocimiento del ADN de doble cadena de picornavirus como el Coxsackie virus B, y se han detectado mayores niveles de ARN mensajero para esta proteína en PBMCs de pacientes con diabetes tipo 1, de tal modo que niveles mayores de esta proteína conducen a una inmunidad antiviral exacerbada y a la producción de interferones de clase I (Liu y cols. 2009). Existen en T1DM algunas variantes protectoras de IFIH1, debidas a una mutación que conduce a la expresión de una forma truncada de la proteína (Nejentsev y cols. 2009).

1.3.2. FACTORES AMBIENTALES.

Durante los últimos 60 años la incidencia de la diabetes tipo 1 ha ido aumentando entre un 3 y un 5% cada año, doblándose el número de casos cada 20 años (*TEDDY study Group*. 2008). Este rápido aumento en la incidencia de la enfermedad se explica mejor por cambios en los factores ambientales que en los factores genéticos. Se han detectado diferencias de prevalencia de la enfermedad muy elevadas entre regiones geográficamente cercanas y con genotipos HLA equivalentes (Kondrashova y cols. 2005), lo cual apunta a la importancia que los factores ambientales deben tener en el desarrollo de la enfermedad. Existen además pequeñas “epidemias” regionales de diabetes tipo 1 que sólo se podrían explicar por exposiciones a agentes ambientales (Bodington y cols. 1995; Yang y cols. 2005).

Así pues existe una susceptibilidad genética que es ampliamente influenciada por factores ambientales y el problema reside en la dificultad de poder identificar estos factores ambientales y su papel en el desarrollo de la enfermedad. Hoy en día se sospecha de 4 grupos de factores ambientales que se piensa influyen en la aparición y/o desarrollo de la T1M; estos 4 grupos son a) agentes infecciosos, b) factores dietéticos, c) factores perinatales y d) ambiente psicosocial (para una revisión exhaustiva de estos factores consultar Peng y cols. 2006; van Belle y cols. 2011):

1.3.2.1. Agentes infecciosos.

➤ **Virus.**

Desde hace mucho tiempo se piensa que las infecciones víricas pueden desencadenar autoinmunidad contra los islotes vía infección de las células β durante un tiempo prolongado,

ya que algunos estudios han identificado virus en islotes de Langerhans de pacientes con diabetes tipo 1 (Yoon y cols. 1979; Hashimoto y cols. 2003). También es posible que esta autoinmunidad venga determinada por procesos de mimetismo molecular (Kaufman y cols. 1992), o por activación inespecífica de la respuesta inmune adaptativa debida a la activación de la respuesta inmune innata (Ellerman y cols. 1996).

Quizás una de las relaciones más claras entre infecciones virales y el desarrollo de diabetes tipo 1 sea el del caso de la rubeóla, ya que más del 12% de niños con rubeóla congénita acabaron desarrollando la enfermedad (Ginsberg-Fellner y cols. 1985). De hecho, la progresión hacia la diabetes en pacientes con rubeóla congénita se ha asociado con la presencia de haplotipos que confieren susceptibilidad a la T1DM (Menser y cols. 1974). Sin embargo, y ya que la prevalencia de la rubeóla ha disminuido significativamente en los últimos años, ésta no puede explicar el aumento en la prevalencia de la diabetes tipo 1.

Aparte del virus de la rubeóla, de todos los otros grupos víricos la familia de los Picornavirus es la que ha atraído mayor atención y la que ha sido más ampliamente estudiada. Así, se han asociado con el desarrollo de la T1DM infecciones con virus entéricos, especialmente el virus Coxsackie B, capaz de infectar selectivamente a las células β del islote. La infección con este virus provoca una expresión dos a tres veces superior de GAD₆₅ en los islotes de ratones NOD, y la mayoría de los animales infectados desarrollan más tarde anticuerpos anti-GAD e hiperglucemia (Hou y cols. 1993). Es posible que la infección por este virus induzca la expresión aumentada de IFN- α , con el consiguiente aumento de la expresión de moléculas de HLA de clase I, hechos que son iniciadores de la respuesta autoinmune en islotes. Se ha detectado la presencia de infección por enterovirus, mediante detección de la proteína enteroviral de la cápside vp1, en el 61% de pacientes con T1DM de reciente diagnóstico, frente a sólo un 6% de controles, aunque el 40% de pacientes con diabetes tipo 2 también mostraron trazas de infección (Richardson y cols. 2009). Otro estudio que analizaba la presencia de ARN de enterovirus en suero por RT-PCR detectó que el 57% de los pacientes diabéticos presentaba ARN enterovírico durante los 6 meses previos a la primera aparición de autoanticuerpos, frente al 31% de controles (Lönnrot y cols. 2000). Además, en el intestino delgado del 75% de pacientes con T1DM se ha detectado la presencia de enterovirus, en comparación con el 10% de controles (Oikarinen y cols. 2007).

Además de la posibilidad de que la propia infección desencadene autoinmunidad o exacerbe la ya existente, existen ciertos datos que apoyarían la hipótesis del mimetismo molecular, según la cual epitopos de las proteínas expresadas por el virus podrían ser

semejantes estructuralmente a moléculas no relacionadas codificadas por genes del huésped. Esta similitud antigénica pudiera dar lugar a una reacción cruzada de algunas células T activadas contra el agente infeccioso, que atacarían tejidos propios que tuvieran determinantes antigénicos similares. Esta similitud se ha demostrado entre la proteína P2C del Cocksackievirus B y el autoantígeno GAD₆₅ (Vreugdenhil y cols. 1998), aunque estudios recientes parecen descartar esta posibilidad en el caso de linfocitos T CD8⁺ (Varela-Calviño y cols. 2004). Aunque existen estudios que relacionan el inicio de la reacción autoinmune en la T1DM e infecciones con enterovirus, estudios a gran escala como DAISY o BABY-DIAB no han encontrado esta asociación (Graves y cols. 2003; Fuchtenbusch y cols. 2001).

Otros autores han propuesto a los rotavirus como posibles agentes etiológicos de la T1DM ya que éstos constituyen una causa frecuente de gastroenteritis en niños y además podría darse una situación de mimetismo molecular entre proteínas víricas de rotavirus y los autoantígenos GAD₆₅ e IA-2 (Honeyman y cols. 1998). El papel de otros virus en el inicio y/o desarrollo de la T1DM como citomegalovirus (Pak y cols. 1988), parvovirus (Kasuga y cols. 1996) y el virus de la encefalomiocarditis (Craighead y cols. 1968) han sido también objeto de estudio.

➤ **Bacterias.**

La composición bacteriana del intestino de pacientes con T1DM parece desempeñar un papel importante en la susceptibilidad y/o protección frente a la enfermedad. Se ha sugerido que la pared intestinal de pacientes diabéticos tipo 1 no tiene la suficiente capacidad para constituir una barrera eficaz que separe las bacterias del lumen del sistema inmune intestinal (Vaarala y cols. 2008). De este modo se aumenta la exposición de antígenos bacterianos al sistema inmune, teniendo lugar una activación inmune subclínica (Westerholm-Ormio y cols. 2003), dando lugar a una función deficiente de los linfocitos Treg (Tiittanen y cols. 2008).

Por otra parte, parece ser que la administración de probióticos podría prevenir la autoinmunidad en los islotes (Calcinaro y cols. 2005; Ljungberg y cols. 2006). En ratones NOD el mantenimiento en condiciones SPF (libres de patógenos específicos), así como el suministro de antibióticos, aumentan la prevalencia de la enfermedad, al disminuir la carga bacteriana a la que el ratón está expuesto, sugiriendo que algún tipo concreto de bacteria podría estar protegiendo de la aparición de la enfermedad. (Bach y cols. 2002). En el polo opuesto, ratones NOD deficientes en una proteína adaptadora para diversos receptores del

sistema inmune innato que reconocen estímulos microbianos (MyD88) no sufren diabetes tipo 1, aunque se les transfieran linfocitos T CD4⁺ diabetogénicos. La administración de antibióticos o el mantenimiento en condiciones SPF restableció el potencial de padecer la enfermedad. Se postula entonces que el reconocimiento anormal de algunas bacterias intestinales puede ser indispensable para el desarrollo de la diabetes en el ratón NOD, mediante una vía que se halla interrumpida en el ratón NOD deficiente para MyD88 (Wen y cols. 2008).

1.3.2.2. Factores dietéticos.

Existen componentes de la alimentación que pueden influir en el inicio, desarrollo y/o protección de la diabetes tipo 1. Así, lactancia materna, zinc, vitaminas C, D y E parecen proteger de la aparición de la diabetes tipo 1, mientras que parece existir una relación entre la administración de determinados alimentos a edades tempranas como la leche de vaca, cereales/gluten, patatas, zanahorias o bayas y el desarrollo de T1DM; de la misma forma inhalación de compuestos N-nitrosos como los utilizados para curar la carne de oveja, o un consumo excesivo de calorías parecen favorecer el desarrollo de la enfermedad (Peng y cols. 2007).

Se ha encontrado que los pacientes con T1DM presentan elevados títulos de anticuerpos contra la proteína láctea seroalbúmina bovina (BSA) y que estos anticuerpos reconocen principalmente un péptido de 17 aminoácidos derivado de ésta (ABBOS). Anticuerpos contra ABBOS reconocen además de forma cruzada una proteína presente en la superficie de las células β , lo que podría conllevar la muerte de dichas células, sugiriendo que la toma de leche de vaca podría influir en el desarrollo de la T1DM (Karjalainen y cols. 1992). Existen sin embargo varios estudios que descartan la asociación entre la inmunidad contra la leche de vaca y la autoinmunidad en las células β , incluyendo el estudio a gran escala DAISY (*Diabetes Autoimmunity Study in the Young*) (Atkinson y cols. 1993; Norris y cols. 1996). El consenso actual parece ser que más que un consumo temprano de leche de vaca, la menor duración de la lactancia materna junto con una mayor ingestión calórica a edades tempranas y/o una alteración de la inmunidad de la mucosa serían los verdaderos factores que aumentarían el riesgo de desarrollar la enfermedad.

Una dieta libre de leche de vaca pero basada en cereales como el trigo causó una mayor incidencia de diabetes en ratones NOD, induciendo una polarización hacia un fenotipo tipo Th1 en el intestino (Flohé y cols. 2003). En cuanto a pacientes con T1DM, se ha

observado en ellos un mayor porcentaje de linfocitos T reactivos al gluten de trigo, afirmando que dicha exposición al gluten durante la infancia temprana podría influir en el debut de la T1DM (Klemetti y cols. 1998; Norris y cols. 2003). Sin embargo, más que iniciar la enfermedad se cree que, al igual que para la leche de vaca, la respuesta inmune no sería específica, sino más bien causada por defectos en la inmunidad de la mucosa intestinal (van Belle y cols. 2011).

La vitamina D ha demostrado ser un claro factor protector en la diabetes tipo 1. De hecho, la aparición de la diabetes tiene lugar más frecuentemente durante el invierno, período en el que la intensidad y duración de la luz del sol es limitada, sintetizándose por ello menor cantidad de vitamina D. Esta vitamina inhibe la diferenciación de células dendríticas y la activación inmunitaria (Adorini y cols. 2008). Se han encontrado menores niveles de vitamina D en plasma de pacientes con T1DM de debut reciente respecto de controles (Littorin y cols. 2006), y el aumento en la ingesta de vitamina D disminuye la incidencia de la enfermedad en ratones NOD y en humanos (Mathieu y cols. 1994 y 2005). Sin embargo, el suministro de esta vitamina como agente terapéutico supone graves efectos secundarios, principalmente en el metabolismo óseo, por lo que la tendencia actual es la de desarrollar análogos de la vitamina D que carezcan de estos efectos (Mathieu y cols. 2002).

1.3.2.3. Factores perinatales.

Los estudios DAISY y EURODIAB determinaron que, en niños con haplotipos HLA que confieran susceptibilidad a padecer T1DM, factores como una mayor edad de la madre, un parto complicado, incompatibilidad de grupos sanguíneos entre la madre y el feto (sistemas AB0 y Rh) y pre-eclampsia materna se asocian con un aumento en el riesgo de padecer la enfermedad por parte del niño (Stene y cols. 2004; Dahlquist y cols. 1999). Se ha estudiado la posibilidad de que la transferencia vía placenta de autoanticuerpos al feto por parte de madres con diabetes tipo 1 aumente el riesgo (Lindberg y cols. 1999), si bien otros estudios cuestionan esta afirmación (Stanley y cols. 2005). En lo que respecta a este tipo de factores se puede generalizar que un embarazo estresante junto con un mayor peso del niño al nacer predisponen moderadamente a padecer T1DM en un futuro (van Belle y cols. 2011).

1.3.2.4. Ambiente psicosocial:

Se ha asociado el aumento en el estrés psicosocial con un aumento en el riesgo de padecer T1DM en individuos genéticamente predispuestos. Así, situaciones como la muerte de un familiar, guerra, discusiones entre los padres, ataques físicos, e incluso climas fríos,

tanto sobre el niño como sobre su familia, se asocian con un mayor riesgo de padecer T1DM, ya que estas situaciones pueden afectar negativamente al niño debido a la relación existente entre los niveles hormonales y las señales nerviosas, que acaban influyendo tanto en la sensibilidad a la insulina como a los requerimientos de esta hormona y al funcionamiento del propio sistema inmune (Sepa y cols. 2005; Thernlund y cols. 1995).

1.4. El sistema inmune: su papel en la diabetes tipo 1.

Las moléculas de histocompatibilidad de clase I y II unen péptidos durante su maduración y transporte hacia la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPAs), de forma que proporcionan una actualización continua de la composición proteica intracelular y exógena, respectivamente, de la célula para su escrutinio por los linfocitos T. El reconocimiento de antígeno conlleva a la activación del linfocito T, su proliferación y diferenciación en una célula efectora cuyo fenotipo puede ser tremendamente variable y que influye de forma decisiva en el tipo de respuesta adaptativa resultante. En esta sección se introducirán de forma muy resumida estos aspectos y su relación con el desarrollo y evolución de la T1DM.

1.4.1. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS Y SU PRESENTACIÓN A LINFOCITOS T CD4⁺.

La mayoría de los péptidos antigénicos que estimulan la respuesta de linfocitos T CD4⁺ derivan de proteínas exógenas, las cuales son capturadas por diversas células presentadoras de antígenos mediante procesos de endocitosis mediada por receptor, fagocitosis y/o macropinocitosis. La eficiencia en la captura de antígeno es un factor clave que determina el nivel de expresión de los péptidos antigénicos derivados de éste unidos a moléculas del MHC de clase II (Lanzavecchia, 1990). Dicha eficiencia está determinada por i) la presencia de receptores específicos o semi-específicos para el antígeno, ii) la agrupación de estos receptores en regiones endocíticas como las recubiertas por clatrina, iii) la actividad endocítica general de la célula y iv) la forma física del antígeno (Colin, 1997). Una vez endocitado por la CPA, parece que una segunda etapa de clasificación y direccionamiento de estas vesículas endocíticas es necesaria para que se generen y presenten la mayoría de los epítopos antigénicos capaces de estimular linfocitos T CD4⁺ (Mitchell y cols. 1995).

Las moléculas del MHC de clase II están formadas por un dímero $\alpha\beta$ (Figura 1) el cual interacciona con la denominada cadena invariable (Ii), formando un complejo que permite su transporte eficiente desde el retículo endoplasmático pero que impide que dichas moléculas

puedan interactuar con ligandos peptídicos (Cresswell, 1994), debido a que la hendidura de unión está ocupada por la región CLIP de la cadena invariable (Cresswell, 1996). La mayoría de estos complejos son dirigidos directamente hacia los endosomas por el motivo similar a dileucinas de la cadena Ii, lo que permite su interacción con antígenos endocitados (Wolf y cols. 1995). La cadena Ii es eliminada mediante la acción conjunta de proteasas, pH ácido y de la molécula DM (Kropshofer y cols. 1995; Roche, 1995). La molécula DM codificada en la región del MHC media la liberación de CLIP y otros péptidos de baja afinidad y favorece la captura de péptidos, incluyendo péptidos antigénicos, que se unen estrechamente a la molécula de clase II. Una vez ensamblados los complejos molécula MHC de clase II-péptido, éstos son enviados a la superficie celular donde pueden persistir y acumularse durante días, dando la oportunidad a una célula presentadora de antígeno de interactuar con un linfocito T CD4⁺ específico para dicho péptido antigénico (Figura 2).

Las proteasas responsables del procesamiento antigénico y de la cadena invariable no están bien definidas. El conocimiento actual de este proceso está basado en i) el uso de inhibidores de proteasas, ii) la localización de dichas proteasas en células y compartimentos subcelulares específicos, y iii) intentos de reconstruir *in vitro* el procesamiento de antígenos, y de la cadena Ii, empleando proteasas purificadas. De todas formas, se sabe que las catepsinas, un grupo de aspartato (catepsinas D y E) y cisteína proteasas (catepsinas B, L, S y H), son proteasas que participan activamente en este proceso (Colin, 1997). Además, diversos estudios han demostrado que la reducción de puentes disulfuro es importante en la presentación antigénica, algo esperado ya que muchos epitopos antigénicos contienen cisteínas que se sabe están implicadas en la formación de dichos puentes en la proteína nativa (Collins y cols. 1991). Es importante señalar que la presentación efectiva de un epitopo antigénico requiere un balance entre la generación y la destrucción de dicho péptido de forma que la actividad endopeptidasa de enzimas como las catepsinas D, E, L y S pueden ser importantes a la hora de generar epitopos de linfocitos T pero también pueden destruirlos, así como la actividad exopeptidasa amino-terminal o carboxi-terminal de las catepsinas H y B, respectivamente (Rodríguez y cols. 1992).

La unión de péptidos antigénicos a las moléculas del MHC de clase II implica varios enlaces de hidrógeno entre residuos aminoácidos presentes en la hendidura de unión a péptidos y en el esqueleto peptídico, así como contactos entre cadenas laterales de aminoácidos del péptido y de la hendidura de la molécula de clase II (Stern y cols. 1994). A diferencia de lo que ocurre en las moléculas de histocompatibilidad de clase I (ver apartado

4.2.), los extremos de la hendidura de unión a péptidos de las moléculas de clase II están abiertos por los extremos y no limitan la longitud de los péptidos presentados por estas moléculas. De hecho la secuenciación de los péptidos unidos asociados a las moléculas de clase II ha identificado péptidos de longitudes comprendidas entre los 10 y 34 residuos (Rudensky y cols. 1991). Además, muchos de esos péptidos asociados con las moléculas de clase II comprenden grupos solapantes de péptidos que comparten una misma secuencia central pero que varían en la longitud de sus extremos amino- y carboxilo-terminal.

1.4.2. PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS Y SU PRESENTACIÓN A LINFOCITOS T CD8⁺.

Las moléculas del MHC de clase I unen péptidos derivados de proteínas celulares y los presentan en la superficie celular para su escrutinio por linfocitos T CD8⁺. De esta manera, el sistema inmune proporciona un sistema continuo de vigilancia frente a células infectadas por virus y células tumorales comprobando si las células expresan antígenos desconocidos.

Las moléculas del MHC de clase I son moléculas heterodiméricas, formadas por una cadena α variable y una cadena constante denominada β 2-microglobulina (Figura 1) las cuales se ensamblan en el retículo endoplasmático (RE) (para una revisión consultar York y cols. 1996). Antes de unirse a un péptido, las moléculas de clase I recién sintetizadas son retenidas en el RE, mediante interacciones con diversas chaperonas moleculares como la calnexina (Williams y cols. 1995) y otras proteínas asociadas como la tapasina (Ortmann y cols. 1997). En ausencia de un péptido apropiado, los heterodímeros de clase I son intrínsecamente inestables y se disocian rápidamente a temperatura fisiológica. La unión de un péptido de una longitud comprendida entre los 8 y 10 residuos estabiliza el heterodímero y permite su transporte hacia la membrana plasmática (York y cols. 1996).

La mayoría de los epitopos antigénicos unidos a moléculas de clase I son generados a partir de proteínas normalmente presentes en el citoplasma celular. La prueba definitiva de que el citoplasma es el lugar donde se generan la mayoría de estos péptidos vino del análisis de células mutantes carentes del transportador TAP (*“transporter of antigen presentation”*) (Townsend y cols. 1989). Esta proteína integral de la membrana del RE es un miembro de la familia ABC de transportadores dependientes de ATP y cuya función es la de transportar péptidos, de forma más eficiente aquellos con longitudes comprendidas entre los 7 y 15 aminoácidos, desde el citoplasma al RE (Momburg y cols. 1998). En células deficientes en TAP, la mayoría de las moléculas de clase I no pueden unir péptidos y son retenidas en el RE (Momburg y cols. 1998).

La mayoría de los epitopos peptídicos presentados a linfocitos T CD8⁺ son generados en la célula por las mismas rutas proteolíticas responsables del reciclado continuo de proteínas citosólicas y nucleares (Kenneth y cols. 1999). Prácticamente todas las proteínas celulares están sometidas a un ciclo de degradación y síntesis continuo (Goldberg y cols. 1976). La tasa de degradación de cada proteína es muy variable y va desde unos pocos minutos hasta semanas (Kenneth y cols. 1999). Además, las células eliminan muy eficientemente proteínas plegadas incorrectamente, dañadas o mutantes con conformaciones anormales, lo que previene su acumulación (Rechsteiner y cols. 1987; Hershko y cols. 1992). Hace tiempo se había demostrado que la degradación no lisosomal de proteínas requería ATP (Gronostajski y cols. 1985), lo que llevó a la identificación del proteosoma 26S, un complejo multiproteico, como el mecanismo principal de proteólisis citoplasmática y, en definitiva, de generación de epitopos antigénicos presentados por moléculas de clase I (Hershko y cols. 1992) (Figura 2).

La estructura tridimensional de varios complejos molécula de clase I-péptido muestran que los péptidos se unen a la molécula de clase I principalmente a través de sus extremos amino- y carboxilo-terminales y las cadenas laterales de algunos residuos internos (Madden, 1995). Los bolsillos complementarios formados por aminoácidos que rodean la hendidura de unión a péptidos varían debido al extenso polimorfismo de estas moléculas de histocompatibilidad, y como resultado cada molécula de histocompatibilidad prefiere conjuntos de péptidos con secuencias consenso diferentes caracterizadas por la conservación de algunos tipos de aminoácidos en posiciones concretas del péptido (Shastri y cols. 1998). Hoy en día estas secuencias consenso han sido establecidas para un gran número de moléculas de histocompatibilidad (Engelhard, 1994; Rammensee y cols. 1995), permitiendo el desarrollo de algoritmos pensados para predecir epitopos antigénicos capaces de estimular linfocitos (Shastri, 1996; van den Eynde y cols. 1997). En general, los péptidos unidos a las moléculas de histocompatibilidad de clase I poseen una longitud comprendida entre los 8-10 aminoácidos, contienen uno o varios residuos internos conservados y comparten un residuo alifático, aromático o cargado positivamente en su extremo carboxilo-terminal (Shastri y cols. 1998).

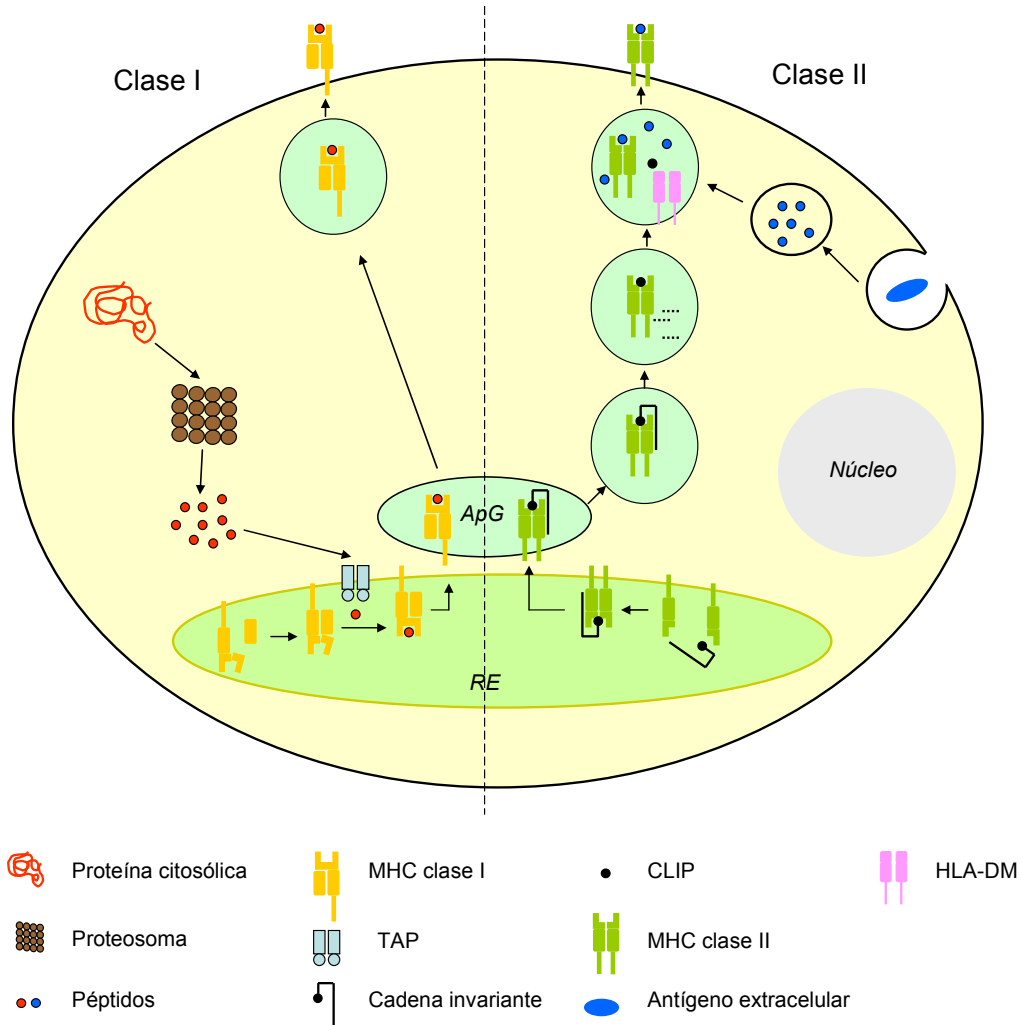


Figura 2. Procesamiento de antígenos y presentación por moléculas de histocompatibilidad de clase I y de clase II. En el caso de proteínas citosólicas (propias o derivadas de patógenos) las proteínas son degradadas por el proteosoma, generándose péptidos que entran al retículo endoplasmático (RE) a través del transportador asociado al procesamiento de antígeno (TAP). Por su parte la cadena α del MHC-I y la β_2 -microglobulina se asocian en el RE, no adoptando el plegamiento correcto hasta la unión de un péptido que haya entrado a través del TAP. Tras la unión MHC-péptido la molécula es enviada vía aparato de Golgi (ApG) a la membrana celular. En el caso de antígenos extracelulares el antígeno es fagocitado y degradado por proteasas endosomales. Por su parte las cadenas α y β de la molécula MHC-II son ensambladas en el RE junto con la cadena invariante (Ii), que impide la unión de péptidos presentes en el RE a moléculas del MHC-II. Tras su paso por el ApG la cadena invariante es degradada de tal modo que sólo una pequeña porción (CLIP) permanece bloqueando el sitio de unión. Tras la fusión con vesículas endocíticas, la molécula HLA-DM libera el fragmento CLIP y los péptidos contenidos en las vesículas se unen a la molécula MHC-II, presentándose finalmente el complejo MHC-II/péptido en la superficie celular (adaptado de Janeway y cols. 2003).

1.4.3. DIFERENCIACIÓN Y SUBTIPOS DE LINFOCITOS T CD4⁺: PLASTICIDAD DE LOS DIFERENTES LINAJES.

En respuesta a un antígeno presentado mediante una molécula de histocompatibilidad de clase II, los linfocitos CD4⁺ o colaboradores (Th; “*T helper*”) se activan y diferencian para desarrollar una serie de papeles críticos durante la respuesta inmune adaptativa (Zhu y cols. 2008), como la colaboración con linfocitos B para inducir la síntesis de anticuerpos y el cambio de clase o el reclutamiento y activación de linfocitos T CD8⁺. Las distintas funciones desempeñadas por los linfocitos Th están determinadas por su patrón de secreción de citocinas y su localización tisular.

En 1986 se demostró la existencia de clones de linfocitos Th, denominados Th1 y Th2, que diferían entre sí por el tipo de citocinas que secretaban (Mosmann y cols. 1986). Los linfocitos Th1 producen fundamentalmente IFN- γ , el cual es importante en la activación de macrófagos y la eliminación de patógenos intracelulares, mientras que los linfocitos Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, las cuales son críticas en la síntesis de IgE, reclutamiento de eosinófilos y eliminación de parásitos extracelulares (Ansel y cols. 2006; Szabo y cols. 2003). Además, los linfocitos Th1 y Th2 están implicados en el desarrollo de numerosas enfermedades, de forma que el consenso existente hoy en día es el de que los linfocitos Th1 causan la mayoría de las enfermedades autoinmunes específicas de órgano, como la T1DM (ver adelante), mientras que los linfocitos Th2 son los responsables del asma y otras reacciones alérgicas.

Con el descubrimiento de la IL-23, que comparte la subunidad p40 del receptor de la IL-12, se hizo patente el hecho de que muchas enfermedades autoinmunes atribuidas en un principio a linfocitos Th1 eran inducidas por otro subtipo de linfocito Th sensible a IL-23 (Cua y cols. 2003). Este nuevo linaje de linfocitos Th fue identificado como el linaje de linfocitos Th17, los cuales producen muchas citocinas incluyendo IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-21 (Harrington y cols. 2005; Park y cols. 2005). Además de su implicación en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, colitis mediada por linfocitos T y diabetes tipo 1 (Lock y cols. 2002; Wong y cols. 2000; Yen y cols. 2006; Honkanen y cols. 2010), los linfocitos Th17 también juegan un papel importante durante la respuesta inmune contra bacterias extracelulares y hongos (Weaver y cols. 2007).

Finalmente, en el timo se genera un linaje de linfocitos T reguladores naturales (nTreg) (Sakaguchi, 2004). La señalización por parte de las citocinas IL-2 y el factor de

crecimiento transformante- β (TGF- β), así como la co-estimulación a través de CD28 y el reconocimiento propio parecen ser aspectos importantes en la generación de estas células. Además, el tratamiento de linfocitos T CD4⁺ vírgenes a través de su receptor de antígeno empleando IL-2 y TGF- β provoca la diferenciación de estas células en linfocitos T reguladores inducidos (iTreg) (Chen y cols. 2003). La población de linfocitos Treg detectada *in vivo* está formada tanto por nTreg como iTreg, los cuales expresan el factor de transcripción Foxp3. Al igual que los nTreg, los iTreg parecen estar implicados en la tolerancia a lo propio y en la modulación e inducción de respuestas inmunes en determinadas circunstancias (Curoto de Lafaille y cols. 2009). La supresión y modulación de la respuesta inmune ejercida por los linfocitos Treg tiene lugar tanto por contacto directo (Suri-Payer y cols. 1998) como por la secreción de citocinas secretadas como la IL-10 o el TGF- β (Dieckmann y cols. 2002; Brusko y cols. 2008).

Las citocinas presentes durante el periodo de estimulación del linfocito T CD4⁺ virgen y la consecuente activación de factores de transcripción específicos son los dos elementos clave que controlan la diferenciación en los distintos linajes Th. Grupos diferentes de citocinas promueven los procesos de diferenciación para cada uno de los linajes: i) IL-12/IFN- γ para linfocitos Th1, ii) IL-4 para linfocitos Th2, TGF- β /(IL-6, IL-21, IL-23) para linfocitos Th17 y iv) TGF- β /IL-2 para linfocitos Treg. Los factores de transcripción que gobiernan la diferenciación de los linfocitos Th también se han definido como i) T-bet/Stat-4 para linfocitos Th1, ii) GATA3/Stat-5 para linfocitos Th2, iii) ROR(γ)/Stat-3 para linfocitos Th17 y iv) Foxp3/Stat-5 para linfocitos Treg (Zhu y cols. 2010).

Se ha observado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que los diferentes linajes de linfocitos Th presentan cierta plasticidad y pueden llegar a secretar citocinas características de otro linaje diferente. De esta manera, linfocitos Th2 pueden ser inducidos a secretar IFN- γ mediante la adición de IL-12 aunque, por otra parte, linfocitos Th1 no son capaces de secretar IL-4 incluso al re-estimularlos en condiciones de polarización Th2 (Zhu y cols. 2010). La plasticidad Th1/Th2 parece depender del estado de diferenciación de la célula. Así, a medida que el linfocito avanza en su diferenciación más difícil se vuelve alterar su patrón de citocinas, de forma que linfocitos Th1 completamente diferenciados no pueden secretar IL-4, pero linfocitos Th1 estimulados una sola vez pueden secretar IL-4 cuando se cultivan en condiciones Th2 (Murphy y cols. 1996; Zhu y cols. 2004). Es muy difícil redirigir linfocitos Th1 o Th2 hacia el linaje Th17 o Treg debido a la modificación genómica de los *loci Rorc* y *Foxp3* en estas células (Wei y cols. 2009).

Los linfocitos Th17 son relativamente inestables en relación con la secreción de citocinas en comparación con los fenotipos Th1 y Th2. Al ser transferidos a un individuo, linfocitos purificados secretores de IL-17 adquieren la capacidad de producir IFN- γ (Lee y cols. 2009).

Al ser cultivados en condiciones de polarización Th1 (Wei y cols. 2009) o en un ambiente inflamatorio de tipo Th1 (Oldenhove y cols. 2009), linfocitos Treg positivos para Foxp3 pueden también secretar IFN- γ . Además, se ha demostrado que los linfocitos Treg pueden secretar IL-17 al ser cultivados en presencia de IL-6 (Yang XO y cols. 2008; Xu y cols. 2007); estos linfocitos Treg positivos para Foxp3 y secretores de IL-17 se han detectado tanto en ratones como en seres humanos (Lochner y cols. 2008; Voo y cols. 2009). Resulta muy interesante el hecho de que la transferencia de linfocitos Treg en un receptor linfopénico reduce la expresión de Foxp3 acompañado de la secreción de IL-17 (Komatsu y cols. 2009).

1.4.4. RESPUESTA INMUNE EN LA DIABETES TIPO 1.

Antes de que los síntomas clínicos de la enfermedad se hagan evidentes tienen lugar en el paciente diabético varias reacciones inmunitarias que pasan inadvertidas. Entre éstas se encuentran la síntesis de autoanticuerpos, la activación de linfocitos T autorreactivos y la infiltración del páncreas o insulitis con el objetivo de destruir las células β productoras de insulina (Bottazzo y cols. 1985). Esta destrucción dirigida y persistente puede permanecer indetectable durante años y sólo hacerse evidente después de que la mayoría de las células β han sido eliminadas (Figura 3), de forma que se ha dado gran prioridad a la búsqueda de biomarcadores que permitan identificar la respuesta autoinmune de forma temprana.

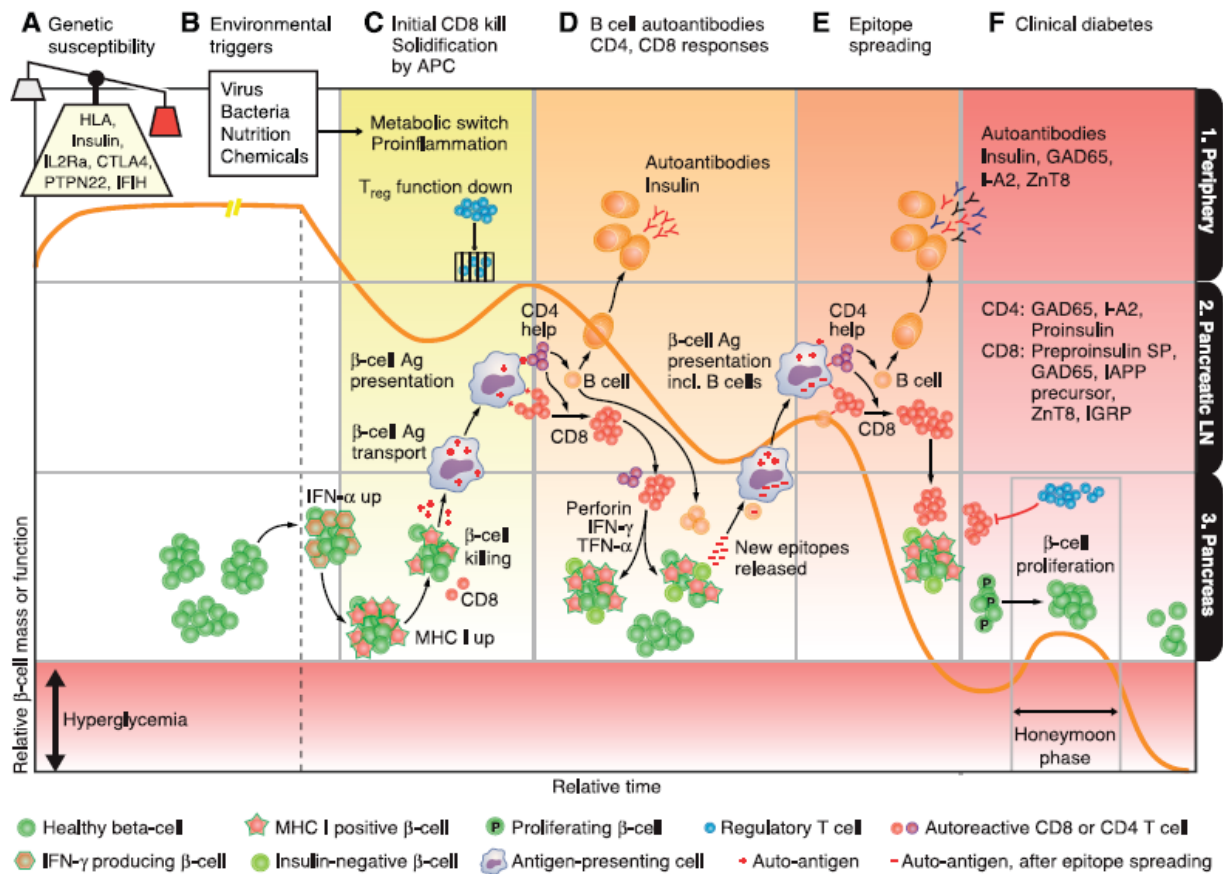


Figura 3. Esquema espacio-temporal de la patogénesis de la diabetes tipo 1. Se representa la masa o función de las células β (línea naranja), así como las distintas fases de la respuesta autoinmune (columnas A-F) que tiene lugar en diferentes lugares anatómicos (filas 1-3). La entrada de la línea naranja a la zona roja supone el inicio de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. La presencia de susceptibilidad genética junto con un desencadenante ambiental induce el inicio de la enfermedad. Las células β pancreáticas comienzan a secretar y a expresar IFN- α (B3) lo que aumenta la expresión de MHC-I (C3) y expone a las células β al ataque por parte de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos presentes en los islotes (C3). Los autoantígenos liberados son captados por las CPAs, que migran al nódulo linfático (C2). Mientras tanto, en la periferia (C1) el desencadenante ambiental provoca un cambio hacia condiciones típicamente proinflamatorias, favoreciendo la función de los linfocitos T efectoros (Th1/Th17) en detrimento de los reguladores (Th2/Treg). Los autoantígenos presentados en este ambiente proinflamatorio y con la ayuda de linfocitos T CD4⁺ (C2) favorecen la conversión de los linfocitos B a células plasmáticas (D2), que producirán autoanticuerpos contra la insulina (D1). Los linfocitos T CD4⁺ estimulan también a los CD8⁺ induciendo su proliferación (D2) y migración al páncreas (D3) donde inducen la muerte de más células β mediada por perforinas y citocinas, generando la pseudoatrofia de algunas células β , que serán entonces negativas para insulina. Con la muerte de más células β se liberan nuevos autoantígenos que antes no estaban expuestos (*epitope spreading*), que son captados por CPAs (incluyendo linfocitos B) que migran al nódulo linfático pancreático (D3) donde activan nuevos linfocitos T autorreactivos. De esta nueva oleada de linfocitos T activados, los CD4⁺ activan a linfocitos B induciendo su diferenciación en célula plasmática y la síntesis de nuevos autoanticuerpos (E2, E1, F1), además de favorecer la proliferación de nuevos CD8⁺ autorreactivos donde se repite el ciclo de destrucción de más células β (E3). Durante el proceso de “luna de miel” parece que algunas células β adquieren la capacidad de proliferar, aumentando la masa celular (F3), y las células Treg recuperan algo de funcionalidad. Sin embargo este proceso no es duradero en el tiempo, y en el momento del diagnóstico sólo permanece entre el 10 y el 30% de la masa de células β inicial (tomado de van Belle y cols. 2011).

Se repasan a continuación algunos de los eventos inmunes más importantes que tienen lugar durante el desarrollo de la diabetes y de los modelos propuestos para explicar la destrucción de las células β de los islotes, así como la interdependencia entre los factores genéticos y ambientales en el desarrollo de la T1DM.

1.4.4.1. Síntesis de autoanticuerpos contra los islotes por parte de los linfocitos B.

Tal y como se indica más adelante en detalle (Sección 5. Autoanticuerpos y autoantígenos) la síntesis de autoanticuerpos está dirigida principalmente hacia cuatro autoantígenos de los islotes: el antígeno 2 asociado a insulinoma (IA-2), la insulina, la isoforma 65 de la decarboxilasa del ácido glutámico (GAD₆₅) y, más recientemente, el transportador de zinc 8 (ZnT8). El cómo, cuándo y dónde los linfocitos B contribuyen al desarrollo de la T1DM es todavía un tema controvertido (Mariño y cols. 2008). De todas formas, aunque los autoanticuerpos que se detectan en el suero de pacientes diabéticos no son suficientes para transferir la enfermedad, sí reflejan una reacción autoinmune indicando que los linfocitos B pueden participar de forma directa en la respuesta inmune debido a la posibilidad de que actúen como células presentadoras de antígenos de los islotes a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ diabetogénicos.

1.4.4.2. Presencia de linfocitos T diabetogénicos en la periferia.

Los linfocitos T han sido considerados desde hace mucho tiempo los responsables de la destrucción final de las células β de los islotes (Roep, 2003). Esta idea ha derivado de experiencias donde el desarrollo de la enfermedad se ha acelerado o disminuido mediante la transferencia o eliminación, respectivamente, de linfocitos T CD4⁺ y/o CD8⁺.

La destrucción de las células β mediada por linfocitos T CD8⁺ es un posible mecanismo que conduce al desarrollo de síntomas clínicos (Skowera y cols. 2008). Los linfocitos T CD8⁺ forman parte de los infiltrados de células inmunes de los islotes, tanto en el ratón NOD como en humanos (Coppeters y cols. 2009), y pueden destruir las células β de forma selectiva a través del reconocimiento antigénico vía moléculas del MHC de clase I (Skowera y cols. 2008).

Los linfocitos T CD4⁺ probablemente aporten ayuda tanto a linfocitos B como linfocitos T CD8⁺ a través de la interacción entre CD40L-CD40 y la secreción de citocinas, respectivamente. En pacientes diabéticos humanos (para una revisión de este punto en el ratón NOD consultar Anderson y cols. 2005) se ha demostrado una polarización de la respuesta por parte de estos linfocitos T CD4⁺ autorreactivos hacia la síntesis de IFN- γ o un fenotipo pro-

inflamatorio tipo Th1, mientras que en sujetos sanos estos mismos linfocitos secretan IL-10 frente a los mismos autoantígenos, o sea, poseen un fenotipo inmunoregulador tipo Th2 (Arif y cols. 2004). Resulta interesante el hecho de que en aquellos pacientes diabéticos donde se detecta la presencia de linfocitos T CD4⁺ secretores de IL-10 su edad en el diagnóstico tiende a ser mayor que la de aquellos donde dichos linfocitos no se detectan, implicando la idea de que en estos pacientes de progresión lenta estos linfocitos T CD4⁺ de tipo Th2 y productores de IL-10 contribuyen a reducir la velocidad de progresión hacia el desarrollo de síntomas clínicos (Arif y cols. 2004). Mucho más recientemente se ha demostrado en el ratón NOD que el bloqueo de la síntesis de IL-17 es un factor protector en el desarrollo de la enfermedad (Emamaullee y cols. 2009), mientras que otros estudios sugieren que la enfermedad en este modelo animal resulta de la acción de linfocitos Th1 cuyo fenotipo se ha modificado hacia otro de tipo Th17 (Bending y cols. 2009; Martin-Orozco y cols. 2009). Aunque el papel de estos linfocitos Th17 en el desarrollo de la enfermedad aún está por aclarar, su presencia en pacientes diabéticos recién diagnosticados ha sido comunicada recientemente, además de detectarse la presencia de IL-17 en los islotes de Langerhans obtenidos de un paciente fallecido muy cerca del diagnóstico de la enfermedad (Honkanen y cols. 2010; Arif y cols. 2011). Estos datos parecen confirmar la idea de que los linfocitos T CD4⁺ autorreactivos con un fenotipo proinflamatorio Th1 y/o Th17 son fundamentales a la hora de desarrollar síntomas clínicos de la enfermedad.

1.4.4.3. Dirección de la respuesta inmune adaptativa por parte de células del sistema inmune innato.

Las células presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas son las primeras en infiltrar el islote y la importancia de este hecho viene subrayada por el hecho de que la inactivación de los macrófagos conduce a una casi total prevención de la diabetes tipo 1 en el ratón NOD (Yoon y cols. 1998). Además, tanto en ratones NOD como en pacientes diabéticos humanos, las células del sistema innato parecen dirigir la respuesta linfocitaria hacia un fenotipo pro-inflamatorio tipo Th1 y/o Th17. En este sentido se ha demostrado que tanto células dendríticas como monocitos de pacientes diabéticos poseen un fenotipo predominantemente proinflamatorio, secretando mayores niveles de IL-1 β e IL-6 (Takahashi y cols. 1998; Sia y cols. 2010; Bradshaw y cols. 2009).

1.4.4.4. Posibles mecanismos que expliquen la activación de los linfocitos T durante la respuesta autoinmune.

La diabetes tipo 1 es el resultado de una destrucción selectiva y progresiva de las células β de los islotes (Figura 4) y el papel de los linfocitos T en la patogénesis de la enfermedad parece fundamental también en pacientes diabéticos humanos.

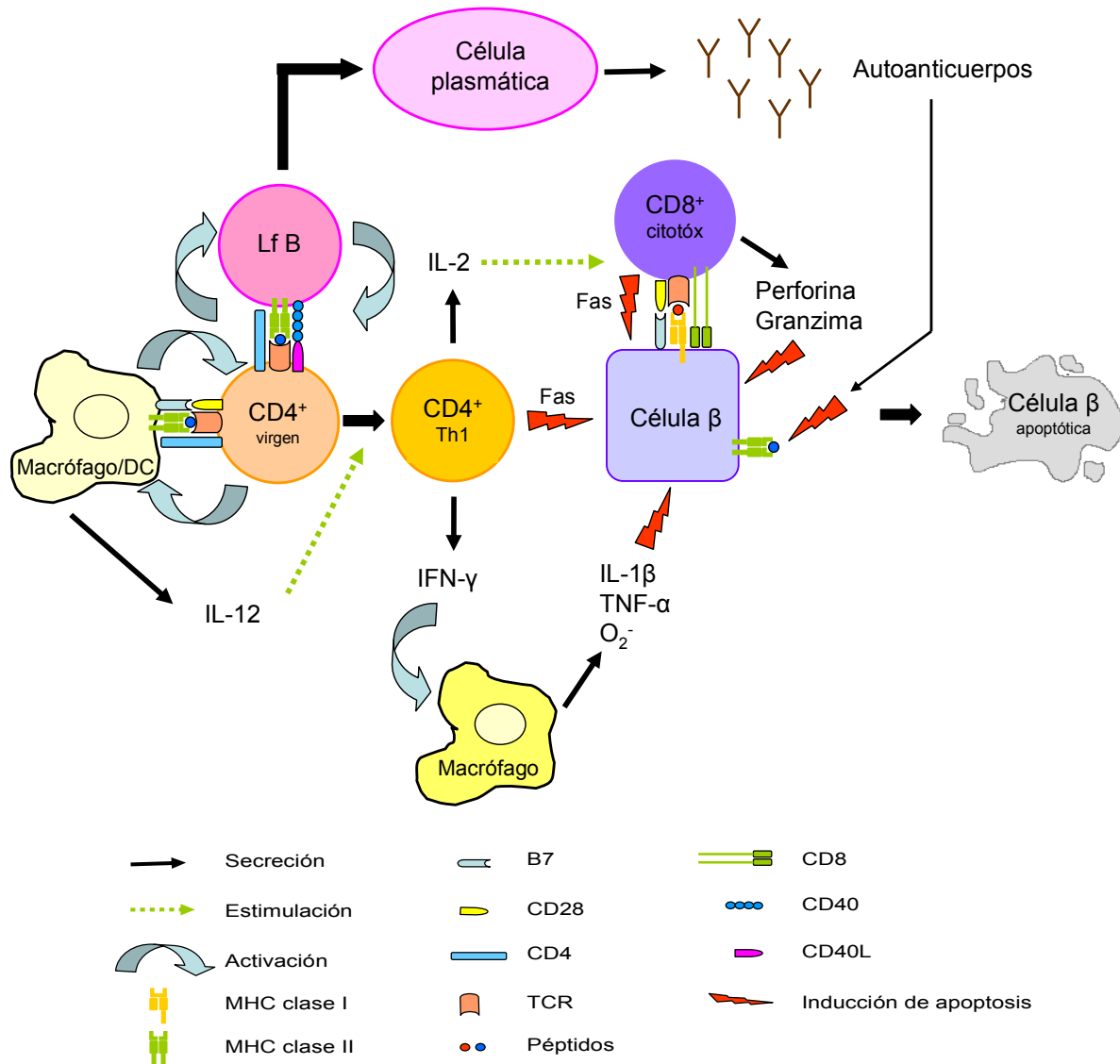


Figura 4. Mecanismos de destrucción de las células β de los islotes de Langerhans durante el desarrollo de la diabetes tipo 1. Los macrófagos y células dendríticas son las primeras células en infiltrar el islote, procesando y presentando a través de complejos péptido-MHC-II autoantígenos derivados de células β a linfocitos T $CD4^+$ vírgenes. Este reconocimiento y activación tiene lugar entre el complejo MHC/péptido y el TCR del linfocito, junto con la unión del correceptor CD4 y las señales coestimuladoras B7 y CD28, de tal modo que el linfocito $CD4^+$ activa a su vez a los macrófagos a secretar IL-12 preferentemente, desviándose la respuesta linfocitaria hacia un fenotipo Th1, con la secreción de IFN- γ e IL-2. El IFN- γ activa a macrófagos en reposo, que liberan citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) y radicales libres (O_2^-), que son tóxicos para la célula β ; la IL-2, además de favorecer la proliferación de los propios linfocitos Th1, induce la migración de linfocitos T $CD8^+$ autorreactivos desde la periferia hasta el islote, así como su proliferación. Cuando tiene lugar el reconocimiento entre el TCR específico para autoantígeno del linfocito T $CD8^+$ y el péptido autoantigénico presentado por MHC-I por las células β , junto con la señal de la molécula CD8 y la coestimulación de B7 y CD28, la célula $CD8^+$ adquiere características citotóxicas, liberando perforinas y granzimas, y ocasionando la muerte de la célula β . Además tanto linfocitos T $CD4^+$ como $CD8^+$

pueden inducir la apoptosis de células β mediada por Fas. Por otra parte, linfocitos B autorreactivos pueden funcionar como CPAs, mostrando el antígeno para el que son específicas por MHC-II a linfocitos T. El reconocimiento por parte del TCR, y las señales coestimuladoras de CD4 y CD40/CD40L ocasiona la activación del linfocito T, que a su vez activa al linfocito B, favoreciendo su conversión a célula plasmática. Esta célula producirá autoanticuerpos contra el antígeno de célula β para el que son específicas. Ya que las células β pueden actuar como CPAs mostrando péptidos propios por MHC-II, los autoanticuerpos generados podrán reconocer estos péptidos mostrados, ocasionando la muerte de la célula β mediada por células dependientes de anticuerpos (Modificado de Kukreja y cols. 1999).

Sin embargo, el mecanismo que desencadena su activación y su infiltración en los islotes pancreáticos no está dilucidado existiendo básicamente tres modelos que intentan explicar cómo los linfocitos T autorreactivos son activadas durante el desarrollo de la enfermedad:

1. Hipótesis del mimetismo molecular (Oldstone, 2004; revisado en Christen y cols. 2004): basada en datos epidemiológicos, clínicos y experimentales que ponen de manifiesto la asociación entre los agentes infecciosos y los procesos autoinmunes. Asume que epitopos derivados de antígenos provenientes de agentes infecciosos podrían ser semejantes estructuralmente a aquellos derivados de autoantígenos. Esta similitud antigénica pudiera dar lugar a una reacción cruzada de algunos linfocitos T activados contra el agente infeccioso los cuales destruirían tejidos propios que tuviesen determinantes antigénicos similares. Sin embargo, el principal obstáculo para aceptar esta hipótesis como una explicación convincente en la etiopatogenia de la diabetes tipo 1 reside en la falta de evidencias directas de mimetismo molecular en T1DM en humanos.
2. Hipótesis de la proliferación de linfocitos T no específica de antígeno o “bystander T cell proliferation” (Tough y cols. 1996): esta hipótesis se basa en que, aunque las infecciones son capaces de inducir respuestas inmunes vigorosas, el aumento en el número total de células T no sólo es el resultado de la expansión de clones de linfocitos T antígeno-específicos, sino también de linfocitos T no antígeno-específicos reclutados al área de infección y estimulados por distintas citocinas secretadas durante la reacción inflamatoria. Esta estimulación no es dependiente del receptor de antígenos del linfocito T y podría ser provocada incluso por virus heterólogos en tanto en cuanto son agentes infecciosos y pueden promover la liberación de citocinas como el IFN- γ y el IFN- β . Esta hipótesis fue contrastada con la del mimetismo molecular para

explicar específicamente el mecanismo inmunopatológico que daría lugar a la T1DM en respuesta a la infección por virus coxsackie B (Horwith y cols. 1998). Se observó cómo la infección vírica era capaz de activar indirectamente linfocitos T autorreactivos, que podrían generar un daño inicial del tejido pancreático. Las células β dañadas liberarían autoantígenos previamente ignorados que pudieran activar un proceso autoinmune, provocando insulinitis y finalmente síntomas clínicos.

3. Hipótesis de la proliferación de linfocitos T mediada por superantígenos (Conrad y cols. 1994): hipótesis propuesta en base a los resultados obtenidos en la caracterización de linfocitos T que infiltraban el páncreas de niños que murieron al inicio de la enfermedad. Los superantígenos interaccionan con los heterodímeros del MHC de clase II y con los receptores de antígeno de linfocitos T en una configuración trimolecular inusual que activa todos aquellos linfocitos T que poseen cadenas β del receptor de linfocitos T concretas ($V\beta$). Debido a esta característica, los superantígenos pueden activar hasta el 30% del total de linfocitos T de un individuo dependiendo de la frecuencia inicial de linfocitos con esa región $V\beta$ específica. De esta manera, aquellas infecciones en las que el agente causal expresase un superantígeno, durante la estimulación masiva de linfocitos T se encontrarían algunos con capacidad autorreactiva que iniciarían la destrucción de las células β de los islotes.

1.5. Autoanticuerpos y Autoantígenos.

1.5.1. AUTOANTICUERPOS CLÁSICOS.

Uno de los primeros signos del desarrollo de la diabetes tipo 1 así como de la intervención del sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad es la generación de autoanticuerpos, que preceden en varios meses e incluso años a la aparición de síntomas clínicos de la enfermedad.

Los autoanticuerpos son sintetizados por el sistema inmune cuando éste falla en la distinción de lo *propio* y lo *no propio* (Wong y cols. 2005a). Para que la síntesis de autoanticuerpos pueda tener lugar, el autoantígeno correspondiente debe estar accesible al sistema inmune para que pueda tener lugar la inmunización. Con la excepción de la insulina y la carboxipeptidasa H, todos los autoantígenos descritos en la T1DM son intracelulares. La

liberación de estos antígenos intracelulares es posiblemente el resultado de la destrucción, mediada por el sistema inmunitario, de las células β pancreáticas haciendo disponibles a linfocitos B y T $CD4^+$ antígenos normalmente secuestrados en el interior celular (Yoon y cols. 2005).

La presencia de autoanticuerpos para proteínas específicas presentes en los islotes pancreáticos, los hoy conocidos como anticuerpos de células de islote (ICA, “*islet cell antibodies*”), fue descrita por primera vez hace 37 años mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta sobre secciones de páncreas (Bottazzo y cols. 1974). Como los autoanticuerpos presentes en ICAs reconocen autoantígenos específicos, estudios posteriores han tratado de identificar dichos antígenos demostrándose la amplia variedad de proteínas que son objeto de la respuesta humoral en la diabetes de tipo 1 humana (Tabla 1).

Características	Autoantígeno	Referencia
Insulina, procesamiento y almacenamiento	Carboxipeptidasa H	Yang y cols. 2008b
	Insulina	Palmer y cols. 1983
	Proinsulina	Kuglin y cols. 1990
	ZnT8	Wenzlau y cols. 2008
Tirosina fosfatasas	IA-2A	Verge y cols. 1996
	IA-2 β	Kawasaki y cols. 1996
Enzimas	Anhidrasa carbónica II	Taniguchi y cols. 2001
	Antígeno pancreático de 30 kDa relacionado con el quimiotripsinógeno	Kim y cols. 1993
	ADN topoisomerasa II	Chang y cols. 1996
	Descarboxilasa del ácido glutámico (GAD)	Baekkeskov y cols. 1990
Diversas	Descarboxilasa de 51 kDa de L-aminoácidos aromáticos	Rorsman y cols. 1995
	Aminoacil-ARNt sintetasa	Park y cols 2010
	Glima 38	Aanstoot y cols. 1996
	GLUT2	Johson y cols. 1990
	Glucolípido	Cabrera-Rode y cols. 1995
	Gangliósido del islote GM-2	Dotta y cols, 1997

	Proteínas de choque térmico	Jones y cols. 1990
	Superficie de células de islote	Maclaren y cols. 1975
Características	Autoantígeno	Referencia
	Células de islote	Bottazzo y cols. 1974
	Proteína de 38 kDa específica de islote	Pak y cols. 1990
	Proteína de 52 kDa de insulinoma de rata	Karounos y cols. 1990
	Proteína fibrilar ácida de la glía	Winer y cols. 2003. Gómez-Touriño y cols. 2010.

Tabla 1. Autoanticuerpos descritos en la diabetes tipo 1 humana.

Actualmente, los principales autoanticuerpos de interés clínico e investigador, además de los ICAs, son los anticuerpos dirigidos contra la isoforma de 65 kDa de la decarboxilasa del ácido glutámico (GAD₆₅) (GADA), la insulina (IAA) y la tirosina fosfatasa IA-2 (antígeno 2 de insulinoma) (IA-2A), los denominados en algunas ocasiones como “anticuerpos bioquímicos” (Pihoker y cols. 2005). La principal razón de este interés en estos tres autoantígenos es que están disponibles como proteínas recombinantes que pueden ser marcadas de forma radiactiva, de forma que ha sido posible desarrollar ensayos reproducibles y precisos para la determinación de estos autoanticuerpos.

Además de la información aportada por los ICAs, GADA, IAA e IA-2A para conocer el proceso autoinmune que tiene lugar en el desarrollo de la T1DM, y debido al largo periodo asintomático entre la detección inicial de autoanticuerpos y el desarrollo de síntomas clínicos, así como el alto valor predictivo de éstos, la determinación de ICAs, GADA, IAA e IA-2A son empleados como marcadores útiles en la predicción de la enfermedad.

Los ICAs están presentes en el 70-80% de los pacientes diabéticos de tipo 1 recién diagnosticados, mientras que sólo se detectan en el 0,5% de los individuos sanos no diabéticos. Estos anticuerpos dejan de detectarse en la mayoría de los pacientes a los dos o tres años del diagnóstico, aunque aproximadamente un 5% de los pacientes son positivos para ICA 10 años después del diagnóstico y en estos casos es más frecuente la presencia de otros autoanticuerpos como los antitiroideos o contra las células parietales gástricas. Se ha demostrado que la sensibilidad de estos anticuerpos es de un 81% (mediana) (rango 44-100%) con una especificidad del 96% (mediana) (rango 64-100%) (Lernmark y cols. 1991). Por otra

parte, en el estudio DPT-1 (*“Diabetes Prevention Trial-1”*) se ha encontrado que aquellos familiares de pacientes diabéticos positivos para ICA con secreciones anormales de insulina en respuesta a inyecciones intravenosas de glucosa tenían un riesgo del 60% de desarrollar la enfermedad a los 5 años y cerca del 90% a los 10 años (*Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group*. 2002). Aunque estos autoanticuerpos se determinan todavía en muchas ocasiones, las dificultades técnicas que presenta su detección entre las que se incluyen la necesidad de páncreas fresco, preferiblemente humano, la subjetividad en la interpretación, la baja reproducibilidad y la variabilidad intra-laboratorio hacen que se empleen otros anticuerpos en el diagnóstico de la enfermedad.

Los anticuerpos anti-insulina (IAA) fueron descritos por primera vez en pacientes con T1DM recién diagnosticados antes del inicio del tratamiento con insulina (Palmer y cols. 1983). La presencia de IAA es más frecuente en pacientes jóvenes recién diagnosticados (un 60% aproximadamente) que en pacientes adultos; de hecho la mayor sensibilidad diagnóstica de estos autoanticuerpos (50-60% aproximadamente) se encuentra en pacientes menores de 10 años (Bingley y cols. 1997), y una vez que se administra la insulina exógena (>10 días) la determinación de estos anticuerpos ya no es válida porque la insulina exógena induce la síntesis de anticuerpos que no pueden ser distinguidos de los IAA. El programa de estandarización de anticuerpos en la diabetes (DASP; *“Diabetes Antibody Standardization Program”*) muestra que la sensibilidad de estos anticuerpos es de sólo un 45% (mediana) (rango 22-57%) y de una especificidad del 98% (mediana) (95-99%) (Schlosser y cols. 2010), siendo, junto con los ICA, los autoanticuerpos cuya determinación resulta más difícil de reproducir y estandarizar.

La decarboxilasa del ácido glutámico (GAD) es una enzima intracelular que cataliza la conversión del ácido glutámico en ácido γ -aminobutírico (GABA) y cuyo papel en la fisiología de la célula β no se conoce. En 1990, GAD se identificó como el autoantígeno de 64 kDa de los islotes que era inmunoprecipitado por el suero de pacientes diabéticos (Baekkeskov y cols. 1990). Además de en los islotes, diversos estudios muestran que GAD se expresa en gran variedad de tejidos, expresándose en mayor cantidad en tejidos del sistema nervioso, razón que explicaría por qué GAD constituye también un autoantígeno contra el que se generan anticuerpos en pacientes con el síndrome de la persona rígida (*“stiff-man syndrome”*) (Alexopoulos y cols. 2010). El programa de estandarización de anticuerpos en la diabetes (DASP; *“Diabetes Antibody Standardization Program”*) ha mostrado que la sensibilidad de los GADA es muy alta, un 82% (mediana) (rango 54-94%) así como su

especificidad, del 96% (mediana) (91-100%) (Törn y cols. 2008). Los autoanticuerpos contra GAD se detectan en un 70-80% de pacientes diabéticos caucásicos recién diagnosticados independientemente de la edad (Graham y cols. 2002) y estudios longitudinales de seguimiento han mostrado que siguen detectándose altos títulos hasta 12 años después del diagnóstico (Borig y cols. 2002), una observación muy interesante porque la hipótesis generalmente aceptada es que los niveles de autoanticuerpos sólo se mantienen si existe una estimulación repetida con antígeno.

Los anticuerpos contra la tirosina fosfatasa IA-2 fueron detectados en ensayos de cribado de una librería de expresión derivada de un insulinoma (Christie y cols. 1993). IA-2 es una proteína transmembrana y se ha detectado su expresión tanto en las células α como en las β de los islotes pancreáticos (Notkins y cols. 2001). La sensibilidad, 70% (mediana) (rango 54-78%), y especificidad, 99% (mediana) (rango 82-100%) de los IA-2A son similares o algo inferiores a los descritos para GADA (Törn y cols. 2008). Diversos estudios muestran que en torno a un 65% de los pacientes diabéticos muestran autoanticuerpos contra IA-2 en el momento del diagnóstico en comparación con sólo un 2,5% de individuos sanos no diabéticos (Leslie y cols. 1999), anticuerpos que están dirigidos contra la parte citoplasmática de la proteína y cuyo título, a diferencia de lo que ocurre con los GADA, se ve reducido rápidamente con la duración de la enfermedad (Borg y cols. 2002).

1.5.2. NUEVOS AUTOANTICUERPOS.

Recientemente se ha descrito la presencia de autoanticuerpos contra un miembro de la familia de los transportadores de zinc (ZnT8A) (Wenzlau y cols. 2001). Los autoanticuerpos dirigidos contra este nuevo antígeno fueron detectados en un 60-80% de pacientes diabéticos recién diagnosticados en comparación con sólo <2% de sujetos sanos no diabéticos. Se ha visto que la presencia de ZnT8A se detecta desde los dos años de edad y su nivel va aumentando hasta el momento del diagnóstico. Una observación interesante es que estos autoanticuerpos fueron detectados en un 26% de pacientes diabéticos de tipo 1 clasificados como negativos para los cuatro autoanticuerpos clásicos, de forma que la determinación conjunta de ZnT8A, GADA, IA2A e IAA eleva la sensibilidad de detección de individuos diabéticos hasta el 98% en el momento del diagnóstico (Wenzlau y cols. 2008).

Además de la identificación de antígenos expresados por las propias células β de los islotes pancreáticos como objetivos de la respuesta autoinmune, trabajos recientes han

demostrado que tanto en el modelo murino NOD (“*non obese diabetic*”) como en pacientes diabéticos humanos, la respuesta se dirige también contra un grupo de células nerviosas que rodean los islotes pancreáticos denominadas células de Schwann peri-islote (pSC) (Winer y cols. 2003). Estas células expresan antígenos específicos entre los que la periferina (Puertas y cols. 2007), la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP; “*glial fibrillary acidic protein*”) y la proteína de unión a calcio S100 β parecen ser objetivos de la respuesta autoinmune.

La presencia de IgG específicas para GFAP fue detectada mediante métodos de espectrometría de masas (SELDI; “*surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*”) en el suero del 75% de pacientes recién diagnosticados (6/8), en el 80% de familiares de primer grado positivos para ICA (12/15) pero sólo en el 17% (2/12) de personas sanas. Estos datos preliminares empleando un número muy reducido de pacientes apoya la idea de que estos autoanticuerpos podrían ser útiles en la detección de pacientes diabéticos. En el caso del otro autoantígeno, S100 β , aunque este trabajo preliminar y otros (Banwell y cols. 2008) han detectado claramente la presencia de linfocitos T autorreactivos dirigidos contra la proteína, la detección de autoanticuerpos no se ha realizado o cuando se ha hecho no se han encontrado diferencias significativas entre pacientes diabéticos y personas sanas (Hovsepyan y cols. 2004).

Finalmente, tal y como se señala en la Tabla 1, se están identificando un número cada vez más elevado de autoantígenos reconocidos por el sistema inmune de pacientes con T1D, contra los cuales se han detectado en el suero de estas personas la presencia de autoanticuerpos. De todas formas, en muchos casos la determinación de estos autoanticuerpos es técnicamente difícil de realizar y/o no son lo suficientemente sensibles o específicos para su uso en estudios del desarrollo de la enfermedad.

1.5.3. UTILIDAD DE LOS AUTOANTICUERPOS.

Se han realizado hasta la fecha multitud de estudios en diversos laboratorios para determinar la relación que existe entre los autoanticuerpos GADA/IA2A/IAA y la diabetes tipo 1 (Notkins y cols. 2001). Tal y como se ha descrito, un 70-80% de los pacientes diabéticos de tipo 1 recién diagnosticados tienen anticuerpos dirigidos contra GAD₆₅ y un número similar o algo inferior contra IA-2; además, un número menor de pacientes tienen anticuerpos contra la insulina aunque en este caso la edad es un factor determinante a la hora

de detectar estos anticuerpos. En comparación, en torno al 1% de las personas sanas no diabéticas poseen autoanticuerpos contra alguno de estos tres antígenos clásicos.

Aunque el interés inicial se centró en determinar la presencia de estos autoanticuerpos en el momento del diagnóstico y en el seguimiento de la enfermedad, pronto se hizo evidente que la generación de estos anticuerpos precedía el desarrollo de síntomas clínicos por meses/años (Leslie y cols. 2001). En el momento actual existen un gran número de estudios que muestran que la presencia de autoanticuerpos en personas completamente normales puede ser usado como un marcador de predicción para identificar aquellos con un elevado riesgo de desarrollar T1DM (Notkins y cols. 2001). El riesgo más elevado está asociado con aquellos sujetos que poseen dos o tres de estos autoanticuerpos. Por ejemplo, la presencia de GADA e IA2A confiere casi un 50% de riesgo de desarrollar T1DM a los 5 años, riesgo aún mayor a los 10 años (Leslie y cols. 1999); otros estudios han mostrado que cuando un individuo posee no sólo anticuerpos contra IA2 y GAD65 sino también contra insulina, el riesgo de desarrollar síntomas clínicos a los 5 años subía hasta el 70% (Verge y cols. 1996). Todos estos estudios muestran que la presencia de dos o más autoanticuerpos está mucho más relacionada con el riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro que el título de alguno de estos autoanticuerpos en particular. Es más, la combinación entre la presencia de alelos del MHC que confieren riesgo al desarrollo de T1D y autoanticuerpos mejora aún más el valor predictivo de éstos, existiendo datos que sugieren que estos anticuerpos aparecen mucho antes en niños con alelos del MHC susceptibles del desarrollo de T1D (Ilonen y cols. 1998). Esto lleva a pensar que la combinación futura de alguno de estos “anticuerpos bioquímicos” con nuevos autoanticuerpos como los dirigidos contra ZnT8, GFAP y/o S100 β podrían mejorar estas predicciones.

En la actualidad se están haciendo cribados poblacionales empleando autoanticuerpos contra GAD65, IA-2 e insulina con el fin de identificar sujetos de alto riesgo a desarrollar la enfermedad para su inclusión en ensayos terapéuticos. La utilidad práctica de esta aproximación es obvia si se considera que la prevalencia de individuos de riesgo a desarrollar T1D, aunque con diferencias poblacionales, se encuentra en torno a 1 de cada 400 individuos. De esta forma, para estudiar el efecto de un fármaco o una terapia experimental en 100 individuos que desarrollarán T1D tendrían que participar en el estudio unas 40.000 personas. Por el contrario, empleando autoanticuerpos como marcadores de riesgo, sólo sería necesario reclutar 200 personas positivas para dos autoanticuerpos ya que casi un 50% de estos individuos de alto riesgo desarrollarán la enfermedad en un periodo de 5 años.

1.5.4. NUEVOS AUTOANTÍGENOS EN LA DIABETES TIPO 1 HUMANA.

Existen excelentes, extensas y numerosas revisiones sobre los tres antígenos clásicos asociados al desarrollo de la diabetes tipo 1 humana como son GAD₆₅, IA-2 e insulina, razón por la cual no se comentará mucho más de lo que ya se ha dicho en párrafos anteriores o posteriores, remitiendo a la lectura de alguna de estas revisiones (Uibo y cols. 2008; Knip y cols. 2008; Narendran y cols. 2003; Wong. 2005b).

Tal y como se ha señalado previamente, se han descubierto toda una serie de nuevos autoantígenos cuyo papel en el desarrollo de la T1DM humana está aún por estudiar en detalle. Se describen a continuación tres de estos nuevos autoantígenos, la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP; “*islet glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*”), la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP; “*glial fibrillary acidic protein*”) y S100β, los cuales presentan una serie de características que los hacen especialmente atractivos a la hora de estudiar su papel en la patogénesis de la T1DM humana.

1.5.4.1. Subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP).

La mayoría de los autoantígenos identificados hoy en día en la T1DM humana han sido descubiertos mediante serología, como GAD₆₅ o IA-2. Por otra parte, clones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ han sido aislados del bazo, nódulos linfáticos o infiltrados de los islotes de ratones NOD pre-diabéticos o recién diagnosticados (Haskins y cols. 1996). Muchos de estos clones de linfocitos T no seleccionados inicialmente con ningún antígeno concreto son particularmente interesantes e informativos ya que es muy posible que sus objetivos moleculares estén implicados en el desarrollo espontáneo de la enfermedad en este modelo murino; de hecho, la mayoría de estos clones no son específicos para los antígenos identificados mediante serología.

Empleando uno de estos clones, el clon CD8⁺ NY8.3 (Verdaguer y cols. 1997), aislado a partir de infiltrados pancreáticos de ratones NOD diabéticos y el cual aceleraba el desarrollo de la enfermedad al ser transfundido a ratones NOD jóvenes, fue como se pudo identificar a la proteína IGRP como un antígeno importante en la T1DM (Lieberman y cols. 2003).

IGRP es una proteína transmembrana localizada en la membrana del retículo endoplasmático, con el extremo amino-terminal hacia el lumen del retículo y el carboxi-terminal hacia el citoplasma, y 9 segmentos transmembrana. Pertenece a la familia de las

glucosa-6-fosfatasa (G6Pasas), familia formada por 3 miembros conocidos como son la G6Pasa- α (G6PC), expresada principalmente en hígado, riñón e intestino; la G6Pasa- β (G6PC3) ampliamente distribuida, y por último IGRP (G6PC2) detectada tan sólo en el páncreas (Shieh y cols. 2005). El gen humano para IGRP se encuentra localizado en el cromosoma 2q24-31, cercano a los genes del glucagón y GAD₆₇ y donde los estudios de asociación genética localizan una región, *IDDM7*, que confiere susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad (Pociot y cols. 2002). A pesar de que IGRP comparte el 50% de su secuencia con la G6Pasa- α , y que conserva 39 aminoácidos de los 45 residuos del centro activo necesarios para presentar actividad fosfatasa, siendo postulada como un elemento clave en el control del metabolismo energético de la célula β (Arden y cols. 1999; Martin y cols. 2001), existen datos contradictorios acerca de la capacidad catalítica de la proteína con autores que proponen que la actividad G6Pasa de IGRP es nula (Arden y cols. 1999), hasta otros que cifran dicha actividad enzimática en aproximadamente un 5% de la actividad de la G6Pasa- α (Petrolonis y cols. 2004).

La importancia de IGRP en el desarrollo de la diabetes tipo 1 radica en cuatro hechos fundamentales. En primer lugar, hasta un 40% de los linfocitos CD8⁺ que infiltran los islotes pancreáticos del ratón NOD parecen ser específicos para el epitopo contra el cual responde el clon NY8.3 (Trudeau y cols. 2003); en segundo lugar, un número significativo y elevado (0,8% aproximadamente) de linfocitos CD8⁺ de sangre periférica parecen tener la misma especificidad antigénica que NY8.3 y además este número correlaciona con el desarrollo futuro de síntomas clínicos en el ratón NOD, siendo éste un hecho de vital importancia debido a la imposibilidad de cuantificar linfocitos T autorreactivos en páncreas o nódulos linfáticos que drenen este órgano en humanos; en tercer lugar, la manipulación de la inmunidad contra IGRP empleando ligandos peptídicos alterados derivados del epitopo reconocido por el clon NY8.3 previene el desarrollo de la enfermedad en el ratón NOD (Han y cols. 2005); y finalmente, IGRP parece ser también reconocida en el ratón NOD por linfocitos T CD4⁺ (Mukherjee y cols. 2005).

Todos estos datos obtenidos en el ratón NOD han conducido a la búsqueda e identificación, en pacientes diabéticos humanos, de epitopos peptídicos derivados de IGRP reconocidos tanto por linfocitos T CD4⁺ y presentados por la molécula del MHC DRA1*01:01/DRB1*04:01 (Yang y cols. 2005) como reconocidos por linfocitos T CD8⁺ y presentados por la molécula del MHC A*02:01 (Jarchum y cols. 2008).

Curiosamente, no existe hasta la fecha ningún estudio que describa la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra IGRP y quizás esta falta de datos se deba a la dificultad para obtener una cantidad lo suficientemente elevada y pura de este antígeno para poder ser empleada en la detección de dichos autoanticuerpos.

1.5.4.2. Proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP).

Se conoce desde hace tiempo la existencia de un grupo de células nerviosas que rodean el islote, las denominadas células peri-islote de Schwann (pSC) (Teitelman y cols. 1998), y cuyo interés en el desarrollo de la T1DM ha despertado recientemente con el descubrimiento de que estas células constituyen una diana para los linfocitos T y B durante el período de infiltración del islote, siendo destruidas por éstos en una fase temprana del proceso autoinmune que tiene lugar en el ratón NOD (Winer y cols. 2003). Estas células expresan de forma específica un conjunto de antígenos, entre los que se encuentra la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), los cuales y al igual que las propias células pSC, se han revelado como autoantígenos tempranos en el desarrollo de la enfermedad en el ratón NOD.

GFAP es una proteína fibrosa que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto, en particular de células gliales como los astrocitos y células de Schwann y descrita por primera vez en 1972 (Bignami y cols. 1972; Fuchs y cols. 1994; Bongcam-Rudloff y cols. 1991).

GFAP está implicada en diversos procesos funcionales de la célula; se ha demostrado que GFAP desempeña un papel importante en la mitosis ajustando la red de filamentos presente en la célula. Durante la mitosis tiene lugar un aumento de la cantidad de GFAP fosforilada y un movimiento de esta proteína modificada hacia la hendidura que se forma en el plano de división celular (Tardy y cols. 1990). Usando ARN mensajero antisentido se ha podido demostrar *in vitro* que GFAP parece desempeñar un papel en las interacciones entre astrocitos y neuronas, ya que astrocitos que carecen de GFAP no presentan extensiones, generalmente presentes, que contactan con las neuronas (Weinstein y cols. 1991).

Existen patologías humanas asociadas a mutaciones en el gen que codifica para GFAP entre las que se puede destacar el síndrome o enfermedad de Alexander (Alexander. 1949). Ésta es una enfermedad rara del sistema nervioso central en la que niños afectados desarrollan leucoencefalopatía y retardo psicomotor, entre otros síntomas que suelen llevar a la muerte en la primera década de vida. La característica patológica de todas las formas de la enfermedad de Alexander es la presencia de las denominadas fibras de Rosenthal, inclusiones

citoplasmáticas presentes en astrocitos y que contienen la proteína GFAP asociada con proteínas de choque térmico (Wippold y cols. 2006); la sobre-expresión de GFAP humana en astrocitos de ratones transgénicos es letal y está acompañada por la presencia de cuerpos de inclusión indistinguibles de las fibras de Rosenthal, resultado que sugiere que alteraciones primarias en el gen para GFAP pueden ser las responsables de los síntomas del síndrome de Alexander (Messing y cols. 1998).

GFAP fue descrita como autoantígeno al analizar cerebros de pacientes con esclerosis múltiple (Eng y cols. 2002), los cuales acumulan astrocitos positivos para esta proteína en las placas presentes en el cerebro de estos individuos. En respuesta a un daño, los astrocitos sintetizan GFAP en un proceso denominado astrogliosis (Eng y cols. 1994); de forma similar, las células pSC experimentan gliosis durante la destrucción de los islotes (Teitelman y cols. 1998). La autoinmunidad contra GFAP en el desarrollo de la T1DM fue observada por primera vez en el ratón NOD, modelo en el que se observa la destrucción espontánea de las células pSC que rodean los islotes y la presencia de linfocitos T específicos para GFAP (Winer y cols. 2003), un proceso que es muy posible que también tenga lugar durante el desarrollo de la enfermedad en pacientes humanos, en los cuales se observa una respuesta proliferativa de linfocitos periféricos frente a la proteína completa significativamente elevada en comparación a la observada en personas sanas (Banwell y cols. 2008). Estudios recientes en el ratón NOD han permitido demostrar que la autoinmunidad frente a las células pSC, y frente a la proteína GFAP en particular, no es un daño colateral que tenga lugar durante la destrucción de las células β pancreáticas, gracias a la obtención de líneas de linfocitos T, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$, específicos para GFAP empleando cultivos de células pSC libres de células β (Tsui y cols. 2008). La autoinmunidad frente a epitopos peptídicos derivados de GFAP en ratones NOD se detecta en momentos muy tempranos de la vida de estos animales sugiriendo que la destrucción de las células pSC constituye un paso previo y necesario a la destrucción de las propias células β de los islotes (Winer y cols. 2003. Tsui y cols. 2008). En la T1DM humana no se ha descrito hasta la fecha la presencia de linfocitos T $CD4^+$ específicos para epitopos peptídicos derivados de GFAP aunque sí para linfocitos T $CD8^+$; además alguno de los epitopos identificados en el ratón NOD específicos para linfocitos $CD4^+$ parecen ser reconocidos por células periféricas de pacientes diabéticos humanos recién diagnosticados (Standifer y cols. 2006). Además, tal y como se ha señalado anteriormente, la presencia de autoanticuerpos contra GFAP sólo se ha realizado sobre un número muy

reducido de pacientes y empleando técnicas de detección como el SELDI cuyo uso en la detección de rutina es muy limitado.

1.5.4.3. S100 β .

S100 β es una de las 16 proteínas pertenecientes a la denominada familia de proteínas de unión a calcio S100 (Zimmer y cols. 1995), expresada en las células de la glía y que funciona como factor neurotrópico y de supervivencia neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso central (Wainwright y cols. 2004). Esta proteína es expresada a altos niveles en astrocitos presentes en el cerebro y su adición *in vitro* a cultivos primarios de neuronas y células gliales induce la formación de extensiones neuronales y alteraciones en la proliferación y fenotipo de los astrocitos, efectos también demostrados *in vivo* (Reeves y cols. 1994). Al igual que en caso de GFAP, S100 β se expresa de forma específica en las células pSC que rodean los islotes de Langerhans (Sunami y cols. 2001).

Se ha descrito la implicación de S100 β en patologías tan diversas como la demencia vascular o la enfermedad de Alzheimer y en enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Meccoci y cols. 1995; Poletaev y cols. 2000). En pacientes afectados por demencia vascular o Alzheimer se han detectado niveles elevados de autoanticuerpos, incluyendo también autoanticuerpos contra GFAP, donde dichos niveles parecen reflejar alteraciones de la barrera hemato-encefálica que promueve el acceso de células inmunocompetentes a antígenos del sistema nervioso (Meccoci y cols. 1995). Además, se ha demostrado que linfocitos T CD4⁺ específicos para S100 β y con un fenotipo proinflamatorio Th1 inducen encefalomiелitis en ratas Lewis (Kojima y cols. 1994). Del mismo modo, se han obtenido líneas linfocitarias T CD4⁺ específicas para S100 β con capacidad citotóxica y las cuales secretan factor de necrosis tumoral α (TNF- α), IFN- γ , IL-10 e IL-4 una vez estimulados con este antígeno, lo que sugiere que estos linfocitos T específicos para S100 β son también patogénicos en seres humanos (Schmidt S. y cols. 1997). Más recientemente se ha demostrado que pacientes jóvenes con esclerosis múltiple presentan respuestas proliferatorias linfocitarias contra la proteína S100 β completa al compararlos con niños sanos (Banwell y cols. 2008).

La inmunorreactividad frente a S100 β en el contexto de la T1DM está asociada a una disminución en la invasión de los islotes de Langerhans (Persson-Sjögren y cols. 2005), y de la misma manera que GFAP, esta proteína constituye un autoantígeno temprano en la patogénesis de la diabetes tipo 1 en el ratón NOD (Winer y cols. 2003). Sin embargo, en el caso de la diabetes tipo 1 humana no se han descrito hasta la fecha epitopos peptídicos

derivados de S100 β , a pesar de que en pacientes diabéticos se detecta una proliferación linfocitaria elevada en respuesta a la proteína completa (Banwell y cols. 2008). Es más, sólo existe un estudio previo en el que se determina mediante *western blot* la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra S100 β en pacientes diabéticos, no encontrándose diferencias significativas al compararse con personas sanas (Hovsepyan y cols. 2004).

1.5.5. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T AUTORREACTIVOS Y SUS DIANAS MOLECULARES.

1.5.5.1. Estrategias en la identificación de las dianas moleculares de linfocitos T.

Existe el consenso general de que la destrucción de las células β de los islotes en la T1DM humana está mediada por una respuesta inmune celular y dicho consenso está apoyado por varias observaciones. En primer lugar, los infiltrados celulares de los islotes o insulitis contienen numerosos linfocitos T CD3⁺ (Hanafusa y cols. 2008; Foulis y cols. 1991; Willcox y cols. 2009). En segundo lugar, la progresión de la enfermedad se ve retardada mediante la administración de fármacos inmunosupresores específicos para linfocitos T (Stiller y cols. 1984). En tercer lugar, se han descrito casos donde se ha transferido la enfermedad de forma accidental mediante trasplante de médula ósea de un paciente diabético a un receptor no diabético inmunodeprimido (Lampeter y cols. 1998). Finalmente, es posible detectar la presencia en sangre periférica de linfocitos autorreactivos en pacientes diabéticos recién diagnosticados (Roep. 2003).

Los epitopos peptídicos reconocidos por linfocitos T son el código molecular a través del cual el sistema inmune adaptativo se comunica. En el contexto de una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T como la T1DM, el reconocimiento de péptidos derivados de autoantígenos de los islotes y reconocidos por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ constituye un paso clave dentro de la cascada autoinmunitaria que lleva a la destrucción de las células β . Los considerables avances de la serología en el proceso autoinmune de la T1DM humana han llevado a la identificación inequívoca de los tres autoanticuerpos bioquímicos principales señalados anteriormente, dirigidos contra la insulina, GAD₆₅ e IA-2. De esta forma, no es sorprendente por tanto que los estudios encaminados a identificar epitopos peptídicos en la T1DM humana se hayan centrado en estos tres autoantígenos clásicos, ya que la existencia de autoanticuerpos IgG contra estos tres autoantígenos implica la ayuda por parte de linfocitos T. Un número creciente de estudios han detectado la presencia de linfocitos T

dirigidos contra estos tres antígenos en sangre periférica, aumentando el interés en el descubrimiento de nuevos epitopos capaces de ser reconocidos por linfocitos autorreactivos.

A día de hoy una caracterización parcial de este código en la T1DM, que en el año 2006 incluía en humanos 155 epitopos reconocidos por linfocitos T CD4⁺ y 22 por linfocitos T CD8⁺, y en el ratón NOD ascendía a 46 y 12 epitopos, respectivamente (Di Lorenzo y cols. 2007), ha conducido a la caracterización de la respuesta por parte de linfocitos T y a otros avances clave para comprender y, eventualmente tratar, esta enfermedad. Estos avances incluyen la demostración de que la respuesta linfocitaria en la T1DM está dominada por linfocitos Th1 (Arif y cols. 2004; Peakman y cols. 1999); la identificación de poblaciones de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-10 y asociados con el diagnóstico tardío de la enfermedad (Arif y cols. 2004); la evidencia de reactividad cruzada por parte de linfocitos T específicos para autoantígenos de los islotes respecto de epitopos derivados de patógenos (Hiemstra y cols. 2001); la identificación de linfocitos T CD8⁺ autorreactivos para el diagnóstico clínico y para el trasplante de islotes (Skowera y cols. 2008. Pinkse y cols. 2005); los primeros pasos hacia el desarrollo y estandarización de ensayos para detectar linfocitos T autorreactivos y su uso en el diagnóstico clínico (Seyfert-Margolis y cols. 2006); y el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en el uso de estos epitopos (Raz y cols. 2001).

Por todas estas razones, y no sólo en el caso particular de las enfermedades autoinmunes si no también en el caso de las enfermedades infecciosas y del cáncer, existe un gran interés por identificar aquellos epitopos peptídicos reconocidos por linfocitos T (Germain y cols. 1994; ElSawa y cols. 2004). Para llevar a cabo dicha identificación existen tres aproximaciones experimentales básicas, cada una de ellas con sus ventajas e inconvenientes y que se describen a continuación.

- **Algoritmos de predicción de unión molécula del MHC/péptido.** Debido a que los péptidos sintéticos son relativamente costosos y en consecuencia limitan el número de epitopos que pueden ser evaluados, se han desarrollado varios algoritmos con la intención de predecir epitopos peptídicos capaces de estimular linfocitos T (Bian y cols. 2003). La mayoría de estos métodos pueden describirse como algoritmos de aprendizaje, basados en el conocimiento previo de péptidos que se unen a una molécula del MHC concreta o de epitopos peptídicos capaces de estimular linfocitos T, y cuya finalidad es identificar patrones en esas secuencias peptídicas y poder emplear dichos patrones para predecir nuevos epitopos (Srinivasan y cols. 2004; Jung y cols. 2001). Esta aproximación, aunque sencilla, presenta una limitación importante

que es la necesaria existencia de datos obtenidos previamente sobre epitopos peptídicos para una molécula del MHC concreta. Además, la identificación de linfocitos T específicos para alguno de estos epitopos no garantiza que dicho péptido sea generado de forma natural a partir del antígeno completo por la célula presentadora de antígeno, ya que se ha demostrado que el linfocito T posee un receptor de antígeno capaz de reaccionar de forma cruzada con varios epitopos presentados por la misma molécula del MHC (Wucherpfennig y cols. 2004). Finalmente, como dicha estrategia está basada fundamentalmente en el descubrimiento de motivos de unión a una molécula del MHC, la mayoría de los estudios se centran en el estudio posterior de aquellos epitopos con predicciones de afinidad elevadas por la molécula del MHC en estudio; sin embargo, algunos epitopos antigénicos derivados de proteínas propias y con baja afinidad por la molécula de MHC son capaces de inducir una estimulación de linfocitos T potentes e incluso autoinmunidad (Liu y cols. 1995; Unger y cols. 2011).

- **Librerías de péptidos solapantes.** Uno de las aproximaciones experimentales más empleadas en la identificación de epitopos antigénicos es la construcción de librerías de péptidos sintéticos solapantes, las cuales cubren completamente la longitud del antígeno de interés y que son usados, de forma individual o en grupos, para determinar la unión a la molécula del MHC o para estimular linfocitos T. El procesamiento antigénico en una célula presentadora de antígeno (CPA) da lugar, en el caso de epitopos presentados por moléculas del MHC de clase II, a conjuntos de péptidos solapantes los cuales comparten parte de su secuencia de aminoácidos a través de la cual interaccionan con la molécula del MHC, pero que poseen extremos carboxi- y amino-terminales de longitud variable (Chicz y cols. 1992). Estas secuencias de los extremos, o residuos peptídicos flanqueantes, pueden tener efectos potentes sobre la afinidad de unión del epitopo a la molécula del MHC y sobre la activación del linfocito T (Bartnes y cols. 1999; Carson y cols. 1997 y 1999). Por esta razón, esta aproximación no es capaz de identificar péptidos procesados y presentados de forma natural ya que no es capaz de definir los residuos flanqueantes de estos epitopos. Por otra parte, aún cuando se han generado clones de linfocitos T CD4⁺ específicos para un autoantígeno empleando péptidos sintéticos, a menudo dichos clones son incapaces de reconocer al antígeno nativo presentado por una CPA, bien porque el péptido representa a un epitopo críptico, no presentado de manera natural o

en condiciones fisiológicas, o bien porque el clon CD4⁺ ha sido generado de forma errónea contra contaminantes presentes en la preparación peptídica (Vincent y cols. 1994; Nagvekar y cols. 1999; Stevens y cols. 1997). Finalmente, el uso de péptidos solapantes obtenidos de forma arbitraria no proporciona ninguna información de si dicho epitopo será generado de forma natural de forma que no se podrá distinguir un falso positivo de una respuesta linfocitaria específica para un epitopo generado de manera natural por una CPA.

- **Identificación directa mediante espectrometría de masas.** Esta tercera estrategia soluciona muchos de los problemas que presentan las anteriormente descritas y está basada en la elución de los epitopos peptídicos presentes en una molécula del MHC concreta y su detección e identificación mediante espectrometría de masas. A día de hoy existen numerosos trabajos donde dicha estrategia ha permitido identificar epitopos procesados y presentados de forma natural por una CPA derivados de proteínas propias y/o autoantígenos importantes en el desarrollo de la T1DM humana (Rudensky y cols. 1991; Arif y cols. 2004; Peakman y cols. 1999; Skowera y cols. 2008). Uno de los puntos fuertes de esta estrategia es su alta sensibilidad: por ejemplo, si tenemos en cuenta que una célula normal posee en su superficie en torno a 10^4 péptidos diferentes unidos a sus 10^5 - 10^6 moléculas del MHC de clase I (Stevanović y cols. 1999), y que el número de copias por célula de un epitopo peptídico concreto capaz de estimular a un linfocito T citotóxico se encuentra en el rango de 1-1000 copias (Christinck y cols. 1991), la cantidad de un péptido concreto procesado de forma natural y presentado en la superficie de una CPA se encuentra en torno a los femtomoles, cantidad que los métodos actuales de espectrometría de masas son capaces de identificar (Lemmel y cols. 2003). La necesidad de cultivar hasta 10^9 - 10^{10} células a partir de las cuales obtener la cantidad de péptido necesario para poderlo identificar mediante espectrometría de masas es probablemente uno de los puntos débiles de esta estrategia.

1.5.5.2. Estrategias en la identificación y caracterización de linfocitos T autorreactivos.

Para comprender el proceso patológico que tiene lugar en la T1DM y poder eventualmente llegar a predecir el desarrollo de síntomas clínicos, se han desarrollado diversas herramientas y tecnologías que permiten evaluar y caracterizar el papel de los

linfocitos T en el proceso patológico que tiene lugar en la T1DM. Por esta razón, se describen a continuación diferentes estrategias analíticas encaminadas a la identificación de linfocitos autorreactivos específicos para un antígeno concreto, así como el potencial de dichas estrategias a la hora de comprender el desarrollo de los síntomas clínicos de la T1DM humana.

- **Ensayos de proliferación celular.** Estos ensayos han sido empleados en estudios de la T1DM desde hace más de 20 años (Miller y cols. 1987). La proliferación celular sirve como parámetro para medir la especificidad antigénica de los linfocitos T frente a un antígeno (Schloot y cols. 1997), la tolerancia inmunológica o recurrencia del proceso autoinmune (Roep y cols. 1999). Las ventajas de estos ensayos donde se cultivan conjuntamente linfocitos T, linfocitos B y monocitos/macrófagos son varias e incluyen i) la sencillez y rapidez de dichos ensayos, ii) la posibilidad de analizar un número elevado de individuos al mismo tiempo y iii) el análisis de las células inmediatamente después de su aislamiento sin una excesiva manipulación y cultivo *in vitro*.

Entre las limitaciones de esta aproximación experimental podemos citar, en primer lugar, que este tipo de ensayos detectan de forma preferente linfocitos T CD4⁺ tipo Th1 secretores de IL-2 específicos para el antígeno, ya que mediante la secreción autocrina de esta citocina estos linfocitos T generan sus propios factores de crecimiento. De esta forma, linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ de memoria que no sintetizan IL-2 sino otro tipo de citocinas importantes como el IFN- γ o la IL-4 no son detectadas en estos ensayos (Geginat y cols. 2001). En segundo lugar, además de reflejar la proliferación de linfocitos T específicos para el antígeno, los ensayos de proliferación realizados con células mononucleares periféricas (PBMCs, “*peripheral blood mononuclear cells*”) poseen un componente importante de proliferación no específica (“*bystander*”), donde la IL-2 secretada por los linfocitos específicos de antígeno puede inducir la proliferación de linfocitos T presentes en el cultivo pero específicos para otros antígenos. En tercer lugar, durante el periodo de cultivo *in vitro* la acumulación de citocinas reguladoras como la IL-10 o el factor de crecimiento tumoral- β (TGF- β) puede ocasionar la supresión de la proliferación de linfocitos T específicos para el antígeno. Finalmente, como los ensayos de proliferación están basados en la proliferación celular de PBMCs completos el análisis de síntesis de

citocinas, análisis de especificidad de epitopo o de reacción cruzada a nivel de linfocito T individual es imposible.

- **Cuantificación de citocinas mediante ELISA.** Los ensayos de ELISA (“*enzyme-linked-immuno-sorbent-assay*”) constituyen actualmente el ensayo oro (“*gold standard*”) para la determinación de la concentración de citocinas en fluidos biológicos como el suero o el plasma sanguíneo, además de emplearse habitualmente en la determinación de la concentración de citocinas en los medios de cultivo de células inmunes estimuladas *in vitro*.

Los inmunoensayos son altamente específicos y relativamente fáciles de realizar sobre un número elevado de muestras, aunque a menudo estos ensayos no son capaces de detectar determinadas citocinas por su baja secreción por parte de células estimuladas *ex vivo*, un problema resuelto por los ensayos de ELISPOT (ver más adelante). En el pasado, se han documentado diversos fenómenos de interferencia en la detección de algunas citocinas generando falsos positivos. Entre estos fenómenos de interferencia, la presencia de anticuerpos heterófilos y/o factores reumáticos puede inducir la interacción no específica de los anticuerpos empleados en el ELISA y dar lugar a una respuesta positiva en ausencia de la citocina. Así, en un estudio donde se describe la síntesis de citocinas por parte de linfocitos T con el receptor de antígenos invariable V α 24-J α Q se señalan niveles elevados de IL-4 en el suero de familiares de pacientes diabéticos y de sujetos sanos, concluyéndose en dicho estudio que la cantidad de IL-4 detectada en el suero estaba asociada con la protección frente al desarrollo de la T1DM; sin embargo estas medidas de ELISA resultaron ser falsos positivos debidos a la presencia de anticuerpos heterófilos (Wilson y cols. 1998). Hoy en día, diversas variaciones como la adición de suero fetal bovino durante el desarrollo del ELISA (She y cols. 1999; Redondo y cols. 1999) o la cuantificación de un suero positivo empleando un anticuerpo de detección no específico para la citocina han permitido controlar el efecto de los anticuerpos heterófilos y los falsos positivos.

- **Cuantificación de citocinas mediante ELISPOT.** Durante una respuesta inmune, un número bajo de linfocitos T en reposo vírgenes o de memoria se expanden de forma clonal y adquieren la capacidad de secretar citocinas. Para poder detectar una respuesta temprana específica para un antígeno por parte de distintas subpoblaciones linfocitarias al nivel de célula individual se desarrolló el ELISPOT (“*enzyme-linked immunospot assay*”) (Czerkinsky y cols. 1983 y 1988; van der Meide y cols. 1995). Este ensayo es fundamentalmente una modificación del ELISA, con la importante

diferencia de que después de su secreción por parte del linfocito T, las citocinas son capturadas y fijadas directamente en la superficie de la placa de ELISPOT. De esta forma, el ELISPOT permite la evaluación de la respuesta de linfocitos T de memoria específicos de antígeno al nivel de célula individual en relación con su frecuencia o tamaño clonal y su perfil de citocinas.

Debido al hecho de que las citocinas se unen directamente a la placa una vez secretadas, éstas no se diluyen en el medio de cultivo o se unen a receptores de citocinas presentes en células adyacentes; por estas razones, los ensayos de ELISPOT poseen una sensibilidad 400 veces mayor que la de un ELISA (Helms y cols. 2000). Además, a diferencia de la tinción intra-citoplasmática de citocinas, en el caso del ELISPOT se determina la síntesis de citocinas por parte de células sin manipular no tratadas farmacológicamente; además las células sobreviven y potencialmente pueden ser usadas en estudios posteriores.

Por varias razones, los ensayos de ELISPOT han ganado popularidad para la determinación directa *ex vivo* de linfocitos T específicos de antígeno. Tal y como se ha mencionado permite la cuantificación del tamaño clonal de linfocitos T específicos para un antígeno después de un periodo de cultivo muy corto *ex vivo* (\approx 24 horas), periodo demasiado corto como para permitir la expansión clonal *in vitro* reflejando en consecuencia las frecuencias de estos linfocitos T específicos *in vivo*, una de las características clave de la inmunidad adaptativa como es la expansión clonal específica. Ni los ensayos de proliferación celular, ni los ensayos de ELISA ni la detección mediante RT-PCR de ARN mensajeros específicos para una citocina aportan información sobre la frecuencia de linfocitos T específicos, de forma que no permiten distinguir si la respuesta neta observada es el resultado de la actividad elevada de un número reducido de células o una respuesta débil de un gran número de linfocitos T. Además, mientras que el límite de detección de los ensayos de tinción intra-citoplasmática de citocinas se encuentra en torno a 1:10.000 células, en los ensayos de ELISPOT dicho límite de detección puede ser tan bajo como 1:1.000.000 células (Karulin y cols. 2000). Esta sensibilidad añadida es crítica a la hora de detectar linfocitos T específicos de antígeno ya que el tamaño clonal de estas células, con pocas excepciones, se encuentra en el rango de 1:10.000 – 1:1.000.000 células.

1.6. Las galectinas y su papel en el sistema inmune.

Una de las características del proceso autoinmune que tiene lugar en la T1DM, tanto en el ratón NOD como en seres humanos, es la presencia de una frecuencia elevada de linfocitos T autorreactivos en los pacientes diabéticos. Diversos mecanismos, no necesariamente excluyentes, como una regulación incorrecta de la tolerancia central (Chentoufi y cols. 2008), de la tolerancia periférica (Tisch y cols. 2008) o del funcionamiento de los linfocitos Treg (Brusko y cols. 2008), podrían explicar el por qué en estos pacientes existe esta frecuencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ activados frente a diversos autoantígenos de los islotes.

Las galectinas pertenecen a la familia de las lectinas, un tipo de proteínas que reconocen oligosacáridos unidos a glicoproteínas y glicolípidos. Estas proteínas se hallan fuertemente conservadas a lo largo de la evolución, encontrándose tanto en esponjas y nematodos como en seres humanos. Hasta la fecha se han descrito 15 galectinas diferentes en mamíferos con patrones de expresión muy variados y que participan en funciones tan importantes como la adhesión celular, la regulación del crecimiento celular o la apoptosis. Además, su nivel de expresión varía no sólo con las diferentes etapas del desarrollo o el tejido sino también en condiciones inflamatorias o tumorales, asociándose en este último caso su nivel de expresión con el potencial metastático del tumor (Rabinovich y cols. 2002 y 2007; Camby y cols. 2006; Perillo y cols. 1998).

Estructuralmente, los miembros pertenecientes a esta familia de lectinas de mamíferos comparten una secuencia aminoacídica de 130 aminoácidos que constituye el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD; “*carbohydrate recognition domain*”) y que es el responsable de su unión preferencial a β -galactósidos (Barondes y cols. 1994). Algunas de ellas contienen un solo CRD y son biológicamente activas como monómeros (galectinas -5, -7 y -10), homodímeros (galectinas -1, -2, -11, -13, -14 y -15) u oligómeros que se agregan a través de su dominio no-lectina (galectina-3); otras galectinas contienen 2 CRDs conectados por un pequeño péptido, las denominadas galectinas en tándem- (galectinas -4, -6, -8, -9 y -12) (Camby y cols. 2006). Aunque la unidad mínima de reconocimiento por parte del CRD es la N-acetil-lactosamina, cada galectina presenta una afinidad específica hacia pequeñas modificaciones de esta unidad mínima (Hirabayashi y cols. 2002), como ocurre por ejemplo entre la galectina-1 y la -3, donde ambas galectinas se unen a la N-acetil-lactosamina pero la galectina-3 se puede unir además a la lacto-N-hexosa, ligando al que la galectina-1 es incapaz de unirse (Ahmad y cols. 2004).

Aunque no poseen el péptido señal necesario para su secreción a través de la ruta secretora vía retículo endoplasmático y aparato de Golgi, algunas galectinas son translocadas al medio celular mediante vías secretorias no clásicas no muy bien caracterizadas a día de hoy, posiblemente previniendo su unión prematura a oligosacáridos de glicoproteínas en formación (Cooper, 1997; Mehul y cols. 1997). Aunque el mecanismo de secreción no se conoce, la localización celular de las galectinas tiene una gran importancia en su función; así, se ha descrito que la actividad intracelular de la galectina-1 es independiente de sus propiedades de lectina mientras que su función extracelular depende principalmente de su capacidad de unir azúcares (Camby y cols. 2006); de la misma manera, mientras que la galectina-3 intracelular posee actividad anti-apoptótica en linfocitos T una vez secretada al exterior induce la apoptosis de esos mismos linfocitos (Hsu y cols. 2009). La actividad de estas lectinas parece basarse en el entrecruzamiento que inducen en glicoproteínas de superficie regulando procesos de señalización importantes como son la proliferación y diferenciación celular o la síntesis de citocinas (Liu y cols. 2005). De este modo, la sensibilidad de un tipo celular concreto al efecto ejercido por las galectinas depende de su patrón de glicosilación, patrón que varía según el estado funcional de la célula (Rabinovich y cols. 2002).

En lo que respecta al sistema inmune, las galectinas se expresan en diversas células activadas como los macrófagos y células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T, incluyendo linfocitos Treg (Rabinovich y cols. 2007). Estudios recientes muestran que las galectinas juegan un papel importante en las fases de iniciación y resolución de las respuestas inflamatorias y autoinmunes, al promover efectos anti- o pro-inflamatorios (Rabinovich y cols. 2007). En este sentido se ha propuesto que la misma galectina puede ejercer efectos anti- o pro-inflamatorios en función de factores como la concentración alcanzada en el lugar de la inflamación, el microambiente extracelular y el tipo de célula diana afectada por la galectina (Toscano y cols. 2007b). La expresión de estas proteínas se regula durante los procesos de activación y diferenciación celular y está mediada por hormonas, citocinas y quimiocinas, y puede estar significativamente alterada en procesos patológicos (Camby y cols. 2006; Liu y cols. 2005).

1.6.1. GALECTINA 1.

La galectina-1 es una lectina que ha demostrado desempeñar un papel clave en el funcionamiento del sistema inmune al inducir apoptosis durante la selección negativa en el

timo de linfocitos T autorreactivos (Perillo y cols. 1997), además de inducir también apoptosis en linfocitos T activados (Perillo y cols. 1995) limitando la respuesta inmune mediada por linfocitos T en la periferia, por lo que se puede postular que una alteración en su expresión o función podría permitir el escape y/o supervivencia de linfocitos T autorreactivos.

Tal y como se ha señalado previamente, la galectina-1 es una lectina con un solo CRD la cual puede formar homodímeros. Se expresa en la mayoría de órganos, principalmente en nódulos linfáticos, bazo, timo, placenta, próstata, diversos tumores y en tipos celulares como los linfocitos B y T, entre otros (Rabinovich y cols. 2002). Se han descrito un gran número de funciones asociadas a esta lectina, las cuales parecen depender del equilibrio monómero/dímero, su estabilidad en el tejido, su concentración y su estado de oxidación, el tipo celular sobre el que actúa y el microambiente en el que ha de desarrollar su función (Rabinovich y cols. 2007). Describiremos principalmente las funciones que desarrolla como reguladora de la respuesta inmune.

Como ya se ha comentado previamente, la galectina-1 se expresa en las células epiteliales del timo, teniendo un papel importante en la selección negativa (Perillo y cols. 1997) y también se expresa en linfocitos T activados, en los que induce apoptosis (Perillo y cols. 1995). Estas dos acciones combinadas permiten, por una parte, la eliminación de linfocitos T autorreactivos en el timo y, por otra, la limitación de la respuesta inmune a nivel periférico limitando el posible daño tisular. El nivel de glicosilación de glicoproteínas receptoras sobre las que actúa la galectina-1 es clave para que pueda inducir apoptosis en linfocitos activados. Uno de estos receptores es CD45: en linfocitos T deficientes en la glicosiltransferasa C2GnT, responsable de la adición de poli-N-acetil-lactosaminas a O-glicanos, los receptores CD45 poseen niveles disminuidos de poli-N-acetil-lactosaminas, preentando estas células una tolerancia mayor a la muerte celular inducida por galectina-1 (Nguyen y cols. 2001).

La galectina-1 regula también la señalización a través del receptor de antígenos del linfocito T, de tal modo que antagoniza con las vías de señalización que requieren co-estimulación y fosforilación de tirosina-fosfatasas, como la producción de IL-2 y la proliferación celular, pero es permisiva para respuestas iniciadas por el TCR que sólo requieran señalización parcial a través del mismo, como la producción de IFN- γ , la expresión de CD69 o la apoptosis (Chung y cols. 2000).

Se ha descrito que la galectina 1 modifica el patrón de síntesis de citocinas y, de forma general, esta lectina inhibe la función de linfocitos Th1 favoreciendo por el contrario la función de linfocitos Th2 (Motran y cols. 2008). A nivel extracelular, la galectina-1 a concentraciones relativamente bajas (0,01 a 0,1 μM) y unida a una matriz extracelular, inhibe la adhesión de los linfocitos a dicha matriz así como la secreción de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF- α por parte de linfocitos T activados (Rabinovich y cols. 1999a). Además, tanto en linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ sin activar y activados se observa un aumento en los niveles de ARN mensajero para IL-10 en presencia de galectina-1 (van der Leij y cols. 2007). Se ha demostrado que los linfocitos Treg constituyen un linaje que sintetiza y secreta elevados niveles de galectina-1; de hecho la supresión de la expresión de esta lectina limita la función supresora de estas células (Garín y cols. 2007).

Además de linfocitos T, la galectina-1 también es expresada por el linfocito B. De esta forma, en linfocitos B activados mediante señales procedentes del entrecruzamiento de su receptor de antígeno y CD40 se observa un aumento en la expresión de esta lectina, y la galectina-1 secretada por estos linfocitos induce la apoptosis de linfocitos T pero no la de las propias células B (Zuñiga y cols. 2001).

La galectina-1 inhibe la producción de óxido nítrico por parte de macrófagos activados (Correa y cols. 2003); además regula la expresión y función de ciertas proteínas en monocitos, como las moléculas de histocompatibilidad de clase II (Barrionuevo y cols, 2007).

En cuanto a las células dendríticas, la adición *in vitro* de galectina-1 induce la expresión de marcadores de maduración de estas células como CD40, CD83, CD86 y HLA-DR, aumenta la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , pero no de IL-12 y favorece su migración a través de la matriz extracelular (Fulcher y cols. 2006). Además, células dendríticas que sobreexpresan galectina-1 son capaces de estimular linfocitos T vírgenes e inducir apoptosis en linfocitos T activados (Perone y cols. 2006b).

Se han ensayado terapias empleando galectina-1 en diversos modelos animales de enfermedades inflamatorias debido a sus propiedades anti-inflamatorias, entre las que podemos citar la miastenia *gravis* (Levi y cols. 1983), artritis inducida por colágeno (Rabinovich y cols. 1999b), hepatitis inducida por concanavalina A (Santucci y cols. 2000), colitis inducida por haptenos (Santucci y cols. 2003), uveitis inducida por la proteína de unión al interfotorreceptor (Toscano y cols. 2006) y enfermedad de injerto contra huésped (Baum y cols. 2003).

Por lo que respecta a la diabetes tipo 1, se ha demostrado que células dendríticas que sobre-expresan galectina-1 reducen la infiltración linfocitaria y retrasan la aparición de la diabetes en ratones NOD. Este efecto terapéutico va acompañado de un aumento en el porcentaje de linfocitos T apoptóticos y la presencia de un menor número de células CD4⁺ secretoras de IFN- γ en los nódulos linfáticos del páncreas (Perone y cols. 2006a). Además, la administración de galectina-1 soluble a ratones NOD reduce el número de linfocitos Th1 y aumenta la frecuencia de linfocitos Th2 y Treg, con el consiguiente aumento de IL-10 e IL-4, acompañándose de la eliminación periférica de linfocitos T específicos para autoantígenos de la célula β (Perone y cols. 2009).

1.6.2. GALECTINA 3.

Esta lectina se expresa principalmente en células tumorales, macrófagos, células epiteliales y, al igual que la galectina-1, en linfocitos T activados (Rabinovich y cols. 2002). La galectina-3 también induce apoptosis de linfocitos T y entre ellos de los timocitos dobles negativos del timo (Stillman y cols. 2006).

A nivel extracelular, induce la apoptosis de los linfocitos T al parecer mediante una vía de señalización diferente a la empleada por la galectina-1 y mediando en este caso los receptores CD45 y CD71 pero no CD7, el cual sí juega un papel importante en la apoptosis mediada por galectina-1 (Stillman y cols. 2006). Además, tiene también un efecto negativo en el crecimiento de linfocitos T al inhibir la proliferación de PBMCs inducida por mitógeno (Müller y cols. 2006). Sin embargo, a nivel intracelular la galectina-3 tiene una función antiapoptótica, quizás debida a que posee un dominio proteico, altamente conservado entre miembros de la familia de la proteína Bcl-2, clave para la actividad supresora de la apoptosis mediada por Bcl-2, de tal forma que esta lectina es un regulador positivo de la proliferación de linfocitos T (Yang y cols. 1996).

En cuanto a su papel en la regulación de la secreción de citocinas, la galectina-3 impide la síntesis de IL-5 por parte de eosinófilos, PBMCs y linfocitos T (Cortegano y cols. 1998), además de inhibir la secreción de IL-12 por parte de las células dendríticas (Bernardes y cols. 2006), favoreciendo en este último caso la respuestas linfocitarias de tipo Th2. Favorece también la secreción de IL-1 por parte de monocitos (Jeng y cols. 1994), de IL-2 por parte de linfocitos T (Hsu y cols. 1996) y de IL-8 por parte de neutrófilos (Nieminen y cols. 2005), promoviendo además la actividad fagocítica de estos últimos (Fernández y cols. 2005).

En general, la galectina-3 favorece la adhesión a la matriz extracelular y la adhesión célula-célula, como por ejemplo la adhesión de los neutrófilos a la laminina de la matriz extracelular y a células endoteliales, favoreciendo su participación en la respuesta inmune (Kuwabara y cols. 1996) o la adhesión de linfocitos T a células dendríticas y macrófagos, favoreciendo la activación del linfocito por parte de estas CPAs (Swarte y cols. 1998).

La galectina-3 induce la producción de IgE por parte de linfocitos B (Kimata, 2002), provocando la liberación de mediadores por parte de mastocitos sensibilizados y no sensibilizados por IgE (Frigeri y cols. 1993).

Además de las múltiples funciones que ejerce esta lectina, se ha visto que la galectina-3 es reconocida como un autoantígeno en varias enfermedades autoinmunes y en cáncer. Así, se han encontrado anticuerpos anti-galectina-3 en el lupus eritematoso sistémico, polimiositis y dermatomiositis (Lim y cols. 2002), en la enfermedad de Chron (Jensen-Jarolim y cols. 2001) y en diversos tumores (Mathews y cols. 1995; Suárez-Álvarez y cols. 2001).

En cuanto al papel de la galectina-3 en la diabetes, se ha demostrado que ratones deficientes (“*knockout*”) para galectina-3 en los que se induce diabetes con estreptozotocina son relativamente resistentes a la diabetogénesis en lo que respecta a la glicemia, la histología y el contenido de insulina; presentan además menor expresión de IFN- γ y ausencia de TNF- α e IL-17 en nódulos linfáticos pancreáticos, lo que lleva a pensar que la galectina-3 modula la progresión de la enfermedad (Mensah-Brown y cols. 2008). Otros autores, sin embargo, han demostrado que la galectina-3 posee un papel protector contra la angiogénesis retinal en la diabetes (Stitt y cols. 2005). Se ha demostrado además que se produce un aumento en la cantidad intracelular de galectina-3 en islotes de rata expuestos a la citocina proinflamatoria IL-1 β , lo que podría apuntar a un papel protector de la galectina-3 en las células β de los islotes frente a las citocinas proinflamatorias (Karlsen y cols. 2006). Estos resultados, aparentemente contradictorios, pueden deberse a las funciones opuestas que presenta la galectina-3 según su localización celular (intracelular-antiapoptótica; extracelular-proapoptótica).

A pesar de todas estas propiedades claramente inmunoreguladoras de las galectinas-1 y -3, y del prometedor papel de la galectina-1 en la terapia para la diabetes autoinmune en el ratón NOD, resulta sorprendente que no existan hasta el momento estudios acerca de la síntesis de estas galectinas en humanos con diabetes tipo 1.

1.7. Objetivos:

- 1) Clonar, expresar y purificar los autoantígenos IGRP, GFAP y S100 β y desarrollar un sistema de ELISA que permita cuantificar autoanticuerpos específicos.

- 2) Identificar los péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por la molécula de histocompatibilidad HLA-DRB1*04:01, evaluar su afinidad *in vitro* por esta molécula de histocompatibilidad e identificar, mediante ELISPOT, la presencia de linfocitos T autorreactivos específicos para estos epitopos peptídicos en células mononucleares periféricas (PBMCs) de personas sanas y pacientes diabéticos de tipo 1.

- 3) Identificar péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por la molécula de histocompatibilidad HLA-A*02:01, evaluar *in vitro* su afinidad por esta molécula de histocompatibilidad y su procesamiento por el proteosoma.

- 4) Evaluar de modo preliminar la especificidad por S100 β de linfocitos T infiltrantes de islotes de Langerhans en el ratón NOD mediante la generación de hibridomas.

- 5) Estudiar la expresión de galectina -1 y -3 por parte de distintos linajes de linfocitos T colaboradores polarizados *in vitro* así como en distintas poblaciones celulares obtenidas de personas sanas y pacientes diabéticos tipo 1.

Capítulo 2:
Materiales y Métodos.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

2.1. Materiales.

2.1.1. MATERIALES BIOLÓGICOS.

2.1.1.1. Cepas bacterianas.

One Shot TOP10F': cepa de *Escherichia coli* (*E.coli*), empleada en técnicas de clonaje de ADN, de genotipo F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG* (Invitrogen).

BL21 (DE3) pLysS: cepa de *E.coli* empleada para la expresión de proteínas recombinantes, de genotipo F- *ompT hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm* (DE3) pLysS (CamR), conteniendo el plásmido pLysS, que permite una reducción de la expresión basal de la proteína recombinante (Invitrogen).

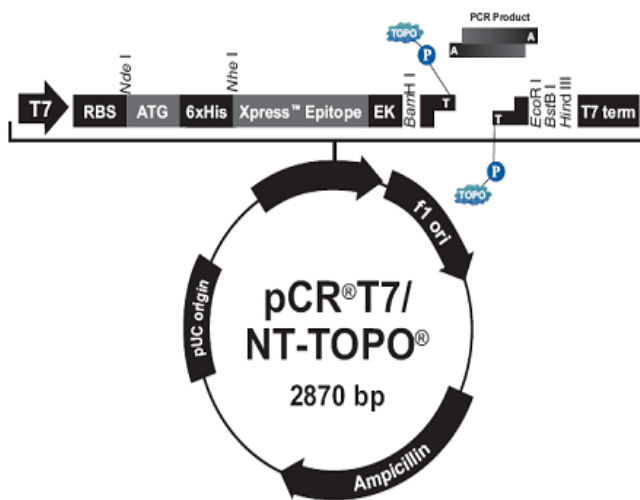
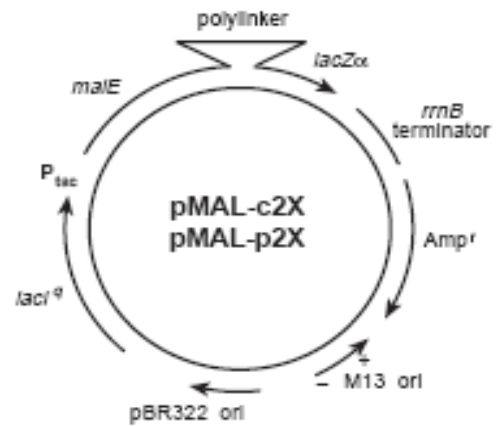
C43 (DE3): cepa de *E.coli* empleada para la expresión de proteínas recombinantes, proveniente de la cepa C41 (DE3) transformada con el gen de la subunidad F de la ATPasa, y a la que se ha eliminado el plásmido. La cepa C41 (DE3) fue a su vez derivada de la cepa BL21 (DE3), y contiene al menos una mutación no caracterizada que previene la muerte celular asociada a la expresión de proteínas recombinantes tóxicas (OverExpress).

2.1.1.2. Plásmidos.



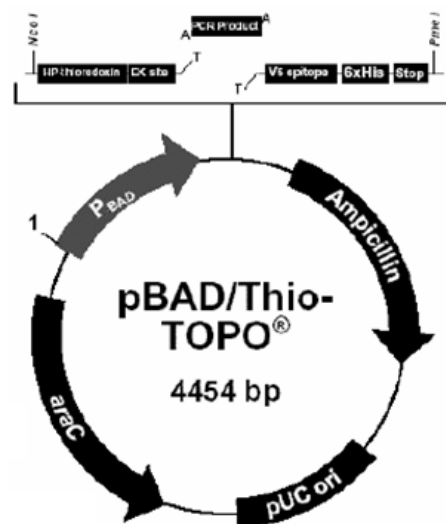
pCR 2.1/TOPO: vector linealizado, que posee desoxitimidinas libres en 3', empleado en experimentos de clonación y que permite clonar productos de PCR en un solo paso (Invitrogen).

pMAL-c2X: vector de expresión bacteriano inducible por IPTG (promotor TAC), que genera una proteína recombinante con la proteína de unión a maltosa en el extremo amino-terminal, aumentando con ello la solubilidad de la proteína resultante (New England Biolabs).

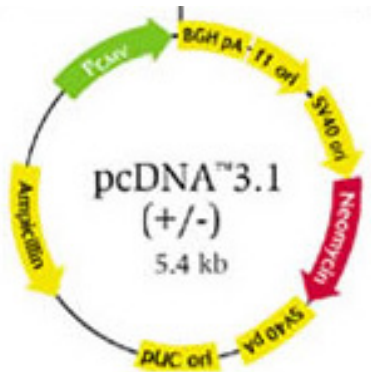


pCR T7/NT-TOPO: vector de expresión bacteriano linealizado, que posee desoxitimidinas libres en 3', y que permite clonar directamente productos de PCR. Inducible por IPTG, genera proteínas recombinantes con una cola de 6 histidinas y el epitopo Xpress en el extremo amino-terminal. Posee el promotor T7 (Invitrogen).

pBAD/Thio-TOPO: vector de expresión bacteriano linealizado, que posee desoxitimidinas libres en 3', inducible por arabinosa, que genera proteínas de fusión con tiorredoxina en el extremo amino-terminal, y el epitopo V5 y una cola de 6 histidinas en el carboxi-terminal (Invitrogen). La unión de la proteína de interés a la tiorredoxina aumenta la solubilidad de proteínas que de otro modo son difíciles de producir, además de mejorarse la eficiencia de la expresión. Posee el promotor araBAD (pBAD), el cual está positiva y negativamente regulado por el producto del gen *AraC*, un factor regulador de la transcripción que forma un complejo con la L-arabinosa. En ausencia de arabinosa, el dímero de AraC se une al promotor de tal modo que se forma un lazo que impide la transcripción. Al añadir L-arabinosa ésta se une al dímero de AraC,

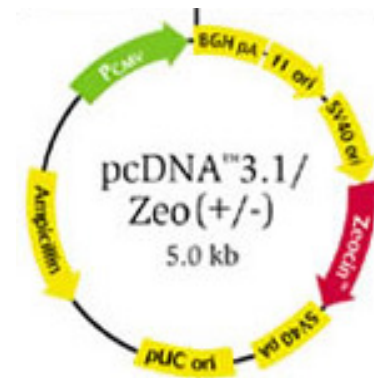


deshaciendo el lazo, y permitiendo el inicio de la transcripción. De este modo se reduce significativamente la expresión basal.



pcDNA 3.1 (+): vector empleado en la expresión de proteínas en células eucariotas, bajo el control del promotor de citomegalovirus. Confiere resistencia a geneticina (G418). Contiene una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación para aumentar la estabilidad del ARN mensajero (Invitrogen).

pcDNA 3.1/Zeo (+): vector similar al pcDNA 3.1 pero que confiere resistencia a zeocina (Invitrogen).



2.1.1.3. Líneas celulares.

Priess: línea celular linfoblastoide (célula B) de origen humano inmortalizada con el virus de Epstein-Barr, homocigota para el genotipo *DRB1*04:01* [DR4/DRw53], *DQA1*0301/DQB1*0302* [DQ8] (*European Collection of Cell Cultures*; ECACC).

K562: línea celular de leucemia eritromieloblastoide de origen humano que no expresa moléculas de histocompatibilidad de clase I (*European Collection of Cell Cultures*; ECACC).

P815: línea celular murina derivada de un mastocitoma de la cepa DBA/2 que no expresa moléculas de histocompatibilidad de clase II, pero sí de clase I (H-2^d) (American Type Culture Collection (ATCC), proporcionada por el Dr. Joan Verdaguer – Departamento de Medicina Experimental, Universitat de Lleida-).

BW5147: línea celular murina establecida a partir de un timoma espontáneo del ratón AKR/J (American Type Culture Collection (ATCC), proporcionada por el Dr. Joan Verdaguer).

2.1.1.4. Muestras humanas.

La utilización de especímenes biológicos humanos en esta investigación contó con el consentimiento informado de los pacientes así como con la correspondiente aprobación del Comité Etico de la Universidad de Santiago y del Comité Etico de Investigación Clínica de Galicia (nº 2006/290).

Plasmas: Fueron cedidos por el Centro de Transfusión de Galicia con la aprobación del Dr. Carlos Arean, director de hemodonación y del Dr. Julio Carrera, director del centro. Los plasmas de pacientes diabéticos fueron obtenidos de muestras sobrantes del análisis de hemoglobina glicada del laboratorio de Bioquímica Especial del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).

Sangre total: Los pacientes con diabetes tipo 1 fueron reclutados de aquellos que acudieron al Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (Hospital Meixoeiro), del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (Hospital Provincial) y/o del *King's College Hospital* de Londres, tanto con diagnóstico reciente (< 1 año) como de larga duración (> 1 año). Los controles sanos no diabéticos sin historia familiar de diabetes tipo 1 fueron reclutados como voluntarios entre el personal de plantilla del departamento y del laboratorio Central del CHUS durante el mismo período, y fueron emparejados con los pacientes diabéticos para edad y sexo. La sangre fue recogida en tubos conteniendo heparina sódica.

2.1.1.5. Animales.

Todos los procedimientos para el manejo y sacrificio de los animales estuvieron de acuerdo con las normas de la Comisión Europea (86/609/CEE).

Ratas Sprage-Dawley: estos animales fueron mantenidos en el animalario de la Universidad de Santiago de Compostela (cortesía del Dr. Miguel A. Rodríguez, Departamento de Biología Celular y Ecología, Universidad de Santiago de Compostela), y empleados en experimentos de inmunofluorescencia.

Ratones NOD: ratones no obesos diabéticos, modelo animal de la diabetes tipo 1 humana (Jackson Laboratories), del grupo del Dr Joan Verdaguer, mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos con la aprobación del Comité Ético para la Experimentación Animal del Hospital Germans Trias i Pujol en el estabulario de dicho hospital.

2.1.2. MATERIALES NO BIOLÓGICOS.

Salvo indicación en sentido contrario todos los compuestos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

2.1.2.1. Disoluciones y tampones.

Azul Coomassie: 50% metanol, 10% ácido acético, 0,2% Brilliant Blue R.

Disolución de desteñido: 40% metanol, 10% ácido acético.

Disolución para el gel concentrador de SDS-PAGE: 4% acrilamida, 0,1% bis-acrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,075% persulfato amónico, 0,0015% TEMED.

Disolución para el gel separador de SDS-PAGE: 10-14% acrilamida, 0,26-0,37% bis-acrilamida, 0,3 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,05% persulfato amónico, 0,0005% N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED).

PBS 1% BSA: PBS 1% albúmina bovina.

PBS 3% BSA: PBS 3% albúmina bovina.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5,7 mM Na₂HPO₄ anhidro, 1,8 mM KH₂PO₄.

PBST 0,5% leche: PBST 0,5% leche desnatada en polvo.

PBST: PBS 0,05% Tween-20.

Tampón de carga para ADN (6x): 1,17 M sacarosa, 0,025% azul de bromofenol en tampón TE.

Tampón de carga para SDS-PAGE (5x): 0,3 M Tris-HCl pH 6,8, 5% SDS, 50% glicerol, 100 mM ditiotreitol, azul de bromofenol.

Tampón de electroforesis para SDS-PAGE: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 3,5 mM SDS.

Tampón de lisis de células eucariotas: 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL, 5 mM EDTA e inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich).

Tampón de RP-HPLC para la bomba A: 0,05% TFA en agua destilada.

Tampón de RP-HPLC para la bomba B: 0,05% TFA en 60% ACN.

Tampón de transferencia para *western blot*: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina.

Tampón Tris-acetato-EDTA (TAE): 0,4 M Tris-HCl, 20 mM EDTA, 1,14% ácido acético glacial.

Tampón Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA.

2.1.2.2. Medios de cultivo.

Medio Luria-Bertani (LB): medio de cultivo líquido para bacterias. 10 g/L triptona (Cultimed), 5 g/L extracto de levadura (Cultimed), 5 g/L NaCl.

Placas de LB: medio de cultivo sólido para bacterias. Medio LB suplementado con 15 g/L de agar.

R10: medio de cultivo de células humanas, consistente en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS, Gibco), 1 U/mL de penicilina, 1 µg/mL de estreptomicina y 2,92 µg/mL de L-glutamina (Gibco).

H10: medio semejante al R10 pero suplementado con 10% de suero humano (Sigma-Aldrich).

R10-PB: medio de cultivo de células murinas, consistente en medio R10 suplementado con 1 mM de piruvato (Gibco) y 50 µM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

HAT: medio R10-PB suplementado con 100 mM hipoxantina, 0,4 mM aminopterina y 16 mM timidina (Sigma-Aldrich).

HT: medio R10-PB suplementado con 100 mM hipoxantina y 16 mM timidina (Sigma-Aldrich).

Medio de congelación: 90% FCS, 10% dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich).

2.1.2.3. Cebadores.

Todos los cebadores fueron adquiridos de Sigma-Genosys, y se muestran en la Tabla 2.

Nombre	Secuencia	Uso
IGRP-F	GGAAGCTTATGGATTTTCCTTCAC	Clonaje IGRP en pCR 2.1/TOPO
IGRP-R	GGCTCGAGCTACTGACTCTTCTTTCC	Clonaje IGRP en pCR 2.1/TOPO
IGRP2-F	ATGGATTTCCCTTCACAGG	Clonaje IGRP en pBAD/Thio-TOPO
IGRP2-R	CTGACTCTTCTTTCCGC	Clonaje IGRP en pBAD/Thio-TOPO
GFAP-F	ATGGAGAGGAGACGCATCACC	Clonaje GFAP en pCR T7/NT-TOPO
GFAP-R	TCAATGGTGATGGTGATGGTGCATCACATC CTTTGTG	Clonaje GFAP en pCR T7/NT-TOPO
GFAP2-F	GGGGATCCATGGAGAGGAGACGCATCACC	Clonaje GFAP en pMAL-c2X
GFAP2-R	GGGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGGTGC ATCACATCCTTGTG	Clonaje GFAP en pMAL-c2X
S100B-F	GGATCCGGGATGTCTGAG	Clonaje S100 β en pCR T7/NT-TOPO
Biotag1	CTCGAAGATGTCGTTTCAGACCGCCACCCTC ATGTTCA	Clonaje S100 β en pCR T7/NT-TOPO
Biotag2	GGATCCTTATTCGTGCCATTCGATTTTCTGA GCCTCGAAGATG	Clonaje S100 β en pCR T7/NT-TOPO
47-F	GTTTCTTGGAGCAGGTAAACA	Genotipado DRB1*04
37-R	CTGCACTGTGAAGCTCTCAC	Genotipado DRB1*04
38-R	CTGCACTGTGAAGCTCTCCA	Genotipado DRB1*04
CtrlDR4-F	TGCCAAGTGGAGCACCCAA	Genotipado DRB1*04
CtrlDR4-R	GCATCTTGCTCTGTGCAGAT	Genotipado DRB1*04
S100pcDNA-F	TAATACGACTCACTATAGGG	Clonaje S100 β en pcDNA3.1 (+) y pcDNA 3.1/Zeo (+)
S100pcDNA-R	TAGTTATTGCTCAGCCGGTGG	Clonaje S100 β en pcDNA3.1 (+)
S100pcDNAZ-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Clonaje S100 β en pcDNA 3.1/Zeo (+)
Gal1-F	GACGCTAAGAGCTTCGTGCT	PCR en tiempo real para galectina-1

Nombre	Secuencia	Uso
Gal1-R	GATGCACACCTCTGCAACAC	PCR en tiempo real para galectina-1
Gal3-F	GCCTACCCATCTTCTGGACA	PCR en tiempo real para galectina-3
Gal3-R	GTGGAAGGCAACATCATTCC	PCR en tiempo real para galectina-3
GAPDH-F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	PCR en tiempo real para GAPDH
GAPDH-R	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT	PCR en tiempo real para GAPDH
Tbet-F	CTGCCTACCAGAATGCCGAGA	PCR en tiempo real para Tbet
Tbet-R	AAGCGGCTGGGAACAGGATAC	PCR en tiempo real para Tbet
GATA3-F	CGAGATGGCACGGGACACTA	PCR en tiempo real para GATA3
GATA3-R	TGGTCTGACAGTTCGCACAGG	PCR en tiempo real para GATA3
RORC2-F	CAGTCATGAGAACACAAATTGAAGTG	PCR en tiempo real para RORC2
RORC2-R	CAGGTGATAACCCCGTAGTGGAT	PCR en tiempo real para RORC2

Tabla 2: Cebadores empleados en este trabajo. Se indica el nombre, la secuencia en dirección 5'→3' y el procedimiento en el que se ha empleado.

2.2. Métodos generales.

2.2.1. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

2.2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En las reacciones de PCR se emplearon dos polimerasas distintas en función del uso: polimerasa *Pfu* (Stratagene) en reacciones de PCR de alta fidelidad o polimerasa *Taq* (Promega) para el resto de reacciones. El tampón suministrado con la *Pfu* contiene 20 mM MgCl₂ (10x), mientras que el de la *Taq* contiene 15 mM MgCl₂ (10x). La mezcla de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) utilizados fue adquirida en Promega, así como el H₂O libre de RNasas/DNasas. Las concentraciones finales de los reactivos utilizados para preparar la mezcla de reacción se muestran en la siguiente tabla (Tabla 3):

Reactivo	Pfu	Taq
Tampón (suministrado con cada enzima)	1x	1x
dNTPs	100 μ M de cada uno	10 μ M de cada uno
Cebadores	0,72 μ M de cada uno	0,36 μ M de cada uno
ADN molde	1:12,5	2:12,5
Enzima	0,1 U/ μ L (1,25U totales)	0,08 U/ μ L (1U total)

Tabla 3: concentraciones finales de los reactivos empleados en las reacciones de PCR. El volumen final de la reacción fue ajustado con H₂O libre de RNasas/DNasas.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *Gene Cyclor* (BioRad). Después de un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 94°C, se ejecutaron 35 ciclos con una etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, de hibridación a la temperatura recomendable para cada pareja de cebadores (ver tabla 2), y de extensión a 72°C por un minuto. Por último se mantuvo la reacción 5 minutos a 72°C.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador *Gene Cyclor* (BioRad). Las condiciones habituales de tiempo y temperatura para las PCRs fueron: 1 ciclo de 94°C 5 min; 35 ciclos consistentes en 94°C 30 seg, temperatura de hibridación (T_h) variable según el par de cebadores 30 seg y 72°C 1 min; y 1 ciclo final de 72°C 5 min.

2.2.1.2. Electroforesis en gel de agarosa.

La electroforesis para ADN se llevó a cabo utilizando geles de agarosa de concentración variable dependiendo del tamaño del fragmento de ADN de interés (0.8% ó 1.3%), preparados en tampón TAE conteniendo 1 μ g/mL de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich), en el sistema *Mini-Sub Cell GT* (BioRad), en tampón TAE aplicando una diferencia de potencial de 120 V durante 20 min. Las muestras provenientes de reacciones de PCR con *Pfu* fueron mezcladas con la cantidad correspondiente de tampón de carga 6x para ADN antes de ser cargadas en el gel. En las reacciones de PCR con *Taq* el tampón de reacción ya incluía los reactivos necesarios para su carga en los geles de electroforesis. Como marcador de peso molecular se emplearon 5 μ L/pocillo del marcador *Hyperladder I* (Bioline). Los geles fueron

visualizados en un GelDoc XR (BioRad), y analizados mediante el *software* Quantity One 4.6.5 (BioRad).

2.2.1.3. Purificación de ADN.

Para purificar ácidos nucleicos éstos fueron separados por electroforesis sobre geles de agarosa, la banda correspondiente aislada del resto del gel, y el ADN purificado mediante el *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN) y cuantificado por absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000), o por comparación con cantidades conocidas de ADN analizadas simultáneamente en el mismo gel.

2.2.1.4. Corte de ADN con enzimas de restricción.

Para la digestión de ADN se emplearon distintas enzimas de restricción (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante, incubando 2 horas a 37°C y posteriormente 20 min a 65°C para detener la reacción, tras lo cual el ADN cortado fue purificado (ver apartado 2.2.1.3).

2.2.1.5. Ligación, transformación, selección de clones positivos, secuenciación.

Las reacciones de ligación se ensamblaron del siguiente modo: 100 ng de plásmido fueron mezclados con la cantidad correspondiente del segmento a clonar para alcanzar una relación molar de 1:3 (vector : inserto). La mezcla fue incubada 5 min a 45°C y, tras enfriar en hielo, se añadieron 3 unidades de T4 DNA ligasa (Promega) junto con 1 µL del tampón 10x suministrado con la enzima (concentraciones finales de 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT y 1 mM ATP), incubándose la reacción 24 horas a 4°C. La ligasa fue posteriormente inactivada por incubación a 65°C durante 10 min, tras la cual células One Shot TOP10F' (Invitrogen) fueron transformadas con 2 µl de la reacción de ligación siguiendo instrucciones del fabricante, y sembradas en placas de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina. Las bacterias recombinantes fueron identificadas mediante PCR con los cebadores específicos para la secuencia de interés, y su identidad fue posteriormente confirmada por secuenciación (Sistemas Genómicos).

2.2.2. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.

2.2.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE):

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó utilizando geles discontinuos de acrilamida:bisacrilamida en presencia de SDS y bajo condiciones desnaturalizantes. Los geles fueron polimerizados en el sistema *Mini-PROTEAN 3 Cell* (BioRad), cargando 3,5 mL de la disolución para el gel separador, dejando polimerizar y cargando a continuación 1 mL de la disolución para el gel concentrador.

La desnaturalización de las proteínas se consiguió añadiendo la cantidad correspondiente de tampón de carga 5x a la muestra, calentando 5 min a 98°C en un baño seco (*ACCUBLOK Digital Dry Bath*; Labnet International). Tras una breve centrifugación 10-15 µL fueron cargados en cada pocillo. Como marcador de peso molecular se empleó el *SDS-PAGE Molecular Weight Standard -Broad Range-* (BioRad).

La electroforesis se realiza en dos etapas: en primer lugar se focaliza la muestra en una banda estrecha mientras las proteínas migran por el gel concentrador a una diferencia de potencial de 70 voltios; en segundo lugar las proteínas se separan en función de su tamaño a lo largo del gel separador, a una diferencia de potencial de 130 voltios hasta que el frente de migración comenzó a salir del gel. La visualización de las diferentes bandas proteicas se consigue tras un proceso de tinción en tampón con azul Coomassie durante 10 min y varias etapas de destiñido. Finalmente, los geles se documentaron, registraron y analizaron utilizando el equipo GelDoc controlado por el *software* Quantity One 4.6.5.

2.2.2.2. *Western blot*:

La identificación de proteínas específicas que se separaron por electroforesis se llevó a cabo mediante la técnica de *western blot* en dos versiones distintas: a) quimioluminiscente, para los casos que requirieron una alta sensibilidad de detección, y b) colorimétrica, en los demás casos. Tras la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (*Hybond C-Extra* para *western blot* colorimétrico; *Hybond ECL* para *western blot* quimioluminiscente; ambas de GE Healthcare) en el sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) en tampón de transferencia durante 1 hora a 100 V. La eficacia de la transferencia se verificó mediante tinción con Rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich).

En el caso del *western blot* colorimétrico después de 2 lavados con agua miliQ la membrana fue colocada en un *cassette* y montada en el sistema SNAP I.D. (Millipore), siguiendo instrucciones del fabricante. La membrana fue bloqueada con tampón PBST 0,5% leche, para a continuación ser incubada con el anticuerpo correspondiente diluido en el mismo tampón durante 30 min. La membrana fue lavada varias veces con tampón PBST para a continuación ser revelada con tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina (SIGMAFAST DAB; Sigma-Aldrich) o con 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; Promega), deteniendo la reacción con varios lavados de agua miliQ tras el correcto desarrollo de las bandas.

En el caso del *western blot* quimioluminiscente después de 2 lavados con agua miliQ se utilizó el kit *Amersham ECL Advance western blotting Detection Kit* (GE Healthcare), siguiendo instrucciones del fabricante. La membrana fue revelada en films *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) en un revelador Curix-60 (Agfa).

El análisis de todas las imágenes de *western blot* se realizó con el software Quantity One 4.6.5. En ocasiones se llevaron a cabo pequeñas modificaciones de este protocolo, convenientemente indicadas en la sección correspondiente.

2.2.3. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS.

2.2.3.1. Condiciones generales de manipulación.

Todas las líneas celulares humanas, así como las células humanas aisladas de sangre periférica y las líneas celulares murinas fueron manipuladas en condiciones estériles en una campana de flujo laminar modelo BV-100 (Telstar), y mantenidas a 37°C y 5% CO₂ en un incubador Sanyo modelo MCO-20AIC. El material desechable empleado para su manejo (de Beckton Dickinson y/o Corning) fue autoclavado antes de su desecho.

2.2.3.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs).

Los PBMCs se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Para ello 20 mL de sangre total anticoagulada con heparina fueron diluidos con PBS (Gibco) hasta un volumen final de 35 mL. La sangre diluida fue depositada sobre 15 mL de Ficoll-Paque PLUS, y centrifugada a 400 xg 30 min a 20°C sin freno. El plasma fue retirado (o una alícuota conservada a -80°C, según la aplicación posterior) y la

capa leucocitaria recogida y lavada 3 veces con 50 mL de PBS a 300 xg 10 min a 20°C. El pellet resultante fue resuspendido y utilizado en el ensayo correspondiente.

2.2.3.3. Propagación y conservación de líneas celulares.

Las líneas celulares de origen humano (Priess, K562) y de origen murino (P815, BW5147) fueron cultivadas en suspensión en frascos de cultivo (de 25 o 75 cm²) en medio R10 o R10-PB, respectivamente, a densidades variables entre 0,1 y 1x10⁶ células/mL. El medio de cultivo fue renovado cada tres días (dos días en el caso de las células P815 debido a su rápida proliferación).

Las células humanas aisladas de sangre periférica fueron cultivadas en suspensión en placas de 6, 24, 48 o 96 pocillos según el tipo de ensayo, en medio R10 o H10, a una concentración de 1x10⁶ células/mL.

Para la congelación de cualquier tipo celular las células fueron centrifugadas a 300 xg 5 min a 4°C (centrífuga modelo Allegra X-12R, Beckman-Coulter), resuspendidas en 1 mL de medio de congelación frío, dispensadas en un criotubo (Nunc) y congeladas a -80°C. Tras la congelación las células fueron mantenidas en nitrógeno líquido.

Para la descongelación de cualquier tipo celular las células fueron descongeladas por inmersión en un baño de agua a 37°C, y tras la descongelación de aproximadamente el 90% del contenido éste fue añadido a un tubo de 15 mL conteniendo 10 mL del medio de cultivo pre-calentado a 37°C. Tras centrifugar a 200 xg durante 10 min las células fueron resuspendidas en medio y mantenidas en cultivo en el soporte deseado.

2.2.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA EN FASE REVERSA (RP-HPLC):

Para el fraccionamiento de péptidos se utilizó un HPLC *System Gold* de Beckman-Coulter, al cual se conectó una columna *BioBasic-18* (Thermo Scientific) de 150 mm de longitud y un diámetro interno de 2,1 mm. Se completó el equipo con un regulador de presión por retorno de pequeño volumen muerto (5 ul) (Thermo Scientific), con el fin de facilitar la recogida de las fracciones de interés y evitar la dilución y difusión de los componentes tras la separación. Los tampones utilizados fueron 0,05% ácido trifluoroacético (TFA; Merck) en agua en la bomba A y 60% acetonitrilo (ACN; Panreac) con 0,05% TFA en la bomba B, con un flujo de 0,150 mL/min.

Para cada fraccionamiento la separación cromatografica comenzó con la inyección de 50 µl del concentrado de péptidos. Se mantuvo el sistema durante 5 min al 100% de bomba A (0% ACN); a continuación se subió al 66% de bomba B (40% ACN) en 30 min; tras ese período se subió en 5 min a 100% de bomba B (60% ACN). Se mantuvo el sistema a 100% de bomba B durante 10 min, tras los cuales se bajó en 5 min a 0% de bomba B. Se reequilibró la columna 15 min con 100% de bomba A antes de realizar otro fraccionamiento. La fase móvil eluida de la columna se fraccionó manualmente mediante la recogida de alícuotas de dos gotas por fracción, las cuales se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso.

Las fracciones recuperadas de la separación por RP-HPLC y que contenían péptidos fueron concentradas a sequedad en un concentrador centrífugo *SpeedVac* (Savant).

2.2.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

La caracterización de los péptidos fraccionados por RP-HPLC se realizó por espectrofotometría de masas en el servicio de espectrometría de masas del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS).

Las mezclas secas de péptidos fueron disueltas en 4 µL de 0,5% de ácido fórmico (Fluka). Volúmenes iguales (0,5 µL) de péptido y matriz, consistente en 3 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico al 0,3% en acetonitrilo al 60% y suplementado con TFA al 0,1% fueron depositados empleando el método de capa fina en una placa de acero pulido 384 Opti-TOF MALDI (Applied Biosystems). Los datos de espectrometría de masas fueron obtenidos en un *loop* de análisis automatizado empleando un analizador MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems).

Los espectros de MS se adquirieron en modo reflectrón positivo con un láser Nd:YAG de 355 nm de longitud de onda, con una media de 1000 disparos por muestra. En el caso de que los péptidos provinieran de proteínas tripsinizadas se utilizaron como calibración interna al menos tres picos de autólisis de tripsina; para los péptidos de otro origen (purificados de DR4, purificados de A2.1 o generados por digestión por el proteosoma) se empleó una calibración externa, por lo que se cargaron 0,5 µL de *Peptide Calibration Standard II* (Bruker) en las 13 posiciones de calibrado (CAL), disueltos en 50% ACN 0,3% ácido tricloroacético. Este estándar contiene bradiquinina 1-7, angiotensina I, angiotensina II, sustancia P, bombesina, sustrato de renina, ACTH clip 1-17, ACTH clip 18-39 y somatostatina 28.

Todos los espectros de MSMS se llevaron a cabo con una resolución relativa de 300 (FWHM) y supresión metaestable. El análisis automatizado de los datos de masas se realizó con el *software 4000 Series Explorer v3.5*. Los espectros de MS y MS/MS se combinaron con el *software GPS Explorer v3.5* empleando el *software Mascot v2.1* (Matrix Science) para buscar en una base de datos de proteínas no redundante (NCBIInr) o en una base de datos específica para S100 β , con una tolerancia del precursor de 300 ppm, una tolerancia del fragmento de MSMS de 0,35 Da, carbamidometilcisteína como modificación fija, metionina oxidada como modificación variable y permitiendo un solo “salto de corte” (*missed cleavage*). Este programa genera una puntuación que nos da una idea del grado de homología entre el valor de masa/carga (m/z) del pico de interés y alguna proteína presente en las distintas bases de datos: si la puntuación es mayor de 32 existe una homología significativa entre nuestro péptido y la proteína propuesta por Mascot; si la puntuación es mayor de 52 indica identidad u homología extensa. Todos los espectros y los resultados de las bases de datos fueron revisados manualmente en detalle utilizando el *software* descrito previamente.

2.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se han expresado como la mediana (rango intercuartílico) o como la media \pm desviación estándar. Para el análisis estadístico se empleó el *software PASW Statistics 18.0* (IBM) y/o el *software GraphPad InStat* (GraphPad Software Ltd.). Un valor p bilateral menor de 0,05 fue escogido como el nivel de significancia estadística. En todos los casos se llevó a cabo un estudio previo de gaussianidad.

La investigación de diferencias significativas entre los diferentes grupos de variables estudiadas se realizó de la forma que se describe a continuación. En el caso de que la variable dependiente fuera cuantitativa y la independiente cualitativa con los datos agrupados en 2 grupos, si las muestras eran independientes se utilizó el test t de student (para distribuciones gaussianas), o el test U de Mann-Withney (distribuciones no gaussianas). Si las muestras estaban relacionadas empleamos el test t de student relacionado (distribuciones normales) o la prueba de los signos de Wilcoxon (distribuciones no normales). Si la variable independiente era cualitativa y se agrupaba en más de 2 grupos se empleó el test de Kruskal-Wallis con el test *post-hoc* de Dunn, ya que los datos a analizar no seguían una distribución normal, lo que impedía utilizar el análisis de varianza (ANOVA).

Cuando ambas variables eran cualitativas, y ya que en nuestro caso provenían de muestras independientes se empleó el test de chi-cuadrado (tablas de contingencia) y/o el estadístico exacto de Fisher.

Los estudios de correlación y de evaluación del grado de asociación entre variables se evaluaron sobre el cálculo de los coeficientes de correlación de Pearson para el caso de variables con una distribución gaussiana, o bien con el coeficiente R de Spearman en el caso contrario.

2.2. Métodos específicos.

2.3.1. CLONAJE, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE AUTOANTÍGENOS.

2.3.1.1. Glucosa-6-fosfatasa específica de los islotes de Langerhans (IGRP).

El material de partida para clonar la IGRP fue un ADN complementario comercializado por Ambion (*PCR-Ready Human Pancreas cDNA*). Este ADN se amplificó con alta fidelidad de copia utilizando los cebadores IGRP-F e IGRP-R ($T_h=55^\circ\text{C}$). El producto obtenido se purificó en un gel de agarosa y se clonó en el vector pCR2.1-TOPO siguiendo las instrucciones del fabricante. La identidad de la construcción fue confirmada por secuenciación.

A continuación se intentó su subclonaje en diferentes vectores de expresión bacterianos (pMAL y pCR T7/NT-TOPO). Se intentó asimismo la expresión en células de insecto mediante el sistema de expresión baculoviral BEVS (Invitrogen), así como su expresión en levaduras *Sacharomyces cerevisiae* BJ3505 y la síntesis *in vitro* con dos sistemas distintos (*RTS 100 E-coli HY Kit* – Roche-; *TnT Coupled Reticulocyte Lysate System* – Promega-). Todos los intentos resultaron infructuosos, posiblemente debido a un efecto tóxico de la proteína. Finalmente, se clonó la pauta de lectura abierta para IGRP en el vector de expresión pBAD/Thio-TOPO, ya que así se limita la producción basal, anulando el efecto tóxico de la proteína que observábamos durante el proceso de clonación en otros vectores de expresión bacterianos.

El clonaje de IGRP en pBAD/Thio-TOPO se realizó por PCR con la polimerasa *Pfu* tomando como molde la construcción IGRP/pCR 2.1-TOPO; los cebadores utilizados fueron IGRP2-F e IGRP2-R ($T_h=55^\circ\text{C}$). El producto de PCR fue purificado y ligado al vector pBAD/Thio-TOPO siguiendo instrucciones del fabricante. La identidad de la construcción fue

confirmada por secuenciación. La proteína de fusión contiene a la tiorredoxina en el extremo amino-terminal y dos colas (epitopo V5 y cola de 6 histidinas) en el extremo carboxi-terminal.

Para la expresión de IGRP, se emplearon bacterias C43 (DE3), ya que contienen membranas internas que permiten la expresión de proteínas transmembrana y son resistentes a la mayoría de proteínas que resultan tóxicas para otras cepas bacterianas. La Figura 5 muestra imágenes de microscopía electrónica de esta cepa bacteriana, tomadas de Arechaga y cols. (2000).

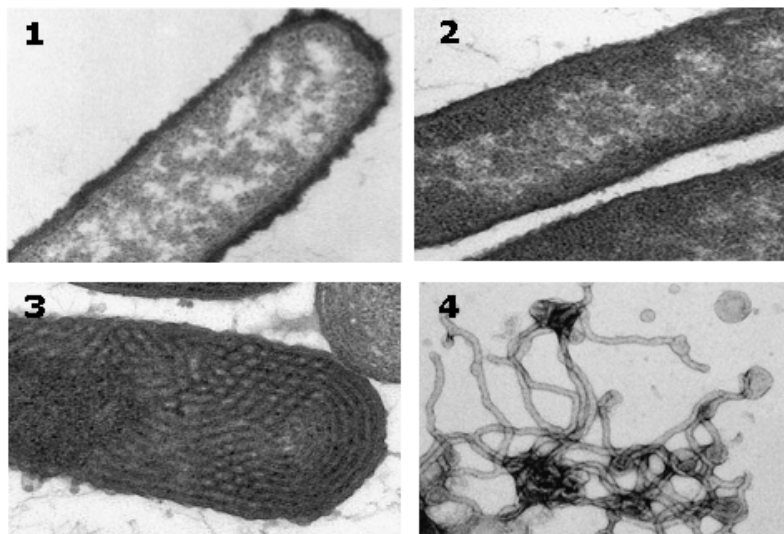


Figura 5. Cepa bacteriana C43 (DE3). Fotografías por microscopía electrónica de bacterias C43 (DE3). **1.** Bacterias sin transformar. **2.** Bacterias transformadas con el plásmido pMW172. **3.** Bacterias transformadas con el plásmido pMW172 conteniendo el gen para la subunidad b de la $F_1 F_0$ ATP sintetasa de *E.coli*. Se observan las membranas internas, que están ausentes en **1** y **2**. **4.** Membranas de C43 (DE3) obtenidas tras la lisis bacteriana conteniendo la proteína recombinante. Imágenes tomadas de Arechaga y cols. (2000).

Bacterias C43 (DE3) fueron transformadas con la construcción IGRP-pBAD/Thio-TOPO y sembradas en placas de medio LB suplementado con glucosa (1 g/L) y ampicilina (100 μ g/mL). 20 mL de medio LB suplementados fueron inoculados con una colonia individual e incubados 16 horas a 37°C con agitación, periodo tras el cual este precultivo fue inoculado en 2 L de LB suplementados (dilución 1:100). La densidad óptica a 600 nm fue monitorizada hasta que alcanzó un valor de 0,8 y se indujo la producción de IGRP añadiendo L-arabinosa a una concentración final del 0,12% durante 4 horas. Después de la inducción, el cultivo fue centrifugado a 10.000 xg durante 20 min a temperatura ambiente, y el pellet seco conservado a -20°C hasta el momento de la purificación.

Para la obtención de microsomas, los pellets bacterianos se descongelaron a 30°C y se resuspendieron en 20 mL de tampón R2 (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoetanol y 1 mg/mL lisozima –Fluka-). Se incubaron 1 hora a 30°C, con agitación ocasional, y a continuación se pasaron 10 veces las bacterias a través de una aguja (20G) para facilitar el lisado. El extracto se centrifuga a 15.000 xg 10 min a temperatura ambiente, se descarta el pellet y el sobrenadante conteniendo las membranas se ultracentrifuga a 150.000 xg 1 hora a 4°C. El pellet obtenido (microsomas) se resuspende en 5 mL de tampón R3 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 140 mM NaCl) conteniendo 1% del detergente fos-colina 12 (FC12; Anatrace). Para facilitar la resuspensión, los microsomas son homogenizados en un homogenizador Douncer manual (50 veces) antes de ser ultracentrifugados a 200.000 xg 45 min a 4°C.

La proteína IGRP solubilizada fue purificada empleando una resina de agarosa unida a anticuerpos anti-V5 (Sigma-Aldrich). La resina, lavada previamente con PBS, fue incubada con el sobrenadante conteniendo IGRP durante 90 min a temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó la resina (100 xg 30 seg), se retiró el sobrenadante y se lavó 1 vez con PBS. Las proteínas retenidas fueron eluidas de la resina empleando ácido acético (20 mM, pH 3,3). El pH de la fracción eluida se neutralizó con Tris-HCl (100 mM, pH 8,0).

La verificación de la producción de IGRP fue llevada a cabo mediante SDS-PAGE (12,5%) y *western blot* colorimétrico con un anticuerpo monoclonal anti-V5 conjugado a la peroxidasa de rábano –HRP- (dilución 1:5000; Invitrogen), revelado con DAB.

2.3.1.2. Proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP).

El ADN complementario para la GFAP humana fue obtenido de Geneservice Ltd (número de acceso BC041765), amplificado mediante PCR con los cebadores GFAP-F y GFAP-R ($T_h=60^\circ\text{C}$), y subclonado en el vector pCR T7/NT-TOPO, siguiendo instrucciones del fabricante. La identidad de los clones recombinantes fue confirmada por secuenciación.

A continuación se subclonó la secuencia de GFAP en el vector pMAL-c2X, respetando la pauta de lectura de la proteína de unión a maltosa (MBP), obteniéndose la proteína recombinante MBP-GFAP. Para ello se llevó a cabo una PCR de la construcción GFAP-pCR T7/NT-TOPO con los cebadores GFAP2-F y GFAP2-R ($T_h=65^\circ\text{C}$). El producto de PCR y el plásmido pMAL-c2X fueron cortados con *BamHI* (Promega), purificados de un gel de agarosa y cuantificados. A continuación se llevó a cabo la ligación y la transformación tal y como se ha descrito con anterioridad.

Bacterias BL21 (DE3) pLysS fueron transformadas con la construcción GFAP-pCR T7/NT-TOPO o con GFAP-pMAL-c2X y sembradas en placas de medio LB suplementado con glucosa (1 g/L), ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (27 µg/mL). 20 mL de medio LB suplementados fueron inoculados con una colonia individual e incubados 16 horas a 37°C con agitación. Este precultivo fue inoculado a una dilución 1:100 en medio LB suplementado. Su densidad óptica a 600 nm fue monitorizada hasta que alcanzó un valor de 0,6 y la producción de la proteína recombinante correspondiente fue inducida por la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0,5 mM, durante 5 horas. El cultivo fue centrifugado a 10.000 xg durante 20 min a temperatura ambiente y el pellet seco fue conservado a -20°C hasta el momento de la purificación.

Los pellets celulares fueron resuspendidos en tampón de lisis (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8,0 para GFAP o 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 para MBP-GFAP) con inhibidores de proteasas libres de EDTA (Sigma-Aldrich) y descongelados en agua templada. Tras la descongelación las células fueron lisadas mediante dos pases por un homogeneizador *French Press* (Avestin C5), centrifugadas a 9000 xg 20 min y la fracción soluble empleada en la purificación. Todos los pasos indicados a continuación tuvieron lugar a 4°C.

La purificación de GFAP se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel (*Ni-NTA agarose*; QIAGEN) en condiciones desnaturizantes, siguiendo indicaciones del fabricante. Brevemente, el extracto crudo fue combinado con la resina e incubado 1 hora con agitación, tras lo cual la resina fue empaquetada en una columna. Se efectuaron dos lavados de la resina con 4 volúmenes de un tampón conteniendo 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6,3, y la proteína fue eluída en primer lugar con 2 volúmenes del mismo tampón a pH 5,9 y a continuación con otros 2 volúmenes a pH 4,5. Se combinaron las fracciones conteniendo GFAP, se cuantificaron y almacenaron en tampón conteniendo 8 M urea a -20°C hasta su uso en experimentos de ELISA y *western blot*.

La purificación de la proteína soluble MBP-GFAP se llevó a cabo en condiciones no desnaturizantes utilizando una resina de amilosa (New England Biolabs), siguiendo indicaciones del fabricante. Brevemente, el extracto crudo fue combinado con la resina e incubado 1 hora con agitación, tras lo que la resina fue empaquetada en una columna. Tras lavar 2 veces con el tampón de lisis la proteína fue eluída por adición de tampón conteniendo 10 mM de maltosa (New England Biolabs). Las fracciones eluídas conteniendo MBP-GFAP

fueron combinadas, cuantificadas y almacenadas a -20°C hasta su uso en experimentos de ELISA y *western blot*.

La identidad de las proteínas purificadas fue confirmada por SDS-PAGE (12,5%) y *western blot* colorimétrico con un anticuerpo monoclonal anti-GFAP (dilución 1:1500; Abcam) en combinación con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP (dilución 1:4000; Sigma-Aldrich) y/o un anticuerpo anti-MBP conjugado a HRP (dilución 1:3000; New England Biolabs).

Como control, la proteína MBP fue también expresada y purificada siguiendo el mismo protocolo empleado para la proteína recombinante MBP-GFAP, y su identidad confirmada por *western blot* colorimétrico con el anticuerpo anti-MBP conjugado a HRP (dilución 1:3000).

2.3.1.3. S100 β .

El ADN complementario para la S100 β humana fue obtenido de Geneservice Ltd (número de acceso BE276927) y subclonado en el vector pCR T7/NT-TOPO siguiendo instrucciones del fabricante. El ADN complementario fue clonado de tal modo que la proteína expresada fuera una proteína recombinante que posea la secuencia de biotinización *in vitro* GGGLNDIFEAQKIEWHE (de aquí en adelante *biotag*) en posición carboxi-terminal. El clonaje en pCR T7/NT-TOPO añade además 6 histidinas y el epitopo Xpress en el extremo amino-terminal.

Para ello añadimos la secuencia del *biotag* a la secuencia codificante (CDS) de S100 β mediante 2 reacciones de PCR. En la primera reacción los cebadores utilizados fueron S100B-F y Biotag1 ($T_h=57^{\circ}\text{C}$). El cebador reverso está diseñado de tal modo que añade la mitad de la secuencia del *biotag* al extremo 3' del CDS de S100 β . Este producto de PCR fue purificado de un gel de agarosa y a continuación fue utilizado como molde en una segunda reacción de PCR. Para esta reacción se utilizó el mismo cebador directo y el cebador reverso Biotag2 ($T_h=57^{\circ}\text{C}$), que añade los nucleótidos necesarios al extremo 3' del CDS de S100 β para completar la secuencia del *biotag*. A continuación este producto de PCR fue purificado de gel de agarosa y se ligó al vector pCR T7/NT-TOPO, siguiendo instrucciones del fabricante. La identidad de la construcción fue confirmada por secuenciación.

Bacterias BL21 (DE3) pLysS fueron transformadas con la construcción S100 β -pCR T7/NT-TOPO y cultivadas para expresar S100 β tal y como se ha descrito para GFAP y MBP-

GFAP. El pellet bacteriano fue descongelado en hielo y resuspendido en 40 mL de tampón 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7,0. Se añadieron 300 µL de inhibidores de proteasas y se lisaron las células por 3 pases a través de un homogeneizador *French Press*. El lisado así obtenido fue clarificado por centrifugación a 10.000 xg 30 min a 4°C.

La purificación de S100β se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de níquel (*Ni-NTA agarose*) en condiciones nativas siguiendo indicaciones del fabricante. Brevemente, el extracto bacteriano fue mezclado con la cantidad apropiada de resina e incubado con agitación durante 1 hora a 4°C. Tras 2 lavados con 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol (Fluka), pH 8,0, la resina conteniendo S100β fue empaquetada en una columna y lavada una vez más. Tras los lavados, la proteína S100β fue eluida con 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8,0. Las fracciones conteniendo S100β se combinaron, cuantificaron y se almacenaron a -80°C. La identidad de la proteína purificada fue confirmada por SDS-PAGE (14%) y *western blot* colorimétrico con anticuerpos anti-histidinas (dilución 1:2000; Sigma-Aldrich) y un anticuerpo monoclonal anti-S100β (dilución 1:10000; Abcam) combinado con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a HRP (dilución 1:5000).

A continuación la proteína S100β fue biotinilada *in vitro* con la enzima *BirA* producida y purificada en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo del profesor Tom Schumacher (*The Netherlands Cancer Institute*, Holanda. <http://research.nki.nl/schumacherlab/Schumacher.htm>). La enzima *BirA* purificada fue finalmente conservada en 50 mM de imidazol, 50 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol y 50% de glicerol a -20°C hasta su utilización. Para las reacciones de biotinilación un volumen de S100β fue mezclado con 1 volumen de solución de biotinilación e incubado toda la noche con agitación a temperatura ambiente. La solución de biotinilación estaba compuesta por 0,04 volúmenes de 5 mM biotina (Sigma-Aldrich) en 0,1 M tampón fosfato pH 7,5, 0,2 volúmenes de ATP a 55 mg/mL (Sigma-Aldrich), 0,01 volúmenes de la enzima *BirA* a 350 µg/mL, 0,2 volúmenes de tampón de ligación 10x (1,5 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,5M Tris pH 7,5), 0,08 volúmenes de inhibidores de proteasas y 0,47 volúmenes de H₂O libre de RNasas/DNasas. A continuación la reacción de biotinilación fue dializada durante toda la noche a 4°C contra 2 L de tampón fosfato 0,1 M pH 7,6.

La proteína S100β biotinilada fue purificada por cromatografía de afinidad empleando la resina *SoftLink* (*SoftLink Soft Release Avidin Resin*, Promega), la cual posee sitios de unión para biotina. La resina fue pre-equilibrada en tampón fosfato 0,1 M pH 7,6 e incubada 1 hora

con agitación junto con la mezcla conteniendo S100 β biotinilada. A continuación se efectuó un lavado con 20 mL de tampón fosfato por centrifugación, y la resina fue resuspendida en 10 mL de tampón y empaquetada en una columna. La proteína S100 β fue eluída con tampón fosfato conteniendo 5 mM de D-biotina.

La identidad de S100 β fue comprobada por SDS-PAGE (14%) y *western blot* colorimétrico con estreptavidina conjugada a HRP (dilución 1:500; Sigma-Aldrich) y el anticuerpo monoclonal anti-S100 β empleado anteriormente. La proteína fue alicuoteada y conservada a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.3.2. DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS CONTRA GFAP Y S100B EN PACIENTES CON DIABETES TIPO 1.

2.3.2.1. Diseño de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y *western blot* para la detección de autoanticuerpos contra GFAP.

Para determinar las concentraciones óptimas de cada uno de los componentes del ELISA, éstos fueron titulados siguiendo el esquema descrito en Crowther y cols. (2009). Placas de 96 pocillos (Maxisorp F96, NUNC) fueron tapizadas con 5 μ g/mL de GFAP durante toda la noche a 4°C. Tras 5 lavados con PBST en un lavador automático *Wellwasher* (Thermo Scientific, modelo 4Mk2), los pocillos fueron bloqueados con PBST 3% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras los lavados los plasmas fueron diluidos 1:256 en PBST, añadidos por triplicado a la placa, e incubados 2 horas a temperatura ambiente. En cada placa se incluyó un plasma positivo para GFAP y otro negativo, con el objetivo de determinar un índice de positividad (ver más abajo). Tras la incubación y el lavado se añadió un anticuerpo biotinilado de ratón contra la IgG humana (dilución 1:1000; Abcam) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de lavar de nuevo la placa se añadió estreptavidina-HRP (dilución 1:500), incubando a continuación durante 45 min a temperatura ambiente. La placa fue lavada 7 veces y se añadió el sustrato ortofenilendiamina (SigmaFast OPD, Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo por adición de HCl 1 M, y la absorbancia a 490 nm fue cuantificada en un lector de ELISA de BioRad modelo 680 con el software *Microplate Manager 5.2*. La señal específica anti-GFAP fue calculada utilizando el siguiente índice:

$$\text{Índice} = \frac{(\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia estándar negativo})}{(\text{Absorbancia estándar positivo} - \text{Absorbancia estándar negativo})} \times 100$$

Para analizar las diferencias en las frecuencias de sujetos positivos para anti-GFAP se excluyeron del análisis todas aquellas muestras con niveles de autoanticuerpos por debajo del límite de detección del ELISA. El valor de corte para determinar la positividad fue establecido en el percentil 99° de los controles sanos.

Para el *western blot* colorimétrico se llevó a cabo un gel de SDS-PAGE de las proteínas GFAP o MBP y MBP-GFAP (éstas últimas cargadas conjuntamente en el mismo pocillo), cargando 1 µg/pocillo; tras la transferencia las secciones correspondientes a cada pocillo fueron recortadas e incubadas por separado en placas de 24 pocillos. Las membranas fueron bloqueadas 1 hora con 1 mL de PBST 3% BSA, y tras 2 lavados de 10 min con PBST fueron añadidos los plasmas diluidos 1:100 en PBST 1% BSA, tanto de sujetos GFAP-positivos como GFAP-negativos, incubando 1 hora. Tras dos nuevos lavados se añadió como anticuerpo secundario un anticuerpo policlonal biotinilado de cabra contra la IgG humana durante 1 hora (dilución 1:100 en PBST 1% BSA; Southern Biotech), para a continuación lavar e incubar con estreptavidina-HRP (dilución 1:500 en PBST 1% BSA) 30 min. Tras dos últimos lavados las membranas fueron reveladas con DAB. Para verificar la especificidad de la reacción en el *western blot*, 5 µg/mL de MBP-GFAP fueron añadidos a los plasmas diluidos e incubados 1 hora antes de añadirlos a las membranas, para bloquear la posible presencia en plasma de anticuerpos anti-GFAP o anti-MBP.

2.3.2.2. Detección *ex vivo* de autoanticuerpos anti-GFAP por inmunofluorescencia.

Los animales empleados en esta sección fueron ratas macho Sprague-Dawley. Esta serie de experimentos fue llevada a cabo en el Departamento de Biología Celular y Ecología de la USC. Secciones de córtex cerebral de 40 µm de grosor fueron fijadas en paraformaldehído, y la peroxidasa endógena bloqueada. A continuación se incubaron toda la noche con plasma humano o con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la GFAP humana, ambos diluidos 1:2000) en tampón salino (0,05 M Tris pH 7,4; TBS) conteniendo 0,2% de Triton X-100 (Analema) y 15% de suero de cabra (Sigma-Aldrich). Las secciones se lavaron con TBS y se incubaron durante 1 hora con un anticuerpo de cabra contra la IgG humana conjugado con Alexafluor 488 (Fluoroprobes) o un anticuerpo de cabra contra la IgG murina conjugado con Alexafluor 546 (Invitrogen), ambos diluidos 1:50 en TBS conteniendo Triton X-100 y suero

de cabra. Tras lavar con agua destilada las secciones fueron montadas con el medio de montaje Vectashield (Vector) y visualizadas en un microscopio confocal (Leica TCS-SP2).

2.3.2.3. Diseño de ELISA y *western blot* para la detección de autoanticuerpos contra S100β.

Para determinar las concentraciones óptimas de cada uno de los componentes del ELISA, éstos fueron titulados siguiendo el esquema descrito por Crowther y cols. Para el desarrollo del ELISA una placa de 96 pocillos fue tapizada con 50 µL/pocillo de S100β a 10 µg/mL en PBS e incubada toda la noche a 4°C. Tras 5 lavados con 350 µL/pocillo de PBST cada pocillo fue bloqueado con 100 µL de PBST 3% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de repetir los lavados los plasmas en estudio fueron diluidos 1:20 en PBST, tanto sin prebloquear como con prebloqueo desde el día anterior con 30 µg/mL de S100β, con el fin de detectar la inespecificidad de señal para cada muestra, y fueron añadidos a la placa, a razón de 50 µL/pocillo. Se preparó además una curva estándar con un anticuerpo monoclonal generado en ratón contra la S100β humana (clon SH-B1, Abcam) usando diluciones seriadas (87 µg/dL a 5,4 µg/dL).

Tras incubar 2 horas a temperatura ambiente, la placa fue lavada 5 veces y los anticuerpos secundarios fueron añadidos (50 µL/pocillo): para los plasmas se utilizó un anticuerpo policlonal producido en conejo contra la fracción constante de la IgG humana conjugado a HRP (Abcam) diluido a 0,2 µg/mL en PBST. Para la curva estándar se utilizó un anticuerpo policlonal contra la IgG completa de ratón conjugado a HRP (Sigma-Aldrich), diluido 1:20.000 en PBST. Se añadieron 50 µL/pocillo de cada anticuerpo secundario a los pocillos correspondientes y se incubó 1 hora a temperatura ambiente.

El exceso de anticuerpo secundario fue eliminado con 5 lavados con PBST y se añadieron 50 µL/pocillo de estreptavidina-HRP diluida en PBST a 4,4 µg/mL. Tras incubar 30 min a temperatura ambiente la placa fue lavada 7 veces y 50 µL del sustrato OPD fueron añadidos a cada pocillo. Se dejó desarrollar el color durante 30 min y la reacción fue detenida mediante la adición de 50 µL/pocillo de HCl 1M. La intensidad de color fue leída a 490 nm.

La señal específica anti-S100β fue obtenida restando a la absorbancia observada en los pocillos con plasma sin bloquear la señal obtenida en los pocillos prebloqueados con S100β, y

esa absorbancia específica fue comparada con las absorbancias obtenidas en la curva estándar, para trasladar el valor a $\mu\text{g/dL}$ de unidades equivalentes de monoclonal.

Para el *western blot* colorimétrico de plasmas de sujetos control y pacientes con diabetes tipo 1 se cargó 1 μg de S100 β en cada pocillo de un gel de poliacrilamida al 14%. Todos los procedimientos posteriores fueron los mismos que los llevados a cabo para el *western blot* para GFAP (sección 2.3.2.1.). Como controles positivos se utilizaron como anticuerpos primarios un anticuerpo monoclonal de ratón contra la S100 β humana (dilución 1:5000), un anticuerpo policlonal de conejo contra la S100 β humana (dilución 1:1000; Abcam), un anticuerpo anti-histidinas conjugado a HRP (dilución 1:2000) y estreptavidina-HRP (dilución 1:500). Los anticuerpos secundarios empleados, todos ellos conjugados a HRP, fueron los siguientes: para las membranas incubadas con plasma se empleó un anticuerpo contra IgGs humanas (empleado anteriormente en el ELISA; dilución 1:5000); para las incubadas con anticuerpo monoclonal anti-S100 β se usó un anticuerpo contra la IgG de ratón (dilución 1:5000); para las incubadas con anticuerpo policlonal anti-S100 β se usó un anticuerpo contra IgGs de conejo (Abcam; dilución 1:3000).

Los resultados del *western blot* mostraron que ciertos plasmas reconocían no sólo a S100 β (banda de mayor peso molecular) sino también a otra banda de menor peso molecular, reconocida también por el anticuerpo policlonal anti-S100 β y la estreptavidina-HRP. Para comprobar si la banda de menor peso molecular observada en los *western blot* (ver Capítulo 4) era S100 β tanto la porción de gel conteniendo la banda mayor como la menor fueron extraídas de un gel de poliacrilamida al 14% y enviadas al servicio de espectrometría de masas del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela. Allí las piezas de gel fueron lavadas tres veces con tampón AmBic (50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ en 50% de metanol – grado HPLC, Scharlau-) y reducidas con 10 mM ditiotretitol. A continuación las piezas fueron lavadas dos veces con tampón AmBic y secadas en un concentrador centrífugo antes de alquilarlas con 55 mM de yodoacetamida en 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. De nuevo las piezas fueron lavadas dos veces con tampón AmBic, para ser entonces deshidratadas mediante la adición de acetonitrilo (Scharlau) y secadas en un concentrador centrífugo. A los geles secos se les añadió tripsina porcina modificada (Promega) a una concentración final de 20 ng/ μL en 20 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, y se incubó 16 horas a 37°C. Los péptidos fueron extraídos 3 veces mediante una incubación de 20 min en 60% de acetonitrilo con 0,5% de ácido fórmico. Los extractos peptídicos resultantes fueron mezclados, secados en el concentrador centrífugo y almacenados a -20°C hasta su posterior análisis por espectrometría de masas.

2.3.3. PÉPTIDOS DERIVADOS DE S100 β PROCESADOS Y PRESENTADOS DE MANERA NATURAL POR MHC DE CLASE II.

2.3.3.1. Puesta a punto del sistema de presentación de antígeno (SPA).

El SPA está basado en la incubación secuencial de las células Priess con una lectina biotinilada (la cual se une a glicoproteínas de superficie con dominios Ig), a continuación con avidina y finalmente con S100 β biotinilada, con el objeto de que el complejo lectina/avidina/S100 β biotinilada sea internalizado, procesado y presentado por MHC de clase II.

Durante todo el proceso de alimentación las células Priess son mantenidas en frío. Tras dos lavados con tampón salino de Hank (HBSS, de Gibco) mediante centrifugación a 370 xg durante 10 min a 4°C las células son resuspendidas en HBSS a 10⁸ células/mL, y se incuban con la cantidad apropiada de lectina durante 30 min en hielo, agitando cada 10 min. Tras esta incubación las células son lavadas nuevamente, resuspendidas a 10⁸ células/mL e incubadas con avidina a la concentración óptima durante 30 min en hielo (agitación cada 10 min). Las células se lavan 2 veces, se resuspenden a 10⁸ células/mL y se incuban con la cantidad apropiada de S100 β biotinilada 30 min en hielo con agitación cada 10 min. Las células se lavan nuevamente y se resuspenden en medio R10 a 5x10⁶ células/mL, para a continuación ser incubadas durante 2 horas en un frasco de agitación a 37°C y 5% CO₂. Tras ese tiempo las células son recogidas y centrifugadas a 770 xg 10 min a 4°C. El pellet es congelado en nitrógeno líquido y a continuación almacenado a -80°C hasta la preparación del extracto celular.

La lectina utilizada fue el mitógeno de la hierba carmín (*pokeweed mitogen*, PWM; Sigma-Aldrich), que fue biotinilada con el éster de biotina (brazo largo)-N-hidroxisuccinimida (*Biotin (long arm) NHS*; Vector Laboratories), siguiendo instrucciones del fabricante. Finalmente la lectina fue dializada contra 2 L de PBS para eliminar la biotina libre sobrante de la reacción. La lectina biotinilada fue denominada b-PWM. Para comprobar que la biotinilización había tenido lugar con éxito se llevó a cabo un SDS-PAGE (14%) y *western blot* con estreptavidina-HRP (dilución 1:500). Para determinar la cantidad óptima de b-PWM para el SPA, 10⁷ células fueron incubadas con cantidades crecientes de b-PWM (0, 1, 2, 6, 10 o 20 μ L) durante 30 min en hielo. A continuación las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, resuspendidas en 100 μ L de PBS e incubadas con 5 μ L de un conjugado de avidina con R-ficoeritina (RPE-Extravidin, Sigma-Aldrich) durante 30 min en hielo. Las células fueron

lavadas 2 veces con PBS frío y fijadas con 300 μL de PBS conteniendo 0,5% paraformaldehído. Tras lavarlas fueron resuspendidas en PBS y analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). La cantidad óptima resultó ser de 6 $\mu\text{L}/10^7$ células.

Para determinar la concentración óptima de avidina 10^7 células fueron incubadas con 6 μL de b-PWM durante 30 min en hielo, y tras dos lavados con PBS frío se incubaron con concentraciones crecientes de avidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína –FITC– (0, 0,25, 0,5, 0,75 o 1 mg/mL; Sigma-Aldrich). Las células fueron lavadas, fijadas con PBS conteniendo 0,5% paraformaldehído y analizadas por citometría. La concentración óptima resultó ser de 0,25 mg/mL.

Finalmente para determinar la cantidad óptima de S100 β biotinilada unimos FITC a la S100 β biotinilada para que la proteína S100 β biotinilada/FITC pudiera ser detectada por citometría. Así pues, 5 mL de S100 β biotinilada (a 0,5 mg/mL) fueron concentrados en un Centricon con un punto de corte de 5 kDa (Millipore) por centrifugación a 2900 xg 20 min a temperatura ambiente, hasta concentrar a un volumen final de 750 μL . Se añadieron 100 μL de PBS y se pasó la proteína por una columna PD Miditrap G25 (GE Healthcare) equilibrada con tampón carbonato pH 8,0. Al eluido se le añadieron 35 μL de FITC a 4 mg/mL (Sigma-Aldrich), y se incubó la mezcla 90 min a 4°C en oscuridad. La mezcla de S100 β biotinilada/FITC y FITC libre fue pasada por una nueva columna G25 y la fracción eluida, conteniendo S100 β biotinilada/FITC, fue cuantificada y conservada a -20°C hasta su utilización. Para la titulación 10^7 células fueron incubadas sólo con 10 μg de S100 β biotinilada, o con el SPA completo (6 μL b-PWM y 0,25 mg/mL avidina) y cantidades crecientes de S100 β biotinilada (0, 1, 2, 5, 10 y 20 μg). Tras incubar según se ha descrito previamente las células fueron lavadas, fijadas y analizadas en el citómetro. La cantidad óptima resultó ser de 5 $\mu\text{g}/10^7$ células. Para cada nuevo lote de S100 β biotinilada se llevó a cabo esta titulación.

2.3.3.2. Crecimiento de células Priess con el SPA.

Las células Priess fueron cultivadas en medio completo en Hyperflasks (Corning). Estos frascos de cultivo con las mismas dimensiones que los T175 tradicionales constan de 10 capas permeables que permiten el intercambio de gases, de tal modo que se pueden llenar por completo sin necesidad de dejar aire en su interior. En nuestro caso demostraron ser el soporte óptimo para crecer grandes cantidades de estas células. Así, células Priess fueron cultivadas a una concentración máxima de 1×10^6 células/mL, y a continuación recogidas,

lavadas, y tratadas con el SPA tal y como se ha descrito anteriormente. $1,2 \times 10^{10}$ células fueron alimentadas sólo con el SPA, y $1,1 \times 10^{10}$ células fueron alimentadas con el SPA y S100 β biotinilada.

2.3.3.3. Preparación de la columna de afinidad anti-DR/Proteína A.

Con el fin de purificar las moléculas DR4 de las células Priess alimentadas sólo con el SPA o con el SPA conteniendo S100 β biotinilada preparamos una columna anti-DR/proteína A, para a continuación obtener un extracto de membranas de Priess e inmunopurificar las moléculas DR4 a través de la columna.

El anticuerpo anti-DR se obtuvo mediante cultivo del hibridoma HB-55 (clon L243, *American Type Culture Collection –ATCC-*) en medio sin suero (*BD Cell Mab medium serum free*; Becton-Dickinson) en un frasco de doble compartimento (*CELLine CL1000 Flask*; Becton-Dickinson), siguiendo instrucciones del fabricante. El medio de cultivo conteniendo el anticuerpo fue recolectado en 3 semanas consecutivas, y conservado a -20°C hasta su utilización. El anticuerpo anti-DR fue cuantificado mediante electroforesis en gel de agarosa con el kit *SAS-MX Serum Protein* (Helena Biosciences Europe), dializado contra 2 L de tampón 0,05 M borato pH 8,0 y conservado a -20°C hasta su utilización.

A continuación pasamos a preparar la columna anti-DR/proteína A. Para ello 15 mL de una resina unida covalentemente a proteína A purificada (*Affi-Prep Protein A Support*; BioRad) fueron cargados en una columna vacía de 15 cm de largo y 1,5 cm de diámetro interno (BioRad). La resina fue equilibrada con 150 mL de tampón de carga de proteína A (0,05 M tampón borato pH 8,0), para a continuación hacer pasar el anticuerpo (a una concentración de 1-10 mg/mL) a través de la resina. El anticuerpo se pasó 2 veces por la columna para asegurar que todo el anticuerpo quedaba unido a la proteína A.

La resina fue lavada con 300 mL de tampón de carga de proteína A, hasta que la absorbancia a 280 nm fue prácticamente igual a 0. La resina fue entonces acondicionada con 200 mL de 0,2 M trietanolamina pH 8,2 preparada justo antes de su utilización y mantenida a temperatura ambiente. Para unir covalentemente la fracción constante del anticuerpo a la proteína A se hicieron pasar 80 mL de solución de dimetil-pimelimidato (40 mM dimetil-pimelimidato-2HCl -Fluka- en 0,2 M trietanolamina pH 8,3). A continuación la columna se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 hora, para permitir la unión del anticuerpo y la proteína A. Para terminar la reacción, la columna fue lavada consecutivamente con 100 mL de tampón 0,2 M Tris-HCl pH 8,0 frío, 100 mL de 0,1 M tampón borato pH 8,0 frío, y con 100

mL de 0,1 M tampón borato con 0,05% de azida sódica. La columna fue conservada a 4°C hasta su utilización. Se prepararon dos columnas, una para la inmunopurificación de DR4 de células Priess tratadas solamente con el SPA, y otra para las tratadas con el SPA y S100 β biotinilada.

La Figura 6 muestra que este proceso de unión del anticuerpo anti-DR a la proteína A tuvo lugar con éxito. En la calle 1 se muestra el medio de cultivo obtenido del hibridoma HB-55, en el que se distinguen varias bandas correspondientes al anticuerpo desnaturalizado (tamaños aproximados de 25 y 50 kDa; flechas), así como la albúmina fetal bovina añadida al medio de cultivo (banda de 66 kDa). Tras pasar el anticuerpo por la columna se recoge la fracción no unida (calle 2), que contiene solamente la albúmina, de lo que se deduce que el anticuerpo sí se ha unido a la proteína A. Finalmente la calle 3 muestra la resina lista para su uso, en la que se observan las bandas correspondientes al anticuerpo desnaturalizado (flechas).

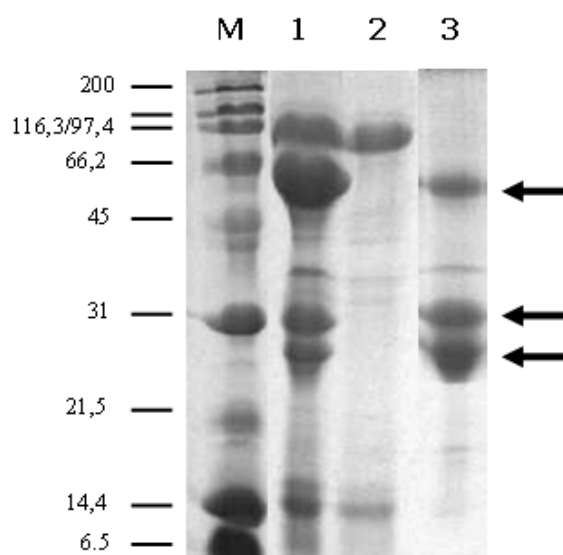


Figura 6. Preparación de la columna anti-DR/proteína A. Análisis SDS-PAGE (14%) de diversas etapas de la elaboración de la columna de afinidad anti-DR4. Calle M: marcador de peso molecular (valores en kDa). 1. Medio de cultivo del hibridoma HB-55 conteniendo anti-DR (50 y 25 kDa; flechas). 2. Medio de cultivo del hibridoma HB-55 tras pasar por la resina de proteína A, y que sólo contiene principalmente albúmina bovina (66 kDa). 3. Resina anti-DR/proteína A lista para su uso, en la que se observa la presencia del anticuerpo anti-DR (flechas). La resina fue resuspendida en tampón de carga de SDS-PAGE 1x, hervida a 98°C 5 minutos y centrifugada. El sobrenadante resultante fue el analizado por electroforesis.

2.3.3.4. Inmunopurificación de DR4 de extractos de células Priess. Fraccionamiento por cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (RP-HPLC).

Para la identificación de péptidos procesados y presentados de forma natural derivados de S100 β , se aislaron membranas celulares de células Priess alimentadas con el SPA y se solubilizaron para obtener un extracto enriquecido en DR4. Para ello, a los sedimentos celulares congelados se les añadió tampón de resuspensión 2x (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo –PMSF- (Fluka)), y se descongelaron rápidamente en agua a temperatura ambiente, para a continuación añadir agua miliQ fría de tal modo que las células queden a $1,25 \times 10^8$ células/mL. Se combinaron todos los pellets descongelados y resuspendidos y se homogeneizaron mediante 10 pases en un homogeneizador Douncer manual de vidrio.

A continuación se agitaron las muestras en un agitador orbital durante 30 min a 4°C, tras la cual el lisado fue centrifugado a 4000 xg 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue recuperado, y el pellet fue resuspendido en 50 mL de tampón de resuspensión 1x, lisado y centrifugado nuevamente. Todo este proceso se repitió 3 veces. Todos los sobrenadantes fueron combinados y la mezcla resultante ultracentrifugada a 175.000 xg 40 min a 4°C.

El sedimento obtenido (compuesto principalmente por membranas celulares) fue resuspendido en 10 mL de tampón de resuspensión 1x. Las membranas fueron solubilizadas mediante incubación con el detergente IGEPAL a una concentración final del 4%, durante 30 min con agitación a 4°C. Tras ultracentrifugar nuevamente a 175.000 xg 2 horas a 4°C el sobrenadante fue recuperado y filtrado por 0,45 μ m para a continuación inmunopurificar las moléculas DR4 presentes en este extracto.

Todo el proceso de inmunopurificación descrito a continuación tuvo lugar a 4°C, manteniendo un flujo constante de 2 mL/min, excepto al cargar el extracto, que fue de 1 mL/min. En primer lugar preparamos una precolumna de resina de proteína A (sin anticuerpo unido), añadiendo 1 mL de resina comercial a una columna vacía (*Empty Rezorian 1mL*; SUPELCO). Esta precolumna fue equilibrada con 10 mL de tampón I (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,005% IGEPAL, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 100 μ M PMSF, 1 μ g/mL pepstatina A) y pasamos por ella el extracto conteniendo las moléculas de DR4, con el fin de eliminar contaminantes que se pudieran unir a la proteína A.

La fracción no retenida por la precolumna fue cargada en la columna de anti-DR/proteína A, que había sido previamente preequilibrada con tampón I. El extracto se pasó 3 veces por la columna para asegurarnos de que todas las moléculas de DR4 quedaban unidas al anticuerpo. A continuación la columna fue lavada consecutivamente con 20 volúmenes de columna de los siguientes tampones: tampón I, tampón II (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl), tampón III (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 450 mM NaCl) y tampón IV (50 mM Tris-HCl pH 8,0).

Las moléculas de DR4 unidas a la columna fueron eluidas con 5 volúmenes de columna de una solución de ácido acético al 10%. La fracción eluida fue incubada 15 min a 70°C para separar los péptidos de las moléculas DR4, para a continuación ser ultrafiltrada por un Amicon Ultra de 10 kDa (Millipore).

Para comprobar si la inmunopurificación de DR4 había tenido lugar con éxito se llevó a cabo un gel SDS-PAGE y un *dot-blot*. Para este último caso se depositaron 10 µL de cada muestra en una membrana de nitrocelulosa, y tras permitir su adsorción al soporte se procedió del mismo modo que para un *western blot* colorimétrico (apartado 2.2.2.2.). El anticuerpo utilizado fue un anticuerpo monoclonal de ratón anti-DP/DQ/DR (concentración final 1 µg/mL; AbD Serotec), y un anticuerpo secundario contra la IgG de ratón conjugado a peroxidasa (1:1000). Finalmente se reveló con el sustrato OPD.

La fracción filtrada conteniendo péptidos fue alicuoteada y concentrada en un concentrador centrífugo hasta un volumen final de aproximadamente 500 µL para los péptidos obtenidos de las células Priess tratadas con el SPA, y de 150 µL para los péptidos obtenidos de las células Priess tratadas con el SPA y S100β biotinilada. Los péptidos presentes en cada muestra fueron fraccionados por RP-HPLC (apartado 2.2.4.), y las fracciones conteniendo péptidos secadas por completo, según se ha descrito previamente.

2.3.3.5. Espectrometría de masas. Selección de péptidos consenso.

Los péptidos secos contenidos en cada fracción fueron solubilizados, depositados mediante el método de capa fina y analizados en un analizador 4800 MALDI-TOF/TOF según se ha descrito con anterioridad (Apartado 2.2.5.). Los espectros derivados de péptidos de Priess alimentadas con el SPA y alimentadas con el SPA y S100β biotinilada fueron comparados entre sí en búsqueda de las fracciones equivalentes, para a continuación ser comparadas manualmente en búsqueda de valores m/z únicos. Cada fracción fue además

comparada con la fracción inmediatamente anterior y la inmediatamente posterior a su fracción equivalente.

Una vez seleccionados los m/z únicos sus valores fueron procesados con el programa informático *FindPept*, del servidor *Expasy Proteomics Server* (<http://www.expasy.ch/tools/findpept.html>), que analiza si valores de m/z obtenidos por MS pueden haber sido generados por una rotura inespecífica de una proteína dada. Los m/z experimentales se comparan con los m/z teóricos calculados a partir de la secuencia de la proteína S100 β . Admitiendo un máximo grado de error de 0.5 Da entre el valor de m/z experimental y el m/z teórico para masas monisotópicas y con cisteínas en forma reducida. Los datos que suministra son el valor del m/z del pico teórico, la diferencia en Dalton con el m/z experimental (Δ Da), la/las secuencias probables para ese m/z experimental y la posición del péptido en la proteína de estudio. Aquellos m/z que podían haber sido derivados de S100 β según el *FindPept*, con un error menor o igual a 0,5 Da y con 1 o 2 predicciones fueron seleccionados como candidatos, siendo 32 los valores de m/z que cumplieron con estos requisitos, correspondiéndose con 44 secuencias peptídicas.

Paralelamente se realizó un análisis bioinformático de la secuencia de la proteína S100 β para localizar motivos de unión a la molécula DR4. Para ello se emplearon las herramientas informáticas y bases de datos que se describen a continuación:

- SYFPEITHI: (<http://www.syfpeithi.de/>; Rammensee y cols. 1999). Según esta base de datos, la posición determinante en la unión de péptidos al DR4 es la posición 1 (P1): el aminoácido presente en esta posición debe ser capaz de formar puentes de hidrógeno o salinos, como F, Y, W, I, L, V o M. Asimismo, en la P3 debería haber alguno de los siguientes residuos: P, W, I, L, V, A, D o E. En P6 los residuos más habituales serían N, S, T, Q, H o R. Las posiciones P7 y P9 ofrecen mayor grado de variabilidad, si bien los aminoácidos presentes en estas posiciones no deben ser G, F, W o P. Los datos que contiene son obtenidos de publicaciones, e incluyen solamente péptidos presentados de manera natural, no péptidos sintéticos. Para asignar una puntuación a un péptido el programa da 10 puntos al aminoácido correcto en un anclaje clave, 6-8 puntos a los anclajes inusuales, 4-6 puntos a los anclajes auxiliares y 1-4 puntos a los aminoácidos preferidos. A los aminoácidos que se cree tienen un efecto negativo en la capacidad de unión se les asignan valores entre -1 y -3. Los resultados que suministra para HLA-DR4 son péptidos de 15 aminoácidos, donde el aminoácido de la posición 4 es el correspondiente a la P1, y el de la posición 12 al de la P9, los demás son aminoácidos flanqueantes.

- HLA-DR4Pred: es uno de los muchos programas desarrollados por el grupo del doctor G.P.S. Raghava (<http://www.imtech.res.in/raghava/>; Bhasin y cols. 2003). Se basa en algoritmos de máquinas de vectores de soporte (SVM), y en este caso en la base de datos MHCBN. La exactitud del método utilizando SVM es del 86%. El programa suministra para HLA-DR4 los 9 aminoácidos de unión.
- SVMHC: la primera versión del programa fue desarrollada en el Centro de Bioinformática de Estocolmo, y actualmente es mantenido por la División de Simulación de Sistemas Biológicos (http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/SVMHC/index_html; Dönnes y cols. 2002). Al igual que para HLA-DR4Pred, las predicciones del SVMHC se basan en máquinas de vectores de soporte y péptidos que se sabe se unen a MHC. En este caso las bases de datos usadas son MHCPEP y SYFPEITHI. El programa suministra para HLA-DR4 los 9 aminoácidos de unión.
- MHC2PRED: es otro de los programas desarrollados por el grupo del doctor G.P.S. Raghava, semejante al HLA-DR4Pred, aunque el MHC2PRED utiliza las bases de datos MHCBN y JenPep, además de poderse utilizar para otros alelos de MHC de clase II distintos de DR4. La exactitud de la búsqueda está en torno al 78%.

Para decidir los residuos flanqueantes que se hallarían en torno a las 3 regiones centrales de unión a DR4 para nuestros péptidos consenso se efectuó una búsqueda bibliográfica (Arnold y cols. 2002; O'Brien y cols. 2008; Lippolis y cols. 2002). A partir de esta búsqueda se decidieron las secuencias de 4 péptidos consenso: S100 6-25 (KAMVALIDVFHQYSGREGDK), S100 21-36 (REGDKHKLKKSELKEL), S100 25-46 (KHKLKKSELKELINNELSHFLE) y S100 68-92 (ECDFQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE). Estos péptidos fueron sintetizados con una pureza del 95% (*GenScript*), resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO), cuantificados en nuestro laboratorio mediante RP-HPLC comparando áreas bajo picos respecto de péptidos de concentración conocida, y conservados a -20°C hasta su utilización.

2.3.3.6. Unión de los péptidos consenso derivados de S100 β a la molécula de histocompatibilidad DR4. Estabilidad del complejo péptido/DR4.

Para evaluar la capacidad de unión de los péptidos consenso se sintetizaron, además de los cuatro péptidos consenso, péptidos de 15 aminoácidos de longitud ("15-mer") solapantes entre sí en 14 aminoácidos y que abarcaran todo el péptido consenso (seis para S100 6-25, dos para S100 21-36, ocho para S100 25-46 y once para S100 68-92). Se incluyeron también en el

estudio varios péptidos procesados y presentados de manera natural de cada región (I, II y III), escogiendo aquellos que presentaban mayor intensidad relativa de pico en la espectrometría de masas. La síntesis, ensayo de unión a DR4 y estabilidad del complejo DR4/péptido fueron llevados a cabo por *Proimmune Ltd.*

El ensayo de unión de cada péptido a la molécula HLA determina la habilidad de cada péptido candidato para unirse a DR4; la detección de la unión se basa en la presencia o ausencia de la conformación nativa del complejo DR4/péptido. La puntuación de cada péptido se indica como el porcentaje de señal generada respecto de la obtenida por el control positivo, que es un epitopo conocido para linfocitos T de gran unión a DR4. Se incluye asimismo un péptido control que presenta una afinidad intermedia para DR4. Los péptidos cuyo porcentaje de unión a DR4 es superior al 15% se considera que sí se unen a DR4. Se suministran las puntuaciones de unión para cada péptido candidato a tiempo cero y a las 24 horas, lo que da una idea de la afinidad del péptido por DR4.

Se calcula además un índice de estabilidad del complejo péptido/DR4, empleando las medidas recogidas a tiempo cero y a las 24 horas e incluyendo estos datos en una ecuación para estimar la vida media del complejo. Tras multiplicar por la puntuación de unión se obtiene el índice de estabilidad: cuanto mayor sea este índice más estable es el complejo péptido/DR4, y más tiempo será presentado el epitopo a los linfocitos T.

2.3.3.7. Análisis mediante ELISPOT (IFN- γ , IL-10 e IL-17) de la inmunogenicidad de los péptidos consenso de S100 β en sujetos control y pacientes diabéticos.

Para el tipado de histocompatibilidad, se aisló ADN genómico de cada uno de los sujetos reclutados a partir de 300 μ L de sangre total (*Wizard Genomic DNA Purification*, Promega), siguiendo instrucciones del fabricante. Se llevó entonces a cabo una reacción de PCR utilizando las condiciones de amplificación y los cebadores indicados por Bunce y cols. (2003): cebadores 47-F (directo), 37-R (reverso) y 38-R (reverso). Tanto la combinación de 47-F y 37-R como la de 47-F y 38-R genera una banda de 259 pb en individuos positivos para DRB1*04, mientras que si el sujeto es negativo no habrá amplificación. Fueron considerados positivos aquellos sujetos de los que se obtenía producto de PCR con cualquiera de las dos reacciones. Como control positivo se usaron los cebadores CtrlDR4-F y CtrlDR4-R, que generan una banda de 796 pb.

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad según se ha descrito con anterioridad (apartado 2.2.3.2.), resuspendiéndolas finalmente a $3,5 \times 10^6$ células/mL en medio H10. 300 μ L de PBMCs fueron mezclados con 50 μ L de medio H10 conteniendo el péptido correspondiente (S100 6-25, S100 21-36, S100 25-46 o S100 68-92), obteniendo una concentración final de péptido de 10 μ M. Como control negativo se utilizó una concentración equivalente de DMSO; en ocasiones también se empleó como control negativo adicional el péptido de *Plasmodium falciparum* correspondiente a los aminoácidos 333-352 (Clavijo y cols. 1993. Calvo-Calle y cols. 2005). Como control positivo 0,5 μ L de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA; concentración final 50 ng/mL) y 0,5 μ l de ionomicina (concentración final 1 μ g/mL) (ambos de Sigma-Aldrich) fueron mezclados con 49 μ L de medio H10 y añadidos a 300 μ L de suspensión celular diluída 1:100.

Las células fueron sembradas por triplicado (100 μ L/pocillo) en una placa de 96 pocillos (Maxisorp F96, NUNC) tapizada con el anticuerpo de captura anti-citocina (anti-IFN- γ , anti-IL-10 o anti-IL-17) suministrado en el kit correspondiente, y cultivadas 3 días a 37°C y 5% CO₂. Tras el período de incubación se reveló el ELISPOT siguiendo las indicaciones del fabricante. Los kits utilizados para el ELISPOT fueron todos de U-CyTech (*Human IL-17 ELISPOT kit*; *Human IFN-gamma ELISPOT kit*; *Human IL-10 ELISPOT kit*). Tras el secado de la placa el número de *spots* fue cuantificado.

Se calculó entonces un índice de estimulación (IE):

$$IE = \frac{\text{n}^\circ \text{ spots por millón de PBMCs (péptido)}}{\text{n}^\circ \text{ spots por millón de PBMCs (DMSO)}}$$

Se consideró que el sujeto presentaba una respuesta positiva frente al péptido si el IE era mayor de 3, ya que éste ha sido el criterio empleado por otros autores para definir la positividad en ELISPOT (Arif y cols. 2004). Cuando el número de spots en DMSO fue igual a cero se tomaron como positivas aquellas respuestas en las que el péptido ensayado presentó más de 3 spots por millón de PBMCs (denotado en las tablas como “>3”). En el caso de que también se empleara el control negativo adicional Pf se calculó el IE (cociente entre spots por millón del péptido ensayado y spots por millón para el Pf), y se consideró como respuesta positiva aquella en la que ambos IE (IE_{DMSO} e IE_{Pf}) fueran superiores a 3.

2.3.4. PÉPTIDOS DERIVADOS DE S100B PROCESADOS Y PRESENTADOS DE MANERA NATURAL POR MHC DE CLASE I.

2.3.4.1. Clonaje de S100 β en pcDNA 3.1 (+)/Zeo.

La pauta de lectura abierta para S100 β fue clonada en el vector pcDNA 3.1 (+) y subclonada en pcDNA 3.1/Zeo (+). Para ello llevamos a cabo una reacción de PCR con los cebadores S100pcDNA-F y S100pcDNA-R ($T_h=53^\circ\text{C}$), y la polimerasa *Pfu*, utilizando como molde la construcción S100 β -pCR T7/NT-TOPO (apartado 2.3.1.3.). El producto obtenido fue cortado con la enzima *BamHI* (Promega), purificado de gel de agarosa, y cuantificado por gel. El vector pcDNA 3.1 (+) fue también digerido con *BamHI*, tratado con fosfatasa alcalina termosensible (TSAP, de Promega; incubado 15 min a 37°C y 15 min a 74°C), purificado de gel y cuantificado. A continuación se llevó a cabo la ligación entre el inserto y el vector tal y como se ha descrito anteriormente (apartado 2.2.1.5.).

Una vez confirmado el éxito del clonaje por secuenciación se realizó el subclonaje en el plásmido pcDNA 3.1/Zeo (+). En este caso se llevó a cabo una PCR de la construcción S100 β /pcDNA 3.1 (+) con la polimerasa de alta fidelidad *Pfu*, el cebador directo descrito en el párrafo anterior y el cebador reverso S100pcDNAZ-R ($T_h=55^\circ\text{C}$). Al igual que en el clonaje anterior, el producto de PCR fue cortado con *BamHI*, purificado de gel de agarosa y cuantificado. El vector pcDNA 3.1/Zeo (+) fue tratado de igual modo que pcDNA 3.1 (+). La ligación se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. En ambos casos la identidad de los clones positivos fue comprobada mediante secuenciación.

2.3.4.2. Transfección de las células A2.1/ K562 con S100 β . Comprobación de la expresión de S100 β .

La línea celular A2.1/K562 fue obtenida mediante transfección estable de la línea celular de leucemia eritromieloblastoide K562 para que exprese la molécula de histocompatibilidad de clase I HLA A*02:01 (A2.1) en superficie. Esta línea que expresa A2.1 es resistente a geneticina y fue obtenida de C. Britten (Britten y cols. 2002). Llevamos a cabo entonces una transfección estable de esta línea con la construcción S100 β /pcDNA 3.1-Zeo (+), para obtener una línea celular doble transfectante que exprese tanto A2.1 como S100 β . Las células A2.1/K562 se mantuvieron en cultivo en frascos de 75 cm² (T75) en medio R10 suplementado con 0,7 mg/mL de geneticina (Invitrogen) como antibiótico de selección.

Antes de llevar a cabo la transfección se hizo una curva de resistencia a zeocina para las células A2.1/K562 cultivando las células con distintas concentraciones de zeocina (Invitrogen), resultando ser 0,2 mg/mL la concentración óptima.

La construcción S100 β /pcDNA 3.1-Zeo (+) fue linearizado mediante digestión con la enzima de restricción *ScaI* (Promega), que corta al plásmido en el gen que confiere resistencia a ampicilina. Tras el corte el plásmido linearizado fue separado de la enzima y otros componentes de la reacción (*QIAquick PCR purification kit*, QIAGEN) y cuantificado por gel. Para las transfecciones utilizamos la Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo indicaciones del fabricante.

En primer lugar llevamos a cabo una transfección transitoria para comprobar la viabilidad de la transfección con S100 β y determinar la relación óptima de ADN/Lipofectamina. Para ello 0,8 μ g de plásmido linearizado fueron mezclados con cantidades crecientes de Lipofectamina, en proporciones 1:1 a 1:5. $0,8 \times 10^6$ células/pocillo fueron incubadas en 500 μ L de medio R10 en placas de 24 pocillos con la mezcla de ADN/Lipofectamina correspondiente durante 72 horas. Se incubaron también células tratadas sólo con Lipofectamina (control negativo).

Tras las 72 horas de cultivo las células fueron recogidas, lavadas, y se preparó un extracto citoplasmático para lo cual las células fueron resuspendidas en 250 μ L de tampón de lisis de células eucariotas e incubadas 30 min en hielo. A continuación se centrifugó el lisado a 10.000 xg 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante (extracto) fue conservado a -20°C hasta su posterior análisis mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE al 14% y *western blot* quimioluminiscente. En la identificación de S100 β se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón contra la S100 β humana (dilución 1:5000), y un anticuerpo secundario contra la IgG de ratón conjugado a HRP (dilución 1:10000; Sigma-Aldrich). La relación óptima ADN/Lipofectamina resultó ser de 1:3. La Figura 7 muestra que S100 β sí puede ser expresada por las células A2.1/K562, siendo la ratio 1:3 la ratio a la que se produce mayor cantidad de la proteína.

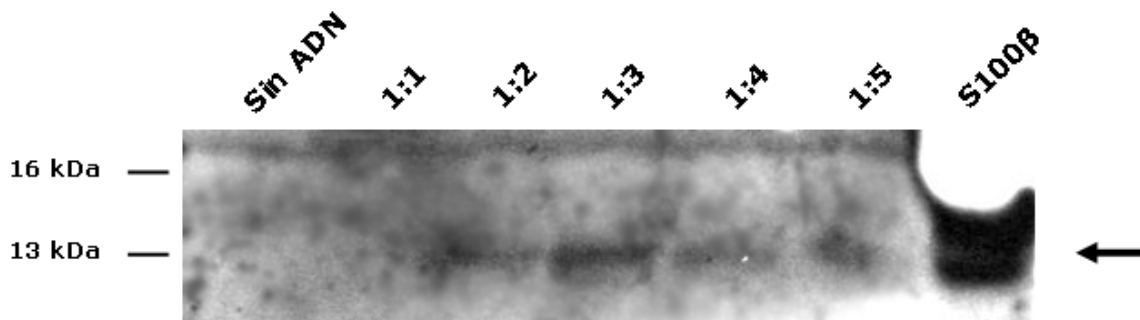


Figura 7. Transfección transitoria de la línea celular A2.1/K562 con S100 β /pcDNA 3.1 (+) Zeo. Se llevaron a cabo transfecciones con distintas relaciones de ADN-Lipofectamina (calles 1:1 a 1:5). Se observa hay expresión de S100 β con los ratios 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5. La proteína expresada tiene el tamaño esperado (13 kDa) (flecha). Como control positivo para el western blot se ha incluido una calle (calle “S100 β ”) con S100 β producida y purificada en nuestro laboratorio (tamaño esperado de 16 kDa). Si no se añade ADN a la Lipofectamina no hay expresión de S100 β (calle “Sin ADN”).

Para la transfección estable 8 μ g del plásmido linearizado fueron mezclados con 24 μ L de Lipofectamina. 8×10^6 células A2.1/K562 fueron sembradas en 4 mL de R10 en un frasco de cultivo de 25 cm² (T25) y la mezcla de ADN/Lipofectamina añadida sobre ellas. Otras 8×10^6 células recibieron sólo Lipofectamina (control negativo de transfección).

Tras 24 horas en cultivo las células fueron diluidas 1:5 con R10 suplementado con 0,7 mg/mL de geneticina y sembradas en un T75. A los 5 días de cultivo se añadió el agente selectivo, zeocina, a 0,2 mg/mL. 5 días más tarde la concentración de zeocina se bajó a 0,1 mg/mL. Se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar un número suficiente, y las células que sobrevivieron fueron congeladas y almacenadas en nitrógeno líquido. En este punto se tomaron células de la línea K562/A2.1 y de la nueva línea K562/A2.1-S100 β y se prepararon extractos celulares, tal y como se ha descrito para la transfección transitoria. De nuevo se llevó a cabo un *western blot* quimioluminiscente, que confirmó que la línea K562/A2.1-S100 β expresaba S100 β (ver Capítulo 5).

Con el fin de obtener células con expresiones elevadas de S100 β , se realizó una clonación por dilución límite de la línea celular obtenida anteriormente. El medio de clonación utilizado fue medio R10 con 12,5% de medio condicionado (medio recogido de un cultivo de la línea celular y filtrado por 0,22 μ m), 0,7 mg/mL de geneticina y 0,1 mg/mL de zeocina.

Para la clonación las células se lavan en DPBS (Gibco), se cuentan y se diluyen a 25.000 células/mL. De esta suspensión se siembran 200 μ L en 24 pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano. Las células sobrantes son diluidas a la mitad y sembradas en otros 24

pocillos, y así sucesivamente hasta cubrir toda la placa. Los cuatro grupos de diluciones seriadas obtenidas (2,5, 1,25, 0,63 y 0,31 células/pocillo) se monitorizan a partir del 4º día de crecimiento, y los pocillos en los que se ven dos focos distintos creciendo se descartan. A los 7 días se retiran 175 µL de medio y se añaden otros 175 µL de medio de clonación. Tras 10 días se observan ya conjuntos de células creciendo; los pocillos se duplican (la mitad de las células se pasa a un pocillo nuevo y a ambos pocillos se les añade más medio condicionado). A partir de este punto se empiezan a expandir los clones a placas de 6 pocillos, a T25 y finalmente a T75, para acabar congelando varias alícuotas de cada clon. En este proceso de expansión ya no es necesario utilizar medio de clonación, se usa R10 con 0,7 mg/mL geneticina y 0,1 mg/mL zeocina.

Para comprobar que S100β estaba efectivamente siendo expresada por cada uno de los clones obtenidos se llevó a cabo una citometría de flujo y una inmunofluorescencia.

Para la citometría de flujo 1×10^6 células de cada clon, así como células K562 sin transfectar, fueron resuspendidas en PBS 3% FCS, y teñidas con 1 µg de un anticuerpo monoclonal generado en ratón contra la molécula HLA-A2 humana conjugado con FITC (BD Pharmingen) durante 30 min en hielo y en oscuridad. A continuación las células se lavaron 3 veces con 1 mL PBS 3% FCS, y se fijaron y permeabilizaron con 100 µL de Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen) 20 min a 4°C en oscuridad. Tras 2 lavados con 1 mL de tampón Perm/Wash (BD Pharmingen) las células fueron resuspendidas en 100 µL de ese mismo tampón y se añadió 1 µg de un anticuerpo monoclonal de ratón contra la S100β humana.

Una vez incubadas 30 min en hielo y en oscuridad fueron de nuevo lavadas con el tampón Perm/Wash, resuspendidas en 100 µL de ese mismo tampón y teñidas con 1 µg de un anticuerpo policlonal de cabra contra el fragmento F(c)-F(ab)² de la IgG de ratón conjugado con ficoeritrina (Abcam), 30 min en hielo y en oscuridad. Tras 2 lavados con el tampón Perm/Wash las células fueron resuspendidas en PBS 3% FCS y analizadas en el citómetro de flujo.

La identidad de los distintos clones fue también verificada mediante inmunofluorescencia para detectar la presencia de A2.1 y S100β.

En el caso de la tinción para A2.1, varios cubreobjetos fueron recubiertos con 400 µL de poli-L-lisina (Sigma-Aldrich) e incubados 10 min a temperatura ambiente. Tras aspirar el exceso de poli-L-lisina los cubreobjetos se dejaron secar y se añadieron sobre cada uno

$0,5 \times 10^6$ células en 600 μL de R10, durante 10 min a 37°C . Tras 3 lavados con 600 μL de PBS los cubreobjetos fueron bloqueados con 100 μL de PBS 10% FCS, durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación las células fueron teñidas con 1 μg de un anticuerpo anti-HLA-A2/FITC, en PBS con 10% FCS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar 3 veces con PBS, las células fueron fijadas con 400 μL de Cytifix/Cytoperm durante 20 min a 4°C . De nuevo se lava 3 veces con PBS, y se incuba con 100 μL de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación se vuelve a lavar 3 veces y se monta sobre un portaobjetos utilizando el medio de montaje *Vectashield* (Vector Laboratories), para a continuación visualizar la muestra en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 acoplado a una cámara digital Olympus DP-71.

Para detectar la presencia de S100 β los cubreobjetos fueron tratados con poli-L-lisina, las células añadidas sobre ellos, y tras la incubación fueron lavados 3 veces con PBS, todo tal y como se ha descrito en el párrafo anterior. Se fijaron y permeabilizaron las células mediante una incubación de 10 min a -20°C con 400 μL de metanol pre-enfriado a -20°C . Tras 3 lavados con PBS se añadió el anticuerpo monoclonal anti-S100 β -FITC, a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBS, y tras teñir con 100 μL de DAPI se lavaron los cubreobjetos y se montaron sobre portaobjetos con *Vectashield*.

2.3.4.3. Crecimiento de K562/A2.1 y K562/A2.1-S100 β . Preparación de extractos con citrato.

Las células fueron cultivadas en medio R10 suplementado con el surfactante Pluronic-F10 (GIBCO), además del/los antibióticos de selección correspondientes (0,7 mg/mL de geneticina para las células control K562/A2.1; 0,7 mg/mL de geneticina y 0,1 mg/mL de zeocina para las células K562/A2.1-S100 β). Las células se crecieron en suspensión en frascos de cultivo de volúmenes crecientes (0,25, 1 y 3 L) con agitación, diluyendo las células a una concentración máxima de $0,2-0,3 \times 10^6$ células/mL al cambiarlas de frasco. Una vez alcanzados los 3 L, las células se dejaron crecer hasta una densidad aproximada de 1×10^6 células/mL, tras lo cual fueron recogidas y tratadas para eluir los péptidos de superficie.

Para ello las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, resuspendidas a 1×10^8 células/mL en tampón citrato (0,131 M ácido cítrico, 0,066 M Na_2HPO_4 , 0,150 M NaCl, pH 3,3), e incubadas 5 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar, el extracto fue filtrado por 0,22 μm y a continuación ultrafiltrado por un Amicon Ultra de 3 kDa (Millipore). La fracción

ultrafiltrada conteniendo los péptidos fue conservada a -80°C hasta su posterior análisis. Una vez extraídos los péptidos, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, resuspendidas en medio R10 con Pluronic y los antibióticos correspondientes y puestas de nuevo en cultivo, para utilizarlas una vez más en la producción de péptidos.

Para verificar la eficacia de este método de extracción de péptidos presentados por las moléculas A2.1 de superficie $2,5 \times 10^6$ células fueron incubadas con PBS o con tampón citrato, tras lo cual las células fueron lavadas y la mitad de ellas puestas de nuevo en cultivo. La otra mitad fue fijada con Cytifix/Cytoperm y teñida con $1 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-HLA-A2/FITC en PBS suplementado con 10% de FCS. Tras dos lavados con PBS 10% FCS las células fueron analizadas en el citómetro. Al día siguiente las células puestas en cultivo fueron recogidas, lavadas y teñidas tal y como se ha descrito.

2.3.4.4. Purificación de péptidos por extracción por fase sólida (SPE). Fraccionamiento por cromatografía líquida de alta eficiencia de fase reversa (RP-HPLC).

Para la purificación mediante extracción por fase sólida (SPE) la resina empleada fue la DSC-18 (Sigma-Aldrich) empaquetada en nuestro laboratorio en columnas vacías de 1 mL de capacidad (*Empty Rezorian Tube Kit*, SUPELCO). Para cada purificación se utilizaron 2 columnas conectadas en serie. Las columnas fueron acondicionadas con 10 volúmenes de columna (v.c.) de metanol, y a continuación fueron equilibradas con otros 10 v.c. de tampón citrato. Se añade a continuación el extracto peptídico, tras lo cual las columnas fueron lavadas con 5 v.c de 0,1% TFA. La elución se llevó a cabo con cada columna por separado empleando 4 mL de 70% ACN con 0,1% TFA. Las fracciones eluidas conteniendo los péptidos fueron concentradas en un concentrador centrífugo hasta un volumen final de aproximadamente 100 μL , y conservadas a -80°C hasta su posterior fraccionamiento por RP-HPLC. Se emplearon diferentes columnas para purificar los péptidos de K562/A2.1 y K562/A2.1-S100 β . Para el fraccionamiento de los péptidos se utilizó la técnica de RP-HPLC, tal y como se ha descrito con anterioridad (apartado 2.2.4).

2.3.4.5. Espectrometría de masas. Síntesis de péptidos candidatos.

Las fracciones recuperadas de la separación por RP-HPLC y que contenían péptidos (fracciones 17 a 60) fueron enviadas al servicio de espectrometría de masas y analizadas tal y como se ha descrito previamente (apartado 2.2.5.). Los espectros derivados de péptidos de

K562/A2.1 y K562/A2.1-S100 β fueron comparados entre sí en búsqueda de fracciones equivalentes. Los valores de m/z obtenidos de las fracciones de K562/A2.1-S100 β fueron enviados al programa *Findpept*, para seleccionar aquellos que podían haber sido derivados de S100 β . De ahí se escogieron los péptidos de una longitud comprendida entre 7 y 11 aminoácidos, y se compararon manualmente con las fracciones equivalentes de K562/A2.1, además de con la inmediatamente anterior y la inmediatamente posterior. De los m/z únicos se seleccionaron aquellos que poseían una longitud de entre 8 y 10 aminoácidos y que fueran intensos. Obtuvimos así 4 m/z candidatos.

Para que un péptido se una a moléculas de clase I debe haber sido generado por el proteosoma y/o el inmunoproteosoma, por lo que todas las predicciones para los 4 valores de m/z candidatos fueron analizadas para comprobar si cumplían esta premisa. Este objetivo se llevó a cabo utilizando a) el Servidor para la Predicción de Fragmentación por Proteosoma (PCP; <http://imed.med.ucm.es/Tools/pcps/index.html>; Díez-Rivero y cols. 2010), que emite predicciones de generación de péptidos a partir de una secuencia dada tanto para el proteosoma como para el inmunoproteosoma (modelo 1), y b) el Algoritmo de Predicción de Fragmentación por Proteosoma (PAProC; proteosoma humano tipo III. <http://www.paproc.de/>; Kuttler y cols. 2000; Nussbaum y cols. 2001). Obtuvimos así 5 péptidos candidatos (S100 10-18, S100 20-28, S100 38-45, S100 54-61 y S100 67-75), que fueron sintetizados por *GenScript* con una pureza del 95%, resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO), cuantificados en nuestro laboratorio mediante RP-HPLC comparando áreas bajo picos respecto de péptidos de concentración conocida, y conservados a -20°C hasta su utilización.

2.3.4.6. Digestión *in vitro* de S100 β por el proteosoma. Identificación de los extremos carboxi-terminales generados.

Para el ensayo de digestión *in vitro* 15 μ g de S100 β fueron incubados en tampón de digestión (30 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM ditioneitol, 0,01% SDS) con 2,62 μ g de la subunidad 20S del proteosoma (Enzo Life Sciences) (relación molar 250:1) a 37°C durante 16 horas. Como control se incubó la proteína S100 β en el tampón de digestión sin proteosoma, o bien con proteosoma en el tampón de digestión conteniendo 1% de ácido acético para inactivarlo. Para detener la reacción la mezcla fue congelada a -80°C. A continuación 70 μ L de cada muestra fueron pasados a través de una resina de intercambio catiónico (ZipTip SCX, Millipore) siguiendo instrucciones del fabricante, con el fin de

eliminar las sales presentes en las mezclas, descartar al proteosoma y a la proteína S100 β que no hubiera sido digerida, y concentrar los péptidos que se hubieran generado.

Finalmente los péptidos capturados por la resina fueron eluidos con 3 μ L de 5% NH₄ en 30% de metanol, depositados mediante el método de capa fina descrito con anterioridad y analizados en el espectrómetro de masas. Los espectros de MS y MS/MS fueron analizados tal y como se ha descrito previamente (apartado 2.2.5.).

2.3.4.7. Ensayo de estabilización de A2.1 de los péptidos candidatos.

Los péptidos candidatos fueron utilizados en ensayos de estabilización de A2.1 (Varela-Calviño y cols. 2004) Para ello se utilizaron células T2 transfectadas para expresar A2.1, las cuales carecen del transportador asociado con el procesamiento (TAP), por lo que las moléculas de HLA A2.1 no unirán péptidos, no serán estables y no se encontrarán en la superficie celular. La adición de péptidos capaces de unirse a A2.1 permite la estabilización de la molécula en la superficie, permitiendo su detección mediante tinción específica para A2.1 y análisis por citometría de flujo.

Así pues, 10⁵ células fueron lavadas dos veces con el medio libre de suero AIM-V (Gibco), e incubadas con 50 μ L de este medio de cultivo conteniendo 5 μ g/mL de β 2-microglobulina (Sigma-Aldrich) y concentraciones decrecientes del péptido a probar (100, 50, 25, 12,5 y 0 μ M). Se empleó como control positivo de unión a A2.1 el péptido derivado del virus influenza GILGFVFTL (“Flu 58-66”) que se sabe se une a A2.1 con gran afinidad (Parker y cols. 1992), y como control negativo el péptido EVKEKGMAA (“GAD 261-269”), perteneciente a la descarboxilasa 65 del ácido glutámico (GAD65), ya que se ha demostrado que no se une a A2.1 (Varela-Calviño y cols. 2004). Asimismo también se cultivaron células conteniendo la cantidad equivalente de DMSO como control negativo. Las células fueron incubadas 16 horas a 37°C y 5% CO₂, tras lo cual fueron lavadas con PBS frío, resuspendidas en 100 μ L de PBS conteniendo 3% FCS y teñidas con 0,2 μ g de anticuerpo monoclonal anti-HLA-A2 conjugado a FITC durante 30 min en hielo y en oscuridad, con agitación cada 10 min. Tras 2 lavados con PBS las células fueron fijadas con 100 μ L de Cytotfix/Cytoperm durante 20 min a 4°C. Tras dos lavados con PBS las células fueron analizadas en el citómetro. El valor de la fluorescencia media empleada en las gráficas es el obtenido para cada pocillo menos el valor de fluorescencia media para el pocillo conteniendo la cantidad equivalente de DMSO.

Para evaluar la capacidad teórica de unión de los péptidos candidatos a A2.1 se enviaron sus secuencias a los siguientes programas *on-line*:

- SYFPEITHI: base de datos ya descrita con anterioridad. La puntuación máxima asignada por el programa varía según el alelo, para el caso de A2.1 la puntuación máxima es de 36, teniendo el epitopo derivado de la proteína de la matriz del virus de la gripe A GILGFVFTL una puntuación de 30.

- HLA-Affi: es uno de los muchos programas desarrollados por el grupo del doctor G.P.S. Raghava. Utiliza las bases de datos MHCBN y Antijen. Los péptidos incluidos para desarrollar el programa son aquellos no números cuyo valor de afinidad (IC_{50}) ya ha sido determinado experimentalmente. La puntuación que suministra es el logaritmo natural de la capacidad de unión: cuanto menor sea la puntuación mayor es la capacidad de unión del péptido. Establece un punto de corte para considerar a un péptido capaz de unirse a A2.1.

- SVMHC: ya descrito en la sección dedicada a MHC de clase II. Valores más altos indican mejor capacidad de unión.

- MHC-I binding: es una de las muchas herramientas presentes en la página web del *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (<http://www.immuneepitope.org/>; Lundegaard y cols. 2008a y 2008b). Esta herramienta suministra los valores de IC_{50} (nM) para cada péptido, de tal modo que cuanto más pequeño sea este valor mayor afinidad tendrá el péptido por A2.1. Así, los péptidos con IC_{50} menor de 50 nM son considerados de gran afinidad, los menores de 500 nM de afinidad intermedia y los menores de 5000 nM de baja afinidad. La mayor parte de los epitopos conocidos de células T tienen afinidad alta o intermedia, si bien algunos de ellos muestran baja afinidad. Hasta el momento no se conoce ningún epitopo de célula T con un valor de IC_{50} superior a 5.000 nM.

2.3.5. GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS DE LINFOCITOS T INFILTRANTES DE ISLOTES DE LANGERHANS DE NOD: ESTUDIO PRELIMINAR DE SU ESPECIFICIDAD.

Los ratones NOD empleados en el estudio fueron mantenidos en el estabulario del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol (Badalona) bajo condiciones libres de patógenos específicos de ratón (SPF) de acuerdo con las Directivas de la Unión Europea de protección de animales de experimentación. El aislamiento de islotes, generación de hibridomas y generación de transfectantes S100 β /P815 fueron llevadas a cabo durante una estancia

predoctoral en el grupo de investigación del doctor Joan Verdaguer, en el Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol.

Los islotes de Langerhans fueron aislados mediante digestión enzimática del páncreas tal y como han descrito otros autores (Carrillo y cols. 2005; Schmidt D. y cols. 1997; Vargas y cols. 2001). Brevemente, el ratón es anestesiado en éter y sacrificado mediante dislocación cervical. Tras ser rociado con etanol al 70% se realizó una incisión todo a lo largo de la línea media, desde la parte inferior del abdomen hasta las glándulas salivares. A continuación el diafragma fue cortado y las costillas extraídas. La masa abdominal fue desplazada hacia el lado izquierdo del animal, y la ampolla de Vater pinzada con una pinza tipo mosquito. Se pinzó a continuación la vesícula biliar con un segundo mosquito, para finalmente pinzar la cara inferior del hígado por el lóbulo hacia el que se dirige el colédoco (Figura 8). De este modo el colédoco queda a la vista, por lo que se sujeta con una pinza dentada y se introduce una aguja de 30G, previamente insertada en una jeringa conteniendo 3 mL de colagenasa fría (CLS-4, Whorthington) a 470 U/mL en HBSS. Si el pinzamiento de la ampolla de Vater, vesícula biliar e hígado ha tenido lugar con éxito la colagenasa llenará por completo el páncreas del ratón.

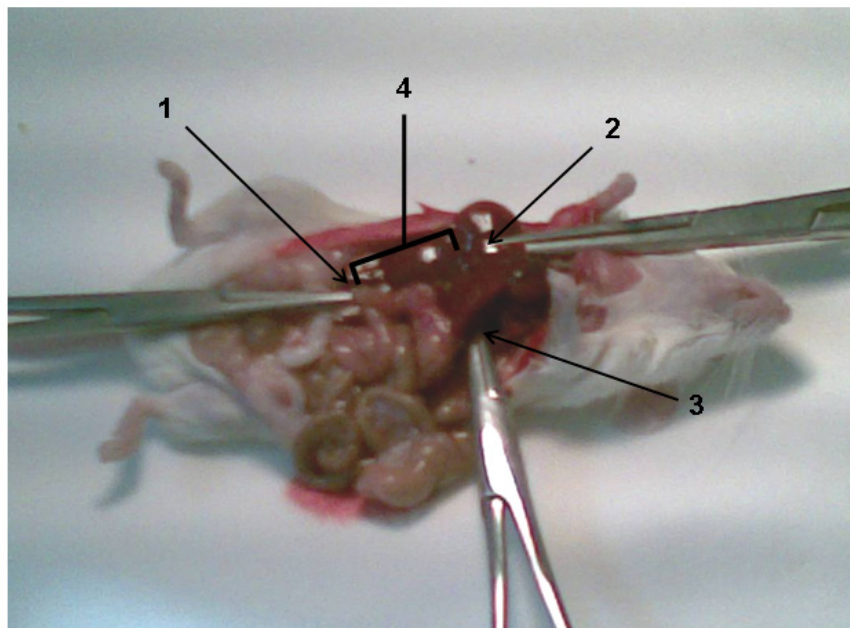


Figura 8: Pinzamiento previo a la inyección del páncreas con colagenasa. Tras efectuar un corte longitudinal por la línea media del animal y extraer las costillas, se pinza la ampolla de Vater (1), la vesícula biliar (2) y la ramificación hepática izquierda del colédoco (3), quedando el colédoco a la vista (4). La colagenasa es introducida en el páncreas mediante inyección a través del colédoco empleando una aguja de 30G.

Una vez comprobado que todo el páncreas se ha llenado de colagenasa se quitan todas las pinzas y la masa abdominal se devuelve a su posición original. Tomando la zona del intestino delgado inmediatamente posterior al estómago se comienza a separar suavemente el páncreas del intestino, llevando a cabo esta separación a lo largo de todo el intestino delgado y el grueso, tras lo cual el páncreas es despegado del estómago, procurando no tomar grasa ni ganglios mesentéricos. El páncreas es mantenido en el interior de un tubo en hielo hasta su disgregación.

A continuación el páncreas se incuba a 20 min en un baño a 37°C, para que actúe la colagenasa, tras lo que la reacción de digestión es detenida mediante la adición de 10 mL de HBSS frío. Se disgrega mecánicamente el páncreas mediante 30 pases por una pipeta de 10 mL. Se añaden 10 mL más de HBSS y se deja sedimentar 10 min en hielo, para a continuación descartar los 10 mL de la zona superior, que contienen básicamente lípidos que interfieren en el posterior aislamiento de los islotes. El resto de la preparación se vuelca en una placa de Petri (90 mm), y se pone bajo una lupa (15 aumentos; Zeiss) dentro de una campana de flujo laminar. Los islotes son tomados de la placa mediante el uso de una micropipeta con el volumen fijado en 150 μ L, y trasladados a una nueva placa de Petri conteniendo HBSS limpio. A continuación los islotes son nuevamente aislados de la segunda placa, y puestos a razón de 10 islotes/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo plano conteniendo 200 μ L de medio R10-PB conteniendo 20% de FCS. Tras una incubación de 10 min a 37°C y 5% de CO₂ 100 μ L de medio de cultivo fueron retirados de cada pocillo, para a continuación añadir 100 μ L de R10-PB 20% FCS conteniendo IL-2 (R&D Systems) para obtener una concentración final en cada pocillo de 2 ng/mL de IL-2.

Tras 24 horas en cultivo se cambió el medio de cultivo y/o se duplicaron los pocillos, en función del número de linfocitos presentes, con medio R10-PB conteniendo 2 ng/mL de IL-2. Dos semanas después los linfocitos fueron recogidos y fusionados con la línea celular de timoma BW5147.

Para ello tanto linfocitos como células BW5147 fueron recogidas, lavadas con medio RPMI 1640 y mezcladas en una proporción 1:5 (linfocito : BW5147) en un mismo tubo. Tras centrifugarlas conjuntamente se retira todo el medio de cultivo, y el fondo del tubo se mantiene durante todo el proceso de fusión dentro de un recipiente con agua a 37°C. A partir de este punto se mantienen las células en constante agitación, excepto en los momentos en que se añade polietilenglicol (PEG) (Sigma-Aldrich). En un primer momento se añaden 20 μ L de PEG sobre las células, removiendo éstas con la punta de la micropipeta durante 1 minuto.

Se añaden a continuación 500 μL más de PEG, gota a gota, durante 1 minuto. Con el fin de diluir el PEG de manera que las células no resulten dañadas se añaden 0,5, 1, 2, 4, 8 y 16 mL de RPMI 1640 consecutivamente y gota a gota, en 1 minuto por adición.

Las células se centrifugan a 210 $\times g$ durante 9 min, se resuspenden en 12 mL de medio HAT y se siembran a razón de 200 μL /pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Tras 7 días en cultivo se monitoriza el crecimiento de hibridomas, los cuales se expanden y se pasan de medio HAT a HT, para finalmente acondicionarlos a crecer en medio R10-PB. Se llevaron a cabo cuatro fusiones, de las que se obtuvieron 7 hibridomas.

En un intento preliminar por determinar el fenotipo de los hibridomas la expresión de CD3, CD4 y/o CD8 fue evaluada; para ello $0,2 \times 10^6$ células fueron lavadas 2 veces con PBS, y resuspendidas en 50 μL de PBS conteniendo 1% de FCS, para ser a continuación teñidas con 2,5 μL de los anticuerpos monoclonales anti-CD3/FITC (Caltag), anti-CD4/APC (Becton Dickinson) y anti-CD8/PE (Becton Dickinson), durante 20 min a 4°C. Tras la tinción las células fueron lavadas 2 veces y analizadas en un citómetro FACS Canto II (Becton-Dickinson).

Para conocer la reactividad de los hibridomas frente a S100 β empleando como CPAs células transfectantes, 2×10^6 células P815 fueron transfectadas con 4 μg de la construcción S100-pcDNA 3.1 (+) (descrito con anterioridad) mediante el uso de Lipofectamina 2000, siguiendo instrucciones del fabricante. A las 48 horas se añadió 1 mg/mL de geneticina como antibiótico de selección. De la línea celular resultante se llevó a cabo una clonación por dilución límite, tal y como se ha descrito con anterioridad, obteniéndose 17 clones P815/S100 β .

Con el fin de comprobar si la proteína S100 β estaba siendo expresada por los clones se preparó un extracto celular, tal y como se ha descrito previamente, de cinco de ellos (clones 4, 5, 6, 11 y 18), y la presencia de S100 β en dichos extractos fue evaluada mediante *western blot* quimioluminiscente con un anticuerpo policlonal de conejo anti-S100 β (dilución 1:5000; Abcam) combinado con un anticuerpo secundario específico contra la fracción constante de la inmunoglobulina de conejo conjugado a HRP (1:5000). Los clones 4 y 6 demostraron expresar S100 β .

Una vez comprobado que los clones 4 y 6 de P815/S100 β expresan S100 β pasamos a determinar entonces si alguno de los hibridomas reconoce específicamente a esta proteína: células P815 y células de los clones 4 y 6 de P815/S100 β fueron resuspendidas en medio R10-

PB a una concentración de 2×10^6 células/mL, y mitomicina C (Sigma-Aldrich) añadida a una concentración final de 50 $\mu\text{g/mL}$. Tras 1 hora de incubación a 37°C y 5% CO_2 las células fueron lavadas 4 veces con R10-PB. $0,1 \times 10^6$ células de cada hibridoma fueron cocultivadas con $0,1 \times 10^6$ CPAs (P815, clon 4 o clon 6) tratadas con mitomicina C en 200 μL de medio R10-PB, durante 24 horas a 37°C y 5% CO_2 . Tras el período de cultivo los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados a -80°C hasta su posterior utilización.

Determinamos a continuación la concentración de IFN- γ presente en los medios de cultivo mediante ELISA (*Murine IFN- γ ELISA Development Kit*), siguiendo instrucciones del fabricante, y empleando los medios de cultivo sin diluir. Para cada hibridoma se calculó un índice de estimulación tal que se consideró respuesta positiva si el índice era superior a 1:

$$\text{Índice} = \frac{\text{pg/mL IFN- } \gamma \text{ cultivo (hibridoma + Clon)}}{\text{pg/mL IFN- } \gamma \text{ cultivo (hibridoma + P815)}}$$

A continuación, y teniendo en cuenta la capacidad de presentación cruzada que presentan los mastocitos (Stelaki y cols. 2009), los hibridomas fueron cocultivados con células P815 tratadas con mitomicina C y con 2 $\mu\text{g/mL}$ de S100 β o de proteína de unión a maltosa (MBP), proteína frente a la cual no es de esperar ningún tipo de respuesta por parte de los hibridomas.

La posible endotoxina contaminante tanto en S100 β como en MBP fue eliminada mediante las *Endotoxin Removal Beads* (Miltenyi Biotec), siguiendo instrucciones del fabricante. Las proteínas resultantes, libres de endotoxinas, fueron cuantificadas por SDS-PAGE. Tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% CO_2 los medios de cultivo fueron recogidos y la cantidad de IFN- γ cuantificada por ELISA. Se calculó un índice de estimulación para cada hibridoma, de tal modo que índices superiores a 1 fueron considerados positivos:

$$\text{Índice} = \frac{\text{pg/mL IFN- } \gamma \text{ cultivo (hibridoma + P815 + S100}\beta\text{)}}{\text{pg/mL IFN- } \gamma \text{ cultivo (hibridoma + P815 + MBP)}}$$

Finalmente, con el fin de delimitar de manera preliminar qué zona de S100 β es reconocida por los hibridomas, estos fueron cocultivados con células P815 tratadas con mitomicina C y con los péptidos S100 6-25, una mezcla 1:1 de S100 21-36 y S100 25-46, S100 68-92 o DMSO (diluyente de los péptidos; control negativo), a una concentración final de 10 μM . Nuevamente, tras 24 horas de cultivo los medios de cultivo fueron recogidos y la cantidad de IFN- γ cuantificada por ELISA. Se determinó asimismo un índice de estimulación para cada hibridoma (índices superiores a 1 fueron considerados positivos):

$$\text{Índice} = \frac{\text{pg/mL IFN-}\gamma \text{ cultivo (hibridoma + P815 + péptido)}}{\text{pg/mL IFN-}\gamma \text{ cultivo (hibridoma + P815 + DMSO)}}$$

2.3.6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINAS.

2.3.6.1. Aislamiento celular, cultivo y polarización.

Los PBMCs fueron aislados como se ha descrito previamente, y a partir de ellos se aislaron los linfocitos T CD4⁺ vírgenes de controles sanos (*Naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit II*, Miltenyi Biotec), siguiendo instrucciones del fabricante. El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ vírgenes obtenido de los distintos individuos varió entre el 4,7% y el 14,7% (mediana 9,8%). La pureza de esta población fue comprobada por citometría de flujo (al menos el 94,2% de las células eran CD3⁺ CD4⁺, y al menos el 85,4% eran CD45RA⁺, con menos del 3,3% de células CD45RO⁺).

Los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T reguladores (Treg) fueron aislados de PBMCs con el kit *CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell isolation kit* (Miltenyi Biotec). El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ varió entre el 24% y el 44,4% (mediana 31%), y para los linfocitos Treg entre el 1,2% y el 3,1% (mediana 2,2%). Se obtuvo asimismo una población CD4⁻.

Los PBMCs, la población CD4⁻, linfocitos CD4⁺ y células Treg fueron cultivadas en medio R10 a 1x10⁶ células/mL, y estimuladas con partículas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (*Dynabeads T cell expander*, Invitrogen), a razón de una partícula por célula. Para evitar la influencia de moléculas exógenas presentes en el suero fetal bovino en las polarizaciones de linfocitos T CD4⁺ vírgenes, estas células fueron cultivadas en medio libre de suero (AIM-V) y estimuladas con una partícula por célula.

Para polarizar la respuesta, los anticuerpos y citocinas apropiados se añadieron al medio de cultivo al principio del período de estimulación (células Th1, Th2, Th17) o bien no se añadieron (células Th0). Las condiciones utilizadas fueron para Th1 2 ng/mL de IL-12 y 100 ng/mL de anticuerpo neutralizante anti-IL-4; para Th2 25 ng/mL de IL-4 y 2 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-IL-12 (Toscano y cols. 2007a); para Th17 dos protocolos fueron utilizados, en el primero se usaron 5 ng/mL de TGF-β y 25 ng/mL de IL-21 (Yang y cols. 2008a), y para el segundo se usaron 10 ng/mL de IL-1β, 10 ng/mL de IL-23, 1 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-IL-4 y 1 µg/mL de anticuerpo neutralizante anti-IFN-γ (Manel y cols. 2008a). Todas las citocinas fueron adquiridas en Peprotech, con la excepción de la IL-23, que fue de eBioscience. Los anticuerpos neutralizantes fueron obtenidos de BD

Pharmingén. En algunos experimentos se añadió al medio de cultivo D-galactopiranosil- β -D-tiogalactopiranosido (tiodigalactósido, TDG; Carbosynth), a una concentración final de 15 mM para comprobar el efecto que un inhibidor de la unión de galectinas tendría sobre el comportamiento celular.

Tras 72 de estimulación las células fueron recogidas por centrifugación y los sobrenadantes conservados a -80°C hasta su uso. En el caso de las polarizaciones las células fueron lavadas con PBS, lisadas con tampón RLT (*RNeasy Mini kit*, QIAGEN), y el lisado homogeneizado mediante un QIAshredder (QIAGEN). El lisado homogeneizado fue conservado a -80°C hasta la purificación de mRNA.

2.3.6.2. Cuantificación de mRNA de galectina-1, galectina-3, Tbet, GATA3 y RORC2.

Los lisados de linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron descongelados y el ARN total purificado mediante el kit *RNeasy Mini kit* (QIAGEN), siguiendo instrucciones del fabricante; durante el proceso de purificación el ADN genómico fue eliminado por incubación con la DNasa I suministrada con el kit. El ARN mensajero (ARNm) fue aislado del ARN total con el kit *Oligotex mRNA Mini kit* (QIAGEN), para a continuación emplearlo como molde para la síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa con el kit *AccuScript High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit* (Stratagene; Agilent Technologies), utilizando cebadores aleatorios. El ADNc fue conservado a -80°C hasta su posterior utilización.

La cuantificación del ARN mensajero para galectina-1, galectina-3, y los factores de transcripción Tbet (específico de Th1), GATA3 (específico de Th2) y RORC2 (específico de Th17), así como para la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real utilizando como moldes los ADNc obtenidos para cada polarización.

Los cebadores para galectina-1 y galectina-3 fueron diseñados utilizando el servidor *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; Rozen y cols. 2000), de tal modo que el cebador directo se hallara en un exón y el reverso en el exón contiguo, para asegurarnos de amplificar ARNm y no ADN genómico contaminante. Los cebadores para GAPDH, Tbet y GATA3 fueron tomados de Cheng y cols. (2009). Los cebadores para RORC2 fueron tomados de Burgler y cols. (2009). Los tamaños esperados para los productos de PCR fueron: 192 pb

(galectina-1), 213 pb (galectina-3), 142 pb (GAPDH), 199 pb (Tbet), 142 pb (GATA3) y 85 pb (RORC2).

En primer lugar se llevó a cabo una PCR con la polimerasa *Taq* para determinar qué temperatura de hibridación podía ser utilizada para todos los cebadores, y comprobar si todos ellos amplificaban un único producto del tamaño esperado. La temperatura de hibridación escogida fue de 60°C. A continuación se optimizaron los parámetros necesarios para llevar a cabo la PCR en tiempo real. Ésta tuvo lugar en un sistema de detección *iCycler iQTMReal-Time* (Bio-Rad). Para cada reacción de 25 µL finales se mezcló 1 µL del ADNc correspondiente con 12,5 µL de *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), además de con 0,5 µL de cebador directo y 0,5 µL de cebador reverso (concentración final 240 nM de cada uno), y 10,5 µL de agua libre de RNasas/DNasas. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado. Para todas las reacciones de PCR se incluyó un control negativo de reversotranscripción (llevó agua en vez de ARNm), y un control negativo de PCR (llevó agua en vez de ADNc). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de 4 min a 95°C y 35 ciclos consistiendo en 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C y 30 seg a 80°C. Finalmente tuvieron lugar 3 ciclos extra para recoger información sobre la curva de fusión: 1 min a 95°C, 1 min a 65°C y un ciclo final consistente en 60 pasos de 10 segundos cada uno aumentando la temperatura 0,5°C por paso, partiendo de 65°C y hasta los 95°C. Las reacciones resultantes fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa del 1,3%.

Antes de analizar las muestras se comprobó previamente la eficiencia de cada par de cebadores: para ello el ADNc de dos muestras distintas fue diluido a 4 concentraciones diferentes, y analizado por PCR en tiempo real. Se obtiene así, para cada par de cebadores, una relación entre el logaritmo de la cantidad inicial de ADNc y el ciclo umbral (Ct, número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base y detectable por el sistema, y que es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde). Esta relación debe ser una línea recta, cuya pendiente se utiliza para calcular la eficiencia E ($E = 10^{(-1/pendiente)}$). La eficiencia de cada par de cebadores debe ser cercana a 2. Asimismo, se obtiene una curva de fusión, que sirve para evaluar la temperatura específica de fusión para cada par, así como para comprobar que se forma un único amplicón y no dímeros de cebadores.

Así pues, todos nuestros cebadores demostraron tener un valor de eficiencia cercano a 2 (media de 2,10, rango de 2,03 a 2,23), y en todos ellos se forma un único amplicón (no

existen dímeros de cebadores). Las temperaturas de fusión obtenidas fueron: 91,5°C (galectina-1), 90°C (galectina-3), 87,5°C (GAPDH), 86,5°C (Tbet), 89°C (GATA3) y 82,5°C (RORC2). Se llevó a cabo una PCR en tiempo real sólo con los cebadores para la GAPDH para comprobar que la amplificación de GAPDH en todas las muestras tenía lugar en el mismo ciclo.

A continuación se llevaron a cabo las reacciones de PCR en tiempo real para todas las muestras con cada par de cebadores (galectina-1, galectina-3, Tbet, GATA3 y RORC2) conjuntamente con el par de cebadores para la GAPDH. El método $\Delta\Delta C_t$ fue el empleado para analizar los niveles de expresión normalizados a la expresión de GAPDH (Pfaffl y cols. 2001; Iglesias-Fernández y cols. 2009). Los resultados mostrados han sido relativizados respecto a la muestra con menor expresión.

2.3.6.3. *Western blot* de extractos celulares para galectina-1 y galectina-3.

Las células provenientes de cada polarización (Th0, Th1, Th2 y Th17) fueron resuspendidas en 250 μ L de tampón de lisis de células eucariotas e incubadas 30 min en hielo. A continuación se centrifugó el lisado a 10.000 xg 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante (extracto) fue congelado a -20°C hasta su posterior utilización.

Para la galectina-1 se llevó a cabo un *western blot* quimioluminiscente tal y como se ha descrito previamente. En un gel de SDS-PAGE del 14% se cargaron 1 μ g de galectina-1 (Sigma-Aldrich) y 10 μ L de cada extracto. Tras la transferencia y el bloqueo la membrana fue teñida con un anticuerpo monoclonal anti-galectina-1 (Abcam) a 0,5 μ g/mL, para a continuación añadir un anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón conjugado a HRP (1:5000; Sigma-Aldrich). Los films fueron expuestos 2 min. Otra membrana conteniendo las mismas muestras se analizó mediante *western blot* colorimétrico con un anticuerpo monoclonal anti- β -actina conjugado a HRP (1:1000; Sigma-Aldrich), revelando con TMB.

Para la galectina-3 se llevó a cabo un *western blot* colorimétrico, siguiendo las instrucciones dadas previamente. Para ello en un gel de SDS-PAGE del 12,5% se cargaron 1 μ g de galectina-3 (Sigma-Aldrich) y 10 μ L de cada extracto. Tras la transferencia y el bloqueo la membrana fue teñida con un anticuerpo policlonal para la galectina-3 conjugado a biotina (0,2 μ g/mL; R&D Systems), y a continuación con estreptavidina conjugada a HRP (1:100). Otra membrana conteniendo las mismas muestras fue teñida con el anticuerpo anti- β -actina descrito para el *western blot* de galectina-1. Las membranas fueron reveladas con TMB.

2.3.6.4. Cuantificación de galectinas y citocinas mediante ELISA.

Para cuantificar la cantidad de galectina-1 en medios de cultivo desarrollamos un ensayo de ELISA específico. Las concentraciones óptimas de anticuerpo de captura, curva estándar, anticuerpo de detección biotinilado y estreptavidina conjugada a HRP fueron determinados siguiendo el esquema propuesto por Crowther y cols.

Brevemente, la placa de 96 pocillos fue tapizada con un anticuerpo monoclonal anti-galectina-1 (Abcam) a 5 $\mu\text{g/mL}$ en PBS, e incubada toda la noche a 4°C. Tras 5 lavados con PBST los pocillos fueron bloqueados con PBST conteniendo 3% de BSA durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron diluidas 1:3 en PBST conteniendo 1% de BSA, y añadidas por duplicado a la placa. Se preparó también una curva estándar de galectina-1 recombinante (Sigma-Aldrich) de 10 a 640 ng/mL. Muestras y estándares se incubaron 2 horas a temperatura ambiente, y tras 5 lavados se añadió el anticuerpo de detección (anticuerpo policlonal contra la galectina-1 conjugado a biotina; Abcam) a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$. Una vez transcurrida una hora de incubación la placa fue lavada 5 veces e incubada 30 min a temperatura ambiente con estreptavidina-HRP (dilución 1:250). La placa se lavó 7 veces para eliminar el exceso de estreptavidina y se incubó 30 min a temperatura ambiente en oscuridad con el sustrato OPD. Finalmente se detuvo la reacción por adición de HCl 1M. La absorbancia fue medida a 490 nm restando la absorbancia a 655 nm.

Para cuantificar la cantidad de galectina-3 se diseñó un ELISA semejante al descrito para galectina-1, con las siguientes modificaciones: el anticuerpo monoclonal de captura específico para la galectina-3 (R&D Systems) se utilizó a 5 $\mu\text{g/mL}$; la curva estándar de galectina-3 recombinante (Sigma-Aldrich) abarcó de 0,2 a 25 ng/mL; las muestras fueron añadidas sin diluir, y el anticuerpo de detección biotinilado (R&D Systems) se utilizó a 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

La cuantificación de IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-17 e IL-21 se llevó a cabo mediante kits comerciales de ELISA (kits *Ready-SET-Go!* –eBioscience- o kits *ELI-pair* -Gen-Probe Diacclone-) siguiendo instrucciones del fabricante.

Todos los datos de concentración de galectinas y citocinas en medios de cultivo y/o plasmas se indican en pg o ng (según corresponda) por millón de células y por mL de medio de cultivo.

2.3.6.5. Determinación de galectina-1 de superficie y tinción con PHA-L.

Tras el período de 72 horas de estimulación las células fueron recogidas, lavadas en frío con PBS y teñidas con 1,5 µg del anticuerpo policlonal anti-galectina-1 conjugado con biotina durante 30 min en hielo, con agitación cada 10 min. Tras lavar el anticuerpo no unido con PBS frío se añadieron a las células avidina conjugada a FITC (0,83 mg/mL; Zymed), fitohemaglutinina conjugada a Alexa Fluor 647 (1 µg; PHA-L; Molecular Probes), y anticuerpo monoclonal anti-CD4 (0,4 µg; AbD Serotec) o anticuerpo monoclonal anti-CD25 (20 µL; BD Pharmingen), ambos conjugados a PE. Tras incubar 30 min en hielo con agitación cada 10 min las células fueron lavadas 2 veces y analizadas en un citómetro de flujo, y los resultados se trataron con el *software* WinMDI 2.9.

2.3.6.6. Eliminación de los ligandos de las galectinas de la superficie celular de linfocitos T.

Para determinar el efecto de la glicosilación de la membrana celular en la síntesis de galectina-1 y el comportamiento de las células T, linfocitos T CD3⁺ de controles sanos fueron aislados empleando el kit *Pan T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec), siguiendo instrucciones del fabricante. Los linfocitos T CD3⁺ fueron teñidos con 1 µM de 5(6)-carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil éster (CFSE), sembrados a una concentración de 1x10⁶ células/mL en medio R10 y estimulados con partículas anti-CD3/CD28 a razón de una partícula por célula. La swainsonina se añadió a los pocillos correspondientes a una concentración final de 200 nM. Tras 72 horas de estimulación las células fueron recogidas por centrifugación para su tinción con la lectina PHA-L y el posterior análisis por citometría de flujo; los medios de cultivo fueron almacenados a -80°C hasta la cuantificación de galectina-1 y citocinas por ELISA, tal y como se ha descrito con anterioridad.

Capítulo 3:

Clonación, expresión y purificación de autoantígenos importantes en la diabetes tipo 1.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

3.1. Clonaje, expresión y purificación de la glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP).

Se ha descrito que en el modelo animal de la diabetes tipo 1 (ratón diabético no obeso; NOD) tanto en el infiltrado linfocitario de los islotes de Langerhans como en sangre periférica la mayor parte de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos eran específicos contra un péptido de la proteína relacionada con la subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP) (Lieberman y cols. 2003). Además, el porcentaje de linfocitos reactivos contra IGRP en sangre periférica permitía predecir si el animal padecería finalmente la enfermedad. Esta elevada reactividad contra IGRP también se ha observado en ratones NOD humanizados que expresan la molécula de histocompatibilidad humana HLA-A*02:01, que se sabe confiere susceptibilidad a padecer la enfermedad (Takaki y cols. 2006); también se han detectado linfocitos T CD4⁺ específicos para IGRP en humanos (Yang y cols. 2006). Vista la importancia de IGRP como autoantígeno en la diabetes tipo 1 decidimos intentar su expresión y purificación con el fin de utilizar la proteína en investigaciones posteriores que permitan ampliar el conocimiento acerca del papel de IGRP en el desarrollo de la diabetes tipo 1.

El cDNA conteniendo la pauta abierta de lectura para IGRP y obtenido mediante RT-PCR a partir de ARN mensajero de páncreas humano, fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO y su identidad confirmada por secuenciación. IGRP es una proteína de membrana localizada en el retículo endoplasmático, con su extremo amino-terminal dirigido hacia el lumen del retículo y su extremo carboxi-terminal hacia el citoplasma y, aunque no se ha determinado su estructura tridimensional, diversos algoritmos predicen hasta 9 dominios transmembrana (Shieh y cols. 2004). Este dato, unido al hecho de que las proteínas de membrana presentan numerosos problemas en su expresión y purificación en sistemas procariotas, como son toxicidad y baja solubilidad, pueden explicar los resultados infructuosos de expresión de esta proteína en nuestro laboratorio empleando sistemas de expresión habituales en bacterias como pMAL y pCR T7/NT-TOPO, los cuales poseen promotores (TAC y T7, respectivamente) cuya expresión basal parece suficiente para eliminar aquellas bacterias recombinantes conteniendo el vector recombinante (datos no mostrados).

Decidimos entonces emplear un sistema de expresión mucho más específico para proteínas que presentan dificultades de expresión debido a su toxicidad y basado en el empleo de una cepa bacteriana específica, C43 (DE3) (Miroux y cols. 1996). Esta cepa bacteriana contiene membranas internas que permiten la expresión de proteínas transmembrana como

IGRP y que es mucho más resistente a la expresión de un gran número de proteínas tóxicas (Dumon-Seignovert y cols. 2004) (ver Figura 5 en Material y Métodos).

En combinación con la cepa C43 (DE3) la pauta de lectura abierta de IGRP fue subclonada en un vector de expresión que permite un mayor control de expresión de la proteína, el vector pBAD/Thio-TOPO. Este vector posee el promotor *araBAD*, el cual está positiva y negativamente regulado por el producto del gen *AraC* (Ogden y cols 1980; Schleif 1992), un factor regulador de la transcripción que forma un complejo con la L-arabinosa. En ausencia de arabinosa, el dímero de AraC se une al promotor de tal modo que se forma un lazo que impide la transcripción. Al añadir L-arabinosa ésta se une al dímero de AraC, deshaciendo el lazo, y permitiendo el inicio de la transcripción. Este sistema de expresión limita la producción basal de la proteína anulando el efecto tóxico observado con otros vectores de expresión procariotas. Además, el vector genera una proteína de fusión con tiorredoxina lo que aumenta la solubilidad de las proteínas mejorando la eficiencia de la expresión.

Finalmente, el proceso de purificación de proteínas de membrana implica el empleo de detergentes que permitan la correcta solubilización de los microsomas donde dicha proteína está insertada. Tras una búsqueda en la literatura decidimos emplear el detergente fos-colina 12 (FC12) ya que permite la solubilización de un gran número de proteínas de membrana diferentes (Eshaghi y cols. 2005). De esta manera, la combinación específica de cepa bacteriana-vector de expresión-detergente permitió finalmente obtener IGRP en un sistema procariota tal y como se muestra en la Figura 9.

En la Figura 9A se muestra un análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie de los diferentes pasos seguidos en la purificación de IGRP. Se puede observar que a pesar de que el nivel de expresión no es muy elevado (Figura 9A, comparar calles 1 y 2) sí es suficiente para obtener una proteína del tamaño esperado para la construcción Thio-IGRP-V5-His (IGRP con tiorredoxina en el extremo amino-terminal y el epitopo V5 junto con una cola de 6 histidinas en el extremo carboxi-terminal; 57 kDa) con un rendimiento de 0,1 mg/L y al menos un 95% de pureza (Figura 9A, calle 6). La identidad de la proteína purificada como IGRP se llevó a cabo mediante análisis por *western blot* empleando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epitopo V5, ya que no existen anticuerpos monoclonales dirigidos contra IGRP (Figura 9B).

A pesar de conseguir expresar y purificar una proteína transmembrana como IGRP, que presenta una elevada toxicidad en bacterias y cuyo papel en el desarrollo de la diabetes tipo 1 parece establecida, la cantidad obtenida no fue suficiente para poder desarrollar un ELISA que permitiese detectar autoanticuerpos dirigidos contra ella en el suero de individuos diabéticos o para identificar epítopos capaces de activar linfocitos T autorreactivos.

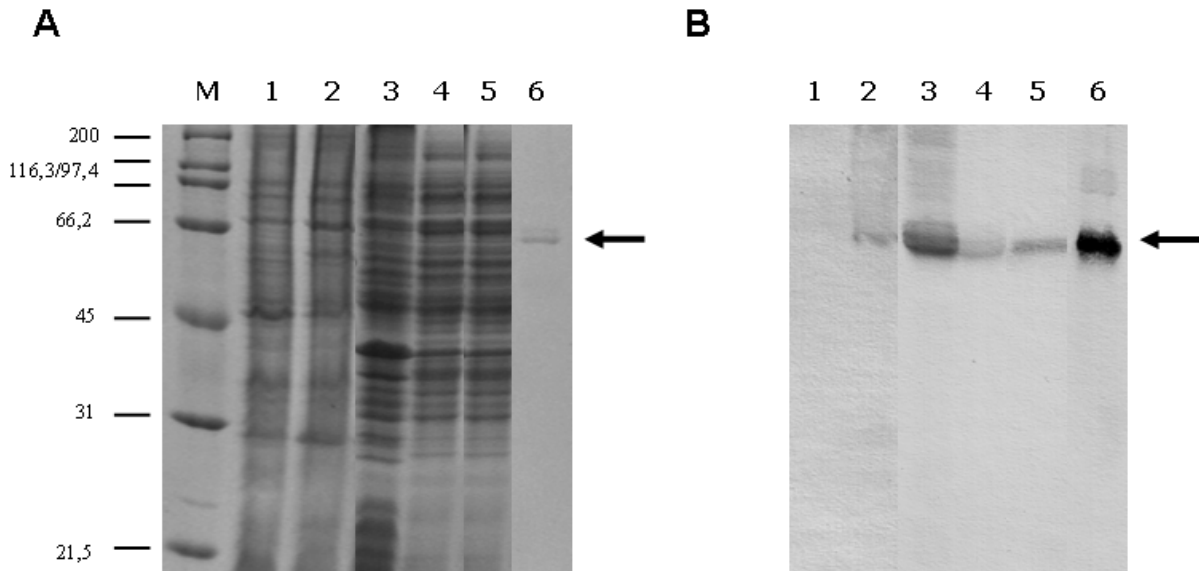


Figura 9. Purificación de la glucosa-6-fosfatasa específica de islotes (IGRP). **A.** Electroforesis desnaturante SDS-PAGE (12,5%) de las distintas etapas seguidas en la purificación de IGRP. Calle M: marcador de peso molecular (kDa); calle 1: lisado de *E. coli* sin inducir con IPTG; calle 2: lisado de *E. coli* tras inducir con IPTG; calle 3: fracción insoluble del extracto bacteriano; calle 4: fracción soluble del extracto bacteriano; calle 5: microsomas solubilizados con foscolina-12; calle 6: IGRP purificada mediante cromatografía de afinidad. **B.** Análisis por *western blot* empleando un anticuerpo monoclonal contra el epítopo V5 de las muestras indicadas en **A**. La flecha señala la posición esperada para IGRP (57 kDa).

3.2. Clonaje, expresión y purificación de GFAP.

Muchos de los autoanticuerpos descritos para la diabetes tipo 1 reconocen proteínas constituyentes del sistema nervioso central y/o periférico (GAD₆₅, IA-2), lo que hace de las proteínas expresadas por células de este tipo un interesante campo de búsqueda de nuevos autoantígenos. Las células de Schwann que rodean a los islotes de Langerhans parecen ser unas de las primeras células en sufrir el ataque autoinmune en la diabetes tipo 1 ya en estadios prediabéticos. Se han derivado líneas de linfocitos T a partir de ratones NOD específicas contra la proteína ácida de la glía (GFAP), proteína expresada por las células de Schwann. Dichas líneas celulares GFAP-específicas son capaces de transferir la enfermedad a ratones inmunodeficientes. Asimismo la inmunoterapia con GFAP previene la diabetes en ratones NOD (Winer y cols. 2003). Es por ello que decidimos abordar la expresión y purificación de GFAP, con el fin de ampliar el conocimiento sobre su papel en la diabetes tipo 1 en humanos.

La pauta de lectura abierta para la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) fue subclonada en el vector de expresión pCR T7/NT-TOPO. Al inducir la síntesis de la proteína mediante IPTG se observa la acumulación en cuerpos de inclusión de una proteína con un tamaño aproximado de 54 kDa, que es el tamaño esperado para GFAP (Figura 10). Ninguna de las modificaciones en las condiciones del cultivo como la disminución de la temperatura de inducción o la reducción de la concentración de IPTG permitieron la expresión de dicha proteína de forma soluble, razón por la cual se emplearon condiciones desnaturalizantes para purificarla y conservarla para evitar su precipitación, tal y como se describe en Materiales y Métodos. La identidad de dicha proteína purificada como GFAP fue comprobada mediante análisis de *western blot* empleando un anticuerpo monoclonal específico para GFAP (Figura 10B).

Con el fin de producir una forma soluble de GFAP la pauta de lectura abierta de GFAP fue subclonada en el vector pMAL-c2 para generar una proteína de fusión con la proteína de unión a maltosa (MBP) en el extremo amino-terminal, con un tamaño aparente de 96 kDa. Dicha proteína de fusión fue purificada mediante cromatografía de afinidad empleando columnas de amilosa (Figura 10C) y su identidad como la proteína de fusión MBP-GFAP fue comprobada mediante análisis por *western blot* empleando anticuerpos monoclonales dirigidos tanto contra GFAP como contra MBP (Figura 10D). La pureza con que se obtuvieron ambas formas de GFAP fue de al menos un 95%, con rendimientos de 20 mg/L para GFAP y 8 mg/L para MBP-GFAP.

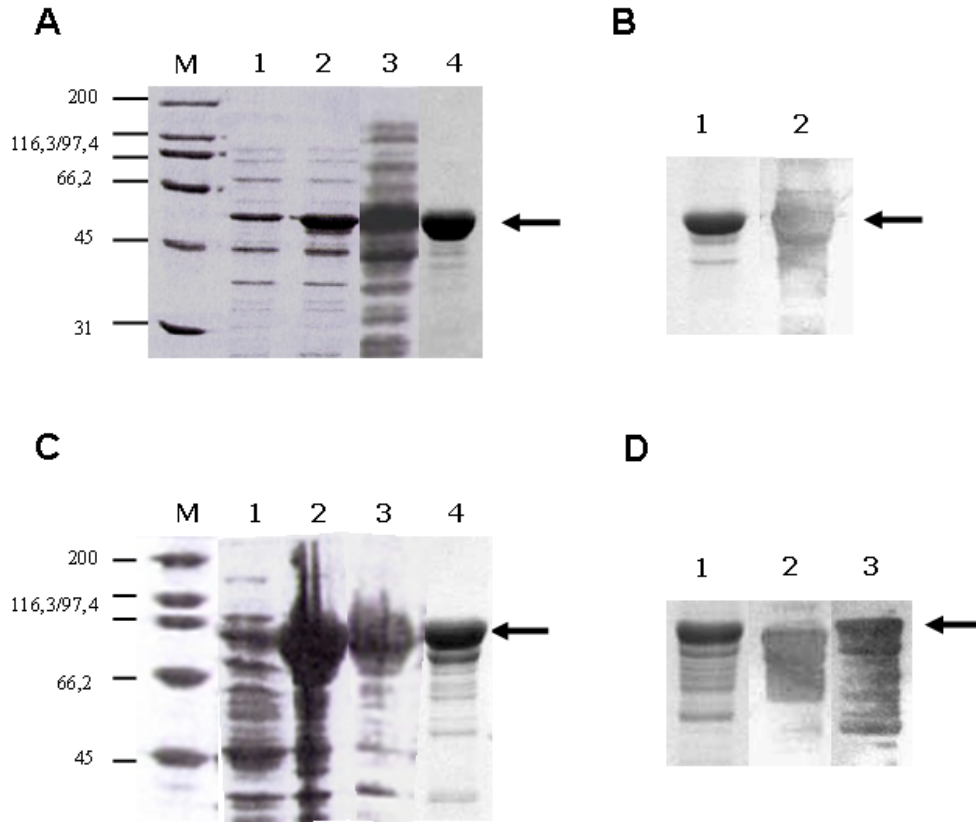


Figura 10. Purificación de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y GFAP fusionada con la proteína de unión a maltosa (MBP-GFAP). **A.** Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (12,5%) de las diferentes etapas de purificación de GFAP. Calle M: marcador de peso molecular (kDa); calle 1: lisado de *E. coli* sin inducir con IPTG; calle 2: lisado de *E. coli* tras inducir con IPTG; calle 3: fracción soluble en 8M urea del extracto bacteriano conteniendo GFAP; calle 4: GFAP purificada mediante cromatografía de afinidad empleando resina de níquel. La flecha señala la posición esperada para GFAP (57 kDa). **B.** Confirmación mediante análisis por *western blot* de la purificación de GFAP. Calle 1: proteína separada mediante electroforesis SDS-PAGE y visualizada mediante tinción con azul de coomassie; calle 2: membrana de nitrocelulosa visualizada empleando un anticuerpo monoclonal anti-GFAP. **C.** Electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (12,5%) de las diferentes etapas de purificación de MBP-GFAP. Calle M: marcador de peso molecular (kDa); calle 1: lisado de *E. coli* sin inducir con IPTG; calle 2: lisado de *E. coli* tras inducir con IPTG; calle 3: fracción soluble del extracto bacteriano conteniendo MBP-GFAP; calle 4: MBP-GFAP purificada mediante cromatografía de afinidad empleando resina de amilosa. La flecha señala la posición esperada para MBP-GFAP (96 kDa). **D.** Confirmación mediante análisis por *western blot* de la purificación de MBP-GFAP. Calle 1: proteína separada mediante electroforesis SDS-PAGE y visualizada mediante tinción con azul de coomassie; calle 2: membrana de nitrocelulosa visualizada empleando un anticuerpo monoclonal anti-GFAP; calle 3: membrana de nitrocelulosa visualizada empleando un anticuerpo monoclonal anti-MBP.

3.3. Clonaje, expresión y purificación de S100 β .

S100 β es una proteína de unión a calcio que funciona como factor neurotrófico y de supervivencia neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso central, y es expresada a niveles altos en el cerebro. Asimismo es sabido que, al igual que GFAP, también es expresada por las células de Schwann que rodean los islotes pancreáticos (Sunami y cols. 2001). Se ha descrito recientemente que S100 β es reconocida como un autoantígeno temprano en ratones NOD, y que en pacientes con diabetes tipo 1 existe una clara respuesta linfocitaria contra este autoantígeno (Winer y cols. 2003; Banwell y cols. 2008). Es por ello que hemos decidido producir y purificar esta proteína para abordar su papel como autoantígeno en la diabetes tipo 1.

La pauta de lectura para la proteína S100 β fue subclonada en el vector pCR T7/NT-TOPO de forma que la proteína de fusión generada posea una cola de 6 histidinas en su extremo amino-terminal. Para obtener una proteína S100 β biotinilada que pudiese ser empleada en los experimentos del sistema de presentación de antígeno (SPA; ver Capítulo 5) se insertó en el extremo carboxi-terminal de S100 β una secuencia de biotinilización (*biotag*) de 17 aminoácidos (ver Materiales y Métodos), para que dicha proteína pudiese ser biotinilada de forma eficiente *in vitro* mediante la enzima *BirA*. Tal y como se aprecia en la Figura 11A, una proteína soluble de aproximadamente 16 kDa se acumula en bacterias BL21 (DE3) pLysS al añadir IPTG, existiendo cierta expresión basal (Figura 11A, comparar calles 1 y 2). Dicha proteína fue purificada mediante cromatografía de afinidad empleando resina de níquel en condiciones nativas no desnaturalizantes, y su identidad como S100 β fue confirmada mediante análisis por *western blot* empleando un anticuerpo monoclonal contra la cola de histidinas y un anticuerpo monoclonal anti-S100 β (Figura 11B). La pureza con que se obtuvo fue de al menos un 95%, con un rendimiento de 25 mg/L.

Una vez purificada, S100 β fue biotinilada *in vitro* empleando la enzima *BirA* tal y como se describe en Materiales y Métodos, y el producto de dicha reacción fue purificado por cromatografía de afinidad empleando la resina *Soft-Link*, que dispone de sitios activos capaces de unir biotina. El resultado de dicha purificación se muestra en la Figura 11C; la eficiencia de la biotinilación *in vitro* de la proteína S100 β conteniendo un epítopo de biotinilación fue verificada mediante análisis por *western blot* empleando estreptavidina conjugada con peroxidasa y un anticuerpo monoclonal anti-S100 β (Figura 11D). El rendimiento final de purificación de la proteína S100 β biotinilada es de aproximadamente 1,5

mg/L, ya que en el paso de biotinización queda proteína sin biotinar o muy poco biotinilada, como se aprecia en las calles 1 y 2 de la Figura 11D. La pureza final de la proteína S100 β empleada en el sistema de presentación de antígeno fue de al menos un 98%.

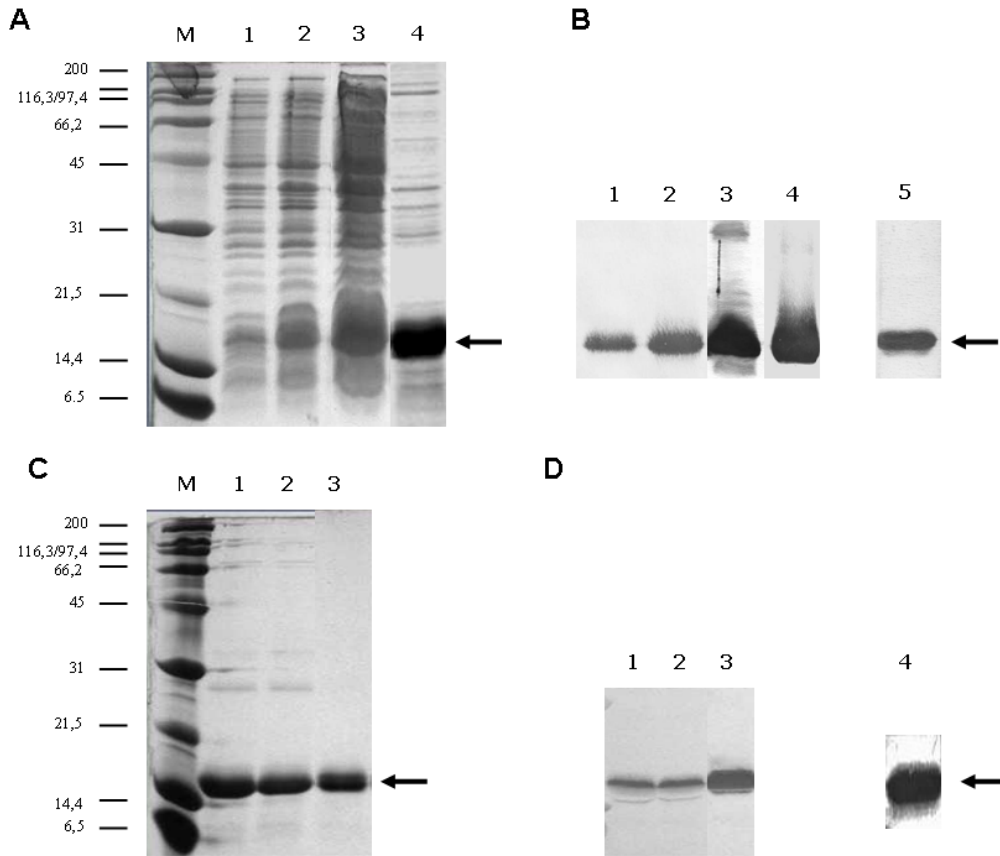


Figura 11. Purificación de S100 β biotinilada in vitro mediante cromatografía de afinidad empleando resinas de níquel y de avidina. **A.** Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (14%) mostrando diferentes etapas de la purificación de S100 β mediante cromatografía de afinidad empleando resinas de níquel. Calle M: marcador de peso molecular (kDa); calle 1: lisado de *E. coli* sin inducir con IPTG; calle 2: lisado de *E. coli* tras inducir con IPTG; calle 3: fracción soluble del extracto bacteriano conteniendo S100 β ; calle 4: proteína S100 β purificada mediante resina de níquel. **B.** Análisis por *western blot* de las muestras indicadas presentes en A empleando un anticuerpo monoclonal contra la cola de histidinas (calles 1-4); calle 5: análisis por *western blot* de la proteína purificada mostrada en A empleando un anticuerpo monoclonal anti-S100 β . **C.** Electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (14%) mostrando diferentes etapas de la purificación de S100 β biotinilada *in vitro*, mediante cromatografía de afinidad empleando resina de avidina. Calle M: marcador de peso molecular (kDa); calle 1: fracción no retenida por la resina de avidina; calle 2: lavado de la resina de avidina; calle 3: proteína S100 β biotinilada purificada. **D.** Análisis por *western blot* de las muestras presentes en C empleando estreptavidina conjugada a peroxidasa (calles 1-3); calle 4: análisis por *western blot* de la proteína purificada mostrada en C empleando un anticuerpo monoclonal anti-S100 β .

3.4. Resumen.

La proteína IGRP ha sido expresada en un sistema procariota mediante una combinación concreta de vector (pBAD/Thio-TOPO), células (C43 (DE3)) y detergente (FC12), con al menos un 95% de pureza aunque con sólo un rendimiento de 0,1 mg/L, insuficiente para su empleo en experimentos subsiguientes. La mejora de este sistema permitirá la expresión de una proteína extremadamente tóxica como IGRP en cantidades suficientes para caracterizaciones posteriores.

Los otros dos antígenos de este trabajo, GFAP y S100 β , han sido expresados y purificados con éxito y en grandes cantidades. El antígeno GFAP ha sido expresado y purificado tanto en condiciones desnaturalizantes (GFAP) como nativas (MBP-GFAP), con una pureza de al menos un 95% y con rendimientos de 20 mg/L (GFAP) y 8 mg/L (MBP-GFAP). En el caso de la proteína S100 β , ésta ha sido expresada y purificada en condiciones nativas, con una pureza de al menos un 95% y un rendimiento de 25 mg/L. Su posterior biotinización *in vitro* y purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de avidina aumenta la pureza de la proteína hasta, al menos, un 98%, con un rendimiento aceptable de 1,5 mg/L.

Capítulo 4:

Determinación de anticuerpos contra GFAP y S100 β en pacientes con diabetes tipo 1.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

4.1. Determinación de autoanticuerpos contra GFAP.

Hasta la fecha, la presencia de autoanticuerpos contra GFAP en la diabetes humana ha sido detectada empleando un método que utiliza la espectrometría de masas para identificar la presencia de inmunoglobulinas específicas (SELDI) (Winer y cols. 2003). Para cuantificar el nivel de autoanticuerpos anti-GFAP en plasma de diabéticos empleando sistemas más comunes en los laboratorios de diagnóstico clínico se desarrolló un sistema de ELISA utilizando la forma no fusionada de GFAP expresada y purificada tal y como se ha descrito anteriormente. El sistema de ELISA descrito en este trabajo tiene unas variaciones intra- e interensayo del 2.1% y 7.8%, respectivamente. En la Figura 12 se muestran las distribuciones de los niveles de autoanticuerpos anti-GFAP tanto en individuos sanos no diabéticos (Figura 12, columna Control) como en pacientes diabéticos de tipo 1 (Figura 12, columna T1DM) o de tipo 2 (Figura 12, columna T2DM).

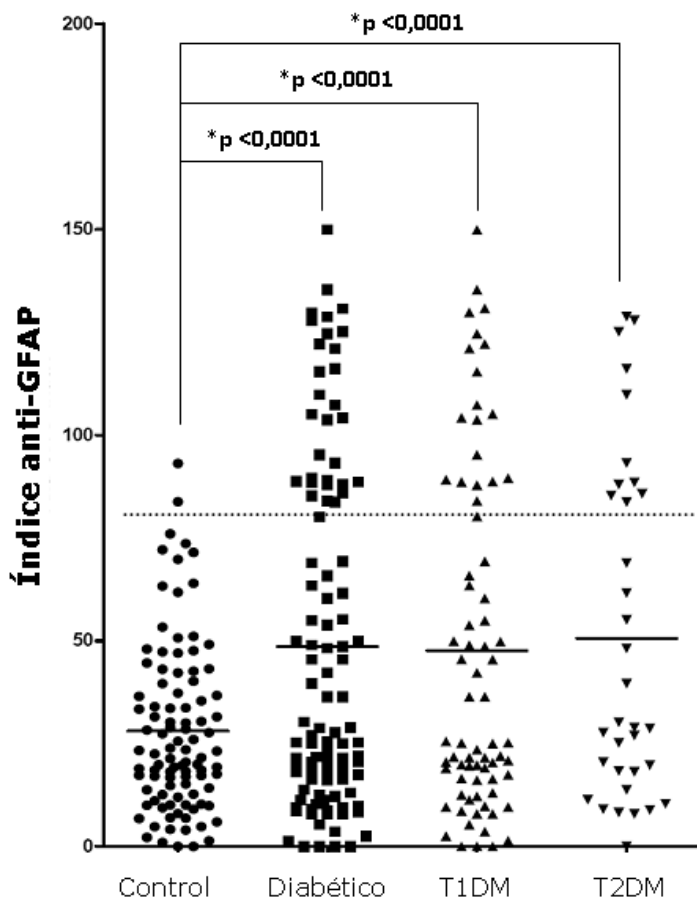


Figura 12: Distribución de los niveles de autoanticuerpos anti-GFAP en plasma. Niveles de IgGs determinados mediante ELISA en plasma de controles sanos (círculos), pacientes diabéticos (tipo 1 y tipo 2, cuadrados), pacientes diabéticos de tipo 1 (triángulos) y pacientes diabéticos de tipo 2 (triángulos invertidos). La línea punteada muestra el percentil 99° de la distribución en controles sanos. Las líneas continuas representan la media para cada distribución. Existen diferencias significativas en la cantidad de muestras positivas (por encima del percentil 99° de los controles sanos) para anti-GFAP tanto en pacientes con diabetes tipo 1 como con diabetes tipo II en comparación con los controles sanos (test exacto de Fisher).

Utilizando como punto de corte el percentil 99° de los niveles observados en individuos sanos no diabéticos, 28 pacientes diabéticos (26,2%) fueron positivos para autoanticuerpos anti-GFAP (Figura 12, columna diabético). Esta frecuencia es significativamente mayor que la observada en controles sanos ($p < 0,0001$, test exacto de Fisher). En el caso de pacientes diabéticos de tipo 1, 18 pacientes (24,7%) fueron positivos para anticuerpos contra GFAP (Figura 12, columna T1DM), comparado con sólo 1 individuo control no diabético ($p < 0,0001$, test exacto de Fisher). Para este grupo de pacientes la sensibilidad del ensayo es del 24,6% y su especificidad del 98,9%, con un valor predictivo positivo del 94,7%. En el caso de pacientes diabéticos de tipo 2, 10 individuos (29,4%) fueron positivos para anticuerpos contra GFAP (Figura 12, columna T2DM) y, aunque esta diferencia es estadísticamente significativa al compararse con los controles sanos ($p < 0,0001$, test exacto de Fisher), hay que tener en cuenta que existe igualmente una diferencia significativa de edad ($p < 0,0001$, test t de student) entre los pacientes diabéticos de tipo 2 y los otros grupos de estudio (Tabla 4).

	Controles	T1DM	T2DM
Número	98	73	34
Edad (media ± SD)	33,4 ± 13,0	27,0 ± 11,6	53,3 ± 8,3 *
Hombres	58 (59,2%)	44 (60,3%)	21 (61,8%)
Mujeres	40 (40,8%)	20 (39,7%)	13 (38,2%)
Glucosa (mg/dl; media ± SD)	94 ± 14	198 ± 82	222 ± 83
HbA1c (%; media ± SD)	5,6 ± 0,6	9,2 ± 2,3	9,1 ± 1,8
Fructosamina (µmol; media ± SD)	254 ± 0,38	538 ± 144	405 ± 114
Tiempo transcurrido desde el diagnóstico (meses)		119 ± 117	129 ± 72
Mediana de los niveles de anti-GFAP (índice)	22,85	25,22 †	29,58 ‡

Tabla 4. Parámetros demográficos y bioquímicos de individuos sanos (controles), pacientes diabéticos de tipo 1 (T1DM) y pacientes diabéticos de tipo 2 (T2DM).

* $p < 0,0001$ comparado con controles sanos o pacientes con T1DM (t-student con la corrección de Welch).

† $p = 0,019$ comparado con controles sanos (test de Mann-Whitney).

‡ $p = 0,016$ comparado con controles sanos (test de Mann-Whitney).

Además de una mayor frecuencia de individuos diabéticos con niveles de autoanticuerpos anti-GFAP superiores a los de individuos sanos no diabéticos, al comparar las medianas de los niveles de anti-GFAP se observan diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes diabéticos y los controles sanos, de forma que tanto los pacientes

diabéticos de tipo 1 como los de tipo 2 presentan mayores niveles de estos autoanticuerpos (25,22 y 29,58 respectivamente) comparado con los controles sanos (22,85) (Tabla 4). La razón de por qué los diabéticos tipo 2 presentan niveles de anti-GFAP elevados podría explicarse por el hecho de que los niveles de estos autoanticuerpos parecen aumentar con la edad, hasta adquirir en controles sanos, según algunos autores, niveles prácticamente equivalentes a los mostrados en pacientes con la enfermedad de Alzheimer en su estado pre-senil (Mecocci y cols. 1995). Nosotros hemos observado diferencias de edad estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con diabetes tipo 2 y los otros dos grupos (controles sanos y pacientes con diabetes tipo 1), por lo que, al menos *a priori*, dichas diferencias en los niveles de anticuerpos anti-GFAP en este grupo pueden venir determinadas por una edad significativamente mayor respecto de los controles.

Es por ello que decidimos analizar la posible correlación entre el nivel de autoanticuerpos anti-GFAP tanto con el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad como con la edad en aquellos pacientes positivos para anti-GFAP. Hay que tener en cuenta que GFAP es una proteína expresada en muchos otros tipos celulares, además de las células de peri-Schwann que rodean los islotes, y su persistencia o nivel podrían indicar una respuesta inmune contra esta proteína continuada en el tiempo. Este análisis muestra una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de anti-GFAP y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico (coeficiente de correlación de Pearson: 0,497; $p = 0,036$) (Figura 13A), pero no con la edad del paciente (coeficiente de correlación de Pearson: 0,09; $p = 0,72$) (Figura 13B). En individuos sanos tampoco existe correlación entre los niveles de anti-GFAP y la edad (coeficiente de correlación de Pearson: 0,21; $p = 0,17$) (Figura 13C).

Esto nos permite sugerir que, en realidad, en aquellos pacientes donde se detecta la presencia de autoanticuerpos la respuesta inmune contra este antígeno continúa a pesar de haber sido destruidos gran parte de los islotes, como indica el desarrollo de síntomas clínicos de la enfermedad en pacientes diabéticos de tipo 1, y que en pacientes diabéticos de tipo 2 más que la edad la explicación más plausible a los niveles de estos anticuerpos anti-GFAP sea el daño neurológico causado por la enfermedad de forma que estos autoanticuerpos podrían servir como un marcador de daño del sistema nervioso en estos pacientes.

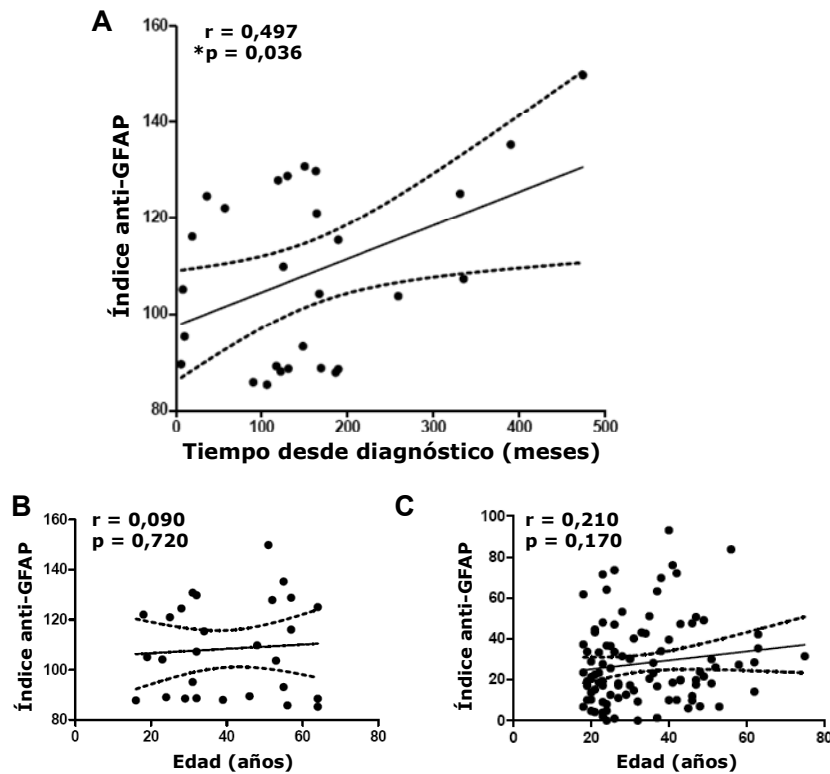


Figura 13. Correlaciones entre los niveles de anticuerpos anti-GFAP y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico y la edad. A. Correlación entre los niveles de anticuerpos IgG anti-GFAP en pacientes diabéticos positivos para estos anticuerpos y el tiempo transcurrido desde el diagnóstico. **B y C.** Correlación entre la edad y los niveles de anticuerpos anti-GFAP en pacientes diabéticos positivos para estos anticuerpos (**B**) o en sujetos sanos (**C**). Las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%.

Para comprobar que el sistema de ELISA desarrollado en nuestro laboratorio detecta una respuesta específica contra GFAP y no respuestas contra posibles contaminantes que copurifiquen con GFAP, plasmas de pacientes diabéticos de tipo 1 tanto positivos como negativos para anti-GFAP por ELISA fueron analizados mediante *western blot*. Como se puede observar en la Figura 14A, cuando membranas de nitrocelulosa conteniendo GFAP fueron incubadas con plasmas de pacientes diabéticos de tipo 1 positivos para autoanticuerpos anti-GFAP y reveladas para mostrar la presencia de IgGs, se detecta claramente la presencia de una banda de unos 54 kDa que coincide con la posición esperada para GFAP (Figura 14A, GFAP positivo, tira -); sin embargo, membranas conteniendo GFAP pero incubadas con plasmas de pacientes diabéticos de tipo 1 negativos para autoanticuerpos anti-GFAP no se detecta la presencia de dicha banda (Figura 14A, GFAP negativo, tira -). Además, dicha señal se ve significativamente reducida al preincubar los plasmas positivos mediante ELISA con la forma soluble de GFAP, la proteína de fusión MBP-GFAP (Figura 14A, GFAP positivo, comparar tiras - y +).

Para comprobar la especificidad de la señal observada en los análisis de *western blot*, realizamos dicho análisis empleando membranas que contenían tanto MBP como MBP-GFAP, y que fueron incubadas con plasmas positivos para autoanticuerpos anti-GFAP obtenidos tanto de individuos sanos (Figura 14B, control sano) como de pacientes diabéticos de tipo 1 (Figura 14B, T1DM) o pacientes diabéticos de tipo 2 (Figura 14B, T2DM). Cuando estas membranas fueron incubadas con dichos plasmas sólo se detectó la banda correspondiente a MBP-GFAP (Figura 14B, calles 1). De nuevo, esta detección es específica para la región GFAP de la proteína de fusión porque no hay detección de MBP, y porque la banda correspondiente a la proteína de fusión desaparece al preincubar las muestras con MBP-GFAP (Figura 14B, calles 3) pero no al preincubar con MBP sola (Figura 14B, calles 2).

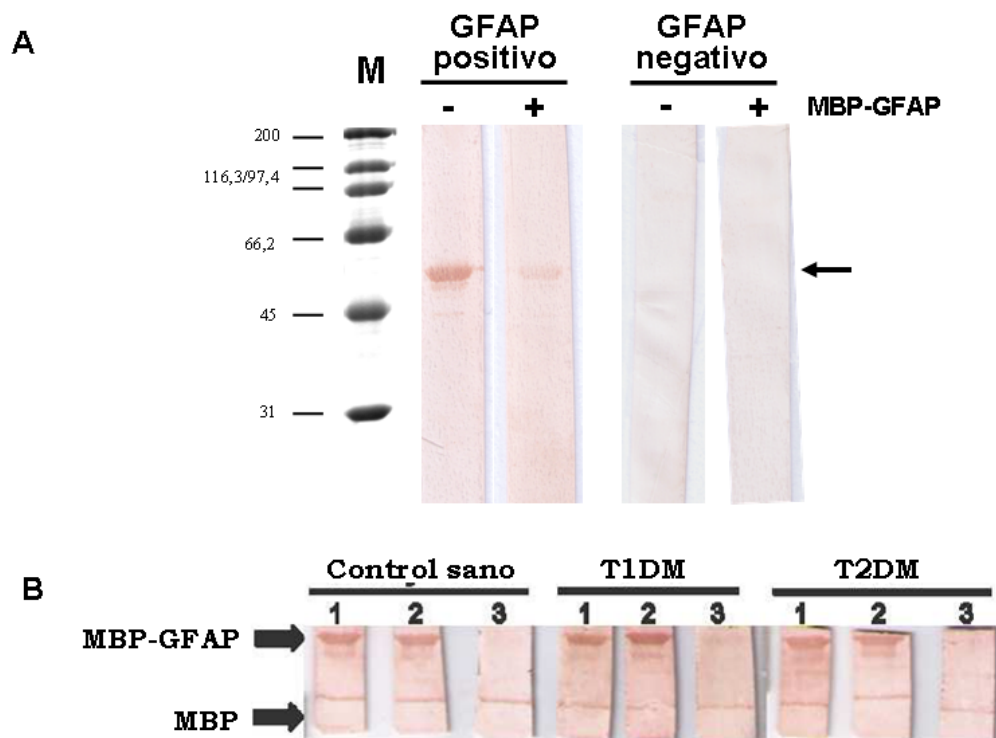


Figura 14. Análisis por *western blot* de autoanticuerpos IgG anti-GFAP en plasma y especificidad de la detección. **A.** Para la detección de anticuerpos IgG anti-GFAP mediante *western blot* se incubaron membranas de nitrocelulosa conteniendo GFAP con plasmas de individuos positivos por ELISA para estos anticuerpos (GFAP positivo) o negativos (GFAP negativo) y se revelaron empleando anticuerpos secundarios anti-IgG humana. La especificidad de esta detección se comprobó mediante la preincubación (membranas +) o no (membranas -) del plasma con la proteína de fusión soluble MBP-GFAP. **B.** Para el análisis de la especificidad de la detección de anticuerpos anti-GFAP mediante *western blot*, la proteína de unión a maltosa (MBP) y la proteína de fusión MBP-GFAP fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con plasmas de individuos positivos por ELISA para anticuerpos anti-GFAP. Al revelar las membranas, los anticuerpos presentes se unen sólo a la proteína de fusión MBP-GFAP (calles 1). El prebloqueo de dichos plasmas con la proteína de fusión MBP-GFAP (calles 3) pero no con MBP (calles 2) elimina la detección de la proteína MBP-GFAP, confirmando la especificidad por GFAP de estos autoanticuerpos.

Los anticuerpos dirigidos contra GFAP fueron detectados utilizando un antígeno obtenido en bacterias, las cuales carecen de muchos de los elementos necesarios para una correcta y completa modificación post-traducciona de proteínas eucariotas, por lo que para verificar que dichos autoanticuerpos reconocen a la proteína GFAP sintetizada y modificada en una célula eucariota, plasmas positivos y negativos para autoanticuerpos anti-GFAP fueron utilizados en tinciones de doble inmunofluorescencia en córtex somatosensorial de rata adulta junto con un anticuerpo monoclonal contra GFAP.

En dichas secciones de tejido neuronal se detecta un número elevado de células teñidas con el anticuerpo monoclonal dirigido contra GFAP y que poseen la típica morfología estrellada de los astrocitos, siendo éstas células que expresan GFAP (Bignami y cols. 1974) (Figura 15, paneles A y D). Estas mismas células GFAP⁺ son también inmunoreactivas cuando se usa un plasma de un paciente diabético de tipo 1 positivo para anticuerpos anti-GFAP por ELISA (Figura 15, panel B) tal y como muestra la superposición de ambas tinciones (Figura 15, panel C). Sin embargo, al emplear un plasma de un paciente diabético de tipo 1 negativo para estos autoanticuerpos no se observa una tinción de células con morfología de astrocitos (Figura 15, panel E) ni una superposición con las células inmunoreactivas frente al anticuerpo monoclonal (Figura 15, panel F).

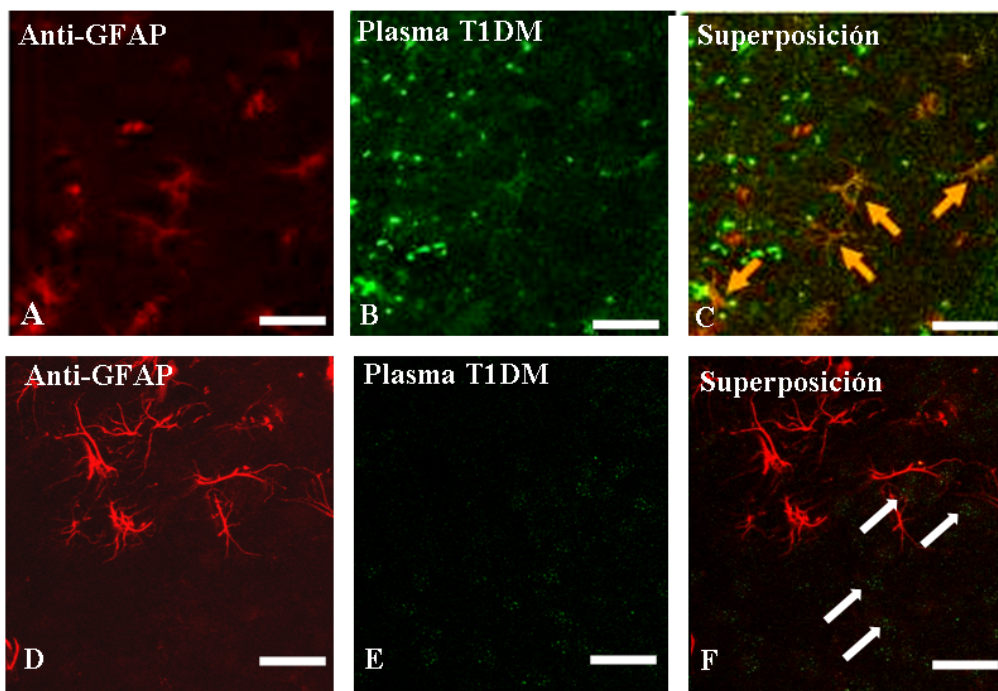


Figura 15. Detección de anticuerpos anti-GFAP mediante microscopia confocal en córtex somatosensorial de rata. Un plasma positivo por ELISA para anticuerpos anti-GFAP (paneles A-C) y

otro negativo (paneles D-F) fueron incubados con secciones de córtex de rata y con un anticuerpo monoclonal anti-GFAP. La unión del anticuerpo monoclonal contra GFAP (paneles A y D, rojo) revela células con la típica morfología estrellada de los astrocitos. Sin embargo, sólo en el caso del plasma positivo para anticuerpos anti-GFAP (panel B, verde) pero no en el plasma negativo (panel E) se detecta la presencia de células inmunoreactivas que coinciden con los astrocitos (panel C, flechas) situación que no ocurre en el caso de un plasma negativo (panel F, flechas).

Las complicaciones crónicas de la diabetes afectan a diferentes órganos y son responsables de la elevada morbilidad y mortalidad de la enfermedad. Nosotros hemos analizado la relación entre la detección de autoanticuerpos anti-GFAP y distintas complicaciones diabéticas como retinopatía, nefropatía y neuropatía (Tabla 5). Un elevado porcentaje de pacientes diabéticos con autoanticuerpos anti-GFAP tienen al menos una complicación diabética crónica, variando desde el 67,9% de pacientes con retinopatía al 28,6% con neuropatía; la diferencia en este porcentaje es estadísticamente significativa en pacientes positivos para anticuerpos anti-GFAP (Anti-GFAP +) comparados con pacientes negativos para dichos autoanticuerpos (Anti-GFAP -) en el caso de la retinopatía (Tabla 5; $p = 0,015$, test exacto de Fisher).

Complicación diabética	Anti-GFAP + % (pacientes positivos/ pacientes totales)	Anti-GFAP - % (pacientes negativos/ pacientes totales)
Retinopatía *	67,9% (19/28)	39,2% (31/79)
Nefropatía	39,2% (11/28)	20,3% (16/79)
Neuropatía	35,7% (10/28)	20,3% (16/79)

Tabla 5. Porcentaje de complicaciones diabéticas en pacientes diabéticos de tipo 1 con y sin autoanticuerpos anti-GFAP. * $p = 0,015$ comparando pacientes diabéticos anti-GFAP - y pacientes diabéticos anti-GFAP + (test exacto de Fisher).

No existe diferencia de edad entre ambos grupos (Anti-GFAP + y Anti-GFAP -, $41,9 \pm 15,3$ vs. $45,1 \pm 16,5$, años; $p = 0,51$, test U de Mann-Whitney), pero sí una clara tendencia de los pacientes positivos para anticuerpos anti-GFAP a que haya transcurrido más tiempo desde el diagnóstico de la enfermedad (Anti-GFAP +: $203,7 \pm 100,2$. Anti-GFAP -: $152,1 \pm 77,1$;

meses), aunque dicha tendencia no es estadísticamente significativa ($p = 0,07$, test U de Mann-Whitney).

Un análisis más detallado de los datos (Figura 16) muestra que los pacientes con dos o tres complicaciones diabéticas crónicas tienden a ser de mayor edad que aquellos que tienen una sola complicación (Figura 16A; $47,7 \pm 15,1$ vs. $40,6 \pm 16,4$; años), ha transcurrido más tiempo desde su diagnóstico (Figura 16B; $224,7 \pm 107,7$ vs. $137,4 \pm 46$; meses) y tienen un mayor nivel de autoanticuerpos anti-GFAP (Figura 16C; $85,8 \pm 41$ vs. $68,8 \pm 46,5$). Sin embargo sólo existen diferencias estadísticamente significativas para el caso del tiempo transcurrido desde el diagnóstico ($p = 0,006$; test U de Mann-Whitney) (Figura 16B), de nuevo apoyando la idea de que la respuesta autoinmune contra GFAP continua aún después del desarrollo de síntomas clínicos de la enfermedad y que su nivel depende del tiempo transcurrido desde el diagnóstico más que de la edad del paciente.

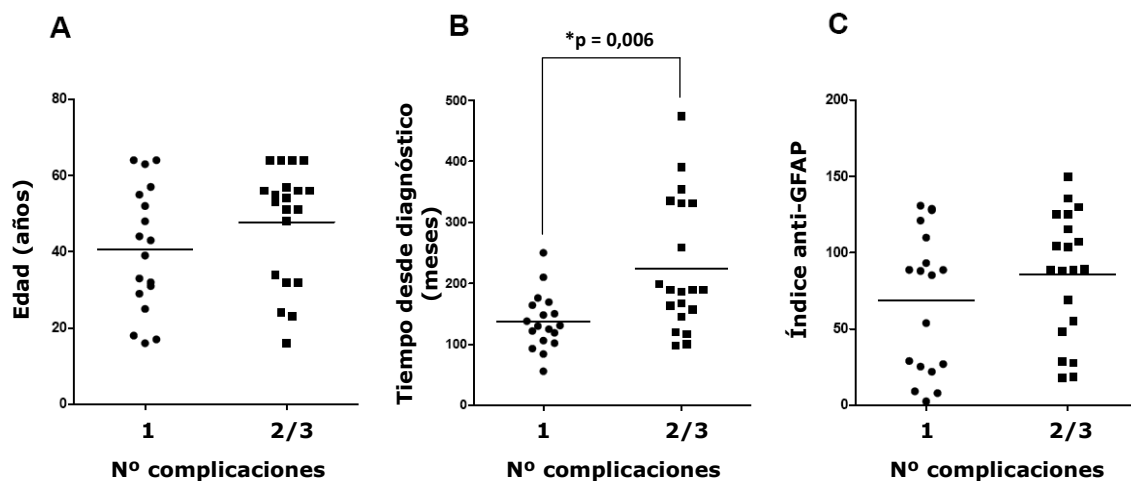


Figura 16. Distribución de edad, tiempo transcurrido desde el diagnóstico y nivel de anticuerpos anti-GFAP en pacientes diabéticos con complicaciones crónicas. Pacientes con sólo una complicación crónica (columna "1") fueron comparados con aquellos pacientes con dos o tres complicaciones (columna "2/3") para comprobar si existen diferencias en edad (A), tiempo transcurrido desde el diagnóstico (B) y/o niveles de anti-GFAP (C). Las tres variables tienden a tener valores mayores en aquellos pacientes con 2 o 3 complicaciones, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el caso del tiempo transcurrido desde el diagnóstico (panel B) (Test U de Mann-Whitney). Las complicaciones estudiadas fueron retinopatía, nefropatía y neuropatía.

4.2. Determinación de autoanticuerpos contra S100β.

Al igual que en el caso ya descrito de GFAP, hemos desarrollado también un sistema de ELISA para cuantificar el nivel de autoanticuerpos anti-S100β en controles sanos y pacientes con diabetes de tipo 1 o de tipo 2. El ELISA aquí descrito tiene un límite de detección de 5,4 μg/dL de equivalentes de monoclonal, y las variaciones intra- e inter-ensayo son del 7% y del 9% respectivamente.

La Figura 17 muestra la distribución del título de equivalentes de monoclonal de anti-S100β tanto en controles sanos como en pacientes diabéticos. Tomando el percentil 95° de los niveles observados en controles como punto de corte (equivalente a un título de monoclonal de 15 μg/dL o menor), 4 pacientes diabéticos (6%) fueron positivos para autoanticuerpos anti-S100β. Se observó una frecuencia similar en los controles sanos (3 individuos; 5%) y las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas ($p = 1,00$, test exacto de Fisher). De los pacientes diabéticos de tipo 1, 3 fueron positivos para anti-S100β (6,8%) mientras que sólo un paciente diabético de tipo 2 (4,2%) fue positivo para estos autoanticuerpos.

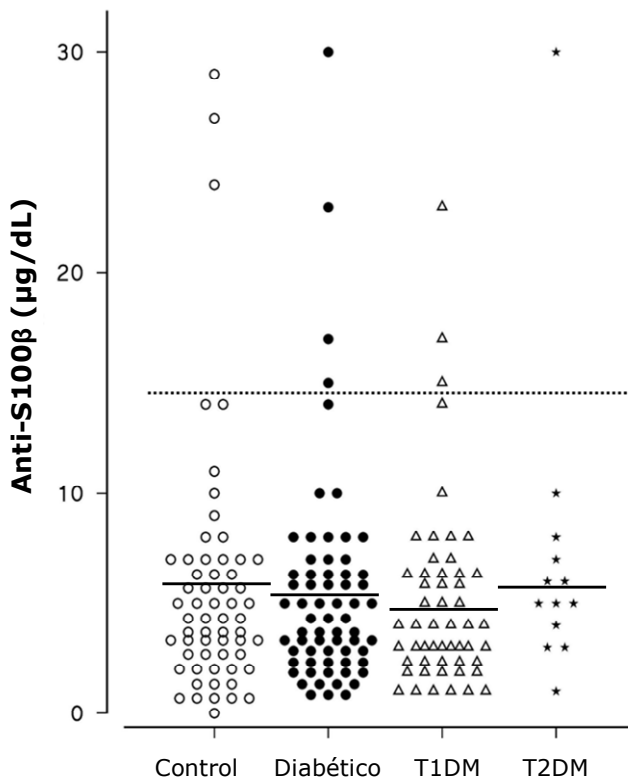


Figura 17. Distribución de los niveles de anticuerpos anti-S100β en plasma. Se muestra la distribución del título de anticuerpos anti-S100β, expresado en equivalentes de anticuerpo monoclonal (μg/dL), en controles sanos (círculos blancos), pacientes diabéticos de tipo 1 y 2 (círculos negros), pacientes diabéticos de tipo 1 (triángulos) y pacientes diabéticos de tipo 2 (estrellas). La línea punteada representa el percentil 95° de la distribución de los individuos sanos. Las líneas continuas representan la media para cada distribución. No se hallaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

Los resultados de ELISA muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de autoanticuerpos anti-S100 β entre controles sanos y pacientes diabéticos, algo que a primera vista resulta sorprendente si consideramos que en los pacientes diabéticos de tipo 1 S100 β es un claro objetivo de la respuesta autoinmune (Winer y cols. 2003; Banwell y cols. 2008). Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con los observados por otros autores que detectan niveles equivalentes de autoanticuerpos anti-S100 β entre individuos sanos y pacientes diabéticos, tanto de tipo 1 como de tipo 2, empleando un sistema de *western blot* como sistema de detección (Hovsepyan y cols. 2004).

Para tratar de averiguar la razón de por qué aparentemente no existen diferencias entre ambos tipos de sujetos en cuanto al nivel de autoanticuerpos anti-S100 β , decidimos analizar los plasmas de 26 sujetos control y 29 pacientes diabéticos de tipo 1 mediante *western blot* de forma que también podríamos confirmar o desmentir los datos de otros autores (Hovsepyan y cols. 2004). Dicho análisis muestra un resultado sorprendente ya que se observan cuatro patrones claros de respuesta frente a la proteína S100 β empleada en este trabajo, patrones que se muestran en la Figura 18. Estos cuatro patrones se corresponden con la no presencia de autoanticuerpos anti-S100 β (Figura 18, membrana 1), la detección de una proteína de unos 13 kDa (Figura 18, membrana 2), la detección de una proteína del tamaño esperado para S100 β - 16 kDa- (Figura 18, membrana 3) o la detección de ambas proteínas a la vez (Figura 18, membrana 4).

La clara detección de una proteína de un tamaño menor al esperado para S100 β es interesante ya que, como se señala más adelante, la mayor parte de los diabéticos respondían más frecuentemente contra esta proteína que contra la proteína de fusión S100 β completa, de forma que decidimos estudiar la identidad de dicho antígeno partiendo de la idea de que podría tratarse de un fragmento de la proteína S100 β empleada en este trabajo (ver Figura 20 para un esquema).

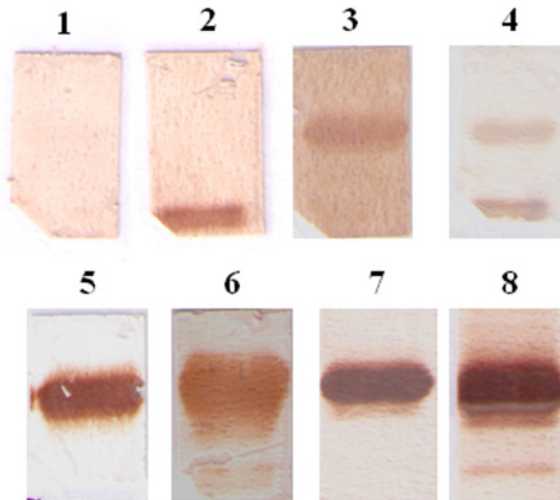


Figura 18. Detección de anticuerpos anti-S100 β mediante *western blot* en sujetos sanos y pacientes diabéticos de tipo 1. 1 μ g de S100 β biotinilada *in vitro* fue transferida a membranas de nitrocelulosa y dichas membranas incubadas con distintos anticuerpos policlonales, monoclonales o plasmas de individuos sanos o pacientes diabéticos de tipo 1. Las distintas membranas muestran los cuatro patrones de bandas observados mediante este tipo de análisis (membranas representativas de un total de 26 controles sanos y 29 pacientes diabéticos de tipo 1). Panel 1: sin banda (plasma negativo); panel 2: sólo banda menor de 13 kDa; panel 3: sólo banda de S100 β completa (16 kDa); panel 4: ambas bandas; panel 5: anticuerpo monoclonal anti-S100 β ; panel 6: anticuerpo policlonal anti-S100 β ; panel 7: anticuerpo monoclonal anti-histidinas, y panel 8: estreptavidina.

Además del patrón observado empleando plasmas humanos, empleamos un anticuerpo monoclonal (Figura 18, membrana 5) o policlonal (Figura 18, membrana 6) específicos contra S100 β para revelar membranas conteniendo S100 β . Como se puede comprobar en la Figura 18, con el anticuerpo policlonal pero no con el monoclonal se detecta la presencia de una proteína de menor peso molecular. Además, al emplear un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cola de histidinas presente en el extremo amino-terminal de la proteína, dicho anticuerpo detecta sólo la presencia de la S100 β completa y no la proteína de menor peso molecular (Figura 18, membrana 7) lo que sugiere que la banda menor podría corresponderse con una forma truncada de S100 β por su extremo amino-terminal. Este dato parece confirmarse al emplear estreptavidina para revelar las membranas, ya que ésta reaccionaría con la cola biotinilada situada en el extremo carboxi-terminal de la proteína y como puede verse en la Figura 18 tanto la proteína de menor tamaño como la proteína S100 β completa son detectadas en este caso (Figura 18, membrana 8), reforzando la idea de que la banda de menor peso molecular detectada en *western blot* empleando plasmas de pacientes diabéticos se corresponde con una forma truncada de S100 β (ver más adelante, Figura 20).

Para confirmar definitivamente que la proteína de menor tamaño detectada mediante *western blot* era realmente una forma truncada de S100 β por su extremo amino-terminal, ambas proteínas fueron analizadas mediante espectrometría de masas (MS). Para ello, ambas bandas fueron cortadas de un gel de poliacrilamida, digeridas con tripsina, los péptidos trípticos analizados mediante espectrometría de masas en tándem (MALDI-TOF/TOF) y los espectros obtenidos para ambas muestras comparados en busca de masas coincidentes entre ambas muestras (Figura 19A). En la Figura 19A se muestra parte de los espectros de digestión tríptica de ambas proteínas, y como se puede apreciar existen varios valores de masa/carga (m/z) coincidentes entre ambas proteínas (Figura 19A, flechas continuas). Estos valores de m/z coincidentes fueron analizados mediante MS/MS, y los espectros de fragmentación resultantes analizados enviados al programa Mascot para la búsqueda de homologías con proteínas eucariotas. En las Figuras 19B y 19C se muestra el espectro de MS/MS correspondiente al fragmento con valor m/z 1706,97 (Figura 19B), junto con los datos suministrados por Mascot sobre la identificación de dicho m/z (Figura 19C). Dicho análisis identifica este m/z como la secuencia de aminoácidos AMVALIDVFHQYSGR correspondiente a los aminoácidos 7-21 de la proteína S100 β . Un análisis semejante para los m/z 1722,96 y 2655,49 identifica dichos m/z como las secuencias de aminoácidos AMVALIDVFHQYSGR (metionina oxidada) y ELINNELSHFLEEIKEQEVVDK correspondientes a los aminoácidos 7-21 y 35-56 de la proteína S100 β , respectivamente. Estos datos indican que la proteína de menor tamaño se corresponde con S100 β y que este fragmento más pequeño empieza en, al menos, el aminoácido número 7 de la secuencia de S100 β .

En el análisis del espectro de masas de ambas proteínas se observa también la existencia de un pico claramente distinguible en el espectro correspondiente a la proteína S100 β completa (Figura 19A, m/z 2278,09; flecha discontinua) que no está presente en el espectro correspondiente a la proteína de menor tamaño (Figura 19A, comparar ambos espectros). Un análisis por MS/MS y búsqueda de homologías en Mascot identifica dicho pico como la secuencia aminoacídica GSHHHHHHGMASMTGGQQMGR, localizada en el extremo amino-terminal de la proteína de fusión y correspondiente a la cola de seis histidinas y los aminoácidos previos al epitopo Xpress, codificada por el vector pCR T7/NT-TOPO en el que se halla clonada la secuencia codificante de S100 β .

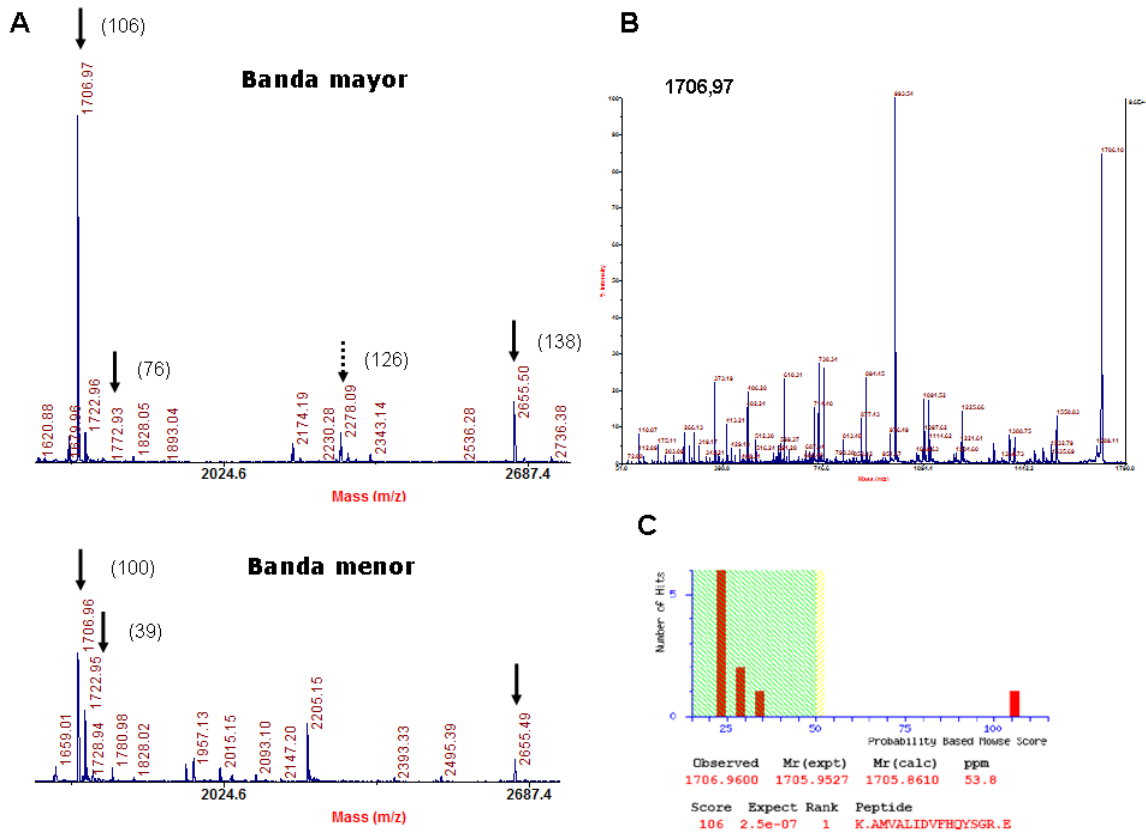


Figura 19. Análisis por espectrometría de masas de las bandas de S100β detectadas mediante western blot. **A.** Espectrometría de masas de los fragmentos trípticos generados a partir de la banda mayor (panel superior) y la banda menor (panel inferior) detectados mediante *western blot*. Las flechas continuas en ambos paneles indican picos m/z coincidentes entre ambos espectros, los cuales fueron posteriormente fragmentados por MS/MS. La flecha discontinua en el panel superior (banda mayor) señala un pico m/z único en esta proteína y que Mascot identificó como la cola de histidinas y los aminoácidos previos al epitopo Xpress codificados por el vector de clonación. La cifra entre paréntesis muestra la puntuación asignada por Mascot a cada uno de los picos. **B.** Espectro representativo obtenido por MS/MS del pico m/z 1706,97. **C.** Resultado suministrado por el programa Mascot sobre la homología del espectro de fragmentación del pico m/z 1706,97 con las proteínas presentes en la base de datos. Una puntuación de 32 es necesaria para indicar homología y 52 o superior señala identidad. La secuencia de aminoácidos para este m/z (con una puntuación de 106) se corresponde con S100β.

El conjunto de datos anteriores demuestra que la banda de menor tamaño molecular detectada en los *western blot* es una forma truncada de S100β por el extremo amino-terminal, donde no se incluyen la cola de histidinas y algunos otros aminoácidos codificados por el vector. De todas formas, la presencia de fragmentos trípticos en dicho fragmento menor de S100β que incluyen los aminoácidos 7-21 nos permiten concluir que la secuencia de S100β estaría prácticamente completa, faltando como mucho 6 aminoácidos del extremo amino-terminal de S100β incluyendo a la metionina terminal. Teniendo en cuenta que gracias a los resultados de *western blot* con estreptavidina sabemos que el extremo carboxi-terminal del

fragmento menor de S100 β está intacto, podemos concluir que el fragmento menor observado en *western blot* corresponde con una forma truncada de S100 β por el extremo amino-terminal, en algún lugar entre el dominio Xpress y el aminoácido 6 de S100 β . La Figura 20 muestra un esquema de la S100 β empleada, y se señala en negrita la zona en la que debe ocurrir el truncamiento, en algún aminoácido presente entre el epítipo Xpress y el aminoácido 6 de S100 β .

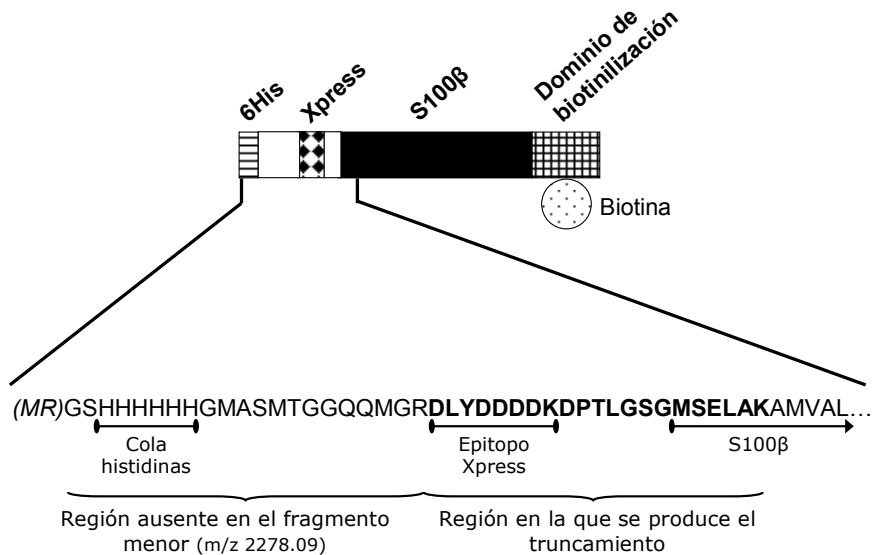


Figura 20. Esquema de la proteína S100 β biotinilada *in vitro* empleada en los análisis por *western blot* e identificación de la posible región de truncamiento. Se muestra ampliada la región amino-terminal, señalando la secuencia correspondiente a la cola de histidinas, al epítipo Xpress y a los primeros 11 aminoácidos de S100 β . Se indica asimismo la secuencia ausente en el fragmento de menor peso molecular (m/z 2278.09), y la región en la cual se produciría el truncamiento de S100 β para originar el fragmento de menor peso molecular detectado mediante *western blot*.

Tras confirmar que la banda menor detectada en los *western blot* era realmente S100 β y no una proteína contaminante, procedimos a analizar los resultados obtenidos empleando plasmas de individuos sanos y pacientes diabéticos de tipo 1. Tal y como se muestra en la Figura 21A, casi un 45% de los pacientes diabéticos poseen anticuerpos anti-S100 β que reaccionan sólo contra la forma truncada de S100 β (banda menor) en comparación con sólo el 15% de los individuos sanos que presentan este patrón de reactividad (Figuras 21A y 21B). Por el contrario, el 65% de todos los sujetos no diabéticos reacciona contra ambas proteínas (truncada y completa) en comparación con un 31% de los pacientes diabéticos. Existe dependencia entre la reactividad observada en *western blot* y el ser o no diabético (coeficiente de correlación de Spearman; $p = 0,016$), de forma que la frecuencia de reacción contra sólo la forma truncada es mayor en pacientes diabéticos que en controles sanos ($p = 0,022$; test

exacto de Fisher), mientras que dicha frecuencia de reacción es opuesta en el caso de la respuesta contra ambas formas de S100β, ya que este patrón es más frecuente en controles que en diabéticos ($p = 0,015$; test exacto de Fisher).

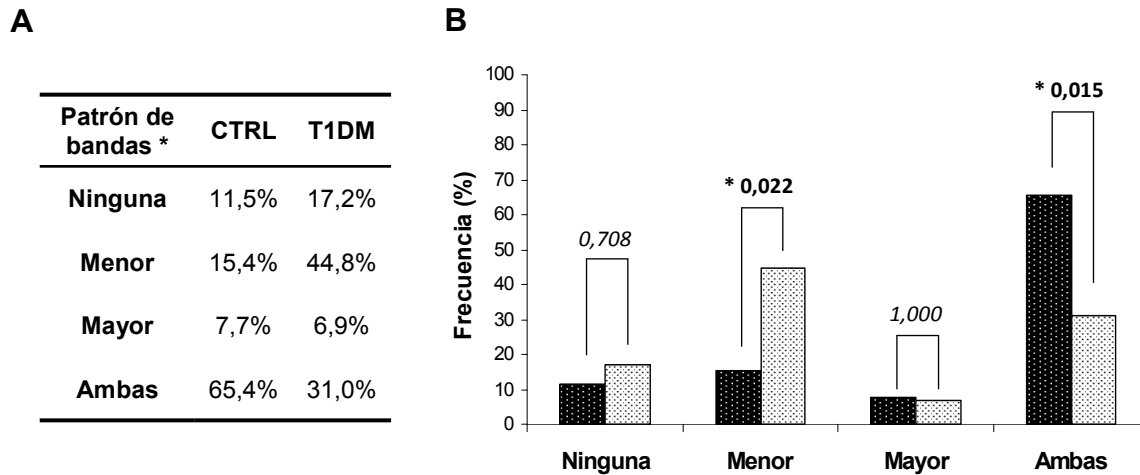


Figura 21. Análisis de la reactividad en los western blot frente a S100β completa o a su forma truncada en sujetos sanos y pacientes diabéticos de tipo 1. **A.** En esta tabla de frecuencias se indican los porcentajes de reactividad observados para cada uno de los cuatro patrones descritos en la Figura 18 tanto en individuos sanos (columna CTRL) como pacientes diabéticos de tipo 1 (columna T1DM): ninguna banda, banda menor, banda mayor o ambas bandas. Existe una dependencia significativa entre tipo de sujeto y patrón de reactividad (* $p = 0,016$; prueba de correlación de Spearman). **B.** Histograma de frecuencias para cada uno de los cuatro patrones de reactividad observados mediante western blot tanto para controles sanos (CTRL, barras negras) como para pacientes con diabetes tipo 1 (T1DM, barras blancas). Existen diferencias significativas entre individuos sanos y pacientes diabéticos en la frecuencia de aparición de la banda menor ($p = 0,022$) y de ambas bandas ($p = 0,015$) (test exacto de Fisher).

No tenemos una explicación firme para el hecho de que los individuos que reaccionan sólo con la forma truncada y minoritaria de S100β presente en las preparaciones de la proteína no reaccionen con la forma completa mucho más abundante, aunque una posible explicación es que la cola de histidinas (ausente en la forma truncada) suponga un impedimento estérico para la unión de estos autoanticuerpos. Así pues, estos resultados parecen apoyar la idea de que los pacientes diabéticos de tipo 1 sí presentan una frecuencia elevada de un tipo concreto de autoanticuerpos contra S100β del que carecen la mayor parte de los controles sanos, posiblemente debido al *molecular spreading* que tiene lugar en los islotes de Langerhans.

4.3. Resumen.

Se ha desarrollado un sistema de ELISA para la detección específica de anticuerpos anti-GFAP, el cual presenta una sensibilidad del 24,6%, una especificidad del 98,9% y un valor predictivo positivo del 94,7%. Se detecta una mayor frecuencia de pacientes diabéticos, tanto de tipo 1 como de tipo 2, positivos para anticuerpos anti-GFAP con respecto a personas sanas; además, los pacientes diabéticos presentan niveles más elevados de estos anticuerpos anti-GFAP respecto de individuos sanos. Este sistema de detección permitirá evaluar el papel de estos autoanticuerpos como marcadores de la enfermedad. Además, el índice de anticuerpos anti-GFAP presenta una correlación positiva con el tiempo transcurrido desde el diagnóstico. Este hecho está asociado con una correlación positiva entre el índice de anticuerpos para GFAP y complicaciones diabéticas.

Se ha desarrollado un sistema de ELISA para la detección específica de anticuerpos anti-S100 β . Este sistema analítico muestra que no existe una mayor frecuencia de pacientes diabéticos con anticuerpos anti-S100 β positivos al compararlos con personas sanas, ni que los niveles de estos anticuerpos sean más elevados en pacientes diabéticos. Sin embargo, el análisis de anticuerpos anti-S100 β por *western blot* muestra un patrón de respuesta diferencial respecto a la proteína S100 β y a una forma truncada de S100 β entre controles sanos y pacientes con diabetes tipo 1, ya que un elevado porcentaje de pacientes diabéticos responde sólo contra la forma truncada de S100 β , lo que podría explicar la no existencia de diferencias en el nivel de estos autoanticuerpos detectados mediante ELISA.

Capítulo 5:

Péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por la molécula de histocompatibilidad de clase II HLA-DRB1*04:01.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

5.1. Optimización del sistema de presentación de antígeno (SPA).

Como ya se ha descrito en los capítulos anteriores, la proteína S100 β es considerada un autoantígeno temprano en ratones NOD, y en pacientes diabéticos de tipo 1 existe una clara respuesta linfocitaria contra ella (Winer y cols. 2003; Banwell y cols. 2008). Mientras que por ELISA no hemos observado diferencias en el nivel de anticuerpos anti-S100 β entre controles sanos y pacientes diabéticos, mediante *western blot* hemos detectado un tipo de respuesta contra S100 β en pacientes diabéticos que parece diferenciarse de la observada en personas sanas. Teniendo en cuenta nuestros resultados y los de otros autores decidimos caracterizar qué péptidos derivados de S100 β son presentados de manera natural por la molécula de histocompatibilidad de clase II DRB1*04:01 (DR4), molécula que se ha demostrado estar asociada con el desarrollo de la T1DM (She, 1996). Para ello decidimos alimentar células que expresan la molécula de histocompatibilidad DR4 con la proteína S100 β purificada en nuestro laboratorio (ver Capítulo 3), de manera que sea dicha célula la que procese la proteína de forma natural y presente péptidos derivados de ella en la superficie celular unidos a DR4, para a continuación purificar dichos péptidos e identificarlos por espectrometría de masas.

Para aumentar la cantidad de proteína S100 β captada por las células presentadoras de antígeno (CPA), en este caso la línea linfoblastoide Priess homocigota para el alelo de histocompatibilidad DR4, hemos empleado un sistema de presentación de antígenos (SPA) descrito anteriormente por Peakman y cols. (Peakman y cols. 1999), que permite que dichas CPA capten una mayor cantidad de proteína y en consecuencia generen una mayor cantidad de péptidos antigénicos a partir de ella. La Figura 22 muestra un esquema de los elementos del SPA empleados en este trabajo.

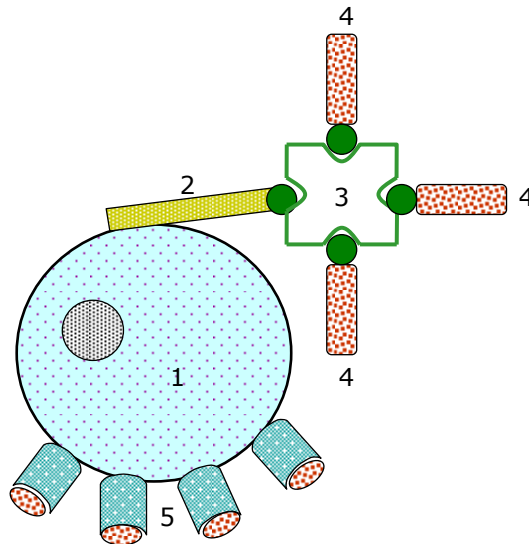


Figura 22. Esquema de los elementos del sistema de presentación de antígeno (SPA). Células Priess (1) homocigotas para la molécula de HLA de clase II DR4 son incubadas, en primer lugar, con la lectina de *Phytolacca americana* (hierba carmín) “pokeweed mitogen” biotinilada *in vitro* (2). Una vez lavadas las células, se incuban con avidina (3) que posee cuatro sitios de unión a biotina y que se unirá a la lectina mediante uno de esos sitios. Finalmente se incuban con S100β biotinilada *in vitro* (4), de forma que ésta sea capturada por los sitios de unión a biotina libres de la avidina. Las células son incubadas a 37°C para que el complejo lectina/avidina/S100β sea internalizado, procesado, y los péptidos derivados de S100β presentados por las moléculas DR4 (5) en la superficie celular.

De forma resumida, el sistema se basa en el uso de células Priess como CPA que han sido preincubadas en frío de forma secuencial con la lectina de *Phytolacca americana* (hierba carmín) “pokeweed mitogen” biotinilada *in vitro* en nuestro laboratorio (b-PWM) (Figura 23A), la cual se une preferentemente a la fracción glucosídica de receptores de superficie con dominios semejantes a inmunoglobulina, y posteriormente preincubadas con avidina. Una vez eliminada la avidina no unida a la superficie celular, estas células son incubadas con la proteína S100β biotinilada *in vitro* (ver Capítulo 3), que es captada por la avidina presente en la superficie celular. Una vez terminada la incubación con S100β las células son diluidas en medio completo e incubadas a 37°C entre 2-3 horas para permitir el procesamiento de S100β y la presentación en la superficie celular de los péptidos generados.

Para la optimización de los componentes del SPA, 10^7 células fueron incubadas con cantidades crecientes de b-PWM y la lectina unida a la superficie celular detectada mediante incubación con una concentración saturante de estreptavidina conjugada a ficoeritrina y análisis subsiguiente de las células mediante citometría de flujo. Tal y como se muestra en la Figura 23B, la fluorescencia media de las células aumenta con la

cantidad de b-PWM añadida. Con estos datos, la cantidad escogida para emplear en el SPA fue de 6 $\mu\text{L}/10^7$ células, ya que si bien con 20 μL se alcanza una intensidad de tinción mayor, la cantidad de lectina unida a la superficie celular es lo suficientemente alta para captar antígeno de forma eficaz.

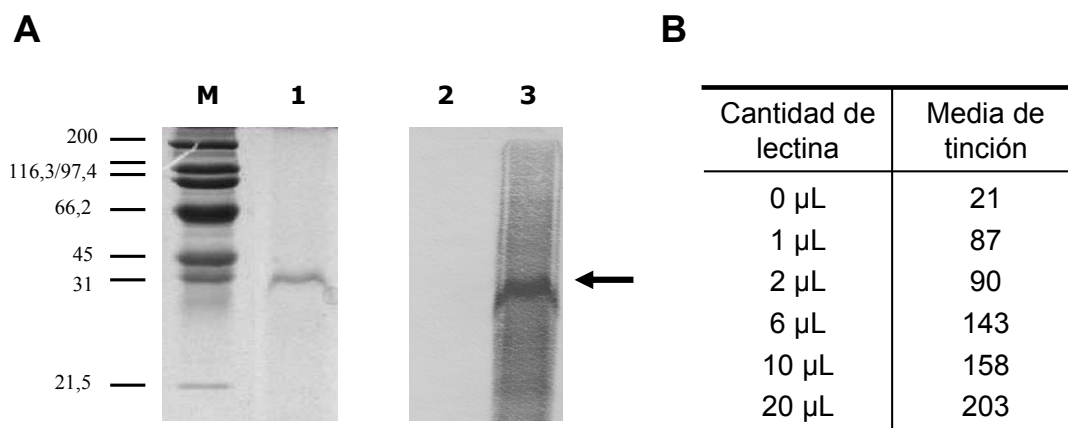


Figura 23. Biotinilización y titulación de la lectina “pokeweed mitogen” (PWM). A. Electroforesis SDS-PAGE (calle 1) y análisis por *western blot* de la reacción de biotinilización *in vitro* de PWM (calles 2 y 3). Calle M, marcador de peso molecular (kDa); calle 1: PWM biotinilada *in vitro*; calle 2, membrana de nitrocelulosa conteniendo PWM sin biotinar, y calle 3, membrana conteniendo PWM biotinilada *in vitro*. La presencia de PWM biotinilada fue revelada en el *western blot* empleando estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano. La flecha señala la posición de PWM (32 kDa) B. Titulación de la lectina PWM biotinilada para el sistema SPA. Células Priess fueron incubadas con cantidades crecientes de PWM biotinilada y a continuación teñidas con estreptavidina-PE. La tabla muestra la fluorescencia media para cada una de las cantidades de PWM biotinilada utilizadas.

Empleamos avidina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) para optimizar la cantidad óptima de este segundo elemento del SPA. Para ello, células Priess (10^7) incubadas en frío con 6 μL de b-PWM fueron incubadas con concentraciones crecientes de avidina-FITC y analizadas por citometría de flujo. Tal y como se muestra en la Figura 24A, con la adición de avidina a una concentración de 0,25 mg/mL se consigue la máxima captación de ésta en la superficie celular por lo que fue escogida para realizar los experimentos descritos a continuación.

Una vez optimizados los dos elementos del SPA, analizamos a continuación la eficacia de dicho sistema así como la cantidad máxima de proteína que podía ser retenida por células Priess en la superficie celular mediante este sistema de captación de antígeno. Para ello, a células Priess preincubadas con el SPA o sin preincubar se les añadieron cantidades crecientes de S100 β biotinilada conjugada con el fluorocromo

FITC y la cantidad de proteína retenida en la superficie celular fue analizada mediante citometría de flujo. Tal y como se muestra en la Figura 24B, células Priess preincubadas con los elementos del SPA captan unas 10 veces más proteína que células Priess sin tratar con dicho sistema, demostrando la eficacia de éste a la hora de dirigir la proteína a la superficie celular para su captación y procesamiento. De este análisis también se deduce que 5 μg de S100 β biotinilada por cada 10^7 células es la cantidad óptima de proteína a emplear en nuestros experimentos. Para cada nuevo lote de S100 β biotinilada purificada se llevó a cabo esta titulación para verificar su validez para el SPA.

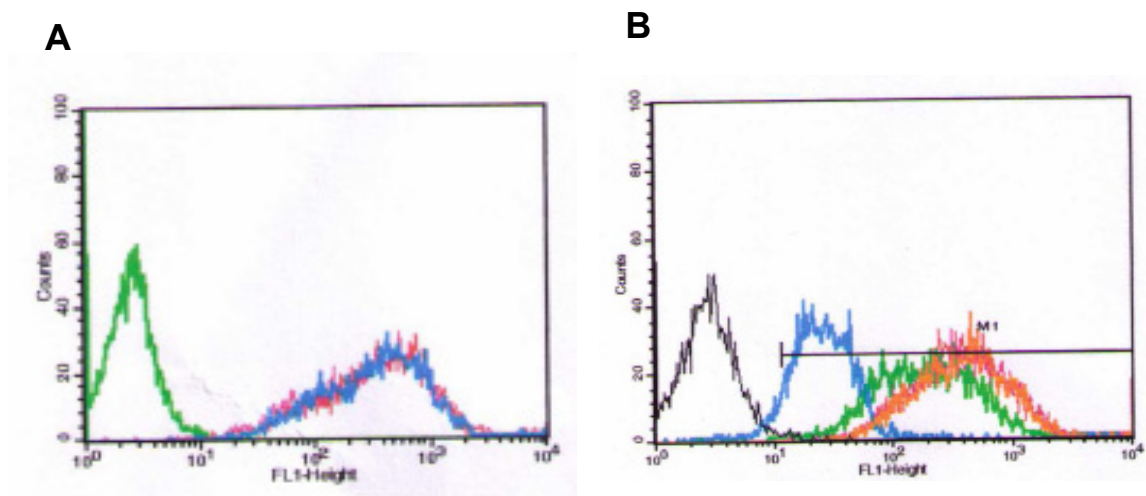


Figura 24. Titulación de avidina y S100 β biotinilada para el SPA. **A.** En la titulación de avidina, células Priess (10^7) fueron incubadas con 6 μL de PWM biotinilada y con concentraciones crecientes de avidina conjugada a FITC. Las células fueron lavadas y analizadas mediante citometría de flujo. El histograma muestra la fluorescencia media para células incubadas sin avidina (línea verde); 0,25 mg/mL de avidina (línea rosa); 0,75 mg/mL de avidina (línea azul); o 1 mg/mL de avidina (línea roja). **B.** En la titulación de S100 β biotinilada, células Priess (10^7) fueron incubadas con 6 μL de PWM biotinilada, 0,25 mg/mL de avidina y con cantidades crecientes de S100 β biotinilada conjugada a FITC (S100 β -FITC). Línea negra: células Priess sin incubar con el SPA; línea azul, células incubadas sólo con S100 β -FITC (10 μg); línea verde, células Priess incubadas con todo el SPA (1 μg de S100 β -FITC); línea naranja: células incubadas con todo el SPA (5 μg de S100 β -FITC); línea rosa: células incubadas con todo el SPA (10 μg de S100 β -FITC); línea roja, células incubadas con todo el SPA (20 μg de S100 β -FITC).

5.2. Crecimiento de células Priess con el SPA, inmunopurificación de DR4 y elución de péptidos presentados por dichas moléculas de histocompatibilidad.

Una vez establecidos los parámetros óptimos del SPA, células Priess fueron cultivadas en medio completo e incubadas con concentraciones óptimas de b-PWM y

avidina (células control) o con b-PWM, avidina y S100 β biotilada (células S100 β). Una vez incubadas a 37°C para permitir la internalización, procesamiento y presentación de S100 β , las células fueron recogidas por centrifugación y el pellet celular almacenado a -20°C hasta su procesamiento. En total, se crecieron $1,2 \times 10^{10}$ células control y $1,1 \times 10^{10}$ células alimentadas con S100 β .

Para purificar las moléculas de histocompatibilidad DR4 empleamos una resina de afinidad de Proteína A-sefarosa a la que se le acopló el anticuerpo monoclonal específico para HLA-DR L243, obtenido en nuestro laboratorio a partir del hibridoma HB-55, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los *pellets* celulares fueron descongelados en frío, lisados y solubilizados con el detergente no iónico IGEPAL; el extracto resultante fue pasado varias veces por la columna de afinidad para asegurar la máxima retención de las moléculas DR4. Tras los lavados correspondientes, las moléculas DR4 retenidas por la columna fueron eluidas mediante incubación ácida con ácido acético, y los péptidos unidos a dichas moléculas de histocompatibilidad separados de éstas mediante incubación a 70°C y ultrafiltración mediante filtro con un punto de corte de 10 kDa, que permite el paso de péptidos de 90 aminoácidos de longitud máxima, aproximadamente.

En la Figura 25A se muestran distintos puntos del proceso de inmunopurificación de DR4 (calles 1 a 5). Se detecta la presencia de moléculas DR4 en la fracción eluida (calle 6), indicando las flechas continuas las cadenas α (35 kDa) y β (29 kDa) de la molécula DR4. Debido al carácter ácido de la elución también se eluye parte del anticuerpo L243, señalado por flechas discontinuas. La eficiencia del aislamiento de los péptidos procesados y presentados de forma natural de las moléculas DR4 mediante incubación a 70°C fue verificada mediante análisis por “*dot-blot*” empleando un anticuerpo monoclonal específico para moléculas de histocompatibilidad de clase II (DP/DQ/DR) (Figura 25B). En dicha figura se puede observar la presencia de moléculas DR4 tanto en la fracción eluida de la columna de afinidad (panel 1) como en la fracción de alto peso molecular retenida en el proceso de ultrafiltración (panel 2), mientras que en la fracción de bajo peso molecular no se detecta la presencia de dichas moléculas (panel 3). Así pues, la ultrafiltración permite separar las moléculas DR4 purificadas mediante cromatografía de afinidad y otras proteínas de alto peso molecular de los péptidos presentados de forma natural y que se hallaban unidos a estas moléculas de histocompatibilidad.

Las mezclas complejas de péptidos obtenidas tanto de células control (sin incubarse con S100 β biotinilada) o células Priess incubadas con S100 β biotinilada fueron secadas para reducir su volumen y conservadas a -80°C hasta su fraccionamiento mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).

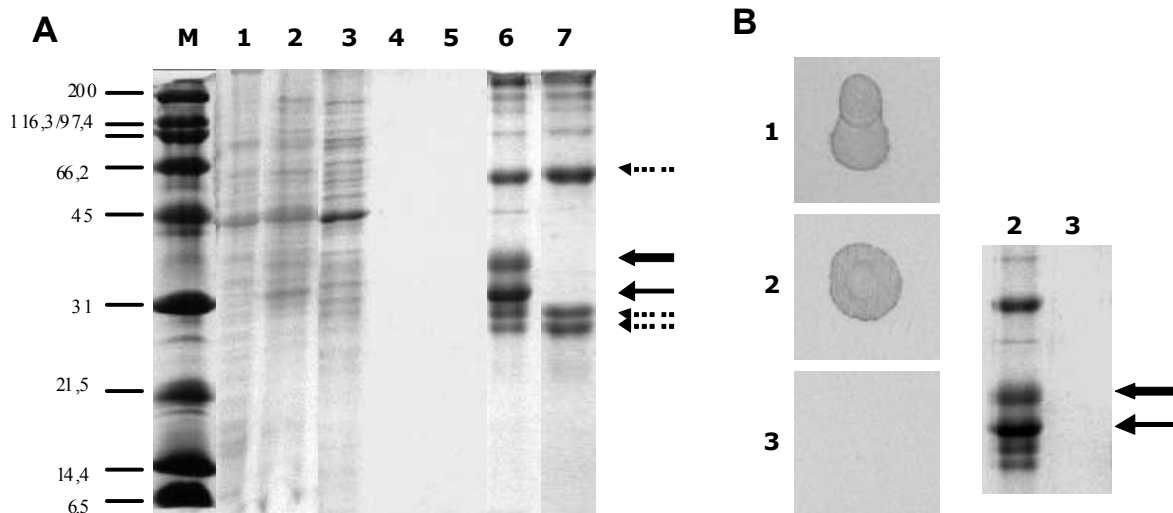


Figura 25. Purificación de DR4 mediante cromatografía de afinidad y filtración por membrana de los péptidos presentados por la molécula de histocompatibilidad. A. Electroforesis SDS-PAGE (14%) de distintas etapas de la purificación de la molécula de histocompatibilidad DR4 mediante cromatografía de afinidad empleando resina de proteína A conjugada al anticuerpo monoclonal L243. Calle M, marcador de peso molecular (en kDa); calle 1, fracción no soluble del extracto celular tras la solubilización de membranas con IGEPAL; calle 2, fracción soluble del extracto celular tras la solubilización; calle 3, fracción no retenida por la resina proteína A-L243; calle 4: primer lavado de la inmunopurificación; calle 5: cuarto lavado de la inmunopurificación; calle 6: fracción eluida de la resina proteína A-L243, conteniendo moléculas DR4 (flechas continuas, cadenas α de 35 kDa y cadenas β de 29 kDa) y el anticuerpo L243 liberado de la resina por la elución ácida (flechas discontinuas); calle 7, resina proteína A-L243. **B.** Análisis por *dot blot* empleando un anticuerpo monoclonal anti-DP/DQ/DR. Panel 1, fracción eluida de la resina proteína A-L243, conteniendo moléculas DR4; panel 2, fracción de alto peso molecular retenida por filtros de 10 kDa; panel 3, fracción de bajo peso molecular no retenida por filtros de 10 kDa. Se observa la presencia de DR4 en la fracción eluida (1) y también en la fracción retenida de alto peso molecular (2), pero no así en la fracción filtrada (3, péptidos). A la derecha se muestra un gel de SDS-PAGE (14%) conteniendo las muestras de los paneles 2 y 3. No se detectan moléculas DR4 en la fracción filtrada (3).

5.3. Fraccionamiento de péptidos por RP-HPLC y análisis mediante espectrometría de masas.

La mezcla compleja de péptidos obtenida de las moléculas DR4 purificadas fue fraccionada utilizando cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC). Tal y como se muestra en la Figura 26, al fraccionar la mezcla compleja de péptidos obtenida de células Priess incubadas o no con S100 β , los péptidos presentes en

la mezcla comienzan a eluir de la columna cuando el porcentaje de acetonitrilo está en torno al 36% (60% de bomba B) y aunque los cromatogramas obtenidos en ambos casos son bastante similares, existen diferencias evidentes al comparar ambos tipos celulares tanto a 210 nm (Figura 26A) como a 280 nm (Figura 26B).

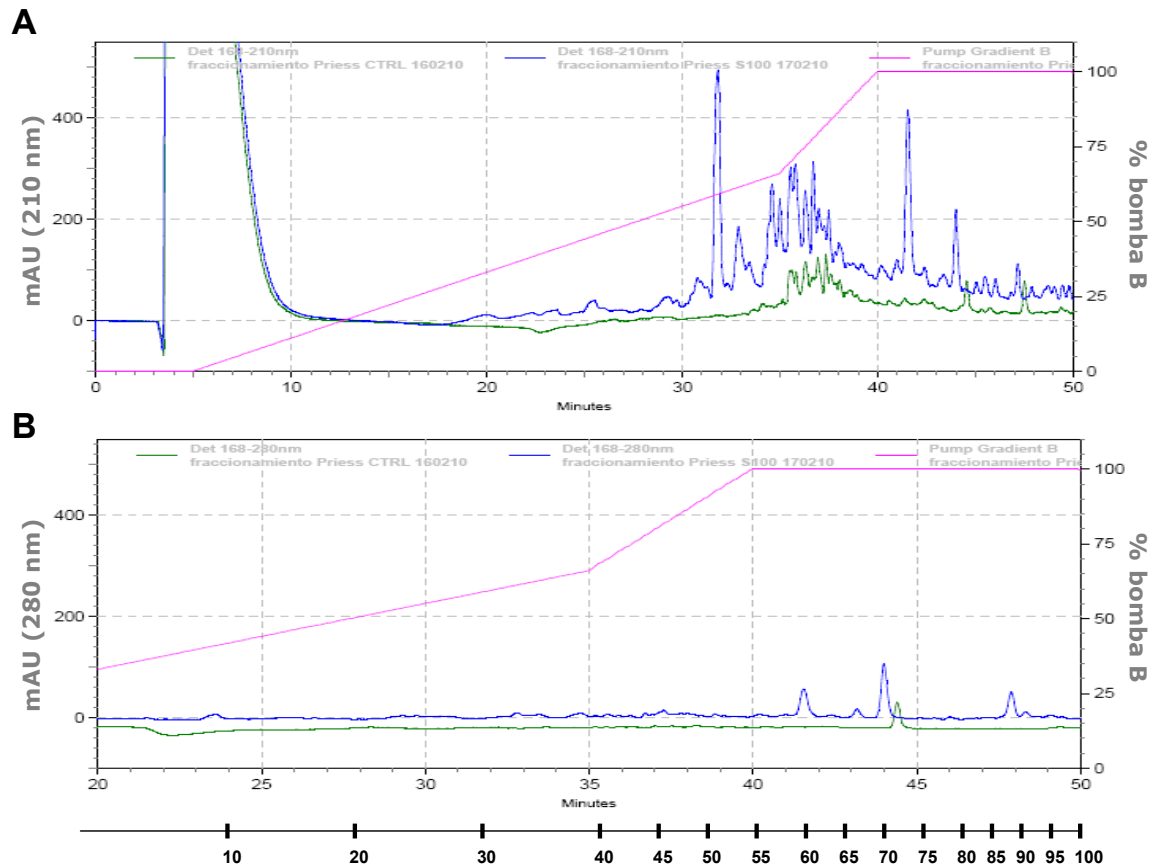


Figura 26. Fraccionamiento por RP-HPLC de epitopos procesados y presentados de forma natural por moléculas de histocompatibilidad de clase II DR4. Los péptidos presentados por las moléculas de histocompatibilidad de clase II DR4 y obtenidos a partir de células Priess incubadas sólo con el SPA (cromatograma verde) o con el SPA y S100 β (cromatograma azul) fueron fraccionados mediante cromatografía HPLC de fase reversa. Se muestran los cromatogramas registrados a 210 nm (A) y a 280 nm (B). La línea rosa representa el porcentaje de bomba B (tampón B, 60% acetonitrilo 0,05% ácido trifluoroacético). La línea inferior representa las fracciones obtenidas en la cromatografía, de las cuales de la 45 a la 100 fueron analizadas mediante espectrometría de masas.

Se obtuvieron 157 fracciones peptídicas para las células Priess control y 161 fracciones para las células Priess incubadas con S100 β ; las fracciones 45 a 100 tanto de las células control como de las células incubadas con S100 β fueron analizadas mediante espectrometría de masas (MS) en un analizador 4800 MALDI-TOF/TOF tal y como se describe en Materiales y Métodos, al ser éstas las fracciones que contenían la mayor cantidad de péptidos.

Los resultados de dicho análisis se muestran en el esquema de la Figura 27. Obtuvimos 56 espectros m/z para las células control no incubadas con S100 β (17.916 m/z en total) y otros 56 espectros m/z para las células Priess incubadas con S100 β para su procesamiento y presentación (16.985 m/z en total). Las fracciones equivalentes obtenidas de células control y de células incubadas con S100 β fueron analizadas y comparadas con el *software* Data Explorer. De dicha comparación se identificaron 428 m/z únicos presentes sólo en las fracciones de células Priess incubadas con S100 β , los cuales fueron analizados mediante el programa Findpept (Expasy Proteomics Server) para predecir si dicho m/z podría derivar de la secuencia de aminoácidos de la proteína S100 β .

De este análisis 56 m/z fueron descartados ya que ninguna secuencia aminoacídica derivada de S100 β generaría dicho m/z, quedando 372 m/z únicos. De estos 372 m/z únicos, se descartaron aquellos que el programa Findpept predecía se hallarían en la región amino-terminal de la proteína recombinante conteniendo la cola de histidinas y/o el dominio Xpress, o en el epitopo de biotinización del extremo carboxi-terminal (*biotag*). Asimismo, se descartaron todos aquellos m/z cuyas predicciones tenían un error entre el m/z obtenido por MS y el predicho por Findpept (ΔDa) mayor de 0,5, un valor de tolerancia equivalente a la mitad de un átomo de hidrógeno, y empleado por otros autores (Peakman y cols. 1999). Finalmente, seleccionamos aquellos valores de m/z para los que el programa Findpept daba una sola predicción o dos predicciones solapantes (existe alguna excepción que será comentada más adelante) lo que deja el número final de candidatos en 32 valores de m/z, señalados en la Tabla 6.

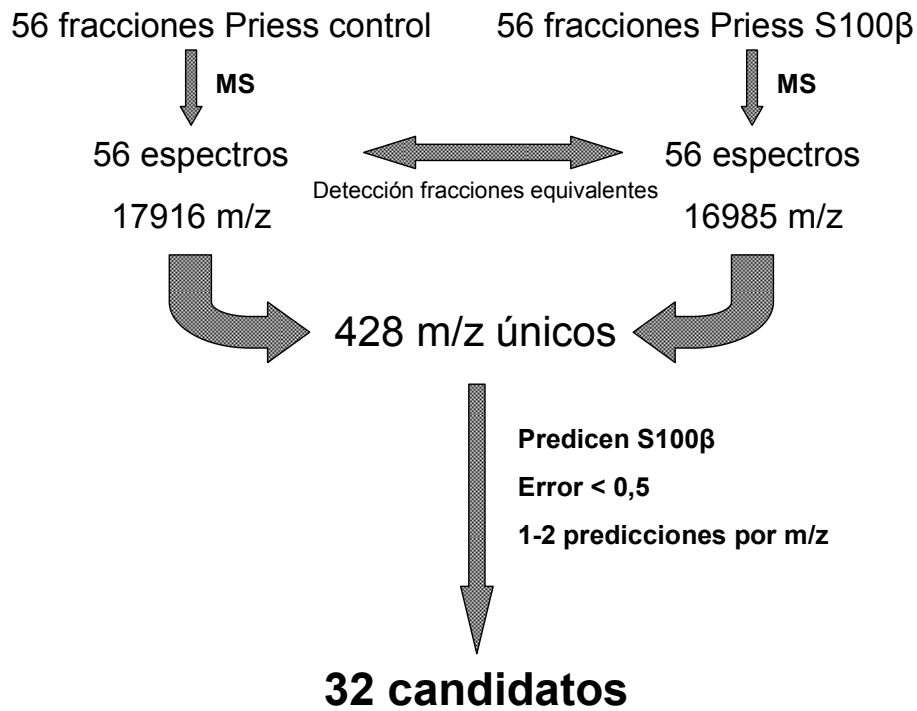


Figura 27. Esquema del análisis por espectrometría de masas de epitopos procesados y presentados de manera natural obtenidos a partir de S100 β . Se han seleccionado 32 epitopos candidatos derivados de S100 β de los 16.985 m/z detectados mediante espectrometría de masas.

Fracción	m/z experimental	m/z teórico	Δ Da	Secuencia
46/47	2.137,851	2.137,063	-0,787	SELEKAMVALIDVFHQYSG
54	1.382,656	1.382,786	0,130	SGREGDKHKLK
		1.382,786	0,130	GREGDKHKLKKS
54	1.841,885	1.841,964	0,079	HFLEEIKEQEVVDKV
54	1.939,943	1.939,791	-0,151	DGECDFQEFMAFVAMVT
		1.939,827	-0,115	ECDFQEFMAFVAMVTTA
55	2.136,048	2.136,054	0,006	KAMVALIDVFHQYSGREGD
		2.136,054	0,006	AMVALIDVFHQYSGREGDK
56/57	1.592,796	1.592,749	-0,047	FQEFMAFVAMVTTA
56	1.670,918	1.670,969	0,050	LKSELKELINNEL
56	1.940,938	1.941,033	0,094	LKELINNELSHFLEEI
72	2.129,960	2.129,864	-0,096	VDKVMETLDNDGDGECDFQ
79	2.272,112	2.271,906	-0,205	GDGECDFQEFMAFVAMVTTAC
84	2.677,497	2.677,503	0,006	KHKLKSELKELINNELSHFLE
85	2.610,379	2.610,269	-0,109	MSELEKAMVALIDVFHQYSGREG
86	2.285,184	2.285,130	-0,054	INNELSHFLEEIKEQEVVD
		2.285,166	-0,018	NELSHFLEEIKEQEVVDKV
		2.285,202	0,018	SELKELINNELSHFLEEIK
		2.285,202	0,018	KSELKELINNELSHFLEEI
		2.285,215	0,030	IDVFHQYSGREGDKHKLK
87	1.592,802	1.592,749	-0,053	FQEFMAFVAMVTTA
89	2.423,172	2.423,336	0,164	SGREGDKHKLKSELKELINN
89	2.897,315	2.897,478	0,162	ELKELINNELSHFLEEIKEQEVVD
		2.897,563	0,248	VALIDVFHQYSGREGDKHKLKSEL
93	1.405,696	1.405,688	-0,008	QEVVDKVMETLD
		1.405,722	0,026	ALIDVFHQYSGR
93/94/95/96	1.603,970	1.603,585	-0,384	LDNDGDGECDFQEF
93	2.336,108	2.336,304	0,196	GREGDKHKLKSELKELINN
93/94	2.891,706	2.891,187	-0,519	EQEVVDKVMETLDNDGDGECDFQEF
94	2.234,119	2.234,049	-0,069	IKEQEVVDKVMETLDNDGDG
94	2.365,166	2.365,308	0,142	EGDKHKLKSELKELINNEL
94	2.967,461	2.967,194	-0,267	TLDNDGDGECDFQEFMAFVAMVTTACH
95/96	2.650,556	2.651,140	0,584	FQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE
96/97/98	1.420,840	1.420,631	-0,209	EFMAFVAMVTTAC
		1.420,664	-0,176	FQEFMAFVAMVT
97	1.841,962	1.841,964	0,002	HFLEEIKEQEVVDKV
99/100	1.325,661	1.325,765	0,103	REGDKHKLKKS
99/100	1.352,681	1.352,826	0,144	HKLKSELKEL
99	1.365,671	1.365,549	-0,122	ECDFQEFMAFV
99/100	1.434,854	1.434,643	-0,210	DFQEFMAFVAMV
		1.434,678	-0,175	VVDKVMETLDNDG
		1.434,714	-0,139	KEQEVVDKVMET
99/100	2.183,001	2.182,822	-0,179	ETLDNDGDGECDFQEFMAF
99	2.500,297	2.500,066	-0,231	DFQEFMAFVAMVTTACHEFFE

Tabla 6. Epitopos derivados de S100β procesados y presentados de manera natural por la molécula de HLA de clase II DR4. Se muestran, de izquierda a derecha, la/s fracción/es en la que se halla dicho péptido (Fracción), el m/z experimental obtenido por espectrometría de masas (m/z experimental), el m/z teórico predicho por Findpept (m/z teórico), el error entre el m/z experimental y el teórico (ΔDa , en daltons) y la secuencia de aminoácidos de S100β correspondiente al m/z experimental (Secuencia).

En la Figura 28A se muestra uno de estos 32 m/z únicos. La flecha en el panel superior señala el m/z único (1.603,97) presente en células incubadas con el SPA y el antígeno S100β y que no se encuentra en la fracción equivalente de las células control (panel inferior). Cuando dicho m/z fue enviado al programa Findpept observamos que predice la secuencia de aminoácidos 61-74 (LDNDGDGECDFQEF) de la proteína S100β (Figura 28B) con un error entre el m/z observado (1.603,97) y el esperado (1.603,58) menor de 0,5 (-0,384).

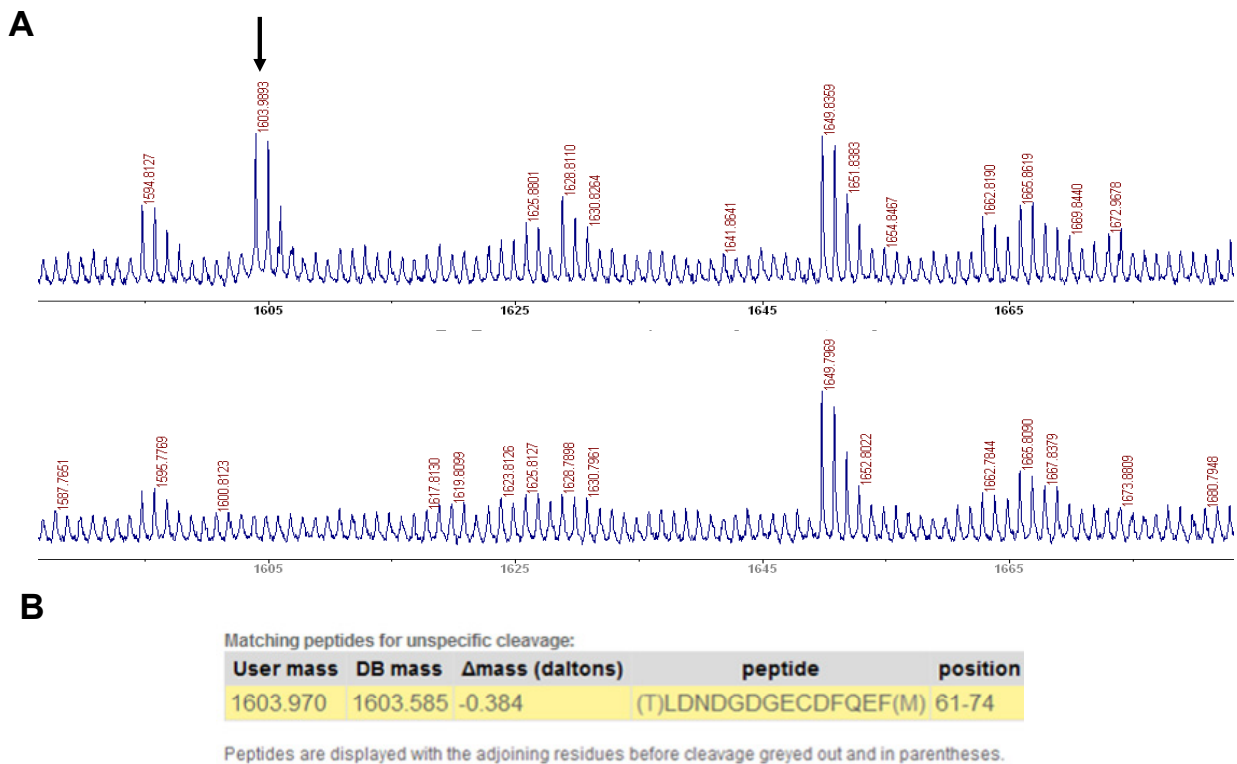


Figura 28. Identificación de un epitopo derivado de S100β, procesado y presentado de manera natural por DR4. **A.** Espectros de fracciones equivalentes de células alimentadas con el SPA (espectro inferior) o con el SPA y S100β (espectro superior). Se observa la presencia de un pico (m/z 1.603,97; flecha) presente sólo en las células Priess alimentadas con S100β. **B.** Resultados suministrados por el programa Findpept para el m/z 1.603,97. Se observa que este fragmento sí puede derivar de la proteína S100β, con una diferencia entre el m/z experimental (*user mass*) y el m/z teórico (*DB mass*) para la secuencia de aminoácidos predicha derivada de S100β de -0,384 Da ($\Delta mass$). La secuencia de aminoácidos de dicho m/z se correspondería con la posición 61-74 de la proteína S100β.

Tal y como hemos señalado anteriormente (ver Tabla 6), se observa que para la mayoría de los 32 m/z candidatos se obtiene una sola predicción (24/32) o dos predicciones, aunque en la mayoría de estos casos (4/6) se predicen péptidos solapantes prácticamente idénticos entre sí desplazados solamente uno (m/z 1.382,65 y 2.136,048) o dos aminoácidos (m/z 1.939,94 y 1.420,84). En aquellos m/z donde Findpept predice dos secuencias aminoacídicas no solapantes, como son los casos de los m/z 2.897,31 y 1.405,69, ambas predicciones se localizan en alguna de las tres regiones consenso identificadas en este trabajo (Figura 29), con la excepción de la predicción QEVVDKVMETLD del m/z 1.405,69 que no se localiza en ninguna de las tres regiones consenso.

Se identificaron dos m/z para los cuales Findpept predice más de dos secuencias aminoacídicas que son m/z 2.285,18 (5 predicciones) y m/z 1.434,85 (3 predicciones). En el caso del m/z 2.285,18 cuatro de dichas predicciones se corresponden con péptidos solapantes entre sí localizados en la región II, mientras que la quinta predicción corresponde a una secuencia localizada entre las regiones I y II (Tabla 6 y Figura 29). El caso del m/z 1.434,85 es algo diferente ya que de las tres predicciones de secuencias aminoacídicas sólo una, DFQEFMAFVAMV, se localiza en una de las tres regiones consenso identificadas, y ya que se halla en una región con una predicción alta de unión a la molécula de histocompatibilidad DR4 (Figura 29) este m/z fue mantenido como candidato.

Finalmente, y tal y como puede verse en la Tabla 6, se han seleccionado tres m/z candidatos donde el error entre el valor encontrado y el esperado es mayor de 0,5, como es el caso del m/z 2.137,85 con un ΔDa de -0,787. Las razones fundamentales para dicha inclusión son que dichos m/z son muy intensos y claramente diferentes respecto a la correspondiente fracción control correspondiente, prediciéndose además una sola secuencia aminoacídica.

Los epitopos procesados y presentados de manera natural predichos en este trabajo tienen una longitud de 11-27 aminoácidos, aunque el 36% de las predicciones son para péptidos de una longitud comprendida entre los 19-21 aminoácidos, la longitud habitual para epitopos presentados por moléculas de histocompatibilidad de clase II (Chicz y cols. 1993. Lippolis y cols. 2002).

El procesamiento de antígenos presentados de forma natural por una CPA, para moléculas de histocompatibilidad de clase II, genera péptidos que forman grupos solapantes y que comparten un núcleo central que contacta con los aminoácidos de la hendidura de la molécula de histocompatibilidad, pero que se diferencian en sus extremos (Chicz y cols. 1992). Es por ello que alineamos las secuencias predichas para los 32 m/z únicos con la secuencia de S100β, con el fin de observar su grado de solapamiento. Tal y como se muestra en la Figura 29, es interesante comprobar que la mayoría de los m/z únicos presentes en células Priess incubadas con S100β forman grupos solapantes, los cuales se agrupan fundamentalmente en torno a tres regiones dentro de la proteína, que hemos denominado como Región I, II y III (Figura 29, cuadros).

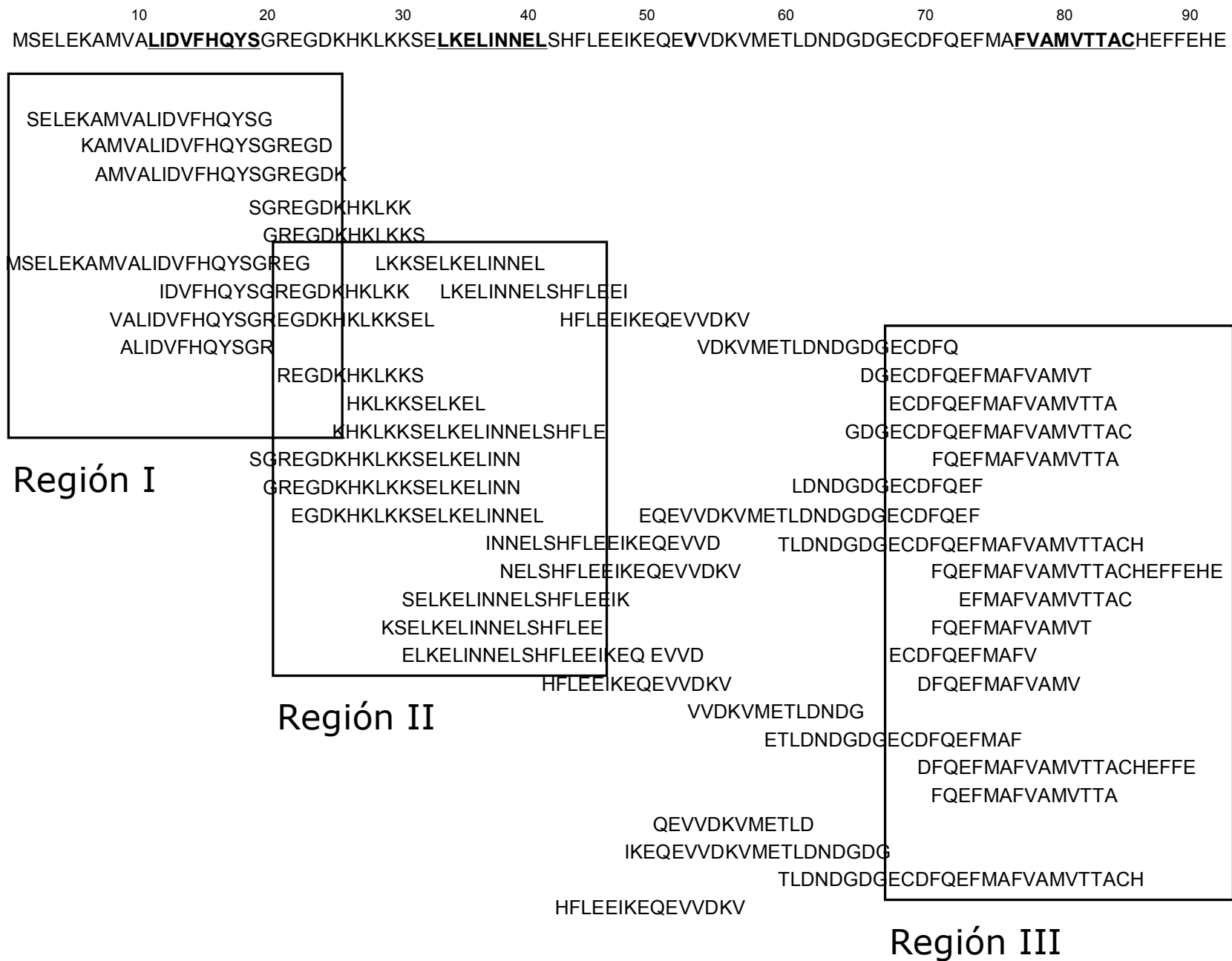


Figura 29. Alineamiento de epitopos candidatos con la secuencia de S100 β . Los epitopos identificados mediante espectrometría de masas se agrupan en tres regiones de la proteína (zonas delimitadas por rectángulos). Una zona amino-terminal (Región I), otra zona contigua a la anterior (Región II) y una zona carboxi-terminal (Región III). **En negrita y subrayadas** se señalan aquellas secuencias aminoacídicas de S100 β que contienen el motivo de unión con aminoácidos compatibles en todas las posiciones (P1 a P9).

Nuestro siguiente paso para caracterizar estos epitopos derivados de S100 β y, al mismo tiempo, poder decidir una secuencia consenso para las tres regiones señaladas en la Figura 29, consistió en analizar si dichas regiones contenían motivos de unión a la molécula de histocompatibilidad DR4. Para esta molécula de histocompatibilidad, la posición que parece ser más importante a la hora de determinar la afinidad de la unión de péptidos es la posición 1 (P1) del motivo de unión de 9 aminoácidos de longitud, donde el aminoácido presente en esta posición debe ser capaz de formar puentes de hidrógeno o salinos. Además también son importantes las posiciones P3 y P6 y, en menor medida, P7 y P9.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de S100 β mediante cuatro programas disponibles en la red y descritos en la sección de Materiales y Métodos (SYFPEITHI, HLA-DR4Pred, SVMHC y MHC2PRED) muestra que existen tres regiones dentro de la secuencia de S100 β que contienen motivos de unión a DR4 (Tabla 7 y Figura 30): la región A correspondiente a los aminoácidos 8-19 (MVALIDVFHQYS), la región B correspondiente a los aminoácidos 33-53 (LKELINNELSHFLEEIQEV) y la región C correspondiente a los aminoácidos 74-86 (FMAFVAMVTTACH) (Figura 30). Estas regiones donde se predice la existencia de motivos de unión de alta afinidad por la molécula de histocompatibilidad DR4 coinciden con las regiones donde se concentran los grupos de epitopos solapantes identificados mediante espectrometría de masas (comparar las Figuras 29 y 30), lo que indica que muchos de los epitopos identificados en nuestro estudio poseen secuencias de aminoácidos que permiten su unión a la molécula de histocompatibilidad DR4 con alta afinidad.

Base de datos	Posición	Secuencia	Puntuación	Región
SYFPEITHI	8	LIDVFHQYS	26	I
	30	LKELINNEL	26	II
	34	INNELSHFL	26	II
	68	FQEFMAFVA	22	III
	71	FMAFVAMVT	22	III
	1	LEKAMVALI	20	I
	6	VALIDVFHQ	20	I
	9	IDVFHQYSG	20	I
	38	LSHFLEEIK	20	II
	42	LEEIKEQEV	20	0
HLA-DR4Pred (SVM)	9	VALIDVFHQ	1,190	I
	77	FVAMVTTAC	1,119	III
	74	FMAFVAMVT	1,018	III
	71	FQEFMAFVA	0,773	III
	52	EVVDKVMET	0,769	0
	66	DGECDFQEF	0,755	III
	45	LEEIKEQEV	0,687	0
	40	ELSHFLEEI	0,669	II
	83	TACHEFFEH	0,637	III
67	GECDFQEFM	0,593	III	
SVMHC	77	FVAMVTTAC	4,8	III
	37	INNELSHFL	1,8	II
	78	VAMVTTACH	1,48	III
	9	VALIDVFHQ	1,2	I
	8	MVALIDVFH	0,96	I
	80	MVTTACHEF	0,8	III
	33	LKELINNEL	0,6	II
	48	IKEQEVVDK	0,38	0
MHC2PRED	8	MVALIDVFH	0,892	I
	77	FVAMVTTAC	0,885	III
	33	LKELINNEL	0,811	II
	37	INNELSHFL	0,689	II
	11	LIDVFHQYS	0,665	I

Tabla 7. Predicciones *in silico* de unión de péptidos derivados de S100 β a la molécula de histocompatibilidad de clase II DR4. La secuencia de S100 β fue analizada mediante los cuatro programas indicados en la columna de la izquierda (SYFPEITHI, HLA-DR4Pred, SVMHC y MHC2PRED). De los programas que predicen más de 10 secuencias (SYFPEITHI y HLA-DR4Pred) se muestran sólo las diez con mejores predicciones, mientras que para los otros dos programas (SVMHC y MHC2PRED) se muestran todas las predicciones dadas por el programa. Se indica la posición dentro de S100 β del primer aminoácido de la secuencia mostrada por el programa (columna posición). La columna secuencia muestra las posiciones P1-P9 de interacción con DR4. Se indica la puntuación otorgada por cada algoritmo a la secuencia mostrada (columna puntuación; en general a mayor puntuación mayor capacidad de unión) y en cuál de las tres regiones de las indicadas en la Figura 29 se encuentra dicha secuencia (se indican como “0” aquellas secuencias no localizadas en ninguna de las tres regiones): verde, región I; marrón, región II; rojo, región III.

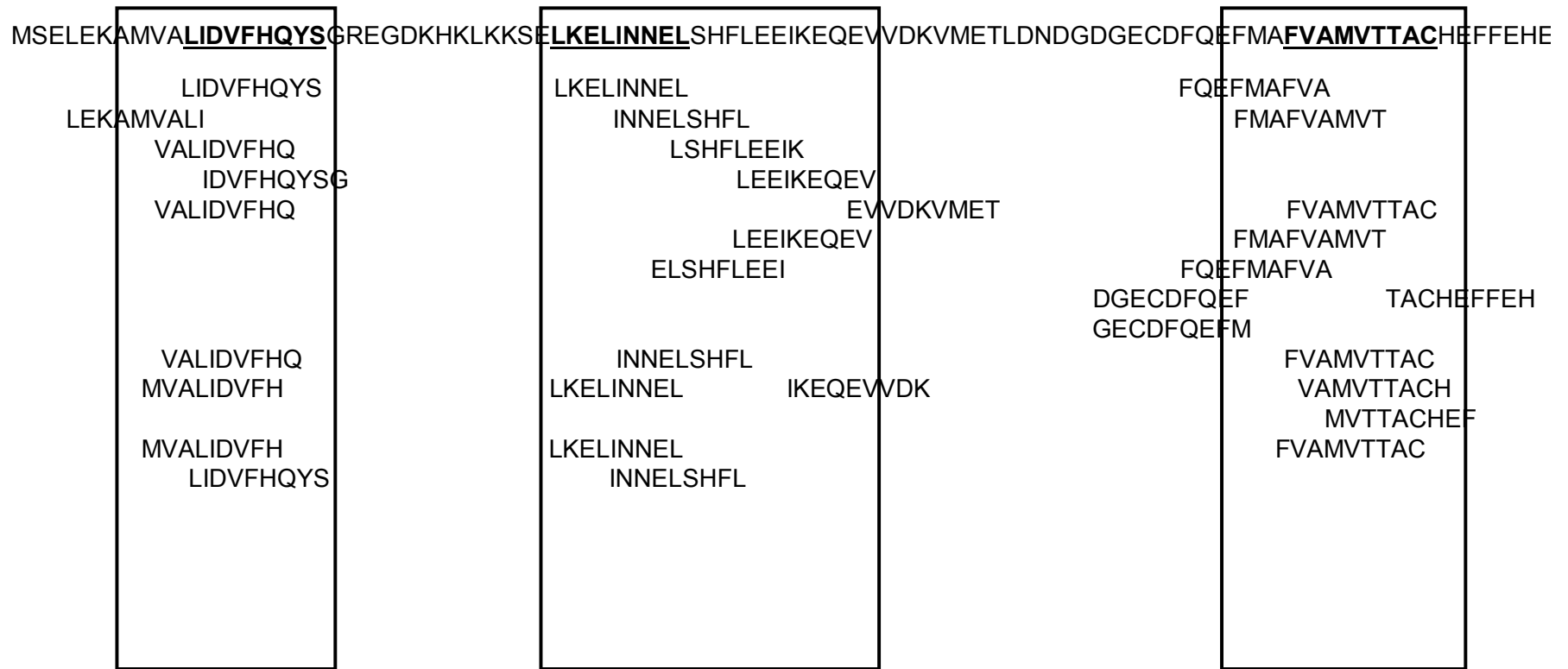


Figura 30: Alineamiento con la secuencia de la proteína S100β de las predicciones *in silico* de unión de péptidos derivados de ella a la molécula de histocompatibilidad de clase II DR4. Las predicciones de unión a DR4 dadas por los cuatro programas mostrados en la Tabla 7 se han alineado con la secuencia de S100β, observándose que casi todas ellas se agrupan en tres regiones prácticamente coincidentes con las mostradas en la Figura 29. **En negrita y subrayadas** se muestran aquellas secuencias aminoacídicas de S100β que contienen el motivo de unión con aminoácidos compatibles en todas las posiciones (P1 a P9).

En el diseño de la secuencia de aminoácidos de los péptidos consenso para las tres regiones, además de la existencia de un grupo de péptidos solapantes y un motivo de unión a la molécula de histocompatibilidad DR4 también tuvimos en cuenta los residuos flanqueantes (PFRs; *peptide flanking residues*) al motivo de unión y la longitud del péptido consenso a sintetizar. Es sabido que los PFRs son importantes en la unión del péptido a las moléculas de histocompatibilidad de clase II y en el reconocimiento por parte del receptor de linfocitos T, especialmente si estos residuos son capaces de formar puentes de sal o de hidrógeno con el TCR (Arnold y cols. 2002). Así, O'Brien y colaboradores (O'Brien y cols. 2008) afirman que un aumento en la longitud del péptido (por aumento en el número de PFRs) implica un aumento en la afinidad de dicho péptido por DR4, si bien dicho aumento ocurre hasta los 18-20 aminoácidos de longitud, a partir de la cual aumentos en la longitud no suponen aumento alguno en la afinidad. Este aumento de afinidad, además, es independiente del hecho de que los residuos PFR se encuentren en el extremo amino-terminal o en el carboxi-terminal.

En cuanto a la longitud total, Lippolis y colaboradores (Lippolis y cols. 2002) identificaron los péptidos presentados por la molécula de histocompatibilidad DR4, detectando que los grupos solapantes presentados por dichas moléculas de histocompatibilidad estaban constituidos por péptidos de entre 14-21 aminoácidos de longitud. En vista de estos resultados decidimos diseñar péptidos consenso con una longitud de entre 15-21 aminoácidos.

Empleando todos los datos señalados anteriormente, como son los datos de identificación de motivos de unión a la molécula de histocompatibilidad DR4, la existencia de grupos solapantes de epitopos procesados y presentados a partir de S100 β , la necesidad de residuos flanqueantes a los motivos de unión y la longitud total, decidimos sintetizar cuatro péptidos consenso para las regiones I, II y III para poderlos emplear en los análisis de ELISPOT (Peakman y cols. 1999). Tal y como se muestra en la Figura 31, diseñamos 4 péptidos consenso: uno para la Región I (S100 6-25, KAMVALIDVFHQYSGREGDK), dos para la Región II (S100 21-36, REGDKHKLKSELKEL; y S100 25-46, KHKLKSELKELINNELSHFLE), y uno para la Región III (S100 68-92, ECDFQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE).

Tres de estos cuatro péptidos (S100 6-25, S100 25-46 y S100 68-92) poseen al menos un motivo de unión de alta afinidad por la molécula de histocompatibilidad DR4 (Figura 31). En el caso del péptido consenso S100 21-36 dicho motivo de unión está incompleto, pero fue seleccionado basándonos en el hecho de que muchos de los epitopos identificados mediante

espectrometría de masas derivan de esta zona de S100 β (Figura 29) y, como han demostrado otros autores, los epítomos autoantigénicos no necesariamente poseen los mejores motivos de unión por la molécula de histocompatibilidad correspondiente (Gebe y cols. 2003).

En la Figura 31 se muestran las secuencias consenso seleccionadas: los números del nombre de cada péptido indican la posición de inicio y fin dentro de S100 β , y en negrita se indica la secuencia central de unión hipotética. Debajo de cada péptido consenso se hallan los péptidos candidatos que incluyen todo o parte del péptido consenso junto con el m/z correspondiente. En A se muestra el péptido consenso para la Región I (S100 6-25), con una longitud de 20 aminoácidos. En B mostramos los péptidos consenso para la Región II (S100 21-36 y S100 25-46); en esta región decidimos sintetizar dos péptidos (de 16 y 22 aminoácidos respectivamente) en vez de uno solo ya que el péptido consenso resultante en esta región sería demasiado largo (casi 30 aminoácidos). Finalmente en C se encuentra S100 68-92, el péptido correspondiente a la Región III, de 25 aminoácidos. Es quizás un poco largo pero a juzgar por los resultados de la Tabla 7, tanto la zona inicial del péptido consenso (ECDF) como la zona terminal (CHEFFEHE) podrían ser zonas unión a DR4, así que decidimos incluir ambas en el péptido consenso.

A

	S100 6-25
	KAMVALIDVFHQYSGREGDK
2.136,048	KAMVALIDVFHQYSGREGD
2.136,048	AMVALIDVFHQYSGREGDK
2.137,851	SELEKAMVALIDVFHQYSG
2.610,379	MSELEKAMVALIDVFHQYSGREG

B

	S100 21-36
	S100 25-46
	REGDKHKLKSELKEL
	KHKLKSELKELINNELSHFLE
1.325,661	REGDKHKLKKS
1.352,681	HKLKSELKEL
2.677,497	KHKLKSELKELINNELSHFLE
2.423,172	SGREGDKHKLKSELKELINN
2.336,108	GREGDKHKLKSELKELINN
2.365,166	EGDKHKLKSELKELINNEL
2.285,184	SELKELINNELSHFLEEIK
2.285,184	KSELKELINNELSHFLEEI

C

	S100 68-92
	ECDFQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE
TLDNDGDGECDFQEFMAFVAMVTTACH	2.967,461
FQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE	2.650,556
EFMAFVAMVTTAC	1.420,840
FQEFMAFVAMVT	1.420,840
DFQEFMAFVAMVTTACHEFFE	2.500,297
NDGDGECDFQEFMAFVAMVTTAC	2.500,297
FQEFMAFVAMVTTA	1.592,802

Figura 31. Péptidos consenso correspondientes a cada región seleccionados para su uso en ensayos de ELISPOT. En el recuadro superior se muestra el nombre del péptido y en el inferior su secuencia, alineada con algunos de los epitopos candidatos identificados mediante espectrometría de masas. En negrita el motivo de unión a la molécula de histocompatibilidad DR4. **A.** Péptido S100 6-25 (Región I). **B.** Péptidos S100 21-36 y S100 25-46 (Región II). **C.** Péptido S100 68-92 (Región III). Los números en el nombre del péptido indican su posición dentro de la secuencia de S100 β .

5.4. Unión a la molécula de histocompatibilidad DR4 de los péptidos consenso derivados de S100 β . Estabilidad del complejo péptido/DR4.

Una vez seleccionados los péptidos consenso decidimos evaluar la capacidad de unión a DR4 y la estabilidad del complejo péptido/DR4 *in vitro* tanto para los péptidos consenso como para los péptidos de 15 aminoácidos derivados de cada uno de ellos (15-mers), así como para algunos de los péptidos procesados y presentados de manera natural (PPPMN) que más influyeron a la hora de definir el péptido consenso correspondiente (ver Figura 31).

Para ello fueron sintetizados los péptidos mostrados en la Tabla 8. Además de los cuatro péptidos consenso se sintetizaron péptidos de 15 aminoácidos de longitud (considerada la longitud óptima de unión a DR4) que abarcaran todo el péptido consenso. Así pues para el péptido consenso S100 6-25 se sintetizaron seis péptidos 15-mer, para el S100 21-36 dos, para el S100 25-46 ocho y para el S100 68-92 once. Asimismo también se incluyeron en el estudio varios PPPMN de cada región (I, II y III), escogiendo aquellos que presentaban mayor intensidad relativa de pico en la espectrometría de masas.

Péptido	Secuencia
Consenso S100 6-25	KAMVALIDVFHQYSGREGDK
15-mer	KAMVALIDVFHQYSG AMVALIDVFHQYSGR MVALIDVFHQYSGRE VALIDVFHQYSGREG ALIDVFGQYSGREGD LIDVFGQYSGREGDK
PPPMN Región I	KAMVALIDVFHQYSGREGD AMVALIDVFHQYSGREGDK SELEKAMVALIDVFHQYSG
Consenso S100 21-36	REGDKHKLKSELKEL
15-mer	REGDKHKLKSELKE EGDKHKLKSELKEL
Consenso S100 25-46	KHKLKSELKELINNELSHFLE
15-mer	KHKLKSELKELINN HKLKSELKELINNE KLKSELKELINNEL LKKSELKELINNELS KKSELKELINNELSH KSELKELINNELSHF SELKELINNELSHFL ELKELINNELSHFLE
PPPMN Región II	REGDKHKLKKS HKLKSELKEL KHKLKSELKELINNELSHFLE SGREGDKHKLKSELKELINN
Consenso S100 68-92	ECDFQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE
15-mer	ECDFQEFMAFVAMVT CDFQEFMAFVAMVTT DFQEFMAFVAMVTTA FQEFMAFVAMVTTAC QEFMAFVAMVTTACH EFMAFVAMVTTACHE FMAFVAMVTTACHEF MAFVAMVTTACHEFF AFVAMVTTACHEFFE FVAMVTTACHEFFEH VAMVTTACHEFFEHE
PPPMN Región III	TLDNDGDGECDFQEFMAFVAMVTTACH FQEFMAFVAMVTTACHEFFEHE EFMAFVAMVTTAC FQEFMAFVAMVT

Tabla 8: Péptidos empleados en el ensayo de unión a DR4 y estabilidad del complejo DR4/péptido. En la columna de la izquierda se indica el péptido y en la de la derecha su secuencia. Se muestra el péptido consenso sintetizado, los péptidos de 15 aminoácidos de longitud derivados de la secuencia consenso (“15-mer”) y los péptidos procesados y presentados de manera natural (PPPMN) identificados por espectrometría de masas para cada uno de los cuatro péptidos consenso. Los PPPMN de los péptidos consenso S100 21-36 y S100 25-46 son los mismos (ver Figura 31).

A continuación se llevó a cabo el ensayo de unión de cada péptido a la molécula de HLA DR4. Estos experimentos, llevados a cabo por la empresa *Proimmune Ltd*, se basan en la detección mediante un anticuerpo específico de la conformación nativa del complejo péptido/DR4 una vez que la molécula de histocompatibilidad está unida a un péptido. En el ensayo se introduce también un control positivo (epitopo conocido para linfocitos T de gran afinidad por DR4), así como un control intermedio (de afinidad débil a DR4). Para cada péptido se asigna una puntuación que consiste en el porcentaje de unión a DR4 respecto de la unión del péptido control positivo. Los péptidos cuyo porcentaje de unión es superior al 15% del péptido control positivo se consideran con afinidad por DR4. La medida de unión a esta molécula de histocompatibilidad se determinó tanto a tiempo cero como a las 24 horas de incubación a 37°C, lo que nos permite tener una idea de la estabilidad de la unión del péptido a la molécula de histocompatibilidad DR4. En este último caso se calcula un índice de estabilidad empleando las medidas recogidas a tiempo cero y a las 24 horas e incluyendo estos datos en una ecuación para estimar la vida media del complejo, de forma que cuanto mayor sea este índice más estable será el complejo péptido/DR4.

En las Figuras 32, 33, 34 y 35 se muestran los resultados obtenidos en dichos ensayos de unión. Según se aprecia en la Figura 32, el péptido consenso S100 6-25 (KAMVALIDVFHQYSGREGDK) presenta una unión intermedia a DR4, si bien es una unión poco estable en el tiempo ya que a las 24 horas apenas se detecta unido a la molécula de histocompatibilidad, siendo su índice de estabilidad intermedio. Ninguno de los péptidos 15-mer presenta mejores características que el péptido consenso del que proceden. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos por los PPPMN de esta región vemos que uno de ellos (péptido 10: SELEKAMVALIDVFHQYSG) presenta mayor estabilidad que el péptido consenso. Como la diferencia principal entre este PPPMN y el péptido consenso es la presencia de 4 aminoácidos adicionales en el extremo amino-terminal podemos concluir que esa zona (SELE) debe contribuir a la unión a DR4, posiblemente por ser residuos flanqueantes que ayuden a la unión del péptido. Según este mismo razonamiento, los 5 últimos aminoácidos del consenso (REGDK), de los cuales carece el PPPMN, no parecen aportar estabilidad a la unión. Así pues, es posible que la secuencia de unión a DR4 sea la propuesta por nosotros y por los distintos algoritmos de predicción (LIDVHFQYS) pero sea necesaria una ampliación hacia el extremo amino-terminal para mejorar la unión y la estabilidad del complejo péptido/DR4.

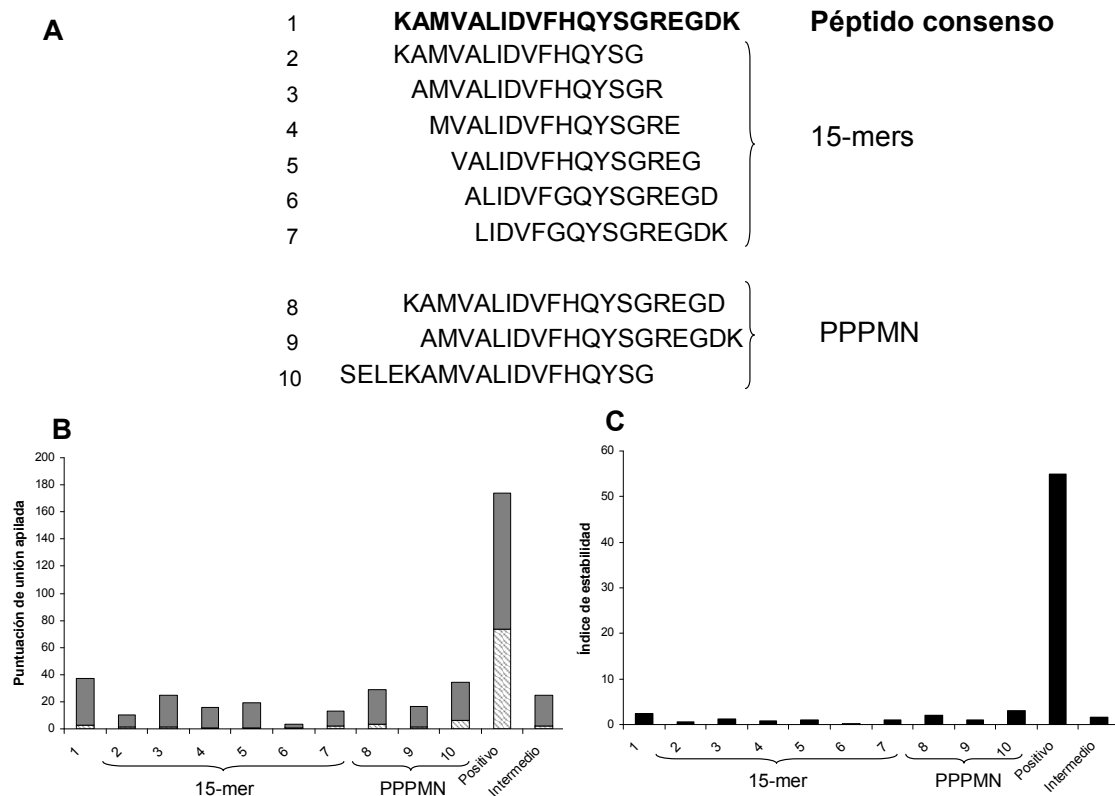


Figura 32. Unión a DR4 y estabilidad del complejo péptido/DR4 para los péptidos de la Región I. **A.** Se muestran los resultados para el péptido consenso S100 6-25 (péptido 1, en negrita), los péptidos de 15 aminoácidos solapantes (péptidos 2-7) y los correspondientes PPPMN (péptidos 8-10). **B.** Se muestra el porcentaje relativo de unión a DR4 en gris (tiempo cero) y el remanente tras incubación durante 24 horas a 37°C (segmento rayado). **C.** Índice de estabilidad del complejo péptido/DR4. Valores más altos indican mayor estabilidad del complejo. Se muestran en B y C los valores de unión y estabilidad para un control positivo (alta afinidad por DR4) y un control intermedio (afinidad intermedia por DR4).

Para la Región II (ver Figura 29) decidimos sintetizar 2 péptidos consenso, S100 21-36 (REGDKHKLKSELKEL) y S100 25-46 (KHKLKSELKELINNELSHFLE), cuyos resultados de unión y estabilidad se muestran en las Figuras 33 y 34, respectivamente. Observamos que según este ensayo ninguno de los dos péptidos consenso se une y/o estabiliza a DR4. En el caso del péptido consenso S100 21-36 (Figura 33), uno de los PPPMN presenta una afinidad de unión y una estabilidad intermedia en comparación con el propio péptido consenso (HKLKSELKEL; péptido 5), siendo un péptido relativamente corto de sólo 11 aminoácidos y que quizás contenga el verdadero motivo de unión a DR4 de esta región. En lo que respecta al péptido consenso S100 25-46 (Figura 34), ni el propio consenso ni ninguno de los 15-mer correspondientes se une y/o estabiliza a DR4. En este caso se observa que el péptido consenso contiene toda la secuencia del PPPMN que presenta cierta afinidad de unión a DR4 (HKLKSELKEL), hecho que indica que la extensión de la secuencia de aminoácidos

tanto hacia el extremo amino- como carboxilo-terminal influye negativamente sobre la unión a DR4 de los péptidos derivados de esta región de S100 β . Podemos concluir entonces que la región de unión a DR4 propuesta por nosotros y por los algoritmos para esta región II (LKELINNEL) no coincide con la realidad, ya que parece ser la zona incluida en el péptido HKLKKSELKEL la que se une, si bien no con gran intensidad, a la molécula DR4. Aunque la secuencia de este PPPMN se halla incluida por completo en el péptido consenso S100 21-36 los aminoácidos extra que éste presenta en el extremo amino-terminal parecen disminuir la capacidad de unión y la estabilidad del complejo péptido/DR4.

A

1	REGDKHKLKKSELKEL	} Péptido consenso
2	REGDKHKLKKSELKE	
3	EGDKHKLKKSELKEL	
4	REGDKHKLKKS	} PPPMN
5	HKLKKSELKEL	
6	KHKLKKSELKELINNELSHFLE	
7	SGREGDKHKLKKSELKELINN	

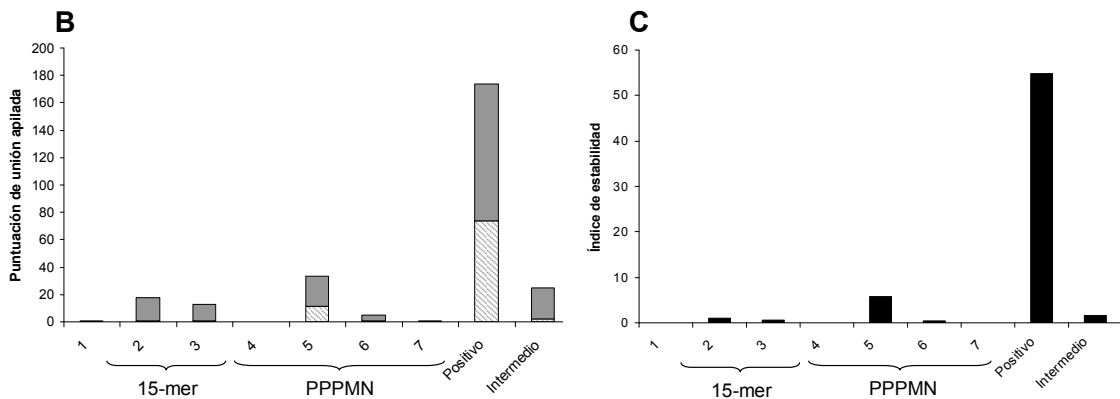


Figura 33. Unión a DR4 y estabilidad del complejo péptido/DR4 para los péptidos de la Región II. A. Se muestran los resultados para el péptido consenso S100 21-36 (péptido 1, en negrita), los péptidos de 15 aminoácidos solapantes (péptidos 2-3) y los correspondientes PPPMN (péptidos 4-7). B. Se muestra el porcentaje relativo de unión a DR4 en gris (tiempo cero) y el remanente tras incubación durante 24 horas a 37°C (segmento rayado). C. Índice de estabilidad del complejo péptido/DR4. Valores más altos indican mayor estabilidad del complejo. Se muestran en B y C los valores de unión y estabilidad para un control positivo (alta afinidad por DR4) y un control intermedio (afinidad intermedia por DR4).

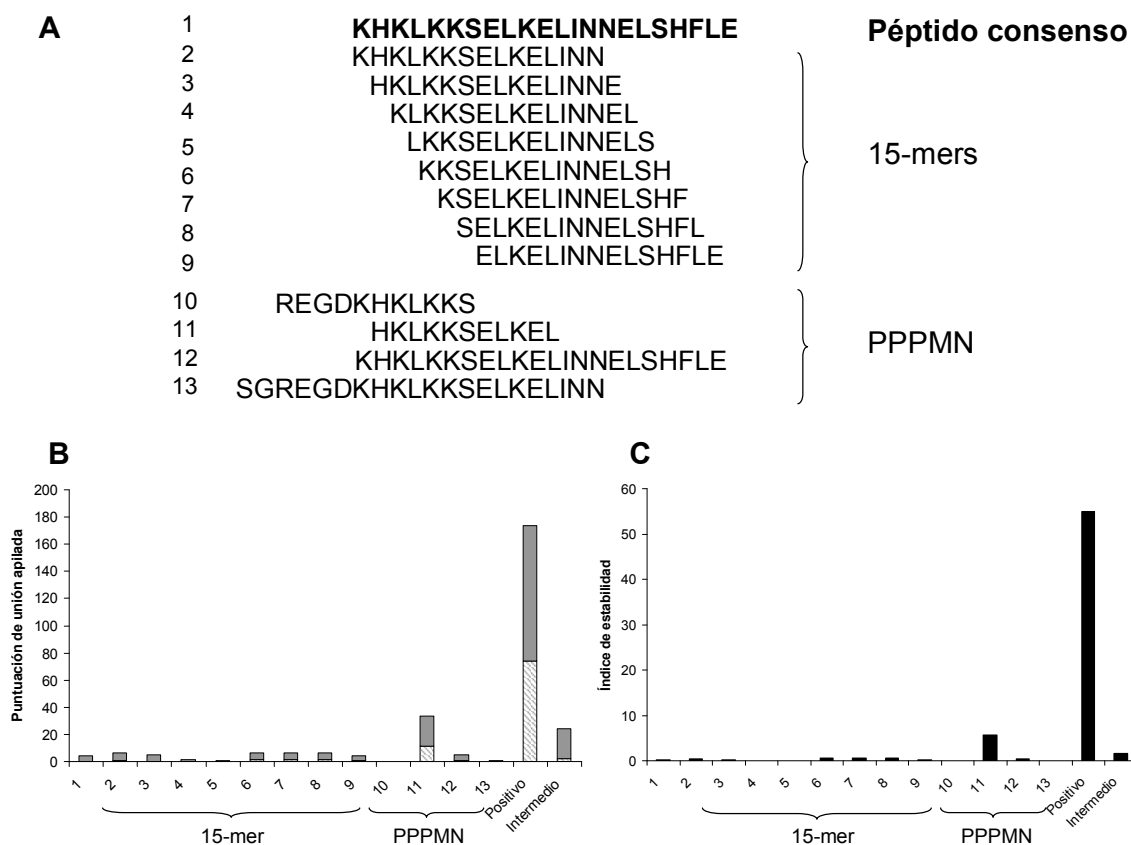


Figura 34. Unión a DR4 y estabilidad del complejo péptido/DR4 para los péptidos de la Región II. A. Se muestran los resultados para el péptido consenso S100 25-46 (péptido 1, en negrita), los péptidos de 15 aminoácidos solapantes (péptidos 2-9) y los correspondientes PPPMN (péptidos 10-13). B. Se muestra el porcentaje relativo de unión a DR4 en gris (tiempo cero) y el remanente tras incubación durante 24 horas a 37°C (segmento rayado). C. Índice de estabilidad del complejo péptido/DR4. Valores más altos indican mayor estabilidad del complejo. Se muestran en B y C los valores de unión y estabilidad para un control positivo (alta afinidad por DR4) y un control intermedio (afinidad intermedia por DR4).

En cuanto al péptido consenso S100 68-92 (Figura 35) y los PPPMN descubiertos mediante espectrometría de masas se observa que poseen afinidades de unión a DR4 elevadas y, además, dicha unión en muchos casos es estable. Al analizar los resultados obtenidos por los distintos péptidos solapantes observamos que la unión a DR4 aumenta según vamos avanzando hacia el extremo carboxi-terminal de la secuencia del péptido consenso, siendo aquellos péptidos con una secuencia comprendida dentro de la región 75-91 (MAFVAMVTTACHEFFEH) los que presentan una afinidad y estabilidad de unión más alta (Figura 35B y C). Así pues, la extensión hacia el extremo carboxi-terminal parece aumentar la afinidad del péptido por DR4.

Es de destacar que los PPPMN de esta Región III presentan una gran afinidad y estabilidad de unión por la molécula DR4. De hecho el PPPMN correspondiente a la

secuencia TLDNDGDGECDFQEFMAFVAMVTTACH (Figura 35A, péptido 13) presenta una estabilidad comparable a la observada para el péptido control de alta afinidad y superior al compararla con la observada para el péptido consenso. Este epitopo incluye gran parte de la secuencia de aminoácidos, la ya descrita 75-91, que parece contribuir de forma importante en la unión del péptido con DR4, mientras que los aminoácidos adicionales presentes en su extremo amino-terminal parecen mejorar la afinidad y estabilidad del péptido por esta molécula de histocompatibilidad. Como en esta secuencia amino-terminal los diferentes algoritmos empleados no predicen motivos de unión a DR4, podemos conjeturar que esos aminoácidos son residuos flanqueantes que estabilizan la unión y que, en conjunción con las predicciones aportadas por los diversos algoritmos sobre los posibles motivos de unión (ver Figura 30), las posiciones P1 (en negrita) del posible motivo de unión del péptido consenso S100 68-92 se encontrarían en la secuencia de aminoácidos **FQEFMAFVAMVTT**, y que otros aminoácidos presentes tanto hacia el extremo carboxi-terminal como hacia el amino-terminal favorecerían la unión de los péptidos que los poseen, como viene demostrado por las buenas puntuaciones de unión y los elevados índices de estabilidad de los PPPMN.

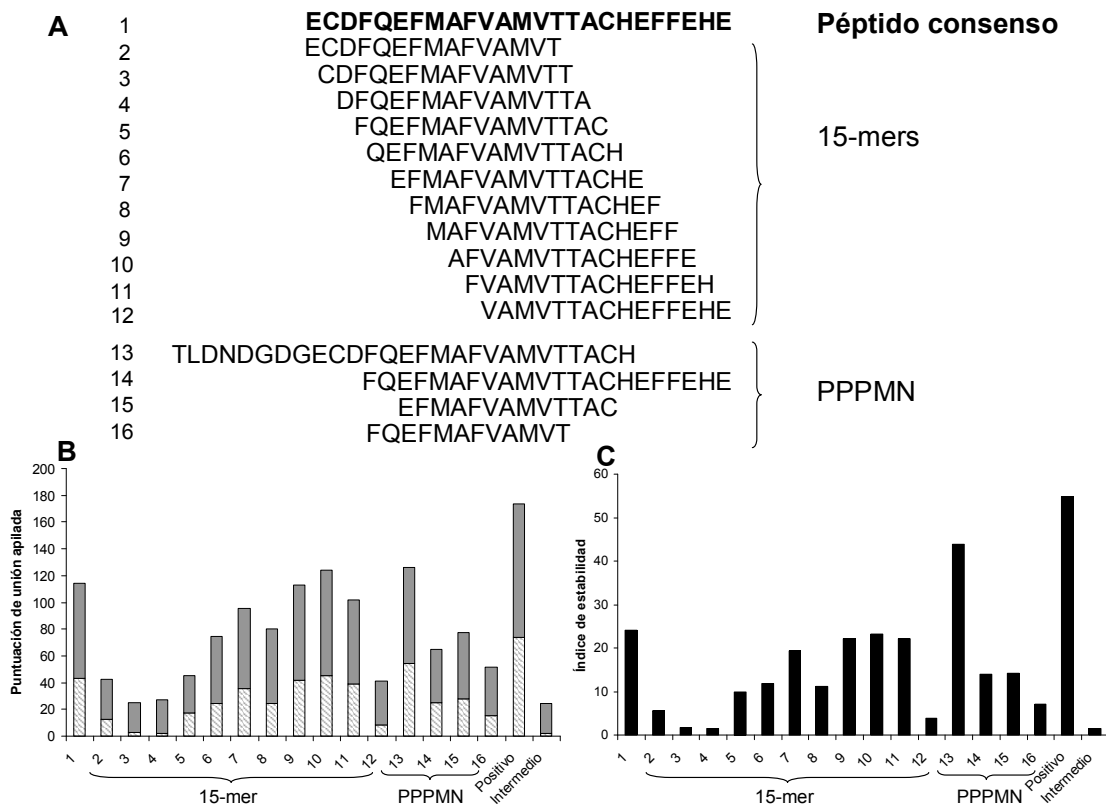


Figura 35. Unión a DR4 y estabilidad del complejo péptido/DR4 para los péptidos de la Región III. Se muestran los resultados para el péptido consenso S100 68-92 (péptido 1, en negrita), los péptidos de 15 aminoácidos solapantes (péptidos 2-12) y los correspondientes PPMN (péptidos 13-16). **B.** Se muestra el porcentaje relativo de unión a DR4 en gris (tiempo cero) y el remanente tras incubación durante 24 horas a 37°C (segmento rayado). **C.** Índice de estabilidad del complejo péptido/DR4. Valores más altos indican mayor estabilidad del complejo. Se muestran en B y C los valores de unión y estabilidad para un control positivo (alta afinidad por DR4) y un control intermedio (afinidad baja por DR4).

En conclusión, de los 4 péptidos consenso sintetizados en este trabajo para el estudio de las respuestas celulares frente a S100 β en personas sanas y pacientes diabéticos, el péptido S100 68-92 y, en menor medida, el S100 6-25, son los que se unen a DR4 y forman complejos más estables *in vitro*, siendo por tanto excelentes candidatos a ser reconocidos en una respuesta linfocitaria. Los péptidos consenso S100 21-36 y S100 25-46 fueron empleados igualmente en los análisis mediante ELISPOT ya que, aunque parece que *in vitro* no se unen a DR4 (S100 25-46) o bien no lo hacen de manera estable (S100 21-36), es sabido que los linfocitos T CD4⁺ pueden reconocer péptidos autoantigénicos que poseen una baja afinidad de unión por la molécula de histocompatibilidad correspondiente (Gebe y cols. 2003).

5.5. Análisis mediante ELISPOT (IFN- γ , IL-10 e IL-17) de la inmunogenicidad de los péptidos consenso de S100 β en sujetos control y pacientes diabéticos.

Una vez sintetizados los péptidos consenso y evaluada su capacidad de unión a DR4, decidimos evaluar su potencial inmunogénico tanto en personas sanas como en pacientes diabéticos mediante la técnica de ELISPOT, una técnica sensible que permite no solo cuantificar el número de células específicas para un determinado antígeno sino también su fenotipo mediante la detección de la producción de diversas citocinas.

Para ello, PBMCs aislados de personas sanas y pacientes diabéticos fueron sembrados por triplicado sobre una placa tapizada con un anticuerpo específico contra la citocina a valorar (IFN- γ , IL-10 o IL-17), en medio de cultivo conteniendo cada uno de los péptidos consenso o diversos controles negativos (dimetilsulfóxido, DMSO; excipiente empleado para disolver los péptidos) o positivos (forbol 12-miristato 13-acetato/ionomicina, PMA/I). Tras 3 días en cultivo las células fueron retiradas de las placas y reveladas siguiendo las instrucciones del fabricante. Los spots fueron cuantificados mediante contaje automático o manual tras el secado de las placas.

Los datos poblacionales de los sujetos empleados en el estudio se muestran en la Tabla 9. No existen diferencias significativas entre controles sanos y pacientes con diabetes tipo 1 en lo que respecta a edad (media 31,33 vs. 26,56; $p > 0,05$, test t de Student) ni sexo (media del porcentaje de hombres 45,83 vs. 59,26; $p > 0,05$, test chi-cuadrado con la corrección por continuidad), por lo que ambos grupos son comparables. Sin embargo, como era de esperar, sí existen diferencias en la frecuencias de individuos DR4 positivos ($p = 0,004$; test chi-cuadrado con la corrección por continuidad), ya que un mayor número de pacientes diabéticos presenta esta molécula de histocompatibilidad (66,67%) respecto de los controles sanos (20,83%).

Caso	Edad	Sexo	DR4
C1	29	F	-
C2	33	F	-
C3	34	M	-
C4	28	F	-
C5	29	F	-
C6	28	F	-
C7	40	M	-
C8	40	M	-
C9	42	M	+
C10	24	M	+
C11	34	M	-
C12	30	F	-
C13	45	M	-
C14	34	M	-
C15	29	F	-
C16	28	F	+
C17	40	M	-
C18	22	F	+
C19	46	M	-
C20	28	F	-
C21	23	F	-
C22	23	M	-
C23	24	F	-
C24	19	F	+
Media de edad	31,33		
% hombres		45,83	
% DR4 positivos			20,83

Caso	Edad	Meses desde debut	Sexo	¿DR4?
Pacientes diabéticos tipo 1				
D1	25	<1	F	-
D2	50	396	M	-
D3		8,6	F	+
D4		4,53	M	+
D5	29	156	M	+
D6	35	204	M	+
D7	33	240	F	+
D8		3,5	M	+
D9		1,5	F	+
D10		<1	M	-
D11		5,5	M	-
D12	33	60	F	-
D13		1,1	F	+
D14		<1	M	+
D15		<1	F	+
D17	18	<1	F	+
D18	23	<1	M	+
D19	19	<1	F	-
D20	35	<1	M	-
D21	23	<1	M	+
D22	32	<1	F	+
D23	24	<1	M	-
D24	30	<1	M	+
D25	28	<1	M	+
D26	17	<1	M	
D27	9	<1	M	
D28	15	<1	F	
Media de edad	26,56			
% hombres			59,26	
% DR4 positivos				66,67

Tabla 9. Datos poblacionales de los controles sanos y los pacientes diabéticos incluidos en los estudios de ELISPOT.

Se consideró que una respuesta era positiva frente a un péptido si el índice de estimulación (IE; ver Materiales y Métodos) era mayor de 3, ya que éste es el criterio más empleado en la literatura y el que ha demostrado una mayor especificidad y sensibilidad (Arif y cols. 2004).

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos para la producción de IFN- γ . Podemos observar que las frecuencias de respuestas positivas frente a los distintos péptidos derivados de S100 β son diferentes entre controles sanos y pacientes diabéticos. Concretamente, el porcentaje de pacientes diabéticos que responden contra los péptidos S100 6-25, S100 25-46 y S100 68-92 es superior al correspondiente en los controles (Tabla 10 y Figura 36) y aunque las diferencias en estas frecuencias, según el test exacto de Fisher, no son significativas, en el

caso de S100 25-46 la razón de verosimilitud sí lo es, lo que sugiere que un futuro aumento en el tamaño muestral podría permitir alcanzar una significación estadística.

Sujeto	PMA/I	S100 6-25	S100 21-36	S100 25-46	S100 68-92
Individuos sanos					
C14	>50	17,67	0,00	1,00	18,33
C15	>50	1,56	1,22	0,73	0,97
C16	>50	3,64	1,50	1,50	0,64
C17	>50	1,00	1,00	1,00	1,00
C18	>50	0,62	1,23	0,65	1,12
C19	>50	0,70	0,99	0,97	0,69
C20	>50	1,33	1,26	0,80	1,88
C21	>50	0,82	0,91	1,64	1,27
C22	>50	0,88	1,18	0,67	0,58
C23	>50	1,14	0,96	0,90	0,79
C24	>50	0,27	1,20	0,89	0,10
Respuestas positivas (%)	100,0	18,2	0,0	0,0	9,1
Pacientes diabéticos tipo 1					
D17	>50	1,00	0,50	1,00	8,50
D18	>50	2,33	1,67	0,33	2,00
D19	>50	4,50	2,50	0,50	5,00
D20	>50	1,00	0,00	2,00	11,00
D21	>50	2,50	2,00	2,50	0,50
D22	>50	0,00	1,00	2,00	0,00
D23	>50				
D24	>50				
D25	>50			>3	
D26	>50	3,10	0,00	5,00	2,00
D27	>50	3,30	1,00	1,00	5,00
D28	>50	3,20	2,00	3,20	1,00
Respuestas positivas (%)	100,0	44,4	0,0	30,0	44,4

Tabla 10. Análisis mediante ELISPOT de la síntesis de IFN- γ por parte de PBMCs de sujetos sanos y pacientes diabéticos en respuesta a los péptidos consenso derivados de S100 β . Los números de la tabla muestran el índice de estimulación (IE; cociente entre n° spots con antígeno / n° spots con DMSO) para cada antígeno en sujetos sanos (C14-C24) y en pacientes diabéticos (D17-D28). Se consideraron positivas aquellas respuestas con un IE mayor de 3 (negrita). Si el número de spots con DMSO era cero se ha denotado la respuesta positiva como “>3”. PMA/I: forbol 12-miristato 13-acetato / ionomicina (control positivo). Se indican también los porcentajes de respuestas positivas para cada antígeno.

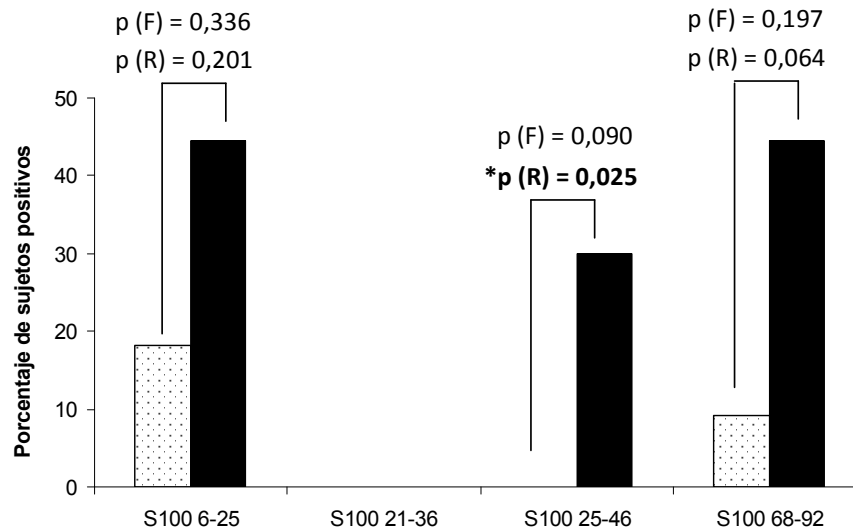


Figura 36. Análisis de las respuestas obtenidas en ELISPOT de IFN- γ para los péptidos consenso derivados de S100 β en sujetos sanos y pacientes diabéticos. Se indica el porcentaje de sujetos con respuesta positiva (IE>3) para los cuatro péptidos consenso tanto en controles sanos (barras blancas) como en sujetos diabéticos (barras negras). Se indica la significación para el test exacto de Fisher (bilateral, “p (F)”) y la significación para la razón de verosimilitud (“p (R)”). Se marcan en negrita las significaciones menores de 0,05.

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos mediante análisis por ELISPOT de la síntesis de IL-10 en respuesta a los péptidos derivados de S100 β . A diferencia de lo que ocurre con la síntesis de IFN- γ , hay un mayor porcentaje de controles sanos que responden contra el péptido S100 6-25 en comparación con los pacientes diabéticos, mientras que para los péptidos S100 21-36 y S100 25-46 parecen ser los diabéticos los que más responden, si bien estos porcentajes se deben únicamente a 2 pacientes, uno de ellos respondiendo positivamente frente a ambos péptidos (D24), y el otro respondiendo sólo contra S100 25-46 produciendo tanto IFN- γ como IL-10 (D26). De todas formas, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de respuestas positivas entre controles y diabéticos para ninguno de estos tres péptidos consenso (Figura 37).

Sorprendentemente, para el péptido S100 68-92 el 100% de los individuos sanos responde fuertemente frente a este péptido sintetizando IL-10 (Tabla 11 y Figura 37); respuesta que es significativamente diferente de la observada en pacientes diabéticos, donde el porcentaje de pacientes que responden frente a este péptido es de sólo el 50% y con respuestas de una menor intensidad a la observada en sujetos sanos. En la Figura 38 se muestra la imagen de los pocillos de ELISPOT para IL-10 de un individuo control (fila superior) y de un paciente diabético (fila inferior). Se observa claramente que el número de *spots* correspondiente al péptido S100 68-92 es muy superior incluso al obtenido en el control

positivo en personas sanas y que, además, esta respuesta es específica, ya que en el control negativo (DMSO) prácticamente no se detectan spots (Figura 38, fila superior). Por el contrario, la respuesta observada frente a este mismo péptido no es del mismo orden de intensidad en los pacientes diabéticos (Figura 38, fila inferior).

Sujeto	PMA/I	S100 6-25	S100 21-36	S100 25-46	S100 68-92
Individuos sanos					
C14	>10	0,00	0,88	1,38	>100
C15	>10	1,06	1,50	0,58	>100
C17	>10	40,00	0,80	1,20	>100
C18	>10	0,17	1,00	0,50	>100
C19	>10	8,13	0,63	0,38	>100
C20	>10	>10	2,75	0,75	>100
C21	>10	4,38	0,75	0,13	>100
C22	>10	0,67	0,33	0,44	>100
C23	>10	0,19	1,25	0,19	>100
C24	>10	2,00	1,00	0,00	>100
Respuestas positivas (%)	100,0	40,0	0,0	0,0	100,0
Pacientes diabéticos tipo 1					
D17	>10	0,50	1,50	2,00	2,00
D18	>10				
D19	>10	2,43	2,29	2,71	6,86
D20	>10	0,00	0,33	0,67	2,00
D21	>10	1,20	1,00	2,80	6,60
D22	>10	1,50	2,50	1,50	9,00
D23	>10	>3			
D24	>10		>3	>3	
D25	>10				
D26	>10	2,00	1,50	4,00	1,00
D27	>10	1,00	2,00	0,00	1,00
D28	>10	1,50	2,00	0,50	>10
Respuestas positivas (%)	100,0	11,1	11,1	22,2	50,0

Tabla 11. Análisis mediante ELISPOT de la síntesis de IL-10 por parte de PBMCs de sujetos sanos y pacientes diabéticos en respuesta a los péptidos consenso derivados de S100 β . Los números de la tabla muestran el índice de estimulación (IE; cociente entre n° spots con antígeno / n° spots con DMSO) para cada antígeno en sujetos sanos (C14-C24) y en pacientes diabéticos (D17-D28). Se consideraron positivas aquellas respuestas con un IE mayor de 3 (negrita). Si el número de spots con DMSO era cero se ha denotado la respuesta positiva como “>3”. PMA/I: forbol 12-miristato 13-acetato / ionomicina (control positivo). Se indican también los porcentajes de respuestas positivas para cada antígeno.

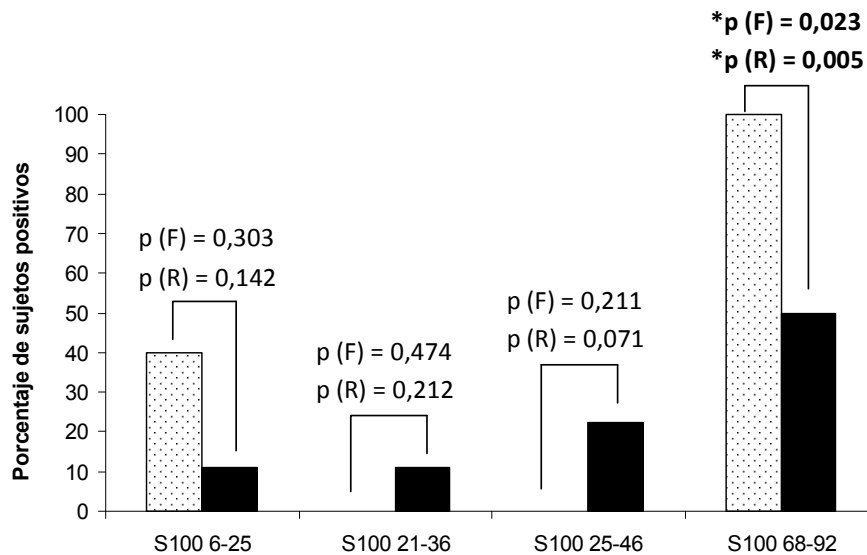


Figura 37. Análisis de las respuestas obtenidas en ELISPOT de IL-10 para los péptidos consenso derivados de S100β en sujetos sanos y pacientes diabéticos. Se indica el porcentaje de sujetos con respuesta positiva (IE>3) para los cuatro péptidos consenso tanto en controles sanos (barras blancas) como en sujetos diabéticos (barras negras). Se indica la significación para el test exacto de Fisher (bilateral, “p (F)”) y la significación para la razón de verosimilitud (“p (R)”). Se marcan en negrita las significaciones menores de 0,05.

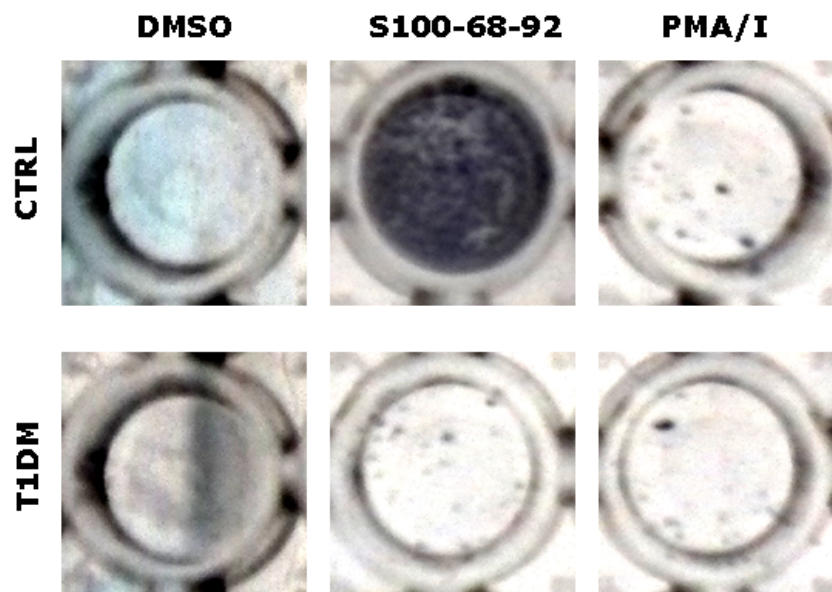


Figura 38. Análisis mediante ELISPOT de la síntesis de IL-10 en personas sanas y pacientes diabéticos. Se muestran las imágenes de los resultados obtenidos mediante ELISPOT para IL-10 en personas sanas (fila superior, CTRL) y pacientes diabéticos (fila inferior, T1DM) frente al control negativo (diluyente de los péptidos, DMSO), al péptido consenso S100 68-92 y al control positivo PMA/I. Se muestra el resultado representativo de una persona sana y el del paciente diabético con el mayor índice de estimulación para S100 68-92 (D28, ver Tabla 11). Se observa la intensa respuesta contra S100 68-92 en el sujeto control, en comparación con la respuesta moderada obtenida por el paciente diabético.

Además de este análisis de frecuencias de respuesta frente a IFN-γ e IL-10, se ha observado que si una persona muestra una respuesta positiva contra un péptido lo hace sintetizando sólo una de las dos citocinas, IFN-γ o IL-10, con la excepción de un par de casos (Tabla 12), existiendo además diferencias significativas entre el patrón de respuesta de personas sanas y pacientes diabéticos ($p = 0,026$), de tal modo que los controles sanos responden preferentemente produciendo IL-10 ($p = 0,020$) y los pacientes diabéticos produciendo IFN-γ ($p = 0,036$) (test Chi-cuadrado). Este mismo hecho se muestra en la Figura 39, donde se han representado los índices de estimulación superiores a 3 para cualquier péptido, y donde se observa que los controles se agrupan en torno al eje x (IE de IL-10), sugiriendo un fenotipo inmunoregulador no proinflamatorio, mientras que los diabéticos presentan una polarización hacia un fenotipo claramente proinflamatorio de tipo Th1, ya que dichas respuestas se agrupan en torno al eje y (IE de IFN-γ). Este mismo comportamiento es observado por otros autores respecto a epitopos derivados de otros autoantígenos importantes en el desarrollo de esta enfermedad como IA-2 y proinsulina (Arif y cols. 2004). Existe además una correlación inversa entre el IE para IFN-γ y el IE para IL-10 ($r = -0,552$; $p = 0,003$. Coeficiente de correlación de Spearman).

*Tipo de respuesta ¹	Controles sanos	Pacientes diabéticos
*Sólo IFN-γ ²	2 (12,5%)	9 (52,9%)
IFN-γ e IL-10 ³	1 (6,3%)	2 (11,8%)
*Sólo IL-10 ⁴	13 (81,3%)	6 (35,3%)

Tabla 12. Comparación entre la positividad para IFN-γ y para IL-10 en controles sanos y pacientes diabéticos. Se muestra el número de respuestas positivas (y el porcentaje entre paréntesis) según el patrón de citocinas sintetizado (sólo IFN-γ, IFN-γ e IL-10, o sólo IL-10), contra cualquier péptido de S100β analizado en ELISPOT en personas sanas y pacientes diabéticos. ¹Distribución de respuestas entre controles y pacientes ($p = 0,026$; test Chi-cuadrado); ²Distribución de respuestas entre controles y pacientes sintetizando sólo IFN-γ ($p = 0,036$; test Chi-cuadrado); ³Distribución de respuestas entre controles y pacientes sintetizando ambas citocinas ($p = 1,000$; test exacto de Fisher). ⁴Distribución de respuestas entre controles y pacientes sintetizando sólo IL-10 ($p = 0,020$; test de Chi-cuadrado). * $p < 0,05$.

Sujeto	PMA/I	S100 6-25	S100 21-36	S100 25-46	S100 68-92
Individuos sanos					
C1	>10	2,00	0,00		
C2	>10	1,00	0,00	0,50	
C3	>10	0,00	0,00	0,00	0,00
C4	>10	0,00	0,00	0,00	0,00
C5	>10	1,00	2,00	0,00	
C6	>10	0,00	0,00	0,00	
C7	>10	0,50	1,00	1,00	0,50
C8	>10	0,00	0,50	0,00	0,00
C9	>10	0,00	0,00	0,00	0,00
C10	>10	1,00	0,00	1,00	0,00
C11	>10	1,00	2,00	3,00	0,00
C12	>10	0,00	1,00	0,00	0,00
C13	>10	0,00	1,00	0,00	0,00
Respuestas positivas (%)	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pacientes diabéticos tipo 1					
D1	>10	0,00	1,00	5,00	1,00
D2	>10	12,00	8,00	8,00	12,00
D3	>10	0,00	0,00	0,00	3,10
D4	>10	0,50	1,50	0,00	2,00
D5	>10	1,30	1,00	0,50	2,00
D6	>10	1,00	0,50	0,50	0,00
D7	>10	1,30	1,10	1,10	1,70
D8	>10	2,00	0,00	0,00	0,00
D9	>10	0,00	2,00	2,00	1,00
D10	>10	0,00	4,00	0,00	0,00
D11	>10	0,50	2,00	2,00	0,50
D12	>10	0,00	1,00	0,00	0,00
D13	>10	0,00	0,00	0,00	0,00
D14	>10	0,00	0,00	0,00	0,00
D15	>10	0,00	0,00	0,00	0,00
Respuestas positivas (%)	100,0	6,7	13,3	13,3	13,3

Tabla 13. Análisis mediante ELISPOT de la síntesis de IL-17 por parte de PBMCs de sujetos sanos y pacientes diabéticos en respuesta a los péptidos consenso derivados de S100 β . Los números de la tabla muestran el índice de estimulación (IE; cociente entre n° spots con antígeno / n° spots con DMSO) para cada antígeno en sujetos sanos (C1-C13) y en pacientes diabéticos (D1-D15). Se consideraron positivas aquellas respuestas con un IE mayor de 3 (negrita). Si el número de spots con DMSO era cero se ha denotado la respuesta positiva como “>3”. PMA/I: forbol 12-miristato 13-acetato / ionomicina (control positivo). Se indican también los porcentajes de respuestas positivas para cada antígeno.

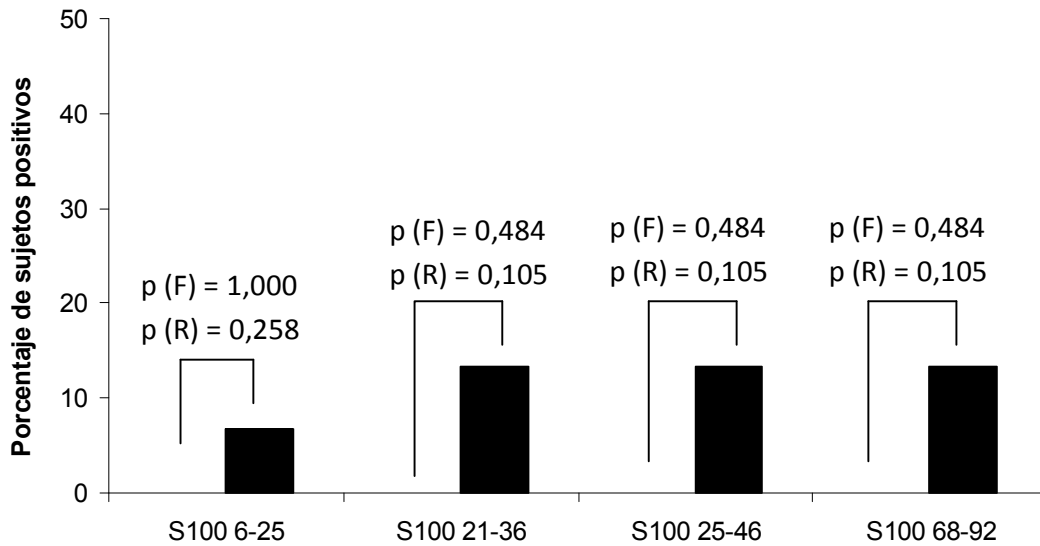


Figura 40. Análisis de las respuestas obtenidas en ELISPOT de IL-17 para los péptidos consenso derivados de S100 β en sujetos sanos y pacientes diabéticos. Se indica el porcentaje de sujetos con respuesta positiva (IE>3) para los cuatro péptidos consenso tanto en controles sanos (barras blancas) como en sujetos diabéticos (barras negras). Se indica la significación para el test exacto de Fisher (bilateral, “p (F)”) y la significación para la razón de verosimilitud (“p (R)”).

De los resultados de los distintos análisis mediante ELISPOT podemos concluir que los pacientes diabéticos parecen responder contra los péptidos S100 25-46, S100 6-25 y S100 68-92 produciendo IFN- γ (los 2 últimos cerca de alcanzar la significancia estadística) mientras que, por el contrario, los sujetos sanos sintetizan IL-10 en respuesta a estos mismos péptidos, en particular frente a S100 68-92, lo que sugiere una respuesta proinflamatoria de tipo Th1 en estos pacientes en respuesta a estos péptidos derivados de S100 β con una disminución de la respuesta reguladora (Treg) frente a dichos epitopos. Además, en pacientes diabéticos parece detectarse la presencia de células autorreactivas secretoras de IL-17 en respuesta a alguno de los epitopos derivados de S100 β , pero su número parece ser bastante inferior en sangre periférica al compararlo con el número de linfocitos autorreactivos secretores de IFN- γ frente a estos epitopos. De todos modos, existe una tendencia a que los índices de estimulación frente a estos péptidos sean superiores a los de controles sanos, tendencia estadísticamente significativa en el caso de S100 68-92.

5.6. Resumen:

Se han identificado 44 PPPMN pertenecientes a S100 β (correspondientes a 32 m/z únicos) como candidatos a ser péptidos procesados y presentados de manera natural por la molécula de histocompatibilidad DR4, formando grupos solapantes y agrupándose en torno a tres regiones. Se han sintetizado 4 péptidos consenso (S100 6-25, S100 21-36, S100 25-46 y S100 68-92) a partir de los PPPMN identificados.

La afinidad de unión a DR4 por parte del péptido consenso S100 6-25 es intermedia, siendo LIDVHFQYS la secuencia central de unión. Una ampliación del péptido por el extremo amino-terminal mejoraría la unión a DR4. Los péptidos consenso S100 21-36 y S100 25-46 no muestran afinidad por DR4. Finalmente, el péptido consenso S100 68-92 es el que muestra una mayor afinidad por DR4, formando complejos de elevada estabilidad. El posible motivo de unión del péptido consenso S100 68-92 se encontraría en la secuencia de aminoácidos **FQEFMAFVAMVTT** (en negrita los posibles aminoácidos P1). Extensiones hacia el extremo amino- o carboxi-terminal mejoran la afinidad por DR4.

Los pacientes diabéticos presentan una respuesta proinflamatoria de tipo Th1 en respuesta a S100 25-46, S100 6-25 y S100 68-92 con una disminución de la respuesta reguladora (Treg) frente a dichos epitopos, siendo de destacar la elevada producción de IL-10 por parte de individuos sanos frente a S100 68-92. En pacientes diabéticos se detecta la presencia de células autorreactivas secretoras de IL-17 en respuesta a alguno de los epitopos derivados de S100 β , existiendo una tendencia a que los índices de estimulación frente a estos péptidos sean superiores a los de controles sanos, especialmente en el caso de S100 68-92.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

Capítulo 6:

Péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por la molécula de histocompatibilidad de clase I HLA-A*02:01.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

6.1. Clonaje de S100 β y generación de las células presentadoras de antígeno K562/A2.1-S100 β .

Se ha demostrado recientemente que la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I HLA-A*02:01 puede seleccionar linfocitos CD8⁺ autorreactivos capaces de destruir los islotes de Langerhans en el ratón NOD (Marron y cols. 2002), y que dicha molécula confiere además susceptibilidad a sufrir la enfermedad en humanos (Todd y cols. 2007. Robles y cols. 2002); es por ello que decidimos determinar cuáles eran los péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural por esta molécula de histocompatibilidad de clase I que constituyen los epitopos autorreactivos reconocidos por linfocitos CD8⁺ en pacientes diabéticos.

Para ello creamos una célula presentadora de antígenos basada en la línea linfoblastoide K562 transfectada con el alelo A*02:01 (línea K562/A2.1) (Britten y cols. 2002), la cual expresa solamente esta molécula de histocompatibilidad en su superficie. Para que esta línea celular sirviese como célula presentadora de S100 β la transfectamos con la pauta de lectura abierta correspondiente a esta proteína clonada en un vector de expresión eucariota (ver Materiales y Métodos). Las células transfectantes fueron seleccionadas empleando zeocina y la expresión de S100 β en dichas células fue analizada mediante *western blot* quimioluminiscente. En la Figura 41 se muestra la presencia de una proteína de un tamaño aproximado de 13 kDa que es reconocida por un anticuerpo monoclonal contra S100 β , y que se detecta tanto en extractos citoplasmáticos preparados a partir de células transfectadas con S100 β de forma transitoria (Figura 41, calle 2) como en extractos de una línea celular estable seleccionada con zeocina (Figura 41, calle 3). Estos datos confirman la expresión de la proteína en esta línea celular, a la cual hemos denominado K562/A2.1-S100 β .

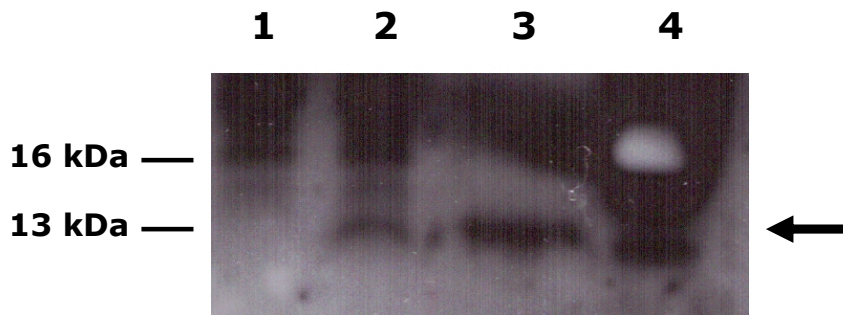


Figura 41. Análisis por *western blot* de extractos citoplasmáticos de células K562/A2.1 transfectadas con S100 β . La línea celular K562/A2.1 fue transfectada con la pauta de lectura abierta de S100 β insertada en el vector pcDNA 3.1 (+)/Zeo. Calle 1: extracto citoplasmático de células K562/A2.1 sin transfectar; calle 2: células K562/A2.1 transfectadas con S100 β de manera transitoria; calle 3: línea estable de células K562/A2.1 transfectadas con S100 β ; calle 4: S100 β producida y purificada en nuestro laboratorio (tamaño esperado de 16 kDa; ver Figura 11). La flecha señala la posición de la S100 β expresada por las células transfectantes (13 kDa).

A partir de esta línea celular K562/A2.1-S100 β decidimos obtener clones por dilución límite que expresasen niveles elevados de S100 β , y que por lo tanto presentasen una mayor cantidad de péptidos derivados de dicha proteína que pudiesen ser identificados posteriormente mediante espectrometría de masas. De un total de 12 clones sólo cuatro crecieron a niveles aceptables (clones #3, #6, #9 y #10), y la expresión de A*02:01 y S100 β en dichos clones fue analizada tanto por citometría de flujo como por inmunofluorescencia. En el análisis mediante citometría de flujo (Figura 42) las células fueron teñidas en superficie para A*02:01 y posteriormente, tras fijarlas y permeabilizarlas, teñidas intracelularmente para S100 β . Se observa que las células K562 originales sin transfectar no expresan ninguna de las dos proteínas (Figura 42A, panel 4), mientras que de los cuatro clones el #6 y el #10 (Figura 42A, paneles 6 y 8) expresan niveles mucho más elevados de S100 β al compararlos con los clones #3 y #9 (Figura 42A, paneles 5 y 7). Dicha diferencia se observa más claramente al cuantificar la fluorescencia media de la tinción anti-S100 β en los distintos clones (Figura 42B). Por el contrario, los niveles de expresión de A*02:01 en los cuatro clones fue muy similar (Figuras 42A y 42B).

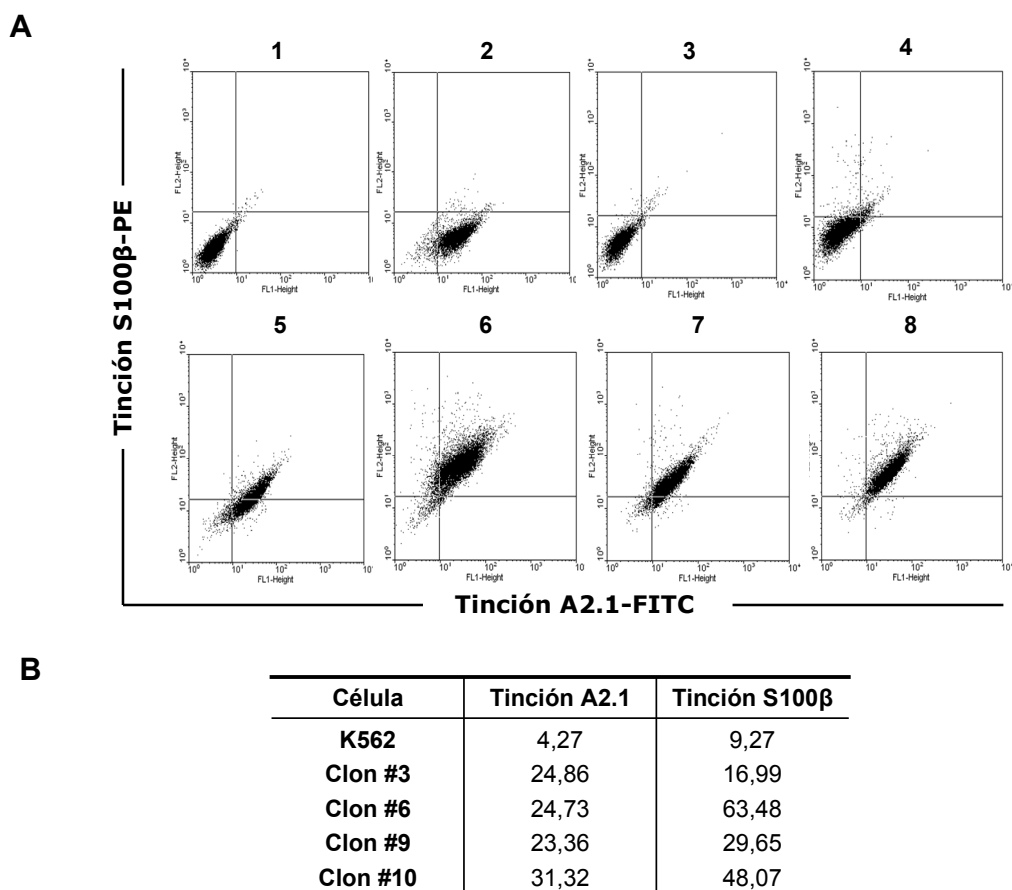


Figura 42. Análisis por citometría de flujo de clones K562/A2.1-S100β. Cuatro clones (#3, #6, #9 y #10) fueron teñidos en superficie para A*02:01 e intracelularmente para S100β empleando anticuerpos monoclonales (ver Materiales y Métodos). **A.** Diagramas de las tinciones control y las correspondientes a los cuatro clones (A*02:01, eje x y S100β, eje y). Panel 1: clon #3 sin teñir; panel 2: clon #3 teñido para A*02:01; panel 3: clon #3 teñido con anti-IgG de ratón conjugado a PE (anticuerpo secundario en la tinción para S100β); panel 4: células K562 originales teñidas para A*02:01 y S100β; paneles 5-8: clones #3, #6, #9 y #10 respectivamente, teñidas para A*02:01 y S100β. Se observa la expresión tanto de A*02:01 como de S100β en los cuatro clones pero no en las células K562 originales. **B.** Tabla resumen de las fluorescencias medias para A*02:01 (columna “Tinción A2.1”) y S100β (columna “Tinción S100β”). Existe un claro aumento en ambas intensidades entre los clones y las células K562 originales sin transfectar (control negativo).

Para comprobar la localización celular de S100β y A*02:01 en nuestros cuatro clones decidimos llevar a cabo un análisis por inmunofluorescencia, escogiendo los clones #3 (el de menor expresión de S100β) y #6 (el de mayor expresión de S100β). En este análisis, las células fueron teñidas para A*02:01 en superficie o bien, una vez fijadas y permeabilizadas, teñidas para S100β intracelular. Al igual que ocurre en el análisis por citometría de flujo y como era de esperar, las células K562 originales no expresan ni A*02:01 ni S100β (Figura 43, fila superior). Por el contrario, los dos clones analizados expresan claramente la molécula de

histocompatibilidad A*02:01 en la superficie celular (Figura 43, ver columna A2.1) y el antígeno S100 β en el citoplasma celular (Figura 43, ver columna S100 β).

A falta de una tinción específica para citoesqueleto, los resultados de inmunofluorescencia parecen sugerir que S100 β presenta un patrón de expresión típico de citoesqueleto en K562 (Calcabrini y cols. 1999), lo cual coincide con los resultados publicados por otros autores, que afirman que la S100 β intracelular se une a proteínas de citoesqueleto como la proteína tau asociada a microtúbulos, la tubulina o la GFAP, entre otras (Sorci y cols. 1998).

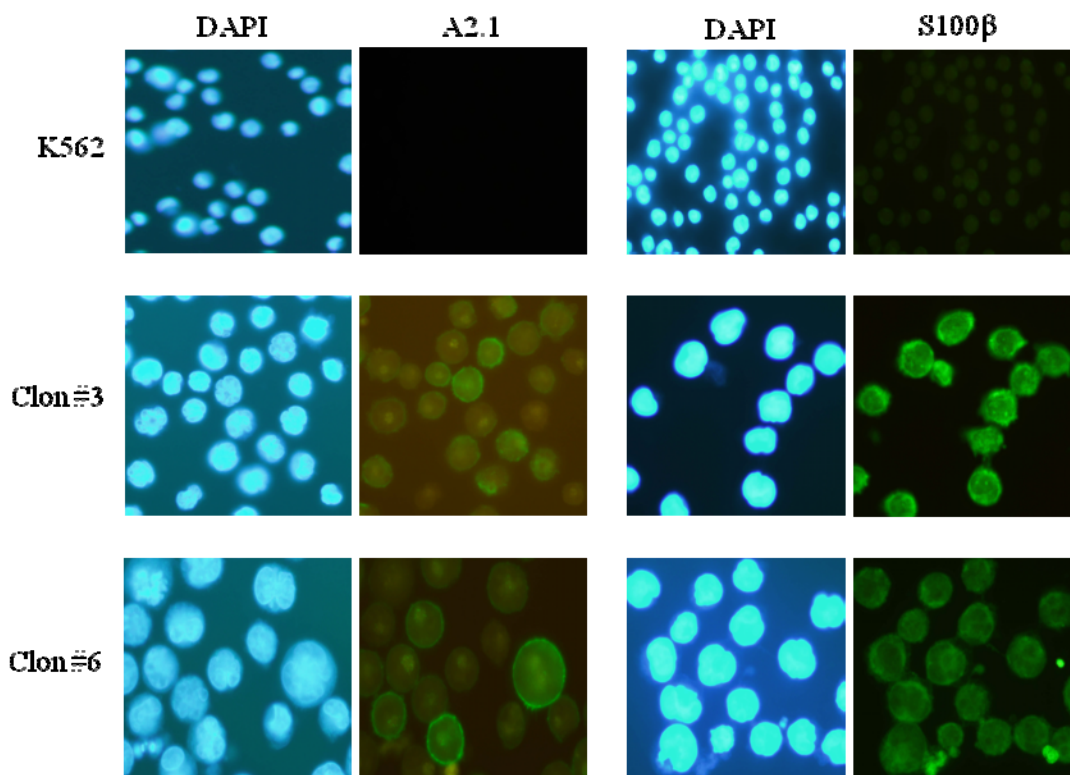


Figura 43. Análisis por inmunofluorescencia de los clones #3 y #6 de K562/A2.1-S100 β . Fila superior: células K562 originales sin transfectar; fila central: células K562/A2.1-S100 β clon #3; fila inferior: células K562/A2.1-S100 β clon #6. Las células fueron teñidas en superficie para A*02:01 (columna A2.1) o intracelularmente para S100 β (columna S100 β). Las células fueron localizadas mediante tinción con DAPI de los núcleos celulares. Se observa la presencia de A*02:01 en ambos clones pero no en K562. Asimismo, se distingue claramente la expresión de S100 β en ambos clones.

6.2. Crecimiento de K562/A2.1 y K562/A2.1-S100β: purificación y fraccionamiento de epítomos procesados y presentados de manera natural por la molécula A*02:01.

Una vez obtenidos clones de células K562/A2.1 que expresan altos niveles de S100β procedimos al crecimiento de uno de dichos clones y de células K562/A2.1 como control hasta un número total de 10^{10} células, tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos. A diferencia de las células Priess, que expresan varias moléculas de histocompatibilidad diferentes en su superficie celular, tanto las células K562/A2.1 como las K562/A2.1-S100β sólo expresan la molécula A*02:01, de forma que empleamos un método de extracción directa de la superficie celular de los péptidos unidos a A*02:01 mediante incubación breve de las células en un tampón ácido (Storkus y cols. 1993). Las células fueron incubadas en tampón citrato durante 5 minutos y los péptidos eluidos de las moléculas A*02:01 fueron ultrafiltrados empleando membranas de 3 kDa de punto de corte para aislar péptidos de menos de 27 aminoácidos de longitud. Los distintos filtrados se guardaron a -80°C hasta su fraccionamiento mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC).

La eficacia de este método de extracción de péptidos presentes en las moléculas A*02:01 de superficie fue verificada mediante citometría de flujo, ya que las moléculas de histocompatibilidad con la hendidura libre son inestables y desaparecen de la superficie celular. Como se observa en la Figura 44, el tratamiento con tampón citrato reduce significativamente la presencia de las moléculas de histocompatibilidad A2.1 en la superficie celular (Figura 44, línea negra). Sin embargo, cuando estas mismas células son lavadas e incubadas de nuevo en medio de cultivo completo, recuperan la expresión de superficie de A*02:01 en 24 horas (Figura 44, línea verde).

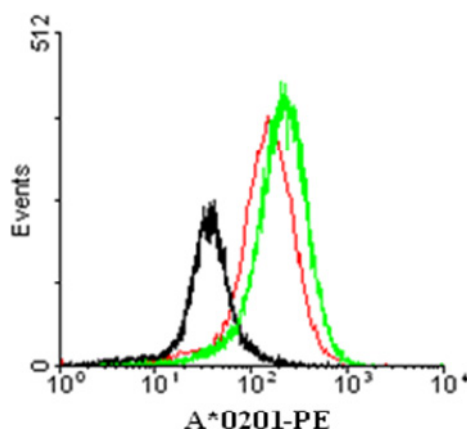


Figura 44. Análisis por citometría de flujo del efecto del tratamiento ácido sobre la expresión de A*02:01 en la superficie de células K562/A2.1-S100 β . Células de uno de los clones K652/A2.1-S100 β fueron incubadas en tampón citrato (pH=3,0) durante 5 minutos. Una vez lavadas, una alícuota fue fijada y teñida para A2.1 (línea negra). El resto de las células fueron puestas de nuevo en cultivo durante 24 horas, tras lo cual fueron fijadas y teñidas (línea verde). Como puede verse, la incubación en medio ácido reduce la cantidad de moléculas A*02:01 en la superficie celular probablemente por la eliminación de los péptidos que contienen en su hendidura. Esta cantidad es recuperada tras 24 horas en cultivo. Como control algunas células fueron tratadas con PBS en vez de con tampón citrato, fijadas y teñidas (línea roja).

Una vez obtenidos los extractos en tampón citrato equivalentes a 10^{10} células, los péptidos presentes en los extractos fueron concentrados mediante la técnica de extracción por fase sólida (SPE) empleando una resina hidrofóbica de fase reversa (DSC-18) tal y como se describe en Materiales y Métodos. Los péptidos retenidos en las columnas DSC-18 fueron eluidos en acetonitrilo y concentrados a vacío hasta un volumen final en torno a los 150 μ L. A continuación, 50 μ L de esta mezcla compleja fueron fraccionados mediante RP-HPLC y separados en 130 fracciones. Tal y como se muestra en la Figura 45, la mayor parte de los péptidos eluye de la columna cuando el porcentaje de acetonitrilo se encuentra entre 12-48% (equivalente a un 20-80% de bomba B).

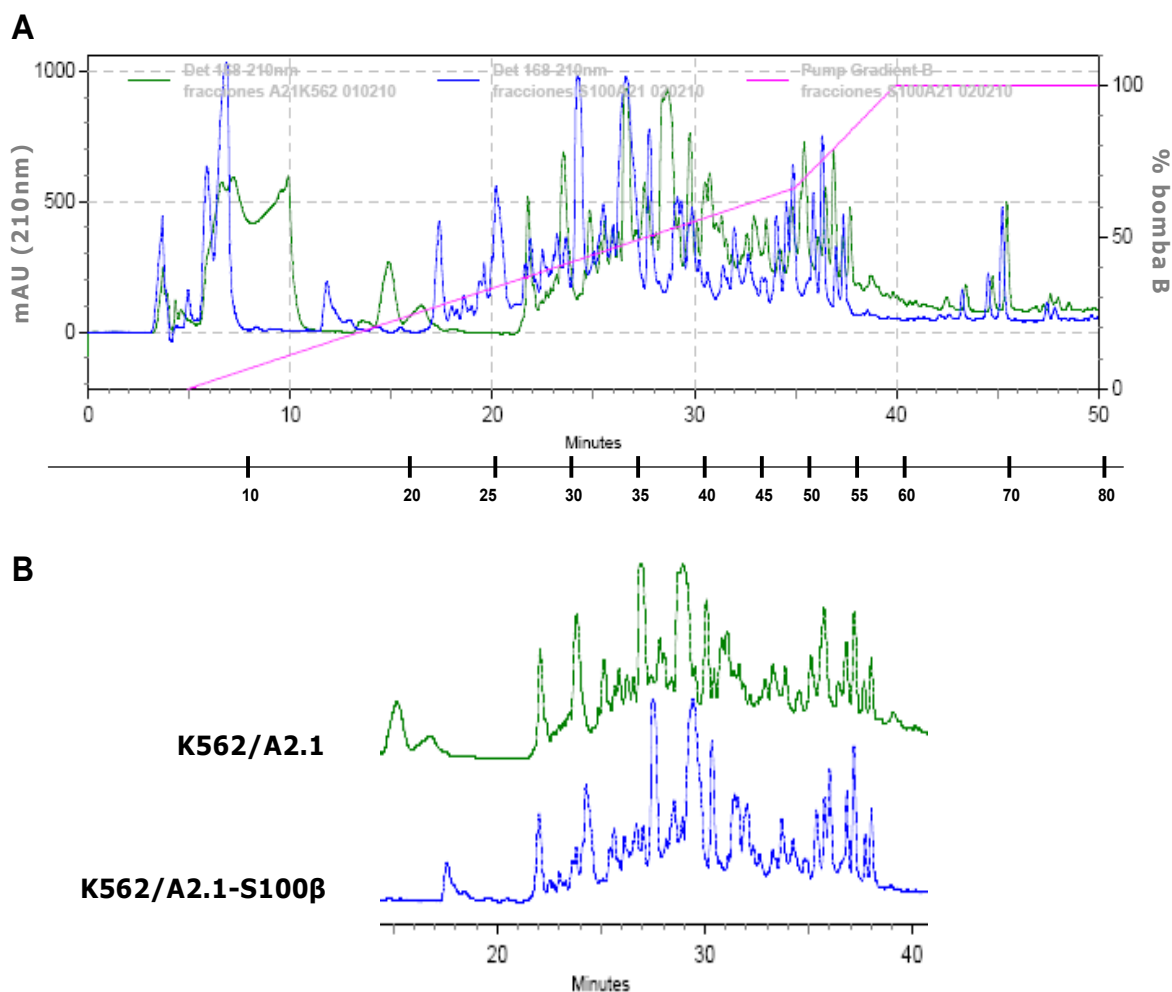


Figura 45. Fraccionamiento por RP-HPLC de los péptidos obtenidos de células K562/A2.1 y K562/A2.1-S100β. A. Cromatograma (210 nm) del fraccionamiento de la mezcla de péptidos obtenida a partir de células K562/A2.1 (cromatograma verde) o a partir de células K562/A2.1-S100β (cromatograma azul). La línea rosa representa el porcentaje de la bomba B (60% acetonitrilo 0,05% ácido trifluoroacético). Bajo el panel se indica el número de fracción correspondiente. B. Se muestra la región que contiene la mayor cantidad de péptidos y que fue analizada mediante espectrometría de masas (minutos 14 a 40; fracciones 17 a 60). Las trazas correspondientes a K562/A2.1 (verde) y a K562/A2.1-S100β (azul) han sido desplazadas para poder apreciar mejor las diferencias entre ambos cromatogramas.

6.3. Espectrometría de masas e identificación de masas únicas.

Se analizaron mediante espectrometría de masas las fracciones 17 a 60 al ser éstas las que contenían la mayor parte de los péptidos (ver Figura 45B). El flujo de trabajo de este análisis y los resultados obtenidos se esquematizan en la Figura 46. Se obtuvieron 44 espectros para las fracciones de K562/A2.1 (a partir de ahora llamadas Ctrl) y otros tantos espectros para las fracciones de K562/A2.1-S100β (a partir de ahora llamadas S100). Todos los espectros fueron analizados con el software Data Explorer de forma similar a como se hizo

en el caso de los epitopos derivados de S100 β y presentados por la molécula de histocompatibilidad DR4. De este modo obtuvimos 7.298 m/z para las fracciones Ctrl y 7.037 m/z para las fracciones S100. Todos los m/z correspondientes a las fracciones S100 fueron analizados mediante el programa Findpept, de forma que sólo 3.403 m/z podrían derivar de una secuencia de aminoácidos de S100 β con un error menor o igual a 1 Da.

De estos 3.403 m/z eliminamos todos aquellos para los que el programa Findpept predice una secuencia de aminoácidos de longitud inferior a 7 y superior a 11, quedando solamente 2.035 m/z que fueron comparados con la fracción equivalente obtenida de células control, además de con las inmediatamente anterior y posterior a dicha fracción, de tal forma que para que un m/z fuese considerado único no debería estar presente en ninguna de las tres fracciones mencionadas. Dicho análisis limitó el número a 874 m/z únicos de los cuales se seleccionaron aquellos para los que el programa Findpept predecía una secuencia de aminoácidos de entre 8 y 10 y cuya intensidad fuese claramente superior al ruido de fondo. Dicho análisis final identificó 4 m/z candidatos de los cuales uno de ellos, el m/z 935,426, se muestra en la Figura 47, mientras que la información completa de cada uno de los 4 m/z candidatos se muestra en la Tabla 14.

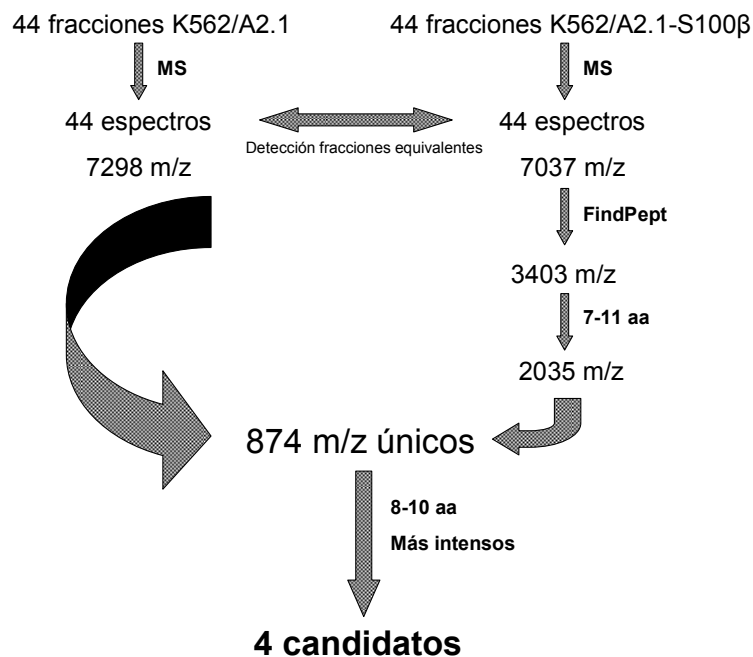


Figura 46. Esquema del proceso llevado a cabo para identificar m/z únicos tras la espectrometría de masas de las fracciones peptídicas obtenidas a partir de células K562/A2.1 y células K652/A2.1-S100 β .

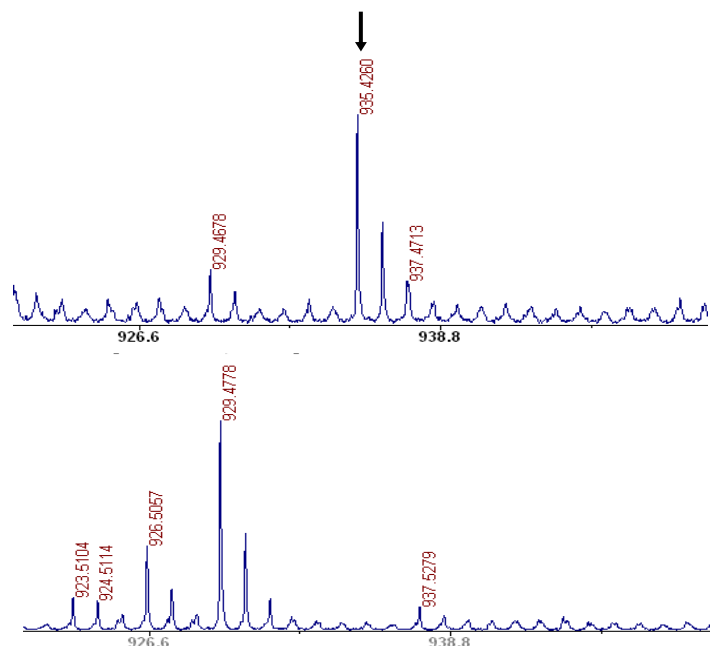


Figura 47. Espectro de uno de los cuatro m/z candidatos identificados mediante espectrometría de masas. El panel superior muestra parte del espectro de la fracción 31 obtenida a partir de células K562/A2.1-S100 β conteniendo el m/z 935,426, el cual no se encuentra presente en la fracción correspondiente obtenida a partir de células control K562/A2.1 (panel inferior).

m/z experimental	m/z teórico	Δ Da	Secuencia	Pos	n° aa	PCP-p	PCP-ip	PAProC
935,426	934,491	-0,934	V DKVMETL	54-61	8	SI	SI	SI
	935,359	-0,067	ETLDNDGDG	59-67	9	NO	NO	NO
	935,359	-0,067	TLDNDGDGE	60-68	9	SÍ	NO	NO
	936,398	0,971	VMETLDND	57-64	8	NO	NO	NO
974,290	973,474	-0,816	INNELSHF	37-44	8	SÍ	SÍ	NO
	973,474	-0,816	NNELSHFL	38-45	8	SI	SI	SI
	973,520	-0,769	EIKEQEVV	47-54	8	SÍ	SÍ	NO
	973,640	-0,649	KLKSELK	27-34	8	NO	SÍ	SÍ
	974,356	0,065	GECDFQEF	67-74	8	SÍ	SÍ	NO
	974,515	0,225	KEQEWDK	49-56	8	NO	SÍ	NO
	974,588	0,298	LKSELKE	28-35	8	NO	NO	NO
	974,588	0,298	KKSELKEL	29-36	8	SÍ	SÍ	NO
1.039,565	1.039,480	-0,084	QYSGREGDK	17-25	9	NO	SÍ	NO
	1.039,564	0,000	GREGDKHKL	20-28	9	SI	SI	SI
1.105,506	1.105,396	-0,109	GECDFQEFM	67-75	9	SI	SI	SI
	1.105,568	0,061	ALIDVFHQY	10-18	9	SI	SI	SI

Tabla 14. Epitopos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural y presentados por la molécula de histocompatibilidad A*02:01. Se indican en la tabla el m/z experimental único identificado por espectrometría de masas (primera columna), el m/z teórico predicho por Findpept (m/z teórico, segunda columna) y la diferencia en daltons con el m/z experimental (columna Δ Da) de las posibles secuencias de S100 β correspondientes al m/z experimental (columna secuencia). Se indica la posición de dicha secuencia de aminoácidos dentro de S100 β (columna Pos) así como su longitud (columna n° aa). Las tres últimas columnas muestran las predicciones de dos algoritmos (PCP y PAProc) sobre la generación del extremo carboxilo terminal de dicho péptido por el proteosoma (columnas PCP-p y PAProc) o el inmunoproteosoma (columna PCP-ip). En negrita se muestran aquellas secuencias cuyo extremo carboxilo terminal podría ser generado por el proteosoma y el inmunoproteosoma.

Como se puede ver en la Tabla 14, existen varias secuencias de aminoácidos derivadas de S100 β para cada uno de los 4 m/z candidatos identificados mediante espectrometría de masas, aunque en algunos casos dichas secuencias son solapantes o corresponden a la misma región de la proteína como es el caso del m/z 935,426 (Tabla 14), donde de las cuatro secuencias aminoacídicas predichas 2 de ellas se corresponden con péptidos desplazados un solo aminoácido (ETLDNDGDG y TLDNDGDGE) o tres (VDKVMETL y VMETLDND), además de que estas cuatro secuencias se encuentran en una región de la proteína de sólo 14 aminoácidos de longitud (posición 54 a la 68; Tabla 14).

Por ello para decidir qué secuencia emplear en posteriores ensayos tuvimos en cuenta el hecho de que la mayor parte de los epitopos presentados por moléculas de histocompatibilidad de clase I son generados por el proteosoma y/o el inmunoproteosoma (Rock y cols. 1994. Niedermann y cols. 1995). Comprobamos entonces cuáles de las secuencias descritas para cada uno de los 4 m/z tendría su extremo carboxilo terminal generado por el proteosoma y/o el inmunoproteosoma empleando dos algoritmos diferentes (ver Materiales y Métodos) (Tabla 14) : a) el Servidor para la Predicción de Fragmentación por Proteosoma (PCP; Diez-Rivero y cols. 2010), que predice cortes tanto por el proteosoma (Tabla 14, columna PCP-p) como por el inmunoproteosoma (Tabla 14, columna PCP-ip) y b) el Algoritmo de Predicción de Fragmentación por Proteosoma (PAProC; Kuttler y cols. 2000. Nussbaum y cols. 2001), que predice cortes por el proteosoma (Tabla 14, columna PAProC).

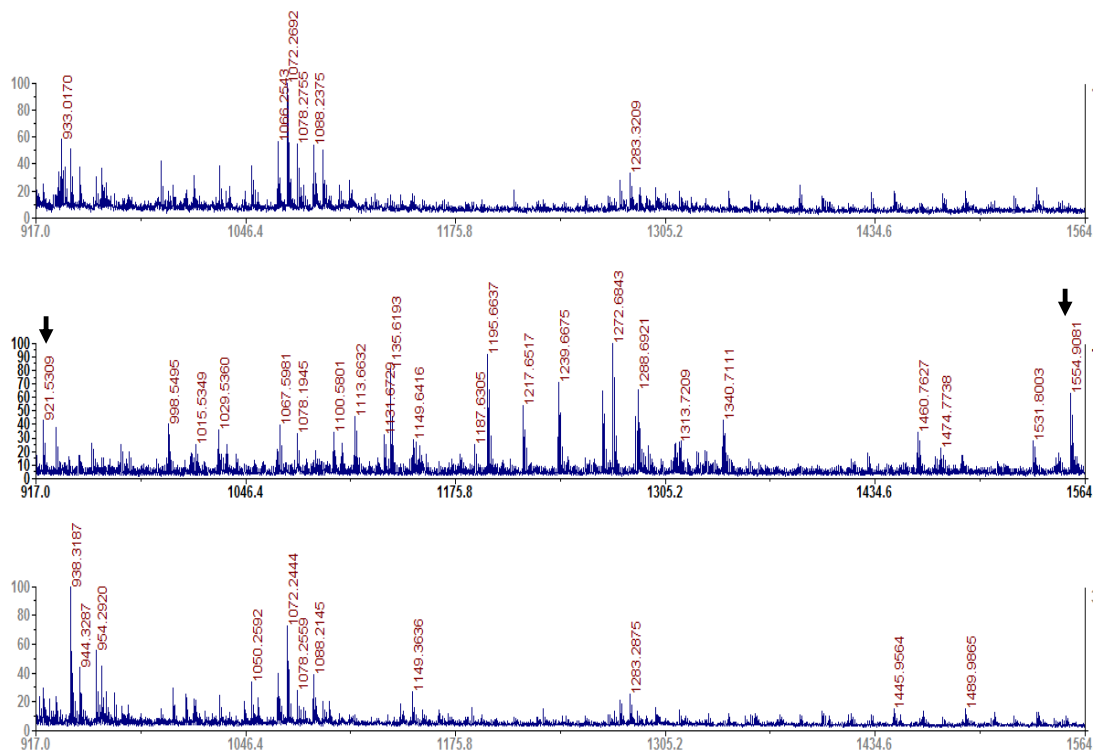
Los resultados de este análisis muestran que algunas de las secuencias de aminoácidos predichas para cada m/z candidato es improbable que sean generadas *in vivo*, ya que sus extremos carboxilo terminales no podrían ser generados por el proteosoma y/o el inmunoproteosoma (Tabla 14). Siguiendo con el ejemplo del m/z 935,426, de las cuatro secuencias de aminoácidos posibles sólo la secuencia VDKVMETL tendría un extremo carboxilo compatible con la generación por parte del proteosoma/inmunoproteosoma, razón por la que dicha secuencia fue sintetizada para experimentos posteriores. Se procedió de la misma forma para los otros 3 m/z candidatos de forma que se sintetizaron un total de cinco péptidos: tres nonámeros (GREGDKHKL, GECDFQEFM, ALIDVFHQY) y dos octámeros (VDKVMETL, NNELSHFL). Aunque la longitud de 9 aminoácidos es la ideal para encajar en la hendidura de unión a péptidos de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (Rammensee y cols. 1993. Bouvier y cols. 1994), estudios previos muestran que péptidos de 8 aminoácidos pueden unirse a la molécula A*02:01 y ser reconocidos como epitopos antigénicos por parte de linfocitos CD8⁺ (Skowera y cols. 2008).

6.4. Determinación de la capacidad de generación por proteosoma y de unión a A*02:01 por parte de los péptidos identificados por espectrometría de masas.

Aunque la utilización de algoritmos para la predicción de extremos carboxi-terminales generados por proteosoma es una estrategia empleada frecuentemente (Voigt y cols. 2010. Asemissen y cols. 2009), decidimos complementar esta información mediante la digestión *in vitro* de S100 β con proteosoma humano purificado, analizando a continuación por espectrometría de masas qué extremos carboxi-terminales son generados más frecuentemente por el proteosoma, comparando estos resultados *in vitro* con las predicciones hechas *in silico*.

Tras el periodo de incubación correspondiente, las mezclas de digestión (sólo S100 β , S100 β + proteosoma y S100 β + proteosoma inactivado) fueron preparadas para su análisis mediante espectrometría de masas por filtración por resina de intercambio catiónico. Tal y como se puede observar en la Figura 48, el análisis de la mezcla conteniendo S100 β y proteosoma activo contiene una gran cantidad de péptidos (Figura 48A y 48B, paneles centrales) que no se hallan presentes cuando la incubación de S100 β fue realizada sin proteosoma (Figura 48A y 48B, paneles superiores) o S100 β y proteosoma inactivado en medio ácido (Figura 48A y 48B, paneles inferiores). Estos datos indican que S100 β en las condiciones de incubación descritas apenas se degrada y que la inactivación del proteosoma es eficaz, de forma que por comparación podemos identificar de forma específica aquellos péptidos generados por digestión *in vitro* del proteosoma (Figuras 48A y 48B, flechas en paneles centrales).

A



B

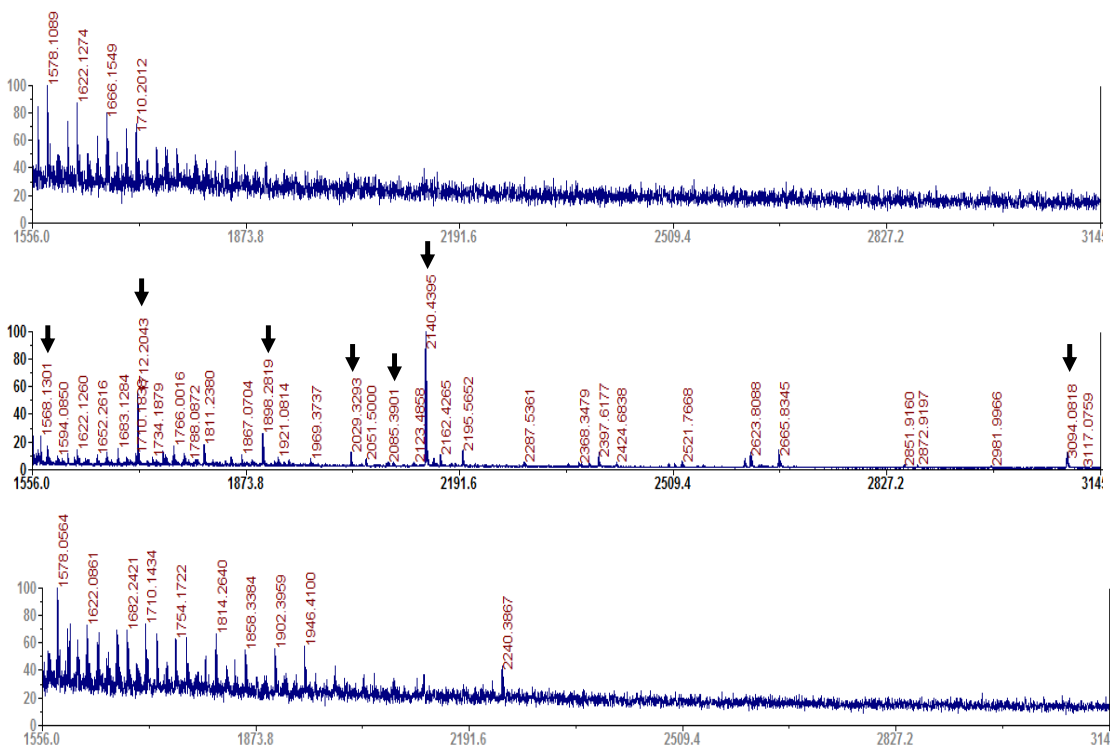


Figura 48. Espectrometría de masas de los péptidos generados tras la digestión in vitro de S100β con el proteosoma. A. Espectros correspondientes a los m/z comprendidos entre 917 y 1564. **B.** Espectros correspondientes a los m/z comprendidos entre 1556 y 3145. Paneles superiores: S100β incubada sin proteosoma; paneles centrales: S100β incubada con proteosoma activo; paneles inferiores: S100β incubada con proteosoma inactivado en medio ácido. Los m/z únicos más intensos presentes en la muestra de S100β y proteosoma fueron posteriormente fragmentados por MS/MS. Se señalan con una flecha aquellos m/z únicos que el programa Mascot identifica como pertenecientes a S100β.

Los m/z más intensos fueron analizados mediante MS/MS con el fin de determinar si pertenecen a S100 β y, de ser el caso, conocer su secuencia. Nueve de ellos (señalados con flechas en la Figura 48) fueron identificados por el programa Mascot como pertenecientes a S100 β . De las secuencias de los péptidos (Figura 49) vemos que los péptidos identificados corresponden con la mitad amino-terminal de S100 β y que además, al comparar dichos fragmentos con los péptidos candidatos descritos anteriormente, comprobamos que en el caso de S100 10-18 y S100 20-28 sus extremos sí pueden ser generados por el proteosoma (Figura 49). Respecto de los otros 3 péptidos candidatos (S100 38-45, S100 54-61 y S100 67-75) no se puede excluir mediante este análisis que puedan ser epitopos reconocidos por linfocitos T CD8⁺, ya que es posible que péptidos con ese extremo carboxi-terminal hayan sido generados *in vitro* por el proteosoma pero por su baja intensidad no sean correctamente fragmentados por MS/MS, o no sean fácilmente distinguibles del ruido de fondo.

Así pues, el ensayo de digestión *in vitro* de S100 β nos permite confirmar que al menos 2 de nuestros 5 péptidos candidatos sí pueden haber sido generados por el proteosoma y que por tanto son candidatos firmes a ser epitopos antigénicos capaces de ser reconocidos por linfocitos T CD8⁺.

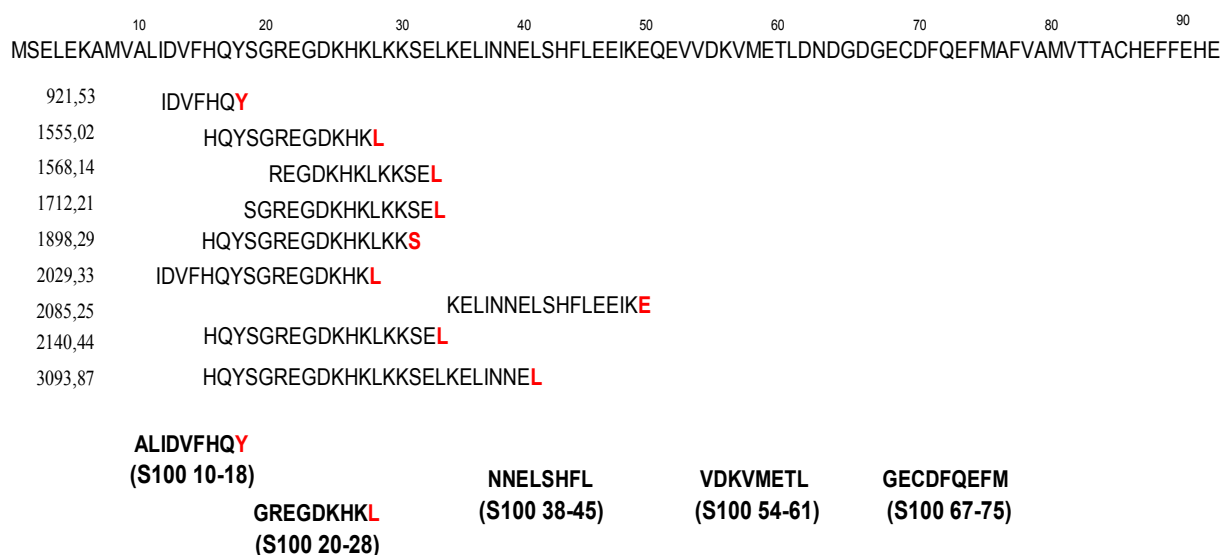


Figura 49. Secuencias de los péptidos generados por digestión *in vitro* de S100 β con el proteosoma. Se muestra la secuencia completa de S100 β y, alineadas con ella, las secuencias obtenidas por MS/MS de los péptidos generados por digestión *in vitro* de S100 β con el proteosoma (m/z señalados con flechas en la Figura 48). A la izquierda de cada secuencia se muestra el m/z correspondiente. En rojo se señala el aminoácido del extremo carboxi-terminal. En la parte inferior y en negrita se hallan las secuencias correspondientes a los péptidos candidatos descritos en la Tabla 14 (en rojo el aminoácido del extremo carboxi-terminal sólo si éste coincide con alguno de los observados por MS/MS). Los extremos carboxi-terminales de los péptidos S100 10-18 y S100 20-28 podrían haber sido generados por el proteosoma, y en consecuencia son excelentes candidatos a epitopos antigénicos.

Otro factor importante que determina la capacidad antigénica de un péptido es su afinidad de unión por una molécula de histocompatibilidad, lo que en principio determina las posibilidades de presentación a linfocitos T. Por ello, decidimos analizar a continuación la afinidad por la molécula de histocompatibilidad A*02:01 de nuestros epitopos candidatos mediante ensayos de estabilización (Varela-Calviño y cols. 2004; ver Material y Métodos). En este ensayo, células T2 que expresan A*02:01 de forma inestable en la superficie celular por defectos en el transportador TAP, son incubadas con concentraciones crecientes del péptido candidato y su afinidad de unión se estima como la capacidad de dicho péptido de estabilizar la presencia de las moléculas A*02:01 en la superficie celular. La Figura 50 muestra los resultados de este análisis y puede verse que de los cinco epitopos candidatos, sólo el péptido S100 10-18 (ALIDVFHQY) cuyo extremo carboxi-terminal puede ser generado por el proteosoma, presenta una cierta afinidad por la molécula A*02:01, mientras que para los otros cuatro epitopos la afinidad por esta molécula es nula o apenas perceptible.

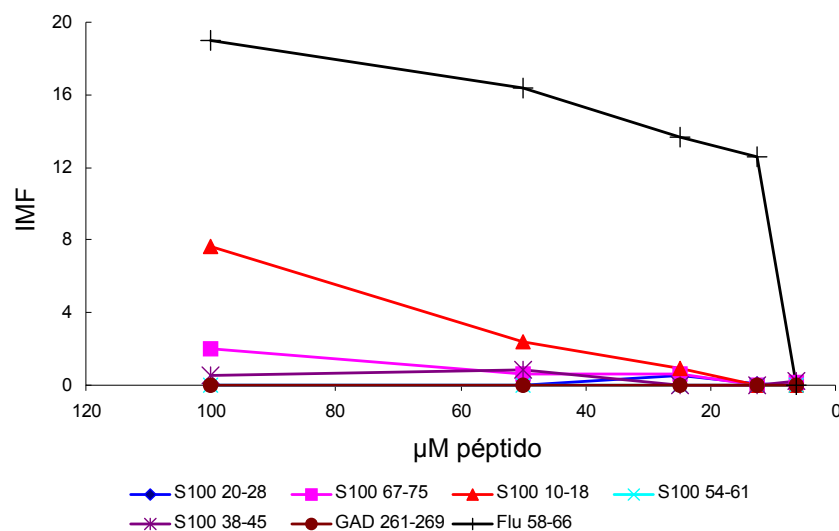


Figura 50. Ensayo de estabilización de moléculas de histocompatibilidad A*02:01. Células T2 fueron incubadas con β 2-microglobulina y con concentraciones crecientes de cada uno de los epitopos candidatos derivados de S100 β , del péptido GILGFVFTL de influenza A (Flu 58-66, control positivo) o del péptido EVKEKGMAA de la decarboxilasa del ácido glutámico 65 (GAD₆₅) (GAD 261-269, control negativo). Tras la incubación, las células fueron lavadas y teñidas con un anticuerpo monoclonal contra A*02:01. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) para A*02:01 (eje y) para cada una de las concentraciones de péptidos ensayadas (eje x). El valor de IMF para cada punto se obtuvo restando la IMF de células T2 incubadas sólo con β 2-microglobulina.

Estos datos experimentales sobre la afinidad de unión de los péptidos a la molécula A*02:01 coinciden con las predicciones que diversos algoritmos (SYFPEITHI, HLA-Affi, SVMHC y MHC-I *binding*; ver Materiales y Métodos) hacen sobre dicha afinidad (Tabla 15) (estos algoritmos sólo analizan secuencias de 9 aminoácidos de longitud por lo que los

octámeros no pudieron ser analizados). Los cuatro algoritmos empleados coinciden en señalar a S100 10-18 como el nonúmero con la mayor afinidad por la molécula A*02:01, aunque de todas formas con una afinidad muy lejana a la de péptidos como el epitopo del virus influenza GILGFVFTL, un epitopo con gran afinidad por dicha molécula de histocompatibilidad.

Péptido	Secuencia	SYFPEITHI	HLA-Affi	SVMHC	MHC-I binding
S100 10-18	ALIDVFHQY	16	4,318/sí	0,43	4967,2
S100 20-28	GREGDKHKL	15	9,107/no	-0,67	24391,2
S100 67-75	GECDFQEFM	7	6,678/no	-0,86	22486,4

Tabla 15. Predicciones de unión a la molécula de histocompatibilidad A*02:01 de los epitopos candidatos. La afinidad por A*02:01 de los epitopos de 9 aminoácidos de longitud fue analizada mediante cuatro algoritmos diferentes. Se indican el epitopo (columna péptido), su secuencia aminoacídica (columna secuencia) y las predicciones dadas por los algoritmos SYFPEITHI, HLA-Affi, SVMHC y MHC-I binding. SYFPEITHI puntúa todos los nonúmeros posibles de S100 β (el mejor péptido de S100 β obtiene 22 mientras que Flu 58-66 obtiene 30). HLA-Affi suministra el logaritmo natural de la capacidad de unión, definiendo un punto de corte por debajo del cual un péptido sí se une (puntuación inferior a 6). (el mejor péptido de S100 β obtiene 3,777). SVMHC aporta un valor numérico donde los valores más altos indican una mayor capacidad de unión (el mejor péptido de S100 β es el epitopo S100 10-18 con 0,43). MHC-I binding ofrece la IC₅₀ para cada péptido y señala como punto de corte de unión aquellos péptidos que tengan valores inferiores a 5000nM (el mejor péptido de S100 β obtiene 99,3).

Finalmente, señalar que esta relativa falta de afinidad respecto a la molécula A*02:01 de los epitopos descritos en este trabajo no resulta sorprendente, ya que es sabido que la mayor parte de los péptidos autoantigénicos tienen poca afinidad por las moléculas de histocompatibilidad que los presentan *in vivo* (Van der Burg y cols. 1996).

6.5. Resumen.

Se ha conseguido obtener una línea celular doble transfectante que exprese la molécula de histocompatibilidad A2.1 y la proteína S100 β , de tal modo que funcione como un sistema de procesamiento y presentación natural de péptidos derivados de S100 β . Mediante el uso de este sistema se han identificado 5 péptidos candidatos a ser derivados de S100 β y presentados de manera natural por A2.1.

Ensayos de generación de péptidos *in vitro* por el proteosoma y posteriores análisis por MS y MS/MS confirman que los extremos carboxi-terminales de al menos 2 de los 5 péptidos candidatos sí pueden haber sido generados por digestión en el proteosoma (S100 10-18 y S100 20-28). Por otra parte, de los 5 péptidos candidatos identificados, el péptido S100 10-18 es el único en el que se aprecia cierta afinidad de unión a A2.1 *in vitro*. El conjunto de resultados sitúa al péptido S100 10-18 como un buen candidato a ser un epitopo autoantigénico derivado de S100 β *in vivo*.

Capítulo 7:

Obtención de hibridomas de linfocitos T infiltrantes de islotes de Langerhans en NOD: determinación de su reactividad frente a S100 β .

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

7.1. Obtención de hibridomas de linfocitos T a partir de linfocitos T infiltrantes de islotes de Langerhans de ratones NOD.

El modelo animal más empleado para el estudio de la diabetes tipo 1 es el ratón NOD (diabético no obeso, de sus siglas en inglés). Los ratones de esta cepa murina desarrollan de forma espontánea una diabetes autoinmune semejante a la diabetes tipo 1 humana, lo cual ha convertido a esta cepa murina en el modelo para el estudio de la enfermedad (Delovitch y cols. 1997).

Para profundizar en el conocimiento del papel de la proteína S100 β en el desarrollo de la enfermedad decidimos obtener linfocitos T infiltrantes de los islotes de Langerhans a partir de ratones NOD para a continuación estudiar su especificidad antigénica en relación con el reconocimiento de S100 β . Para ello, cultivamos islotes de Langerhans en presencia de IL-2 para permitir la proliferación de aquellos linfocitos T infiltrantes. Tras 24 horas en cultivo ya era posible observar linfocitos saliendo del islote (Figura 51A) y a los 7 días dicha proliferación linfocitaria es evidente (Figura 51B), mostrando dichas células la típica morfología fusiforme indicativa de su estado de activación, además de establecer contactos con otros linfocitos (Figura 51C).

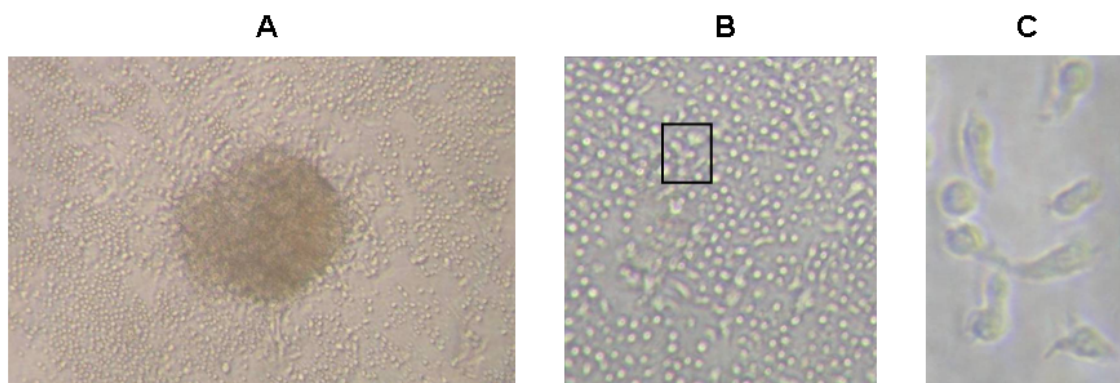


Figura 51. Cultivo de islotes de Langerhans aislados de ratones NOD. Los páncreas de ratones NOD fueron digeridos enzimáticamente y los islotes aislados y cultivados en medio de cultivo completo (ver Materiales y Métodos) en presencia de IL-2. **A.** Islote de Langerhans mostrando la salida del infiltrado linfocitario tras 24 horas de cultivo. **B.** Linfocitos infiltrantes tras 7 días de cultivo en presencia de IL-2. **C.** Imagen correspondiente al recuadro indicado en **B**, donde se observan linfocitos activados con morfología fusiforme y con tendencia a establecer contactos con otros linfocitos.

A las dos semanas, los linfocitos T infiltrantes fueron inmortalizados mediante la fusión con la línea tumoral de timoma BW5147 empleando polietilenglicol (Prud'homme y cols. 1991). Se llevaron a cabo cuatro fusiones empleando linfocitos infiltrantes de 8 hembras (3 de ellas diabéticas) y 18 machos NOD, de una edad media de 14 semanas (rango de 11 a 19

semanas). Tras una semana en cultivo en medio selectivo HAT (hipoxantina, aminopteridina, timidina) se monitorizó el crecimiento de hibridomas, obteniéndose finalmente 7: IJ1, IJ2, IJ3, IJ4 (fusión 1), IJ22, IJ23 (fusión 3) e IJ24 (fusión 4). Una vez expandidos, éstos fueron acondicionados para crecer en medio de cultivo HT (hipoxantina, timidina), y a continuación en medio de cultivo sin agentes selectivos para los ensayos de especificidad antigénica.

En cuanto al fenotipo de dichos hibridomas, cuatro de ellos (IJ1, IJ2, IJ3 e IJ4) fueron teñidos con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. Según se observa en la Figura 52, los cuatro hibridomas analizados parecen derivar de linfocitos T por su expresión de CD3 (Figura 52, columna central) aunque en algunos casos, como los hibridomas IJ1, IJ2 e IJ4, se detectan dos poblaciones con distintos niveles de expresión de CD3, por lo que sería de interés llevar a cabo una clonación por dilución límite con el fin de obtener una población más homogénea.

En cuanto a la expresión de las moléculas CD4 y CD8, se deduce que ninguno de los cuatro hibridomas parece derivar de linfocitos T $CD4^+$ ya que se detecta claramente la expresión de la molécula CD8, con la excepción del hibridoma IJ3 donde se detecta además otra población doble positiva $CD4^+CD8^+$ (Figura 52, columna derecha). Podemos concluir entonces de este estudio preliminar que los cuatro hibridomas analizados provienen de linfocitos T y que al menos IJ2, IJ3 e IJ4 parecen derivar de linfocitos T $CD8^+$.

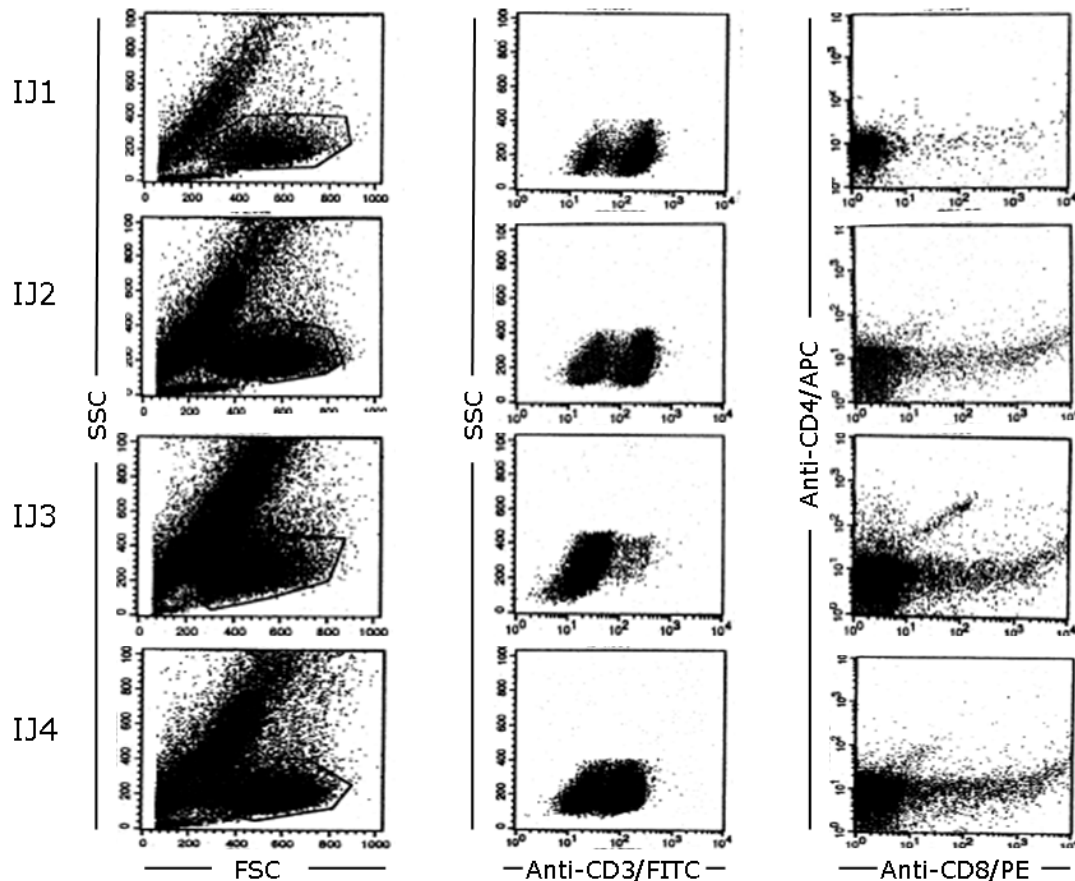


Figura 52. Fenotipo de los hibridomas IJ1, IJ2, IJ3 e IJ4. Los hibridomas IJ1, IJ2, IJ3 e IJ4 fueron teñidos con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 para su caracterización fenotípica. Se muestran los diagramas de dispersión FSC/SSC (columna izquierda), anti-CD3 (columna central) y anti-CD4/anti-CD8 (columna derecha). Se puede apreciar que tres de los cuatro hibridomas parecen derivar de linfocitos CD8⁺.

7.2. Determinación preliminar de la especificidad antigénica de hibridomas de linfocitos T.

Una vez obtenidos los hibridomas, decidimos comprobar si alguno de ellos era específico para la proteína S100β. Debido al difícil acceso por parte de nuestro laboratorio a esplenocitos frescos de ratones para ser utilizados como células presentadoras de antígeno (CPA) y ya que la mayoría de los hibridomas parecían ser CD8⁺, en su lugar optamos por emplear una línea celular transfectada con S100β que exprese la molécula de histocompatibilidad de clase I H2-K^d presente en NOD (Inoue y cols. 2004), ya que de esta forma tendremos un sistema de procesamiento y presentación natural de S100β para evaluar la reactividad de los hibridomas.

Para generar esta CPA escogimos la línea celular P815, una línea celular murina derivada de un mastocitoma de la cepa DBA/2, la cual es MHC-II negativa y H2-K^d positiva y ha sido empleada anteriormente por otros autores como CPA (Eisenlohr y cols. 1992). Una vez transfectadas con la construcción S100 β -pcDNA 3.1 (+), y tras la selección de transfectantes en medio selectivo conteniendo G418, se llevó a cabo una clonación por dilución límite obteniéndose 17 clones P815/S100 β positivos. Se prepararon extractos citoplasmáticos de 5 de esos clones y se comprobó por *western blot* la presencia de S100 β . Como se puede apreciar en la Figura 53, los clones 4 y 6 expresan niveles detectables de S100 β , mientras que ni el resto de clones analizados ni las células P815 sin transfectar expresan esta proteína.

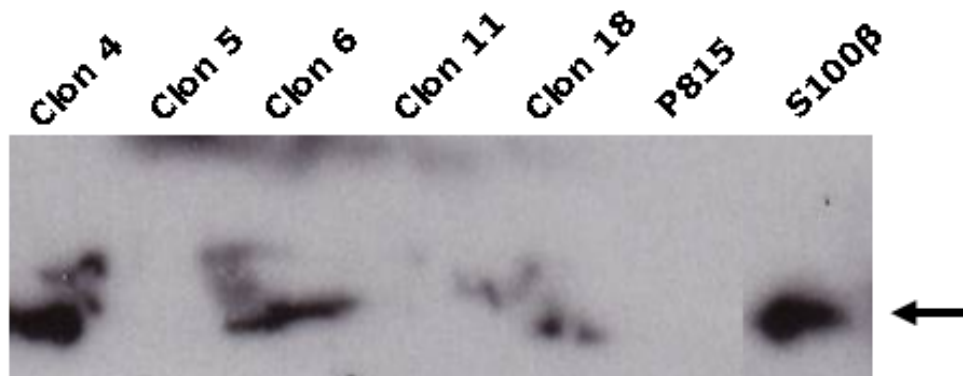


Figura 53. Análisis por *western blot* quimioluminiscente de extractos de células P815 transfectadas con S100 β . Se preparó un extracto citoplasmático de los clones 4, 5, 6, 11 y 18 de células P815 transfectadas con S100 β así como de células P815 sin transfectar, y la expresión de S100 β fue analizada mediante *western blot* quimioluminiscente empleando un anticuerpo policlonal anti-S100 β . Como control positivo se empleó S100 β recombinante producida en nuestro laboratorio. Se observa la expresión de S100 β (flecha) en los clones 4 y 6, no así en los clones 5, 11 y 18, y tampoco en las células P815 sin transfectar.

Los clones 4 y 6, así como células P815 (como control negativo), fueron tratadas con mitomicina C y tras sucesivos lavados cocultivadas con los hibridomas (IJ1, IJ2, IJ3, IJ4, IJ22, IJ23 e IJ24). Tras 24 horas de cultivo, el medio fue recogido y la producción de IFN- γ determinada mediante ELISA. Como se puede observar en la Figura 54, el hibridoma IJ4 y, en mucha menor medida, el IJ3, parecen reconocer de forma específica epitopos derivados de S100 β y presentados por el clon 4. Cuando se empleó el clon 6 como CPA ninguno de los hibridomas secreta niveles superiores de IFN- γ a los observados en presencia de células P815 sin transfectar (Figura 54).

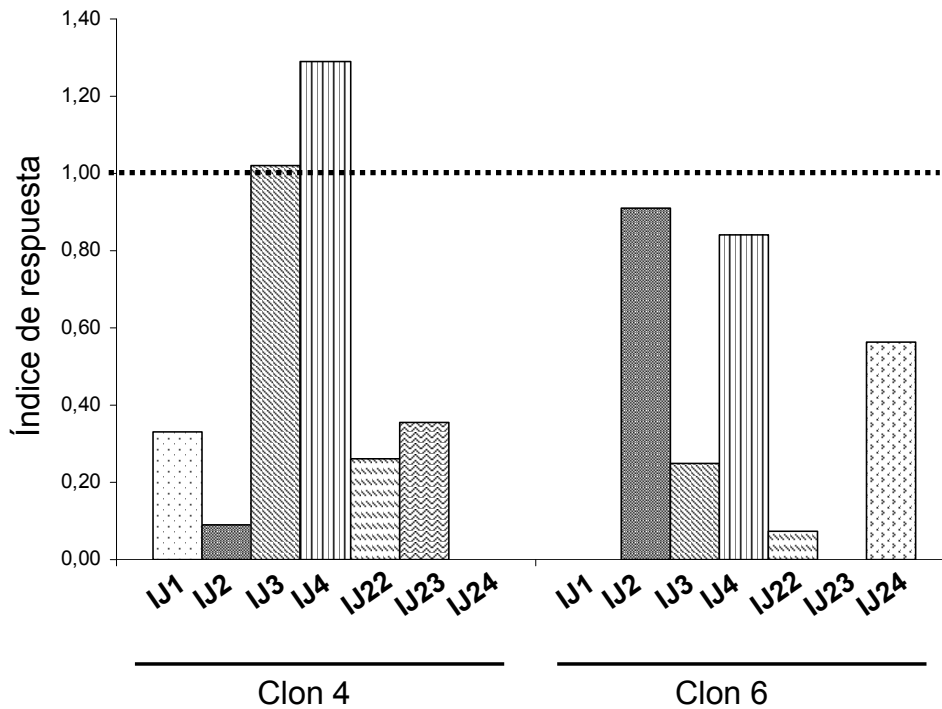


Figura 54. Reactividad de los hibridomas frente a los clones 4 y 6 de células S100β/P815. Los clones 4 y 6 transfectados con S100β y células P815 sin transfectar fueron tratadas con mitomicina C y cocultivadas con los distintos hibridomas en proporción 1:1 durante 24 horas, tras las cuales el medio de cultivo fue recogido y el nivel de IFN-γ cuantificado por ELISA. Se muestran los resultados como índice de respuesta (cantidad de IFN-γ secretada en presencia del clon 4 o 6 / cantidad de IFN-γ secretada en presencia de células P815). Se consideró como respuesta positiva aquella en la que el índice fue superior a 1 (línea punteada).

Otros autores (Stelekati y cols.) han mostrado que los mastocitos son células capaces de presentación cruzada, es decir, pueden captar antígeno exógeno, procesarlo y presentarlo mediante moléculas de histocompatibilidad de clase I a linfocitos T CD8⁺, tanto *in vitro* como *in vivo* y estimular de esa forma la secreción de IFN-γ por parte de dichos linfocitos T. Siendo la línea celular P815 un mastocitoma que no expresa moléculas de MHC de clase II, decidimos emplear esta línea celular para comenzar a delimitar la especificidad antigénica frente a S100β de los hibridomas obtenidos en este trabajo. Para ello, volvimos a evaluar la especificidad de los hibridomas en este caso co-cultivándolos en presencia de células P815 y de la proteína S100β purificada, determinando a continuación la secreción específica de IFN-γ. Nos centramos en los hibridomas IJ3 e IJ4 que parecen responder frente al clon 4 así como los hibridomas IJ1 e IJ24, que parecen clones no específicos para S100β.

Como se observa en la Figura 55A, los hibridomas IJ3 e IJ4 (y en menor medida IJ24), que respondían frente al clon 4 de S100β/P815, también secretan IFN-γ de forma específica en presencia de S100β.

Teniendo esto en cuenta, y ya que habíamos sintetizado previamente distintos péptidos de S100 β procesados y presentados de manera natural en humanos (S100 6-25, S100 21-36, S100 25-46 y S100 68-92; ver secciones anteriores), decidimos emplearlos para tratar de delimitar la zona de reconocimiento de S100 β de estos hibridomas con la idea de que al ser péptidos relativamente largos, éstos podrían ser captados, procesados y presentados de manera semejante a como podría tener lugar con la proteína S100 β completa. Como se muestra en la Figura 55B, nuevamente los hibridomas IJ3 e IJ4 son los hibridomas los que muestran una respuesta positiva específica frente a los péptidos S100 6-25 y la mezcla S100 21-36/S100 25-46.

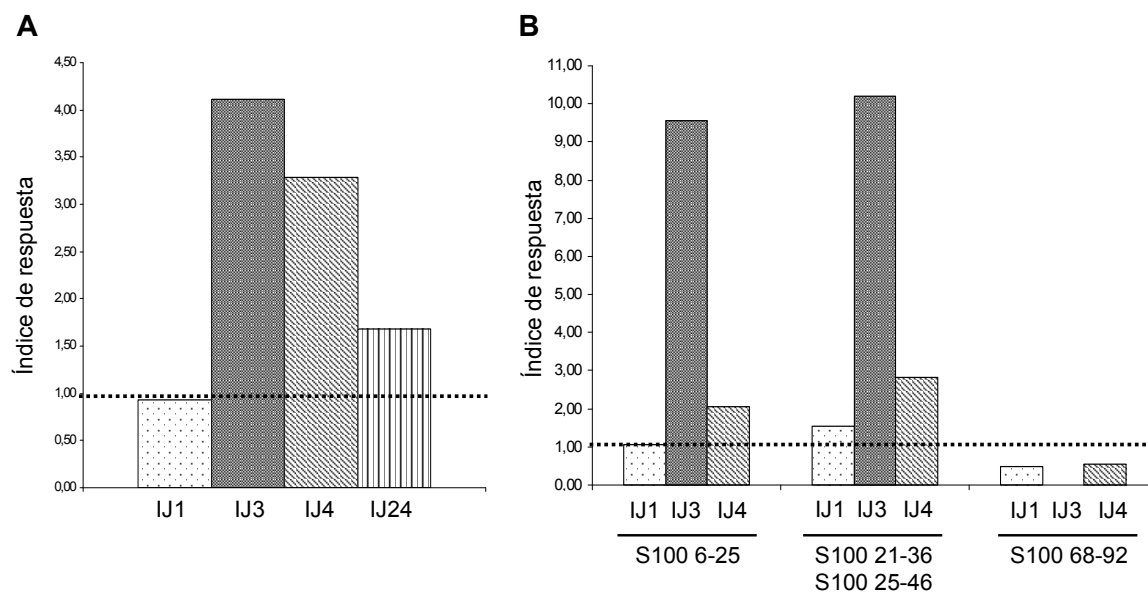


Figura 55. Reactividad de los hibridomas frente a la proteína S100 β y los epítomos S100 6-25, S100 21-36, S100 25-46 y S100 68-92. **A.** Los hibridomas fueron cocultivados con células P815 tratadas con mitomicina C en presencia de S100 β o de proteína de unión a maltosa (MBP). Tras 24 horas el medio de cultivo fue recogido y la cantidad de IFN- γ cuantificada por ELISA. Se muestran los resultados como índice de respuesta (IFN- γ secretado en presencia de S100 β / IFN- γ secretado en presencia de MBP (proteína de unión a maltosa)). Se consideró como respuesta positiva aquella en la que el índice fue superior a 1 (línea punteada). **B.** Los hibridomas fueron cocultivados con células P815 tratadas con mitomicina C en presencia de los péptidos S100 6-25, una mezcla de S100 21-36 y S100 25-46 (1:1) o S100 68-92. Se empleó DMSO como control negativo. Se muestran los resultados como índice de respuesta (IFN- γ secretado en presencia de péptido / IFN- γ secretado en presencia de DMSO). Se consideró como respuesta positiva aquella en la que el índice fue superior a 1 (línea punteada).

De este estudio preliminar de la reactividad de los hibridomas frente a S100 β podemos concluir que los hibridomas IJ3 e IJ4 reconocen S100 β , tanto expresada de manera endógena como suministrada de manera exógena. Este reconocimiento parece deberse, al menos, a algún epítipo presente en los aminoácidos 6 a 25 y/o 21 a 46 de S100 β (Figura 55A y 55B).

La mayor respuesta observada en cocultivo con la proteína completa y/o los péptidos respecto de la observada en el caso del cocultivo con CPAs expresando S100β de manera endógena (Clon 4) puede ser debida al hecho de la presencia de una mayor cantidad de antígeno en el primer caso que en el segundo. De esta forma, de los siete hibridomas obtenidos en este estudio, dos de ellos (un 28,5%) parecen ser específicos para S100β reforzando la importancia de este autoantígeno en el desarrollo de la diabetes tipo 1.

7.3. Resumen.

Se han obtenido siete hibridomas a partir de linfocitos T infiltrantes de islotes de Langerhans de ratones NOD. Una caracterización fenotípica preliminar de cuatro de ellos muestra que el 75% son CD8⁺.

Para estudiar su posible reactividad frente a S100β se han transfectado células P815 con S100β, de manera que péptidos derivados de esta proteína serán presentados de manera natural por la molécula de histocompatibilidad H2-K^d. Dos de los hibridomas (IJ3 e IJ4) responden contra esta línea celular transfectante produciendo IFN-γ.

Asimismo, estos hibridomas también responden produciendo IFN-γ si la proteína ha sido añadida de manera exógena a células presentadoras (mastocitos), y por cultivo con péptidos relativamente largos hemos podido comprobar que la reactividad detectada se dirige principalmente contra la zona amino-terminal de S100β.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

Capítulo 8:

Importancia de las galectinas en los linfocitos T colaboradores: síntesis de galectina-1 en la diabetes tipo 1.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

8.1. Estudio del patrón de síntesis de galectina 1 y 3 por parte de diferentes subtipos de linfocitos T colaboradores (Th).

El efecto que las galectinas ejercen sobre la respuesta inmune ha sido generalmente estudiado por la adición exógena a cultivos celulares de estas moléculas producidas *in vitro* de forma recombinante; sin embargo, no existen estudios que hayan analizado la síntesis de estas lectinas por parte de los distintos tipos de linfocitos T colaboradores (Th), ni qué papel podrían jugar estas moléculas inmunoregulatoras en el desarrollo de la diabetes tipo 1.

Por esta razón, hemos comenzado por analizar la síntesis de galectinas-1 y -3 por parte de linfocitos Th purificando linfocitos T CD4⁺ vírgenes a partir de individuos sanos, los cuales hemos activado *in vitro* empleando anticuerpos contra CD3 y CD28 y cultivado en condiciones polarizantes para diferenciar dichos linfocitos hacia un fenotipo Th1, Th2 o Th17, empleando en este último caso TGF- β e IL-21 (Yang y cols. 2008a). Como control, linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron activados y cultivados en condiciones no polarizantes (Th0) al no añadirse citocinas exógenas a los cultivos (dato no mostrado). En primer lugar, hemos verificado la correcta polarización de los linfocitos mediante la detección en el medio de cultivo, mediante ELISA, de citocinas características para cada uno de los subtipos de linfocitos T colaboradores (Figura 56A) como son IFN- γ para Th1, IL-13 para Th2 e IL-17A para Th17. Tal y como se esperaba, cada uno de los diferentes subtipos producía mayores niveles de la citocina correspondiente al compararlo con los otros dos subtipos (Figura 56A).

Asimismo, la correcta polarización *in vitro* fue también determinada por la cuantificación mediante PCR en tiempo real de los niveles de ARN mensajero para factores de transcripción expresados por cada subtipo Th, concretamente T-bet para Th1, GATA3 para Th2 y RORC2 para Th17 (Szabo y cols. 2000. Zheng y cols. 1997. Crome y cols. 2009). Los resultados se analizaron mediante el método del $\Delta\Delta C_t$ tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos (Pfaffl y cols. 2001). Como se observa en la Figura 56B y al igual que ocurre con la determinación de citocinas específicas en el medio de cultivo, la expresión de Tbet, GATA3 y RORC2 fue más elevada en linfocitos Th1, Th2 y Th17, respectivamente.

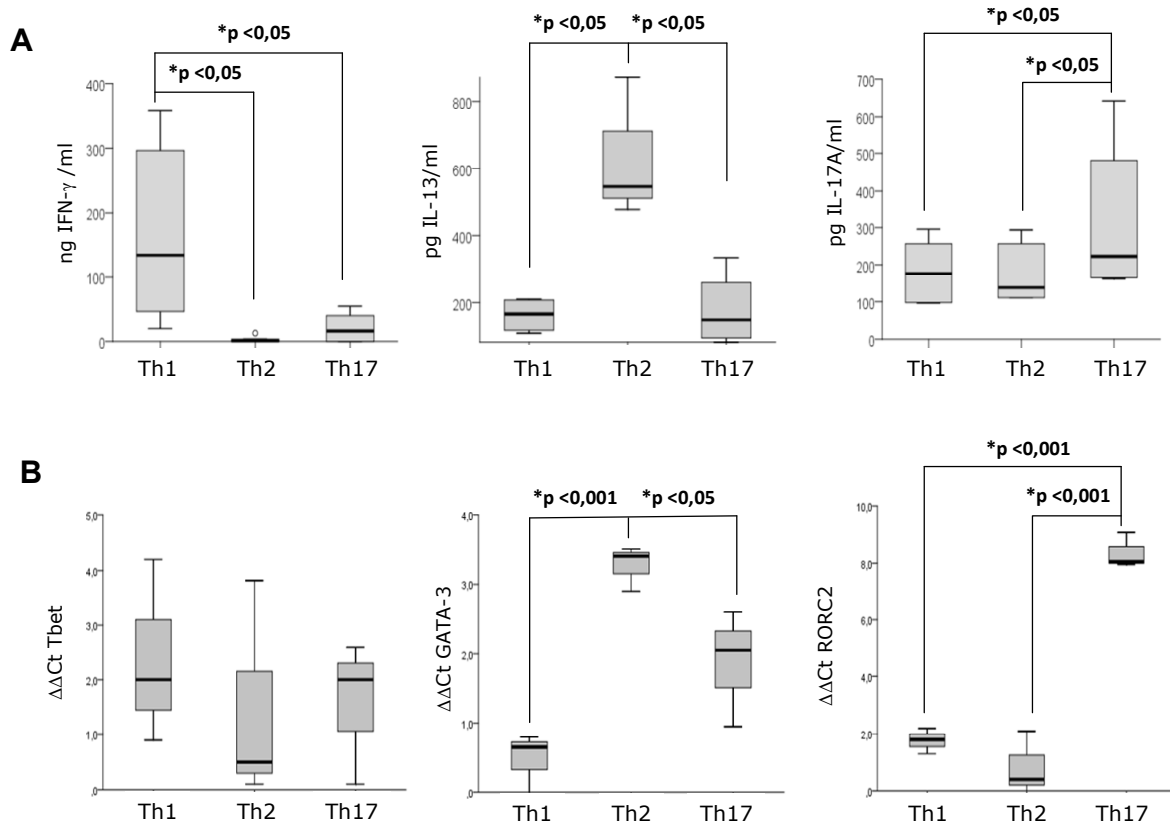


Figura 56. Síntesis *in vitro* de citocinas por parte de linfocitos T CD4⁺ virgenes en condiciones polarizantes y niveles de ARN mensajero de factores de transcripción específicos para cada subtipo. **A.** Linfocitos T CD4⁺ virgenes fueron aislados magnéticamente, activados y cultivados *in vitro* en condiciones polarizantes Th1, Th2 o Th17. La síntesis de citocinas características para cada subtipo fue cuantificada en el medio de cultivo mediante ELISA determinando interferón-gamma (IFN- γ , panel izquierdo) como citocina Th1, interleucina-13 (IL-13, panel central) como citocina Th2 e interleucina-17A (IL-17A, panel derecho) como citocina Th17. Los niveles de proteína se expresan como ng/ml o pg/mL por cada 10⁶ linfocitos en cultivo. **B.** Se aisló ARN mensajero de las células descritas en A, y tras la síntesis de ADN complementario se llevó a cabo una PCR en tiempo real para cuantificar la expresión de distintos factores de transcripción específicos para linfocitos Th1 (Tbet, panel izquierdo), Th2 (GATA-3, panel central) y Th17 (RORC2, panel derecho). Se muestra el diferencial del diferencial del ciclo umbral ($\Delta\Delta Ct$). La línea en las barras muestra el valor de la mediana (valores p, test t de Student).

Una vez confirmado que las condiciones empleadas permiten diferenciar linfocitos T CD4⁺ virgenes en los tres subtipos de linfocitos T colaboradores Th1, Th2 y Th17 caracterizados hoy en día, pasamos a analizar el nivel de expresión en estas poblaciones de dos de las galectinas mejor caracterizadas hasta la fecha como son la galectina-1 y la galectina-3, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína sintetizada. Mediante PCR en tiempo real, se observa que los linfocitos Th17 poseen más ARN mensajero para galectina-1 ($\Delta\Delta Ct$ de 3,2) al compararlos con linfocitos Th1 y Th2 ($\Delta\Delta Ct$ de 1,2 y 1,6 respectivamente) (Figura 57A).

Decidimos comprobar si este aumento de ARN mensajero para esta lectina en linfocitos Th17 va acompañado también de un aumento en los niveles de proteína secretada al medio de cultivo cuantificándola mediante un ELISA desarrollado *in situ*. Tal y como se observa en la Figura 57B y en consonancia con los niveles de ARN mensajero, existe un aumento significativo en los niveles de galectina-1 en los medios de cultivo de linfocitos Th17 al compararlos con los niveles secretados por linfocitos Th1 y Th2. A su vez la cantidad de galectina-1 detectada en los medios de cultivo de linfocitos Th2 es también mayor al compararla con la observada en medios de cultivo de linfocitos Th1, lo cual se halla en consonancia con los niveles de ARN mensajero detectados.

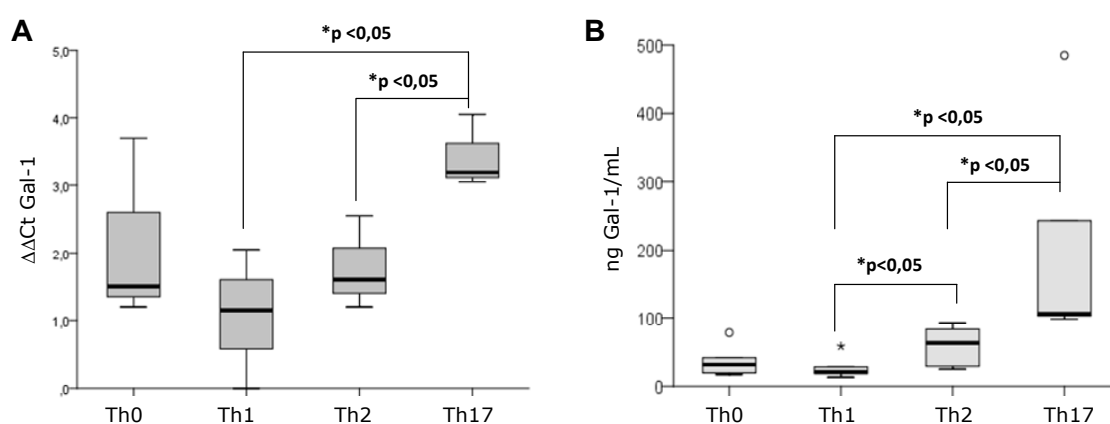


Figura 57. Niveles de ARN mensajero y proteína para galectina-1 en linfocitos Th1, Th2 y Th17. **A.** Los niveles de ARN mensajero para galectina-1 en linfocitos Th1, Th2 y Th17 fueron determinados mediante PCR en tiempo real. Se muestra el diferencial del diferencial del ciclo umbral ($\Delta\Delta Ct$). Th0: linfocitos T $CD4^+$ vírgenes activados y cultivados en condiciones no polarizantes. **B.** Los niveles de galectina-1 en el medio de cultivo fueron determinados mediante ELISA. Los niveles de proteína se expresan como ng/ml por cada 10^6 linfocitos en cultivo. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos/círculos señalan muestras que se hallan por encima/por debajo del intervalo de confianza del 95%. (test t de Student).

Además de los niveles de proteína secretada analizamos también los niveles de galectina-1 intracelular mediante *western blot* empleando extractos citoplasmáticos de los distintos subtipos de linfocitos T colaboradores. De nuevo, los linfocitos Th17 poseen mayores niveles de galectina-1 intracelular en comparación con los otros subtipos (Figura 58).

De los resultados anteriormente expuestos se concluye que los linfocitos Th17 expresan niveles más elevados de galectina-1, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína intra- y extracelular.

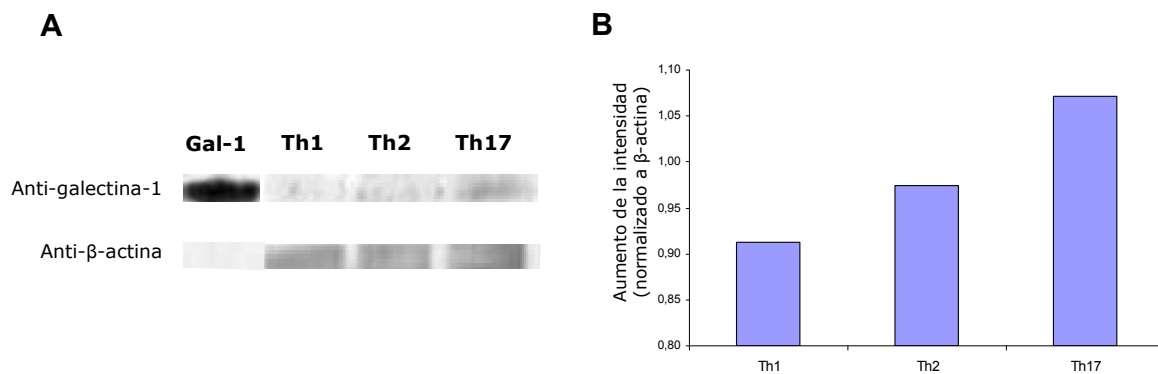


Figura 58. Análisis por western blot de galectina-1 intracelular en distintos subtipos de linfocitos T colaboradores. A. Análisis por western blot de los niveles citoplasmáticos de galectina-1 en los distintos subtipos linfocitarios Th1, Th2 y Th17 (fila superior). En los mismos extractos se cuantificó el nivel de β-actina como proteína control (fila inferior). La especificidad de la detección de galectina se evaluó mediante el empleo de galectina-1 recombinante (calles Gal-1). B. Análisis de la imagen mostrada en A, donde los valores para galectina-1 fueron normalizados a los observados para β-actina. Los linfocitos Th17 presentan niveles superiores de galectina-1 intracelular respecto de los otros subtipos.

En el caso de la otra lectina caracterizada en este trabajo, la galectina-3, los resultados de PCR en tiempo real indican que, al igual que para la galectina-1, el ARN mensajero para esta galectina es expresada en mayor cantidad en linfocitos Th17 en comparación con los subtipos Th1 y Th2, alcanzando un valor p cercano a 0,05 (Figura 59A). Para cuantificar los niveles de proteína secretada, también en este caso desarrollamos una técnica de ELISA específica tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Sin embargo y de forma sorprendente, la cantidad de galectina-3 presente en los medios de cultivo era equivalente en todos los subtipos de linfocitos T colaboradores (Figura 59B) lo cual no concuerda con los niveles de ARN mensajero presentes en los distintos subtipos detectados por PCR en tiempo real. Por esta razón decidimos analizar por western blot extractos citoplasmáticos de cada subtipo celular para detectar la presencia de galectina-3 intracelular y tratar de explicar dicha discrepancia. Este análisis muestra que existe más cantidad de galectina-3 intracelular en linfocitos Th17 en comparación con los demás subtipos (Figura 60), lo que podría explicar los niveles elevados de ARN mensajero para esta proteína detectados por PCR en tiempo real.

Las conclusiones que podemos extraer de estos experimentos *in vitro* es que existe una mayor expresión de galectina-3 en linfocitos Th17, y que esta diferencia parece deberse al nivel intracelular de galectina-3 ya que en el medio de cultivo no se encuentran diferencias entre los diferentes subtipos.

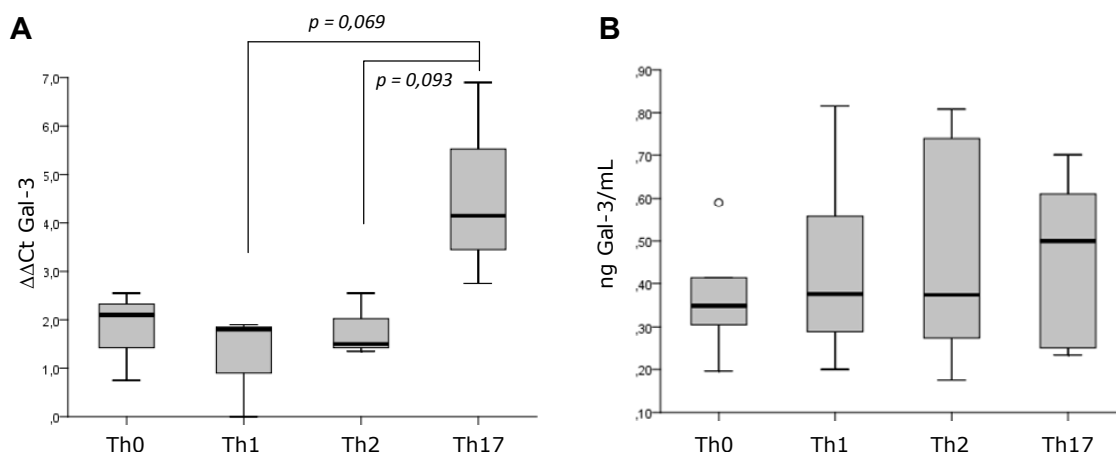


Figura 59. Niveles de ARN mensajero y proteína para galectina-3 en linfocitos Th1, Th2 y Th17. **A.** Los niveles de ARN mensajero para galectina-3 en linfocitos Th1, Th2 y Th17 fueron determinados mediante PCR en tiempo real. Se muestra el diferencial del diferencial del ciclo umbral ($\Delta\Delta Ct$). Th0: linfocitos T $CD4^+$ vírgenes activados y cultivados en condiciones no polarizantes. **B.** Los niveles de galectina-3 en el medio de cultivo fueron determinados mediante ELISA. Los niveles de proteína se expresan como ng/ml por cada 10^6 linfocitos en cultivo. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los círculos señalan muestras que se hallan por debajo del intervalo de confianza del 95% (valores p, test t de Student).

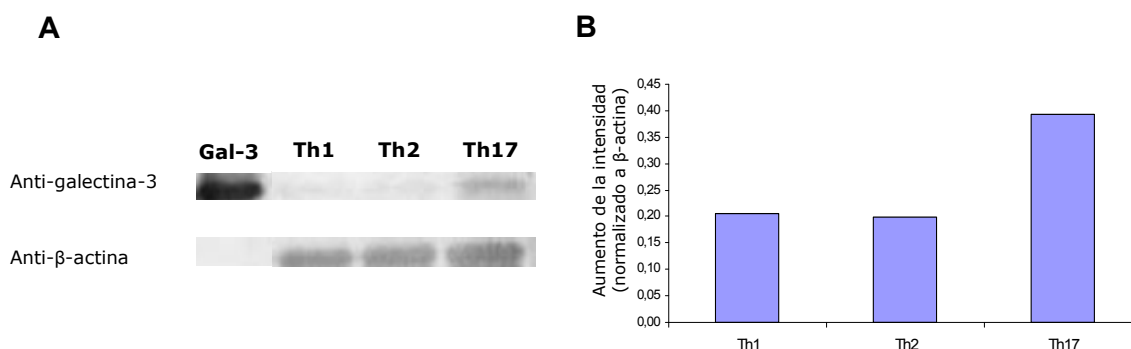


Figura 60. Análisis por western blot de galectina-3 intracelular en distintos subtipos de linfocitos T colaboradores. **A.** Análisis por western blot de los niveles citoplasmáticos de galectina-3 en los distintos subtipos linfocitarios Th1, Th2 y Th17 (fila superior). En los mismos extractos se cuantificó el nivel de β -actina como proteína control (fila inferior). La especificidad de la detección de galectina se evaluó mediante el empleo de galectina-3 recombinante (calles Gal-3). **B.** Análisis de la imagen mostrada en A, donde los valores para galectina-3 fueron normalizados a los observados para β -actina. Los linfocitos Th17 presentan niveles superiores de galectina-3 intracelular respecto de los otros subtipos.

El conjunto de resultados anteriores muestran que para galectina-1 y -3 los linfocitos Th17 polarizados *in vitro*, empleando TGF- β e IL-21, producen mayores niveles de estas lectinas y que, en el caso de la galectina-1, este nivel elevado de expresión se refleja en mayores niveles de proteína en el medio de cultivo. La IL-21 es una citocina que señala a través de la cadena común γ del receptor de alta afinidad para IL-2, y se demostró recientemente en ratones que aquellas citocinas que señalizan a través de este receptor, como son IL-2, IL-4 e IL-7, promueven la síntesis de la galectina-3 (Joo y cols. 2001). De esta

forma, y siendo la IL-21 una citocina que señala a través del mismo receptor, las condiciones de polarización empleadas podrían haber inducido artificialmente la síntesis de galectinas en los linfocitos Th17 diferenciados *in vitro*.

Para evaluar esta posibilidad decidimos cuantificar los niveles de galectina-1 secretada al medio de cultivo por parte de linfocitos T CD4⁺ vírgenes polarizados hacia un fenotipo Th17 empleando otras condiciones de polarización que no incluyesen IL-21 (Manel y cols. 2008a y 2008b). Los niveles de IL-17A, IL-21¹, IFN- γ , IL-13 y galectina-1 resultaron ser similares entre ambas condiciones de polarización y no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas (Tabla 16). Estos datos indican que la adición exógena de IL-21 para polarizar linfocitos T CD4⁺ vírgenes no causa una expresión artificial de galectina-1 y que ambas condiciones de polarización hacia un fenotipo Th17 son equivalentes.

Condiciones de polarización	IL-17A (pg/ml)	IL-21 (pg/ml)	IFN- γ (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)	Galectina-1 (ng/ml)
TGF- β + IL-21	200,8 (111,9)	450,6 (268,7)	19,9 (20,4)	149 (122,8)	105,7 (140,5)
IL-23 + IL1 β + α IFN- γ + α IL-4	220 (74,2)	484,4 (481,8)	19,7 (6,5)	166 (82,7)	118,2 (158,5)

Tabla 16. Comparación entre dos condiciones de polarización de linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia Th17. Se polarizaron linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia un fenotipo Th17 empleando dos condiciones diferentes de polarización y se cuantificaron diversas citocinas y galectina-1 en el medio de cultivo resultante. α IFN- γ : anticuerpo neutralizante para IFN- γ ; α IL-4: anticuerpo neutralizante para IL-4. Los resultados se muestran como mediana (rango intercuartílico). El valor p para todos los casos es superior a 0,05 (test U de Mann-Whitney).

¹ Teniendo en cuenta que en el primer tipo de polarización se empleó IL-21 podría no tener sentido cuantificar IL-21 en el medio de cultivo. Sin embargo, hemos comprobado previamente (datos no mostrados) que la cantidad de IL-21 exógena añadida en el medio de cultivo disminuye un 99,3% tras los 3 días de cultivo, por lo que la IL-21 detectada por ELISA tiene un origen endógeno y atribuible a la producción celular.

8.2. Síntesis in vitro de las galectinas 1 y 3 en pacientes con diabetes tipo 1 y controles sanos.

Visto el diferente patrón de expresión de galectina-1 y -3 en los distintos subtipos de linfocitos T colaboradores decidimos estudiar a continuación la síntesis de estas lectinas inmunoregulatoras en pacientes con diabetes tipo 1, una enfermedad autoinmune caracterizada por una respuesta linfocitaria muy polarizada en estos pacientes hacia un fenotipo pro-inflamatorio de tipo Th1. Para ello, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) tanto de pacientes diabéticos como de controles sanos, fueron activadas con anticuerpos anti-CD3/CD28 y la cantidad de galectina-1 y -3 secretada al medio cuantificada mediante ELISA. La activación policlonal de PBMCs provoca un aumento significativo de la secreción de ambas galectinas (Figura 61A y 61B) tanto en sujetos control como en pacientes diabéticos en comparación con los niveles secretados en ausencia de estimulación.

Los niveles de galectina-1 secretados por PBMCs de sujetos sanos y pacientes diabéticos difieren significativamente entre sí tanto en el caso de células sin estimular como en células estimuladas (Figura 61A). En este caso, la cantidad de galectina-1 secretada por PBMCs no estimulados de personas sanas es 5 veces superior a la secretada por células obtenidas de pacientes diabéticos (187,5 (99,6) ng/mL vs. 36,3 (89,3) ng/mL respectivamente; mediana (rango intercuartílico)). Esta diferencia entre personas sanas y pacientes diabéticos se observa también cuando los PBMCs fueron activados de forma policlonal (743,6 (130,2) ng/mL vs. 236,1 (210,3) ng/mL).

En lo que respecta a la galectina-3 (Figura 61B) no existen diferencias significativas en la cantidad de lectina secretada entre controles sanos y pacientes diabéticos en células sin estimular (0,48 (0,30) ng/mL vs. 0,26 (0,17) ng/mL). Sin embargo tras la activación sí que hay diferencias y de nuevo los individuos control no diabéticos secretan más galectina-3 que los pacientes con T1DM (2,60 (4,36) ng/mL vs. 0,77 (0,94) ng/mL).

Todos estos resultados nos indican, en primer lugar, que la activación de PBMCs provoca la síntesis y secreción tanto de galectina-1 como galectina-3 y, en segundo lugar, que los PBMCs de pacientes diabéticos secretan niveles significativamente menores de ambas lectinas en comparación con personas sanas cuando las células han sido estimuladas, existiendo estas diferencias incluso en células sin estimular en el caso de la galectina-1.

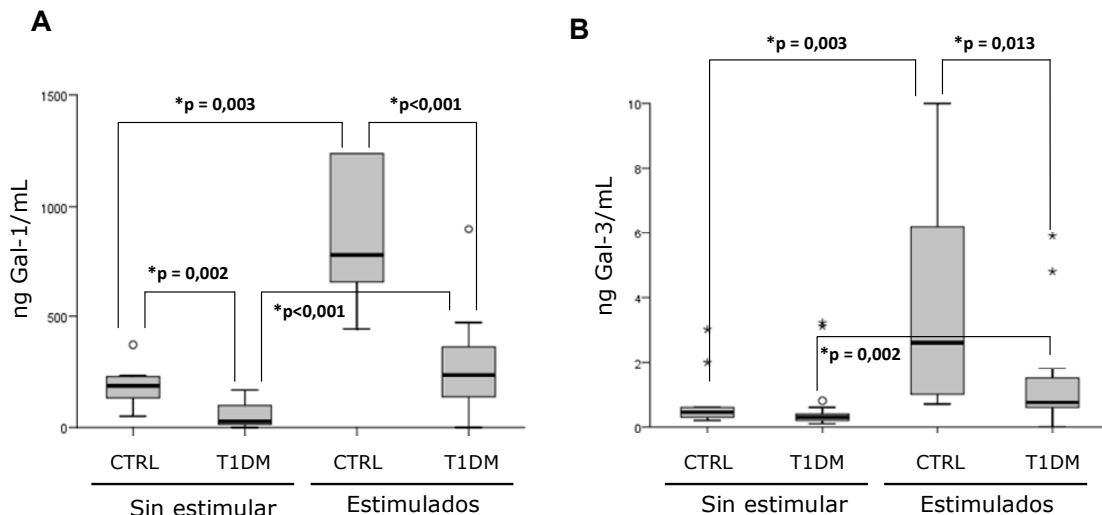


Figura 61. Concentración de galectina-1 y -3 en medios de cultivo de PBMCs de personas sanas y pacientes diabéticos. Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron aisladas de personas sanas (CTRL) y pacientes diabéticos (T1DM) y cultivadas durante 3 días sin estimular o estimulando con anticuerpos anti-CD3/CD28. Tras el período de cultivo, los medios fueron recogidos y se cuantificó la cantidad de galectina-1 y -3 mediante ELISA. **A.** Secreción de galectina-1. La estimulación policlonal provoca un aumento significativo de los niveles de galectina-1 secretados (comparar sin estimular y estimulados) además de existir diferencias en los niveles secretados por sujetos sanos (columnas CTRL) y pacientes diabéticos (columnas T1DM). **B.** Secreción de galectina-3. La estimulación policlonal provoca la secreción de galectina-3 (comparar sin estimular y estimulados). También existen diferencias significativas entre controles sanos y pacientes diabéticos pero solo en PBMCs estimulados. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos/círculos señalan muestras que se hallan por encima/por debajo del intervalo de confianza del 95% (valor p, test U de Mann-Whitney). Los datos tanto en A como en B se expresan como ng/ml por cada 10^6 células.

Con el fin de identificar los factores que pudieran explicar las diferencias observadas en la secreción de galectina-1 y galectina-3 se cuantificaron diferentes citocinas importantes en la polarización de linfocitos T $CD4^+$ y en el desarrollo de la diabetes tipo 1, para conocer en qué condiciones se observa esta disminución en la secreción de galectinas. De esta forma, la estimulación policlonal de PBMCs de pacientes con diabetes tipo 1 indujo la síntesis de mayores cantidades de $IFN-\gamma$ en comparación con controles sanos (Figura 62A; 164,9 (82,4) ng/ml vs. 60,3 (42,0) ng/ml, respectivamente). Además, aunque las diferencias para IL-10 no son significativas, sí son sugerentes de una menor producción de esta citocina por parte de los pacientes diabéticos (Figura 62B; 2216 (1597) pg/ml vs. 1070 (794) pg/ml, respectivamente). Estos resultados concuerdan con una polarización de la respuesta en diabéticos en dirección Th1, y la presencia de linfocitos Th2/Treg en controles sanos, algo que también hemos comprobado en la respuesta frente a epítopos derivados de S100 β (ver capítulo 2).

Determinamos también la síntesis de IL-17A e IL-21, citocinas secretadas por el recién descrito subtipo de linfocitos T colaboradores Th17. Los PBMCs de pacientes diabéticos secretan mayores niveles de IL-17A en comparación con los controles sanos en

células sin estimular (Figura 62C; 918,7 (232,8) pg/ml vs. 0 (378,0) pg/ml, respectivamente), y aunque estos mismos PBMCs procedentes de pacientes con T1DM secretaban elevados niveles de esta citocina tras su estimulación policlonal las diferencias no alcanzaron significancia estadística (1974,1 (4113,0) pg/ml vs. 1388,7 (1458,0) pg/ml, respectivamente). Es de interés indicar que a nivel basal sin estimulación el 60% de los controles sanos muestran niveles de IL-17A por debajo del límite de detección del ELISA (4 pg/mL), en comparación con sólo el 38,5% de los pacientes diabéticos.

En el caso de la IL-21, de nuevo, los PBMCs de pacientes diabéticos secretan más cantidad de esta citocina en comparación con los controles sanos tras la estimulación policlonal (Figura 62D; 257,6 (2192,1) pg/ml vs. 0,0 (68,3) pg/ml, respectivamente). Es también interesante destacar en este caso que una mayor proporción de controles sanos (62,5%) muestran valores de IL-21 por debajo del límite de detección (31 pg/mL) mientras dicho porcentaje es de sólo un 21,4% en los pacientes diabéticos.

Estos resultados muestran que las diferencias observadas entre pacientes diabéticos y sujetos sanos, en cuanto a la síntesis de galectina-1 y galectina-3 por parte de células mononucleares periféricas, tiene lugar en el contexto de una elevada respuesta de tipo Th1 y también, aunque no de forma tan acusada, de una mayor respuesta de tipo Th17. Una respuesta de tipo Th1 elevada en pacientes con diabetes tipo 1 es un hecho característico de las células inmunes de estos pacientes la cual, según estudios recientes, va también acompañada de una respuesta de tipo Th17 elevada (Honkanen y cols. 2010). Esta respuesta de tipo proinflamatorio Th1/Th17 va además acompañada de una respuesta de tipo Th2 y/o Treg disminuida; dicho balance en la síntesis de citocinas y la diferenciación linfocitaria constituye un factor que puede explicar la síntesis diferencial de galectinas-1 y -3 en pacientes diabéticos.

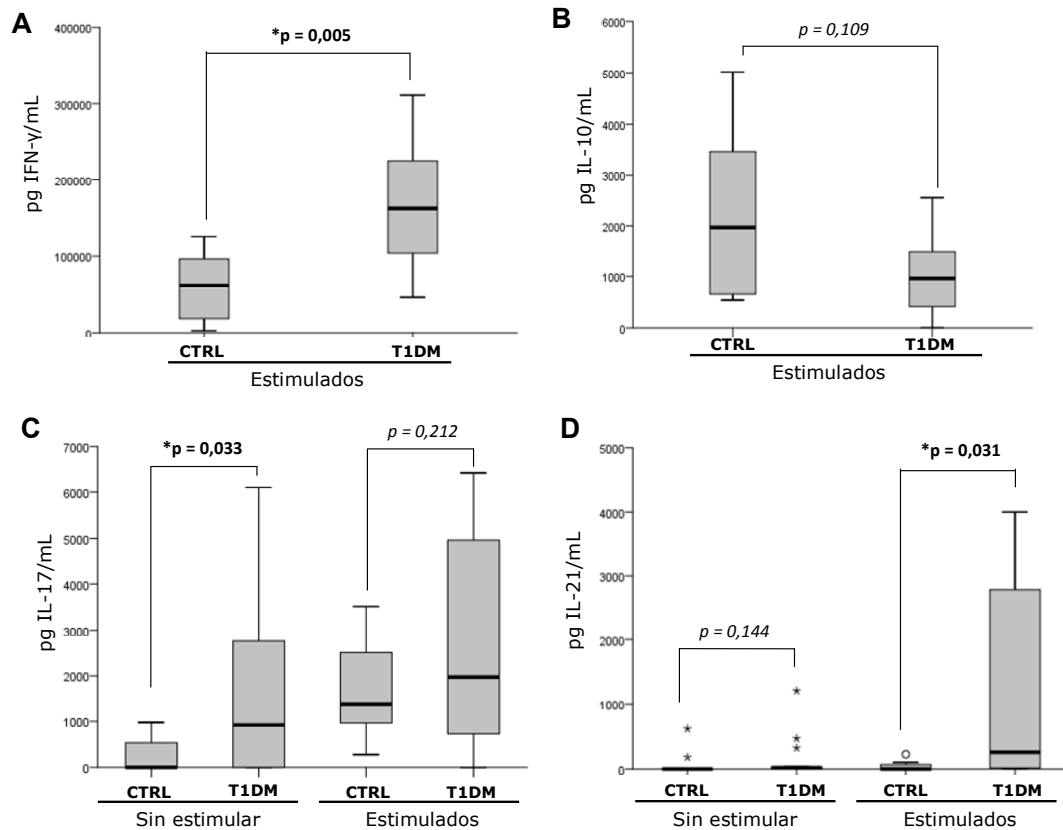


Figura 62. Síntesis de citocinas por parte de PBMCs obtenidos de personas sanas y pacientes diabéticos. A. Síntesis de IFN- γ por PBMCs estimulados con anti-CD3/CD28 (valores p, test t de Student). B. Síntesis de IL-10 por PBMCs estimulados con anti-CD3/CD28 (valores p, test t de Student). C. Síntesis de IL-17 por PBMCs sin estimular o estimulados con anti-CD3/CD28 (valores p, test U de Mann-Whitney). D. Síntesis de IL-21 por PBMCs sin estimular y estimulados con anti-CD3/CD28 (valores p, test U de Mann-Whitney). En todos los casos la concentración de citocina se expresa como pg/ml por cada 10^6 células. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos/círculos señalan muestras que se hallan por encima/por debajo del intervalo de confianza del 95%. Para las citocinas IFN- γ e IL-10 los resultados para los PBMCs sin estimular no se muestran ya que producen cantidades por debajo del límite de detección del ELISA.

8.3. Estudio de la secreción de galectina-1 y citocinas por distintos tipos celulares en sujetos control y pacientes diabéticos: células CD4⁻, CD4⁺, Th17 y linfocitos T reguladores (Treg).

Hemos descrito en la sección anterior una menor secreción de galectina-1 por parte de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de pacientes diabéticos. En un intento por conocer qué población concreta es la que muestra una reducción en la síntesis de esta lectina inmunoreguladora, se aislaron diversas poblaciones leucocitarias a partir de PBMCs tanto de pacientes diabéticos como de sujetos sanos. Dichas poblaciones fueron linfocitos CD4⁺, linfocitos T reguladores (Treg) CD4⁺CD25⁺ y linfocitos Th17 diferenciados *in vitro* a partir de linfocitos CD4⁺. También se ha determinado la síntesis de galectina-1 por parte de la población celular remanente de aislar linfocitos CD4⁺, que hemos denominado CD4⁻ y que

contiene básicamente linfocitos T CD8⁺, linfocitos B y monocitos. En la activación de todas las poblaciones celulares (CD4⁻, CD4⁺, Th17 y Treg) se emplearon anticuerpos anti-CD3/CD28 para poder comparar los resultados con los obtenidos en linfocitos Th diferenciados *in vitro*. Una vez transcurrido el periodo de estimulación, los medios de cultivo fueron recogidos y la cantidad de galectina-1 y diversas citocinas (IFN- γ , IL-10 e IL-17) fueron cuantificados por ELISA.

Como se puede observar en la Figura 63A, en controles sanos la población CD4⁻ es la que secreta mayores niveles de galectina-1 al medio de cultivo al compararla con el resto de poblaciones analizadas. Es de destacar el hecho de que no existe diferencia en la secreción de galectina-1 entre las células CD4⁻ y los linfocitos Treg, siendo ésta última una población en la cual se ha demostrado la síntesis de niveles elevados de esta lectina (Garín y cols. 2006). Así pues podemos concluir que de las poblaciones celulares analizadas, las células CD4⁻ y las Treg secretan niveles elevados de galectina-1 en comparación con linfocitos CD4⁺ sin polarizar o con linfocitos Th17.

A continuación decidimos averiguar el contexto en el que tiene lugar esta síntesis de galectina-1 mediante la cuantificación de citocinas características. Los linfocitos CD4⁺ y Th17 presentan una mayor secreción de IFN- γ en comparación con las poblaciones CD4⁻ y Treg, si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa respecto de los otros tipos celulares (Figura 63B). En el caso de la IL-10 sí existen diferencias entre linfocitos CD4⁺ y la población CD4⁻, produciendo los primeros mayores cantidades de esta citocina inmunomoduladora (Figura 63C). Finalmente, en referencia a la síntesis de IL-17 tanto linfocitos CD4⁺ sin polarizar como polarizados hacia un fenotipo Th17 secretan los mayores niveles de esta citocina, en comparación con la población CD4⁻ (Figura 63D). Además es interesante señalar el hecho de que los linfocitos Treg secretan también niveles elevados de IL-17, niveles que aunque no alcanzan significancia estadística con respecto a la población CD4⁻ concuerdan con lo descrito recientemente por otros autores donde se indica que los linfocitos Treg secretan IL-17 (Voo y cols. 2009).

Podemos concluir que la población de células periféricas con una mayor contribución a la secreción de galectina-1 en sujetos sanos es la CD4⁻ seguida por los linfocitos Treg. De nuevo, el patrón de producción de citocinas observado en estos individuos indica que niveles elevados de citocinas proinflamatorias de tipo Th1, como es el IFN- γ , van acompañados de niveles bajos de galectina-1 extracelular.

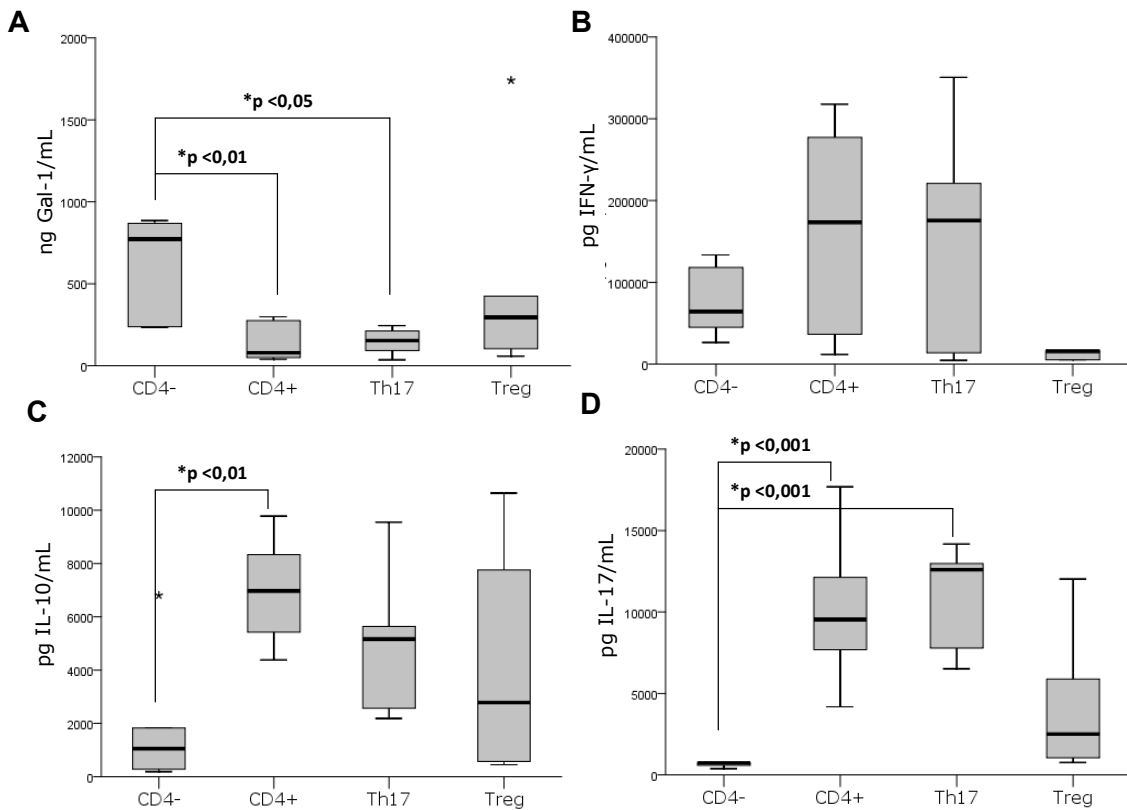


Figura 63. Niveles de galectina-1 extracelular y de distintas citocinas de interés (IFN- γ , IL-10 e IL-17) en diversas poblaciones celulares de sujetos sanos. Diversas poblaciones celulares (CD4⁻, CD4⁺, Th17 y Treg) fueron obtenidas a partir de PBMCs de sujetos control y activadas policlonalmente con anti-CD3/CD28 durante 3 días (ver Materiales y Métodos). Tras el periodo de estimulación, los niveles de galectina-1 extracelular (A), IFN- γ (B), IL-10 (C) e IL-17 (D) fueron determinados mediante ELISA. Los valores de galectina-1 y citocinas se muestran como ng/ml o pg/ml, según corresponda, por cada 10⁶ células. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos señalan muestras que se hallan por encima del intervalo de confianza del 95% (valores p, test de Kruskal-Wallis con el test *post-hoc* de Dunn).

Un análisis similar de la síntesis de galectina-1 y citocinas fue realizado empleando las mismas poblaciones celulares obtenidas a partir de PBMCs de pacientes diabéticos (Figura 64). De nuevo, la población CD4⁻ y los linfocitos Treg son las que secretan mayores niveles de galectina-1 (Figura 64A). En cuanto a la producción de IFN- γ (Figura 64B) sí que existen diferencias significativas entre los distintos tipos celulares, algo que no ocurría en controles sanos, ya que los linfocitos CD4⁺ producen cantidades elevadas de esta citocina en comparación con la población CD4⁻ y linfocitos Treg, lo cual es indicativo de una fuerte polarización hacia un fenotipo Th1 en estos pacientes ya descrita previamente (Liblau y cols. 1995). Es también muy significativo el hecho de que los linfocitos Th17 diferenciados *in vitro* secreten altas cantidades de IFN- γ , lo que concuerda con la idea propuesta recientemente por

otros autores de que este fenotipo linfocitario presenta una elevada plasticidad y que quizás representen un fenotipo no terminal (Annunziato y cols. 2007).

Para las otras dos citocinas cuantificadas en este estudio, IL-10 (Figura 64C) e IL-17 (Figura 64D) observamos que, al igual que ocurre con la síntesis de IFN- γ , los linfocitos CD4⁺ y Th17 son los mayores productores de estas citocinas, en comparación con la población CD4⁻ y los linfocitos Treg. De nuevo y al igual que ocurre en el caso de personas sanas, resulta interesante el hecho de que los linfocitos reguladores Treg secreten niveles elevados de una citocina implicada en procesos inflamatorios como la IL-17 (Figura 64D) (Voo y cols. 2009).

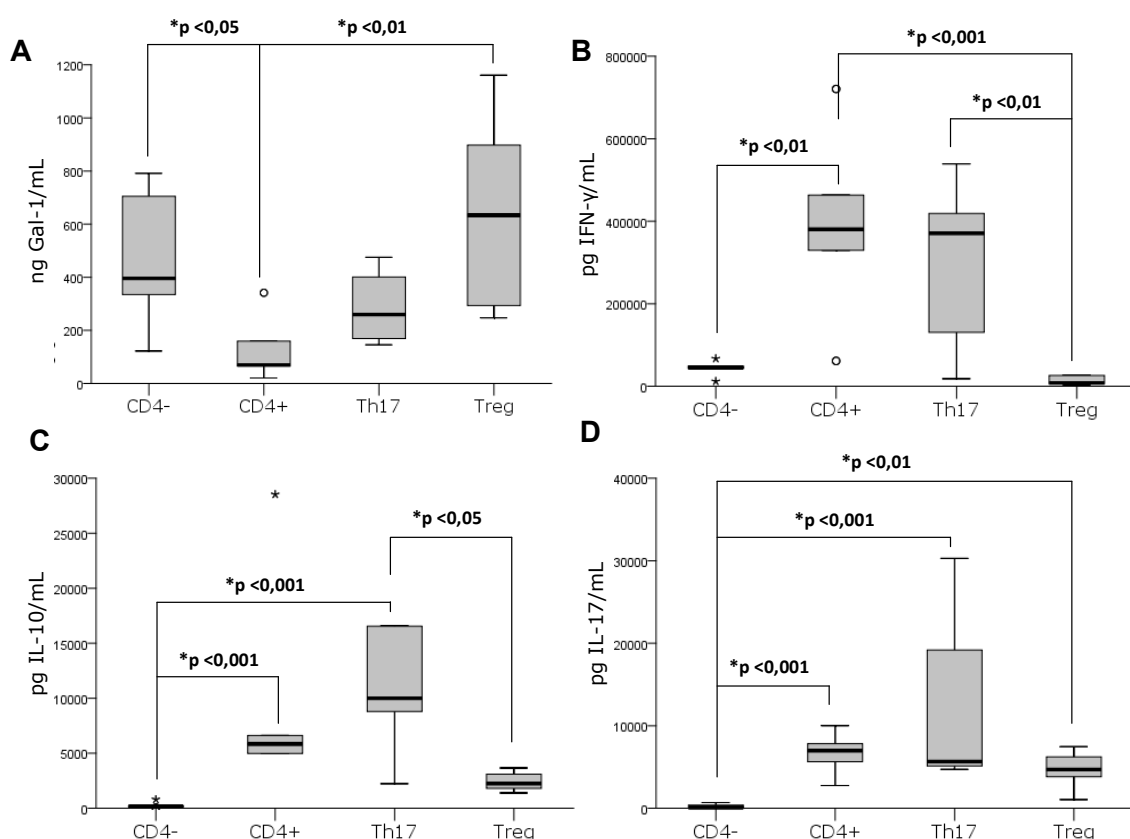


Figura 64. Niveles de galectina-1 extracelular y de distintas citocinas de interés (IFN- γ , IL-10 e IL-17) en diversas poblaciones celulares de pacientes diabéticos. Diversas poblaciones celulares (CD4⁻, CD4⁺, Th17 y Treg) fueron obtenidas a partir de PBMCs de sujetos control y activadas policlonalmente con anti-CD3/CD28 durante 3 días (ver Materiales y Métodos). Tras el periodo de estimulación, los niveles de galectina-1 extracelular (A), IFN- γ (B), IL-10 (C) e IL-17 (D) fueron determinados mediante ELISA. Los valores de galectina-1 y citocinas se muestran como ng/ml o pg/ml, según corresponda, por cada 10⁶ de células. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos señalan muestras que se hallan por encima del intervalo de confianza del 95% (valores p, test de Kruskal-Wallis con el test *post-hoc* de Dunn).

Una vez establecidas las poblaciones celulares que sintetizan galectina-1 y en qué condiciones, pasamos a comparar la secreción de esta lectina en dichas poblaciones para estudiar si existía alguna diferencia entre ambos tipos de sujetos, individuos sanos y pacientes

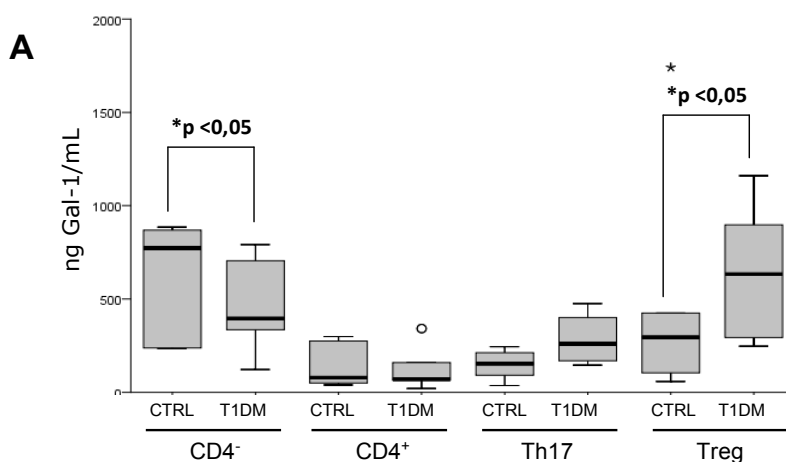
diabéticos (Figura 65). En cuanto a la síntesis de galectina-1 destacar tres hechos importantes. En primer lugar, la población que presenta una secreción significativamente disminuida de esta lectina en pacientes diabéticos, respecto a sujetos sanos, es la población CD4⁻, la cual secreta sólo un 50% de la galectina-1 secretada por el mismo tipo celular en sujetos sanos (772,6 vs. 396 ng/ml) (Figura 65A). En segundo lugar, el hecho de que los linfocitos Treg de diabéticos no secretan una menor cantidad de esta lectina inmunoreguladora, como sería de esperar si suponemos que dichos linfocitos Treg no funcionan correctamente; de hecho, los niveles secretados por estos linfocitos son significativamente superiores a los secretados por linfocitos Treg aislados de sujetos sanos (423,6 vs. 633,7 ng/mL) (Figura 65A). Finalmente, aunque la estimulación policlonal de linfocitos CD4⁺ de diabéticos indujo una secreción de galectina-1 ligeramente inferior a la de linfocitos CD4⁺ de sujetos sanos (78,8 vs. 69,4 ng/ml) (Figura 65A), esta diferencia no es estadísticamente significativa, de lo que se deduce que la mayor responsable de la secreción disminuida de galectina-1 observada en PBMCs de pacientes diabéticos es la población CD4⁻ y no los linfocitos CD4⁺.

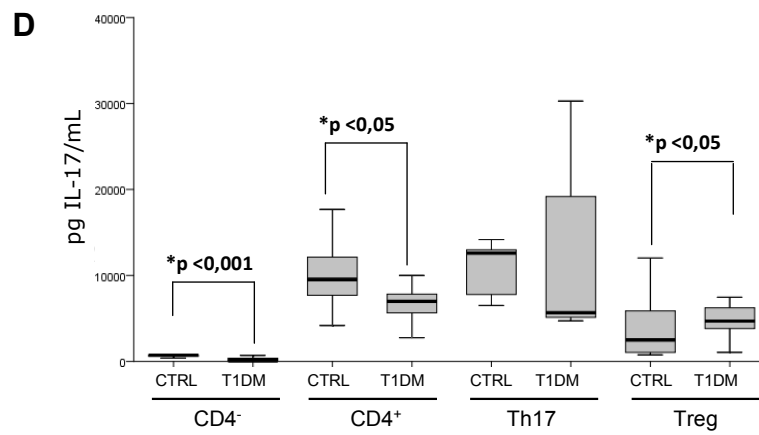
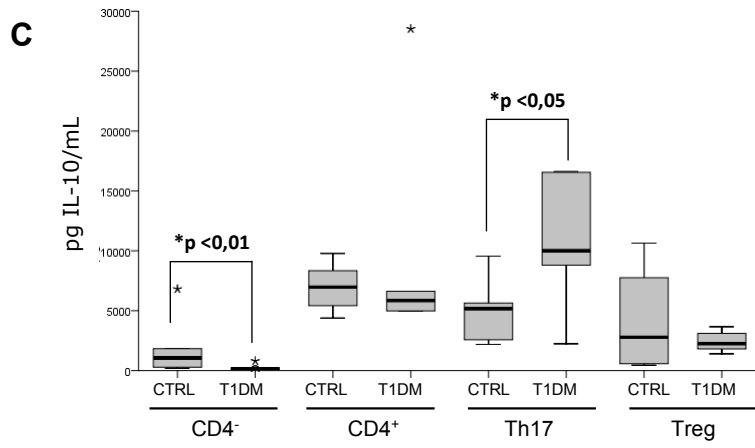
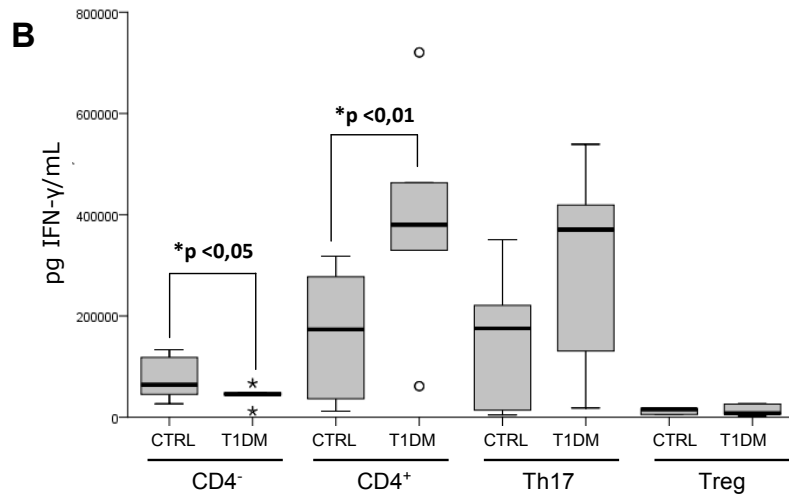
Tal y como se esperaba, la estimulación policlonal de linfocitos CD4⁺ de pacientes diabéticos indujo la síntesis de mayores niveles de IFN- γ en comparación con sujetos sanos (Figura 65B) y menores cantidades de IL-10, si bien esta última diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 65C); de todas formas, se observa un aumento significativo de la relación IFN- γ /IL-10 (o lo que es lo mismo Th1/Th2-Treg) en pacientes diabéticos (49,8 vs. 22,5) (Figura 65E) (Liblau y cols. 1995). Al fijarnos en la población CD4⁻, responsable de la secreción disminuida de galectina-1, la cantidad secretada tanto de IFN- γ (Figura 65B) como de IL-10 (Figura 65C) es menor en ambos casos por parte de estas células obtenidas de pacientes diabéticos con respecto a sujetos sanos, pero al igual que ocurre con los linfocitos CD4⁺, la relación IFN- γ /IL-10 es de nuevo significativamente mayor en pacientes diabéticos (250,3 vs. 81,7) (Figura 65E), debido a una mayor reducción relativa en la secreción de IL-10. En cuanto a los linfocitos Th17 diferenciados *in vitro* cabe destacar la mayor secreción de IL-10 por parte de estos linfocitos obtenidos y diferenciados a partir de pacientes diabéticos (Figura 65C), citocina que se ha demostrado puede ser producida por linfocitos Th17 (McGeachy y cols. 2007). Esta elevada producción de IL-10 compensa la mayor producción de IFN- γ de estas células (Figura 65B), haciendo que la relación IFN- γ /IL-10 sea ahora muy similar entre linfocitos Th17 de pacientes diabéticos y sujetos control (Figura 65E). Además, aunque las diferencias no son significativas, existe una disminución de

la ratio IFN- γ /IL-10 en las Treg de diabéticos, lo que podría sugerir un mecanismo homeostático de regulación frente a la polarización Th1 descrita en linfocitos T.

En cuanto a los niveles de IL-17 es importante señalar la presencia de niveles mayores de esta citocina en el medio de cultivo de linfocitos CD4⁺ obtenidos de sujetos sanos en comparación con pacientes diabéticos (9.539 vs. 6.991 pg/ml, respectivamente) (Figura 65D), situación similar a la observada en la población CD4⁻ (735 vs. 81 pg/ml). En ambos casos, resulta interesante observar la coincidencia entre menores niveles de IL-17 y menores niveles de galectina-1 en pacientes diabéticos. Una relación opuesta a la observada en los linfocitos Treg, donde dichos linfocitos reguladores obtenidos de pacientes diabéticos secretan mayores niveles de IL-17 en comparación con los sujetos sanos (4.688 vs. 2.501 pg/ml, respectivamente), lo cual coincide con un mayor nivel de galectina-1 en el medio de cultivo de Treg de diabéticos. Todos estos datos apoyan los experimentos de diferenciación linfocitaria *in vitro*, expuestos al inicio de esta sección, y que muestran que los linfocitos Th17, en comparación con los linfocitos Th1, producen mayores niveles de esta lectina.

Así pues, concluimos que la población responsable de la secreción reducida de galectina-1 por parte de los PBMCs de pacientes con diabetes tipo 1 es la población CD4⁻ y no los linfocitos CD4⁺, que si bien secretan niveles menores de galectina-1 en comparación con los linfocitos Treg o con las células de la población CD4⁻, esta secreción no parece estar alterada en pacientes diabéticos. Además, la fuerte polarización de la respuesta hacia un tipo proinflamatorio Th1 en sujetos diabéticos, acompañada de una menor síntesis de citocinas relacionadas con linfocitos Th17, provocan una reducción significativa de la secreción de galectina-1 por parte de pacientes diabéticos contribuyendo a mantener dicha polarización (Toscano y cols. 2007a).





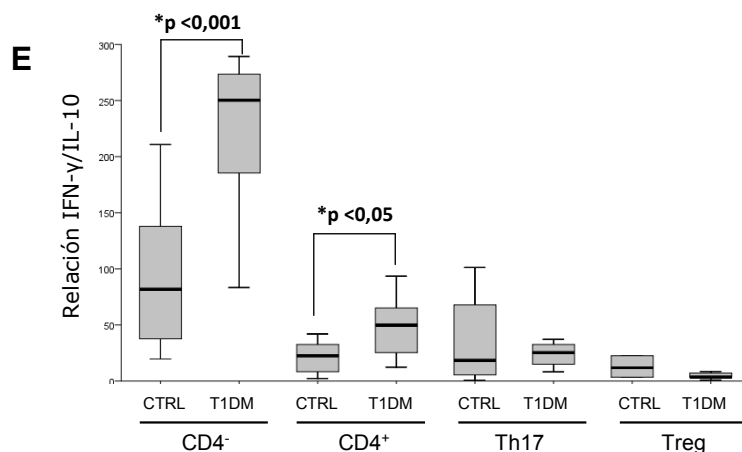


Figura 65. Niveles de galectina-1 extracelular, IFN- γ , IL-10, IL-17 y la relación IFN- γ /IL-10 en diversas poblaciones celulares de personas sanas y pacientes diabéticos. Se obtuvieron diversas poblaciones celulares a partir de PBMCs (linfocitos CD4⁺, Th17 diferenciados *in vitro* a partir de CD4⁺, Treg y la población CD4⁻ remanente de los PBMCs) aislados de personas sanas (columnas CTRL) o de pacientes diabéticos (columnas T1DM). Dichas poblaciones fueron estimuladas durante 72 horas y se determinó la concentración en los medios de cultivo de galectina-1 (A), IFN- γ (B), IL-10 (C), IL-17 (D) y la relación IFN- γ /IL-10 (E). Los valores de galectina-1 y citocinas se muestran como ng/ml o pg/ml, según corresponda, por cada 10⁶ células. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos/círculos señalan muestras que se hallan por encima/por debajo del intervalo de confianza del 95% (valores p, test t de Student para poblaciones normales o test U de Mann-Whitney para poblaciones no normales).

8.4. Estudio del nivel de galectina-1 en la superficie celular y su relación con azúcares de superficie en distintos tipos celulares.

Una vez determinado que la población deficiente a la hora de secretar galectina-1 al medio en pacientes diabéticos es la población CD4⁻ nos preguntamos si podría existir alguna diferencia en el nivel de galectina-1 unida a la superficie celular entre controles y pacientes. La galectina-1 se une a diferentes glicoproteínas de la superficie celular controlando varias funciones fisiológicas de los linfocitos, como la adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular, o la apoptosis de linfocitos T activados mediada por su unión al receptor de células T, polarizando la respuesta inmune hacia un fenotipo Th2/Treg (Perillo y cols. 1998. Toscano y cols. 2007a); además, diferencias en la cantidad de galectina-1 presente en la superficie celular podría indicar diferencias en la glicosilación de proteínas de membrana entre sujetos sanos y pacientes diabéticos, y contribuir a la comprensión de la polarización extrema de la respuesta linfocitaria en estos últimos.

Para ello las distintas poblaciones celulares descritas en la sección anterior, obtenidas tanto de individuos sanos como de pacientes diabéticos, una vez estimuladas en las condiciones previamente descritas, fueron lavadas y teñidas para galectina-1, CD4, CD25 y la lectina PHA-L. Según la literatura, la lectina PHA-L interacciona con gran afinidad con

glucopéptidos tri- y tetraantenarios que contengan residuos de galactosa exteriores y ningún ácido siálico en posición α 2,6, en cuya posición es inhibitorio e impide la unión de PHA-L al glucopéptido (Green y cols. 1987. Hammarstrom y cols. 1982. Jenner y cols. 2006).

En lo que respecta a los niveles de galectina-1 en la superficie celular en las diferentes poblaciones celulares estudiadas, y al igual que ocurre para la galectina-1 secretada al medio de cultivo, la población $CD4^-$ y los linfocitos Treg demostraron ser los que presentaban mayores niveles de galectina-1 en la superficie celular, a niveles significativamente mayores que los detectados en linfocitos $CD4^+$ y linfocitos Th17 diferenciados *in vitro* (Figura 66A). Estos niveles de galectina-1 no parecen guardar relación con los niveles de tinción para la lectina PHA-L (Figura 66B), ya que de las cuatro poblaciones estudiadas, las células $CD4^-$ y los linfocitos Treg son los que parecen tener niveles inferiores de tinción para esta lectina en comparación con los linfocitos $CD4^+$ o Th17 (comparar figuras 66A y 66B).

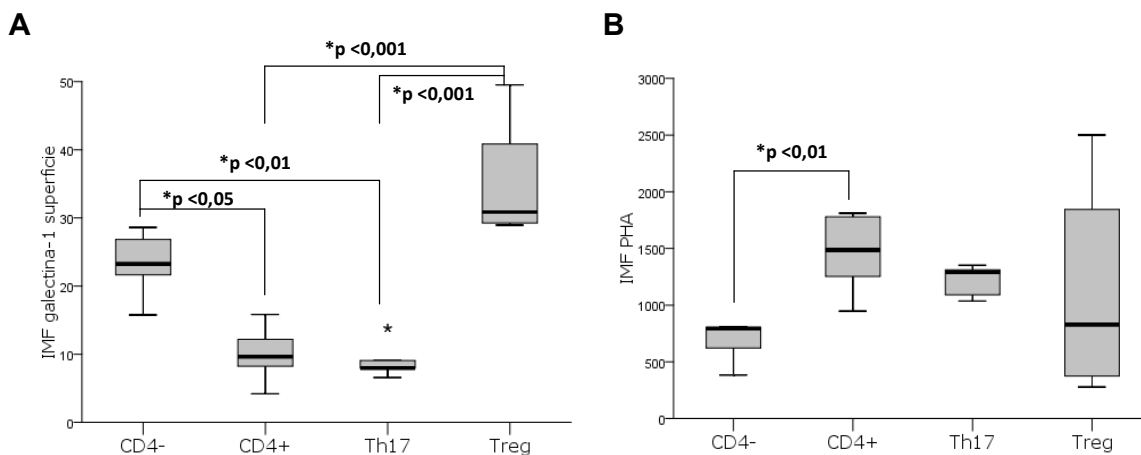


Figura 66. Niveles de galectina-1 en la superficie celular y tinción con la lectina PHA-L en distintos tipos celulares de personas sanas. A. Niveles de galectina-1 en la superficie celular de distintas poblaciones celulares obtenidas de personas sanas. Los niveles de galectina-1 superficial son significativamente mayores en las poblaciones $CD4^-$ y linfocitos reguladores (Treg) en comparación con linfocitos $CD4^+$ y Th17. **B.** Tinción con PHA-L de las mismas poblaciones celulares mostradas en A. Se observa una relación inversa entre los niveles de tinción con PHA-L y los niveles de galectina-1 superficial. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos/círculos señalan muestras que se hallan por encima/por debajo del intervalo de confianza del 95% (valores p, test de Kruskal-Wallis con el test *post-hoc* de Dunn). IMF: intensidad media de fluorescencia.

Es bien conocido el hecho de que la estimulación celular provoca una remodelación importante en las glucoproteínas de la superficie celular, algo que hemos comprobado experimentalmente al estimular mediante anticuerpos anti-CD3/CD28 linfocitos $CD4^+$ y teñirlos posteriormente con PHA-L (Figura 67A). Como puede verse en dicha figura, la estimulación policlonal de esta población celular provoca un aumento significativo en los niveles de tinción para PHA-L, lo que en principio indicaría una disminución en los niveles de

glucoproteínas de superficie conteniendo ácido siálico y/o mayor cantidad de glucopéptidos tri- y tetraantenarios que contengan residuos de galactosa exteriores. De este modo, decidimos comprobar la tinción con la lectina PHA-L estaría relacionada con los niveles de activación en cada una de las distintas poblaciones estudiadas, cuantificando asimismo los niveles de galectina-1 de superficie. Para ello, escogimos CD25 como marcador de activación y en función del nivel de dicho marcador cada población fue dividida a su vez en tres sub-poblaciones (CD25 bajo, CD25 medio y CD25 alto) (Figura 67B) determinándose el nivel de galectina-1 en la superficie celular en las sub-poblaciones CD25 bajo y CD25 alto (Figura 67C).

Los resultados obtenidos sobre la cantidad de galectina-1 detectada en la superficie celular se muestran en la Figura 67C. Existen claras diferencias en los niveles de galectina-1 entre aquellas células que expresan distintos niveles de CD25, tanto en las células CD4⁺ como en los linfocitos Treg, diferencias que no parecen existir, sin embargo, en linfocitos CD4⁺ y Th17 (Figura 67C). En el caso de la población de células CD4⁻, y dado que el estímulo empleado fueron anticuerpos anti-CD3/CD28 nos lleva a pensar que esta diferencia podría deberse a los linfocitos CD8⁺ presentes en dicha población. Los linfocitos reguladores Treg con mayores niveles de CD25 son los que mayores niveles de galectina-1 presentan en superficie en comparación con el resto de tipos celulares. Finalmente, tal y como se muestra en la Figura 67D y para todos los tipos celulares, los niveles de CD25 y la tinción con la lectina PHA-L están directamente relacionados ya que aquellas células con menores niveles de CD25 tienen también una menor tinción con PHA-L y viceversa, demostrando que la activación celular provoca una remodelación de los azúcares presentes en la superficie celular y por tanto influye en la unión de galectina-1 a dicha superficie.

En conjunto, estos datos parecen indicar que aquellas células con mayores niveles de CD25 poseen también mayores niveles de galectina-1 en superficie, y presentan una mayor tinción para la lectina PHA-L, lo que en principio indicaría un menor nivel de ácido siálico en posición α 2-6 y/o mayor cantidad de glucopéptidos tri- y tetraantenarios que contengan residuos de galactosa exteriores.

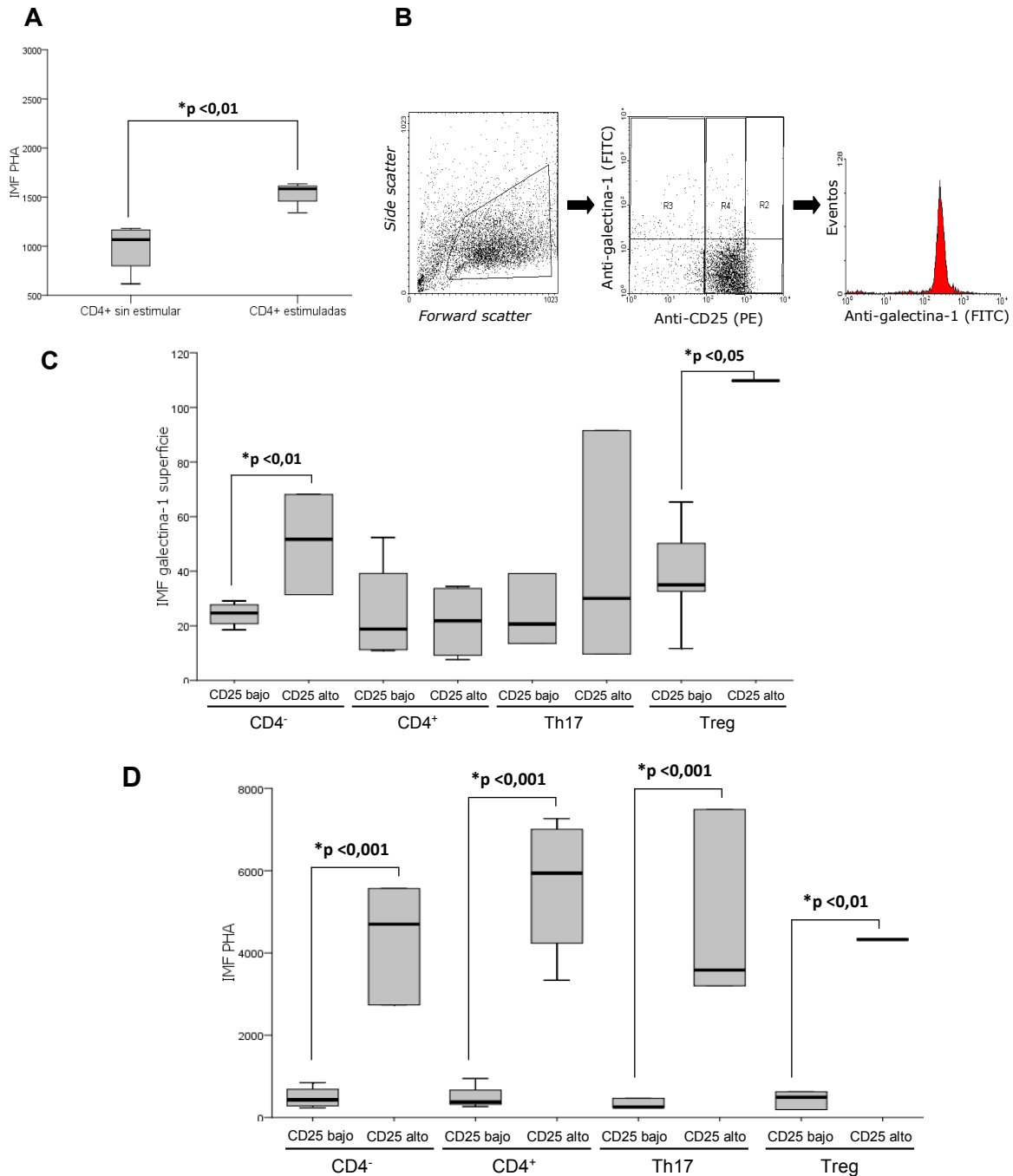


Figura 67. Niveles de galectina-1 de superficie en función del nivel de CD25 en distintas poblaciones celulares obtenidas de controles sanos. Las cuatro poblaciones ya descritas y obtenidas de personas no diabéticas fueron estimuladas con anticuerpos anti-CD3/CD28 durante tres días, tras lo cual fueron lavadas y teñidas para galectina-1 superficial y CD25. **A.** Tinción con la lectina PHA-L de linfocitos CD4⁺ activados o no con anticuerpos anti-CD3/CD28. La estimulación provoca un aumento significativo en el nivel de tinción para esta lectina (valores p, test t de student para muestras relacionadas). **B.** Esquema seguido para clasificar las diferentes poblaciones celulares estudiadas en función de los niveles de CD25. Tras seleccionar las células vivas empleando una ventana en *forward/side scatter*, dichas células fueron divididas en tres poblaciones según los niveles de CD25: CD25 bajo (ventana “R3” correspondiente al 10% inferior), CD25 alto (ventana “R2” correspondiente al 10% superior) y CD25 medio (ventana “R4” correspondiente al 90% restante). Para cada una de las poblaciones se cuantificó la intensidad media de fluorescencia para galectina-1. **C.** Niveles de galectina-1 en función de los niveles de CD25. Para cada una de las cuatro poblaciones celulares se comparan los niveles de galectina-1 en superficie entre las células CD25 bajo y CD25 alto. En los

leucocitos CD4⁺ y linfocitos Treg el aumento en los niveles de CD25 está asociado con un aumento significativo de galectina-1 en superficie. **D.** Tinción con la lectina PHA-L y su relación con los niveles de CD25. Los niveles de tinción para PHA-L son significativamente mayores en todos los casos en aquellas células que expresan niveles más elevados de CD25. La línea en las barras muestra el valor de la mediana (valores p, test U de Mann-Whitney).

Una vez establecidos los niveles de galectina-1 en la superficie de distintas poblaciones leucocitarias obtenidas a partir de individuos sanos, procedimos a comprobar si existían diferencias con los niveles presentes en las mismas poblaciones celulares obtenidas a partir de pacientes diabéticos. Tal y como se muestra en la Figura 68A, los linfocitos CD4⁺ obtenidos de pacientes diabéticos y estimulados *in vitro* poseen más galectina-1 en superficie en comparación con los mismos linfocitos obtenidos de individuos sanos. Este aumento en la galectina-1 de superficie podría deberse al hecho de que los linfocitos CD4⁺ de diabéticos se diferencian preferentemente hacia Th1 (tal y como hemos mostrado anteriormente), y se ha demostrado recientemente que este subtipo de linfocito T posee un patrón de glicoproteínas de superficie capaz de unir galectina-1 (Toscano y cols. 2007a). Asimismo detectamos una intensidad de tinción con PHA-L mayor en los linfocitos CD4⁺ obtenidos a partir de diabéticos (Figura 68B), lo cual corrobora la idea de la existencia de un patrón de glicoproteínas diferente en estos pacientes, que contendrían una menor cantidad de glicoproteínas de superficie con ácido siálico en posición α 2,6. Así pues, si bien la secreción de galectina-1 por parte de los linfocitos CD4⁺ en diabéticos parece similar a la observada en individuos sanos (Figura 65), estas células parece que presentan menores niveles de ácido siálico en posición α 2,6 en el glucocáliz, por lo que la cantidad de galectina-1 unida a la superficie celular sería mayor en comparación con lo que ocurre en controles sanos. (Toscano cols. 2007a; Zhuo y cols. 2011).

Por contra, cuando esos mismos linfocitos CD4⁺ son diferenciados *in vitro* hacia un fenotipo Th17 muestran niveles de galectina-1 unida a la superficie celular y niveles de tinción de PHA-L comparables a los observados en linfocitos Th17 diferenciados a partir de individuos sanos (Figura 68A y 68B), a pesar de que en los primeros los niveles de PHA-L son ligeramente superiores a los observados en linfocitos Th17 obtenidos de individuos sanos.

En el caso de los linfocitos reguladores Treg, el nivel de galectina-1 en la superficie celular es 3,2 y 1,6 veces mayor en individuos sanos y pacientes diabéticos, respectivamente, a los observados en linfocitos CD4⁺ obtenidos del mismo individuo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en el primer caso (comparar Figuras 43 66 y 45 68A). Además,

esta mayor cantidad de galectina-1 en la superficie de linfocitos Treg está asociada a una reducción del 44 y el 37% en la tinción de PHA-L en controles sanos y pacientes diabéticos, respectivamente, al compararlos con linfocitos CD4⁺ (Figura 68B). Resulta interesante el hecho de que los linfocitos reguladores Treg de diabéticos presenten menores niveles de galectina-1 en superficie al compararlos con linfocitos reguladores Treg obtenidos de sujetos sanos, ya que este resultado podría explicar por qué en el caso de los linfocitos Treg de diabéticos se detecta más galectina-1 en el medio de cultivo, al unirse ésta en menor proporción a la superficie celular (ver Discusión).

En linfocitos Treg de controles sanos existe una fuerte correlación positiva entre niveles de galectina-1 de superficie y niveles de CD25 ($r = 0,843$, $p < 0,05$; coeficiente de correlación de Pearson), de tal modo que las células con más CD25 expresan mayores niveles de galectina-1 en superficie. Este resultado coincide con los datos expuestos por otros autores que afirman que las células Treg, que poseen elevados niveles de CD25, expresan grandes cantidades de galectina-1 en superficie, la cual les confiere parte de su poder supresor (Garín y cols. 2007). En pacientes con diabetes tipo 1 esta correlación también es significativa, pero de signo opuesto ($r = - 0,794$, $p < 0,01$; coeficiente de correlación de Pearson), de lo que podemos concluir que las células que más CD25 expresan, las células Treg, poseen menores niveles de galectina-1 de superficie en pacientes con diabetes tipo 1, lo cual puede estar limitando su poder supresor.

Finalmente en el caso de la población CD4⁻ es difícil extraer una conclusión clara, ya que es una población heterogénea en la que se hallan presentes células de características muy diferentes entre sí como son linfocitos T CD8⁺, linfocitos B y monocitos. Sin embargo, se observa que esta población obtenida de pacientes diabéticos presenta niveles de galectina-1 en superficie significativamente mayores a los observados por estas mismas células provenientes de sujetos sanos, mientras que los niveles de tinción con PHA-L parecen seguir una dirección opuesta, y son significativamente menores en leucocitos CD4⁻ obtenidos de pacientes diabéticos; la purificación de los diferentes tipos celulares presentes en esta población CD4⁻ permitirá obtener conclusiones más fiables sobre lo que realmente ocurre en este caso.

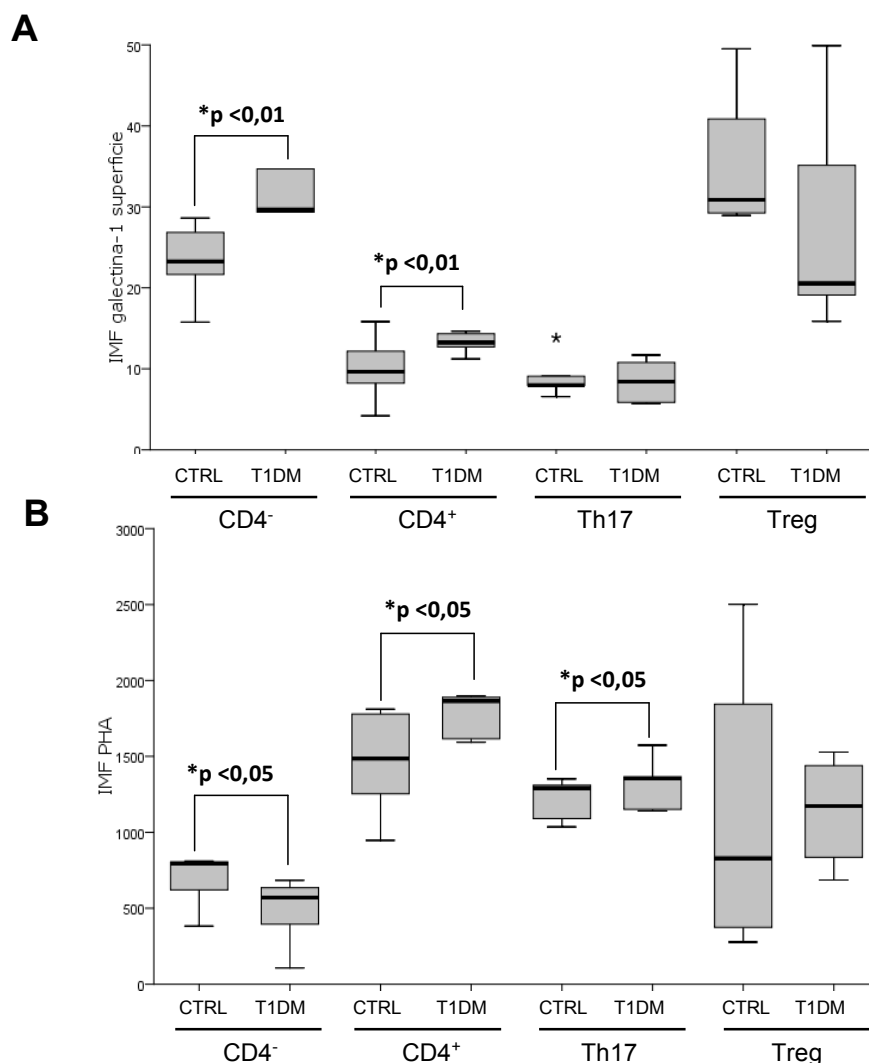


Figura 68. Comparación de los niveles de galectina-1 en superficie y tinción de PHA-L en distintos tipos celulares obtenidos de personas sanas y pacientes diabéticos. Las diferentes poblaciones obtenidas a partir de PBMCs (CD4⁻, CD4⁺, Th17 y Treg) de personas sanas (columnas CTRL) o de pacientes diabéticos (columnas T1DM) fueron estimuladas *in vitro* durante tres días, tras lo cual fueron lavadas y teñidas para galectina-1 en superficie (A) y PHA-L (B). La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos señalan muestras que se hallan por encima del intervalo de confianza del 95% (valores p, test t de Student o test U de Mann-Whitney). IMF: intensidad media de fluorescencia.

Con el fin de comprobar qué efecto tendría sobre la producción de citocinas por parte de linfocitos T CD4⁺ el bloqueo del dominio de unión a carbohidratos de la galectina-1, añadimos al medio de cultivo D-galactopiranosil-β-D-tiogalactopiranosido (tiodigalactósido, TDG). El TDG compite con la N-acetilglucosamina por el dominio de unión a carbohidratos (CRD) de las galectinas, bloqueando su unión a las glucoproteínas de superficie (Espelt y cols. 2011. Cattaneo y cols. 2011. Tras estimular 3 días las células con anticuerpos anti-CD3/CD28 cuantificamos los niveles de IFN-γ, IL-10 e IL-17 y el número de células al final

del periodo de estimulación. Según lo propuesto por otros autores (Toscano y cols. 2007a) el patrón de glicosilación de las proteínas de superficie de los linfocitos T colaboradores Th1 y Th17, pero no el de las Th2, ocasiona que la galectina-1 se una a su superficie, iniciando una cascada de señales que lleva en último término a la muerte celular. La adición de TDG bloquearía el sitio de unión a carbohidratos de las galectinas de forma que sería de esperar que los linfocitos Th1 y Th17 no sufrieran apoptosis y observásemos en el medio de cultivo un aumento de los niveles de IFN- γ e IL-17.

Sorprendentemente, sin embargo, el nivel de IFN- γ disminuye al añadir el TDG (Figura 69A), alcanzando significancia estadística en el caso de los pacientes diabéticos. Además, acompañando a esta reducción en la síntesis de IFN- γ , la síntesis de IL-10 aumenta tanto en pacientes diabéticos como en personas sanas (Figura 69B). Este efecto del TDG modifica la relación IFN- γ /IL-10 (Figura 69D) de forma que disminuye de forma muy evidente en aquellos cultivos de linfocitos CD4⁺ obtenidos de pacientes diabéticos, acercándose a la relación observada en sujetos sanos. Este resultado en principio sorprendente puede deberse al hecho de que el TDG no es un inhibidor específico de la galectina-1 y el efecto observado pueda resultar de la suma de los bloqueos de los dominios de unión a carbohidrato de otras galectinas.

A pesar de lo observado anteriormente para el IFN- γ , la adición de TDG a cultivos de linfocitos CD4⁺ aumenta la síntesis de IL-17 en el caso de los pacientes diabéticos (Figura 69C), mientras que en el caso de los sujetos sanos se observa un ligera disminución no significativa; es de señalar que este comportamiento divergente entre los linfocitos de ambos tipos de sujetos es significativamente diferente (Figura 69C).

Este efecto en la síntesis de citocinas, con una reducción en la síntesis de citocinas Th1 y aumento de citocinas Th2 o reguladoras, va acompañado además de un aumento en el número de células presentes en los cultivos al final del periodo de tres días en presencia de TDG, siendo este aumento significativo en el caso de los pacientes diabéticos (Figura 69E).

En resumen, parece que el empleo de un inhibidor como el TDG que impide la unión de las galectinas (incluyendo galectina-1) a sus glucoproteínas ocasiona una disminución significativa de la relación de citocinas pro-inflamatorias/citocinas reguladoras (IFN- γ /IL-10), un resultado contrario a lo esperado, además de permitir una mayor proliferación celular y/o una reducción en la muerte celular *in vitro*.

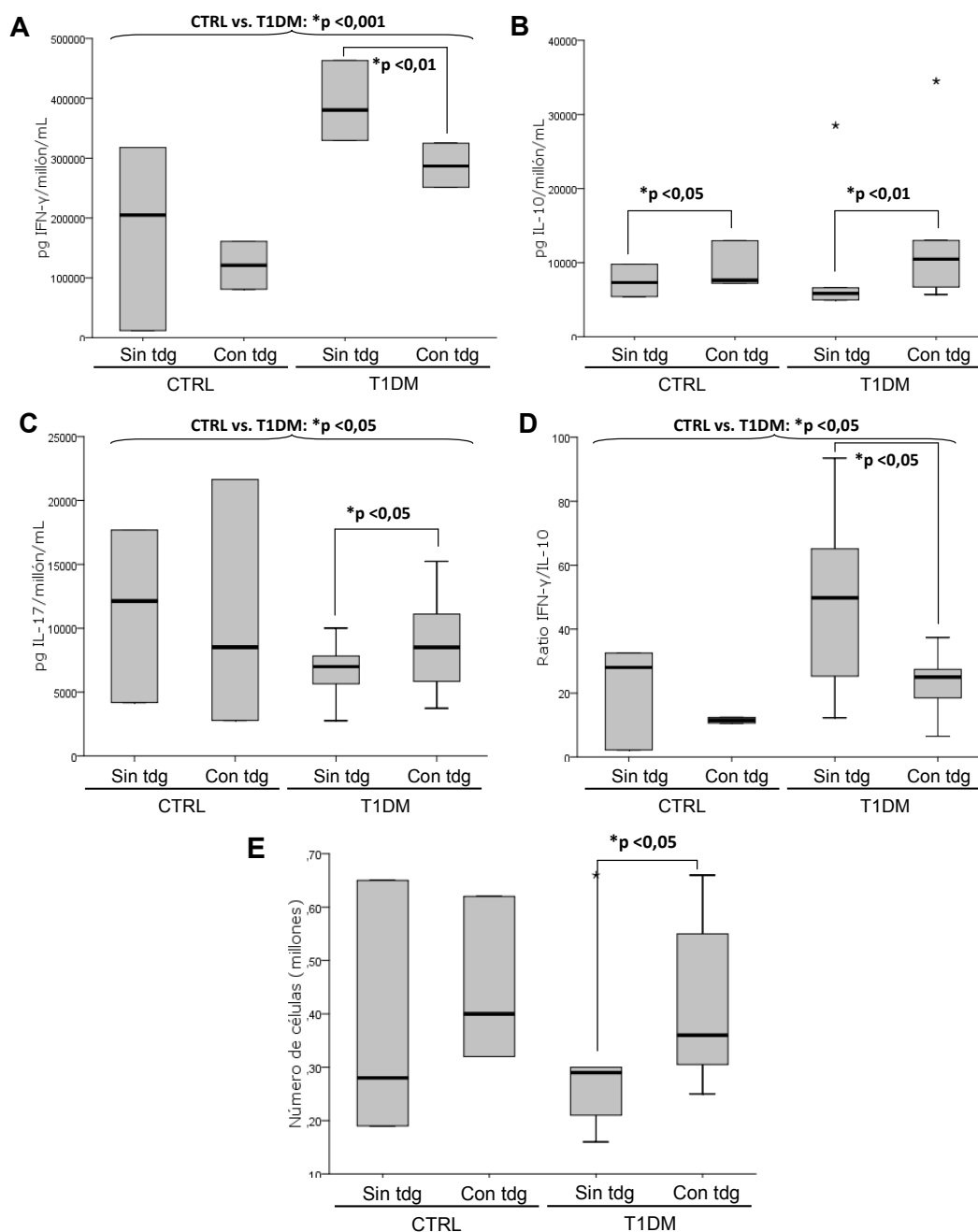


Figura 69. Efecto del tiodigalactósido (TDG) sobre la síntesis de citocinas por parte de linfocitos CD4⁺ y su proliferación *in vitro*. Linfocitos CD4⁺ fueron aislados y cultivados tal y como se describe en Materiales y Métodos en ausencia o presencia de 15mM TDG. Tras 3 días de estimulación, el medio fue recogido para cuantificar los niveles de IFN- γ (A), IL-10 (B), IL-17 (C). Además se determinó la relación IFN- γ /IL-10 (D) así como el número de células viables presentes al final del periodo de estimulación (E). El efecto del TDG dentro de cada grupo de personas fue evaluado mediante la prueba de los signos de Wilcoxon. La comparación del efecto del TDG entre personas sanas y pacientes diabéticos fue evaluado mediante el test t de Student o el test U de Mann-Whitney. La línea en las barras muestra el valor de la mediana. Los asteriscos señalan muestras que se hallan por encima del intervalo de confianza del 95%.

8.5. Efecto de la eliminación de los ligandos de las galectinas sobre el comportamiento *in vitro* de linfocitos T.

A continuación decidimos estudiar cuál sería el efecto de la eliminación de los ligandos naturales de las galectinas en la superficie celular sobre el comportamiento *in vitro* de los linfocitos de sujetos control. La swainsonina (SW) es un inhibidor de la α -manosidasa II que bloquea la ruta de síntesis de N-glicanos, disminuyendo significativamente la cantidad de N-acetil-lactosaminas unidas a proteínas de superficie, las cuales son el ligando natural de la galectina-1 (entre otras galectinas).

En primer lugar, comprobamos el efecto que sobre la proliferación celular tendría el tratamiento con SW de linfocitos T CD3⁺ estimulados policlonalmente durante tres días, determinando la dilución del marcaje con CFSE de dichos linfocitos. La adición de SW reduce la tinción con CFSE en un 8,5% (test de rangos de Wilcoxon, $p < 0,001$), indicando que la adición de SW induce un mayor proliferación de los linfocitos CD3⁺ (datos no mostrados). Asimismo comprobamos el efecto que sobre la glicosilación de proteínas de superficie tiene la adición de SW mediante la tinción de las células con la lectina PHA-L. Tal y como era de esperar, los linfocitos incubados con SW muestran una reducción significativa de la tinción, ya que con la SW disminuye el número de ligandos potenciales para esta lectina. (Figura 70A).

La cantidad de galectina-1 en el medio aumenta significativamente (Figura 70B), lo que puede deberse a que la falta de ligandos adecuados en el glucocálix aumenta la cantidad de galectina-1 libre en el medio de cultivo al no unirse ésta a la superficie celular. Además la adición de SW dirige a los linfocitos T hacia una respuesta tipo Th1, produciendo mayores niveles de IFN- γ (52,6 vs. 65,4 ng/millón de células/mL) y menores de IL-10 (Figura 70C), lo que ocasiona una elevación significativa de la relación de citocinas Th1/Th2 (Figura 70D). Sin embargo la cantidad de IL-17 secretada al medio se ve significativamente reducida con la adición de la SW, lo que nos lleva a pensar que quizás la galectina-1 de superficie podría ser necesaria para la supervivencia *in vitro* de las células Th17, o bien que existe una elevada diferenciación de estas células hacia un fenotipo tipo Th1 debida a una mayor proliferación celular, ya que los linfocitos Th17 parecen ser un fenotipo celular plástico capaz de diferenciación (Annunziato y cols. 2007).

Así pues la eliminación de los ligandos potenciales para galectina-1 en superficie ocasiona un aumento de los niveles de esta lectina en el medio extracelular, además de

conducir a los linfocitos T hacia una respuesta Th1, disminuyéndose además los niveles de IL-17.

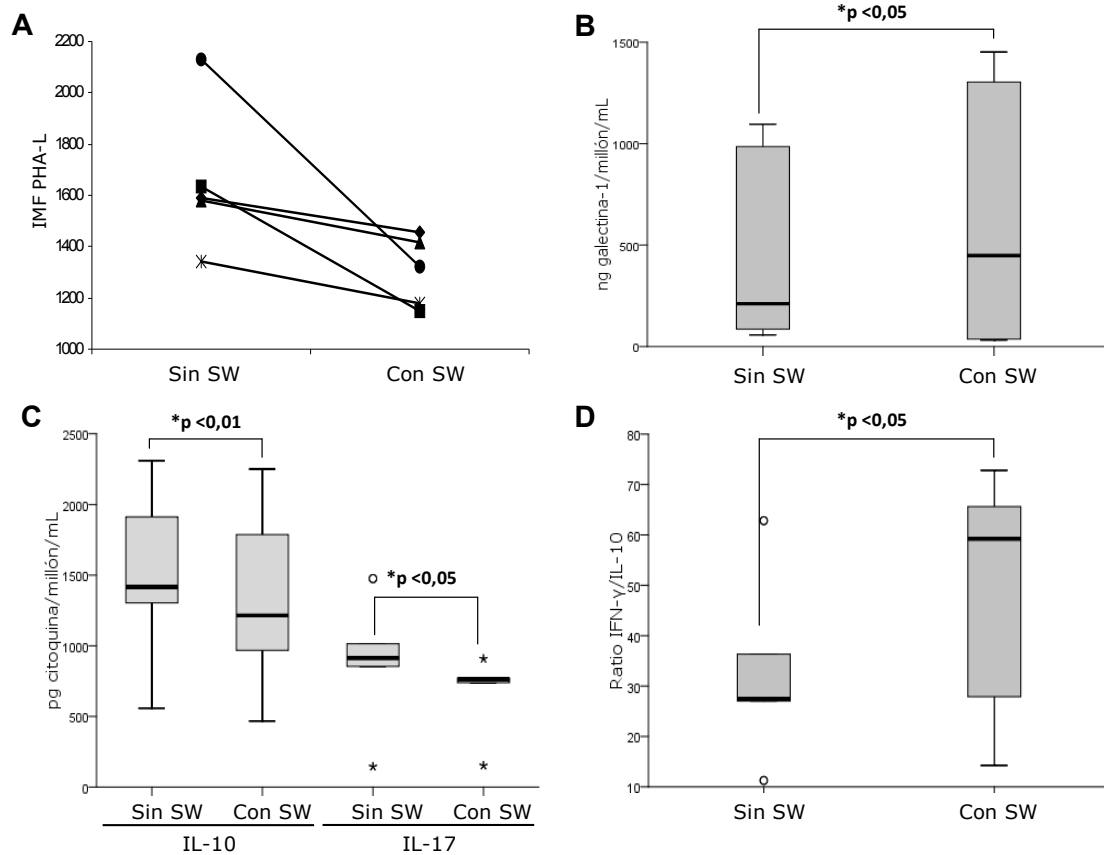


Figura 70. Efecto del inhibidor de glicosilación swainsonina en el patrón de azúcares de superficie y la producción de galectina-1 y citocinas por parte de linfocitos T. Linfocitos T CD3⁺ de controles sanos fueron cultivados en presencia (columnas “con SW”) o ausencia (columnas “sin SW”) de 200 nM de swainsonina. Al final del periodo de estimulación se determinó la tinción con la lectina PHA-L (**A**), la secreción de galectina-1 (**B**), la secreción de citocinas (**C**) y la relación de citocinas Th1/Th2 (**D**) en dichos cultivos. En **A** los símbolos representan distintos individuos. En **B**, **C** y **D** los asteriscos/círculos señalan muestras que se hallan por encima/por debajo del intervalo de confianza del 95%. La línea en las barras muestra el valor de la mediana (valores p, test de rangos de Wilcoxon).

8.6. Resumen.

Hemos demostrado que los linfocitos Th17 expresan y presentan mayores niveles de galectina-1 (intra- y extracelular) y galectina-3 (intracelular) que los linfocitos Th1 y Th2.

La cantidad de galectina-1 secretada por pacientes con diabetes tipo 1 es significativamente menor a la secretada por controles sanos, lo cual ocurre en un entorno Th1/Th17 aumentado. Hemos comprobado que existe una secreción disminuida de galectina-1 por parte de células pertenecientes a la población CD4⁻ en sujetos diabéticos. Asimismo existe un aumento de la secreción de galectina-1 en linfocitos Treg de diabéticos, la cual podría deberse a los menores niveles de esta lectina en la superficie de estas células. Además, aunque la secreción de galectina-1 por parte de linfocitos CD4⁺ en diabéticos es normal, la cantidad de galectina-1 en superficie es superior a la presentada por los controles, posiblemente debido a una menor presencia de ácido siálico en posición α 2,6; esta diferencia no es observada en el caso de los linfocitos Th17 polarizados *in vitro*, indicando que la polarización hacia este fenotipo celular es normal en estos pacientes.

Aunque el TDG no es un inhibidor específico para la galectina-1, su empleo nos permite afirmar que la inhibición de la unión a la superficie celular de proteínas con actividad de lectina provoca una disminución de la diferenciación linfocitaria hacia un fenotipo pro-inflamatorio tipo Th1 y un incremento de un fenotipo más inmunoregulador tipo Th2/Treg. Futuros estudios permitirán dilucidar cuál o cuáles de estas lectinas son las responsables del fenotipo observado en pacientes diabéticos.

La disminución de ligandos naturales para galectinas en linfocitos T ocasiona que la galectina-1, y probablemente otras lectinas, no sea capaz de unirse a la superficie celular, por lo que aumenta su concentración en el medio extracelular, ocasionando una polarización hacia un fenotipo Th1, en detrimento de una respuesta tipo Th17.

Capítulo 9:

Discusión.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

La expresión y purificación de proteínas integrales de membrana supone hoy en día un reto debido a la toxicidad que presentan dichas proteínas en los sistemas de expresión procariota habitualmente utilizados (Saida y cols. 2006). De hecho, y hasta nuestro conocimiento, no existe en la literatura ninguna descripción de la expresión de IGRP en un sistema procariota. Existen trabajos en los que la pauta abierta de lectura para IGRP ha sido empleada para transfectar células eucariotas con el fin de obtener células transfectantes utilizadas en ensayos de inmunofluorescencia o de actividad enzimática (Shieh y cols. 2004; Petrolonis y cols. 2004; Arden y cols. 1999). Asimismo, Petrolonis y cols. describen la expresión y purificación de esta proteína empleando un sistema de expresión baculoviral, si bien sólo se muestra un *western blot* en el que se aprecia poca cantidad de proteína y de baja pureza, sugiriendo un bajo rendimiento del proceso de purificación. En este trabajo, sin embargo, demostramos que este sistema es capaz de producir y purificar una mayor cantidad de IGRP con un alto grado de pureza.

La IGRP producida y purificada por estos autores fue clonada conteniendo una cola de 6 histidinas en el extremo carboxi-terminal o en el amino-terminal, observándose que la cola en amino-terminal disminuye en 10 veces su actividad. De este resultado se puede deducir que la cola en posición amino afecta de algún modo a la estructura de IGRP, pudiendo explicar la aparente falta de expresión en nuestro sistema baculoviral, ya que nuestra proteína recombinante portaba la cola de seis histidinas en dicha posición. Asimismo, hemos comprobado que la cola en amino-terminal impide de algún modo la unión de anticuerpos anti-histidinas.

Nuestra intención a la hora de purificar IGRP era obtener suficiente cantidad de proteína para desarrollar, en primer lugar, un sistema de ELISA para detectar autoanticuerpos contra ella y, en segundo lugar, analizar mediante el sistema de presentación de antígenos los epitopos procesados de manera natural a partir de IGRP. La producción de proteínas en un sistema procariótico frente a uno eucariótico presenta la ventaja principal de poder obtener grandes cantidades de la proteína de interés. En este trabajo describimos un sistema de producción procariota de IGRP basado en la combinación de tres elementos con los cuales esperamos obtener en el futuro cantidades suficientes de proteína para continuar con su caracterización como autoantígeno en la diabetes tipo 1 humana. Dichos elementos son el empleo de una cepa bacteriana muy concreta, la cepa C43 (DE3), que ofrece la ventaja de permitir la expresión de proteínas que son tóxicas para la mayoría de cepas bacterianas. El segundo elemento importante consiste en el empleo del vector pBAD, un vector diseñado para

la expresión de proteínas tóxicas ya que, a diferencia de los vectores convencionales, el promotor *AraC* de este vector permite un mejor control de la expresión basal de la proteína de interés. Finalmente, el tercer elemento del sistema lo constituye el empleo del detergente Fos-colina 12 (FC12), un detergente que permite la solubilización eficaz de dicha proteína para poder purificarla. De hecho, aunque en trabajos previos (Petrolonis y cols.) describen la purificación de IGRP constatan la inestabilidad de la proteína tras su solubilización. Nosotros hemos encontrado que el detergente Fos-colina 12 (FC12) es, de los detergentes estudiados en este trabajo, el más eficaz a la hora de solubilizar IGRP de las membranas bacterianas y mantener la proteína estable en solución. El empleo de este detergente, junto con la purificación mediante cromatografía de afinidad empleando resinas unidas a un anticuerpo que reconoce el epitopo V5 de la IGRP recombinante nos ha permitido en este trabajo el diseñar un sistema de expresión y purificación de IGRP.

Sería importante en el futuro mejorar el rendimiento de nuestro sistema (0,1 mg/L), para poder obtener anticuerpos mono- y policlonales contra esta proteína, los cuales no existen hasta el momento, con el fin de, llevar a cabo ELISAs para cuantificar los niveles de autoanticuerpos en suero y/o plasma de controles sanos y pacientes con diabetes tipo 1, así como para estudiar el procesamiento de este autoantígeno e identificar epitopos antigénicos derivados de maneral natural de IGRP.

En el presente estudio, las proteínas GFAP y S100 β producidas en *E. coli* con elevada pureza y rendimiento han sido empleadas para desarrollar un sistema de ELISA que permite una cuantificación relativa del nivel de autoanticuerpos dirigidos contra ellos en pacientes con T1DM. La presencia de autoanticuerpos contra GFAP ha sido descrita previamente en estudios de ionización por láser inducida en superficie (SELDI) y espectrometría de masas (Winer y cols. 2003). Sin embargo, no existen estudios previos sobre la detección y prevalencia de este tipo de autoanticuerpos empleando técnicas más rutinariamente empleadas en el diagnóstico clínico, como podrían ser el ELISA o el *western blot*.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que es posible detectar la presencia y cuantificar el nivel de autoanticuerpos contra GFAP tanto en pacientes con diabetes tipo 1 como con diabetes tipo 2, y que dichos autoanticuerpos persisten durante años. La sensibilidad del ELISA para anti-GFAP (24,6%) parece baja cuando es comparada con la obtenida para otros autoanticuerpos presentes en plasma de diabéticos tipo 1, como GADA o IA-2A, para los cuales se han determinado sensibilidades de un 82% y un 62-70%, respectivamente (Törn y cols. 2008). Una de las posibles razones que permiten explicar esta

diferencia es el hecho de que los ensayos en fase sólida generalmente poseen menor sensibilidad en comparación con los ensayos en fase líquida, siendo ésta una de las debilidades de nuestro ensayo (Törn y cols. 2008). Asimismo, la relativa baja prevalencia de los autoanticuerpos anti-GFAP observados por ELISA comparados con los obtenidos por SELDI (Winer y cols. 2003) podrían deberse al hecho de que los autoanticuerpos pueden haberse unido al antígeno diana en el tejido nervioso, lo cual resultaría en bajas o indetectables concentraciones del anticuerpo en plasma. Mejoras futuras que incluyan un aumento en la sensibilidad podrían permitir el uso de la detección de anticuerpos anti-GFAP por ELISA como marcadores de respuestas autoinmunes en pacientes con diabetes tipo 1. Además, se podría evaluar la presencia de estos autoanticuerpos como un marcador precoz de la enfermedad ya que serían originados en respuesta a la destrucción de las células de Schwann que rodean los islotes.

La presencia de autoanticuerpos contra GFAP ha sido descrita en diferentes condiciones neurológicas como la enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, depresión, epilepsia, esclerosis múltiple o Parkinson (Tanaka y cols. 1989; Mecocci y cols. 1995; Poletaev y cols. 2000), sugiriendo todos estos estudios una posible relación entre los títulos de autoanticuerpos y la edad, y un posible papel como marcadores de una alteración de la barrera hematoencefálica (Mecocci y cols. 1995). Nuestros resultados muestran que los títulos de autoanticuerpos anti-GFAP aumentan con el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la enfermedad. Estos niveles de anti-GFAP en pacientes diabéticos de largo recorrido parecen además estar asociados con un aumento en el número de complicaciones crónicas en estos pacientes. Estos datos nos llevaron a especular que los autoanticuerpos anti-GFAP podrían ser utilizados como marcadores de daño nervioso y/o de la barrera hematoencefálica.

La neuropatía diabética autónoma es una complicación seria y frecuente tanto en diabéticos de tipo 1 como de tipo 2; su etiología no es conocida, pero hay evidencias que sugieren que existen factores inmunológicos que pueden tener un papel importante en su desarrollo (Duchen y cols. 1980). En pacientes con diabetes tipo 1 son frecuentemente detectados autoanticuerpos contra componentes del sistema nervioso autónomo en ganglios simpáticos, médula adrenal y nervio vago, y su presencia parece estar asociada con la neuropatía autónoma (Zanone y cols. 1993; Ejksjaer y cols. 1999). La determinación de autoanticuerpos contra componentes del sistema nervioso es llevada a cabo mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta de fijación del complemento, los cuales emplean en la mayoría de los casos tejidos animales no humanos (Canal y cols. 1997). De momento no se

han identificado los antígenos específicamente reconocidos por estos autoanticuerpos detectados por fijación del complemento, pero en un estudio se detectaron dos bandas por *western blot* frente a las que sí había reactividad, una de 74 kDa en la médula adrenal y otra de 33 kDa en el nervio vago (Stroud y cols. 1997). Sin embargo la identidad de esas proteínas no ha sido investigada, y los pesos moleculares no coinciden ni con GFAP ni con S100 β . De todos modos, ya que algunos de los tejidos empleados en la técnica de fijación del complemento expresan GFAP (por ejemplo células gliales satélite presentes en ganglios simpáticos (Shi y cols. 2008), es posible que la reactividad observada por fijación del complemento en estos tejidos pueda ser dirigida, al menos en parte, contra GFAP.

Los niveles plasmáticos de autoanticuerpos contra S100 β detectados por nuestro ELISA son bajos, lo cual coincide con los resultados expuestos por otros autores (Hovsepian y cols. 2004), y no observamos diferencias en el nivel de autoanticuerpos entre controles sanos y pacientes con diabetes (tipo 1 o tipo 2), a pesar de que existen estudios que determinan que S100 β es una diana del sistema inmunológico en esta enfermedad (Winer y cols. 2003. Banwell y cols. 2008), y que otros autores han descrito la presencia de autoanticuerpos contra S100 β mediante ELISA en pacientes con enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, depresión, epilepsia, esclerosis múltiple o Parkinson (Mecocci y cols. 1995; Janković y cols. 1991; Wilhelm y cols. 2007; Poletaev y cols. 2000). Al efectuar análisis mediante *western blot* observamos que, efectivamente, tanto controles como pacientes presentan autoanticuerpos específicos contra S100 β . Sin embargo observamos que los pacientes diabéticos poseen un perfil de autoanticuerpos que aparentemente reconoce una forma truncada de S100 β , que carece como máximo de los 6 primeros aminoácidos. Es difícil explicar estos resultados, pero una de las posibilidades podría ser que el perfil de autoanticuerpos presente en pacientes con T1DM no se pueda unir eficientemente a la forma completa de la proteína empleada en este trabajo por algún tipo de impedimento estérico causado por la cola de histidinas cercana a la secuencia de S100 β , por lo que no se apreciaría reacción contra la proteína completa pero sí contra la truncada. Otra posibilidad es que la reactividad contra la proteína de pequeño tamaño observada en los *western blot* de pacientes diabéticos esté dirigida contra alguna proteína contaminante derivada de *E. coli* y presente en esa zona concreta del blot donde también se encuentre la forma truncada de S100 β que hemos detectado mediante espectrometría de masas.

Es sabido que los linfocitos B tienen un papel importante como células presentadoras de antígeno en los islotes de Langerhans durante el desarrollo de la diabetes (Serreze y cols.

1998; Tian y cols. 2006; Noorchashm y cols. 1997; Carrillo y cols. 2005), y que el tejido nervioso que rodea al islote parece ser uno de los primeros en sufrir la destrucción mediada por linfocitos T (Winer y cols. 2003). Es posible que tras la muerte de las células de Schwann se libere S100 β o péptidos derivados de ésta, generados por proteólisis inespecífica de la proteína como consecuencia de la lisis celular, y que serán diferentes de los que se generarían por procesamiento antigénico normal por parte de una CPA. Así, los linfocitos B autorreactivos presentes podrían presentar directamente estos péptidos por MHC de clase II, activando a linfocitos T autorreactivos en el nódulo linfático pancreático, lo que conllevaría en último término a la activación del linfocito B y a su paso a célula plasmática, produciendo autoanticuerpos contra ese epítipo de S100 β .

Recientemente se ha descrito que existen dos tipos de linfocitos T: tipo A, que responden frente a la proteína y a los péptidos procesados por las CPAs, y tipo B, que responden únicamente a péptidos que han sido ofrecidos de manera exógena a la CPA, pero no a ese mismo péptido obtenido por el procesamiento intracelular de la proteína. Estos péptidos serían idénticos pero tendrían diferentes conformaciones cuando se encontraran unidos a las moléculas del MHC de clase II (Pu y cols. 2002). Se ha sugerido que las células T tipo B específicas para proteínas autólogas podrían participar en la inducción de autorreactividad (Lovitch y cols. 2003; Kawamura y cols. 2008). De hecho Mohan y cols. (2010) han encontrado un tipo de linfocitos T CD4⁺ autorreactivos que reconocen un péptido antigénico derivado de la insulina cuando éste suministrado exógenamente a las CPAs, pero no cuando este mismo péptido procede del procesamiento intracelular de la insulina por parte de una CPA.

Así pues, las células B actuando como CPAs de péptidos ofrecidos de manera exógena derivados de S100 β podrían estar activando a linfocitos T autorreactivos de tipo B, lo cual acabaría activando a la propia célula B e induciéndola a producir autoanticuerpos contra ese péptido, obteniéndose un anticuerpo que será conformacionalmente diferente al obtenido a partir de ese mismo péptido procesado por la célula B.

Una de las formas para concretar la reactividad de estos autoanticuerpos dirigidos contra S100 β y observado en pacientes diabéticos podría ser el diseño de péptidos solapantes derivados de la proteína completa o el clonaje y purificación de formas truncadas de S100 β sin ninguna secuencia adicional, para su empleo en sistemas de ELISA, *western blot* y/o *dot blot*.

Mediante el uso del sistema de presentación de antígeno (SPA) descrito en este trabajo, hemos conseguido identificar 44 péptidos derivados de S100 β procesados y presentados de manera natural (PPPMN) por la molécula de histocompatibilidad DR4, la cual confiere susceptibilidad a desarrollar diabetes tipo 1. Estos PPPMN tal y como se esperaba forman grupos solapantes, agrupándose en torno a 3 regiones de S100 β hecho que, junto con la predicción *in silico*, nos ha permitido diseñar cuatro péptidos consenso para emplear en ensayos de unión a DR4 y para determinar la presencia de linfocitos T específicos para cada uno de estos péptidos mediante ELISPOT.

Los ensayos de unión y estabilidad del complejo péptido/DR4 nos han permitido determinar que el péptido consenso S100 68-92 es el que posee mayor afinidad de unión por la molécula DR4 y el que forma complejos estables. La síntesis de una librería solapante de péptidos de 15 aminoácidos de longitud nos ha permitido acotar el motivo de unión principal a DR4 de este péptido localizándolo en torno a la secuencia FEQFMAFVAMVTT. En cuanto al péptido consenso S100 6-25, que define la región I, posee una afinidad de unión a DR4 intermedia y menor que S100 68-92; en dicha región la secuencia LIDVHFQYS parece contener el motivo de unión a DR4, si bien el aumento en el número de residuos flanqueantes (PFRs) en el extremo amino-terminal parece mejorar esta afinidad. Finalmente, ni los péptidos consenso S100 21-36 y S100 25-46 ni la librería de péptidos sintetizada a partir de ellos muestran afinidad alguna por la molécula DR4. Es sabido que la afinidad por una molécula de histocompatibilidad, en este caso DR4, es determinante para que un péptido pueda ser presentado a un linfocito T y por tanto poder resultar autoantigénico; dicha afinidad determinará al mismo tiempo la estabilidad del complejo formado, ya que permitirá que el péptido permanezca durante más tiempo disponible en la superficie de una célula presentadora de antígeno (CPA) para ser reconocido por linfocitos T. De todos modos, esto no excluye que los linfocitos T CD4⁺ puedan reconocer péptidos autoantigénicos con baja afinidad por una molécula de histocompatibilidad, como son los péptidos consenso S100 21-36 y S100 25-46, ya que es un hecho establecido que muchos de los péptidos autoantigénicos descubiertos hasta la fecha poseen bajas afinidades de unión a la molécula de histocompatibilidad concreta (Gebe y cols 2003), quizás porque esta baja afinidad permite que, durante el desarrollo de linfocitos T en el timo, se seleccionen linfocitos CD4⁺ capaces de reconocer estos péptidos al no estar éstos representados en el repertorio tímico. Por esta razón, los péptidos S100 21-36 y S100 25-46 han sido también evaluados en ELISPOT.

Los resultados del ELISPOT confirman el hecho ya observado por otros autores (Arif y cols. 2004) de que los pacientes con diabetes tipo 1 muestran un fenotipo proinflamatorio de tipo Th1, ya que contra S100 β se observa una elevada respuesta frente a algunos de los péptidos ensayados, caracterizada por la elevada producción de IFN- γ (S100 6-25, S100 25-46 y S100 68-92). Sin embargo, los controles sanos presentan un fenotipo claramente inmunoregulador, ya que existe una mayor reactividad frente a algunos péptidos, especialmente frente a S100 68-92, y en menor medida frente a S100 6-25, caracterizada por la producción de IL-10. Además, los resultados de ELISPOT parecen coincidir con los obtenidos en los ensayos de unión a DR4, ya que los péptidos con mejores afinidades de unión a DR4 (S100 6-25 y S100 68-92) son los que presentan mayor inmunorreactividad.

En cuanto a la reactividad frente a estos péptidos por parte de células productoras de IL-17 las frecuencias de respuestas positivas no son estadísticamente diferentes entre controles y pacientes. Sin embargo, es muy interesante el hecho de que los índices de estimulación en los diabéticos son significativamente superiores a los obtenidos por los controles sanos, especialmente (y de nuevo) contra S100 68-92, sugiriendo un papel importante de los linfocitos Th17 en el desarrollo y evolución de la diabetes tipo 1. De hecho nosotros y otros autores (Honkanen y cols. 2010) hemos demostrado la producción de mayores niveles de IL-17 por parte de PBMCs de diabéticos tipo 1, además de demostrar estos últimos que la inmunidad tipo Th17 en los islotes de Langerhans conlleva a la apoptosis de las células de los islotes, lo cual hace hincapié en la importancia de la respuesta tipo Th17 en esta enfermedad.

Es posible entonces que sí exista una reactividad diferencial frente a estos péptidos de S100 β por parte de diabéticos produciendo IL-17, pero que la frecuencia de estas células en sangre periférica sea muy baja y los índices de estimulación no alcancen por ello valores superiores a 3. De hecho Honkanen y cols. (2010) indican que, tras la activación policlonal de PBMCs de controles y diabéticos de tipo 1 sólo el 3,53% y el 4,26 % respectivamente son células IL-17⁺ CCR6⁺. Así pues, habría que mejorar el diseño del ELISPOT para conseguir una mejor detección de estas células, quizás purificando linfocitos T CD4⁺ CCR6⁺ y realizando una pre-estimulación de dichos linfocitos con células dendríticas generadas a partir de monocitos del propio paciente como CPAs, para mejorar la estimulación y por tanto la detección de linfocitos autorreactivos Th17.

En cuanto a los PPMN de S100 β para la molécula de histocompatibilidad de clase I A2.1 hemos identificado 5 candidatos mediante la generación de una línea celular doble

transflectante que expresa A2.1 y S100 β y la posterior purificación de los péptidos presentados en superficie. Ya que normalmente los péptidos presentados por MHC de clase I han de haber sido derivados mediante degradación intracelular por parte del proteosoma, llevamos a cabo un estudio *in vitro* de los extremos carboxi-terminales más frecuentemente generados a partir de S100 β por este complejo multienzimático. Esto nos ha permitido determinar que al menos dos de nuestros péptidos candidatos sí podrían haber sido generados a partir del proteosoma (S100 10-18 y S100 20-28). Además uno de estos péptidos (S100 10-18) es capaz de unirse y estabilizar la molécula A2.1, si bien en mucha menor medida que el epitopo GILGFVFTL derivado de la proteína M1 del virus influenza A, un epitopo con muy alta afinidad por la molécula A2.1. De todas formas, y de la misma manera que para los PPPMN presentados por la molécula DR4, este hecho no impide que dichos péptidos puedan ser reconocidos por linfocitos T autorreactivos presentes en pacientes con T1DM. (Van der Burg y cols. 1996).

El siguiente paso en esta línea de investigación consiste en caracterizar la respuesta por parte de linfocitos T CD8⁺ frente a estos epitopos antigénicos, mediante experimentos de ELISPOT en controles sanos y pacientes con diabetes tipo 1 determinando la producción de IFN- γ , IL-10 e IL-17, de modo semejante a lo que se ha realizado para los PPPMN de clase II.

De todas formas, el papel de S100 β en el desarrollo de la diabetes tipo 1 y el de los linfocitos T CD8⁺ específicos para epitopos de esta proteína lo hemos comenzado con la obtención de hibridomas de linfocitos T infiltrantes de islotes de Langerhans de ratones NOD. En este trabajo se ha llevado a cabo un trabajo muy preliminar de su fenotipo y su especificidad. A pesar de que la citometría determina que todos los hibridomas son CD3⁺ CD4⁻, y que cierto número de células de los hibridomas son CD8⁺, sería importante llevar a cabo una clonación por dilución límite para obtener clones totalmente CD8⁺. También sería interesante purificar la población doble positiva CD4⁺ CD8⁺ del hibridoma IJ3, puesto que se ha demostrado que en diversas enfermedades autoinmunes (miastenia *gravis*, artritis reumatoide, esclerosis múltiple) la frecuencia de estas células dobles positivas está aumentada, así como en infecciones víricas crónicas (VIH, EBV, hepatitis crónica B y C), si bien de momento se desconoce su papel en la patogenia de estas enfermedades (Parel y cols. 2004).

Hemos observado reactividad frente a la proteína S100 β , tanto presentada de manera natural por células transflectantes como mediante adición de la proteína completa al medio de cultivo, en los hibridomas IJ3 e IJ4, y esta reactividad parece estar dirigida contra la zona amino-terminal de la proteína, una zona cuya inmunogenicidad hemos también observado en

el caso de pacientes humanos y en el contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase II. Este dato preliminar parece indicar que S100 β es un autoantígeno en el desarrollo de la enfermedad de este modelo murino, algo observado por otros investigadores (Winer y cols. 2003) lo que nos permitirá usar este modelo animal para el estudio del papel de estos linfocitos T CD8⁺ en el desarrollo de síntomas clínicos y evaluar el papel que dichos linfocitos juegan en la destrucción final de los islotes de Langerhans.

La detección en sangre periférica de linfocitos T autorreactivos específicos para proteínas propias, como por ejemplo S100 β , puede deberse en parte a una selección positiva/negativa errónea en el timo, que permitiría el escape de linfocitos T autorreactivos hacia la periferia. La galectina-1 parece desempeñar un papel importante en esta selección, induciendo la apoptosis de timocitos corticales inmaduros *in vitro* (Perillo y cols. 1997), además de contribuir a la tolerancia periférica induciendo la apoptosis de linfocitos T activados (Perillo y cols. 1995). Así pues, en la segunda parte de esta tesis doctoral decidimos evaluar si en la diabetes tipo 1 existe algún defecto en la producción y/o función de esta lectina inmunoreguladora.

La activación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes provoca la diferenciación hacia diferentes tipos funcionales de linfocitos T colaboradores (Th), responsables de la inmunidad adaptativa. Basándose en los patrones de expresión de citocinas, se han propuesto tres tipos de linfocitos T colaboradores: Th1, Th2 y Th17. Los linfocitos Th1 producen principalmente IFN- γ y median la eliminación de patógenos intracelulares, mientras que los Th2 secretan IL-4 e IL-13 y son cruciales para el control de patógenos extracelulares. Ambos subtipos se excluyen mutuamente, y una desviación temprana hacia uno de los dos subtipos impide la diferenciación hacia el otro subtipo (Mosmann y cols. 1989). La pérdida de protección frente a la autoinmunidad en ratones carentes de IFN- γ permitió concluir que debían existir otros subtipos de linfocitos Th que indujeran autoinmunidad; así pues, un nuevo subtipo de linfocitos Th productores de IL-17 fue identificado, y nombrado como Th17 (Betelli y cols. 2008). Estas células se caracterizan por la secreción de IL-17 e IL-21, y se han relacionado con procesos de inflamación tisular y patología autoinmune (Betelli y cols. 2007). Para que la respuesta inmune tenga lugar con éxito y no tenga lugar una exacerbación de la respuesta es clave la regulación a nivel de activación y posterior inducción de apoptosis en los 3 subtipos de linfocitos T colaboradores.

La galectina-1 es expresada, entre otros tipos celulares, por linfocitos T activados (Figura 63 y Blaser y cols. 1998), promoviendo *in vivo* la apoptosis de estos linfocitos T

activados (Perillo y cols. 1995), reduciendo con ello la posibilidad de una respuesta inmune desproporcionada que pudiera llevar en último término a autoinmunidad.

Se ha demostrado recientemente que la galectina-1 inhibe la síntesis de citocinas proinflamatorias al inducir la apoptosis selectiva tanto de linfocitos Th1 como Th17, pero no la de Th2 (Toscano y cols. 2007a). Este efecto ha sido demostrado mediante la adición de galectina-1 exógena, sin embargo, no está claro si los distintos subtipos de linfocitos T colaboradores contribuyen a esta regulación sintetizando esta lectina o por el contrario otras células, del sistema inmune o no, contribuyen a la síntesis de esta lectina. Nuestros resultados muestran que los linfocitos Th17 sintetizan y poseen mayores niveles de galectina-1 intra- y extracelular que los Th1 y Th2, independientemente del uso o no de IL-21 para inducir la polarización. Es posible entonces que la galectina-1 juegue un papel importante en este subtipo de linfocitos T colaboradores, bien porque su secreción impida la polarización hacia un fenotipo Th1 induciendo la apoptosis de dichas células, o bien porque actúe como un mecanismo de control de las propias Th17.

La eliminación de los ligandos potenciales de la galectina-1 (entre otras) mediante la adición de swainsonina a linfocitos T CD3⁺ provoca la liberación de la galectina-1 unida a las moléculas de superficie, hecho constatado por el aumento de la galectina-1 libre en el medio de cultivo, lo cual conlleva una desviación hacia un fenotipo Th1 (ver Figura 70 y Rabinovich y cols. 1999; Santucci y cols. 2000 y 2003), en detrimento de Th2 y Th17. Así pues la pérdida de la galectina-1 de la superficie celular lleva a que o bien la supervivencia y/o proliferación *in vitro* de las Th17 se vea afectada, debido el papel mitogénico que la galectina-1 desempeña en determinadas situaciones (Adams y cols. 1996), o bien a que exista una elevada diferenciación de estas células en estas condiciones hacia un fenotipo Th1, ya que los linfocitos Th17 parecen ser un fenotipo celular plástico capaz de diferenciación (Annunziato y cols. 2007), lo cual refuerza la idea de la importancia de la galectina-1 para los linfocitos Th17. De todos modos no hay que descartar que el efecto que otras galectinas puedan tener en los linfocitos también se vea afectado por la adición de la swainsonina, así que los resultados observados podrían no deberse únicamente a la galectina-1.

En lo que respecta a la galectina-3, hemos demostrado que también los linfocitos Th17 expresan y poseen mayores niveles de esta lectina a nivel intracelular en comparación con los subtipos Th1 y Th2, mientras que no hemos encontrado diferencias a nivel de galectina secretada al medio de cultivo. Este hecho puede explicarse en parte a que el efecto de la galectina-3 en este caso sea principalmente a nivel intracelular, lo que podría suponer un

mayor potencial antiapoptótico en linfocitos Th17 en comparación con Th1 y Th2 (Hsu y cols. 2009). Esta conclusión debe ser tomada con precaución, ya que la galectina-3 se ha cuantificado en linfocitos Th17 polarizados en presencia de IL-21, que señala a través de la cadena común del receptor de alta afinidad para IL-2, y se ha demostrado que en ratones las citocinas que señalizan a través de este receptor (como IL-2, IL-4 e IL-7) promueven la síntesis de galectina-3 (Joo y cols. 2001). Así pues es posible que artificialmente hayamos inducido la expresión de galectina-3 en linfocitos Th17. De todos modos, y ya que según ciertos autores la IL-21 es necesaria para la polarización de Th17 en humanos (Yang y cols. 2008a), quizás este aumento de síntesis de galectina-3 inducida por IL-21 en Th17 sea algo que ocurra realmente *in vivo* y no sea necesariamente un artificio.

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune órgano-específica, en la que la actividad de los linfocitos Th2 se halla disminuida (Berman y cols. 1996), mientras que existe un gran número de linfocitos Th1 secretando IFN- γ que juegan un papel importante en la destrucción de las células β productoras de insulina (Castano y cols. 1990), lo que demuestra que el equilibrio Th1/Th2 se halla desplazado a favor de Th1. En nuestro caso hemos activado policlonalmente PBMCs de pacientes diabéticos, comprobando que efectivamente se detectan mayores niveles de IFN- γ y menores niveles de IL-10 respecto de los controles, por lo que la relación IFN- γ /IL-10 está significativamente aumentada.

Hemos cuantificado además citocinas típicas de Th17 como IL-17 e IL-21, ya que existen estudios que sugieren una respuesta tipo Th17 aumentada en diabetes tipo 1 (Honkanen y cols. 2010). Efectivamente, y al igual que Honkanen y cols., hemos detectado niveles superiores de IL-17 en PBMCs de diabéticos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en el caso de PBMCs sin estimular, mientras que tras la estimulación muchos más sujetos control en comparación con los diabéticos presentan niveles por debajo del límite de detección. Hemos cuantificado además IL-21, citocina secretada por las células Th17 y que posee un papel clave en el mantenimiento de dichas células (Nurieva y cols. 2007), inhibiéndose el desarrollo de la diabetes en NOD al neutralizar esta citocina (McGuire y cols. 2011). Los PBMCs de pacientes diabéticos secretan mayores niveles de IL-21 tras la activación policlonal que los controles sanos, y mayor porcentaje de diabéticos está por encima del límite de detección respecto de controles sanos cuando no se estimula. Este aumento en IL-21 podría explicar los niveles también elevados de IL-17, ya que la IL-21 actuaría fortaleciendo la supervivencia de los linfocitos Th17. En este ambiente de citocinas

desequilibrado a favor de Th1 y Th17 es en donde detectamos una menor secreción de galectina-1 y galectina-3 por parte de PBMCs de pacientes con diabetes tipo 1.

Aunque existen un gran número de estudios acerca del papel de las galectinas en el desarrollo de la respuesta inmune, poco se conoce sobre el papel de estas lectinas en la diabetes tipo 1, o sobre cómo el tipo de respuesta inmune influye en la síntesis de estas moléculas. Nosotros hemos observado que la activación de PBMCs induce la secreción de galectina-1 y galectina-3, y que además los PBMCs estimulados de pacientes con diabetes tipo 1 secretan niveles significativamente menores de ambas lectinas cuando son comparados con PBMCs de controles; en el caso de la galectina-1 estas diferencias existen incluso a nivel basal en PBMCs sin estimular. Así pues parece haber una deficiencia en la secreción de galectina-1 y -3 en pacientes diabéticos, hecho que ocurre en otras enfermedades autoinmunes, como la galectina-3 y la enfermedad de Crohn (Jensen-Jarolim y cols. 2002). La galectina-3 extracelular inhibe la secreción de IL-12 por parte de células dendríticas impidiendo la polarización de linfocitos T CD4⁺ vírgenes hacia un fenotipo Th1 y favoreciendo la diferenciación hacia un fenotipo Th2. La menor cantidad de galectina-3 producida por PBMCs de diabéticos posiblemente no sea suficiente para impedir la secreción de IL-12, favoreciéndose la polarización hacia una respuesta proinflamatoria Th1 en detrimento de una respuesta inmunorreguladora tipo Th2 (Bernardes y cols. 2006).

Con el fin de conocer qué población de las contenidas en los PBMCs era la defectiva en la secreción de galectina-1 cuantificamos la galectina-1 secretada por linfocitos T CD4⁺, linfocitos Th17 diferenciados *in vitro*, linfocitos Treg y células CD4⁻. Así, ni los linfocitos CD4⁺ ni los Th17 presentan secreción defectiva de galectina-1 en pacientes con diabetes tipo 1, mientras que la producción por parte de los linfocitos Treg se halla aumentada. Sorprendentemente son las células CD4⁻, conteniendo principalmente monocitos, linfocitos B y linfocitos T CD8⁺, las que presentan una secreción disminuida de galectina-1 en diabéticos.

Estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio (datos no mostrados) muestran que, de los distintos tipos celulares presentes en la población CD4⁻, son los monocitos los que mayores niveles de galectina-1 secretan (\approx 2.000 ng/mL) en comparación con linfocitos B (\approx 300 ng/mL) y linfocitos T CD8⁺ (\approx 30 ng/mL). Cuando se compara la secreción de galectina-1 por parte de estos tres tipos celulares en controles sanos y pacientes con diabetes tipo 1 se observa una secreción claramente disminuida por parte de los monocitos, por lo que podemos concluir que es éste el tipo celular responsable de la secreción disminuida de galectina-1 observada en estos pacientes. Es sabido que la galectina-1 desactiva

los macrófagos activados (Rabinovich y cols. 2007) de forma que niveles reducidos de galectina-1 podrían favorecer la activación prolongada de estas células con posible destrucción tisular.

Tras la estimulación antigénica, los ratones *knockout* para galectina-1 producen mayores niveles de IFN- γ , IL-2 e IL-17, y niveles similares de IL-5 e IL-10 en comparación con ratones normales (Toscano y cols. 2007a), resultados que coinciden con la idea de que la galectina-1 endógena controla la supervivencia y expansión de linfocitos Th1 y Th17 *in vivo*, por lo que su deficiencia conllevaría asociada una mayor susceptibilidad a padecer neuroinflamación (Toscano y cols. 2007a). Así pues el ambiente defectivo en galectina-1 presente en pacientes diabéticos de tipo 1 debido a la deficiente secreción por parte de células CD4⁺ (previsiblemente monocitos) podría estar desviando la respuesta inmune a favor de Th1 y Th17 en estos sujetos

En función de su concentración, la galectina-1 juega un papel dual pudiendo inducir proliferación o apoptosis (Adams y cols. 1996). Al igual que su concentración, su estado redox (Outenreath y cols. 1992), su estructura (monómero u homodímero; Perillo y cols. 1995; Cho y cols. 1995) o su localización (intra- o extracelular; Camby y cols. 2006) parecen determinar el papel que juega esta lectina en el desarrollo de la respuesta inmune, favoreciendo la supervivencia linfocitaria o por el contrario su apoptosis.

Algunos autores (Toscano y cols. 2007a) han afirmado que la galectina-1 soluble es apoptótica para los linfocitos T activados, especialmente para Th1 y Th17; sin embargo, en su estudio la galectina-1 fue añadida de modo exógeno a unas concentraciones (75-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que son más de 100 veces superiores a las concentraciones máximas detectadas *in vitro* por nosotros (máximo de 0,77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las células CD4⁺ de controles sanos) y por otros autores (He y cols. 2004). Estos últimos demostraron que la galectina-1 soluble no es muy eficaz a la hora de desencadenar la apoptosis de células T activadas, al menos *in vitro*. De hecho, estos autores demuestran que la galectina-1 induce más efectivamente la apoptosis cuando se encuentra unida a la matriz extracelular (MEC), ya que la matriz presenta esta proteína de un modo bidimensional, una conformación en la que es reconocida más eficazmente por las células T activadas sufriendo entonces apoptosis y llevando en último término a una regulación a la baja de la respuesta inmune. Así, las concentraciones de galectina-1 requeridas para provocar la apoptosis cuando ésta se halla unida a la MEC son como mínimo 10 veces inferiores respecto de la galectina-1 soluble. Otro estudio (Allen y cols. 1990) afirma que

elevadas cantidades de galectina-1 unida a la superficie celular generan enlaces cruzados entre glicoproteínas, reduciendo la habilidad de la célula para unirse a la MEC.

Nosotros hemos observado que los linfocitos T CD4⁺ activados de pacientes con diabetes tipo 1 presentan mayor cantidad de galectina-1 unida a la superficie celular respecto de los controles sanos. Así pues, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos por otros autores hemos propuesto un modelo (Figura 71) para explicar el papel que podría jugar la galectina-1 en el desarrollo de la respuesta autoinmune observada en pacientes con T1DM. En individuos sanos (Figura 71A) los linfocitos T CD4⁺ activados presentan un determinado nivel de ligandos para galectina-1 en superficie, y secretan una pequeña cantidad de esta lectina, uniéndose parte de ella a la superficie celular. Por otra parte células de la población CD4⁻ secretan grandes cantidades de galectina-1, parte de la cual acaba por unirse a la MEC, conformando una estructura bidimensional de galectina-1 tal y como han descrito He y cols. Los azúcares libres de los linfocitos T les permiten unirse a la galectina-1 de la MEC, produciéndose la apoptosis de estos linfocitos T activados, limitándose con ello la respuesta inmune.

Por el contrario, las células CD4⁺ activadas de pacientes diabéticos (Figura 71B) secretan aproximadamente los mismos niveles de galectina-1 que los controles sanos, pero la presencia de grandes cantidades de ligandos para la galectina-1 en superficie ocasiona que mucha más galectina-1 se una al glicocáliz, lo cual probablemente sea debido a que estas glicoproteínas contienen menores cantidades de ácido siálico en posición α 2,6, que impide la unión de la galectina-1, lo que viene indicado por la elevada tinción con PHA-L con respecto de los controles sanos (Zhuo y cols. 2010). Así, al aumentarse el nivel de enlaces cruzados entre glicoproteínas el linfocito no podrá unirse a la MEC y no se inducirá apoptosis. Por otra parte, aunque alguno de los linfocitos se pudiera unir a la MEC, las células de la población CD4⁻ de diabéticos secretan menor cantidad de galectina-1, por lo que la MEC tendrá menos galectina-1 unida permitiendo que estos linfocitos puedan eventualmente escapar de una muerte por apoptosis. Finalmente, concentraciones bajas de galectina-1 soluble impiden la adhesión a la MEC mediada por IL-2 (Rabinovich y cols. 1999), otro mecanismo más que contribuiría a impedir la apoptosis de los linfocitos CD4⁺ activados, manteniéndose entonces la respuesta inmune.

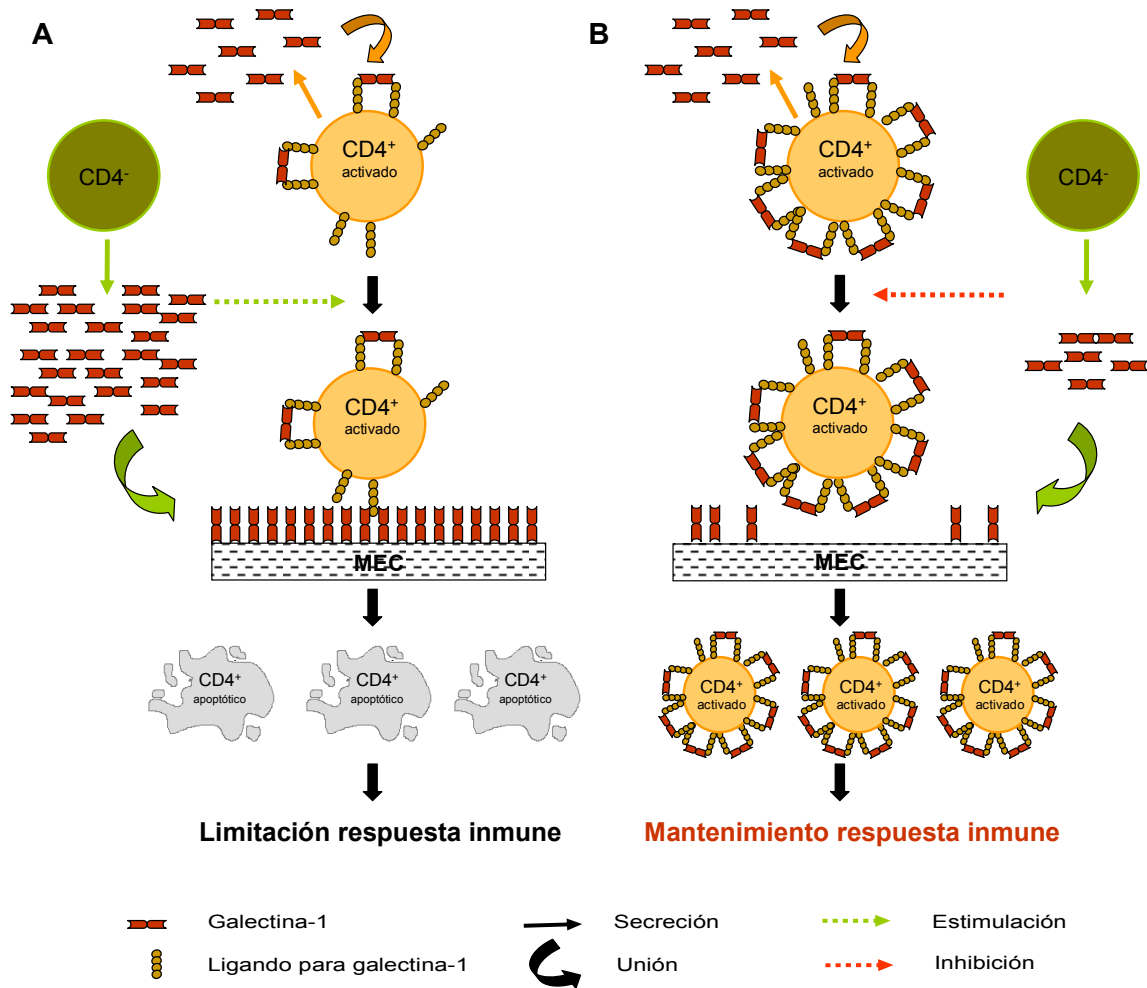


Figura 71. Modelo propuesto del papel de la galectina-1 en el desarrollo de la T1DM. A. En personas sanas, los linfocitos T $CD4^+$ activados secretan galectina-1, parte de la cual se une a los ligandos presentes en la superficie celular. Las células $CD4^-$, como monocitos, secretan niveles mucho mayores de galectina-1, parte de la cual se uniría a la matriz extracelular (MEC). Cuando los ligandos libres en linfocitos T $CD4^+$ se unen a la galectina-1 presente en la MEC se desencadenan una serie de señales que llevan en último término a la apoptosis del linfocito, limitándose la respuesta inmune. **B.** En pacientes diabéticos, los linfocitos T $CD4^+$ activados secretan cantidades de galectina-1 similares a las observadas en personas sanas, pero la presencia de un mayor número de ligandos para esta lectina provoca que ésta se una a la superficie celular, estableciéndose enlaces cruzados entre las glicoproteínas e impidiéndose con ello la unión a la MEC. Por otra parte, células $CD4^-$ como los monocitos secretan mucha menos galectina-1, por lo que la cantidad de esta lectina unida a la MEC sería mucho menor, lo que conllevaría a una supervivencia prolongada del linfocito T $CD4^+$ activado, manteniéndose en último término la respuesta inmune y la posibilidad de daño tisular en estos pacientes.

El hecho de que las células inmunes estén ejerciendo su función en un ambiente defectivo en galectina-1 puede influenciar el comportamiento de otras células además de los linfocitos T $CD4^+$. Por ejemplo, es conocido que las células dendríticas diferenciadas en presencia de galectina-1 adquieren un fenotipo regulador, promoviendo entonces la tolerancia de células T y terminando la inflamación autoinmune a través de mecanismos en los que

intervienen la IL-27 y la IL-10. Así pues es posible especular que el ambiente defectivo en galectina-1 descrito en pacientes diabéticos y causado por la población CD4⁻ pueda modificar el comportamiento de las células dendríticas, reduciendo su habilidad para terminar la inflamación autoinmune (Ilarregui y cols. 2009). Además las propias células dendríticas también pueden expresar galectina-1, induciendo en ese caso la apoptosis de linfocitos T activados (Perone y cols. 2006b), mecanismo que podría entonces estar alterado en diabéticos. La importancia de la galectina-1 para las células dendríticas viene subrayada por el hecho de que células dendríticas que sobre-expresan galectina-1 pueden retrasar la aparición de la diabetes autoinmune en ratones NOD así como disminuir el grado de insulinitis (Perone y cols. 2006a).

Los linfocitos T reguladores desempeñan un papel importante en la regulación del sistema inmune. En lo que respecta a la diabetes tipo 1 hay autores que sugieren que en pacientes diabéticos existe un menor número de linfocitos T reguladores respecto de controles sanos, lo que podría explicar en parte la falta de regulación de su respuesta inmune (Kukreja y cols. 2002). Sin embargo tanto nosotros como otros autores no hemos detectado diferencias en la frecuencia de aparición de estos linfocitos Treg (controles sanos 2,1% ± 0,8%; pacientes diabéticos: 2,4% ± 0,6%; media ± desviación estándar) (Lindley y cols. 2005; Putnam y cols. 2005; Brusko y cols. 2005 y 2007; Tree y cols. 2006). De hecho actualmente se propone que, si bien el número de linfocitos Treg es normal, la función supresora de éstos se halla disminuida (Lindley y cols. 2005; Brusko y cols. 2005).

Se sabe que al menos parte de la acción supresora de los Treg viene mediada por la galectina-1 unida a la superficie de estas células, que les permite establecer enlaces cruzados entre los receptores glucoproteicos de las células diana, conduciendo a la supresión de la respuesta inmune (Garín y cols. 2007). Teniendo en cuenta estos resultados previos descritos por otros autores, y los resultados obtenidos por nosotros en lo que respecta a la producción de galectina-1 por parte de linfocitos Treg, hemos propuesto el modelo de la Figura 72 para explicar el papel de la galectina-1 en el funcionamiento de linfocitos Treg a la hora de regular la respuesta inmune.

En controles sanos (Figura 72A), los linfocitos Treg secretan galectina-1 (en concordancia con lo expuesto por Garín y cols. 2006) y parte de ella permanece unida a superficie celular, donde interacciona mediante contacto célula-célula con las glicoproteínas de linfocitos T CD4⁺ activados, llevando a cabo enlaces cruzados entre ellas e induciendo apoptosis, suprimiendo con ello la respuesta inmune. Sin embargo en diabéticos (Figura 72B)

por alguna razón la galectina-1 no es capaz de permanecer unida a la superficie, hecho constatado en nuestros experimentos por la menor tinción en superficie y la mayor cantidad de galectina-1 libre detectada en el medio de cultivo por ELISA. Así el papel supresor de los linfocitos Treg se vería claramente afectado, ya que no se establecerían enlaces cruzados entre glicoproteínas en el linfocito T CD4⁺ y éste permanece activado, manteniéndose la respuesta inmune, con la consiguiente posibilidad del desarrollo de una respuesta autoinmune. Así pues, los niveles y distribución de galectina-1 detectados en este trabajo podrían explicar, al menos en parte, la pérdida de poder supresor presente en los linfocitos Treg de diabéticos observada por diversos grupos de investigación.

Hemos descrito además que en controles sanos existe una elevada correlación directa entre niveles de galectina-1 de superficie y CD25 en linfocitos Treg, lo cual coincide con lo expuesto por Garín y cols. (2007) acerca de que los linfocitos Treg, que son los que mayores niveles de CD25 expresan, expresan grandes cantidades de galectina-1. En pacientes diabéticos esta relación es inversa, lo cual apoya la idea de que son los linfocitos Treg (los CD25^{alto}), y no otras células activadas CD25⁺ que pudiéramos haber copurificado, los que presentan una cantidad disminuida de galectina-1 en superficie.

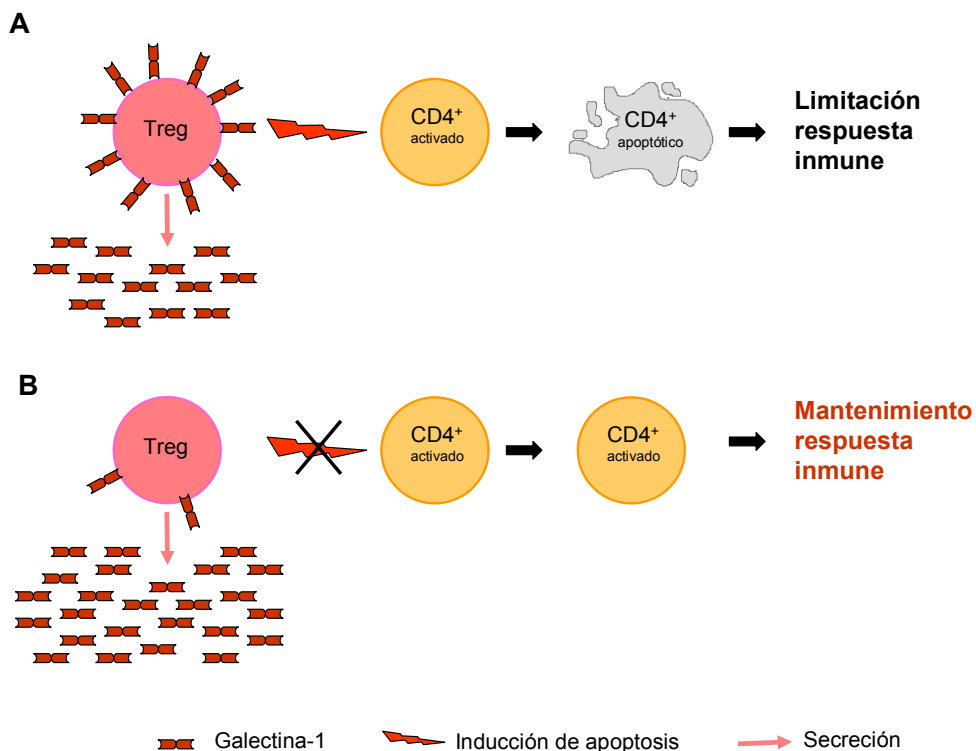


Figura 72. Modelo sobre el papel de la galectina-1 sobre la función de los linfocitos T reguladores (Treg) en la diabetes. A. En personas sanas, los linfocitos Treg presentan grandes cantidades de galectina-1 unida a su superficie, secretando además al medio extracelular cantidades importantes de esta lectina. Cuando el linfocito Treg encuentra un linfocito T CD4⁺ activado se une a

él, estableciendo gracias a la galectina-1 presente en el linfocito Treg enlaces cruzados entre los receptores de superficie del linfocito T CD4⁺ activado induciendo su eliminación por apoptosis y limitando con ello la respuesta inmune. **B.** En el paciente diabético, por el contrario, los linfocitos Treg presentan niveles reducidos de galectina-1 en la superficie (lo que aumentaría la cantidad de galectina-1 extracelular y explicaría la diferencia encontrada con personas sanas). Esta carencia de galectina-1 en superficie impide que los Treg establezcan enlaces cruzados entre glicoproteínas de la superficie de linfocitos T CD4⁺ activados, enlaces que son determinantes para inducir la apoptosis, permitiéndose entonces la supervivencia del linfocito y manteniéndose la respuesta inmune con posible daño tisular.

Las causas que conducen a esta pérdida de poder supresor por parte de los Treg de diabéticos mediada por galectina-1 podrían ser diversas: por una parte es posible que el patrón de azúcares de superficie sea diferente en pacientes diabéticos respecto de controles (patrón que ya hemos demostrado ser diferente al menos en linfocitos T CD4⁺), y que ese nuevo patrón impida la unión de galectina-1 a la superficie celular, si bien nosotros no hemos detectado diferencias en lo que a tinción con PHA-L se refiere. Por otro lado hemos detectado una mayor secreción de IL-17 por parte de linfocitos Treg de diabéticos, y ya que recientemente se ha indicado la posibilidad de que los linfocitos Treg sean un tipo celular plástico capaz de convertirse a un fenotipo tipo Th17 en condiciones proinflamatorias y con niveles reducidos de TGF- β (Xu y cols. 2007), es posible que el ambiente proinflamatorio y con bajos niveles de TGF- β descrito en la T1D (Azar y cols. 2000) induzca a las células Treg a convertirse en Th17, que según hemos observado poseen mucha menos galectina-1 en superficie respecto de las Treg, disminuyéndose su capacidad supresora.

Sería entonces de interés estudiar el patrón de azúcares de superficie de linfocitos Treg de pacientes diabéticos para comprobar si el problema radica en la no unión de la galectina-1 a la superficie más que a un cambio en el fenotipo de las células Treg. Habría también que caracterizar la población Treg que presenta galectina-1 de superficie disminuida, mediante tinción para IL-17, ROR γ (t), FOXP3, CCR6 y/o otros marcadores, con el fin de determinar si realmente ha tenido lugar la conversión de Treg a Th17.

Sorprendentemente, tanto los linfocitos T CD4⁺ como los Th17 polarizados *in vitro* en diabéticos secretan menores cantidades de IL-17 respecto de los controles sanos. Se ha demostrado recientemente que cuando linfocitos Th17 autorreactivos para antígenos del islote y diferenciados *in vitro* fueron transferidos a ratones NOD.scid estos animales desarrollaron rápidamente diabetes, y cuando las células introducidas fueron recuperadas se observó que éstas producían predominantemente IFN- γ , en detrimento de IL-17, indicando que aunque los linfocitos Th17 promueven la inflamación pancreática sólo son capaces de inducir diabetes tras su conversión a Th1 (Martin-Orozco y cols. 2009; Bending y cols 2009). Esto explicaría

por qué los linfocitos CD4⁺ de diabéticos producen menos IL-17, ya que es posible que las células Th17 hayan pasado a ser Th1, produciendo niveles mayores de IFN- γ y menores de IL-17. Esto explicaría también por qué los Th17 diferenciados *in vitro* producen menos IL-17; estos linfocitos, a diferencia de nuestros experimentos previos de polarización, no han sido diferenciados a partir de linfocitos T CD4⁺ vírgenes, sino directamente de linfocitos CD4⁺, células que en diabéticos ya están desviadas hacia Th1, por lo que las condiciones de polarización establecidas por nosotros (IL-1 β e IL-23) se ven alteradas por la presencia de citocinas proinflamatorias producidas por los linfocitos Th1. Para determinar entonces el comportamiento real de los linfocitos Th17 de diabéticos sería necesario aislar linfocitos T CD4⁺ vírgenes y polarizarlos hacia Th17. También se podría analizar mediante citometría de flujo la población CD4⁺ CCR6⁺ ROR γ (t)⁺ y determinar en ella el patrón de citocinas y de galectina-1, ya que ésta sería la verdadera población de células Th17, resultando entonces innecesaria la polarización *in vitro*. Experimentos en esta última línea están actualmente siendo llevados a cabo en nuestro laboratorio, y resultados preliminares parecen indicar que los linfocitos CD4⁺ CCR6⁺ ROR γ (t)⁺ de pacientes con diabetes tipo 1 presentan menores niveles de galectina-1 total (intracelular y de superficie) en comparación con controles sanos.

Un hecho destacable es la mayor producción de IL-10 por parte de linfocitos Th17 de diabéticos, citocina que puede ser producida por este subtipo celular y que estudios recientes sugieren que actúa limitando los efectos patológicos de las mismas Th17 que la producen (McGeachy y cols. 2007), por lo que es posible pensar que la secreción de IL-10 detectada por nosotros actúe como un mecanismo de control negativo para limitar la proliferación de Th17 en diabéticos. Además se ha demostrado que la IL-23, empleada en las polarizaciones, induce no sólo la secreción de IL-17 sino también la de IL-10 (Vanden Eijnden y cols. 2005), reforzando la idea de la existencia de este mecanismo de control negativo, que parece estar especialmente activado en diabéticos.

El tiodigalactósido (TDG) compite con la galectina-1, y posiblemente con otras galectinas, a la hora de unirse a las glicoproteínas (Bianchet y cols. 2000). Sería de esperar que la adición de este inhibidor favoreciera una respuesta tipo Th1, al no poder unirse la galectina-1 a la superficie, sin embargo lo que se produce es un desplazamiento hacia un fenotipo inmunorregulador tipo Th2/Treg, en detrimento del fenotipo proinflamatorio tipo Th1 esperado. Estudios posteriores permitirán determinar qué otras lectinas poseen el mismo ligando que la galectina-1, permitiendo conocer qué galectinas son causantes del efecto observado. Una alternativa sería emplear anticuerpos neutralizantes contra galectina-1, o

ARN interferente, para bloquear de un modo más específico la galectina-1, y observar qué efectos son realmente causados por la ausencia de esta lectina y no por la combinación de la ausencia de otras lectinas. Curiosamente en los pacientes diabéticos sí aumenta la producción de IL-17 al añadir el inhibidor TDG.

Así pues, hemos propuesto un modelo que explica la resistencia de los linfocitos T CD4⁺ activados de diabéticos a la apoptosis mediada por galectina-1, así como la disminución del poder supresor de Treg y la secreción defectiva de galectina-1 por parte de células de la población CD4⁻ (monocitos, linfocitos B y/o linfocitos T CD8⁺, observadas en pacientes con diabetes tipo 1. Posteriores estudios de caracterización fenotípica de la población de linfocitos Treg que presenta menor galectina-1 de superficie y de la población Th17 presente de manera natural en los PBMCs de diabéticos nos conducirán a un mejor conocimiento del papel de la galectina-1 en el desarrollo de la diabetes tipo 1 humana.

Conclusiones.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

- 1) Se ha clonado, expresado y purificado con éxito los autoantígenos IGRP, GFAP y S100 β .
- 2) Se han desarrollado dos sistemas de ELISA para la detección de autoanticuerpos contra GFAP y S100 β . En el caso de GFAP, el ELISA posee una sensibilidad del 24,6%, una especificidad del 98,9% y un valor predictivo positivo del 94,7% y se observan diferencias en los niveles de autoanticuerpos entre personas sanas y pacientes con diabetes tipo 1. Los niveles de autoanticuerpos correlacionan positivamente con el tiempo transcurrido desde el diagnóstico. No se han encontrado diferencias en los niveles de autoanticuerpos para S100 β , si bien parecen existir anticuerpos en el suero de pacientes diabéticos contra una forma truncada de la proteína S100 β empleada en este estudio.
- 3) Hemos identificado 44 PPPMN derivados de S100 β , agrupados en tres regiones de la proteína y presentados de manera natural por HLA-DRB1*04:01. Se han sintetizado 4 péptidos consenso a partir de dicha información y se ha evaluado su afinidad de unión y estabilización respecto a DR4, resultando ser S100 68-92 y, en menor medida, S100 6-25 los péptidos con mayor afinidad por esta molécula de histocompatibilidad que confiere susceptibilidad a la T1DM. La respuesta linfocitaria frente a estos epitopos peptídicos, especialmente S100 68-92, en pacientes diabéticos presenta un fenotipo proinflamatorio secretando IFN- γ e IL-17 (Th1/Th17), mientras que en personas sanas dicha respuesta frente al mismo epitopo presenta un fenotipo claramente inmunorregulador secretando grandes cantidades de IL-10.
- 4) Hemos identificado 5 PPPMN derivados de S100 β presentados de manera natural por HLA-A*02:01. De todos ellos, S100 10-18 y S100 20-28 podrían haber sido generados por el proteosoma *in vivo* y sólo S100 10-18 posee afinidad, aunque muy baja, por A*0201.
- 5) Se han generado 7 hibridomas de linfocitos T, de los cuales 2 de ellos reconocen S100 β en el contexto de H2-K^d, siendo clave en este reconocimiento el segmento amino-terminal.
- 6) Hemos demostrado que los linfocitos Th17 expresan *in vitro* mayores niveles de galectina-1 y -3 en comparación con linfocitos Th1 y Th2. Las células CD4⁻ de diabéticos secretan menores cantidades de galectina-1 respecto de controles sanos, favoreciendo potencialmente una respuesta tipo Th1. Los linfocitos CD4⁺ de pacientes presentan mayores niveles de galectina-1 en superficie lo que podría impedir la apoptosis de estas células. Los linfocitos Treg, si bien en número semejante al del observado en controles sanos, presentan en pacientes diabéticos menores niveles de galectina-1 de superficie, proteína que es importante

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

para la correcta función supresora de estas células. En conjunto, todos estos datos indican una alteración en la síntesis de galectina-1 por parte de células inmunes en la diabetes tipo 1, lo que podría afectar al tipo de respuesta linfocitaria en estos pacientes, favoreciendo una respuesta pro-inflamatoria de tipo Th1.

Publicaciones derivadas de la investigación.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

- **Gómez-Touriño I, Camiña-Darriba F, Otero-Romero I, Rodríguez MA, Hernández-Fernández A, González-Fernández A, Pena-González E, Rodríguez J, Rodríguez-Segade S, Varela-Calvino R.** Autoantibodies to glial fibrillary acid protein and S100beta in diabetic patients. *Diabet Med.* 2010 Feb; 27(2):246-8.
- **Gómez-Touriño I, Sánchez-Espinel C, Hernández-Fernández A, González-Fernández A, Pena-González E, Rodríguez J, García-López JM, Varela-Calviño R.** Th17 and reduced Th1 polarisation conditions favour the synthesis of galectin-1: case of human type 1 diabetes. *Cellular immunology* (en prensa).
- **Solicitud de patente de invención:**
 - Inventores: Rubén Varela Calviño e Iria Gómez Touriño.
 - Solicitante: Universidad de Santiago de Compostela.
 - Título: Péptido antigénico aislado derivado de la proteína S100-beta, procedimiento de identificación y su uso en la prevención, tratamiento, diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes tipo 1.
 - Número de solicitud: P20113106, 17/06/11.
 - País: España.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

Bibliografía.

Caracterización de autoantígenos en la diabetes tipo 1. Papel de las galectinas en la etiopatogenia de la enfermedad.

- Aanstoot HJ, Kang SM, Kim J, Lindsay LA, Roll U, Knip M, Atkinson M, Mose-Larsen P, Fey S, Ludvigsson J, Landin L, Bruining J, Maclaren N, Akerblom HK, Baekkeskov S.** Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *J Clin Invest.* 1996 Jun 15;97(12):2772-83.
- Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S.** *Inmunología celular y molecular.* 6ª ed. Editorial Elsevier Saunders. 2008.
- Adams L, Scott GK, Weinberg CS.** Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1, *Biochim. Biophys. Acta.* 2 (1996) 137-144.
- Adorini L, Penna G.** Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008 Aug;4(8):404-12. Epub 2008 Jul 1.
- Aguilar MI.** HPLC of peptides and proteins. *Methods and protocols.* 1ª Ed. (2004). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 251. Humana Press.
- Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF.** Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology.* 2004; 14:817-25.
- Alexander, WS.** Progressive fibrinoid degeneration of fibrillary astrocytes associated with mental retardation in a hydrocephalic infant. *Brain* 1949; 72: 373-81.
- Alexopoulos H, Dalakas MC.** A critical update on the immunopathogenesis of Stiff Person Syndrome. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40:1018-25.
- Allen HJ, Sucato D, Woynarowska B, Gottstine S, Sharma A, Bernacki RJ.** Role of galaptin in ovarian carcinoma adhesion to extracellular matrix in vitro. *J Cell Biochem.* 1990 May; 43(1):43-57.
- American Diabetes Association.** <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/genetics-of-diabetes.html>.
- Anderson MS, Bluestone JA.** The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 447-85.
- Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier MC, Polychronakos C.** A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem.* 2002 Nov 29;277(48):46478-86. Epub 2002 Sep 19.
- Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S.** Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6; 204(8):1849-61. Epub 2007 Jul 16.
- Ansel KM, Djuretic I, Tanasa B, Rao A.** Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:607-656.
- Arden SD, Zahn T, Steegers S, Webb S, Bergman B, O'Brien RM, Hutton JC.** Molecular cloning of a pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Diabetes.* 1999 Mar; 48(3):531-42.
- Arechaga I, Miroux B, Karrasch S, Huijbregts R, de Kruijff B, Runswick MJ, Walker JE.** Characterisation of new intracellular membranes in *Escherichia coli* accompanying large scale over-production of the b subunit of F1Fo ATP synthase. *FEBS Letters.* 2000 482: 215-219.

Arif S, Moore F, Marks K, Bouckenoghe T, Dayan CM, Planas R, Vives-Pi M, Powrie J, Tree T, Marchetti P, Huang GC, Gurzov EN, Pujol-Borrell R, Eizirik DL, Peakman M. Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated β -cell death. *Diabetes* 2011. DOI: 10.2337/db10-1643.

Arif S, Tree TI, Astill TP, Tremble JM, Bishop AJ, Dayan CM, Roep BO, Peakman M. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J Clin Invest* 2004; 113:451–63.

Arnold PY, La Gruta NL, Miller T, Vignali KM, Adams PS, Woodland DL, Vignali DA. The majority of immunogenic epitopes generate CD4⁺ T cells that are dependent on MHC class II-bound peptide-flanking residues. *J Immunol* 2002; 169:739-749.

Asemissen AM, Haase D, Stevanovic S, Bauer S, Busse A, Thiel E, Rammensee HG, Keilholz U, Scheibenbogen C. Identification of an immunogenic HLA-A*0201-binding T-cell epitope of the transcription factor PAX2. *J Immunother*. 2009 May; 32(4):370-5.

Atkinson MA, Bowman MA, Kao KJ, Campbell L, Dush PJ, Shah SC, Simell O, Maclaren NK. Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med*. 1993 Dec 16;329(25):1853-8.

Azar ST, Salti I, Zantout MS, Major S. Alterations in plasma transforming growth factor beta in normoalbuminuric type 1 and type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Dec; 85(12):4680-2.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19; 347(12):911-20.

Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*. 1990 Sep 13;347(6289):151-6.

Banwell B, Bar-Or A, Cheung R, Kennedy J, Krupp LB, Becker DJ, Dosch HM; Wadsworth Pediatric Multiple Sclerosis Study Group. Abnormal T-cell reactivities in childhood inflammatory demyelinating disease and type 1 diabetes. *Ann Neurol*. 2008; 63:98-111.

Barondes SH, Castronovo V, Coopera DNW, Cummings RD, Drickamer K, Felzi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, Leffler H, Liu FT, Lotan R, Mercurio AM, Monsigny M, Pillai S, Poirer F, Raz A, Rigby PWJ, Rini JM, Wang JL. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994; 25; 76:597-8.

Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, Martins B, Andreia R, Viana JF, Crespo F, Vasconcelos C, Ferreira C, Vicente AM. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet*. 2004 Aug;12(8):620-6.

Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS; Type 1 Diabetes Genetics Consortium. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2009 Jun;41(6):703-7. Epub 2009 May 10.

Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, Ilarregui JM, Toscano MA, Bianco GA, Isturiz MA, Rabinovich GA. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive

immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J Immunol.* 2007; 178: 436-45.

Bartnes K, Leon F, Briand JP, Travers PJ, Hannestad K. N-terminal elongation of a peptide determinant beyond the first primary anchor improves binding to H-2 I-Ad and HLA-DR1 by backbone-dependent and aromatic side chain-dependent interactions, respectively. *Eur. J. Immunol.* 1999; 29:189–195.

Baum LG, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, Hoffmann D, Emmanouilides CE, Territo MC, Baldwin GC. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin Immunol.* 2003; 109: 295-307.

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet.* 2004 Aug;75(2):330-7. Epub 2004 Jun 18.

Bending D, De la Peña H, Veldhoen M, Phillips JM, Uyttenhove C, Stockinger B, Cooke A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* 2009;119:565–72.

Berman MA, Sandborg CI, Wang Z, Imfeld KL, Zaldivar F,Jr, Dadufalza V, Buckingham BA. Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 1996; 157:4690-6.

Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Roque-Barreira MC. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am J Pathol.* 2006; 168: 1910-20.

Bertera S, Alexander A, Giannoukakis N, Robbins PD, Trucco M. Immunology of type 1 diabetes. Intervention and prevention strategies. *Endocrinol and Metab Clin Nor Amer* 1999; 28: 841-864.

Betelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: The third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:652-7.

Betelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453:1051-7.

Bhasin, M, Singh, H, Raghava, G.P.S. MHCBN: A comprehensive database of MHC binding and non-binding peptides. *Bioinformatics.* 2003. 19, 666-667.

Bian H, Reidhaar-Olson JF, Hammer J. The use of bioinformatics for identifying class II-restricted T-cell epitopes. *Methods* 2003, 29, 299–309.

Bianchet MA, Ahmed H, Vasta GR, Amzel LM. Soluble beta-galactosyl-binding lectin (galectin) from toad ovary: crystallographic studies of two protein-sugar complexes. *Proteins.* 2000 Aug 15; 40(3):378-88.

Bignami A, Eng LF, Dahl D, Uyeda CT. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 1972 Aug 25;43(2):429-35.

Bingley PJ; Bonifacio E, Williams AJK, Genovese S, Botazzo GF, Gale EAM. Prediction of IDDM in the general population: strategies based on combinations of autoantibody markers. *Diabetes* 1997; 46:1701-10.

Blaser C, Kaufmann M, Muller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol* 1998; 28:2311-9.

Bodington MJ, Muzulu SI, Burden AC. Spatial clustering in childhood diabetes: evidence of an environmental cause. *Diabet Med.* 1995 Oct;12(10):865-7.

Bongcam-Rudloff E, Nistér M, Betsholtz C, Wang JL, Stenman G, Huebner K, Croce CM, Westermarck B. Human glial fibrillary acidic protein: complementary DNA cloning, chromosome localization, and messenger RNA expression in human glioma cell lines of various phenotypes. *Cancer Res.* 1991; 51:1553-60).

Borg H, Gottsatter A, Ferlund P, Sundkvist G. A 12-year prospective study of the relationship between islet antibodies and beta-cell function at and after the diagnosis in patients with adult-onset diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 1754-62.

Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med.* 1985; 313: 353-60.

Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet.* 1974 Nov 30;2(7892):1279-83.

Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet.* 2004 Apr;36(4):337-8. Epub 2004 Mar 7.

Bouvier M, Wiley DC. Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science.* 1994 Jul 15; 265(5170):398-402.

Britten CM, Meyer RG, Kreer T, Drexler I, Wölfel T, Herr W. The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods.* 2002 Jan 1; 259(1-2):95-110.

Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, Haller M, Rockell J, Gottlieb P, Clare-Salzler M, Atkinson M. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2007 Mar; 56(3):604-12.

Brusko TM, Putnam AL, Bluestone JA. Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities, *Immunol. Rev.* 2008; 371-390.

Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005 May; 54(5):1407-14.

Burgler S, Ouaked N, Bassin C, Mantel PY, Siegmund K, Meyer N, Akdis CA, Schmidt-Weber CB. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:588, 95, 595.e1-7.

Buus S, Lauemøller SL, Worning P, Kesmir C, Frimurer T, Corbet S, Fomsgaard A, Hilden J, Holm A, Brunak S. Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee' artificial neural network approach. *Tissue Antigens* 2003. 62:378-384.

Cabrera-Rode E, Diaz-Horta O, Fernandez LE, Carr A, Marquina G, Valiente O, Gonzalez-Suarez RM, Uriarte A. Glycolipids as the major autoantigens of cytoplasmatic islet cell antibodies. *Autoimmunity.* 1995;20(3):145-51.

- Calcabrini A, Rainaldi G, Santini MT.** Cytoskeletal rearrangement in K562 erythroleukaemic cells forced to grow on a positively charged polymer surface. *J Mater Sci Mater Med.* 1999 Oct-Nov; 10(10/11):613-20.
- Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, Candeloro P, Bonato V, Marzotti S, Corneli RB, Ferretti E, Gulino A, Grasso F, De Simone C, Di Mario U, Falorni A, Boirivant M, Dotta F.** Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia.* 2005 Aug; 48(8):1565-75. Epub 2005 Jun 29.
- Calvo-Calle JM, Oliveira GA, Nardin EH.** Human CD4⁺ T cells induced by synthetic peptide malaria vaccine are comparable to cells elicited by attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *The Journal of Immunology.* 2005. 175:7575-7585.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R.** Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 2006; 16: 137R-157R.
- Canal N, Nemni R.** Autoimmunity and diabetic neuropathy. *Clin Neurosci.* 1997; 4:371-3.
- Carrillo J, Puertas MC, Alba A, Ampudia RM, Pastor X, Planas R, Riutort N, Alonso N, Pujol-Borrell R, Santamaria P, Vives-Pi M, Verdaguer J.** Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes.* 2005 Jan; 54(1):69-77.
- Carson RT, Desai DD, Vignali KM, Vignali DA.** Immunoregulation of Th cells by naturally processed peptide antagonists. *J. Immunol.* 1999 162:1-4.
- Carson RT, Vignali KM, Woodland DL, Vignali DA.** T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity* 1997; 7:387-399.
- Castano L, Eisenbarth GS.** Type-I diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol* 1990; 8:647-79.
- Cattaneo V, Tribulatti MV, Campetella O.** Galectin-8 tandem-repeat structure is essential for T-cell proliferation but not for co-stimulation. *Biochem J.* 2011 Jan 27; 434(1):153-60.
- Chang YH, Hwang J, Shang HF, Tsai ST.** Characterization of human DNA topoisomerase II as an autoantigen recognized by patients with IDDM. *Diabetes.* 1996 Apr;45(4):408-14.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM.** Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198:1875-1886.
- Cheng Y, Zhang J, Hou W, Wang D, Li F, Zhang Y, Yuan F.** Immunoregulatory effects of sinomenine on the T-bet/GATA-3 ratio and Th1/Th2 cytokine balance in the treatment of mesangial proliferative nephritis. *Int Immunopharmacol* 2009; 9:894-9.
- Chentoufi AA, Binder NR, Berka N, Abunadi T, Polychronakos C.** Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms. *Scand J Immunol.* 2008 Jul;68(1):1-11.
- Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, Strominger JL.** Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med.* 1993 Jul 1; 178(1):27-47.
- Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DA, Strominger JL.** Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 1992 Aug 27; 358(6389):764-8.

Cho M, Cummings RD. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization. *J Biol Chem.* 1995 Mar 10; 270(10):5198-206.

Christen U, von Herrath MG. Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Mol Immunol.* 2004; 40: 1113-20.

Christie MR, Hollands JA, Brown TJ, Michelsen BK, Delovitch TL. Detection of pancreatic islet 64,000 M(r) autoantigens in insulin-dependent diabetes distinct from glutamate decarboxylase. *J Clin Invest* 1993; 92:240-248.

Christinck ER, Luscher MA, Barber BH, Williams DB. Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. *Nature* 1991; 352: 67-70.

Chung CD, Patel VP, Moran M, Lewis LA, Miceli MC. Galectin-1 induces partial TCR zeta-chain phosphorylation and antagonizes processive TCR signal transduction. *J Immunol.* 2000; 165: 3722-9.

Colin W. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol* 1997; 15:821-50.

Collins DS, Unanue ER, Harding CV. Reduction of disulfide bonds within lysosomes is a key step in antigen processing. *J. Immunol.* 1991; 147:4054-59.

Conrad B, Weidmann E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriguez-Rilo H, Finegold D, Trucco M. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature.* 1994; 371: 351-5.

Cooper DNW. Galectin-1: secretion and modulation of cell interactions with laminin. *Trends Glycosci Glycotech.* 1997; 45:57.

Coppieters KT, von Herrath MG. Histopathology of type 1 diabetes: old paradigms and new insights. *Rev Diabet Stud.* 2009; 6:85-96.

Correa SG, Sotomayor CE, Aoki MP, Maldonado CA, Rabinovich GA. Opposite effects of galectin-1 on alternative metabolic pathways of L-arginine in resident, inflammatory, and activated macrophages. *Glycobiology.* 2003; 13: 119-28.

Cortegano I, del Pozo V, Cárdbaba B, de Andrés B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol.* 1998; 161: 385-9.

Craighead JE, McLane MF. Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science.* 1968 Nov 22; 162(856):913-4.

Cresswell P. Assembly, transport and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12:259-93.

Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 1996; 84:505-7.

Crome SQ, Wang AY, Kang CY, Levings MK. The role of retinoic acid-related orphan receptor variant 2 and IL-17 in the development and function of human CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 2009 Jun; 39(6):1480-93.

Crowther JR. The ELISA Guidebook. 2^a Ed. (2009). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 516, Humana Press.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA,

- Sedgwick JD.** Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421:744-48.
- Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ.** Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30:626-635.
- Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O.** Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon secreting cells. *J Immunol Methods* 1988; 110: 29–36.
- Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A.** A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 65: 109–121.
- Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G.** Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetes Care*. 1999 Oct;22(10):1698-702.
- Delovitch TL, Singh B.** The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*. 1997 Dec; 7(6):727-38.
- Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO.** Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2007 Apr; 148(1):1-16.
- Diabetes Prevention Trial-Type 1 Diabetes Study Group.** Effects on insulin in relatives of patients with type 1 diabetes mellitus. *N Eng J Med* 2002; 346: 1685-91.
- Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G.** Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells. *J Exp Med*. 2002 Jul 15;196(2):247-53.
- Diez-Rivero CM, Lafuente EM, Reche PA.** Computational analysis and modeling of cleavage by the immunoproteasome and the constitutive proteasome. *BMC Bioinformatics* 2010, 11:479 (<http://imed.med.ucm.es/Tools/pcps/index.html>).
- Dönnes P, Elofsson A.** Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC. *BMC Bioinformatics* 2002 3: 25.
- Dorman JS, LaPorte RE, Stone RA, Trucco M.** Worldwide differences in the incidence of type I diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ beta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Oct; 87(19):7370-4.
- Dotta F, Falorni A, Tiberti C, Dionisi S, Anastasi E, Torresi P, Lernmark A, Di Mario U.** Autoantibodies to the GM2-1 islet ganglioside and to GAD-65 at type 1 diabetes onset. *J Autoimmun*. 1997 Dec;10(6):585-8.
- Duchen LW, Anjorin A, Watkins PJ, Mackay JD.** Pathology of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 1980; 92:301-3.
- Dumon-Seignovert L, Cariot G, Vuillard L.** The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). *Protein Expr Purif*. 2004 Sep; 37(1):203-6
- Eisenlohr LC, Yewdell JW, Bennink JR.** Flanking sequences influence the presentation of an endogenously synthesized peptide to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1992 Feb 1; 175(2):481-7

Ejskjaer N, Arif S, Dodds W, Zanone MM, Vergani D, Watkins PJ, Peakman M. Prevalence of autoantibodies to autonomic nervous tissue structures in type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 1999; 16:544-49.

Ellerman KE, Richards CA, Guberski DL, Shek WR, Like AA. Kilham rat triggers T-cell-dependent autoimmune diabetes in multiple strains of rat. *Diabetes.* 1996 May;45(5):557-62.

Elsawa SF, Rodeberg DA, Celis E. T-cell epitope peptide vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2004. Oct; 3(5):563-75.

Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, Shapiro AM. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2009; 58:1302-11.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty one years (1969-2000). *Neurochem Res* 2002; 25:1439-1451.

Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 1994; 4: 229-37.

Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II molecules. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:181-207.

Eshaghi S, Hedren M, Nasser MI, Hammarberg T, Thornell A, Nordlund P. An efficient strategy for high-throughput expression screening of recombinant integral membrane proteins. *Protein Sci.* 2005 Mar; 14(3):676-83.

Espelt MV, Croci DO, Bacigalupo ML, Carabias P, Manzi M, Elola MT, Muñoz MC, Dominici FP, Wolfenstein-Todel C, Rabinovich GA, Troncoso MF. Novel roles of galectin-1 in hepatocellular carcinoma cell adhesion, polarization and in vivo tumor growth. *Hepatology.* 2011 Mar 9. doi: 10.1002/hep.24294.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2003 Jan; 26 Suppl 1:S5-20.

Fernández GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gómez SA, Beigier Bompadre M, Isturiz MA, Rabinovich GA, Palermo MS. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology.* 2005; 15: 519-27.

Flohé SB, Wasmuth HE, Kerad JB, Beales PE, Pozzilli P, Elliott RB, Hill JP, Scott FW, Kolb H. A wheat-based, diabetes-promoting diet induces a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine.* 2003 Feb 7;21(3):149-54.

Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 1991; 165: 97-103.

Frigeri LG, Zuberi RI, Liu FT. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. *Biochemistry.* 1993; 32: 7644-9.

Fuchs E, Weber K. Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function and Disease. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 345-82.

Füchtenbusch M, Irnstetter A, Jäger G, Ziegler AG. No evidence for an association of coxsackie virus infections during pregnancy and early childhood with development of islet autoantibodies in offspring of mothers or fathers with type 1 diabetes. *J Autoimmun.* 2001 Dec; 17(4):333-40.

- Fulcher JA, Hashimi ST, Levroney EL, Pang M, Gurney KB, Baum LG, Lee B.** Galectin-1-matured human monocyte-derived dendritic cells have enhanced migration through extracellular matrix. *J Immunol.* 2006; 177: 216-26.
- Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI.** Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood.* 2007 Mar 1; 109(5):2058-65. Epub 2006 Nov 16.
- Gebe JA, Falk BA, Rock KA, Kochik SA, Heninger AK, Reijonen H, Kwok WW, Nepom GT.** Low-avidity recognition by CD4⁺ T cells directed to self-antigens. *Eur J Immunol.* 2003 May; 33(5):1409-17.
- Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A.** Cytokine-driven proliferation of human naive, central memory, and effector memory CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 2001; 194:1711–19.
- Germain RN.** MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76:287–299.
- Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Fedun B, Taub F, Dobersen MJ, McEvoy RC, Cooper LZ, Notkins AL, Rubinstein P.** Diabetes mellitus and autoimmunity in patients with the congenital rubella syndrome. *Rev Infect Dis.* 1985 Mar-Apr;7 Suppl 1:S170-6.
- Goldberg A, St. John A.** Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annu. Rev. Biochem.* 1976; 45:747–803.
- Gómez-Touriño I, Camiña-Darriba F, Otero-Romero I, Rodríguez MA, Hernández-Fernández A, González-Fernández A, Pena-González E, Rodríguez J, Rodríguez-Segade S, Varela-Calvino R.** Autoantibodies to glial fibrillary acid protein and S100beta in diabetic patients. *Diabet Med.* 2010 Feb;27(2):246-8.
- Graham J, Hagopian WA, Kockum I, Li LS, Sanjeevi CB, Lowe RM, Schaefer JB, Zarghami M, Day HL, Landin-Olsson M, Palmer JP, Janer-Villanueva M, Hood L, Sundkvist G, Lernmark A, Breslow N, Dahlquist G, Blohmé G; Diabetes Incidence in Sweden Study Group; Swedish Childhood Diabetes Study Group.** Genetic effects on age-dependent onset and islet cell autoantibody markers in type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1346-55.
- Graves PM, Rotbart HA, Nix WA, Pallansch MA, Erlich HA, Norris JM, Hoffman M, Eisenbarth GS, Rewers M.** Prospective study of enteroviral infections and development of beta-cell autoimmunity. Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetes Res Clin Pract.* 2003 Jan; 59(1):51-61.
- Green ED, Baenziger JU.** Oligosaccharide specificities of Phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating phytohemagglutinins. Interactions with N-glycanase-released oligosaccharides, *J. Biol. Chem.* 1987. 25: 12018-12029.
- Gronostajski R, Pardee A, Goldberg A.** The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1985; 260:3344–49.
- Hammarstrom S, Hammarstrom ML, Sundblad G, Arnarp J, Lonngren J.** Mitogenic leucoagglutinin from Phaseolus vulgaris binds to a pentasaccharide unit in N-acetyllactosamine-type glycoprotein glycans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1982. 5: 1611-1615.
- Han B, Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Marée AF, Edelstein-Keshet L, Santamaria P.** Prevention of diabetes by manipulation of anti-IGRP autoimmunity: high efficiency of a low-affinity peptide. *Nat Med.* 2005; 11: 645-52.

Hanafusa T, Imagawa A. Insulinitis in human type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1150:297-9.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; 6:1123-32.

Hashimoto K, Yasukawa M, Tohyama M. Human herpesvirus 6 and drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2003 Aug;3(4):255-60.

Haskins K, Wegmann D. Diabetogenic T-cell clones. *Diabetes* 1996; 45: 1299-305.

He J, Baum LG. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death, *J. Biol. Chem.* 6 (2004) 4705-4712.

Helms T, Boehm BO, Asaad RJ, Trezza RP, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Direct visualization of cytokine-producing recall antigen-specific CD4 memory T cells in healthy individuals and HIV patients. *J Immunol* 2000; 164: 3723–32.

Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 1992; 61:761–807.

Hiemstra HS, Schloot NC, van Veelen PA, Willemen SJ, Franken KL, van Rood JJ, de Vries RR, Chaudhuri A, Behan PO, Drijfhout JW, Roep BO. Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:3988–91.

Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1572:232-54.

Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC. T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med.* 1998 Apr; 4(4):231-9.

Honkanen J, Nieminen JK, Gao R, Luopajarvi K, Salo HM, Ilonen J, Knip M, Otonkoski T, Vaarala O. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol.* 2010 Aug 1; 185(3):1959-67. Epub 2010 Jun 30.

Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med.* 1998; 4: 781-5.

Hou J, Sheikh S, Martin DL, Catterjee NK. Coxsackievirus B4 alters pancreatic glutamate decarboxylase expression in mice soon after infection. *J Autoimm* 1993; 6: 529-542.

Hovsepyan MR, Haas MJ, Boyajyan AS, Guevorkyan AA, Mamikonyan AA, Myers SE, Mooradian AD. Astrocytic and neuronal biochemical markers in the sera of subjects with diabetes mellitus. *Neurosci Lett.* 2004 Oct 21; 369(3):224-7.

Hsu DK, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol Rev.* 2009; 230:114-27.

Hsu DK, Hammes SR, Kuwabara I, Greene WC, Liu FT. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. *Am J Pathol.* 1996; 148: 1661-70.

- Iglesias-Fernández R, Matilla A.** After-ripening alters the gene expression pattern of oxidases involved in the ethylene and gibberellin pathways during early imbibition of *Sisymbrium officinale* L. seeds. *J. Exp. Bot.* 2009. 60 (6): 1645-1661.
- Ibarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA.** Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol.* 2009 Sep; 10(9):981-91. Epub 2009 Aug 9.
- Ilonen, J, Simell, O, Knip, M, Akerblom, HK.** Screening for genetic IDDM risk and prevention trials in infancy. *Diabetes Metab. Rev.* 1998. 14:188-189.
- Inoue K, Ikegami H, Fujisawa T, Noso S, Nojima K, Babaya N, Itoi-Babaya M, Makimo S, Ogihara T.** Allelic variation in class I K gene as candidate for a second component of MHC-linked susceptibility to type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia.* 2004 Apr; 47(4):739-47.
- Jahromi MM, Eisenbarth GS.** Genetic determinants of type 1 diabetes across populations. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct; 1079:289-99.
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M.J.** *Inmunobiología: el sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* 2ª ed. Editorial Masson. 2003.
- Janković BD, Djordjjević D.** Differential appearance of autoantibodies to human brain S100 protein, neuron specific enolase and myelin basic protein in psychiatric patients. *Int J Neurosci.* 1991 Sep; 60(1-2):119-27.
- Jarchum I, Nichol L, Trucco M, Santamaria P, DiLorenzo TP.** Identification of novel IGRP epitopes targeted in type 1 diabetes patients. *Clin Immunol.* 2008 Jun; 127(3):359-65.
- Jeng KC, Frigeri LG, Liu FT.** An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunol Lett.* 1994; 42: 113-6.
- Jenner J, Kerst G, Handgretinger R, Muller I.** Increased alpha 2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells, *Exp. Hematol.* 2006. 9: 1212-1218.
- Jensen-Jarolim E, Gscheidlinger R, Oberhuber G, Neuchrist C, Lucas T, Bises G, Radauer C, Willheim M, Scheiner O, Liu FT, Boltz-Nitulescu G.** The constitutive expression of galectin-3 is downregulated in the intestinal epithelia of Crohn's disease patients, and tumour necrosis factor alpha decreases the level of galectin-3-specific mRNA in HCT-8 cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Feb; 14(2):145-52.
- Jensen-Jarolim E, Neumann C, Oberhuber G, Gscheidlinger R, Neuchrist C, Reinisch W, Zuberi RI, Penner E, Liu FT, Boltz-Nitulescu G.** Anti-Galectin-3 IgG autoantibodies in patients with Crohn's disease characterized by means of phage display peptide libraries. *J Clin Immunol.* 2001; 21: 348-56.
- Johnson JH, Crider BP, McCorkle K, Alford M, Unger RH.** Inhibition of glucose transport into rat islet cells by immunoglobulins from patients with new-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1990 Mar 8;322(10):653-9.
- Jones DB, Hunter NR, Duff GW.** Heat-shock protein 65 as a beta cell antigen of insulin-dependent diabetes. *Lancet.* 1990 Sep 8;336(8715):583-5.
- Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W, Eberlein TJ.** Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes, *J. Leukoc. Biol.* 4 (2001) 555-564.

Jung G, Fleckenstein B, von der Mülbe F, Wessels J, Niethammer D, Wiesmüller K. From combinatorial libraries to MHC ligand motifs, T-cell superagonists and antagonists. *Biologicals* 2001, 29, 179–181.

Karjalainen J, Martin JM, Knip M, Ilonen J, Robinson BH, Savilahti E, Akerblom HK, Dosch HM. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1992 Jul 30;327(5):302-7.

Karlsen AE, Størling ZM, Sparre T, Larsen MR, Mahmood A, Størling J, Roepstorff P, Wrzesinski K, Larsen PM, Fey S, Nielsen K, Heding P, Ricordi C, Johannesen J, Kristiansen OP, Christensen UB, Kockum I, Luthman H, Nerup J, Pociot F. Immune-mediated beta-cell destruction in vitro and in vivo-A pivotal role for galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 May 26;344(1):406-15. Epub 2006 Mar 29.

Karounos DG, Thomas JW. Recognition of common islet antigen by autoantibodies from NOD mice and humans with IDDM. *Diabetes.* 1990 Sep;39(9):1085-90.

Karulin AY, Hesse MD, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Single cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity. *J Immunol* 2000; 164: 1862–72.

Kasuga A, Harada R, Saruta T. Insulin-dependent diabetes mellitus associated with parvovirus B19 infection. *Ann Intern Med.* 1996 Oct 15; 125(8):700-1.

Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1992 Jan;89(1):283-92.

Kawamura K, McLaughlin KA, Weissert R, Forsthuber TG. Myelin-reactive type B T cells and T cells specific for low-affinity MHC-binding myelin peptides escape tolerance in HLA-DR transgenic mice. *J Immunol.* 2008 Sep 1;181(5):3202-11

Kawasaki E, Hutton JC, Eisenbarth GS. Molecular cloning and characterization of the human transmembrane protein tyrosine phosphatase homologue, phogrin, an autoantigen of type 1 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Oct 14;227(2):440-7.

Kenneth L. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17:739-79.

Kim YJ, Zhou Z, Hurtado J, Wood DL, Choi AS, Pescovitz MD, Warfel KA, Vandagriff J, Davis JK, Kwon BS. IDDM patients' sera recognize a novel 30-kD pancreatic autoantigen related to chymotrypsinogen. *Immunol Invest.* 1993 Apr;22(3):219-27.

Kimata H. Enhancement of IgE production in B cells by neutrophils via galectin-3 in IgE-associated atopic eczema/dermatitis syndrome. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 128: 168-70.

Klemetti P, Savilahti E, Ilonen J, Akerblom HK, Vaarala O. T-cell reactivity to wheat gluten in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Immunol.* 1998 Jan;47(1):48-53.

Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 2008; 7:550-7.

Kojima K, Berger T, Lassmann H, Hinze-Selch D, Zhang Y, Gehrman J, Reske K, Wekerle H, Linington C. Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecules, a calcium binding protein of astroglia. *J. Exp. Med.* 1994; 180:817–829.

Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an

- uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:1903-1908.
- Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Vesikari T, Ilonen J, Knip M, Hyöty H.** A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Ann Med.* 2005;37(1):67-72.
- Kropshofer H, Vogt AB, Stern LJ, Hammerling GJ.** Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules. *Science* 1995; 270:1357-59.
- Kuglin B, Halder B, Bertrams J, Grünekle D, Gries FA, Kolb H.** Proinsulin autoantibodies: association with type I diabetes but not with islet cell antibodies, insulin autoantibodies or HLA-DR type. *J Autoimmun.* 1990 Oct;3(5):573-7.
- Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N.** Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest.* 2002 Jan; 109(1):131-40.
- Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, Haderl KP.** An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages, *J. Mol. Biol.* 2000. 298: 417-429.
- Kuwabara I, Liu FT.** Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol.* 1996; 156: 3939-44.
- Kyogoku C, Langefeld CD, Ortmann WA, Lee A, Selby S, Carlton VE, Chang M, Ramos P, Baechler EC, Batliwalla FM, Novitzke J, Williams AH, Gillett C, Rodine P, Graham RR, Ardlie KG, Gaffney PM, Moser KL, Petri M, Begovich AB, Gregersen PK, Behrens TW.** Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. *Am J Hum Genet.* 2004 Sep;75(3):504-7. Epub 2004 Jul 23.
- Lampeter EF, McCann SR, Kolb H.** Transfer of diabetes type 1 by bone-marrow transplantation. *Lancet* 1998; 351: 568-569.
- Lanzavecchia A.** Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8:773-93.
- Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, Weaver CT.** Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 2009; 30:92-107.
- Lemmel C, Stevanović S.** The use of HPLC-MS in T-cell epitope identification. *Methods* 2003; 29: 248-59.
- Lernmark A, Molenaar JL, van Beers WA, Yamaguchi Y, Nagataki S, Ludvigsson J, Maclaran NK.** The Fourth International Serum Exchange Workshop to standardize cytoplasmic islet cell antibodies. The Immunology and Diabetes Workshops and Participating Laboratories. *Diabetologia* 1991; 34:534-5.
- Leslie D, Lipsky P, Notkins AL.** Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest.* 2001 ;108:1417-22.
- Leslie RDG, Atkinson MA, Notkins AL.** Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.*1999; 42: 3-14.
- Levi G, Tarrab-Hazdai R, Teichberg VI.** Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *Eur J Immunol.* 1983; 13: 500-7.
- Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO.** Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today.* 1995 Jan; 16(1):34-8.

Lieberman SM, DiLorenzo TP. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens.* 2003 Nov; 62(5):359-77.

Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8; 100(14):8384-8. Epub 2003 Jun 18.

Lim Y, Lee DY, Lee S, Park SY, Kim J, Cho B, Lee H, Kim HY, Lee E, Song YW, Jeoung DI. Identification of autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 295: 119-24.

Lindberg B, Ivarsson SA, Lernmark A. Islet autoantibodies in cord blood could be a risk factor for future diabetes. *Diabetologia.* 1999 Nov;42(11):1375.

Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005 Jan; 54(1):92-9.

Lippolis JD, White FM, Marto JA, Luckey CJ, Bullock TN, Shabanowitz J, Hunt DF, Engelhard VH. Analysis of MHC class II antigen processing by quantitation of peptides that constitute nested sets. *J Immunol* 2002, 169:5089-5097.

Littorin B, Blom P, Schölin A, Arnqvist HJ, Blohmé G, Bolinder J, Ekblom-Schnell A, Eriksson JW, Gudbjörnsdóttir S, Nyström L, Ostman J, Sundkvist G. Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetologia.* 2006 Dec;49(12):2847-52. Epub 2006 Oct 27.

Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 29-41.

Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, Wraith DC. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 1995; 3:407-415.

Liu S, Wang H, Jin Y, Podolsky R, Reddy MV, Pedersen J, Bode B, Reed J, Steed D, Anderson S, Yang P, Muir A, Steed L, Hopkins D, Huang Y, Purohit S, Wang CY, Steck AK, Montemari A, Eisenbarth G, Rewers M, She JX. IFIH1 polymorphisms are significantly associated with type 1 diabetes and IFIH1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *Hum Mol Genet.* 2009 Jan 15;18(2):358-65. Epub 2008 Oct 16.

Ljungberg M, Korpela R, Ilonen J, Ludvigsson J, Vaarala O. Probiotics for the prevention of beta cell autoimmunity in children at genetic risk of type 1 diabetes--the PRODIA study. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct; 1079:360-4.

Lochner M, Peduto L, Cherrier M, Sawa S, Langa F, Varona R, Riethmacher D, Si-Tahar M, Di Santo JP, Eberl G. In vivo equilibrium of proinflammatory IL-17+ and regulatory IL-10+ Foxp3+ ROR γ t+ T cells. *J Exp Med* 2008; 205:1381-93.

Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002 May;8(5):500-8.

- Lönnrot M, Korpela K, Knip M, Ilonen J, Simell O, Korhonen S, Savola K, Muona P, Simell T, Koskela P, Hyöty H.** Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes*. 2000 Aug;49(8):1314-8.
- Lovitch SB, Walters JJ, Gross ML, Unanue ER.** APCs present A beta(k)-derived peptides that are autoantigenic to type B T cells. *J Immunol*. 2003 Apr 15;170(8):4155-60.
- Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ, Bailey R, Bourget K, Plagnol V, Field S, Atkinson M, Clayton DG, Wicker LS, Todd JA.** Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1074-82. Epub 2007 Aug 5.
- Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M.** NetMHC-3.0: Accurate web accessible predictions of Human, Mouse, and Monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *NAR*. 2008. 36:W509-512.
- Lundegaard C, Lund O, Nielsen M.** Accurate approximation method for prediction of class I MHC affinities for peptides of length 8, 10 and 11 using prediction tools trained on 9mers. *Bioinformatics* 2008. 24:1397-1398.
- Lundegaard C, Nielsen M, Lund O.** The validity of predicted T-cell epitopes. *Trends Biotechnol* 2006. 24: 537-538.
- Maclaren NK, Huang SW, Fogh J.** Antibody to cultured human insulinoma cells in insulin-dependent diabetes. *Lancet*. 1975 May 3;1(7914):997-1000.
- Madden DR.** The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev Immunol* 1995; 13:587-622.
- Maier LM, Lowe CE, Cooper J, Downes K, Anderson DE, Severson C, Clark PM, Healy B, Walker N, Aubin C, Oksenberg JR, Hauser SL, Compston A, Sawcer S; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, De Jager PL, Wicker LS, Todd JA, Hafler DA.** IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS Genet*. 2009 Jan;5(1):e1000322. Epub 2009 Jan 2.
- Manel N, Unutmaz D, Littman DR.** The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 2008; 9:641-9.
- Manel N.** In vitro differentiation of human Th-17 CD4⁺ T cells. *Protocol Exchange*. 2008. DOI:10.1038/nprot.2008.122. Published online 3 June 2008.
- Mariño E, Grey ST.** A new role for an old player: do B cells unleash the self-reactive CD8⁺ T cell storm necessary for the development of type 1 diabetes? *J Autoimmun*. 2008; 31: 301-5.
- Marron MP, Graser RT, Chapman HD, Serreze DV.** Functional evidence for the mediation of diabetogenic T cell responses by HLA-A2.1 MHC class I molecules through transgenic expression in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15; 99(21):13753-8. Epub 2002 Oct 2.
- Martin CC, Bischof LJ, Bergman B, Hornbuckle LA, Hilliker C, Frigeri C, Wahl D, Svitek CA, Wong R, Goldman JK, Oeser JK, Lepretre F, Froguel P, O'Brien RM, Hutton JC.** Cloning and characterization of the human and rat islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP) genes. *J Biol Chem*. 2001 Jul 6; 276(27):25197-207.

Martin-Orozco N, Chung Y, Chang SH, Wang YH, Dong C. Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells, *Eur. J. Immunol.* 1 (2009) 216-224.

Mathews KP, Konstantinov KN, Kuwabara I, Hill PN, Hsu DK, Zuraw BL, Liu FT. Evidence for IgG autoantibodies to galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin (Mac-2, epsilon binding protein, or carbohydrate binding protein 35) in human serum. *J Clin Immunol.* 1995 ; 15:329-37.

Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia.* 2005 Jul;48(7):1247-57. Epub 2005 Jun 22.

Mathieu C, van Etten E, Gysemans C, Decallonne B, Bouillon R. Seasonality of birth in patients with type 1 diabetes. *Lancet.* 2002 Apr 6;359(9313):1248.

Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Bouillon R. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia.* 1994 Jun;37(6):552-8.

Mäurer M, Ponath A, Kruse N, Rieckmann P. CTLA4 exon 1 dimorphism is associated with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2002 Oct;131(1-2):213-5.

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007 Dec; 8(12):1390-7. Epub 2007 Nov 11.

McGuire HM, Walters S, Vogelzang A, Lee CM, Webster KE, Sprent J, Christ D, Grey S, King C. Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models. *Diabetes.* 2011 Mar; 60(3):867-75.

Meccoci P, Parnetti L, Romano G, Scarelli A, Chionne F, Cecchetti R, Polidori MC, Palumbo B, Cherubini A, Senin U. Serum anti-GFAP and anti-S100 autoantibodies in brain aging, Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neuroimmunol* 1995; 57: 165-70.

Mehul B, Hughes RC. Plasma membrane targetting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci.* 1997; 110: 1169-78.

Mensah-Brown EP, Al Rabesi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, Liu FT, Lukic ML. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clin Immunol.* 2009 Jan;130(1):83-8. Epub 2008 Oct 8.

Menser MA, Forrest JM, Honeyman MC, Burgess JA. Letter: Diabetes, HLA antigens, and congenital rubella. *Lancet.* 1974 Dec 21;2(7895):1508-9.

Messing, A, Head, MW, Galles, K, Galbreath, EJ, Goldman, JE, Brenner, M. Fatal encephalopathy with astrocyte inclusions in GFAP transgenic mice. *Am J Path* 1998; 152: 391-98.

Miller GG, Pollack MS, Nell LJ, Thomas JW. Insulin-specific human T cells. Epitope specificity, major histocompatibility complex restriction, and alloreactivity to a diabetes-associated haplotype. *J Immunol* 1987; 139:3622-29.

Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol.* 1996 Jul 19; 260(3):289-98.

- Mitchell RN, Barnes KA, Grupp SA, Sanchez M, Misulovin Z, Nussenzweig MC, Abbas AK.** Intracellular targeting of antigens internalized by membrane immunoglobulin in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1995; 181:1705–14.
- Mohan JF, Levisetti MG, Calderon B, Herzog JW, Petzold SJ, Unanue ER.** Unique autoreactive T cells recognize insulin peptides generated within the islets of Langerhans in autoimmune diabetes. *Nat Immunol.* 2010 Apr;11(4):350-4. Epub 2010 Feb 28.
- Momburg F, Hammerling GJ.** Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv. Immunol.* 1998; 68:191–256.
- Moreno A, Clavijo P, Edelman R, Davis J, Szein M, Sinigaglia F, Nardin E.** CD4⁺ T cell clones obtained from *Plasmodium falciparum* sporozoite-immunized volunteers recognize polymorphic sequences of the circumsporozoite protein. *J Immunol.* 1993 Jul 1; 151(1):489-99.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136:2348-57.
- Mosmann TR, Coffman RL.** TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-73.
- Motran CC, Molinder KM, Liu SD, Poirier F, Miceli MC.** Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. *Eur J Immunol.* 2008; 38: 3015-27.
- Müller S, Schaffer T, Flogerzi B, Fleetwood A, Weimann R, Schoepfer AM, Seibold F.** Galectin-3 modulates T cell activity and is reduced in the inflamed intestinal epithelium in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Jul;12(7):588-97.
- Mukherjee R, Wagar D, Stephens TA, Lee-Chan E, Singh B.** Identification of CD4⁺ T Cell-Specific Epitopes of Islet-Specific Glucose-6-Phosphatase Catalytic Subunit-Related Protein: A Novel β Cell Autoantigen in Type 1 Diabetes. *J Immunol* 2005; 174: 5306-15.
- Murphy E, Shibuya K, Hosken N, Openshaw P, Maino V, Davis K, Murphy K, O'Garra A.** Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. *J Exp Med* 1996; 183:901-13.
- Nagyekar N, Corlett L, Jacobson LW, Matsuo H, Chalkley R, Driscoll PC, Deshpande S, Spack EG, Willcox N.** Scanning a DRB3*0101 (DR52a)-restricted epitope cross-presented by DR3: overlapping natural and artificial determinants in the human acetylcholine receptor. *J. Immunol.* 1999; 162:4079–4087.
- Narendran P, Mannering SI, Harrison LC.** Proinsulin—a pathogenic autoantigen in type 1 diabetes. *Autoimmunity reviews* 2003; 2: 204-210.
- Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA.** Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science.* 2009 Apr 17;324(5925):387-9. Epub 2009 Mar 5.
- Nguyen JT, Evans DP, Galvan M, Pace KE, Leitenberg D, Bui TN, Baum LG.** CD45 modulates galectin-1-induced T cell death: regulation by expression of core 2 O-glycans. *J Immunol.* 2001; 167: 5697-707.
- Niedermann G, Butz S, Ihlenfeldt HG, Grimm R, Lucchiari M, Hoschutzy H, Jung G, Maier B, Eichmann K.** Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of

epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity*. 1995; 2:289–99.

Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci* 2003. 12:1007-1017.

Nieminen J, St-Pierre C, Sato S. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol*. 2005; 78: 1127-35.

Nisticò L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet*. 1996 Jul;5(7):1075-80.

Noorchashm H, Noorchashm N, Kern J, Rostami SY, Barker CF, Naji A. B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes*. 1997 Jun;46(6):941-6.

Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, Hoffman M, Eisenbarth GS, Erlich HA, Rewers M. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*. 2003 Oct 1;290(13):1713-20.

Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, Yu Liping, Hoffman M, Chase HP, Erlich HA, Hamman RF, Eisenbarth GS, Rewers M. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. *Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). JAMA*. 1996 Aug 28;276(8):609-14.

Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J. Clin. Invest*. 2001; 108:1247–52.

Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):480-3. Epub 2007 Jun 20.

Nussbaum AK, Kuttler C, Haderer KP, Rammensee HG, Schild H. PProC: A Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages available on the WWW. *Immunogenetics*. 2001. 53: 87-94.

O'Brien C, Flower DR, Feighery C. Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome Research* 2008, 4:6.

Ogden S, Haggerty D, Stoner CM, Kolodrubetz D, Schleif R. The Escherichia coli L-arabinose operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Jun; 77(6):3346-50.

Oikarinen M, Tauriainen S, Honkanen T, Oikarinen S, Vuori K, Kaukinen K, Rantala I, Mäki M, Hyöty H. Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. *Clin Exp Immunol*. 2008 Jan;151(1):71-5. Epub 2007 Nov 7.

Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, O'Brien S, Blank R, Lamb E, Natarajan S, Kastenmayer R, Hunter C, Grigg ME, Belkaid Y. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* 2009; 31:772-786.

Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell*. 1987; 50: 819-20.

- Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, Riddell SR, Tampe R, Spies T, Trowsdale J, Cresswell P.** A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 1997; 277:1306–9.
- Outenreath RL, Jones AL.** Influence of an endogenous lectin substrate on cultured dorsal root ganglion cells. *J Neurocytol.* 1992 Nov; 21(11):788-95.
- Pak CY, Cha CY, Rajotte RV, McArthur RG, Yoon JW.** Human pancreatic islet cell specific 38 kilodalton autoantigen identified by cytomegalovirus-induced monoclonal islet cell autoantibody. *Diabetologia.* 1990 Sep;33(9):569-72.
- Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW.** Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet.* 1988 Jul 2; 2(8601):1-4.
- Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghupathi PK, Paquette TL.** Insulin antibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. *Science* 1983; 222:1337-9.
- Panagiotopoulos C, Qin H, Tan R, Verchere CB.** Identification of a beta-cell-specific HLA class I restricted epitope in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003 Nov;52(11):2647-51.
- Panina-Bordignon P, Lang R, van Endert PM, Benazzi E, Felix AM, Pastore RM, Spinosa GA, Sinigaglia F.** Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 1995 May 1;181(5):1923-7.
- Parel Y, Chizzolini C.** CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev.* 2004 Mar;3(3):215-20.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C.** A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6:1133-41.
- Park SG, Park HS, Jeong IK, Cho YM, Lee HK, Kang YS, Kim S, Park KS.** Autoantibodies against aminoacyl-tRNA synthetase: novel diagnostic marker for type 1 diabetes mellitus. *Biomarkers.* 2010 Jun;15(4):358-66.
- Parker KC, Bednarek MA, Hull LK, Utz U, Cunningham B, Zweerink HJ, Biddison WE, Coligan JE.** Sequence motifs important for peptide binding to the human MHC class I molecule, HLA-A2. *J Immunol.* 1992 Dec 1; 149(11):3580-7.
- Peakman M, Stevens EJ, Lohmann T, Narendran P, Dromey J, Alexander A, Tomlinson AJ, Trucco M, Gorga JC, Chicz RM.** Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 eluted from HLA-DR4. *J Clin Invest* 1999; 104:1449–57.
- Peng H, Hagopian W.** Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord.* 2006 Sep; 7(3):149-62.
- Perillo NL, Marcus ME, Baum LG.** Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med.* 1998 May; 76(6):402-12.
- Perillo NL, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG.** Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature.* 1995 Dec 14;378(6558):736-9.
- Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG.** Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med.* 1997 May 19; 185(10):1851-8.
- Perone MJ, Bertera S, Shufesky WJ, Divito SJ, Montecalvo A, Mathers AR, Larregina AT, Pang M, Seth N, Wucherpfennig KW, Trucco M, Baum LG, Morelli AE.** Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol.* 2009; 182: 2641-53.

Perone MJ, Bertera S, Tawadrous ZS, Shufesky WJ, Piganelli JD, Baum LG, Trucco M, Morelli AE. Dendritic cells expressing transgenic galectin-1 delay onset of autoimmune diabetes in mice. *J Immunol.* 2006; 177: 5278-89.

Perone MJ, Larregina AT, Shufesky WJ, Papworth GD, Sullivan ML, Zahorchak AF, Stolz DB, Baum LG, Watkins SC, Thomson AW, Morelli AE. Transgenic galectin-1 induces maturation of dendritic cells that elicit contrasting responses in naive and activated T cells. *J Immunol.* 2006 Jun 15;176(12):7207-20.

Persson-Sjögren S, Holmberg D, Forsgren S. Remodeling of the innervation of pancreatic islets accompanies insulinitis preceding onset of diabetes in the NOD mouse. *J Neuroimmunol.* 2005 Jan;158(1-2):128-37.

Petrolonis AJ, Yang Q, Tummino PJ, Fish SM, Prack AE, Jain S, Parsons TF, Li P, Dales NA, Ge L, Langston SP, Schuller AG, An WF, Tartaglia LA, Chen H, Hong SB. Enzymatic characterization of the pancreatic islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein (IGRP). *J Biol Chem.* 2004 Apr 2; 279(14):13976-83.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1; 29(9):e45.

Pihoker C, Gillian LK, Hampe CS, Lernmark A. Autoantibodies in diabetes. *Diabetes* 2005; 54, suppl 2: S52-S61.

Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout JW, Roep BO. Autoreactive CD8 T cells associated with β cell destruction in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:18425–30.

Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immunol* 2002; 3:235–499.

Poletaev AB, Morozov SG, Gnedenko BB, Zlunikin VM, Korzhenevsky DA. Serum anti-S100b, anti-GFAP and anti-NGF autoantibodies of IgG class in healthy persons and patients with mental and neurological disorders. *Autoimmunity.* 2000;32(1):33-8.

Powis SH, Vaughan RW. MHC Protocols. *Methods in Molecular Biology.* Vol. 210, Ed. Humana Press, 2003. Capítulo 7.

Prud'homme GJ, Long TY, Bocarro DC, Balderas RS, Theofilopoulos AN. Analysis of pancreas-infiltrating T cells in diabetic NOD mice: fusion with BW5147 yields a high frequency of islet-reactive hybridomas. *Autoimmunity.* 1991; 10(4):285-9.

Pu Z, Carrero JA, Unanue ER. Distinct recognition by two subsets of T cells of an MHC class II-peptide complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8844-9

Puertas MC, Carrillo J, Pastor X, Ampudia RM, Planas R, Alba A, Bruno R, Pujol-Borrell R, Estanyol JM, Vives-Pi M, Verdaguer J. Peripherin is a relevant neuroendocrine autoantigen recognized by islet-infiltrating B lymphocytes. *J Immunol.* 2007 May 15;178(10):6533-9.

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet.* 1997 Mar;15(3):293-7.

Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun.* 2005 Feb; 24(1):55-62. Epub 2005 Jan 12.

- Rabinovich A.** Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes* 1994; 43: 613-621.
- Rabinovich GA, Ariel A, Hershkovich R, Hirabayashi J, Kasai KI, Lider O.** Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. *Immunology*. 1999 May; 97(1):100-6.
- Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S.** Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*. 2002; 23: 313-20.
- Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y.** Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*. 1999; 190: 385-98.
- Rabinovich GA, Liu FT, Hirashima M, Anderson A.** An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. *Scand J Immunol*. 2007; 66: 143-58.
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NN, Bachor OA, Stevanovic S.** SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* (1999) 50: 213-219 (www.syfpeithi.de).
- Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O.** Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol*. 1993. 11: 213-244.
- Rammensee HG, Friede T, Stevanovic S.** MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995; 41:178-228.
- Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR.** b-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 2001; 358:1749-53.
- Rechsteiner M.** Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu. Rev. Cell Biol*. 1987; 3:1-30.
- Redondo MJ, Gottlieb PA, Motheral T, Mulgrew C, Rewers M, Babu S, Stephens E, Wegmann DR, Eisenbarth GS.** Heterophile antimouse immunoglobulin antibodies may interfere with cytokine measurements in patients with HLA alleles protective for type 1A diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 2166-70.
- Reeves, RH, Yao, J, Crowley, MR, Buck, S, Zhang, X, Yarowsky, P, Gearhart, JD, Hilt, DC.** Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1994; 91:5359-63.
- Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M, McDuffie RS Jr, Hamman RF, Klingensmith G, Eisenbarth GS, Erlich HA.** Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia*. 1996 Jul; 39(7):807-12.
- Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG.** The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009 Jun;52(6):1143-51. Epub 2009 Mar 6.
- Robles DT, Eisenbarth GS, Wang T, Erlich HA, Bugawan TL, Babu SR, Barriga K, Norris JM, Hoffman M, Klingensmith G, Yu L, Rewers M.** Diabetes Autoimmunity Study in the Young. Millennium award recipient contribution. Identification of children with early

onset and high incidence of anti-islet autoantibodies. *Clin Immunol.* 2002 Mar; 102(3):217-24.

Roche PA. HLA-DM: an in vivo facilitator of MHC class II peptide loading. *Immunity* 1995; 3:259–62.

Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994 Sep 9; 78(5):761-71.

Rodriguez GM, Diment S. Role of cathepsin D in antigen presentation of ovalbumin. *J. Immunol.* 1992; 149:2894–98.

Roep BO, Stobbe I, Duinkerken G, van Rood JJ, Lernmark A, Keymeulen B, Pipeleers D, Claas FH, de Vries RR. Auto- and alloimmune reactivity to human islet allografts transplanted into type 1 diabetic patients. *Diabetes* 1999; 48:484–90.

Roep BO. The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia* 2003; 46:305–21.

Rorsman F, Husebye ES, Winqvist O, Björk E, Karlsson FA, Kämpe O. Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 12;92(19):8626-9.

Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. 2000. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.

Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway, CA Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991; 353:622.

Saida F, Uzan M, Odaert B, Bontems F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. *Curr Protein Pept Sci.* 2006 Feb; 7(1):47-56.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-62.

Santucci L, Fiorucci S, Cammilleri F, Servillo G, Federici B, Morelli A. Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology.* 2000; 31: 399-406.

Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, Rabinovich GA, Morelli A. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice, *Gastroenterology.* 5 (2003) 1381-1394.

Schleif R. DNA looping. *Annu Rev Biochem.* 1992; 61:199-223.

Schloot NC, Roep BO. Islet antigen-specific T cell clones in autoimmune diabetes: from mice to men. *Diabetes Metab Rev* 1997; 13:127–138.

Schlosser M, Mueller PW, Törn C, Bonifacio E, Bingley PJ and Participating Laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for insulin autoantibodies. *Diabetologia* 2010; 53: 2611-20.

Schmidt D, Verdaguer J, Averill N, Santamaria P. A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity. *J Exp Med.* 1997 Oct 6; 186(7):1059-75.

Schmidt S, Linington C, Zipp F, Sotgiu S, de Waal Malefyt R, Wekerle H, Hohlfeld R. Multiple sclerosis: comparison of the human T-cell response to S100 beta and myelin basic

protein reveals parallels to rat experimental autoimmune panencephalitis. *Brain* 1997; 120:1437-45.

Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J. Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy. *Diabetes Care*. 2005 Feb;28(2):290-5.

Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1998 Oct 15; 161(8):3912-8.

Seyfert-Margolis V, Gisler TD, Asare AL, Wang RS, Dosch HM, Brooks-Worrell B, Eisenbarth GS, Palmer JP, Greenbaum CJ, Gitelman SE, Nepom GT, Bluestone JA, Herold KC. Analysis of T-cell assays to measure autoimmune responses in subjects with type 1 diabetes: results of a blinded controlled study. *Diabetes* 2006; 55:2588–94.

Shastri N, Serwold T, Paz P. Reading within the lines: naturally processed peptides displayed by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 137-44.

Shastri N. Needles in haystacks. Identifying specific peptide antigens for T-cells. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:271-77.

She JX, Ellis TM, Wilson SB, Wasserfall CH, Marron M, Reimsneider S, Kent SC, Hafler DA, Neuberger DS, Muir A, Strominger JL, Atkinson MA. Heterophile antibodies segregate in families and are associated with protection from type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8116–19.

She JX. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunol Today*. 1996 Jul;17(7):323-9.

Shi H, Cui H, Alam G, Gunning WT, Nestor A, Giovannucci D, Zhang M, Ding HF. Nestin expression defines both glial and neuronal progenitors in postnatal sympathetic ganglia. *J Comp Neurol*. 2008; 508:867-78.

Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. In islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein, the beta cell antigenic sequence that is targeted in diabetes is not responsible for the loss of phosphohydrolase activity. *Diabetologia*. 2005 Sep; 48(9):1851-9.

Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. The islet-specific glucose-6-phosphatase-related protein, implicated in diabetes, is a glycoprotein embedded in the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS Lett*. 2004 Mar 26; 562(1-3):160-4.

Sia C, Hänninen A. Functional alterations of proinflammatory monocytes by T regulatory cells: implications for the prevention and reversal of type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2010; 7: 6-14
Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, Hafler DA. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol* 2009; 183: 4432-9.

Skowera A, Ellis RJ, Varela-Calviño R, Arif S, Huang GC, Van-Krinks C, Zaremba A, Rackham C, Allen JS, Tree TI, Zhao M, Dayan CM, Sewell AK, Unger WW, Drijfhout JW, Ossendorp F, Roep BO, Peakman M. CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *J Clin Invest*. 2008 Oct; 118(10):3390-402.

Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, Field S, Burren O, Smink LJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Widmer B, Dunger DB, Savage DA, Walker NM, Clayton DG, Todd JA. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet*. 2006 Jun;38(6):617-9. Epub 2006 May 14.

Somoza N, Vargas F, Rora-Mir C, Vives-Pi M, Fernández-Figueras MT, Jaraquemada D, Pujol-Borrell R. Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V β usage and cytokine profile. *Journal Immunol* 1994; 153: 1.360-1.377.

Sorci G, Agneletti AL, Bianchi R, Donato R. Association of S100B with intermediate filaments and microtubules in glial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec 10; 1448(2):277-89.

Srinivasan K, Zhang G, Khan A, August J, Brusic V. Prediction of class I T-cell epitopes: evidence of presence of immunological hot spots inside antigens. *Bioinformatics* 2004, 20: I297-I302.

Standifer NE, Ouyang Q, Panagiotopoulos C, Verchere CB, Tan R, Greenbaum CJ, Pihoker C, Nepom GT. Identification of Novel HLA-A*0201-restricted epitopes in recent-onset type 1 diabetic subjects and antibody-positive relatives. *Diabetes* 2006; 55: 3061-7.

Stanley HM, Norris JM, Barriga K, Hoffman M, Yu L, Miao D, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M; Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). Is presence of islet autoantibodies at birth associated with development of persistent islet autoimmunity? The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes Care*. 2004 Feb;27(2):497-502.

Stelekati E, Bahri R, DminOrlando O, Orinska Z, Mittrücker HW, Langenhaun R, Glatzel M, Bollinger A, Paus R, Bulfone-Paus S. Mast cell-mediated antigen presentation regulates CD8⁺ T cell effector functions. *Immunity*. 2009 Oct 16; 31(4):665-76. Epub 2009 Oct 8.

Stene LC, Barriga K, Norris JM, Hoffman M, Erlich HA, Eisenbarth GS, McDuffie RS Jr, Rewers M. Perinatal factors and development of islet autoimmunity in early childhood: the diabetes autoimmunity study in the young. *Am J Epidemiol*. 2004 Jul 1;160(1):3-10.

Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 1994; 368:215.

Stevanović S, Schild H. Quantitative aspects of T cell activation--peptide generation and editing by MHC class I molecules. *Semin Immunol*. 1999; 11:375-84.

Stevens EJ, Peakman M. T-cell studies in insulin dependent diabetes mellitus: lessons from other autoimmune diseases. *Diabetes* 1997; *Nutr. Metab.* 10:242-254.

Stiller CR, Dupré J, Gent M, Jenner MR, Keown PA, Laupacis A, Martell R, Rodger NW, von Graffenried B, Wolfe BM. Effects of cyclosporine immunosuppression in insulin-dependent diabetes mellitus of recent onset. *Science* 1984; 223: 1362-7.

Stillman BN, Hsu DK, Pang M, Brewer CF, Johnson P, Liu FT, Baum LG. Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol*. 2006; 176:778-89.

Stitt AW, McGoldrick C, Rice-McCaldin A, McCance DR, Glenn JV, Hsu DK, Liu FT, Thorpe SR, Gardiner TA. Impaired retinal angiogenesis in diabetes: role of advanced glycation end products and galectin-3. *Diabetes*. 2005 Mar;54(3):785-94.

Storkus WJ, Zeh HJ 3rd, Maeurer MJ, Salter RD, Lotze MT. Identification of human melanoma peptides recognized by class I restricted tumor infiltrating T lymphocytes. *J Immunol*. 1993 Oct 1; 151(7):3719-27.

- Stroud CR, Heller SR, Ward JD, Hardisty CA, Weetman AP.** Analysis of antibodies against components of the autonomic nervous system in diabetes mellitus. *QJM*. 1997;90:577-85.
- Suarez-Alvarez B, Garcia Suarez MM, Argüelles ME, Sampedro A, Alvarez Marcos C, Mira E, Van den Brul FA, Liu FT, Chowdhury PS, de los Toyos JR.** Circulating IgG response to stromelysin-3, collagenase-3, galectin-3 and mesothelin in patients with pharynx/larynx squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2001; 21: 3677-84.
- Sunami E, Kanazawa H, Hashizume H, Takeda M, Hatakeyama K, Ushiki T.** Morphological characteristics of Schwann cells in the islets of Langerhans of the murine pancreas. *Arch Histol Cytol*. 2001 May; 64(2):191-201.
- Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM.** CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*. 1998 Feb 1;160(3):1212-8.
- Swarte VV, Mebius RE, Joziase DH, Van den Eijnden DH, Kraal G.** Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells. *Eur J Immunol*. 1998; 28: 2864-71.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH.** A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000. Mar 17; 100(6):655-69.
- Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH.** Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:713-758.
- Takahashi K, Honeyman MC, Harrison LC.** Impaired yield, phenotype, and function of monocyte-derived dendritic cells in humans at risk for insulin-dependent diabetes. *J Immunol*. 1998; 161: 2629-35.
- Takaki T, Marron MP, Mathews CE, Guttmann ST, Bottino R, Trucco M, DiLorenzo TP, Serreze DV.** HLA-A*0201-restricted T cells from humanized NOD mice recognize autoantigens of potential clinical relevance to type 1 diabetes. *J Immunol*. 2006 Mar 1; 176(5):3257-65.
- Tanaka J, Nakamura K, Takeda M, Tada K, Suzuki H, Morita H, Okado T, Hariguchi S, Nishimura T.** Enzyme-linked immunosorbent assay for human autoantibody to glial fibrillary acidic protein: higher titer of the antibody is detected in serum of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 1989; 80:554-60.
- Taniguchi T, Okazaki K, Okamoto M, Seko S, Uchida K, Seino Y.** Presence of autoantibodies to carbonic anhydrase II and lactoferrin in type 1 diabetes: proposal of the concept of autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Diabetes Care*. 2001 Sep;24(9):1695-6.
- Tardy M, Fages C, LePrince G, Rolland B, Nunez J.** Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes. *Mol Aspects Dev Aging Nerv Syst* 1990; 265: 41-52.
- TEDDY Study Group.** The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Dec; 1150:1-13.
- Teft WA, Kirchoff MG, Madrenas J.** A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:65-97.

Teitelman G, Guz Y, Ivkovic S, Ehrlich M. Islet injury induces neurotrophin expression in pancreatic cells and reactive gliosis of peri-islet Schwann cells. *J Neurobiol* 1998; 34: 304-18.

Therlund GM, Dahlquist G, Hansson K, Ivarsson SA, Ludvigsson J, Sjöblad S, Hägglöf B. Psychological stress and the onset of IDDM in children. *Diabetes Care*. 1995 Oct;18(10):1323-9.

Tian J, Zekzer D, Lu Y, Dang H, Kaufman DL. B cells are crucial for determinant spreading of T cell autoimmunity among beta cell antigens in diabetes-prone nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2006 Feb 15;176(4):2654-61.

Tiittanen M, Westerholm-Ormio M, Verkasalo M, Savilahti E, Vaarala O. Infiltration of forkhead box P3-expressing cells in small intestinal mucosa in coeliac disease but not in type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2008 Jun; 152(3):498-507. Epub 2008 Apr 24.

Tisch R, Wang B. Dysregulation of T cell peripheral tolerance in type 1 diabetes. *Adv Immunol*. 2008 ;100:125-49.

Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1987 Oct 15-21; 329(6140):599-604.

Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Jul; 39(7):857-64. Epub 2007 Jun 6.

Törn C, Mueller PW, Schlosser M, Bonifacio E, Bingley PJ and Participating Laboratories. Diabetes Antibody Standardization Program: evaluation of assays for autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2. *Diabetologia* (2008) 51:846–852.

Toscano MA, Bianco GA, Iarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, Zwirner NW, Poirier F, Riley EM, Baum LG, Rabinovich GA. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol*. 8 (2007) 825-834.

Toscano MA, Commodaro AG, Iarregui JM, Bianco GA, Liberman A, Serra HM, Hirabayashi J, Rizzo LV, Rabinovich GA. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J Immunol*. 2006; 176: 6323-32.

Toscano MA, Iarregui JM, Bianco GA, Campagna L, Croci DO, Salatino M, Rabinovich GA. Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007; 18:57-71.

Tough DF, Borrow P, Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*. 1996; 272: 1947-50.

Townsend A, Öhlen C, Bastin J, Ljunggren H-G, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989; 340:443–48.

- Tree TI, Roep BO, Peakman M.** A mini meta-analysis of studies on CD4+CD25+ T cells in human type 1 diabetes: report of the Immunology of Diabetes Society T Cell Workshop. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct; 1079:9-18.
- Trudeau JD, Kelly-Smith C, Verchere CB, Elliott JF, Dutz JP, Finegood DT, Santamaria P, Tan R.** Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood. *J Clin Invest.* 2003 Jan;111(2):217-23.
- Tsui H, Chan Y, Tang L, Winer S, Cheung RK, Paltser G, Selvanantham T, Elford AR, Ellis JR, Becker DJ, Ohashi PS, Dosch HM.** Targeting of pancreatic glia in type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 918-28.
- Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Rønningen KS, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC.** Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature.* 2003 May 29;423(6939):506-11. Epub 2003 Apr 30.
- Uibo R, Lernmark A.** GAD65 autoimmunity-clinical studies. *Adv Immunol.* 2008; 100: 39-78.
- Unger WW, Velthuis J, Abreu JR, Laban S, Quinten E, Kester MG, Reker-Hadrup S, Bakker AH, Duinkerken G, Mulder A, Franken KL, Hilbrands R, Keymeulen B, Peakman M, Ossendorp F, Drijfhout JW, Schumacher TN, Roep BO.** Discovery of low-affinity preproinsulin epitopes and detection of autoreactive CD8 T-cells using combinatorial MHC multimers. *J Autoimmun* 2011 (doi:10.1016/j.jaut.2011.05.012).
- Vaarala O, Atkinson MA, Neu J.** The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes.* 2008 Oct; 57(10):2555-62.
- Vaidya B, Pearce SH, Charlton S, Marshall N, Rowan AD, Griffiths ID, Kendall-Taylor P, Cawston TE, Young-Min S.** An association between the CTLA4 exon 1 polymorphism and early rheumatoid arthritis with autoimmune endocrinopathies. *Rheumatology (Oxford).* 2002 Feb;41(2):180-3.
- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG.** Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011 Jan; 91(1):79-118.
- van den Eynde BJ, van der Bruggen P.** T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:684-93.
- Van der Burg SH, Visseren MJ, Brandt RM, Kast WM, Melief CJ.** Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability. *J Immunol.* 1996 May 1; 156(9):3308-14.
- van der Leij J, van den Berg A, Harms G, Eschbach H, Vos H, Zwiers P, van Weeghel R, Groen H, Poppema S, Visser L.** Strongly enhanced IL-10 production using stable galectin-1 homodimers. *Mol Immunol.* 2007; 44: 506-13.

van der Meide PH, Groenestein RJ, de Labie MC, Heeney J, Pala P, Slaoui M. Enumeration of lymphokine-secreting cells as a quantitative measure for cellular immune responses in Rhesus macaques. *J Med Primatol* 1995; 24(4): 271–281.

Vanden Eijnden S, Goriely S, De Wit D, Willems F, Goldman M. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur J Immunol*. 2005 Feb; 35(2):469-75.

Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orrú V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Taskén K, Cucca F, Mustelin T, Bottini N. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet*. 2005 Dec;37(12):1317-9. Epub 2005 Nov 6.

Varela-Calvino R, Skowera A, Arif S, Peakman M. Identification of a naturally processed cytotoxic CD8 T-cell epitope of coxsackievirus B4, presented by HLA-A2.1 and located in the PEVKEK region of the P2C nonstructural protein. *Journal of Virology*. Dec. 2004, p. 13399–13408 Vol. 78, No. 24.

Vargas F, Julián JF, Llamazares JF, Garcia-Cuyàs F, Jiménez M, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M. Engraftment of islets obtained by collagenase and liberase in diabetic rats: a comparative study. *Pancreas*. 2001 Nov; 23(4):406-13.

Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, Jones R, Ring SM, McArdle W, Pembrey ME, Strachan DP, Dunger DB, Twells RC, Clayton DG, Todd JA. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2005 May;76(5):773-9. Epub 2005 Mar 17.

Verdaguer J, Schmidt D, Amrani A, Anderson B, Averill N, Santamaria P. Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice. *J Exp Med*. 1997; 186: 1663-76.

Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS. Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. 1996 Jul;45(7):926-33.

Vincent A, Willcox N. Characterization of specific T cells in myasthenia gravis. *Immunol Today* 1994; 15:41–42.

Vita R, Zarebski L, Greenbaum JA, Emami H, Hoof I, Salimi N, Damle R, Sette A, Peters B. The immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan; 38(Database issue):D854-62. Epub 2009 Nov 11.

Voigt A, Jäkel S, Textoris-Taube K, Keller C, Drung I, Szalay G, Klingel K, Henklein P, Stangl K, Kloetzel PM, Kuckelkorn U. Generation of in silico predicted coxsackievirus B3-derived MHC class I epitopes by proteasomes. *Amino Acids*. 2010 Jun; 39(1):243-55. Epub 2009 Dec 9.

Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Wang YH, Arima K, Bover L, Hanabuchi S, Khalili J, Marinova E, Zheng B, Littman DR, Liu YJ. Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 24; 106(12):4793-8. Epub 2009 Mar 9.

Vreugdenhil GR, Geluk A, Ottenhoff TH, Melchers WJ, Roep BO, Galama JM. Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia*. 1998 Jan; 41(1):40-6.

- Wainwright, MS, Craft, JM, Griffin, WST, Marks, A, Pineda, J, Padgett, KR, Van Eldik, LJ.** Increased susceptibility of S100B transgenic mice to perinatal hypoxia-ischemia. *Ann. Neurol.* 2004; 56: 61-67.
- Wallace C, Smyth DJ, Maisuria-Armer M, Walker NM, Todd JA, Clayton DG.** The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2010 Jan;42(1):68-71. Epub 2009 Dec 6.
- Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW.** Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctlα-4. *Science.* 1995 Nov 10;270(5238):985-8.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE.** IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:821-52.
- Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, Cui K, Kanno Y, Roh TY, Watford WT, Schones DE, Peng W, Sun HW, Paul WE, O'Shea JJ, Zhao K.** Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4⁺ T cells. *Immunity* 2009; 30:155-167.
- Weinstein DE, Shelanski ML, Liem RK.** Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol.* 1991 Mar; 112(6):1205-13.
- Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA, Gordon JI, Chervonsky AV.** Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1109-13. Epub 2008 Sep 21.
- Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC.** The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:17040-5.
- Wenzlau JM, Moua O, Sarkar SA, Yu L, Rewers M, Eisenbarth GS, Davidson HW, Hutton JC.** Slc30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1150:256-9.
- Westerholm-Ormio M, Vaarala O, Pihkala P, Ilonen J, Savilahti E.** Immunologic activity in the small intestinal mucosa of pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003 Sep; 52(9):2287-95.
- Wilhelm KR, Yanamandra K, Gruden MA, Zamotin V, Malisauskas M, Casaite V, Darinskas A, Forsgren L, Morozova-Roche LA.** Immune reactivity towards insulin, its amyloid and protein S100B in blood sera of Parkinson's disease patients. *Eur J Neurol.* 2007 Mar;14(3):327-34.
- Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG.** Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol* 2009; 155: 173-81).
- Williams D, Watts T.** Molecular chaperones in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 57:77-84.
- Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA.** Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; 391: 177-81; Corrección en *Nature* 1999; 399: 84.

Winer S, Tsui H, Lau A, Song A, Li X, Cheung RK, Sampson A, Afifiyan F, Elford A, Jackowski G, Becker DJ, Santamaria P, Ohashi P, Dosch HM. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not β -cell exclusive. *Nat. Med.* 2003; 9:198-205.

Winter WE, Schatz DA. Autoimmune markers in diabetes. *Clin Chem.* 2011 Feb; 57(2):168-75. Epub 2010 Dec 2.

Wippold, FJ II, Perry A, Lennerz, J. Neuropathology for the Neuroradiologist: Rosenthal Fibers. *American Journal of Neuroradiology* 2006; 27:958-961.

Wolf PR, Ploegh HL. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1995; 11:267–306.

Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2000;9(8):589-93.

Wong FS, Wen L. B cells in autoimmune diabetes. *Rev Diabet Stud* 2005; 2:121-35.

Wong FS. Insulin – a primary autoantigen in type 1 diabetes? *Trends Mol Med* 2005; 11: 445-48.

Wucherpfennig KW. T cell receptor crossreactivity as a general property of T cell recognition. *Mol Immunol* 2004; 40: 1009-17.

Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25–Foxp3– T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β . *J Immunol* 2007; 178:6725-6729.

Yang J, Danke NA, Berger D, Reichstetter S, Reijonen H, Greenbaum C, Pihoker C, James EA, Kwok WW. Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein-reactive CD4+ T cells in human subjects. *J Immunol.* 2006 Mar 1; 176(5):2781-9.

Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 2008; 454:350-2.

Yang L, Zhou ZG, Tan SZ, Huang G, Jin P, Yan X, Li X, Peng H, Hagopian W. Carboxypeptidase-H autoantibodies differentiate a more latent subset of autoimmune diabetes from phenotypic type 2 diabetes among Chinese adults. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Dec;1150:263-6.

Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 6737-42.

Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008; 29:44-56.

Yang Z, Long X, Shen J, Liu D, Dorman JS, Laporte RE, Chang YF. Epidemics of type 1 diabetes in China. *Pediatr Diabetes.* 2005 Sep;6(3):122-8.

Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1310-6.

Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med.* 1979 May 24;300(21):1173-9.

- Yoon JW, Jun HS, Santamaria P.** Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*. 1998; 27: 109-22.
- Yoon JW, Jun HS.** Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther*. 2005 Nov-Dec; 12(6):580-91.
- York I, Rock KL.** Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol*. 1996; 14:369–96.
- Zanone MM, Peakman M, Purewal T, Watkins PJ, Vergani D.** Autoantibodies to nervous tissue structures are associated with autonomic neuropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1993; 36:564-9.
- Zheng W, Flavell RA.** The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997. May 16; 89(4):587-96.
- Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, Killeen N, Urban JF Jr, Guo L, Paul WE.** Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 2004; 5:1157-65.
- Zhu J, Paul WE.** CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112:1557-69.
- Zhu J, Paul WE.** Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010; 20:4-12.
- Zhuo Y, Bellis SL.** Emerging role of alpha 2,6-sialic acid as a negative regulator of galectin binding and function. *J Biol Chem*. 2011 Feb 25; 286(8):5935-41. Epub 2010 Dec 20.
- Zimmer DB, Cornwall, EH, Landar, A, Song, W.** The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 1995; 37:417-29.
- Zuñiga E, Rabinovich GA, Iglesias MM, Gruppi A.** Regulated expression of galectin-1 during B-cell activation and implications for T-cell apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2001 Jul;70(1):73-9.