



Estudio de la respuesta autoreactiva de linfocitos B anti-periferina en la diabetes tipo I

M^a Nahir Garabatos Leitón

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

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

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



Facultad de Biología

Departamento de Fisiología e Inmunología

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA AUTOREACTIVA DE LINFOCITOS B
ANTI-PERIFERINA EN LA DIABETES TIPO I**

Tesis Doctoral

M^a Nahir Garabatos Leitón

2014

Universidad de Barcelona

Facultad de Biología

Departamento de Fisiología e Inmunología

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA AUTOREACTIVA DE LINFOCITOS B
ANTI-PERIFERINA EN LA DIABETES TIPO I**

Memoria presentada por

M^a Nahir Garabatos Leitón

para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Barcelona.

Tesis realizada bajo la dirección del Dr. Thomas Stratmann del
Departamento de Fisiología e Inmunología, Facultad de Biología.

Programa de Biomedicina (2006-2007).

Dr. Thomas Stratmann

M^a Nahir Garabatos Leitón

Barcelona 14 de Julio 2014

A mis padres,

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director de tesis Thomas Stratmann, por haber sido mi maestro y mentor, y por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis.

Agradecer de forma muy especial a mis amigos y compañeros de laboratorio Maxi, Angela, Cris, Elisa, Anna y Annemie porque sin vosotros y sin vuestro apoyo no hubiera sido lo mismo. A Raimon y Nel porque me habéis ayudado a impulsar este proyecto con vuestro esfuerzo y trabajo.

A Joan Verdaguer, Jorge Carrillo y Jorge Carrascal, por darme la oportunidad de formar parte de vuestro proyecto y por haberme ayudado a desarrollarlo.

A Dave Serreze, gracias por acogerme en los EEUU con los brazos abiertos, porque ha sido una de las experiencias más gratificantes que he vivido. A Jonh, Marike, Rob y Deanne por su apoyo y amistad.

A Marga, por ser tan especial y por haberme dado tantos buenos consejos. A Olga, por su amistad y por haberme escuchado y apoyado entre café y café.

Al resto de amigos y compañeros del Departamento: Elisenda, Xavi, Juani, Joan, Nuria, David, Marta, Bárbara, Jordi Peig, Miguel e Irene porque he tenido la suerte de conocer a grandes personas de las que siempre hay algo que aprender.

A todos y cada uno de los miembros del Departamento de Fisiología e Inmunología, porque de una u otra manera formáis parte de esta historia.

A Isabel Crespo y Cristina López, del servicio de citometría del IDIBAPs, por haberme enseñado y ayudado tanto, y sobre todo por recibirnos siempre con una gran sonrisa.

A mi familia, a mis hermanas y a mis sobrinos, Noel, Hugo, Lara, Verito y Eva. De forma especial me gustaría dedicar esta tesis a mi hermana Begoña, porque aunque ya no esté con nosotros, sigue siendo mi mayor referente de coraje, fuerza y valor en la vida.

A personas muy especiales en mi vida como Elida y M^a Dolors por haberme dado todo su apoyo y amor cuando lo he necesitado.

A mis amigas y amigos de siempre, y en especial a Irene, Bárbara, Olalla y María Sánchez.

Por último y no por ello menos importante, a Nuno por todo su amor, dedicación y apoyo incondicional.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| I. Introducción..... | 12 |
| 1 Biología del linfocito B..... | 13 |
| 2 El receptor de linfocitos B. | 14 |
| 2.1 Inmunoglobulinas: proceso de recombinación y generación de diversidad..... | 15 |
| 2.1.1 Reordenamientos primarios de las inmunoglobulinas. | 17 |
| 2.1.2 Reordenamientos secundarios de las inmunoglobulinas. | 18 |
| 2.1.2.1 Hipermutación somática. | 21 |
| 2.1.2.2 Cambio de isotipo..... | 22 |
| 2.2 Desarrollo y maduración de linfocitos B. | 23 |
| 2.2.1 Fase antígeno independiente..... | 23 |
| 2.2.2 Fase antígeno dependiente..... | 26 |
| 2.3 Activación de linfocitos B T dependiente..... | 28 |
| 2.4 Activación de linfocitos B T independiente..... | 32 |
| 2.5 Poblaciones de linfocitos B..... | 33 |
| 2.5.1 Linfocitos B foliculares. | 33 |
| 2.5.2 Linfocitos B marginales. | 34 |
| 2.5.3 Linfocitos B1. | 34 |
| 2.5.4 Linfocitos B reguladores..... | 36 |
| 2.6 Características y función efectora de los anticuerpos. | 36 |
| 3 Mecanismos de tolerancia y autoinmunidad de linfocitos B. | 37 |
| 3.1 Mecanismos de tolerancia central..... | 39 |
| 3.2 Mecanismos de tolerancia periférica..... | 40 |

| | | |
|---------------------------------------|--|-----------|
| 3.3 | Autoinmunidad y pérdida de tolerancia de linfocitos B..... | 41 |
| 4 | Diabetes Tipo I y linfocitos B. | 43 |
| 4.1 | La diabetes tipo I en humanos. | 43 |
| 4.2 | El páncreas. | 44 |
| 4.3 | Epidemiología..... | 45 |
| 4.4 | Etiología de la DT1..... | 45 |
| 4.5 | Histopatología de la enfermedad..... | 47 |
| 4.6 | Anticuerpos en DT1..... | 47 |
| 5 | El ratón NOD como modelo murino de DT1. | 48 |
| 5.1 | Modelos murinos emparentados con NOD resistente a DT1. | 50 |
| 5.2 | Mecanismos efectores de DT1 en ratones NOD. | 51 |
| 5.3 | Autoantígenos y autoanticuerpos relacionados con la DT1 en el modelo de ratón NOD..... | 53 |
| 6 | Papel de los linfocitos B autoreactivos en el desarrollo de la DT1. | 55 |
| 6.1 | Defectos en la tolerancia de linfocitos B en la DT1..... | 57 |
| 7 | Desarrollo de moléculas fluorescentes antígeno-específicas para el estudio y caracterización de linfocitos B. | 58 |
| 8 | Antecedentes del estudio. | 60 |
| 8.1 | La periferrina: proteína de origen neuroendocrino. | 60 |
| 8.2 | Linfocitos B anti-periferrina en el infiltrado de ratones NOD. | 61 |
| II. Hipótesis y Objetivos..... | | 63 |
| III. Materiales y Métodos..... | | 65 |
| 1 | DESARROLLO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y OCTÁMEROS DE PERIFERINA. | 66 |
| 1.1 | Clonación y expresión de proteínas recombinantes de periferrina fusionadas a GST. | 66 |

| | | |
|-------|--|----|
| 1.1.1 | Diseño y clonación de proteínas recombinantes de periferina fusionadas a GST.... | 66 |
| 1.1.2 | Expresión y purificación de proteínas recombinantes de periferina de fusión a GST. | 69 |
| 1.2 | Clonación y expresión de péptidos de periferina fusionados al complejo MHC clase II A ^{g7} | 71 |
| 1.2.1 | Diseño y clonación de péptidos de periferina fusionados A ^{g7} en células S2..... | 71 |
| 1.2.2 | Transfección y expresión de péptidos de periferina fusionados A ^{g7} en células S2... .. | 73 |
| 1.2.3 | Producción y purificación de péptidos de periferina fusionados a A ^{g7} mediante FPLC..... | 74 |
| 1.3 | SDS-PAGE..... | 76 |
| 2 | ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AUTOREACTIVA DE CÉLULAS B ANTI-PERIFERINA..... | 76 |
| 2.1 | Origen, estabulación y mantenimiento de ratones. | 76 |
| 2.2 | Líneas de hibridomas de células B anti-periferina. | 77 |
| 2.3 | Protocolo de inmunización con proteína GST-PRPH 429-507..... | 77 |
| 2.4 | Extracción muestras de sangre y obtención de suero de ratón..... | 77 |
| 2.5 | Medición niveles de glucosa. | 78 |
| 2.6 | ANÁLISIS DE ANTICUERPOS ANTI-PERIFERINA..... | 78 |
| 2.6.1 | Análisis del reconocimiento por Western-blot y Dot-blot. | 78 |
| 2.6.2 | Detección de anticuerpos IgG e IgM anti-periferina mediante ELISA..... | 79 |
| 2.6.3 | Detección de PRPH 467-507 fusionada a A ^{g7} mediante ELISA. | 80 |
| 2.6.4 | Análisis de la especificidad de anticuerpos mediante ELISA de competición..... | 80 |
| 2.6.5 | Análisis de la especificidad de reconocimiento mediante inmunofluorescencia con el neuroblastoma N1E-115..... | 81 |
| 2.7 | ANÁLISIS CELULAR DE LINFOCITOS B ANTI-PERIFERINA. | 81 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.7.1 | Obtención de muestras celulares de bazo, médula ósea, nódulos pancreáticos y peritoneo..... | 81 |
| 2.7.2 | Aislamiento de islotes pancreáticos mediante digestión con colagenasa..... | 82 |
| 2.7.3 | Marcaje de antígenos de superficie y BCR mediante anticuerpos y octámeros de PRPH..... | 82 |
| 2.7.3.1 | Muestras de ratón..... | 82 |
| 2.7.3.2 | Tinción de superficie del hibridoma I6..... | 84 |
| 2.7.3.3 | Análisis mediante citometría de flujo..... | 85 |
| 2.7.4 | Aislamiento de linfocitos B anti-periferina y detección específica de secreción de anticuerpos mediante ELISPOT..... | 85 |
| 3 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 86 |
| IV. | Resultados..... | 87 |
| 1 | IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL EPITOPO RECONOCIDO POR LINFOCITOS B ANTI-PERIFERINA..... | 88 |
| 1.1 | Determinación de la secuencia del epítipo reconocido por hibridomas de células B anti-periferina infiltrantes de islote..... | 88 |
| 1.2 | El epítipo presente en la periferina es de tipo lineal y de baja afinidad..... | 93 |
| 2 | ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL ANTI-PRPH EN RATONES NOD Y CEPAS RESISTENTES A DT1..... | 96 |
| 2.1 | Determinación del desarrollo e isotipo de la respuesta de anticuerpos anti-periferina generada en ratones NOD..... | 96 |
| 2.2 | Análisis de los niveles de anticuerpos anti-periferina en cepas de ratones resistentes a diabetes tipo 1..... | 98 |
| 2.3 | Inducción de anticuerpos anti-periferina en ratones NOD tras inmunización con proteína recombinante PRPH 429-507..... | 99 |
| 2.4 | Respuesta de anticuerpos anti-periferina en ratones transgénicos NOD.TCR α -/- . | 100 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 3 | ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR ANTI-PERIFERINA EN EL MODELO DE RATON NOD | 101 |
| 3.1 | Desarrollo de moléculas octaméricas para el estudio de linfocitos B anti-periferina. | 101 |
| 3.2 | Validación de los octámeros de periferina para estudios de detección de linfocitos B anti-periferina <i>ex vivo</i> en ratones NOD. | 102 |
| 3.3 | Estudio de la distribución de linfocitos B anti-periferina durante el desarrollo de la DT1. | 107 |
| 3.4 | Análisis del fenotipo y estado de activación de la población de linfocitos B anti-periferina presente en ratones NOD. | 109 |
| 3.5 | Detección de linfocitos anti-periferina en ratones resistentes a diabetes C57BL/6. | 112 |
| 4 | IMPLICACIÓN DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS B ANTI-PERIFERINA EN DT1 | 114 |
| 4.1 | Aumento de linfocitos B anti-periferina en peritoneo de ratones NOD diabéticos. | 114 |
| | V. Discusión | 115 |
| | VI. Conclusiones | 124 |
| | VII. Publicaciones y Actividad Científica Resultante de la Etapa Pre doctoral | 127 |
| | VIII. Bibliografía | 130 |
| | IX. Abreviaturas | 149 |
| | X. Anexo | 151 |

I.INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1 Biología del linfocito B.

Los linfocitos B son las células del sistema inmune productoras de anticuerpos, y responsables de la defensa del organismo frente a patógenos externos, mediante la activación directa de la respuesta inmune humoral y a través de su participación activa en la respuesta inmune celular. Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Igs), son los principales efectores de la inmunidad humoral, contribuyendo al desarrollo de esta mediante diferentes mecanismos. En primer lugar, son capaces de unirse de forma específica a virus, bacterias intracelulares y toxinas impidiendo su entrada en células diana de nuestro organismo, en un proceso se conocido como neutralización. En segundo lugar, al unirse al patógeno facilitan la captación de este por células del sistema inmune con capacidad de fagocitosis, como células dendríticas y macrófagos, en lo que se conoce como proceso de opsonización. Por último, los anticuerpos que cubren a un agente patógeno pueden activar la cascada del sistema del complemento por medio de la vía clásica, provocando la lisis directa de ciertos microorganismos al formar poros en sus membranas [1], [2].

Los linfocitos B presentan anclado a membrana la misma Ig soluble que secretan, este receptor de superficie recibe el nombre de BCR (*B Cell Receptor*). Cada linfocito B porta múltiples copias de un único receptor o BCR, y este a su vez reconoce una única región dentro del patógeno que recibe el nombre de antígeno o epítipo. Cuando un linfocito B reconoce su antígeno específico a través del BCR, se inician una serie de eventos que llevan finalmente a su activación y diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos, y a linfocitos B de memoria responsables de la respuesta inmunitaria específica en posteriores encuentros con el antígeno, conocida como respuesta inmune adaptativa [3].

Por otra parte, los linfocitos B son células que poseen capacidad de procesar y presentar antígenos en el contexto de MHC (*Major Histocompatibility Complex*), al igual que macrófagos y células dendríticas. En este sentido, cumplen una función de nexo importante entre la respuesta inmune humoral y celular, ya que pueden presentar antígenos de patógenos activando la respuesta efectora de linfocitos T CD4 y T CD8. Los linfocitos T CD4 cumplen una función crucial a través de la secreción de citocinas y activación de linfocitos B, mientras los linfocitos T CD8 se caracterizan por su actividad efectora citotóxica [3].

Todos estos procesos en conjunto, ponen en marcha la maquinaria del sistema inmune que tiene como objetivo final proteger al organismo del ataque de agentes patógenos externos. En ocasiones, debido a fallos en el proceso de desarrollo, maduración y tolerancia se generan

linfocitos B con capacidad de reconocer y responder frente a antígenos propios o autoantígenos. Cuando esto ocurre, nuestro propio sistema inmune se vuelve capaz de atacar y destruir células de nuestro organismo, dando lugar al desarrollo de procesos autoinmunitarios.

A continuación profundizaremos en el desarrollo, maduración y activación de las diferentes poblaciones de linfocitos B, para más adelante explicar en detalle cuales son los mecanismos que posee el sistema inmune para el control de la tolerancia de linfocitos B.

2 El receptor de linfocitos B.

El receptor de los linfocitos B o BCR está formado por una molécula de Ig de membrana, asociada a dos cadenas $Ig\alpha$ o $CD79\alpha$ e $Ig\beta$ o $CD79\beta$, y a un complejo correceptor compuesto por tres proteínas: $CD19$, $CD21$ y $CD81$ (figura 1) [4].

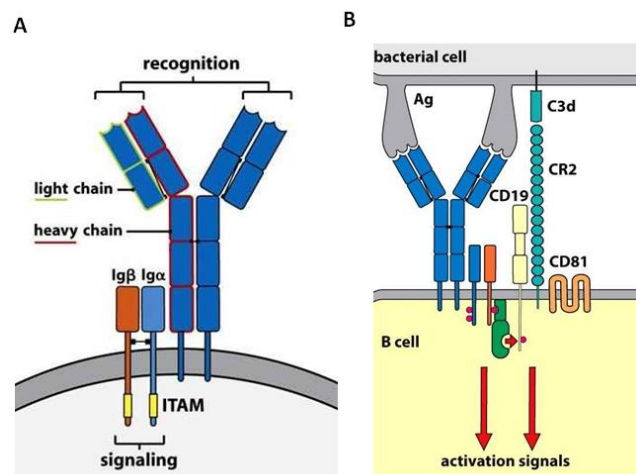


Figura 1. Receptor de linfocitos B. A. Estructura de la Ig de superficie asociada a las cadenas $Ig\alpha$ ($CD79\alpha$) e $Ig\beta$ ($CD79\beta$), responsables de la señalización intracelular. B. Complejo correceptor del linfocito B formado por la asociación de la Ig de superficie con las moléculas $CD19$, $CR2$ o $CD21$ y $CD81$ [4].

La Ig de superficie, es una glicoproteína de membrana capaz de unirse de forma específica al antígeno, a través de un dominio de reconocimiento o región variable formado por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas [5]. Las cadenas $Ig\alpha$ y $Ig\beta$, unidas entre sí por puentes disulfuro, presentan regiones intracelulares ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) responsables de la señalización intracelular del receptor [6].

El complejo correceptor interviene en la potenciación de la señal de activación del linfocito B. En este sentido, la molécula CD21 también conocida como receptor del complemento 2 oCR2, es capaz de unir moléculas del complemento CD3d depositadas sobre la superficie del patógeno. Este proceso, da lugar a la unión del complejo correceptor con la Ig de superficie y genera señales intracelulares que potencian la respuesta de los linfocitos B a través de la molécula correceptora CD19 [7].

2.1 Inmunoglobulinas: proceso de recombinación y generación de diversidad.

Como ya se ha comentado anteriormente, las Igs están formadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas por puentes disulfuro y cada una de ellas presenta una región variable y una región constante. En ratón existen dos subtipos de cadenas ligeras, κ y λ , y nueve diferentes cadenas pesadas, que definen el isotipo correspondiente de la Ig: μ (IgM), d(IgD), g1(IgG1), g2a(IgG2a), g2b(IgG2b), g2c(IgG2c), g3(IgG3), e(IgE) y a(IgA). En humanos, los isotipos difieren con respecto a ratón, y se definen como μ (IgM), d(IgD), g1(IgG1), g2(IgG2), g3(IgG3), g4(IgG4), e(IgE), a1(IgA1) y a2(IgA2) [8].

La región variable de cada Ig es responsable del reconocimiento del antígeno y la constante de las funciones efectoras del anticuerpo. Las moléculas de Igs están codificadas por tres loci en humanos y ratón. En ratón, la cadena ligera (IgL) está codificada por los loci κ y λ , localizados en el cromosoma 6 y 16 respectivamente, mientras el locus de la cadena pesada (IgH) se localiza en el cromosoma 12. En humanos, los loci κ y λ de la IgL se localiza en el cromosoma 2 y 22 respectivamente, mientras el locus de la IgH se localiza en el cromosoma 14.

El locus IgH presenta una región 5' donde se localizan los genes que codifican para la región variable de las Igs. Estos genes se agrupan dentro de tres familias V_H , D y J_H . En posición 3' se localizan los genes de la familia C_H (región constante) que codifican para los diferentes isotipos de las Igs. En ratón, se han descrito 4 genes diferentes dentro de la familia J_H y 30 genes para la familia D, de los cuales solamente 19 son funcionales. En el caso de los genes V_H actualmente existe controversia acerca del número existente, aunque investigaciones recientes apuntan a la presencia de 141 genes, de los cuales únicamente entre 92 y 12, dependiendo de la cepa de ratón, son funcionales [9]. En humanos, se han identificado 9 genes J_H , 27 genes D y 123 genes V_H [10].

En ratón, el locus IgL-k está formado por 5 genes J_L y 140 genes V_L localizados aguas arriba de la región constante [11]. El otro locus IgL- λ posee únicamente 8 segmentos génicos V_L y 5 genes V_L de los cuales únicamente 3 son funcionales.

Durante el desarrollo de los linfocitos B, los genes codificantes para las Igs se reorganizan en numerosas ocasiones, dando lugar a un amplio repertorio de Igs de diferentes especificidades. Como ya se ha mencionado anteriormente, la región variable de las Igs es la responsable del reconocimiento de antígeno, y por lo tanto, es la zona donde se localizan las regiones más variables en las Igs. En esta zona de la cadena pesada y ligera, se localizan tres regiones de hipervariabilidad o determinantes de complementariedad conocidas como CDR1, CDR2 y CDR3 (*Complementary Determining Regions*). Como se puede ver en la figura 2, estas tres regiones se encuentran flanqueadas por unas regiones marco más conservadas FW1, FW2, FW3 y FW4 (*Framework*) responsables de la conformación del centro de unión al antígeno. CDR1 y CDR2 son codificados por los genes V, mientras CDR3, resulta de la recombinación de los genes VDJ en la cadena pesada y los VJ en la cadena ligera. Debido a esto, CDR3 presenta una alta diversidad y es el principal responsable de la especificidad de la inmunoglobulina.

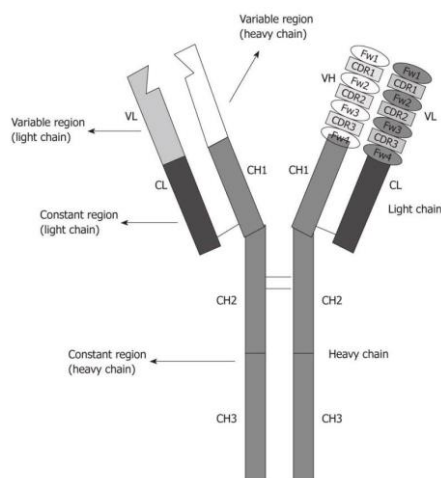


Figura 2. Estructura general de las inmunoglobulinas. Las moléculas de inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras unidas entre sí por puentes disulfuro. Cada cadena presenta una región constante, que define la funcionalidad del anticuerpo y una región variable implicada en el reconocimiento del antígeno. En esta región variable se localizan regiones marco conservadas o Fw (*Framework region*) implicadas en la conformación del centro de reconocimiento y unas regiones de hipervariabilidad o CDR (*Complementarity determining region*) que definen la especificidad de la inmunoglobulina [12]

A continuación se explicarán en detalle los procesos de reorganización genética que sufren los genes de las Igs durante el desarrollo y función efectora del linfocito B.

2.1.1 Reordenamientos primarios de las inmunoglobulinas.

La recombinación de los segmentos V(D)J es uno de los eventos clave durante el desarrollo de los linfocitos B en médula ósea. Durante este proceso, muchos genes V pueden recombinar primero con los diferentes genes de la familia D, en el caso de la cadena pesada, y estos a su vez con los genes de la familia J. Este fenómeno ocurre de forma casi aleatoria tanto en la cadena pesada como en la ligera. Por otra parte, durante el proceso de recombinación se añaden y se eliminan nucleótidos a las secuencias flanqueantes. De esta forma, la recombinación primaria en médula ósea se convierte en el principal mecanismo de generación de diversidad del repertorio de Igs [4].

Los diferentes fragmentos V, D (en el caso de la cadena pesada) y J se encuentran flanqueados por unas secuencias altamente conservadas que reciben el nombre de señales de recombinación (RSS) (figura 3). Estas secuencias se localizan en el extremo 3' de la región V, en el extremo 5' la región J, y a ambos lados de la región D, y se componen de un heptámero y un nonámero espaciados por secuencias de 12 o 23 pb que se corresponden con una o dos vueltas de hélice de DNA, respectivamente [4].

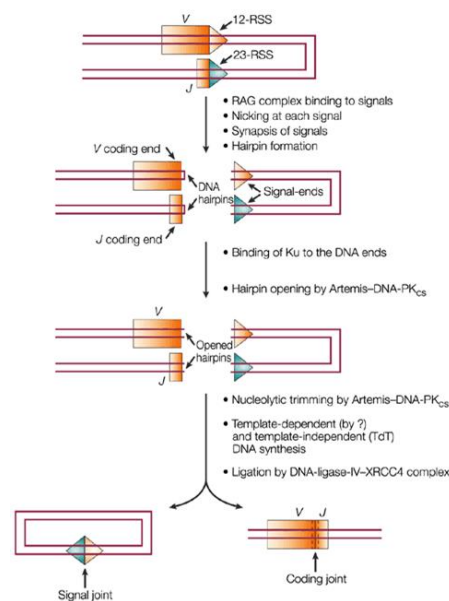


Figura 3. Proceso de recombinación de las inmunoglobulinas mediado por proteínas RAG. Las proteínas RAG inician el proceso de recombinación mediante secuencias 23-RSS y 12-RSS que flanquean los segmentos génicos V, D y J y siguiendo la regla 12/23. El complejo RAG corta la doble cadena en estas regiones generando extremos 3'-OH que se cierran en forma de horquilla con la cadena complementaria. A continuación, interviene el complejo de nucleasas Artemis-DNA-PKcs que abre las horquillas, permitiendo la adición o eliminación de nucleótidos en 3' y 5' mediante la acción de polimerasas que trabajan con la cadena molde o de forma independiente como la TdT (deoxynucleotidyl transferase). Finalmente, el complejo XRCC4-DNA-Ligasa 4, liga los extremos del DNA finalizando el proceso. [13].

Se ha descrito que durante este proceso la recombinación entre secuencias 23-RSS y 12-RSS se produce de manera más eficiente, siguiendo la denominada regla 12/23 [14]. La recombinación de V(D)J requiere de la activación de los genes de recombinación 1 y 2, conocidos como RAG 1 y RAG 2 [15]. La expresión de proteínas RAG está regulada durante el desarrollo de linfocitos T y B [16].

Las proteínas RAG reconocen las secuencias flanqueantes 23-RSS y 12-RSS, y las cortan generando extremos 3'-OH, que se cierran en forma de horquilla con la cadena complementaria (figura 3). A continuación, intervienen el complejo de nucleasas Artemis-DNA-PKcs que abre las horquillas, permitiendo la adición o eliminación de nucleótidos en 3' y 5' mediada por polimerasas que trabajan con la cadena molde o de forma independiente como la TdT (*deoxynucleotidyl transferase*). Finalmente, el complejo XRCC4-DNA-Ligasa 4, liga los extremos del DNA [13].

En ratón, el bloqueo de genes RAG o deficiencias en alguna de las enzimas del sistema de recombinación bloquea completamente el desarrollo de linfocitos T y B, en lo que se conoce como inmunodeficiencia combinada grave (SCID) [17]. En humanos, las mutaciones en RAG1 o RAG2 son la causa de un trastorno hereditario conocido como síndrome de Omenn [18].

Por otra parte, hay que señalar que durante el desarrollo del linfocito B, tanto en médula ósea como en bazo, existen procesos de control de funcionalidad y tolerancia del BCR donde interviene el mecanismo de recombinación mediado por RAG. En médula ósea, como se explicará más adelante en detalle, en el caso de que se generen cadenas de Igs defectuosas o con capacidad de reconocer antígenos propios, pueden darse reordenamientos genéticos secundarios de los genes de las Igs en un proceso conocido como edición del receptor. Por otra parte, los linfocitos B en periferia podrían sufrir también reorganizaciones secundarias mediadas por proteínas RAG. Como se explicará más adelante, estos mecanismos están relacionados con procesos de maduración de afinidad de las Igs y control de tolerancia y se conocen como revisión del receptor.

2.1.2 Reordenamientos secundarios de las inmunoglobulinas.

La recombinación V(D)J mediada por RAG se encarga de la diversificación inicial del repertorio primario de Igs de las células B que se desarrollan en médula ósea. Aunque este repertorio primario es amplio, en periferia puede darse una mayor diversificación incrementando tanto la capacidad de las Igs para reconocer antígenos extraños, como las capacidades efectoras de los anticuerpos. Esta fase secundaria de diversificación ocurre en las células B activadas y es

impulsada en su mayor parte tras el reconocimiento y unión al antígeno. La diversificación se lleva a cabo mediante tres mecanismos, hipermutación somática, cambio de isotipo y conversión génica. Estos mecanismos alteran la secuencia de la Ig de diferente manera [Revisado en 4].

La recombinación de cambio de isotipo, involucra los genes de la región constante de la cadena pesada donde se reemplaza la región C μ original por una región C alternativa, lo que aumenta la diversidad funcional del repertorio de Igs.

La hipermutación somática y la conversión génica afectan a la región variable de la inmunoglobulina. La hipermutación somática, diversifica el repertorio de anticuerpos al introducir mutaciones puntuales en las regiones V de la cadena ligera y pesada, lo que altera la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

La conversión génica diversifica el repertorio de anticuerpos primario en algunas especies de mamíferos y aves, entre ellos el pollo, el conejo y la oveja. En este caso, durante el proceso se reemplazan bloques de secuencias de las regiones variables, por secuencias derivadas de las regiones variables de pseudogenes.

Al igual que la recombinación V(D)J mediada por RAG, estos procesos involucran eventos de recombinación de los genes que codifican Igs, pero al contrario de la recombinación V(D)J, son llevados a cabo por una enzima denominada desaminasa de citidina inducida por activación (AID), que se expresa sólo en linfocitos B y no en linfocitos T.

La secuencia de la enzima AID se relaciona con la de una proteína conocida como APOBEC1 (enzima editora de mRNA de apolipoproteína B, polipéptido catalítico 1), que convierte a la citosina del mRNA de la apolipoproteína B en uracilo, mediante desaminación; así, al principio se creyó que la AID actuaba como una desaminasa de citidina de mRNA. Aunque esto aún es una posibilidad, pruebas actuales sugieren que la AID también puede actuar como una desaminasa de citidina de DNA, que desamina de manera directa los residuos de citidina de los genes de Ig y los transforma en uridina.

La AID puede unirse al DNA monocatenario y desaminarlo, por lo que para que la enzima actúe, la doble hélice de DNA debe estar desenrollada; este fenómeno parece estar desencadenado por la transcripción de secuencias cercanas. Al inicio del proceso, la AID inicia un ataque nucleófilo sobre el anillo de pirimidina de la citidina expuesta convirtiéndolo en un anillo de uridina. En este punto, otras enzimas de reparación de DNA ubicuas pueden cooperar con la AID alterando la secuencia del DNA monocatenario mediante otros mecanismos. En este sentido, el residuo uracilo producido por la AID puede ser el sustrato de la enzima de reparación por escisión de bases de uracilo-DNA-glucosilasa (UNG), que elimina la base

pirimidina para formar un sitio abásico en el DNA. Además de esto, la endonucleasa apúrica/apirimídica 1 (APE1) puede escindir el resto del residuo, lo que produce una mella en una sola cadena del DNA, en el sitio de la citosina original. La UNG y la APE1 son enzimas presentes en todas las células, que reparan con eficiencia las conversiones frecuentes de citosina en uracilo y los sitios abásicos resultado del daño espontáneo del DNA.

La AID sólo es funcional en las células B activadas y al incrementar en forma considerable el daño del DNA presente en los genes de Igs, aumenta en gran medida la probabilidad de que este daño sea reparado de modo incorrecto y dando lugar a mutaciones.

Los tres tipos mecanismos de diversificación, pueden provocar diferentes tipos de mutación en los genes de las Igs (figura 4). Estas mutaciones se describen con mayor detalle en las secciones siguientes.

Si sólo actúa la AID sobre el DNA, únicamente ocurrirá hipermutación somática. Los sitios abásicos generados por la UNG también pueden dar lugar a hipermutación somática por sustitución de nucleótidos en el momento de la replicación. Por otra parte, se cree que las mellas de cadena individual generadas por la APE1 son una señal requerida para iniciar el proceso de replicación con molde usando secuencias homólogas que ocurre durante el proceso de conversión génica.

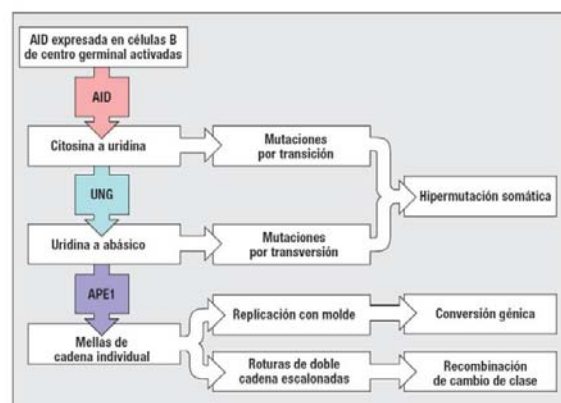


Figura 4. Mecanismos implicados en el reordenamiento secundario de las inmunoglobulinas. Acción de las enzimas AID, UNG y APE1 a nivel de mutaciones por transición, por transversión o por mellas en el DNA implicadas en los procesos de recombinación somática, cambio de clase o conversión génica. [4].

Por último, se cree que una alta densidad de mellas de cadena individual en regiones específicas que flanquean genes de la región C, genera las roturas de doble cadena escalonadas que se requieren para el cambio de clase.

2.1.2.1 Hipermutación somática.

El fenómeno de hipermutación somática opera en linfocitos B localizados en órganos linfoides periféricos, una vez se han producido los reordenamientos primarios de las Igs en médula ósea. En humanos y ratón, los fenómenos de hipermutación somática se dan de forma general en linfocitos B maduros que han sido activados por su antígeno correspondiente con ayuda de los linfocitos T en los centros germinales. En este sentido, un estudio reciente en ratón describe también la presencia de señales de hipermutación somática en linfocitos B inmaduros, incluso en ausencia de linfocitos T [19]. En humanos, se ha descrito también que este fenómeno podría ocurrir en ausencia de ayuda de linfocitos T [20].

La hipermutación somática es un proceso donde se introducen mutaciones dentro de la secuencia V(D)J inicial [21]. Este proceso tiene lugar preferentemente en regiones de la secuencia denominados puntos calientes (*hot spots*) donde se acumulan el mayor número de mutaciones. Estas mutaciones iniciadas por la AID, suelen ser de tipo transicional, es decir, una base pirimidínica es sustituida por una base pirimidínica (C/T) o una base purínica es sustituida por una base purínica (A/G). En este sentido, también se han descrito mutaciones menos frecuentes de tipo transversal, donde una pirimidina es sustituida por una purina.

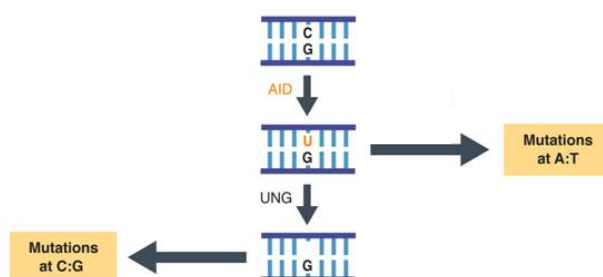


Figura 5. Mecanismos de hipermutación somática. Durante el proceso de hipermutación somática la enzima AID inicia el proceso de deaminación de una citosina, transformándola en un uracilo. Este durante la replicación de la célula puede ser considerado como una timina por las polimerasas dando lugar a una mutación de tipo transicional. Podría darse el caso de que la una vez generado el uracilo, la enzima UNG actuase sobre la cadena dejando un sitio abásico, de esta forma durante la replicación las polimerasas podrían introducir cualquiera de los cuatro nucleótidos, dando lugar a mutaciones por transición o transversión [22].

El proceso de hipermutación somática se inicia por la desaminación de una citosina mediante la acción de la AID, transformándola en un uracilo (figura 5); a continuación, este uracilo puede ser tratado como una timina (mutación transicional) o puede ser reconocido por la enzima UNG, siendo eliminado el residuo y generando un sitio abásico. En este último caso, puede ser

reemplazado mediante la acción de polimerasas por una base pirimidínica (mutación transicional) o purica (mutación transversal) [22].

2.1.2.2 Cambio de isotipo.

Las primeras Igs expresadas por los linfocitos B son de tipo IgM e IgD, y el primer anticuerpo que se produce en una respuesta inmunitaria es de tipo IgM. Durante el transcurso de la respuesta inmunitaria, la misma región V ensamblada puede ser expresada en anticuerpos con isotipo IgG, IgA o IgE. Esta variación de isotipo se conoce como cambio de clase [Revisado en 4]. Este mecanismo es estimulado en el transcurso de una respuesta inmunitaria por señales externas como citocinas liberadas por células T o señales mitógenas suministradas por los agentes patógenos. Está guiado por secuencias de DNA repetitivas, o regiones de cambio (S), que se encuentran aguas abajo de los genes de la región C de las Igs, con excepción del gen δ (figura 6). El cambio se produce mediante el inicio de la transcripción a través de estas regiones de promotoras (flechas figura 6) localizados aguas arriba de cada región S. Debido a la naturaleza de las secuencias repetitivas, la transcripción por medio de regiones S genera lazos R (regiones extendidas de DNA monocatenario formadas por la cadena que no funciona como molde), que sirven como sustrato para la AID, y después para la UNG y para la APE1. Estas actividades introducen una alta densidad de mellas de cadena individual en la cadena de DNA que no funciona como molde y probablemente también un número menor de mellas en la cadena molde. Las muescas escalonadas se convierten en roturas de doble cadena mediante un mecanismo desconocido. Estas roturas son reconocidas de forma putativa por la maquinaria de reparación de roturas de doble cadena de la célula, en un proceso que involucra la participación de la DNA-PKcs y de otras proteínas de reparación. Las dos regiones de cambio, en este caso S_{μ} y S_{ϵ} , se juntan por medio de esta maquinaria y el cambio de clase se completa mediante escisión de la región de DNA interpuesta (incluyendo a C_{μ} , C_{δ} y C_{γ}) y la ligación de las regiones S_{μ} y S_{ϵ} .

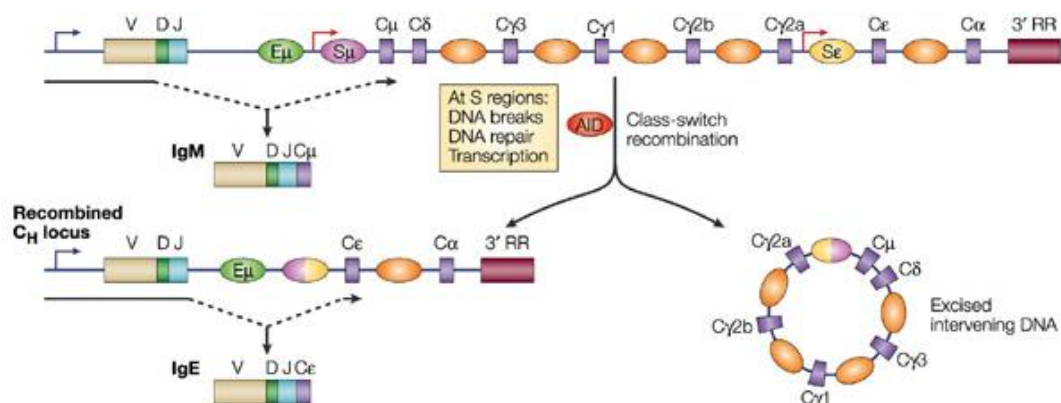


Figura 6. Mecanismo de cambio de isotipo de IgM a IgE. El proceso de recombinación se inicia con la activación y transcripción de las regiones S μ y S ϵ . La enzima AID actúa cambiando C por U, y a continuación las enzimas UNG y APE1 eliminan los U y fragmenta la cadena de DNA. A continuación se lleva un proceso de empalme, uniendo la región VDJ a la nueva cadena pesada C ϵ , generándose un círculo de DNA mediante escisión que porta la región génica intermedia eliminada [23].

2.2 Desarrollo y maduración de linfocitos B.

Durante el desarrollo fetal, los linfocitos B son generados en el hígado, pero tras el nacimiento esta función pasa a tener lugar a nivel de médula ósea [24]. Así, en individuos adultos los linfocitos B se originan en la médula ósea de donde salen en un estado inmaduro transicional, para culminar su maduración en el bazo [25]. Las células B maduras recirculan por los diferentes órganos linfoides secundarios, donde pueden ser estimuladas si se encuentran con el antígeno. De este modo podemos clasificar en dos fases la maduración de los linfocitos B, una primera fase antígeno-independiente que tiene lugar en médula ósea y es dependiente de factores de migración y supervivencia como CXCL12 e IL7 [26], y una segunda fase antígeno-dependiente en bazo, donde el reconocimiento y fuerza de interacción del BCR con el antígeno será crucial en la maduración del linfocito B y su diferenciación final célula folicular o marginal [27].

2.2.1 Fase antígeno-independiente.

La etapa de diferenciación en médula ósea comienza a partir de células hematopoyéticas pluripotenciales o HSC, y se caracteriza por sucesivos reordenamientos de los genes de las Igs, con el objetivo de conseguir un receptor de antígeno funcional. Muchos de los factores secretados por la médula ósea así como las interacciones con las células del estroma participan en el desarrollo de los linfocitos B [Revisado en 4 y 28]. En un primer paso de diferenciación, las células HSC se diferencian a células progenitoras linfoides o MPP, a partir de la cual se

originan células de la estirpe mieloide o linfoide. Las células MPP expresan en superficie FLT3, una tirosincinasa que se une a su ligando presente en la superficie de las células del estroma. De este modo, la señalización a través de FLT3 dirige la diferenciación celular de MPP hacia progenitores linfoides común o CLP e induce la expresión en superficie del receptor para la interleucina 7 (IL-7). La IL-7 secretada por las células del estroma es esencial para el desarrollo y supervivencia de linfocitos B en ratón. Por otra parte, las células del estroma secretan de forma constitutiva la quimiocina CXCL12 necesaria para la retención de progenitores de linfocitos B en médula ósea. Otro factor de supervivencia descrito, es la TLSP (linfopoyetina derivada del estroma de timo), y en ratón se ha visto que al menos durante el desarrollo embrionario tiene una función importante en el desarrollo de linfocitos B en hígado, así como durante el período perinatal en médula ósea.

El CLP inicia la diferenciación a linfocito B inmaduro a través de diferentes estadios de maduración controlados por la expresión de diferentes factores de transcripción y factores de crecimiento celular. Durante este proceso se llevará a cabo la reorganización de los genes de las Igs para expresar un receptor maduro en superficie (figura 7).

En una primera fase temprana los precursores reciben el nombre células pro-B. Durante esta etapa los factores de transcripción E2A y EBF inducen la expresión de proteínas clave para el inicio de la recombinación primaria de los genes de las Igs como RAG1 y RAG2 (*recombination-activating genes*) [15].

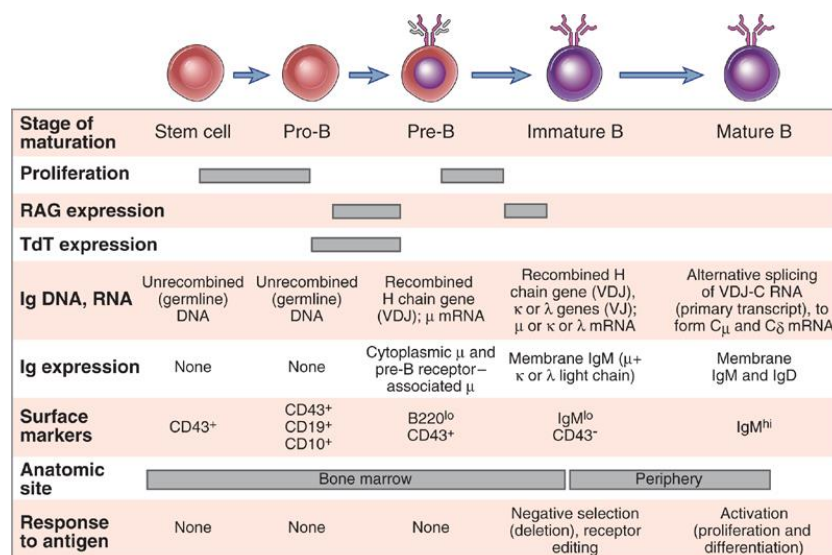


Figura 7. Esquema de las diferentes etapas de desarrollo y maduración del receptor de los linfocitos B en médula ósea y periferia [28].

Otra proteína clave inducida por E2A y EBF es el factor de transcripción Pax5 que interacciona con CD19 y la cadena Ig α expresadas en la membrana de la célula pro-B, y parece estar relacionado con el compromiso de diferenciación final a linfocito B. En este sentido, la ausencia de expresión de Pax5 dirige los progenitores de médula ósea hacia linfocitos T y células de la estirpe mieloide. El proceso de recombinación en esta fase se inicia con la reorganización de los segmentos D y J_H de la cadena pesada, que se continúa con la reorganización de la región V_H con el segmento DJ_H, para la expresión completa de la cadena pesada de la inmunoglobulina en superficie (figura 7). Si la reorganización con los fragmentos del mismo loci en este punto no es exitosa, puede continuar el proceso de recombinación con la reorganización del otro alelo [29]. Durante esta etapa, se induce la expresión de la enzima TdT, que contribuye al aumento de diversidad de repertorio de inmunoglobulinas mediante la adición de nucleótidos extra (nucleótidos N) en las articulaciones V-D y D-J durante el proceso. Un reorganizamiento exitoso V_HDJ_H da lugar al cese del proceso de recombinación y expresión primaria de una cadena pesada tipo μ (IgM) en la superficie. Se calcula que un 45% de células pro-B son eliminadas en esta etapa debido a la producción de reordenamientos improductivos. En este punto, las células avanzan hacia la siguiente etapa de maduración donde reciben el nombre de células pre-B. En este punto disminuye el nivel de expresión de TdT, y mediante la actividad de E2A y EBF se expresan los genes de dos cadenas ligeras sustitutas Vpre-B and $\lambda 5$ (*surrogate light chains*) que se juntarán con la cadena pesada, para dar lugar a un precursor de Ig de membrana en superficie que recibe el nombre de receptor pre-B. Este receptor de expresión transitoria se asocia en membrana a Ig α y Ig β , moléculas encargadas de la transducción de las señales intracelulares. La señalización del receptor pre-B está asociado a las moléculas BLNK y la tirosinasa Btk. En humanos mutaciones en el gen btk son el origen de la enfermedad conocida como agammaglobulinemia de Bruton, una inmunodeficiencia ligada al cromosoma X que se caracteriza por la ausencia de Igs y linfocitos B maduros en periferia [30].

Durante esta etapa la señalización recibida a través del receptor será fundamental para el desarrollo del linfocito B. En este sentido, la posibilidad de reordenamientos V(D)J exitosos en ambos alelos podría dar lugar a la expresión anormal de inmunoglobulinas de superficie de diferentes especificidades. Para evitarlo, la señalización a través del receptor pre-B pone en marcha un mecanismo de exclusión alélica a través del cual solamente uno de los dos alelos puede ser expresado en las células. Este mecanismo es llevado a cabo de diferentes maneras, por un lado la señalización del pre-BCR disminuye la expresión de las recombinasas RAG1 y RAG2 en la célula, y por otro reduce la accesibilidad de la maquinaria de recombinasas al locus

de la cadena pesada, aunque el mecanismo no está claro. En ausencia de señal, la reorganización de los genes continúa hasta alcanzar la expresión de un receptor pre-B funcional.

En la fase de transición de células pro-B a pre-B, las células con receptores pre-B funcionales se dividen varias veces en células pre-B de menor tamaño e inician la reorganización de los genes de la cadena ligera V_LJ_L mediante el aumento de expresión de las recombinasas RAG1 y RAG2. Primero lo harán para los genes de la cadena κ , y si esta no es funcional reorganizarán la región λ , en lo que se conoce como mecanismo de exclusión isotípica. Los reordenamientos de la cadena ligera tienen lugar en un alelo a la vez, de manera que un cromosoma puede hacer múltiples reordenamientos antes de iniciar el proceso en el otro cromosoma. En el momento en el que se alcance una reorganización exitosa de la cadena ligera, donde también intervienen mecanismos de exclusión alélica, esta se expresará en superficie reemplazando a las cadenas ligeras sustitutas V_{pre-B} and λ_5 del receptor. Las proporciones de expresión de cadena ligeras κ y λ varían entre especies. En ratón, un 95% expresan cadena κ y un 5% λ , mientras en humano un 65% expresan κ y un 35% λ . Una vez terminado el proceso, el linfocito B inmaduro expresará en membrana una Ig de tipo IgM.

2.2.2 Fase antígeno-dependiente.

Los linfocitos B inmaduros que salen de médula ósea hacia bazo, órgano donde completarán el proceso de maduración, reciben el nombre de linfocitos B transicionales T1 y se definen como IgM⁺⁺, IgD⁻, CD21⁻, CD23⁻ (figura 8). Una vez allí, los linfocitos T1 se localizan en la zona externa de la pulpa blanca, los PALS (*Periarteriolar Lymphoid Sheath*), y posteriormente migrarán hacia la zona folicular, donde adquirirán la expresión en superficie de IgD, CD21 y CD23, transformándose en linfocitos B transicionales tipo T2, población definida como IgM⁺⁺, IgD⁺⁺, CD21⁺⁺ y CD23⁺ [Revisado en 31]. En este estadio los linfocitos B se caracterizan por presentar una alta capacidad proliferativa y elevada resistencia a la apoptosis. Recientemente, se ha descrito que la molécula CD23 es capaz de unir inmunocomplejos de anticuerpos IgE procedentes del torrente circulatorio, transportando antígeno a los folículos donde pueden ser captados por células dendríticas que los presentan a linfocitos T potenciando la respuesta inmune [32]. Se postula que el factor BAFF (*B Cell Activation Factor of TNF Family*) presente en bazo, podría ser decisivo para el paso del estadio T1 al T2. Algunos autores apuntan a la

presencia de una tercera población T3 [33], pero recientemente se ha demostrado que se trata de un compartimento transicional formado por linfocitos B anérgicos [34].

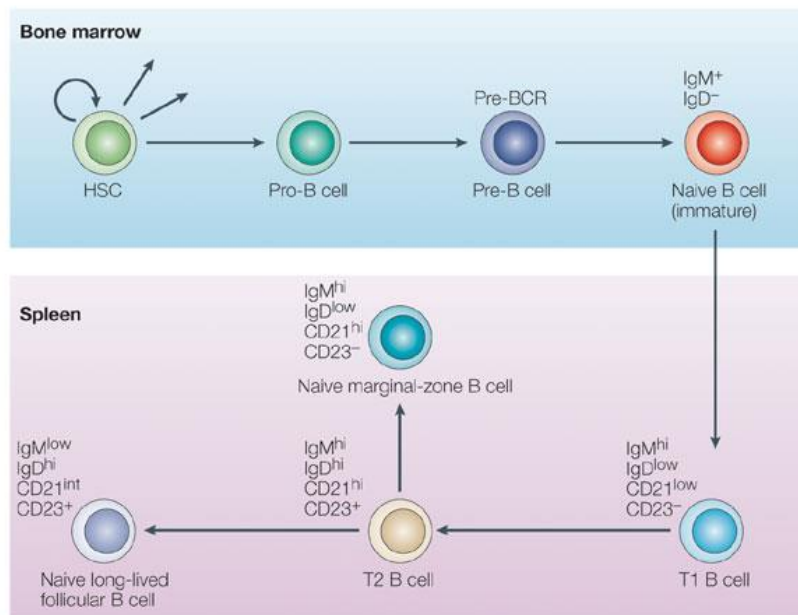


Figura 8. Etapas de desarrollo y diferenciación de las principales poblaciones de linfocitos B en bazo [31].

Los linfocitos B transicionales T2 continúan con su proceso de maduración en bazo dando lugar a las dos grandes poblaciones de linfocitos maduros de tipo B2, los linfocitos B foliculares (FO) caracterizados por la expresión de $IgM^{-/int}$, IgD^{++} , $CD21^{-/int}$ y $CD23^{+}$, y los linfocitos B marginales (MZ) definidos como IgM^{++} , $IgD^{-/int}$, $CD21^{++}$ y $CD23^{-}$ (Figura 8). Recientemente, se ha postulado que los linfocitos MZ podrían originarse también a partir de linfocitos B FO esplénicos [35].

Existe una tercera población de linfocitos B, los linfocitos B1. Estos linfocitos poseen un desarrollo y localización fisiológica diferente al resto, como se comentará más adelante, y se encuentran principalmente en peritoneo y cavidades serosas [36].

Los linfocitos B FO conforman la población mayoritaria en bazo y se localizan principalmente en los folículos primarios y folículos secundarios (GC) de la pulpa blanca, en contacto con los linfocitos T de la zona T. Los linfocitos B MZ se localizan en la zona marginal de bazo, entre la pulpa blanca y la pulpa roja y se encuentran implicados principalmente en la primera línea de defensa o respuesta innata frente a patógenos (figura 9) [37].

La activación de linfocitos B puede producirse mediante dos vías, una dependiente de la colaboración de linfocitos T que se conoce como respuesta T-dependiente, y otra independiente de señales de coestimulación de linfocitos T conocida como respuesta T-independiente.

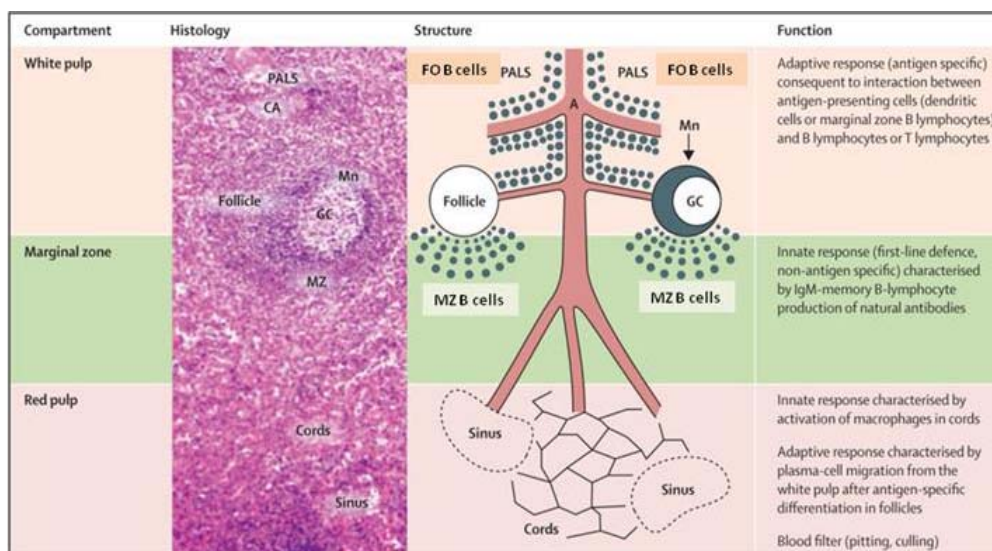


Figura 9. Localización y función de los linfocitos B FO y MZ en los diferentes compartimentos de bazo. CA=arteriola central. GC=centro germinal. Mn=zona de manto. MZ=zona marginal. PALS=*periarteriolar lymphoid sheath* [37].

Los linfocitos B FO son los principales responsables de la respuesta T-dependiente, mientras que los linfocitos B MZ y de tipo B1 se activan principalmente por respuestas de tipo T-independiente. A continuación profundizaremos en la descripción de ambas vías de activación.

2.3 Activación de linfocitos B T-dependiente.

El desarrollo de la respuesta de linfocitos B FO T-dependiente es llevado a cabo en los folículos primarios de los diferentes órganos linfoides secundarios tras el encuentro con antígeno, que en este tipo de respuesta suele ser de origen proteico. El linfocito B FO puede reconocer antígenos solubles en el folículo procedentes del sistema linfático, en la superficie de células presentadoras o bien encontrar el antígeno de forma soluble en el torrente sanguíneo [38], [38].

La unión de antígeno al BCR de membrana induce la internalización de los complejos antígeno-BCR en vesículas endosómicas. El antígeno es procesado y los péptidos resultantes son presentados en moléculas de MHC de clase II en superficie [39]. Los linfocitos B FO en esta etapa se caracterizan por el aumento de expresión en superficie de moléculas de MHC de clase II, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2). Estas últimas son moléculas con una importante función coestimuladora de linfocitos T CD4 (figura 10).

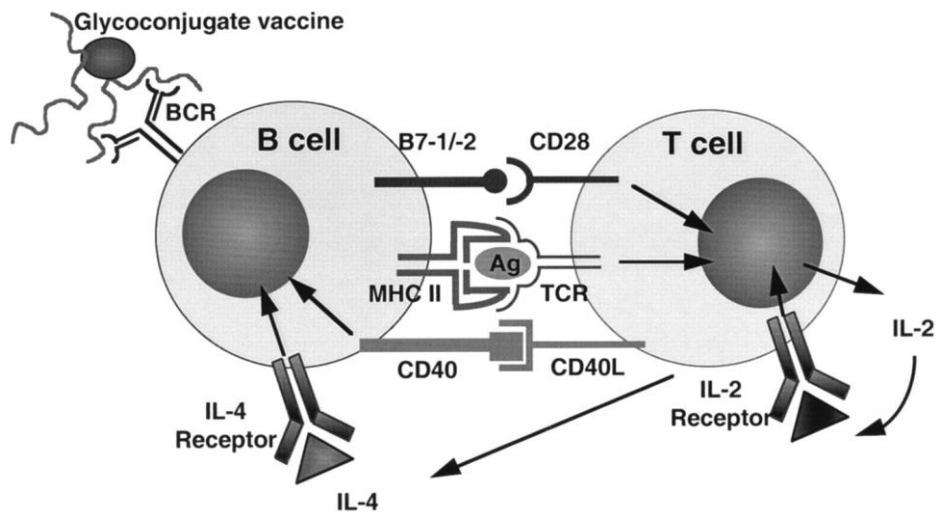


Figura 10. Señalización implicada en el proceso de activación de linfocitos B T-dependiente. En la imagen se muestra un ejemplo de respuesta descrito frente a vacunas lipopolisacáridos glicoconjugados [40]. Los glicoconjugados se unen al BCR del linfocito B, que procesa y presenta epítomos de la vacuna a través de MHC II a los linfocitos T. A continuación se genera la segunda señal coestimuladora mediante la interacción de la molécula CD28 con los ligandos B 7.1 y/o B.2, lo que activa la producción y secreción de IL2 por el linfocito T. Los linfocitos T aumentan la expresión de CD40L en superficie y comienzan a secretar IL4, ambas señales o vías activarán finalmente al linfocito B.

Los linfocitos B FO en este estadio migran hacia el borde del folículo primario [41]. Una vez allí, pueden activar a los linfocitos T mediante su estimulación a través del TCR y CD28 que se unirán a MHC clase II y B7.1/B7.2 de la superficie del linfocito B respectivamente (figura 10). Este proceso inducirá la expresión en el linfocito T CD4 de la molécula CD40L y la secreción de diversas citocinas como la IL-2, IL-4 e IL-6 que activarán finalmente al linfocito B, induciendo su diferenciación hacia células plasmáticas primarias secretoras de anticuerpos IgM, y su migración al centro del folículo primario para dar lugar a la formación de estructuras foliculares secundarias conocidas como centros germinales (CGs) [42].

Estos centros son esenciales para el desarrollo de la respuesta, pues proveen de un microambiente donde los linfocitos B pueden expandirse, aumentar la afinidad de sus receptores, cambiar de isotipo, producir células plasmáticas de larga vida y linfocitos B de memoria [43].

Los centros germinales se dividen en dos zonas: clara y oscura (figura 11). En la zona oscura se encuentran los linfocitos B en división, empaquetados densamente, que reciben el nombre de centroblastos y algunas células dendríticas foliculares (FDCs). En este punto, los linfocitos B

reducen la expresión de Ig de superficie y se ven sometidos a procesos de hipermutación somática; cada centroblasto introduce aproximadamente una mutación por cada ciclo de división celular. En la zona clara se localizan linfocitos B de menor tamaño que reciben el nombre de centrocitos y están inmersos en una densa red de FDCs. La presencia de FDCs es esencial para la respuesta y supervivencia de los linfocitos B, pues es en este punto donde los centrocitos reconocen y compiten por el antígeno presentado en la superficie de las FDCs. De esta forma solo se seleccionarán los centrocitos que reconozcan a través de su BCR antígenos con alta afinidad, lo que significa que durante esta etapa muchos centrocitos sufrirán procesos de revisión de receptor y si finalmente no consiguen generar un receptor con elevada afinidad, entrarán en apoptosis debido a la falta de estimulación.

La actividad efectora de las FDCs se encuentra mediada por la interacción de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 presentes en la superficie de estas, con las moléculas LFA-1 y VLA-4 presentes en la superficie de los centrocitos [44]. Se ha descrito que la señalización a través ambas vías favorece la supervivencia de los centrocitos en el centro germinal [45].

En este proceso intervienen también de forma importante los linfocitos T-colaboradores foliculares (THFs), que se localizan en la zona clara del CG. Se sabe que la señalización a través de CD40 es importante en la formación de linfocitos B de memoria [46]. Los centrocitos que han sido seleccionados positivamente, mediante la interacción con FDCs y THFs, darán lugar finalmente a células B de memoria y células B plasmáticas de larga vida.

Las células B de memoria, caracterizadas por su larga supervivencia, se distribuyen dentro del compartimento de células residentes de los diferentes órganos linfoides secundarios, mientras las células plasmáticas resultantes migran preferentemente a médula ósea donde producirán anticuerpos de forma continuada [47].

En posteriores encuentros con el antígeno, los linfocitos B de memoria responderán de forma más rápida y con mayor afinidad, tanto presentando antígeno como generando nuevas células plasmáticas secretoras de anticuerpos. De esta manera, mientras la repuesta inmune primaria de linfocitos B tarda entre 5 y 10 días, la secundaria se desarrolla entre 1 y 3 días.

Aunque la formación de CGs esté relacionada con respuestas a antígenos T-dependientes, algunos antígenos T-independientes promueven la formación de estos centros germinales, aunque el proceso de hipermutación somática ocurre con menor frecuencia, debido a la falta de colaboración de los linfocitos T [48].

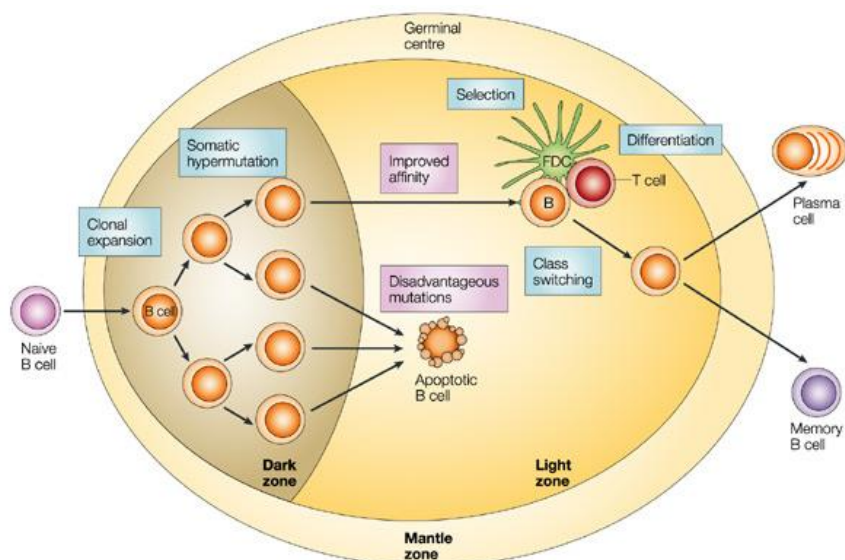


Figura 11. Desarrollo de la respuesta de linfocitos B dentro del centro germinal. Los linfocitos B maduros naive son activados tras entrar en contacto con el antígeno y recibir ayuda de los linfocitos T a nivel de la zona T. Una vez activados migran hacia los folículos, comienzan a proliferar y a diferenciarse en centroblastos, dando lugar a la zona oscura del centro germinal. En esta fase inician procesos de recombinación somática generando BCRs con diferentes afinidades. A continuación los centroblastos disminuyen su capacidad proliferativa y se diferencian a centrocitos (zona clara) que son seleccionados por la afinidad por el antígeno. Sólo los linfocitos con BCRs de alta afinidad reciben señales de supervivencia de los linfocitos T foliculares y células dendríticas foliculares, el resto mueren por procesos de apoptosis. Los linfocitos B seleccionados en este punto atraviesan varias rondas de proliferación, mutación y selección. En esta fase, ocurren procesos de cambio de clase o isotipo del anticuerpo expresado lo que le conferirá diferentes propiedades funcionales. Finalmente, estos linfocitos se diferencian en células de memoria y/o células plasmáticas y abandonaran el centro germinal [49].

Por otra parte, en los CGs se llevan a cabo mecanismos de cambio de isotipo de las Igs. Todos los linfocitos B maduros no activados (*naive*) expresan en superficie IgD e IgM, siendo IgM el primer anticuerpo secretado durante una respuesta primaria. Sin embargo, solamente un 10% de los anticuerpos presentes en plasma presentan isotipo IgM, mientras la mayoría son de tipo IgG. Por tanto, una importante proporción de linfocitos B en periferia han experimentado en algún momento procesos de cambio de isotipo. En este proceso es fundamental la interacción con linfocitos T colaboradores (TH).

Los linfocitos TH1 son los principales mediadores de la respuesta inmune celular, y mediante la secreción de IFN- γ estimulan el cambio de isotipo de anticuerpos hacia la producción de IgG2a [50]. Estos anticuerpos se unen a la superficie del patógeno favoreciendo su eliminación y presentación por células del sistema inmune como macrófagos, potenciando así la respuesta inmune frente a este antígeno.

Por el contrario, los linfocitos TH2 son los principales mediadores de la respuesta inmune humoral y secretan principalmente IL-4, IL-5 y TGF- β . En ratón, la IL-4 induce el cambio de clase hacia IgG1 e IgE, mientras TGF- β , dirige el cambio de clase hacia IgG2b e IgA y la citocina IL5, al igual que el TGF- β induce el cambio de clase a IgA [51], [52] .

Por otra parte, es importante destacar que las citocinas secretadas por linfocitos TH1 tienen un efecto regulatorio negativo sobre los linfocitos TH2. En este sentido, recientemente se ha apuntado que el efecto del IFN- γ domina sobre el del IL4, y ambos sobre el TGF- β [51]. Este fenómeno permite al sistema inmune direccionar de forma eficiente el tipo de respuesta efectora. Más adelante, se explicará en detalle la actividad efectora de los diferentes isotipos de anticuerpos dentro de la respuesta inmune.

2.4 Activación de linfocitos B T-independiente.

La respuesta de linfocitos B T-independiente se desarrolla en ausencia de señales de linfocitos T colaboradores y es característica de linfocitos B MZ y linfocitos B1.

Existen dos tipos de antígenos T-independientes clasificados como TI-1 y TI-2. Los TI-1 pueden activar a los linfocitos B independientemente de su especificidad antigénica, si este se encuentra a altas concentraciones [52]. Esta activación está mediada por otros receptores de la superficie del linfocito B conocidos como los TLR (*Toll-like receptors*). Los lipopolisacáridos (LPS) de membrana, presentes en las bacterias Gram negativas, son un ejemplo de antígenos de tipo TI-1. Generalmente, este tipo de respuestas no generan linfocitos B de memoria.

Los antígenos de tipo TI-2 están formados por secuencias repetidas presentes en la superficie de algunos patógenos. Un ejemplo de ello son los polisacáridos de membrana presentes en la superficie de bacterias encapsuladas y algunos virus [53]. La estructura secuencial de este tipo de antígenos activa al linfocito B mediante el entrecruzamiento de BCRs.

La activación de linfocitos B mediante esta vía T-independiente, genera una respuesta inmune rápida contra numerosos patógenos promoviendo la expansión de linfocitos B y la secreción de anticuerpos de tipo IgM de baja afinidad. Por este motivo, los linfocitos MZ y B1 cumplen una función esencial en la respuesta inmune primaria siendo principales efectores de la barrera inmune innata [54].

2.5 Poblaciones de linfocitos B.

Como se ha comentado anteriormente, los linfocitos B maduros se pueden clasificar en linfocitos B FO, linfocitos B MZ y linfocitos B1 en función de los marcadores de superficie y su localización tisular (figura 12) [55], [56].

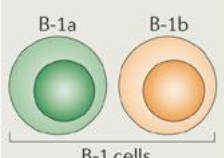
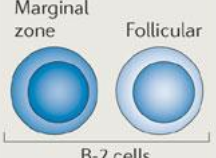
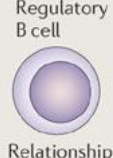
| | | | | | |
|---|--|---|---|---|---|
| Cell surface phenotype | CD5 ⁺ CD19 ^{hi} CD1d ^{mid} | CD5 ⁻ CD19 ^{hi} CD1d ^{mid} | CD5 ⁻ CD19 ^{mid} CD1d ^{hi} CD21 ^{hi} | CD5 ⁻ CD19 ^{mid} CD1d ^{mid} | CD5 ⁺ CD19 ^{hi} CD1d ^{hi} CD21 ^{hi/mid} |
| | CD23 ⁻ CD43 ⁺ IgM ^{hi} IgD ^{low} | CD23 ⁻ CD43 ⁺ IgM ^{hi} IgD ^{low} | CD23 ⁻ CD43 ⁻ IgM ^{hi} IgD ^{low} | CD23 ⁺ CD43 ⁻ IgM ^{low} IgD ^{hi} | CD23 ^{+/-} CD43 ⁻ IgM ^{hi} IgD ^{low/mid} |
| Frequency in total splenic B cell population | 2% | <1% | 15% | >70% | 1% |
| |  B-1 cells | |  B-2 cells | |  Regulatory B cell Relationship to B-1 and B-2 cells unclear |

Figura 12. Fenotipo y frecuencias de las diferentes poblaciones de linfocitos B de ratón [56].

Recientemente se ha descrito también la presencia de una población de linfocitos B con capacidades supresoras conocidos como linfocitos B reguladores, caracterizados por la secreción de IL-10 y la expresión de CD5 y CD1d [57].

A continuación entraremos a explicar en detalle las características de cada población.

2.5.1 Linfocitos B foliculares.

En ratón la mayoría de los linfocitos B FO residen en los folículos primarios de bazo y nódulos linfáticos cerca de la zona T, lo que permite la interacción con los linfocitos T durante el desarrollo de la respuesta a antígenos T-dependientes. Por otra parte, los linfocitos B FO forman parte de la población recirculante entre los diferentes órganos linfoides secundarios, donde pueden entrar en contacto con antígeno y ser activados. Su vida media en periferia es corta, sobre 4 meses. Se ha descrito que los linfocitos B FO pueden recircular a médula ósea y asentarse alrededor de los capilares sinusoides, pudiendo responder a patógenos procedentes del torrente sanguíneo de forma T-independiente [27].

La mayoría de los linfocitos B FO se caracterizan por la expresión en superficie de IgD^{high}IgM^{low}CD21^{mid}CD23⁺, aunque también se ha descrito también la presencia de una

segunda población de linfocitos B FO de tipo II caracterizada por la expresión de $IgD^{high}IgM^{high}CD21^{mid}CD23+$, que podría ser precursora de la población de linfocitos B marginales, en situaciones críticas de depleción de esta población por infección con patógenos [27].

2.5.2 Linfocitos B marginales.

Como ya se ha comentado anteriormente, los linfocitos MZ están implicados en la respuesta frente antígenos T-independientes y contribuyen de forma importante en la respuesta inmune humoral primaria frente a diversos patógenos extracelulares [58][59].

En ratón los linfocitos B MZ se localizan mayoritariamente en el seno marginal localizado entre la pulpa roja y la pulpa blanca del bazo, junto a macrófagos y células dendríticas. Estas células constituyen el 15% de la población de linfocitos B en esta región [56]. En el seno marginal drena la sangre procedente de las arteriolas, de forma que su ubicación facilita el reconocimiento y respuesta rápida frente a patógenos transportados por la sangre [60]. En este sentido, se ha observado que ratones deficientes en linfocitos B MZ son incapaces de frenar la infección por *Streptococcus pneumoniae* [61].

Estas poblaciones de linfocitos B, se caracterizan por la expresión en superficie de los marcadores $IgD^{high}IgM^{low}CD21^{high}CD1d^{high}CD23-$. Se sabe que la elevada expresión de CD1d en estas células facilita la presentación de antígenos lipídicos a la población de linfocitos iNKT (*invariant natural killer T cells*) por lo que la población de linfocitos B MZ esplénica podría ser origen de la producción de anticuerpos anti-lípidos [62].

Por otra parte, se ha descrito que esta población de linfocitos MZ puede tener una importante función en la presentación de inmunocomplejos de sangre. Una vez capturados a través del CD21 de superficie pueden migrar hacia la zona del folículo y presentar los complejos a los linfocitos B FO [63]. En este sentido se sabe que los linfocitos B MZ presentan antígenos de forma más eficiente que los linfocitos B FO, mediante la expresión de altos niveles de MHC clase II, CD86 y CD80 en superficie [64].

2.5.3 Linfocitos B1.

En peritoneo y cavidades pleurales, se localiza otra población de linfocitos B maduros, los linfocitos B1. Al igual que los linfocitos MZ de bazo, están implicados en la respuesta a

antígenos T-independientes y secretan anticuerpos naturales frente a diversos patógenos, importantes en la respuesta inmune innata [65].

Los linfocitos tipo B1 se caracterizan por la expresión en superficie de IgM^{high}IgD^{low}CD11b+, y se pueden dividir en dos subpoblaciones en función de los marcadores de superficie, la población B1a CD5+ y la población B1b CD5-.

Los anticuerpos secretados por los linfocitos B1 generalmente son de tipo IgM y se caracterizan por su baja afinidad y polireactividad. Se ha observado que los linfocitos B1a secretan anticuerpos IgM de forma espontánea que reconocen polisacáridos de bacterias encapsuladas como *Streptococcus pneumoniae* [66].

Los linfocitos B1b son capaces de inducir rápidamente la secreción de anticuerpos frente a antígenos T-independientes, participando de forma importante en procesos de aclaramiento antigénico [67].

Por otra parte, se ha descrito la presencia de linfocitos B1a CD5+ en placas de Peyer del intestino de ratones sanos [68]. En este sentido, se sabe que los linfocitos B1 son los principales responsables de la respuesta de anticuerpos IgA T-independiente en intestino [69].

Actualmente, el desarrollo de los linfocitos B1 no está del todo claro. Existen dos modelos que explican su desarrollo, el modelo de linaje y el modelo de selección [70]. El modelo de linaje se basa en la observación de que células progenitoras del hígado fetal son capaces de regenerar eficientemente el compartimento B1 comparado con los progenitores de médula ósea de adulto. En adultos estos linfocitos B1 se mantiene debido a su elevada capacidad de auto-renovación [71]. Por otra parte, el modelo de selección propone que las poblaciones de linfocitos B1 y B2 poseen un precursor común, y que diferentes señalizaciones a través del BCR determinarían la diferenciación final de la célula a tipo u otro. Según este modelo, señales de fuerte intensidad estarían relacionadas con la diferenciación a linfocitos B1, mientras que señales de intensidad intermedia diferenciarían las células a linfocitos B FO, y señales de intensidad débil dirigiría la diferenciación hacia linfocitos B MZ [72]. Este modelo explicaría la capacidad de expresión de CD5 por linfocitos B2 tras la activación por entrecruzamiento del BCR [73].

Actualmente, la población de linfocitos B1 solo se ha identificado en ratón. En humanos hasta la fecha se desconoce, a pesar de la importante función que desempeñan. En este sentido se postula que la población de linfocitos MZ circulante podría desempeñar esta función [74].

2.5.4 Linfocitos B reguladores.

Además de los linajes de linfocitos B mencionados hasta el momento, en ratón y humano se ha descrito la presencia de una población de linfocitos B secretora de IL-10, citocina mediadora de la supresión de la respuesta inmune inflamatoria [57], [75]. Los linfocitos B reguladores o linfocitos B10 se presentan en baja frecuencia en periferia, en torno a un 1-5% en ratones *naive*, pero expanden durante procesos autoinmunitarios. En este sentido, se ha detectado su presencia en modelos de autoinmunidad como la encefalitis experimental autoinmune inducida (EAE) [77] o el lupus inducido (SLE) [78].

Esta población se caracteriza por presentar en superficie los marcadores CD1d^{high}CD5⁺, y es capaz de IL-10 mediante activación *in vitro* con anticuerpos anti-CD40 o LPS [79]. Un estudio reciente ha revelado la importancia *in vivo* de la presencia de IL-21 y la señalización a través de moléculas de MHC II y CD40 durante el desarrollo y expansión de los linfocitos B10 [80].

Se sabe que los mecanismos de regulación por linfocitos B10 son antígeno-específicos y que la especificidad del BCR determina de forma importante el desarrollo de la respuesta [57]. Por otra parte, las señales recibidas a través de moléculas del BCR como CD19 son importantes también en su desarrollo. Por ejemplo, ratones deficientes en CD19 carecen de linfocitos B reguladores fenómeno que conlleva al desarrollo de procesos inflamatorios exacerbados, reacciones de hipersensibilidad por contacto y procesos autoinmunitarios [57].

Por otra parte, se sabe que la presencia de IL-10 no es necesaria para el desarrollo de los linfocitos B10, puesto que estas células se desarrollan de forma natural en ratones IL-10^{-/-} [82].

2.6 Características y función efectora de los anticuerpos.

Los diferentes isotipos de anticuerpos secretados por los linfocitos B presentan diferente función efectora [Revisado en 4]. Los anticuerpos con isotipo IgM son característicos de respuestas inmunes primarias, y son los primeros producidos tras el encuentro con el antígeno; en cambio IgG, IgE e IgA son isotipos producidos en respuestas inmunes secundarias. Los anticuerpos IgM forman pentámeros (figura 13) y se caracterizan porque son capaces de activar efectivamente al sistema del complemento.

Por otra parte los anticuerpos IgG son los más abundantes en periferia y presentan diferentes subclases. Los IgG3 juegan un papel importante en la respuesta antibacteriana y son muy eficientes promoviendo la fagocitosis mediante opsonización. Los IgG2a pueden activar el

sistema del complemento. IgG1 es el isotipo dominante en respuestas frente a parásitos e infecciones virales, favoreciendo el proceso de fagocitosis.

Los anticuerpos IgE son inducidos por infecciones de parásitos, y también están involucrados en procesos de alergia. Los mastocitos y basófilos expresan receptores de alta afinidad para IgE conocidos como FcεRI, que son capaces de unir IgE en ausencia de antígeno. Cuando un antígeno entra en contacto con la Ig del complejo IgE-FcεRI, activa a la célula provocando la liberación de histamina y otros factores responsables de la respuesta de hipersensibilidad inmediata.

Los anticuerpos IgA juegan un papel fundamental en la inmunidad de las mucosas. Proporcionan una barrera, evitando la entrada de patógenos extracelulares o neutralizándolos mediante la formación de inmunocomplejos que son excretados al lumen intestinal en forma de dímeros (figura 13).

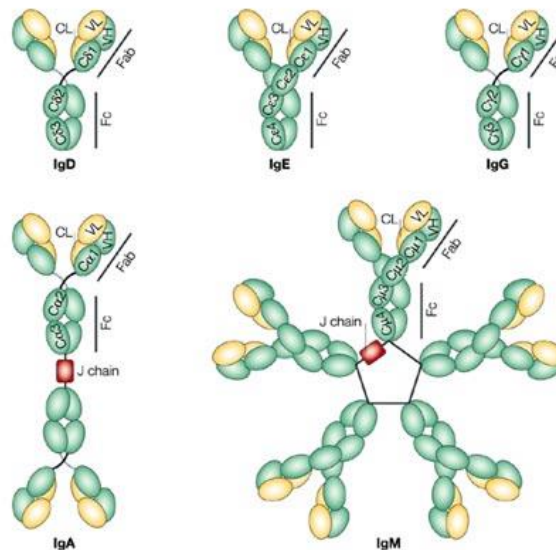


Figura 13. Estructura molecular de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas son complejos proteicos formados por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cadenas ligeras interaccionan con la región N terminal de las pesadas a través de una región denominada Fab. La región C terminal de la cadena pesada contiene la región Fc a través de la cual interaccionan con los receptores. En mamíferos, en función de la región constante de la cadena pesada, se ha descrito de forma común la presencia de 5 clases de Igs: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Las IgA pueden dimerizar a través del extremo C terminal de la cadena pesada, y la IgM tiene la capacidad de generar estructuras pentaméricas [83].

3 Mecanismos de tolerancia y autoinmunidad de linfocitos B.

La tolerancia inmunológica se puede definir como el estado fisiológico en el que el sistema inmune no reacciona de forma destructiva contra el propio organismo.

El sistema inmune ha desarrollado la capacidad de generar anticuerpos capaces de reconocer un amplio repertorio de patógenos para defender al organismo. Sin embargo, un porcentaje considerable de estos anticuerpos puede llegar a reconocer proteínas propias en un fenómeno conocido como autoreactividad. Se sabe que más de la mitad de linfocitos B inmaduros generados en la médula ósea de un individuo sano tienen capacidad autoreactiva, sin embargo solo una pequeña proporción llega al compartimento de linfocitos B maduros. Esto es debido a que el sistema inmune ha desarrollado diferentes procesos de control de tolerancia a lo propio, donde las células autoreactivas generadas son eliminadas o silenciadas mediante diferentes mecanismos.

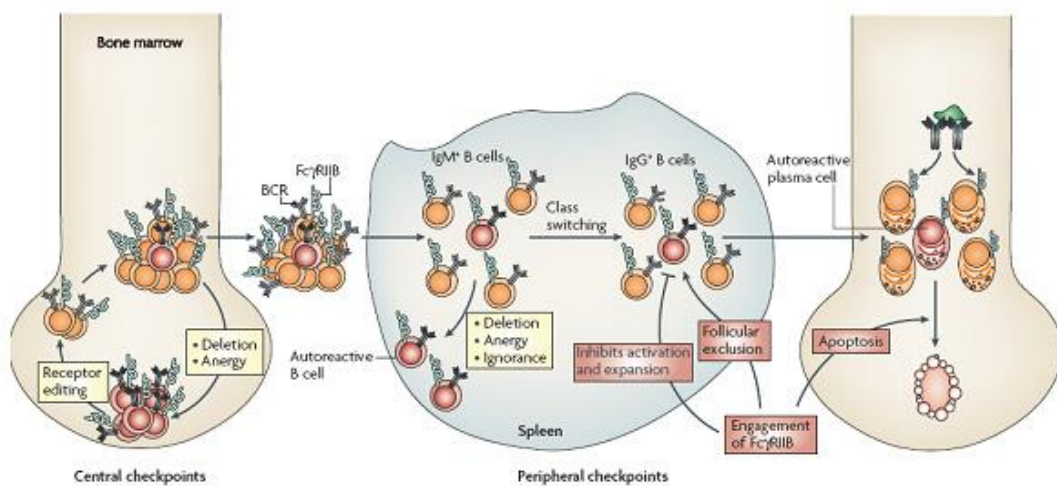


Figura 14. Mecanismos de control de tolerancia central y periférica de linfocitos B. Durante su desarrollo en médula ósea, la autoreactividad de linfocitos B en estadio inmaduro es controlada por mecanismos de deleción, anergia y revisión de receptor. Una vez salen a periferia, las células con potencial autoreactivo no eliminadas son controladas por diferentes mecanismos como deleción, anergia, ignorancia clonal y exclusión folicular [84].

En términos generales, los mecanismos de tolerancia de linfocitos B pueden ser clasificados en mecanismos de tolerancia central, donde el control se ejerce a nivel del repertorio pre-inmune de linfocitos B de médula ósea, y mecanismos de tolerancia periférica, que impiden la activación y maduración de afinidad de aquellos linfocitos B que han pasado al compartimento de células B maduras. En la figura 14, se muestra un esquema de los diferentes mecanismos de tolerancia ejercidos a nivel de linfocitos B en médula ósea y órganos periféricos, que serán explicados a continuación con más detalle.

3.1 Mecanismos de tolerancia central.

A nivel de médula ósea existen dos mecanismos de tolerancia que controlan la autoreactividad de los linfocitos B inmaduros, la edición del receptor y la delección clonal [Revisado en 85].

Los mecanismos de delección clonal se ponen en marcha cuando un linfocito B inmaduro autoreactivo interactúa con un autoantígeno con alta afinidad. En este momento, el complejo BCR-antígeno es rápidamente internalizado y se detiene por completo el desarrollo del linfocito B. Por otra parte, se inhibe la expresión del factor de supervivencia BAFF (*B-cell-activating factor*) [86] y aumenta la expresión del factor pro-apoptótico BIM (*BCL-2 interacting mediator of cell death*) [87]. En este sentido se ha descrito que la sobreexpresión de Bcl-2 revierte el proceso de apoptosis de los linfocitos B autoreactivos, un fenómeno también observado en ratones transgénicos deficientes en BIM.

Por otra parte, los linfocitos B inmaduros autoreactivos que reconocen autoantígeno con moderada afinidad en médula ósea, pueden ser rescatados de la apoptosis mediante reordenamientos adicionales de los genes de la cadena ligera con el objetivo de producir un nuevo receptor de superficie no autoreactivo. Este mecanismo se conoce como edición del receptor. Esto es posible debido a que el linfocito B inmaduro sigue expresando proteínas RAG que permiten llevar a cabo recombinaciones secundarias de los genes de las Igs en caso de reconocimiento fuerte de antígeno. El cese de expresión de RAG tiene lugar después de un reordenamiento no autoreactivo exitoso, lo que reduce la probabilidad de reorganizaciones posteriores [88], [89].

Inicialmente, se describió que el proceso de delección clonal afectaba principalmente a linfocitos B autoreactivos que reconocen autoantígenos en médula ósea con alta afinidad, mientras aquellos que lo hacen con una afinidad moderada son más susceptibles a procesos de edición de receptor. Actualmente, la edición de receptor es considerado como el principal mecanismo de control de tolerancia central de linfocitos B inmaduros, y la delección clonal como mecanismo posterior de control de células que retienen su capacidad autoreactiva [90]. Curiosamente, se ha observado que cerca de la mitad de linfocitos B inmaduros de médula ósea han sufrido procesos de edición de receptor, y expresan en su superficie BCRs con dos o más cadenas ligeras diferentes, pudiendo ser alguna de ellas autoreactiva. Este fenómeno recibe el nombre de inclusión alélica [91]. Este mecanismo aberrante no solo explicaría la elevada incidencia de linfocitos B polireactivos y autoreactivos en el repertorio pre-inmune, sino que también podría ser uno de los mecanismos principales a través de los cuales linfocitos B autoreactivos de baja afinidad podrían escapar a los sistemas de tolerancia central, mediante la señalización y selección positiva a través del BCR con especificidad no autoreactiva [92]. Se

estima que aproximadamente un 10% de linfocitos B de periferia podría presentar este fenómeno [93].

3.2 Mecanismos de tolerancia periférica.

A pesar de los mecanismos de tolerancia central, algunos linfocitos B autoreactivos consiguen evadirlos [Revisado en 85]. Solamente un pequeño porcentaje de los linfocitos B generados en médula ósea consiguen pasar a la fase transicional y migrar a bazo donde completarán su maduración tras el encuentro con antígeno. Nuevamente interacciones de alta afinidad de receptores de linfocitos B autoreactivos con autoantígenos darán lugar a la delección clonal de estos linfocitos dependiente de Bim [94]. Por el contrario, interacciones débiles o muy débiles darán lugar a la inducción de un estado de anergia o ignorancia del linfocito, respectivamente [95]. Tras el primer encuentro con el antígeno extraño o propio, los linfocitos pasan a un estado maduro o *naive*. En este estadio los linfocitos migran hacia las regiones denominadas PALS donde entran en contacto con linfocitos T. Si en el transcurso de 2-3 días no se activan con ayuda de los linfocitos T o mediante TLRs de superficie, entran en apoptosis.

El estado de anergia en linfocitos B se caracteriza por una desensibilización del BCR que conlleva a una disminución de su respuesta, a una disminución de la capacidad de presentación de antígenos y producción de anticuerpos [96]. Otra característica de las células en estado de anergia, es su baja supervivencia debido a la incapacidad de competir por las bajas concentraciones de factor BAFF expresadas en bazo [97]. Sin embargo, se sabe que este estado puede ser revertido bajo determinadas situaciones, como en presencia de antígenos y células T que activen fuertemente a los linfocitos B, por lo que se trata de un mecanismo de tolerancia reversible. De esta forma los linfocitos B autoreactivos podrían llegar a evadir los mecanismos de selección negativa, llevando a cabo una maduración de afinidad en los centros germinales.

Numerosos estudios llevados a cabo en ratones transgénicos que expresan poblaciones de linfocitos B autoreactivos en un fondo autoinmune, han demostrado que fallos en los mecanismos de anergia clonal son la principal causa de la activación de estas poblaciones [95], [97].

Algunos linfocitos B pueden reconocer autoantígenos con muy baja afinidad de forma que las señales de activación que se generan son muy débiles o casi nulas. En estos casos, los mecanismos de selección negativa en periferia no actúan sobre ellos pasando desapercibidos, en un fenómeno conocido como ignorancia clonal. Otra posible causa de la ignorancia clonal

podría ser la falta de expresión de autoantígeno en médula ósea o bazo, que impediría la eliminación eficiente de clones de linfocitos B autoreactivos.

Se ha descrito también que los linfocitos B que interactúan con autoantígenos en periferia dejan de expresar CD62L, receptor de migración o *homing* necesario para su entrada en los órganos linfoides secundarios [98]. De esta forma, el linfocito B autoreactivo quedaría excluido de los folículos linfoides, en lo que se conoce como control de tolerancia por exclusión folicular.

Otra región a tener en cuenta en el control de la tolerancia periférica son los centros germinales donde tienen lugar procesos de hipermutación somática que podrían dar lugar a la generación de linfocitos B autoreactivos. Se sabe que en este punto la selección negativa está mediada por la alta competencia por el antígeno presentado en la superficie de las dendríticas foliculares y por la falta de coestimulación de linfocitos T foliculares [99], lo que finalmente induce fenómenos de apoptosis mediados por BIM. En los centros germinales se ha descrito también la presencia de macrófagos TBM (*Tingible-Body Macrophage*) con una función esencial en la eliminación de los cuerpos nucleares apoptóticos potencialmente inmunogénicos, que podrían inducir la activación de clones de linfocitos B autoreactivos [100].

3.3 Autoinmunidad y pérdida de tolerancia de linfocitos B.

Cuando los mecanismos de control de tolerancia no consiguen frenar la maduración de linfocitos B autoreactivos, se puede desencadenar una respuesta frente a autoantígenos en periferia dando lugar a procesos de inflamación y daño tisular crónico de origen autoinmunitario.

En este sentido, según el patrón de expresión de el o los autoantígenos, las enfermedades autoinmunitarias se pueden clasificar en órgano-específicas, cuando el antígeno presenta una distribución tisular restringida a un órgano, como es el caso de la diabetes tipo I que afecta al páncreas, o sistémicas, cuando el antígeno presenta una distribución ubicua. Un ejemplo de enfermedad autoinmune sistémica es el lupus eritomatoso sistémico, donde se produce una respuesta autoreactiva de linfocitos B frente a DNA y nucleoproteínas.

Los factores que determinan fallos en los mecanismos de control de tolerancia son complejos y están determinados tanto por las características del antígeno, como por los factores dependientes del individuo. Diversos estudios realizados en modelos de ratón con BCRs transgénicos para diferentes antígenos y autoantígenos muestran como el fondo genético se correlaciona con la predisposición a fallos en los mecanismos de regulación de la tolerancia [Revisado en 101].

| Gene | Mouse strain or human population | Associated diseases ^b | Tolerance phenotypes mediated by susceptibility alleles |
|---------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| <i>Mice</i> | | | |
| <i>Fcgr2b</i> | NZB/MRL/BXSB/NOD/ NZM2410/NZW | SLE | Reduced <i>Fcgr2</i> expression in GC B-cells leads to differentiation of self-reactive B-cells into plasma cells. |
| <i>Ifi202</i> | NZB | SLE | Increased expression reduces B-cell susceptibility to apoptosis. |
| <i>Ly108</i> | NZM2410/NZW | SLE | Dampens BCR signalling at immature/transitional stage impairing energy, receptor editing and deletion. |
| <i>Cr2</i> | NZM2410/NZW | SLE | Impairment of C3d binding resulting in defective B-cell energy and abnormal GC response. |
| <i>Tlr7</i> | BXSB | SLE | Increased expression due to gene duplication on Y Chromosome impairs B-cell tolerance to RNA-associated autoantigens. |
| <i>Human</i> | | | |
| <i>PTPN22</i> | Various | T1D/RA/GD/ SLE/MG | Dominant gain of inhibitory function mutation that impairs BCR (and TCR) signalling. |
| <i>FCRL3</i> | Asian | SLE/RA/GD | Increased expression dampens BCR signalling. Associated with increased autoantibody production. |
| <i>FCGR2B</i> | Asian/Caucasian | SLE/GP/ITP | Polymorphisms cause reduced induction of this inhibitory molecule on memory B-cells. |
| <i>PDCD1</i> | Asian/Caucasian/Hispanic | SLE | Decreased expression due to impaired binding of RUNX transcription factor to its enhancer. Functions as an inhibitor of BCR (and TCR) signalling. |
| <i>BLK</i> | Caucasian | SLE/APS | Decreased expression due to promoter polymorphism is thought to inhibit BCR signalling. |
| <i>LYN</i> | Caucasian (female) | SLE | Decreased expression due to intronic polymorphism is thought to result in hyper-responsiveness to BCR stimulation. Strong correlation with autoantibody production. |
| <i>BANK1</i> | Asian/Caucasian | SLE, SSc | Polymorphisms predicted to increase recruitment and activation of Lyn and IP3R resulting in sustained BCR signalling and B-cell hyperactivity. |
| <i>CD40</i> | Asian/Caucasian | RA, GD | Increased surface expression of CD40 on B-cells. |

^b Abbreviations – APS: primary antiphospholipid antibody syndrome; GD: Grave's disease; GP: Goodpasture's disease; ITP: idiopathic thrombocytopenic purpura; MG: myasthenia gravis; RA: rheumatoid arthritis; SLE: systemic lupus erythematosus; SSc: systemic sclerosis; and T1D: type 1 diabetes.

Tabla 1. Genes de susceptibilidad autoinmunitaria relacionados con defectos de tolerancia de linfocitos B en ratón y humano. En la tabla se muestra una relación de diferentes genes implicados en pérdida de tolerancia implicados en el desarrollo de diferentes enfermedades autoinmunitarias, así como los mecanismos que se encuentran alterados en cada uno de ellos [101].

Numerosos genes de susceptibilidad han sido descritos tanto en ratón como en humanos. Muchos de ellos están implicados en la vía de señalización del BCR como Ly108, Cr2, FCGR2B, PTPN22, FCRL3, BLK, LYN y BANK (Tabla 1). Sin embargo, numerosos estudios genéticos han demostrado que en el proceso de desarrollo de diversas enfermedades autoinmunitarias existen defectos a nivel de genes implicados en tolerancia de linfocitos T, apoptosis y dianas de inflamación de tejidos. Un ejemplo de ello, se observa en el modelo experimental de lupus, donde se han descrito alteraciones a nivel de tolerancia de linfocitos B (Ly108 y PTPN22), a nivel de respuesta inmune y adaptativa (Tlr7 y FAS) y a nivel de genes implicados en el daño tisular (IFN- α and ICAM1)[102].

Por otra parte, se ha observado que los linfocitos B autoreactivos asociados a enfermedades autoinmunes como diabetes tipo I o lupus, presentan defectos a nivel de los mecanismos de edición de receptor. En este sentido, se ha descrito que la población de linfocitos B- λ (que expresan la cadena ligera λ) de pacientes de diabetes tipo I y lupus, presenta un número inferior de secuencias RS con respecto a pacientes control [103]. Por lo que en estos casos, debido a la baja frecuencia de recombinación se podría pensar que la autoreactividad de los linfocitos B podría estar ligada al repertorio y mecanismos de recombinación de las regiones RS.

4 Diabetes Tipo I y linfocitos B.

Muchas de las enfermedades autoinmunitarias órgano-específicas actualmente descritas, están dirigidas principalmente por linfocitos T autoreactivos. En la diabetes tipo I (DT1), a pesar de la importancia patogénica de la respuesta de linfocitos T autoreactivos, se sabe que los linfocitos B desarrollan un papel importante en la presentación y activación de esta respuesta de linfocitos. Además de esto, en humanos, los autoanticuerpos generados durante la respuesta son una importante herramienta como marcadores de pronóstico y diagnóstico de la enfermedad.

A continuación se describirán en detalle las características y mecanismos efectores de la enfermedad en humanos y en el modelo de ratón NOD, para finalmente profundizar en el papel desarrollado por los linfocitos B dentro de la enfermedad.

4.1 La diabetes tipo I en humanos.

La diabetes mellitus tipo I (DT1), clásicamente denominada insulino dependiente o diabetes juvenil, es un ejemplo de enfermedad autoinmunitaria órgano-específica, que se caracteriza por la destrucción de la células β productoras de insulina de los islotes de Langerhans del páncreas [104]. Como ya se ha comentado anteriormente, esta destrucción está mediada principalmente por linfocitos T y da lugar a la aparición de autoanticuerpos específicos detectados en sangre.

En humanos, se ha descrito que existe un primer periodo subclínico que puede durar meses e incluso varios años, durante el cual se produce una inflamación de los islotes, denominada insulinitis, que se acompaña de una pérdida grave de masa de células β [105], [106], con la consiguiente disminución en la producción de insulina. El debut clínico de la enfermedad

puede tener lugar tras la destrucción de un 80-95% de las células β productoras de insulina [107], [108], y se acompaña de la aparición de hiperglicemia, cetoacidosis, glucosuria, poliuria y polidipsia.

Los individuos afectados generalmente dependen de por vida de la administración de insulina exógena, para controlar su glucemia en la medida de lo posible. A pesar de ello, y como resultado de la hiperglicemia a largo plazo, se producen lesiones vasculares progresivas que dan lugar a varias secuelas como insuficiencia renal, ceguera, neuropatía y obstrucciones arteriales que pueden derivar a gangrena.

4.2 El páncreas.

El páncreas es un órgano glandular mixto, donde la región endocrina que representa entre un 1 y 2% del tejido pancreático, está constituida por los islotes de Langerhans o islotes pancreáticos, donde se localizan las células β secretoras de insulina. El resto de tejido con función exocrina se encarga de la secreción de enzimas digestivas a nivel del duodeno (figura 15).

La insulina es la hormona encargada de controlar los niveles de glucosa en sangre o glucemia. Su función es la de estimular el consumo de glucosa por parte de las células del organismo, y se sabe que el control nervioso local es esencial en la regulación de este proceso [109].

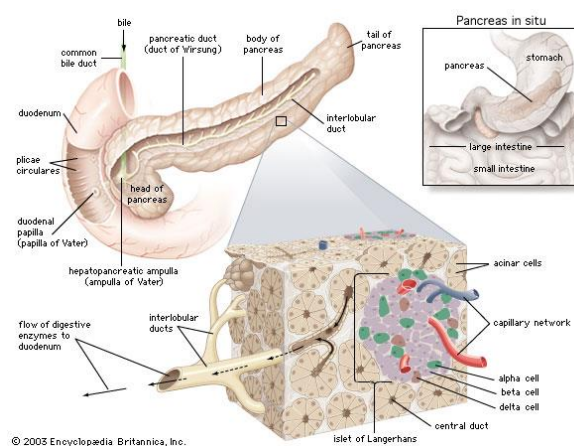


Figura 15. Estructura del páncreas. La parte exocrina está constituida por células epiteliales dispuestas en estructuras esféricas llamados acinos pancreáticos, encargados de la secreción de enzimas digestivas. La parte endocrina se agrupa en islotes de Langerhans, donde se localizan las células secretoras de hormonas que producen insulina (células beta), glucagón (células alfa) y somatostatina (células delta) (Imagen extraída de Enciclopedia Británica 2003).

Por tanto, los islotes pancreáticos se encuentran densamente vascularizados e inervados. Un claro ejemplo de ello, es la inervación autónoma de los islotes donde se localizan nervios simpáticos, parasimpáticos y sensoriales, además de un manto de células gliales de Schwann. Todos ellos forman parte de una compleja red que envuelve y que a su vez penetra en los islotes [110].

4.3 Epidemiología.

La DT1 es una de las enfermedades crónicas severas más frecuentes actualmente. En nuestro país se diagnostican cada año unos 12-20 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, según la región. Esta enfermedad suele aparecer de forma abrupta durante la infancia o la adolescencia, encontrándose la máxima incidencia entre los 10 y los 14 años [111]

Aunque se estima que esta enfermedad afecta a 1 de cada 300 niños en el mundo, la distribución geográfica es ampliamente heterogénea. Se ha sugerido de forma general la existencia de un gradiente norte-sur en la incidencia de la DT1, siendo más frecuente en países del norte de Europa (40 casos nuevos por año por cada 100.000 habitantes, en Finlandia) [112]. Los datos existentes hoy día, apoyan la denominada “hipótesis de la higiene”, según la cual la mejora en las medidas higiénicas y sanitarias de los países más desarrollados, aumenta la incidencia de enfermedades de origen autoinmunitario, así como las de base alérgica [113], [114]. Se ha sugerido que la falta de exposición a microbios y parásitos principalmente durante la infancia, no estimula la correcta maduración de la respuesta de linfocitos T de tipo TH2, implicados en este tipo de procesos, lo que conlleva a un desequilibrio que favorece el desarrollo de respuestas TH1 pro-inflamatorias, que intervienen en procesos autoinmunes como la DT1.

4.4 Etiología de la DT1.

Al igual que ocurre con otras enfermedades autoinmunes, la susceptibilidad individual a desarrollar DT1 tiene un importante componente genético. En este sentido, se ha observado una predisposición hereditaria a presentar la enfermedad, de manera que familiares de individuos afectados por DT1 presentan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad comparado con la población general. A pesar de ello, estudios realizados en gemelos, muestran como la concordancia de la enfermedad entre hermanos gemelos monocigóticos es tan sólo de un 50%, si uno de ellos desarrolla la enfermedad antes de los 5 años [115]. Este hecho indica que los factores genéticos heredados no explican completamente la aparición de

la enfermedad, sino que también pueden intervenir otros factores, como podrían ser mutaciones y recombinaciones de genes no heredadas a nivel de receptores de linfocitos T y B [111] y factores ambientales [104] que podrían favorecer el inicio del proceso autoinmunitario. Actualmente mediante el empleo de técnicas de análisis genómico de polimorfismos y estudios de asociación genómica, se han identificado en humanos más de 40 loci relacionados con el desarrollo de la enfermedad [116]. Aunque algunos loci de susceptibilidad/resistencia parecen tener más influencia que otros, ninguno es suficiente ni estrictamente necesario para el desarrollo de la enfermedad. Por tanto se piensa que el riesgo de desarrollar DT1, depende de la combinación de alelos de susceptibilidad y alelos de resistencia presentes en el genoma del individuo [117], [118].

Entre los diversos genes implicados en la DT1, cabe destacar especialmente el locus IDDM1 donde se localizan los genes del complejo principal de histocompatibilidad de humanos o HLA [119]. Aunque se describió primero la asociación de la DT1 con alelos HLA de clase II DR3 y DR4, actualmente se sabe que la mayor parte de esta asociación se debe al ligamiento entre alelos DR y DQ. En poblaciones de origen caucásico, los genotipos asociados con mayor susceptibilidad a presentar la enfermedad son DR3-DQ2 y DR4-DQ8 [111]. Por otra parte, también se ha descrito la presencia de alelos HLA que confieren resistencia a la enfermedad. En este sentido se ha relacionado la presencia de alelos DQ6 con la resistencia a la enfermedad [120]. La relación de los diferentes haplotipos con la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad podría estar relacionada con la capacidad de presentación de péptidos propios a nivel de timo, de forma que los alelos relacionados con susceptibilidad podrían presentar un repertorio más reducido de péptidos propios a nivel de timo, lo que conllevaría la salida de un mayor número de linfocitos T autoreactivos a periferia.

Además de los genes de HLA descritos anteriormente, se han descrito otros loci genéticos que confieren susceptibilidad a la enfermedad. Uno de los más conocidos, es el loci IDDM2 codificante para el gen promotor de la insulina. En esta región, se han observado que determinados polimorfismos en regiones no codificantes VNTR (*variable number of tandem repeats*), se asocian con la mayor o menor expresión de insulina a nivel tímico. De esta manera los polimorfismos que dan lugar a una expresión y presentación disminuida en timo facilitarían la salida de linfocitos autoreactivos anti-insulina a periferia promoviendo el desarrollo de la enfermedad [120], [121]. Otros IDDM asociados con susceptibilidad son por ejemplo, el IDDM12 cuyo gen candidato es el codificante para CTLA-4 implicado en la proliferación de linfocitos T activados o el IDDM9 donde se localizan los genes de las moléculas CD86 y CD80 importantes en el proceso de co-estimulación de los linfocitos T [111].

Como se ha comentado anteriormente, los factores ambientales afectan al desarrollo de la enfermedad. Entre los factores ambientales que han sido relacionados con la DT1, destacan las infecciones víricas y la dieta. Se postula que ciertas infecciones podrían inducir un desequilibrio en los sistemas de tolerancia del organismo, activando así a los linfocitos autoreactivos que hubieran escapado a la selección negativa a nivel de órganos linfoides primarios [122], [123]. Así por ejemplo, se ha descrito que algunos virus (virus Epstein Barr, retrovirus, Coxsackie B4) presentan una similitud molecular con epítopos pertenecientes a autoantígenos específicos de células β [124]. El mimetismo molecular en estos casos podría favorecer que los mismos linfocitos que se activan para eliminar la infección vírica ataquen también a las células β pancreáticas.

Por otra parte, se ha observado que la dieta es un componente añadido a la susceptibilidad de la enfermedad. En este sentido, algunos trabajos han descrito la presencia de una respuesta de linfocitos T frente a proteínas de la leche de vaca, que podrían favorecer el desarrollo de la DT1 [125]. Actualmente, existe un estudio en marcha el TRIGR (*Trial to reduce IDDM in the Genetically at Risk*), para determinar si la presencia de la proteínas de la leche de vaca en la primera infancia es un factor de riesgo de desarrollo de la enfermedad.

4.5 Histopatología de la enfermedad.

Los estudios histopatológicos en páncreas de individuos afectados de DT1 han revelado la presencia de linfocitos T CD8, seguidos de macrófagos, linfocitos T CD4, linfocitos B y células dendríticas [126]. En este ambiente local de inflamación se ha caracterizado la presencia de citocinas de tipo TH1, promotoras de la respuesta celular inflamatoria y citotóxica, y la hiperexpresión de moléculas de HLA de clase I en células de los islotes [127], [128].

Por otra parte, se ha descrito un fenómeno de hipersensibilidad de las células β -pancreáticas frente a la acción de citocinas pro-inflamatorias [129]. De esta forma, las células β serían más susceptibles a fenómenos de apoptosis mediante mecanismos ligados a la acción de perforinas y granzimas, dando lugar a la liberación y presentación de autoantígenos que potenciarían el proceso autoinmune de destrucción de los islotes.

4.6 Anticuerpos en DT1.

En 1974, experimentos de inmunofluorescencia realizados con suero de pacientes diabéticos sobre secciones de tejido pancreático, revelaron la existencia de anticuerpos circulantes anti-

islote (ICA) en el suero [130]. En la actualidad, se considera que los autoanticuerpos en la DT1 tienen un papel secundario, pues son producidos como consecuencia de la destrucción de las células β por parte de los linfocitos T, y posterior liberación de antígenos intracitoplasmáticos. A pesar de ello a día de hoy, los autoanticuerpos son una herramienta valiosa de predicción y diagnóstico de la enfermedad debido a su temprana aparición, y generalmente tras el diagnóstico de la enfermedad y con el tiempo tienden a disminuir.

En este sentido numerosos estudios han descrito la presencia de anticuerpos anti-ácido glutámico descarboxilasa isoforma 65 (GAD65), anti-insulina (IAA) y anti-proteína 2 asociada a insulinoma (IA2) en pacientes diabéticos [Revisado en 131]. Los anticuerpos anti-insulina son los más prevalentes en el momento del diagnóstico en niños de corta edad. Los anticuerpos que se emplean de forma rutinaria como marcadores de la enfermedad son los anticuerpos anti-islote (ICA), anti-insulina (IAA), anti-ácido glutámico descarboxilasa (GAD65), y los anti-proteína 2 asociada a insulinoma (IA-2/ICA512 y IA2beta). La presencia de uno o más de estos autoanticuerpos en suero está directamente relacionada con riesgo de desarrollo de la enfermedad [111].

Además de los anticuerpos mencionados anteriormente, también se ha descrito la presencia de anticuerpos frente a otras proteínas como la proteína de choque térmico 60 (HSP-60) [132] o el autoantígeno de islote 69 (ICA-69) [133]. Recientemente se ha detectado en pacientes diabéticos afectados por neuropatías la presencia de anticuerpos frente a la proteína periferina [134].

5 El ratón NOD como modelo murino de DT1.

Hasta la fecha han sido pocos los estudios realizados sobre tejido pancreático humano durante la etapa pre-diabética, puesto que la obtención de este tipo de muestras plantea problemas éticos obvios. No obstante, la inaccesibilidad a estos tejidos ha propiciado el desarrollo de métodos alternativos en el estudio de la etiopatogenia de la DT1, como el desarrollo de modelos animales inducidos, espontáneos o transgénicos.



Insulinitis in standard NOD mice

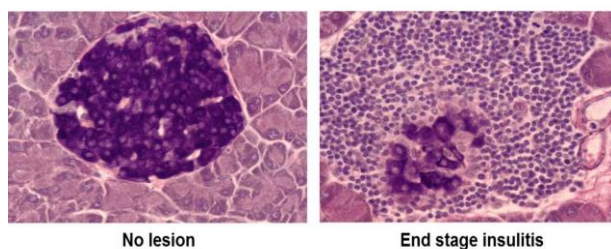


Figura 17. El ratón NOD. En la imagen superior se muestra una fotografía de un ratón de la cepa NOD/Ltj. En la imagen inferior se muestran dos secciones de tejido pancreático teñidos con hematoxilina-eosina, a la izquierda se muestra un islote normal y a la derecha un islote con infiltración masiva de células del sistema inmune (Imágenes extraídas de <http://jaxmice.jax.org>)

El ratón NOD (*Non-Obese Diabetic*) es el modelo animal más ampliamente utilizado en el estudio de la diabetes tipo I, ya que presenta características similares a la enfermedad descrita en humanos. Estos ratones fueron descritos por primera vez en 1980 como una subcepa procedente del cruce de ratones Jcl:ICR (ratones Swiss), que desarrollaba una forma espontánea diabetes [135].

Esta cepa de ratones presenta una fase inicial preclínica de insulinitis que se desarrolla a partir de las 4-6 semanas y que se caracteriza por una invasión de los islotes de Langerhans por parte de linfocitos T CD4, T CD8, B, macrófagos y células dendríticas [104]. A pesar de la identidad genética de la cepa, no todos los ratones desarrollan la enfermedad, fenómeno que al igual que en humanos, pone de manifiesto el origen multifactorial de la enfermedad. El debut de la DT1 en estos ratones tiene lugar entre las 10 y 30 semanas de edad, y la incidencia es de aproximadamente un 70-90% en las hembras y un 40-60% en los machos [136]. Además se ha observado que este modelo de ratón desarrolla otras enfermedades de origen autoinmune como tiroiditis, paratiroiditis, sialitis y adrenalitis [137], lo que refleja un fallo generalizado en los mecanismos de tolerancia y control del sistema inmune en estos ratones.

A nivel genético, se han descrito más de 49 loci de susceptibilidad asociados al desarrollo de DT1 en el modelo NOD que reciben el nombre de Idd (*insulin-dependent diabetes*) [138]. El principal locus de susceptibilidad a la enfermedad es el Idd1, que al igual que en humanos, contienen los genes que codifican para las moléculas de MHC de clase II (*Major Histocompatibility Complex Class II*). El modelo de ratón NOD expresa el alelo de clase II H-2g7. Se ha observado que la presencia del aminoácido aspartato en la posición 57 de la cadena β (el homólogo murino de DQ β en humanos) confiere resistencia a la enfermedad, mientras la presencia de una serina, alanina o valina están relacionadas con la susceptibilidad a la enfermedad [139]. A pesar de que la presencia de este alelo ha demostrado ser esencial para el desarrollo de la DT1 en el animal, no es suficiente en sí mismo.

A parte de la importante contribución de los genes de MHC al desarrollo de la DT1, interacciones complejas entre genes de diferente naturaleza que podrían estar relacionados con el desarrollo a susceptibilidad. En el ratón NOD existen al menos 20 Idds diferentes de MHC, que podrían estar relacionados con el proceso. Entre ellos destacan Idd3, cuyos genes candidatos son IL21 e IL2 [140], [141] e Idd 5.1 relacionado con el gen CTLA-4 [142], todos ellos implicados en la regulación de la respuesta inmunitaria.

Por otra parte, se sabe qué determinados factores externos como los ambientales, la dieta o infecciones víricas afectan al desarrollo de la enfermedad. En este sentido, la incidencia de la cepa de ratones NOD aumenta cuando la colonia se mantiene en un ambiente microbiológicamente controlado, libre de patógenos, conocido como SPF (*Specific Pathogen Free*) y son alimentados con pienso rico en fibra. En el caso de infecciones víricas, se ha observado que la infección por el virus de la coriomeningitis (LCMV) frena el proceso autoinmunitario [124].

5.1 Modelos murinos emparentados con NOD resistente a DT1.

La cepa de ratones NOR (*Non-Obese Resistant*), resistente a DT1 procede del cruce de ratones NOD y C57BL/KsJ. Dentro del genoma del modelo NOR, 14 cromosomas proceden de la cepa NOD y 4 cromosomas (2, 4, 11 y 12) proceden de la cepa diabeto-resistente C57BL/KsJ. Esta combinación genética hace que la cepa NOR sea resistente a la enfermedad. Se ha observado que esta cepa no desarrolla insulinitis ni diabetes [143], sin embargo, si desarrollan otras respuestas autoinmunitarias a nivel de las glándulas salivares como sialitis.

La primera generación resultado del cruce de la cepa NOD con la NOR, denominada F1 [NOD x NOR], se caracteriza también por desarrollar resistencia a diabetes. Sin embargo, a diferencia de los NOR, en todos los ratones se ha observado el desarrollo de insulinitis de forma similar a ratones NOD [144]. Ambos modelos son herramientas potentes en el estudio de los mecanismos y factores genéticos que intervienen en el desarrollo de la T1D.

5.2 Mecanismos efectores de DT1 en ratones NOD.

Al igual que ocurre en humanos, en ratones NOD los linfocitos T también son las principales causantes de la destrucción de las células β pancreáticas. Además, en este modelo se han descrito diferentes alteraciones del sistema inmune, como por ejemplo deficiencias en la capacidad coestimuladora de células presentadoras de antígenos, disminución en el número de linfocitos NK T y linfocitos CD4+CD25+ con función reguladora y defectos en la señalización a través de TCR que en conjunto podrían estar relacionados con fallos a nivel de tolerancia central y periférica, contribuyendo al desarrollo de la enfermedad.

Los primeros estudios basados en la transferencia de esplenocitos de ratones NOD prediabéticos en ratones receptores NOD-SCID (carentes de linfocitos T y B), revelaron que el desarrollo de la enfermedad requiere de la presencia tanto de linfocitos T CD4 como T CD8 [145]. Sin embargo, en la actualidad existe desacuerdo sobre el papel específico desempeñado por las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 en el desarrollo de la respuesta autoinmunitaria [146].

Algunos trabajos señalan el papel fundamental de los linfocitos T CD4 en el desarrollo de la de la respuesta, lo cual queda demostrado por la estrecha asociación de los alelos de MHC de clase II presentes en un individuo con la susceptibilidad a DT1. Por otra parte, se ha observado que la transferencia de clones autoreactivos de linfocitos T CD4 aislados de ratones diabéticos, resulta en la transferencia de la enfermedad incluso en ausencia de otras poblaciones linfocitarias [147], [148].

No obstante muchos autores consideran a los linfocitos T CD8, clásicamente con función citolítica, como responsables del ataque inicial contra las células pancreáticas, puesto que se ha observado que la deficiencia de moléculas de MHC de clase I en las células beta pancreáticas en ratones con fondo genético NOD bloquea la aparición de insulinitis (Katz, Benoist, & Mathis 1993; Serreze et al. 1994; Wicker et al. 1994). Aun así, algunos autores sostienen que incluso este primer ataque es dependiente de la colaboración de las células CD4 [151].

A pesar de la indiscutible importancia de los linfocitos T CD4 y T CD8 en la respuesta inmunitaria frente a islotes, a día de hoy se desconoce cuál es el mecanismo implicado en el inicio de la destrucción autoinmune de los islotes.

En ratones NOD se ha descrito la presencia inicial de macrófagos y células dendríticas a las 3 semanas de edad en la periferia de los islotes y ductos pancreáticos [152]. Se cree que la presencia inicial de estas células del sistema inmune responde a un proceso fisiológico normal de remodelación estructural del páncreas [153]. Sin embargo, en ratones NOD se sabe que los macrófagos juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad pues su depleción o la inhibición de su entrada a páncreas están directamente relacionada con la prevención de la enfermedad [154].

De forma importante, tras el destete en ratones NOD se ha descrito la presencia de macrófagos y células dendríticas alrededor de nervios peri-islote, lo que ha llevado a muchos autores a postular que el ataque a elementos del sistema nervioso podría ser el detonante inicial de la enfermedad [155], [156]. Sin embargo hay que tener en cuenta también que durante este periodo del desarrollo, existen procesos de neogénesis de islotes e hiperactividad de células beta, que sometidas a estrés podrían colaborar en el proceso autoinmune mediante el aumento de expresión de moléculas de MHC de clase II y la presentación de antígenos beta pancreáticos [157].

Por tanto, todos estos procesos junto con los defectos inmunológicos descritos a nivel de macrófagos y células dendríticas de los ratones NOD, que incluyen diferenciación defectiva a nivel de médula ósea, secreción de citocinas alteradas y deficiencia en procesos de fagocitosis podrían generar el marco perfecto de inflamación local y disponibilidad de autoantígenos que darían lugar al inicio del ataque inmune frente a islotes.

Durante este proceso, seguramente los linfocitos T CD8 y T CD4 colaboren en el ataque sobre la célula beta. Los linfocitos T CD4 podrían ser activados previamente por células dendríticas procedentes de islote a nivel de los nódulos pancreáticos. Una vez activados se dirigirían de nuevo a islote donde iniciarían el ataque. Paralelamente los linfocitos CD8 atraídos por el entorno de inflamación una vez en islote podrían ser activados directamente *in situ*, contribuyendo a la destrucción de los islotes.

Pese a la presencia de linfocitos B en el infiltrado pancreático, durante muchos años estas células han sido relegadas a un segundo plano, siendo principalmente consideradas por su capacidad secretora de autoanticuerpos contra diversos antígenos y el valor predictivo de estos como marcadores de la enfermedad. Actualmente, se sabe que desarrollan un papel importante en el proceso de la enfermedad como células presentadoras de antígenos [158] y

que desempeñan una función importante dentro de la enfermedad, puesto que su depleción evita el desarrollo de DT1 [159]. En el apartado 6 se explicará en detalle su papel dentro de la DT1.

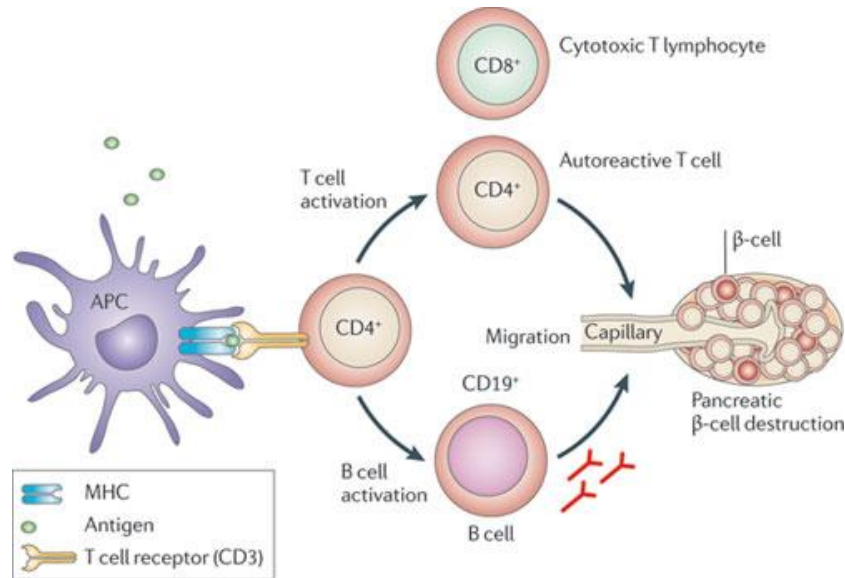


Figura 18. Principales mecanismos efectoros en la DT1. Los autoantígenos β pancreáticos son captados a nivel de islotes por células presentadoras, posteriormente estas células migran a los nódulos pancreáticos donde presentan antígenos a linfocitos T CD4 que se activan, proliferan y migran a islotes. En el islote mediante la secreción de diversas citocinas pro-inflamatorias reclutarán a más linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8 con actividad citotóxica. Dentro de este modelo se piensa que los linfocitos B podrían estar implicados en la presentación inicial de autoantígenos β pancreáticos como APCs y en la destrucción de los islotes mediante la producción anticuerpos anti-islote [160].

5.3 Autoantígenos y autoanticuerpos relacionados con la DT1 en el modelo de ratón NOD.

En el ratón NOD se han identificado numerosos autoantígenos con mayor o menor representatividad y secuencialidad de aparición a lo largo del curso de la enfermedad, fenómeno que recibe el nombre de *epitope spreading* (Tabla 2).

Los autoantígenos cuya respuesta se detecta a edades más tempranas en ratones NOD son la insulina, GAD65 (ácido glutámico descarboxilasa isoforma 65), HSP-60 (proteína de choque térmico 60), IA-2 (proteína 2 asociada a insulinoma) e IGRP (glucosa 6-fosfatasa). En este sentido, se ha descrito que la detección de anticuerpos anti-insulina entorno a las 8 semanas de edad está relacionada con el desarrollo de DT1 [161]. Por el contrario, la presencia de

anticuerpos GAD-65 e IA-2 no está estrictamente relacionada con el desarrollo de la enfermedad [162].

| Autoantígeno | Localización | Reconocimiento |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Insulina (IAA) | Células β /Timo | CD4+, CD8+ y anticuerpos |
| GAD-65 | Células β /Testículos/ Neuronas | CD4+, CD8+ y anticuerpos |
| IA-2 e IA-2 β | Neuroendocrina/Adrenal/Pituitaria | CD4+, CD8+ y anticuerpos |
| ICA-69 | Neuroendocrina/Timo | CD4+ y anticuerpos |
| HSP-60 y HSP-90 | Ubicua e inducible | CD4+ y anticuerpos |
| Periferina | Neuroendocrina | CD4+ y anticuerpos |
| Carboxipeptidasa H | Neuroendocrina | Anticuerpos |
| GM2-1 | Islote | Anticuerpos |
| IGRP | Células β | CD4+, CD8+ |

Tabla 2. Principales antígenos identificados en el modelo de ratón NOD. En la tabla se muestra la localización y la respuesta autoinmune detectada para los principales autoantígenos. GAD65 (ácido glutámico descarboxilasa isoforma 65), IA2 (proteína 2 asociada a insulinoma), IA-2 β (proteína 2 beta asociada a insulinoma ICA-69 (autoantígeno de islote 69), HSP-60 (proteína de choque térmico 60), HSP-90 (proteína de choque térmico 90), GM2-1 (gangliósido pancreático) e IGRP (glucosa 6-fosfatasa) [Adaptado de 163].

En el caso de la insulina [164] y GAD65 [165] cabe destacar la coincidencia entre los epítomos reconocidos por los linfocitos T CD4 en humanos y en el modelo murino NOD. Estos datos concuerdan con el hecho de que los haplotipos de MHC de clase II que confieren susceptibilidad a la diabetes en humanos (HLA-DQ8) y en ratón (H-2g7) son estructuralmente similares, lo cual remarca la influencia que tiene la capacidad de las moléculas de MHC para presentar un determinado repertorio peptídico, sobre la susceptibilidad individual a la DT1 [166].

Cabe destacar que la mayoría de estos autoantígenos presentan una distribución en su expresión no restringida a la célula β . En este sentido, se han descrito que los autoantígenos IA-2, IA-2 β y la periferina son moléculas que se expresan tanto a nivel pancreático como neuronal (Lieberman & DiLorenzo 2003; Puertas et al. 2007). Este hecho tiene una posible explicación en el origen común de ambos tejidos, ya que algunos autores mantienen la hipótesis de que las células endocrinas pancreáticas derivan del ectodermo embrionario, al igual que el sistema nervioso [168], [169].

La presencia de autoantígenos con un perfil de expresión neuroendocrina refuerza la idea de la existencia de un ataque autoinmune frente a elementos del sistema nervioso periférico en islotes [156]. Además de los procesos de remodelación del páncreas durante el periodo perinatal, se sabe que durante el desarrollo de la insulitis existe un proceso paralelo de infiltración de fibras nerviosas secretoras de GAD-65, que se destruyen durante el transcurso de la enfermedad [170]. Por tanto en este proceso autoantígenos como GAD-65, I-A2, ICA-69 y periferina podrían estar involucrados en la amplificación de la respuesta autoinmune.

6 Papel de los linfocitos B autoreactivos en el desarrollo de la DT1.

La importancia de la respuesta de linfocitos B en el desarrollo de la DT1 fue descrita por primera vez en estudios realizados con ratones NOD deficientes en linfocitos B, NOD.Ig μ ^{-/-} [159]. En este estudio, se observó que la delección de linfocitos B en periferia prevenía del desarrollo de la enfermedad tanto en ratones machos como hembras. Por otra parte, no se observaron signos de insulitis, poniendo de manifiesto la importancia de la señalización de linfocitos B en la infiltración de los islotes.

En un estudio similar llevado a cabo por el equipo de Dr. Noorschashm en ratones NOD, se observó que la depleción *in vivo* de los linfocitos B mediante administración de anticuerpos anti- μ desde el nacimiento hasta las 30 semanas de edad, resultaba en la prevención total de la insulitis y sialitis desarrollada por estos ratones. El cese en la administración del anticuerpo, permitía la regeneración de la población de linfocitos B, con la consecuente aparición de insulitis y sialitis [171].

Como se ha comentado anteriormente, la detección de anticuerpos anti-isloote es una herramienta de gran valor predictivo y diagnóstico en humanos. Además, se ha observado que cuanto mayor es el repertorio de autoanticuerpos detectados, mayor es el riesgo de desarrollar la enfermedad. Sin embargo, en ratones se ha demostrado que la transferencia de estos autoanticuerpos no se correlaciona con la transmisión de la DT1 [158], lo que sugiere que la producción de anticuerpos no es un mecanismo primario por el cual los linfocitos B contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, la transferencia pasiva materno-fetal de autoanticuerpos anti-insulina podría estar relacionada con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad en las crías [172]. Por el contrario, en humanos la transmisión materno-fetal de autoanticuerpos parece estar relacionada con la resistencia de la progenie a desarrollar la enfermedad [173].

Los linfocitos B, además de producir anticuerpos, son células con capacidad de presentación de antígenos a linfocitos T CD4 a través de MHC de clase II. Como se puede observar en la tabla 2, muchos de los autoantígenos con una respuesta de anticuerpos asociada presentan también una respuesta de linfocitos T CD4, lo que sugiere una estrecha colaboración entre ambos tipos de poblaciones. En este sentido, se ha observado que los ratones NOD.Ig $\mu^{-/-}$ presentan una respuesta de linfocitos T CD4 defectiva específica para autoantígenos como GAD, insulina e IA-2 comparada con los NOD [158], [174], [175].

Por otra parte, se ha observado que la respuesta de linfocitos T autoreactivos puede ser restaurada en animales NOD.Ig $\mu^{-/-}$ mediante transferencia de células de médula ósea singénicas y linfocitos B esplénicos procedentes de NOD [158]. Además, en este estudio, se ha observado como linfocitos T CD4 anti-GAD previamente activados por linfocitos B, son capaces de desarrollar una respuesta autoreactiva eficiente en ausencia de linfocitos B, lo que pone de manifiesto la importancia de estas células en los procesos iniciales de activación.

Otra serie de estudios dirigidos por el Dr. Noorchashm, remarcan la importancia de la presentación de antígenos por linfocitos B en el desarrollo de la DT1. En este trabajo observaron cómo ratones NOD deficientes en MHC clase II solamente en linfocitos B, no en el resto de células APC, desarrollaban protección a la DT1 (Noorchashm et al. 1999a).

Diferentes trabajos han apuntado a la contribución de determinadas subpoblaciones de linfocitos B en el desarrollo de la enfermedad. En este sentido se ha descrito la importancia de los linfocitos B MZ en la presentación de antígenos. Se ha descrito, que esta población de linfocitos B MZ se encuentra incrementada en los ratones NOD y presenta una alta expresión del receptor del complemento CR1/CR2 que favorece la captación de antígenos a través del sistema del complemento potenciando los mecanismos de presentación. El bloqueo de CR1/CR2, previene el desarrollo de la enfermedad (Noorchashm et al. 1999b).

Por otra parte, se ha descrito que los linfocitos B MZ en ratones NOD presentan una alta sensibilidad a la activación mediada por CD40, IL4 y TLR9 [178].

Estudios realizados por el equipo de JW Thomas, demuestran la importancia de los linfocitos B1 peritoneales en el desarrollo de la DT1. Se ha observado que la delección de esta población mediante lisis hipotónica específica resulta en una disminución del infiltrado pancreático y en una disminución del *onset* de la DT1 en ratones NOD [179].

De forma importante, se ha descrito también que los linfocitos B juegan un papel importante en la amplificación de la respuesta contra antígenos de células β (*epitope spreading*). Los ratones NOD desarrollan una respuesta ordenada y secuencial frente a las proteínas GAD, HSP e insulina, que no ocurre en ausencia de linfocitos B [180].

Los nódulos pancreáticos son considerados como la principal zona de activación y proliferación de linfocitos T CD4, previo al desarrollo de la DT1 [181]. Se ha descrito que la presencia de los linfocitos B en esta región es crítica durante el desarrollo de la respuesta [182].

Por otra parte, se ha descrito que los linfocitos B presentes en el infiltrado de islotes participan en la formación de estructuras foliculares ectópicas, donde podrían interactuar y presentar antígenos a los linfocitos T CD4 autoreactivos *in situ* [183]. Este proceso favorecería también la maduración y aumento de afinidad de los linfocitos B autoreactivos mediante fenómenos de hipermutación somática.

La especificidad de los linfocitos B parece ser importante en el proceso de destrucción de islotes. En este sentido se ha observado que mientras la expresión de un clon de linfocitos B anti-insulina (VH125) acelera el desarrollo de la DT1 en ratones NOD [184], la expresión de un clon de linfocitos B frente a un antígeno no diabotogénico como es el HEL (*Hen Egg Lysozyme*) confiere protección frente a la enfermedad [185]. Este hecho podría tener explicación en la eficiencia de presentación antígeno-específica de los linfocitos B. Estas células al igual que las células dendríticas y macrófagos internalizan antígenos mediante endocitosis para después presentarlos vía MHC clase II, sin embargo son las únicas células capaces de reconocer y capturar antígenos de forma específica a través del BCR favoreciendo su presentación vía MHC clase II. Se ha descrito que este mecanismo es mucho más eficiente en la presentación de antígenos que la endocitosis [186].

Por último, se ha observado que los linfocitos B se encuentran implicados en el mantenimiento de la respuesta autoreactiva de los linfocitos T CD8. En este sentido, se ha descrito que la presencia de linfocitos B promueve la supervivencia de linfocitos T CD8 a nivel de islote [187], lo que potenciaría el proceso de destrucción de las células β pancreáticas.

6.1 Defectos en la tolerancia de linfocitos B en la DT1.

En ratones NOD se han descrito diversas alteraciones en los diferentes mecanismos de tolerancia de los linfocitos B [185]. Estudios de tolerancia en DT1 muestran como los linfocitos B autoreactivos anti-insulina a pesar de presentar características de células en estado de anergia, como escasa proliferación frente a estímulos T-dependientes (anti CD40) o T-independientes (anti-IgM o LPS), son capaces de madurar y entrar en el compartimento de linfocitos B foliculares y marginales [188]. Por otra parte, estos linfocitos B aumentan la expresión de CD86 de membrana tras su activación, pudiendo enviar señales de coestimulación y activación a linfocitos T autoreactivos [188].

Otro de los mecanismos principales de control de tolerancia de linfocitos B alterado, es la edición del receptor. En el ratón NOD al igual que en humanos, se ha observado que el número de secuencias de recombinación RS es significativamente menor al detectado en otras cepas no autoinmunes [103], lo que podría estar relacionado con la generación de un repertorio de linfocitos B más autoreactivo.

Recientemente se ha descrito que los linfocitos B de ratones NOD en comparación con otras cepas no diabetogénicas, presentan una expresión alterada de CD19 en superficie. Se ha observado que la elevada expresión de esta molécula del complejo correceptor, potencia la presentación del autoantígeno IGRP y la expansión de linfocitos T autoreactivos, pudiendo favorecer así el proceso autoinmunitario [189].

7 Desarrollo de moléculas fluorescentes antígeno-específicas para el estudio y caracterización de linfocitos B.

Los linfocitos B como ya se ha explicado anteriormente, son células capaces de secretar anticuerpos en su fase de diferenciación final a célula plasmática. Por otra parte en estadio de linfocito B naive o de memoria expresa en superficie la misma inmunoglobulina, formando el complejo receptor o BCR a través del cual reconocen específicamente antígenos.

Desde el descubrimiento y descripción del BCR, muchos investigadores han centrado sus esfuerzos en el análisis de poblaciones específicas de linfocitos B mediante técnicas de separación celular y citometría de flujo basadas en el uso de moléculas fluorescentes ligadas a antígenos específicos capaces de unirse a su receptor de superficie. La mayoría de las técnicas desarrolladas hasta el momento en esta dirección, pueden ser clasificadas en tres grupos: estudios mediante el uso haptenos, estudios mediante el uso de proteínas o viriones/organismos y por último estudios mediante el uso de epítomos. En la tabla 3, se describen las ventajas e inconvenientes de cada uno de estos sistemas. En todos los sistemas, un fluorocromo, una biotina u otro reactivo es utilizado para detectar el linfocito B unido al antígeno correspondiente.

| Categoría | Tipo de antígeno | Ventajas | Desventajas |
|--|--------------------|---|---|
| Haptenos | Moléculas pequeñas | Respuestas altamente específicas | Moléculas no presentes en patógenos o antígenos autoreactivos |
| Proteínas enteras o viriones/organismos | Antígenos nativos | Presencia de epítospos nativos conformacionales y/o lineales implicados en la respuesta | Reconocimiento de epítospos no relevantes. Método de expresión y producción puede ser limitante |
| Epítospos (ej. tetrámeros de linfocitos B) | Epítospos lineales | Restricción del análisis a un solo epítospo. Técnica de síntesis de péptidos bien establecida | Ruido de fondo asociado al sistema de análisis. Limitado al estudio de epítospos lineales |

Tabla 3. Principales sistemas de detección y estudio de linfocitos B a través del BCR. En la tabla se muestra las características, ventajas y desventajas de los diferentes mecanismos de detección de los linfocitos B.

Los haptenos, son moléculas de pequeño tamaño, como el dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP), frente a los cuales el sistema inmune no responde por su baja capacidad inmunogénica. Sin embargo, cuando estas pequeñas moléculas se asocian a otras moléculas transportadoras o *carriers* de mayor tamaño, son capaces de estimular el sistema inmunológico y generar respuestas específicas frente a estas. Generalmente este tipo de modelos han sido empleados para estudios de la biología de linfocitos B en modelos murinos [190]–[193]. A pesar de la utilidad de este tipo de herramientas para el estudio del desarrollo y funcionamiento del sistema inmune, el hecho de tratarse de moléculas no presentes en patógenos o antígenos autoreactivos, limita bastante su aplicación.

En este sentido, el desarrollo reciente de sistemas de detección mediante el uso de proteínas u organismos patogénicos han supuesto un gran avance en este sentido [194]–[196]. Pese a las ventajas de esta técnica, entre las que hay que destacar que es capaz de analizar la respuesta completa frente a los antígenos nativos presentes en la proteína u organismo, hay que señalar que en muchos casos la presencia de antígenos no relevantes como lípidos de la cápside u otros, incrementaría el ruido de fondo o señal, dificultando el análisis de la respuesta frente a los antígenos de interés.

El desarrollo de técnicas mediante el empleo de epítospos específicos, ha supuesto una solución a este inconveniente, siempre y cuando se trabaje con epítospos lineales donde no se requiera la estructura de la proteína completa. En este sentido, en 2003 el Dr. Newman desarrolló una herramienta de tinción linfocitos B con especificidad anti-dsDNA, principal respuesta implicada en el desarrollo de lupus, demostrando la capacidad de estas moléculas de detectar específicamente linfocitos B anti-dsDNA en ratones [197]. En este caso, las

moléculas tetraméricas estaban constituidas por péptidos de dsDNA biotinilados y conjugados a moléculas fluorescentes de estreptavidina.

Basándose en la misma metodología, recientemente en el año 2009 la Dr. Betty Diamond, publico un estudio de caracterización fenotípica de poblaciones autoreactivas de linfocitos B anti-dsDNA presentes en la sangre de pacientes afectados de lupus [198]. Este estudio describe la correlación existente entre la presencia de altos niveles de linfocitos B anti-dsDNA y el desarrollo de la enfermedad.

Este tipo de técnicas pese a ser más específicas que el resto, no están exentas de problemas, puesto que introduce problemas de ruido de fondo. En este sentido, y como consecuencia de la alta diversidad del repertorio de anticuerpos, las moléculas de estreptavidina y los fluorocromos pueden ser reconocidos de forma específica por anticuerpos. En ratones ha sido descrita la presencia de linfocitos B anti-ficoeritina (PE) [199]. Actualmente este problema, ha sido parcialmente solventado mediante el uso de dos fluorocromos diferentes conjugados al epítipo reduciendo así de forma importante el ruido de fondo de la técnica [200].

Por tanto el desarrollo de moléculas de marcaje específico de linfocitos B es interesante y necesario para el seguimiento y estudio de poblaciones de linfocitos B autoreactivos, pues el curso de la repuesta de estas células podría proporcionar información relevante sobre el estado de evolución de la enfermedad, permitiendo el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

8 Antecedentes del estudio.

8.1 La periferina: proteína de origen neuroendocrino.

La periferina es una proteína clasificada como un filamento intermedio del citoesqueleto de tipo III. En ratones, humanos y resto de mamíferos, se ha descrito su presencia en células del sistema nervioso periférico y algunos subgrupos de células del sistema nervioso central, como neuronas motoras espinales, neuronas de origen sensorial y pequeñas inter-neuronas situadas en el córtex e hipocampo [201]. A nivel patológico, se ha asociado la presencia de agregados de periferina en neuronas motoras de pacientes afectados por esclerosis lateral amiotrófica [202].

Como ya se ha comentado anteriormente la periferina presenta un patrón de expresión neuroendocrino, de forma que se ha descrito también su presencia en células β pancreáticas. La periferina está codificada por un único gen, pero en ratón se han descrito hasta tres isoformas diferentes como resultado del *splicing* alternativo del RNAm [201]. La isoforma

mayormente expresada recibe el nombre de Per 58, de 58 KDa, es el resultado del correcto *splicing* de todas las regiones intrónicas. La isoforma Per 61, originada por *splicing* defectivo del intrón 4, se diferencia de la anterior en que contiene una inserción central de 32 aminoácidos y un peso molecular final de 61 KDa. Por último, la isoforma Per 56, con 56 KDa de peso molecular, presenta una región carboxi-terminal más corta debida a una delección, lo que origina un cambio en la pauta de lectura en la secuencia final de la proteína [203].

8.2 Linfocitos B anti-periferina en el infiltrado de ratones NOD.

A comienzos de los años 90, la *periferina* fue descrita como un autoantígeno relacionado con la DT1 en ratones NOD [204]. Se observó la presencia de autoanticuerpos y la existencia de una respuesta de linfocitos T frente a esta proteína a las 6 semanas de edad en ratones NOD. Sin embargo, durante muchos años fue considerada como un autoantígeno de poca relevancia, debido a estudios que demostraban la eficacia de otros autoantígenos β pancreáticos (GAD-65, insulina, HSP-60,...) en la prevención de DT1 [205], [206] frente a la ineficacia del tratamiento con *periferina* [207].

Recientemente un estudio realizado por el grupo de Dr. Verdaguer, ha descrito la presencia de una importante respuesta autoreactiva de linfocitos B frente a elementos del sistema nervioso neuronal de islotes pancreáticos infiltrados. El estudio del patrón de especificidad de estas células concluyó que la mayoría de linfocitos B presentes en el infiltrado de islotes presentan especificidad anti-*periferina*, y prácticamente la totalidad reconocen las isoformas Per 58 y Per 61 de la *periferina*, lo que hace pensar a los autores en la presencia de un epítipo relevante en la región C terminal de la proteína (Puertas et al. 2007). Por otra parte, el análisis de los reordenamientos genéticos de las cadenas pesada y ligera de las Igs de estos linfocitos B, detectó la presencia de reorganizaciones secundarias como hipermutación somática y cambio de clase en esta población [208], lo que podría indicar que la respuesta de linfocitos anti-*periferina* está activa durante el proceso de destrucción de islotes pancreáticos y probablemente interaccione con linfocitos T CD4 anti-*periferina in situ* o en nódulos drenantes potenciando la respuesta autoinmunitaria.

Investigaciones recientes, demuestran como la pérdida de neuronas sensoriales que inervan los islotes pancreáticos previene la insulinitis y la diabetes en ratones NOD [123], reforzando la idea de que el ataque a diferentes elementos del sistema nervioso como la *periferina* podría ser decisivo en el desarrollo de la diabetes tipo 1.

Por tanto el estudio de la respuesta de linfocitos B anti-periferina desarrollada en ratones NOD podría proporcionar información importante sobre su papel de esta población dentro de la DT1.

II.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La proteína periférica se perfila como un autoantígeno relevante de linfocitos B implicado en el ataque dirigido frente a elementos del sistema nervioso durante el desarrollo de la DT1 en ratones NOD. Por tanto y teniendo en cuenta la importancia del estudio de esta población los objetivos planteados en este trabajo de tesis son:

- El análisis y caracterización de la región antigénica o epítipo presente en la periférica reconocido por linfocitos B autoreactivos en ratones NOD.
- El estudio la respuesta de autoanticuerpos anti-periférica desarrollada en ratones NOD frente a este epítipo.
- El estudio y caracterización de la respuesta celular de linfocitos B anti-periférica generada en ratones NOD, mediante el desarrollo de una herramienta de marcaje específica generada a partir la secuencia del epítipo descrita.

Los datos obtenidos en este estudio pretenden aportar información sobre el epítipo presente en esta proteína y la respuesta de linfocitos B desarrollada frente a esta región en la cepa de ratones NOD. Por otra parte el desarrollo de una nueva molécula de marcaje antígeno-específica proporcionará una valiosa herramienta aplicable en posteriores estudios sobre esta población.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1 DESARROLLO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y OCTÁMEROS DE PERIFERINA.

1.1 Clonación y expresión de proteínas recombinantes de periferina fusionadas a GST.

Las mayoría de los péptidos de periferina (PRPH) generados en este estudio se clonaron directamente dentro del vector de expresión pAK1-6H (un vector de la serie pGEX modificado; Harper et al., 1994), a excepción de los péptidos correspondientes a las proteínas recombinantes PRPH 1-84, PRPH 85-140, PRPH 129-193, PRPH 182-239, PRPH 230-293, PRPH 282-386, PRPH 375-450 y PRPH 429-507, que se clonaron en un primer paso en el vector pBlueScript y en un segundo paso final en el vector de expresión pAK1-6H. El vector de expresión pAK1-6H codifica para una proteína de fusión compuesta en su extremo N-terminal por GST (glutación S-transferasa), y en el extremo C-terminal por una secuencia de aa de 6 histidinas. Presenta dos sitios de restricción para *NcoI* y *XbaI*, entre la secuencia de GST y la cola de histidinas donde se clonaron las secuencias de los diferentes péptidos de PRPH.

1.1.1 Diseño y clonación de proteínas recombinantes de periferina fusionadas a GST.

La amplificación de cada uno de los péptidos de PRPH (ver tabla1) se realizó a partir de un plásmido con el cDNA de la isoforma Per 61, cedido por el Dr. Joan Verdaguer. Todas las secuencias de los oligonucleótidos 5' y 3' utilizados para la amplificación del constructo fueron obtenidas de Bonsai Technologies, y todas las enzimas proceden de Fermentas.

La clonación de los péptidos de las proteínas PRPH 1-84, PRPH 85-140, PRPH 129-193, PRPH 182-239, PRPH 230-293, PRPH 282-386, PRPH 375-450, PRPH 429-507, PRPH 429-466, PRPH 446-485 y PRPH 467-507 se realizó en dos pasos. En la primera etapa se llevó a cabo una reacción de amplificación con las diferentes parejas de oligonucleótidos 5' y 3' a partir de cDNA de Per61 (tabla 1). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 20 ng cDNA, 0.5 μ M de oligonucleótidos, 2 mM dNTPs, tampón PCR *Pfu* 1x (200mM Tris-HCl pH 8.8/100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / 100 mM KCl /1%Tritón X-100/1 mg/ml BSA/20 mM MgSO_4) y 1 U de *Pfu*

polimerasa. Las muestras fueron procesadas en un termociclador (BioRad) con un programa que constaba de una etapa de desnaturalización inicial 94 °C- 4 min, 30 ciclos de 95°C - 30 seg, 55°C - 1min, 61°C - 30 seg, y una etapa final de elongación de 72°C - 7 min.

Una vez obtenidos los diferentes productos de PCR estos fueron clonados dentro del vector pBlueScript. Todas las ligaciones se llevaron a cabo utilizando la enzima T4 DNA ligasa siguiendo métodos estándares y se transformaron en la cepa bacteriana de *E. coli* XL1-Blue (Stratagene; La Jolla, CA, U.S.A.) mediante choque térmico.

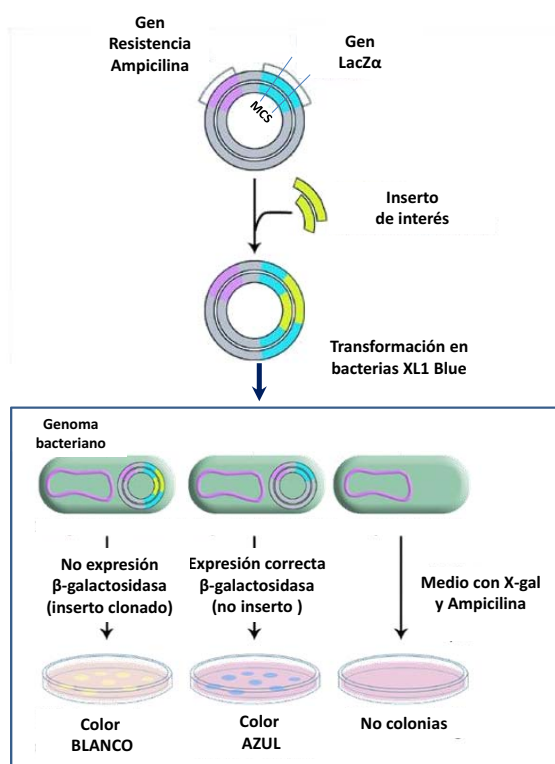


Figura 1. Blue-white screening. Esta técnica de biología molecular basada en la detección rápida y sencilla de colonias de bacterias que han incorporado plásmidos clonados con el inserto de interés mediante color. El plásmido vector pBlueScript contiene el gen mutante *lacZα* con una secuencia interna de MCS. *LacZα* codifica para los 59 aa iniciales de la enzima β-galactosidasa o péptido α, en presencia del factor de inducción IPTG. El péptido ω, producido por la bacteria XL1-Blue, complementa al péptido α devolviendo a la enzima β-galactosidasa su actividad, degradando así el sustrato X gal (análogo de la lactosa) y convirtiéndolo en 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo un pigmento de color azul. Este proceso se ve interrumpido, en bacterias que hayan integrado plásmidos con el inserto de interés clonado en la región MCS. De esta forma las colonias de bacterias de color azul presentan plásmidos vacíos, mientras que las de color blanco presentan el plásmido con el inserto de clonado interés. Imagen extraída de

La selección de los clones correctos se realizó mediante *blue-white screening* (ver figura 1), se prepararon minipreps siguiendo métodos estándares de cada clon, y se realizaron dobles digestiones con *NcoI* y *XbaI* de cada plásmido. Los fragmentos obtenidos fueron purificados en geles de agarosa al 1% (BioRad) siguiendo métodos estándares, y ligados en el vector de expresión pAK1, previamente digerido con las mismas enzimas. Las ligaciones fueron transformadas en bacterias XL1-Blue mediante choque térmico.

La selección de los clones se realizó mediante digestión enzimática usando las enzimas *Nco*I y *Xba*I. A continuación, se prepararon minipreps de cada uno de ellos y se purificaron por extracción con fenol-cloroformo (Fluka) según métodos estándares.

La clonación de los péptidos de las proteínas PRPH 467-495, PRPH 478-507, PRPH 486-507, PRPH 475-495 y PRPH 477-495 se realizó mediante una amplificación previa por PCR de los diferentes fragmentos a partir de cDNA de Per61, y utilizando las diferentes parejas de oligonucleótidos 5' y 3' (tabla 1), usando las mismas condiciones de PCR que para los anteriores fragmentos. Una vez obtenidos los diferentes productos de PCR estos fueron clonados dentro del vector de expresión pAK1 mediante las dianas de restricción *Nco*I y *Xba*I.

| Primer | Secuencia | Proteína Recombinante |
|---------------|---|---|
| PRPH1 F | ACCATGGGAATGCCATCTCCGCCAGCATG | PRPH 1-84 |
| PRHP1 R | ATCTAGACCGAAATCGAGGCGCTCCGAGGGCAA | PRPH 1-84 |
| PRPH2 F | ACCATGGGATCCATGGCCGAGGCCCTCAAC | PRPH 85-140 |
| PRHP2 R | ATCTAGACCTCTGCCCCCGCGCTGGCT | PRPH 85-140 |
| PRPH3 F | ACCATGGGACTGCGCGGGAGCTGAGCCA | PRPH 129-193 |
| PRHP3 R | ATCTAGACCTTGCGGTTTCTTCTTAA | PRPH 129-193 |
| PRPH4 F | ATCTAGACCTCTCTCGGTAGCTTCTT | PRPH 182-239 |
| PRHP4 R | ACCATGGGAGCGCTCAAGCAGAGGTTAGAA | PRPH 182-239 |
| PRPH5 F | ACCATGGGAGAGTTCTCAAGAAGCTACAC | PRPH 230-293 |
| PRHP5 R | ATCTAGACCCGACTTATACCCTCTCTGC | PRPH 230-293 |
| PRPH6 F | ACCATGGGAAAGAATCTGCAGGAGGCAGAG | PRPH 282-386 |
| PRHP6 R | ACCATGGGACAGCTGCGGGAGCTGGAAGA | PRPH 282-386 |
| PRPH7 F | ATCTAGACCTCCAGGGCGAAGTCTCTTC | PRPH 375-450 |
| PRHP7 R | ATCTAGACCTCTCCCTTCCAGTAGCTT | PRPH 375-450 |
| PRPH8 F | ATCTAGACCTGAGCTGTGGATAGAAGACTT | PRPH 429-507/PRPH 429-466 |
| PRHP8 R | ACCATGGGAATAGCCACCTACAGGAAGCTA | PRPH 429-507/PRPH 467-507/PRPH 478-507/PRPH 486-507 |
| PerBpep1R | TTCTAGACCTGGAGAGGCTCCATCTCAG | PRPH 429-466 |
| PerBpep2F | AACCATGGTTCTATCTCTTTGCTCTCT | PRPH 446-485 |
| PerBpep2R | TTCTAGACCTCCCATCCCGGGTCTCAA | PRPH 446-485 |
| PerBpep3F | AACCATGGATAGCCACAGCAAGAAGATG | PRPH 429-466/PRPH 467-495 |
| Per22F | AACCATGGGAAAGGTGGTGACAGAGTCCCA | PRPH 486-507 |
| Per30F | AACCATGGGAACAATTGAGACCCGGATGG | PRPH 478-507 |
| Per8-3-495R | TTCTAGAGGCTGTTCTTCTGGGACTCTG | PRPH 467-495 |
| Per8-3-1F | CATGGTGATCAGGACAATTGAGACCCGGATGGGAGAAAGGTGGTGACAGAGCC | PRPH 476-490 |
| Per8-3-1R | CTAGAGGCTGTGCCACCTTCTCCCATCCCGGGTCTCAATTGTCTGATCAC | PRPH 476-490 |
| Per8-3-2F | CATGGTGACCCGGATGGGAGAAAGGTGGTGACAGAGTCCAGAAAGGACAGCCT | PRPH 481-495 |
| Per8-3-2R | CTAGAGGCTGTCTCTGGGACTCTGTACCACCTTCTCCCATCCCGGGTCTCAC | PRPH 481-495 |
| Per23.1F | CATGGTTCTGATCAGGACAATTGAGAC | PRPH 473-495 |
| Per23.1R | TCGAGTCTCAATTGTCTGATCAGAAC | PRPH 473-495 |
| Per23.2F | TCGAGATGGGGAAGGTTGGTGACAGAGTCCAGAAAGGACAGGGT | PRPH 473-495 |
| Per23.2R | CTAGACCTGTTCTTCTGGGACTCTGTACCACCTTCTCCCAT | PRPH 473-495 |
| Per21F | CATGCTGATCAGGACAATTGAGAC | PRPH 475-495 |
| Per21R | TCGAGTCTCAATTGTCTGATCAGC | PRPH 475-495 |
| Per19F | CATGAGGACAATTGAAGAC | PRPH 477-495 |
| Per19R | TCGAGTCTCAATTGTCTCT | PRPH 477-495 |
| PerL475-S491F | TCGAGATGGGGAAGGTTGGTGACAGAGTCCGG | PRPH 475-493 |
| PerL475-S491R | CTAGACCCGACTCTGTACCACCTTCTCCCATC | PRPH 475-493 |
| PerL475-K493F | TCGAGATGGGGAAGGTTGGTGACAGAGTCCAGAAAGGGT | PRPH 475-491 |
| PerL475-K493R | CTAGACCTTCTGGGACTCTGTACCACCTTCTCCCATC | PRPH 475-491 |

Tabla 1. Listado de secuencias de oligonucleótidos utilizados en los procesos de clonación y expresión de las diferentes proteínas recombinantes de periferina.

La clonación del resto de los péptidos de PRPH, se llevó a cabo mediante hibridación de los oligonucleótidos correspondientes (tabla 1). Para la reacción de hibridación, se utilizaron 200 ng de cada uno de los oligonucleótidos 5' y 3', previamente fosforilados según métodos estándares, calentando a 65°C durante 10 min. A continuación se enfriaron lentamente

durante 20 min, y finalmente se dejaron 30 min a temperatura ambiente (TA). Una vez completada la reacción de hibridación, los diferentes fragmentos se ligaron con el vector pAK1, y finalmente se transformaron en bacterias XL1-Blue mediante choque térmico.

La selección de los clones se realizó mediante PCR de colonias utilizando los oligonucleótidos pGEX-F y PRPH-R correspondiente a cada fragmento, la reacción de amplificación fue llevada a cabo con 0.5 U de *Taq* polimerasa, oligonucleótidos 0.5 μ M, dNTPs 0.2 mM, tampón PCR *Taq* 1x, 3 μ l de DNA (una colonia de *E. coli* resuspendida en 20 μ l de agua); el programa constaba de una etapa de desnaturalización inicial 94 °C - 4 min, 30 ciclos de 95°C - 30 seg, 55°C -30 seg, 61°C - 30 seg, y una etapa final de elongación de 72°C - 5 min.

Se realizaron minipreps de los clones seleccionados y se purificaron según métodos estándares mediante extracción con fenol-cloroformo.

Finalmente, todas las construcciones de PRPH generadas, se secuenciaron utilizando el oligonucleótido pGEXF, asegurando así la correcta pauta de lectura dentro del vector pAK1. La reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit de secuenciación Big Dye® v 3.1. (Applied Biosystems). La lectura de las secuencias se realizó en el servicio de genómica del Parc Científic de Barcelona.

1.1.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes de periferina de fusión a GST.

Todos los plásmidos de expresión obtenidos, fueron transformados en la cepa *E. Coli* BL-21 (New England) mediante choque térmico. Como medio de crecimiento de bacterias se utilizó LB (1% bacto triptona/0,5% extracto de levadura/0.5 % NaCl a pH 7.2) en presencia de 100 μ g/ml de carbenicilina (ApplyChem) como antibiótico de selección.

Para la producción de proteína, se preparó un inóculo inicial de 3 ml a partir de una colonia y se creció ON (*overnight*) a 37 °C en agitación constante. Al día siguiente, se inocularon 500 μ l del pre-cultivo en 500 ml de medio y se creció hasta alcanzar un valor de densidad óptica a 600 nm de 0.6 (Génesis 10 UV). En este punto se recogieron 50 μ l de cultivo como control pre-inducción.

La inducción se llevó a cabo añadiendo al medio de cultivo IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo se dejó crecer durante 4 h más a 37°C en un agitador rotatorio a 250 rpm (VWR OS-500). Pasado este tiempo, se recogió una alícuota de 50 μ l de cultivo como control

post-inducción, se centrifugó el resto del cultivo a 6000 xg (Beckman-Coulter Avanti J-E) durante 15 min a 4 °C, y se congeló el *pellet* obtenido a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Tras descongelar el *pellet*, se resuspendió en 40 ml de PBS/150 mM NaCl pH 7.4 para llevar a cabo una lisis celular mediante 10-12 ciclos sonicación con pulsos de 1 min al 60 % de potencia (Badolin Sondolopus H2070). Se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se filtró utilizando filtros con un tamaño de poro de 0.2 µm de membrana PES para eliminar los precipitados (Milliplex GP Millipore).

| Secuencia de aminoácidos del péptido | Posición | Proteína Recombinante |
|--|----------|-----------------------|
| MPSSASMSHHSSGLRSSISSTSYRRTFGPPPSLSPGAFSYSSSRFSSSRLLGSGPSSSARLGSFRAP RAGALRPSERLDF | 1-85 | PRPH 1-85 |
| SMAELNQFLATRSNEKQELQELNDRFANFIEKVRFLQEQNAALRGELSQARGQE | 85-140 | PRPH 85-140 |
| LRGELSQARGQEPARADQLCQELRRLRELELLGRERDRVQVERDGLAEDLAALKQRLEEETRK | 129-193 | PRPH 129-193 |
| ALKQRLEEETRKREDAEHNLVLFKRDVDDATLSRLEERKIESLMDIEIFLKKLHEEE | 182-239 | PRPH 182-239 |
| EFLKKLHEEELRDLQVSVESQVQVQVEVATVKPELTAALRDIRAQYENIAAKNLQEAEEWYKS | 230-293 | PRPH 230-293 |
| KNLQEAEEWYKSKVREHWGNPGGPRVGRHWWEWRCASQPGLSATAQYADLSDAANRNHEALRQAKQEMNESRRQISLTCVEVDGLRGTNEALLRQLRELEEQFALE | 282-386 | PRPH 282-386 |
| QLRELEEQFALEAGGYQAGAARLEELRQLKEEMARHLREYQELLNKVMALDIEIATYRKLLEG EESRISVPVHSF | 375-450 | PRPH 375-450 |
| IATYRKLLEG EESRISVPVHSFASLSLKTTPPEMEPLQDSHKKMVLRTIETRDGKVVTSQKEQHSDDLKSSIHSY | 429-507 | PRPH 429-507 |
| IATYRKLLEG EESRISVPVHSFASLSLKTTPPEMEPLQ | 429-466 | PRPH 429-466 |
| PVHSFASLSLKTTPPEMEPLQDSHKKMVLRTIETRDGE | 446-485 | PRPH 446-485 |
| DSHKKMVLRTIETRDGKVVTSQKEQHSDDLKSSIHSY | 467-507 | PRPH 467-507 |
| KVVTSQKEQHSDDLKSSIHSY | 486-507 | PRPH 486-507 |
| TIETRDGKVVTSQKEQHSDDLKSSIHSY | 478-507 | PRPH 478-507 |
| DSHKKMVLRTIETRDGKVVTSQKEQ | 467-495 | PRPH 467-495 |
| IRTIETRDGKVVTE | 476-490 | PRPH 476-490 |
| TRDGKVVTSQKEQ | 481-495 | PRPH 481-495 |
| MVLRTIETRDGKVVTSQKEQ | 473-495 | PRPH 473-495 |
| LRTIETRDGKVVTSQKEQ | 475-495 | PRPH 475-495 |
| RTIETRDGKVVTSQKEQ | 477-495 | PRPH 477-495 |
| LRTIETRDGKVVTSQK | 475-493 | PRPH 475-493 |
| LRTIETRDGKVVTS | 475-491 | PRPH 475-491 |

Periferina isoforma de 507 aa, especie mus musculus. Número acceso a secuencia GenBank CAA42500.1

Tabla 2. Librería y nomenclatura numérica asignada a los diferentes péptidos de periferina generados en este estudio. En negrita se resalta la secuencia del epítipo detectado en la región C terminal.

El lisado celular resultante, se incubó durante 2 h a 4 °C en agitación orbital, en presencia de 2.5 ml de una suspensión de esferas de glutatión-sefarosa (Sigma) al 50% en PBS. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS y finalmente se eluyó la proteína con 50 mM Tris-HCl/glutatión reducido pH 8.0. En este punto, se recogió una muestra como control del proceso de purificación.

A continuación se realizó un cambio de tampón a PBS/20 mM Imidazol, por ultrafiltración en tubos Amicon Ultra-15 10 KDa (Millipore) y se llevó a un volumen final de 1 ml. Se filtró nuevamente con filtros de 0,2 µm y se inyectó en una columna de Ni-NTA sepharosa (Amersham) utilizando para ello un sistema automatizado de FPLC (Akta basic, Amersham). Una vez inyectada la muestra, se realizaron lavados con PBS/20 mM Imidazol, y finalmente se eluyó la proteína en presencia de PBS/500 mM Imidazol.

La proteína eluida se concentró en tubos Amicon Ultra-15 10 KDa a 250 μ l centrifugando a 3800 rpm durante 40 min. Se realizó un cambio de tampón a PBS/150mM NaCl pH 7.4 y finalmente se determinó la concentración. La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo mediante la reacción de BCA (Pierce) utilizando como estándar BSA (Pierce).

Las diferentes fracciones recogidas de proteína fueron analizadas por *SDS-PAGE*, como se describe en el apartado 3 de la sección A.

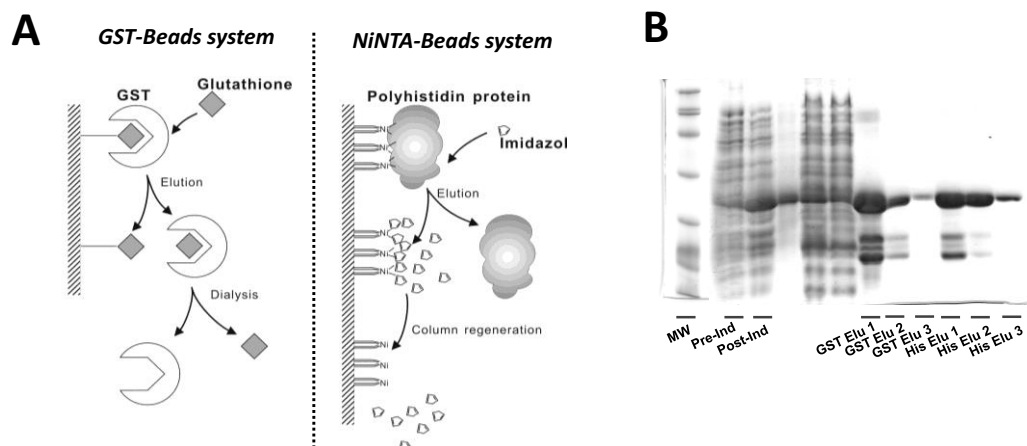


Figura 2. Purificación de proteínas. A. Mecanismo de purificación de proteínas, a través de GST (izquierda) y cola de histidinas (derecha). Imagen extraída de <http://www.intechopen.com/books/protein-engineering-technology-and-application/chromatography-method> B Análisis por *SDS-PAGE* de las diferentes fracciones recogidas durante el proceso de purificación de PRPH 429-507 (Pre-ind: lisado celular pre-inducción de la proteína. Post-ind: lisado celular post-inducción de la proteína. GST Elu 1, 2 y 3: Fracciones recogidas de la elución con glutatión reducido. His Elu 1, 2 y 3: Fracciones recogidas de la elución con Imidazol).

1.2 Clonación y expresión de péptidos de PRPH fusionados al complejo MHC clase II A^{G7}.

1.2.1 Diseño y clonación de péptidos de PRPH fusionados A^{G7} en células S2.

Para la producción de las diferentes estructuras octaméricas de PRPH, en un primer paso se insertó una secuencia de biotilación #85 (Schatz, 1993) en los plásmidos pAK1-PRPH 467-507 y pAK1-PRPH 473-495 mediante digestión con la enzima *Xba*I. A continuación, y mediante PCR usando los oligonucleótidos pGEXF (portador de la diana de restricción *Nco*I) y pGEXSalIR

(portador de la diana de restricción *SalI*) se amplificaron las secuencias de PRPH 467-507 y PRPH 473-495 a partir del plásmido original, y PRPH 467-507#85 y PRPH 473-495#85 a partir del plásmido modificado con la secuencia de biotilación.

En un segundo paso, se clonaron las secuencias de periferina dentro de los vectores codificantes para la cadena α y β que conforman el MHC de clase II A^{E7}.

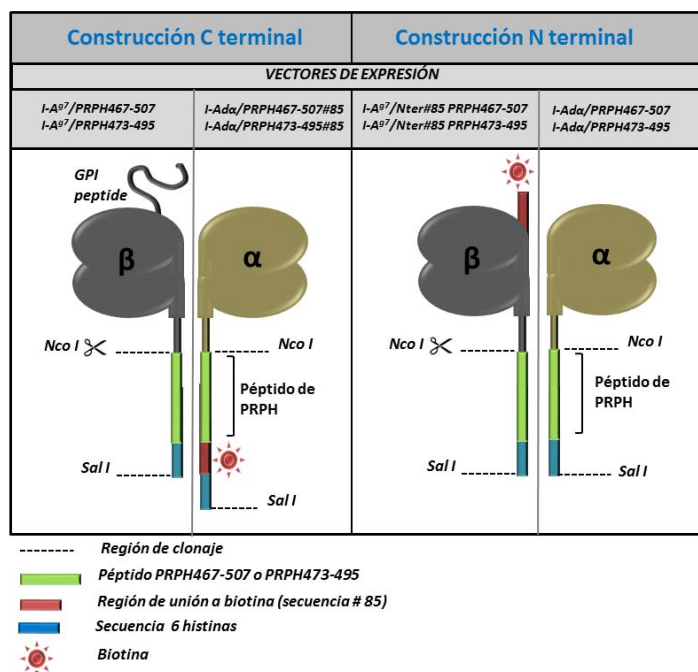


Figura 3. Estructura de las moléculas de A^{E7}/PRPH 467-507 y A^{E7}/PRPH 473-495. En la figura se muestra la combinación de plásmidos utilizada para la expresión de las construcciones C y N terminal, así como las principales dianas de restricción utilizadas para la clonación. Por otra parte, se muestran la localización de los péptidos dentro de la cadena β y α de A^{E7}.

Para la clonación dentro de la cadena α , se utilizó el plásmido pRmHa/I-Ad α modificado mediante la inserción de tres dianas de restricción *NcoI*, *Clal* y *SalI*, que recibe el nombre de I-Ad α Nco/Clal. Para ello se insertó la secuencia procedente de la hibridación de los oligonucleótidos IAdBamHIF e IAdNCoClalSalR.

El vector resultante fue digerido con *NcoI* y *SalI* y se ligaron las secuencias de PRPH 467-507, PRPH 473-495, PRPH 467-507#85 y PRPH 473-495#85, amplificadas en el proceso anterior, y digeridas previamente con las mismas enzimas, obteniendo finalmente cuatro cadenas α modificadas I-Ad α /PRPH 467-507, I-Ad α /PRPH 473-495, I-Ad α /PRPH 467-507#85 y I-Ad α /PRPH 473-495#85.

La cadena β se generó a partir de dos vectores pRmHa/I-A^{E7} y pRmHa/I-A^{E7}GPI₂₈₂, modificados previamente mediante la inserción inicial de una secuencia de tres dianas de restricción *NcoI*, *ClaI* y *SalI*. Para ello se insertó la secuencia procedente de la hibridación de los oligonucleótidos IAg7BstXF y IAg7NcoClaSalR mediante digestión con *BstX* y *SalI*. Estos vectores reciben el nombre de I-A^{E7}NcoI/ClaI y I-A^{E7}GPI₂₈₂NcoI/ClaI.

A continuación, se digirió I-A^{E7}NcoI/ClaI con *SacI* y *BglII*, y se insertó una secuencia de biotilación #85, originada por hibridación de los oligonucleótidos Nter#85 F y R, dando lugar al vector modificado I-A^{E7}NcoI/ClaINter#85. Una vez obtenidos los vectores modificados, I-A^{E7}NcoI/ClaI e I-A^{E7}NcoI/ClaINter#85 fueron digeridos con *NcoI* y *SalI* y ligados con los fragmentos PRPH 467-507 y PRPH 473-495, previamente digeridos con las mismas enzimas. Finalmente se obtuvieron cuatro nuevos vectores modificados, I-A^{E7}/Nter#85 PRPH 467-507, I-A^{E7}/Nter#85 PRPH 473-495, I-A^{E7}/PRPH 467-507 e I-A^{E7}/PRPH 473-495. Una vez obtenidas las construcciones, se preparó una producción de DNA de cada una de ellas (Maxi Prep Kit, Qiagen). El DNA se purificó por un método general de extracción con fenol-cloroformo (Fluka), y las diferentes construcciones se secuenciaron y se esterilizaron por filtración con filtros de 0,22 μm (Ultrafree MC Millipore).

| Primer | Secuencia |
|----------------|---|
| IAdBamH1F | CGCGCGGATCCACTACAGCT |
| IAdNcoClaSalR | TTTGTCGACATCGATTTTTTTCATGGACTGAGCCAGTTCCTTTTCCA |
| IAg7BstXF | AGCCTGAAGAGCCCCATCACT |
| IAg7NcoClaSalR | TTTGTCGACATCGATTTTTTTCATGGACTGGGCGAGTTTCTTCTTGAG |
| Nterm#85F | GGACTTAATGACATTTTCGAGGCCCAAAAATAGAGTGGCATGAAG |
| Nterm#85R | GATCCTTCATGCCACTCTATTTTTTGGGCCTCGAAAATGCATTAAGTCCGC |
| pGEXClaIR | CTCTCTATCGATTCAGGATCCGTGATGGTGAT |
| pGEXSalIR | CTCTGTGCGACTCAGGATCCGTGATGGTGAT |
| Seq#85XbaIF | CTAGTCTGAACGACATCTTCGAAGCTCAGAAAATCGAATGGCATGAAG |
| Seq#85XbaIR | CTAGCTTCATGCCATTCTGATTTCTGAGCTTCGAAGATGTCGTTTCTGAG |
| pGEXF | GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG |

Tabla 3. Listado de secuencias de oligonucleótidos utilizados en los procesos de clonación y expresión de las diferentes proteínas de periferina fusionadas a A^{E7}.

1.2.2 Transfección y expresión de péptidos de periferina fusionados A^{E7} en células S2.

Se realizaron transfecciones con los diferentes plásmidos con el péptido PRPH 467-507 o 473-495, para generar las diferentes construcciones en posición C y N terminal (según se muestra en figura 4). Para generar las construcciones control, se transfectaron los vectores pRmHa/I-

A⁶⁷GPI₂₈₂ e pRmHa/I-Ad α para generar la molécula control C terminal, que recibe el nombre de Ag7/GPI y los vectores I-A⁶⁷Ncol/ClalNter#85 e pRmHa/I-Ad α para producir la molécula control N terminal o I-Ag7/85N.

La transfección se realizó por el método de Cl₂Ca en la línea celular de *Drosophila melanogaster* S2, siguiendo procedimientos estándares y se utilizó el plásmido de resistencia a puromicina pHSP70PL. Tras 2 semanas de selección en medio Schneider (Lonza) suplementado con 10% FCS y 5 μ g/ml de puromicina (Invivogen), se realizó un análisis de la expresión de proteína. Para ello, se crecieron las diferentes líneas en 10 ml de medio *Insect Xpress* (Lonza) y tras alcanzar una confluencia del 80-90%, se indujo la expresión añadiendo CuSO₄ a una concentración final de 0.625 mM. La expresión se analizó al tercer día de inducción. Para ello se recogió el cultivo, se centrifugó a 2000 rpm 5 min a 4°C y se incubó con 25 μ l esferas de Ni-NTA sepharosa al 50% en PBS, para purificar la proteína del sobrenadante. Las diferentes fracciones recogidas de proteína fueron analizadas por SDS-PAGE, como se describe en el apartado 3 de la sección A.

1.2.3 Producción y purificación de péptidos de periferina fusionados a A⁶⁷ mediante FPLC.

Una vez seleccionadas las líneas establecidas con mejor expresión de proteína, se llevó a cabo un crecimiento del cultivo escalado hasta un volumen final de 800 ml en botellas de 2 L (*roller bottles*; Becton Dickinson). A la densidad de 3.5×10^6 células/ml se indujo la expresión con CuSO₄ a una concentración final de 0.625 mM. Tras 3 días de inducción, se recogieron los cultivos y se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min. Se incubó el sobrenadante con 2.5 ml de Ni-NTA sepharosa al 50% en PBS, durante 2 h a 4°C en agitación rotatoria. A continuación, se filtró el sobrenadante para recoger la Ni-NTA sepharosa, en embudo de vidrio Duran porosidad #3 (Schott) acoplado a un sistema de vacío. Se lavó con PBS/20 mM Imidazol, y finalmente se eluyó con PBS/200 mM Imidazol. La proteína eluída se filtró con filtros de 0.2 μ m y se concentró en tubos Amicon Ultra (Millipore) a 250 μ l centrifugando a 3800 rpm durante 40 min. Se cambió el tampón a 10 mM Tris-HCl pH 8.0. La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo mediante la reacción de BCA (Pierce), utilizando como estándar BSA (Pierce).

A continuación se llevó a cabo la reacción de biotilación en las siguientes condiciones: tampón 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 μ M de proteína, 1/10 del volumen de Biomix A (Avidity), 1/10 del volumen de Biomix B (Avidity), biotina 0.25 μ M (Avidity), 1/100 de inhibidor de

proteasa (Boehringer Mannheim protease inhibitor mix, stock: una pastilla en 1 ml de H₂O) y 0,06-0,03 mg/ml de enzima BirA durante la noche a TA. Finalizada la reacción, se cambió el tampón a PBS pH 7.4, y se inyectó en una máquina FPLC para la purificación mediante una columna de Superdex200. La proteína se eluyó en el mismo tampón. Las diferentes fracciones recogidas de proteína fueron analizadas por *SDS-PAGE*, como se describe en el apartado 3 de la sección A.

La cuantificación de las diferentes proteínas se llevó a cabo mediante la reacción de BCA (Pierce). El testaje del porcentaje de biotilación de las proteínas purificadas, se llevó a cabo utilizando 15 µg de proteína. Se incubó con 20 µl de esferas de avidina (Pierce) al 50% en PBS 1h a TA en agitación, se centrifugó en tubos de 1.5 ml con membrana de 0.2 µm a 13500 rpm 2 min, y finalmente las dos fracciones obtenidas, proteína biotilada unida a esferas de avidina y retenida en el filtro, y proteína no biotilada pasada por el filtro, fueron analizadas por *SDS-PAGE* como se describe en el apartado 3 de la sección A. Una vez determinada el porcentaje de biotilación final, las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su uso.

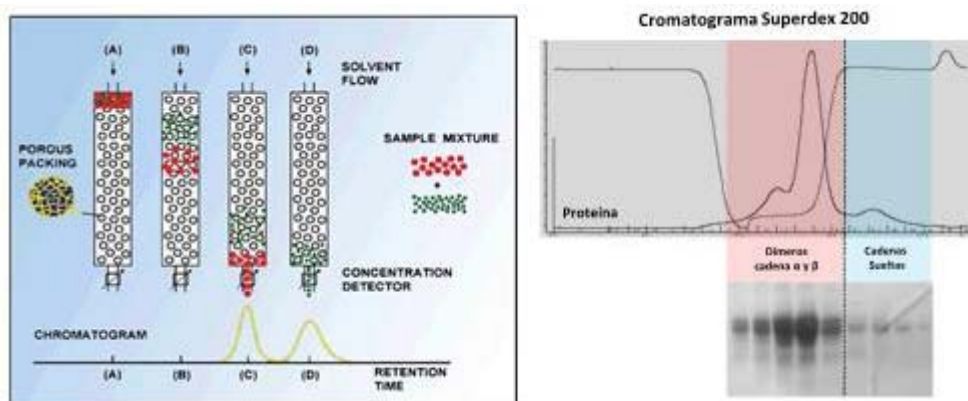


Figura 4. Cromatografía de exclusión por tamaño molecular. Este tipo de cromatografía separa moléculas con diferente peso molecular. Se realiza en columnas cilíndricas rellenas con matrices (fase estacionaria) como por ejemplo, dextranos con enlaces cruzados (*sephadex*). Esta matriz está formada por partículas que forman un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado. Cuando se hace pasar proteínas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel; aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros, sólo podrán moverse en el espacio que queda entre las partículas, y por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En cambio aquellas proteínas capaces de penetrar en los poros se verán retrasadas en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las proteínas se eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular. Imagen extraída de <http://www.mtpgroup.nl/amm-laboratory-course.aspx>. En la imagen de la derecha, se muestra el cromatograma de la proteína A^{β7}/PRPH 467-507 N terminal y el análisis por *SDS-PAGE* de las diferentes fracciones eluidas. Tras su elución de la columna de sephadex, se pueden separar dímeros αβ (proteína completa) de cadenas α y β sueltas.

1.3 SDS-PAGE.

El análisis de expresión de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida al 12.5% (Fluka) en presencia de SDS al 0.02% (Fluka). Las diferentes muestras recogidas se desnaturalizaron por calor a 96°C durante 5 min en tampón SDS 1x (40 mM Tris-HCl pH 6.8/0.06% glicerol/ 0.008% SDS/0.03% Azul de Bromofenol/10 mM DTT). Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron a 180V en un sistema de electroforesis (BioRad). Una vez finalizado el proceso, se fijó en una solución 50% metanol/10% de ácido acético 10 min, a continuación se incubó en solución de tinción 0.025% azul brillante de Coomassie R-250/10% ácido acético entre 15 min y 1 hora, y finalmente se destiñó en una solución de 10% ácido acético hasta visualizar correctamente las bandas de proteína.

2 ANÁLISIS DE LA RESPUESTA AUTOREACTIVA DE CÉLULAS B ANTI-PERIFERINA.

2.1 Origen, estabulación y mantenimiento de ratones.

Las cepas de ratones NOD/LtJ y C57BL/6, utilizadas para experimentos de caracterización celular, fueron adquiridos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y Charles River Laboratories (Spain) respectivamente. Los animales fueron estabulados en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*) en las instalaciones del Servicio de experimentación animal del Parque Científico de Barcelona (SEA. PCB) de la Universidad de Barcelona. Las parejas fundadoras de las cepas de ratones NOD/LtJ y C57BL/6, NOR (Non-Obese Resistant) y F1 [NODxNOR] utilizadas en el estudio de análisis de anticuerpos en suero, realizado en colaboración con el Dr. J. Verdaguer, fueron adquiridas de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y estabuladas en condiciones SPF en el estabulario del Hospital Germans Trias i Pujol. La cepa de ratones NOD/LtJ/DVs utilizada para los estudios de desarrollo y caracterización celular en islotes pancreáticos, procedían de laboratorio del Dr. Dave Serreze. Las parejas fundadoras de cada una de las colonias procedían originalmente de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Todas manipulaciones se realizaron siguiendo protocolos aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal.

2.2 Líneas de hibridomas de células B anti-periferina.

Todas las líneas de hibridomas, y sobrenadantes de cultivo utilizadas en este estudio (ver tabla 4) fueron generosamente cedidas por el Dr. Joan Verdaguer. Los hibridomas I6 y 228E1, fueron cultivados en medio RPMI 10 % FCS, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, 2 mM glutamina, 1 mM piruvato sódico, y 50 µM 2-β mercaptoetanol.

| Nombre del Hibridoma | Cepa Murina | Isotipo del mAb |
|----------------------|----------------|-----------------|
| I6 | 8.3F1[NODxNOR] | IgG2bK |
| H35 | 8.3F1[NODxNOR] | IgG2bK |
| H36 | 8.3F1[NODxNOR] | IgG2bK |
| H39 | 8.3F1[NODxNOR] | IgG2bK |
| H135 | 8.3NOD | IgG2cK |
| H161 | 8.3NOD | IgG2bK |
| H166 | 8.3NOD | IgG2bK |
| H182 | F1[NODxNOR] | IgG2cK |
| H184 | F1[NODxNOR] | IgG2bK |
| H186 | F1[NODxNOR] | IgG2bK |
| H228 | F1[NODxNOR] | IgG2bK |
| H258 | 8.3F1[NODxNOR] | IgG2cK |
| H259B | 8.3F1[NODxNOR] | IgG2cK |
| H260 | 8.3F1[NODxNOR] | IgG2bK |
| H228E1 | F1[NODxNOR] | IgG2bK |

Tabla 4. Líneas de hibridomas de células B utilizados en este estudio. En la tabla se indica la cepa murina de origen de las líneas y el isotipo de los anticuerpos secretados por estas. F1 8.3 hace referencia a la primera generación del cruce de ratones NOD con ratones 8.3 NOD. Los ratones transgénicos 8.3 NOD, expresan un clon diabtogénico de linfocitos T CD8 que recibe el nombre de NY8.3.

2.3 Protocolo de inmunización con proteína GST-PRPH 429-507.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron hembras NOD/Ltj de 6-12 semanas de edad. Se les administró por vía intraperitoneal (i.p.) 100 µg de proteína GST-PRPH8 en tampón PBS emulsionada en adyuvante de Freund completo (Sigma). Tras 14 días, se realizó una re-administración vía intraperitoneal (i.p.) de 100 µg de proteína recombinante PRPH 429-507 emulsionada en adyuvante de Freund incompleto (Sigma). Los grupos control fueron inyectados con la misma cantidad de proteína control GST. A los 3 días tras de la segunda inmunización, se extrajo sangre por punción intracardiaca para análisis de anticuerpos en suero.

2.4 Extracción muestras de sangre y obtención de suero de ratón.

Para la extracción de sangre por punción intracardiaca, se anestesiaron previamente los ratones con isoflurano (Steve). Se utilizaron agujas de 23G, y se extrajeron en cada caso entre 500-800 µl de sangre. Finalmente, se procedió al sacrificio del ratón por dislocación

cervical. Los viales con la fracción de sangre se dejaron ON a 4°C para permitir la coagulación completa de la sangre. Al día siguiente, se centrifugaron a 2000 rpm 5 min a 4°C, se separó la fracción de suero, y se congeló a -20°C para su posterior análisis.

2.5 Medición niveles de glucosa.

Para el seguimiento de la diabetes de los ratones NOD/LtJ/DVs, se utilizaron tiras reactivas colorimétricas de detección de glucosa en orina (Bayer). La positividad de las tiras (>250mg/100ml), en dos días consecutivos, fue considerado como criterio de positividad para la enfermedad. La incidencia de DT1 de la colonia NOD/Ltj estabulada en el Parc Cientific se midió analizando los niveles de glucosa mediante tiras reactivas (Roche, Accu-Check). Los ratones con dos medidas seguidas de glucosa >200mg/dl se consideraron diabéticos.

2.6 ANÁLISIS DE ANTICUERPOS ANTI-PERIFERINA.

2.6.1 Análisis del reconocimiento por *Western Blot* y *Dot Blot*.

Para el análisis de proteínas por *Western blot*, todas las muestras se resuspendieron en tampón SDS 1x y se desnaturalizaron por calor 5 min a 96°C. A continuación se cargaron 10 µg de proteína en geles al 12.5% de poliacrilamida 0.02% SDS y se corrieron en tampón de electroforesis compuesto por Tris-HCl 0.025 mM/0.19% glicina/0.02% SDS. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa (Whatman-GE Healthcare). Para ello, se incubó la membrana durante 10 min en tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 7.5/190 mM glicina/20% metanol) y a continuación las proteínas fueron transferidas utilizando un sistema de transferencia (BioRad) a 100 V durante 45 min. Una vez finalizada, se comprobó la eficiencia de la transferencia incubando la membrana 1 min con una solución compuesta por 0.5% Ponceau S (Sigma) y 1% de ácido acético (ApplyChem).

Para la detección por quimioluminiscencia, la membrana fue bloqueada con 10 mM Tris-HCl pH 7.5/100 mM NaCl/0.1% Tween 20/5% leche descremada (Sveltess), en agitación durante 2 h a TA. A continuación se incubó ON con el anticuerpo primario, sobrenadante de cultivo de los diferentes hibridomas o suero de ratón diluido en el mismo tampón de bloqueo. Al día siguiente, se lavó la membrana con tampón TBS (10 mM Tris-HCl pH 7.5/100 mM NaCl)

durante 45 min en agitación. A continuación se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG contra ratón conjugado a HRP (BD Biosciencie) en TBS a una concentración de 1 μ g/ml durante 30 min en agitación a TA (temperatura ambiente). Se lavó con TBS durante 45 min, y finalmente se reveló usando el kit de detección ECL (Amersham).

Para el análisis por dot blot se cargó 1 μ g de proteína directamente sobre membrana de nitrocelulosa (Whatman-GE Healthcare). Una vez seca, se bloqueó con un tampón PBS/2.5% leche descremada/0.1 % Tween 20 durante 2 h a TA y en agitación. A continuación se incubó con el anticuerpo primario durante la noche, sobrenadante de cultivo de los diferentes hibridomas o suero de ratón diluido, en el mismo tampón de bloqueo y las mismas condiciones. La membrana fue lavada con PBS/ 0.1% Tween 20 durante 30 min en agitación a TA. La incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG contra ratón conjugado a HRP (BD Biosciencie) se llevó a cabo en PBS/0.1 % Tween 20 a una dilución 1/1000 durante 1 h en agitación a TA. A continuación, la membrana fue lavada nuevamente con PBS/0.1.% Tween 20 durante 45 min, y se reveló usando el kit de detección ECL (Amersham).

2.6.2 Detección de anticuerpos IgG e IgM anti-periferina mediante ELISA.

Para la detección de anticuerpos por ELISA, se prepararon placas de 96 pocillos con la proteína recombinante PRPH correspondiente y la proteína GST control, a 10 μ g/ml en PBS y se incubó ON a 4°C (triplicados por muestra). Al día siguiente se lavó la placa 3 veces con 200 μ l por pocillo de PBS/0.1% Tween 20, y se bloqueó con 100 μ l de PBS/1mM EDTA/2.5% BSA durante 3 horas a 37°C. Pasado el tiempo de bloqueo, se retiró el tampón y se añadió el sobrenadante de hibridoma o el suero de ratón previamente diluidos a la concentración correspondiente en tampón de bloqueo, y se incubó ON a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las placas 3 veces con veces con 200 μ l por pocillo de PBS/0.1% Tween 20, y se incubaron 1 h a TA con 50 μ l de anticuerpo de detección anti-IgG contra ratón conjugado con HRP (1 μ g/ml) o anti-IgM contra ratón conjugado a biotina (1 μ g/ml). A continuación, se lavó la placa y se incubó 1 h a TA con 50 μ l 0.5 μ g/ml de SA-HRP para la detección de anti-IgM. Finalmente, se lavaron las placas y se procedió a su revelado añadiendo 100 μ l por pocillo de tampón sustrato de revelado o-fenilendiamina (OPD, Sigma). La reacción se paró con HCl 3N, y la lectura se realizó a 492 nm (Tecan Infinite M200). Para la detección de anticuerpos anti-kappa en suero de ratones NOD.TCR α -/-, las placas se cubrieron con proteína de la misma forma, y a continuación se incubaron 1 h a TA con 50 μ l de anticuerpo de detección 1 μ g/ml anti-kappa contra ratón conjugado a biotina (Jackson Lab). Se lavaron las placas 3 veces con veces con

200 μ l por pocillo de PBS/0.1% Tween 20 y seguidamente se incubó con una solución de avidina conjugada a AKP (Sigma). Finalmente, se lavaron las placas de la misma forma y finalmente se procedió a su revelado añadiendo 100 μ l por pocillo de sustrato de revelado BCIP®/NBT (Sigma).

2.6.3 Detección de periferina fusionada a A^{g7} mediante ELISA.

Para detectar la expresión de PRPH8.3 o PRPH23 fusionadas a A^{g7} en posición N o C terminal, se prepararon placas de 96 pocillos con avidina a 10 μ g/ml en PBS y se incubó ON a 4°C (triplicados por muestra). Al día siguiente se lavó la placa 3 veces con 200 μ l por pocillo de PBS/0.1% Tween y se bloqueó con 100 μ L de PBS/1mM EDTA/2.5% BSA durante 3 h a 37°C. Pasado el tiempo de bloqueo se retiró el tampón, se añadieron las proteínas A^{g7}/PRPH biotiniladas a una concentración final de 10 μ g/ml y se incubó 2 h a TA. Los pasos siguientes lavados e incubación con el anticuerpo de detección anti-IgG de ratón conjugado a HRP se llevaron a cabo como se explica en el apartado 2 de la sección B.1.

2.6.4 Análisis de la especificidad de anticuerpos mediante ELISA de competición.

Para el desarrollo del ELISA de competición, en primer lugar se titularon los sobrenadantes de cultivo de las diferentes líneas de hibridomas y suero de ratones NOD, para seleccionar la dilución apropiada para el ensayo, utilizando PRPH 473-495 para la detección de anticuerpos.

Una vez determinadas, 1/10 en el caso de los hibridomas y 1/300 para suero de NOD, se incubaron ON a 4°C con concentraciones crecientes de péptido sintético 0 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M y 1000 μ M, tanto con el péptido PRPH 473-495 específico, como con el péptido no relevante PRPH 7.13 utilizado como control. A continuación se prosiguió el ELISA según la metodología descrita en el apartado 2 de la sección B.1.

2.6.5 Análisis de la especificidad de reconocimiento mediante inmunofluorescencia con el neuroblastoma N1E-115.

Con el objetivo de analizar la capacidad de bloqueo del péptido sintético PRPH 473-495, en la unión del mAb 228E1 a PRPH nativa, se realizó una inmunofluorescencia con la línea de neuroblastoma murino N1E-115, cedida por el laboratorio del Dr. J. Verdaguer.

Para ello, se sembraron células sobre cubreobjetos con poli-lisina en placas de cultivo de 24 pocillos en medio RPMI 10 % FCS, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomina, 2 mM glutamina, 1 mM piruvato sódico, 50 µM 2-β mercaptoetanol y se incubaron ON a 37°C. A continuación se lavaron los pocillos con PBS y se fijaron las células incubando 10 min a TA con PBS/4% formaldehído. Se lavó, y se permeabilizó con PBS/0.01% Tritón durante 5 min a TA. Se lavó nuevamente con PBS y se procedió a la incubación con 50 µl del sobrenadante 228E1 mAb (dilución 1/10 utilizada en el ELISA de competición) bloqueado ON con el péptido PRPH23 100 µM. Como control, se incubaron células con el sobrenadante 228E1 mAb (dilución 1/10) bloqueado con 100 µM de un péptido no relevante 2.5mi, y células con el sobrenadante 228E1 sin bloquear. Al día siguiente, se lavaron las células con PBS y se incubó 3 h a TA con el anticuerpo secundario de detección Alexa 555 anti-IgG contra ratón (Invivogen) a una concentración de 10 µg/ml. A continuación se lavaron las células con PBS, y se incubaron 10 min con Hoechst 1:1000 para la tinción de núcleos. Tras un último lavado en PBS y H₂O, los diferentes cubres se montaron en portaobjetos añadiendo una gota de medio de montaje ProLong[®] Gold antifading (Life Technologies). Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia DMIRB (Leica).

2.7 ANÁLISIS CELULAR DE LINFOCITOS B ANTI-PERIFERINA.

2.7.1 Obtención de muestras celulares de bazo, nódulos pancreáticos y peritoneo.

Para la obtención de muestras celulares, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Primeramente se realizó un lavado peritoneal y a continuación se extrajeron los nódulos pancreáticos y el bazo de cada ratón.

Para el lavado peritoneal se inyectaron 10 ml de tampón de FACS, PBS/2%FCS, por vía intraperitoneal. Los nódulos pancreáticos y el bazo de cada ratón se extrajeron y se

disgregaron de forma mecánica recogiendo la suspensión celular en tampón de FACS. Una vez recogidas todas las muestras, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. Las muestras de nódulos pancreáticos y peritoneo se resuspendieron en tampón FACS.

Las muestras de bazo fueron lisadas para eliminar los eritrocitos mediante resuspensión en tampón de lisis (150 mM NH_4Cl /10 mM NaHCO_3 /0.1 mM EDTA-Na_2 a pH 7.38) e incubación 5 min a TA. Tras la incubación las muestras fueron lavadas dos veces con 5 ml tampón de FACS y resuspendidas finalmente en 1 ml de tampón FACS.

2.7.2 Aislamiento de islotes pancreáticos mediante digestión con colagenasa.

Se utilizó colagenasa tipo IV (Roche) para digerir el páncreas con el fin de poder aislar los islotes; la colagenasa se utilizó a una concentración equivalente a 5 U/ml, junto con DNAasa (10 $\mu\text{g/ml}$) en HBSS (Lonza). El protocolo seguido consistió en inyectar 5 ml de la solución colagenasa/DNAasa a través del conducto pancreático. A continuación se extrajeron los páncreas y se incubaron 30 min a 37°C. La reacción se paró añadiendo HBSS frío y pipeteando sucesivas veces provocando la disgregación mecánica del páncreas. Posteriormente se lavó 2 veces con HBSS para eliminar los restos de colagenasa y enzimas pancreáticas. Finalmente, se resuspendió en medio RPMI media 10 % FCS, 50 U/ml penicilina, 50 $\mu\text{g/ml}$ estreptomina y 2 mM glutamina, y se procedió al aislamiento de islotes manual bajo lupa microscópica.

2.7.3 Marcaje de antígenos de superficie y BCR mediante anticuerpos y octámeros de periferina.

2.7.3.1 Muestras de ratón.

Una vez repartidas las diferentes muestras, se llevó a cabo un bloqueo con avidina 0.5 mg/ml, incubando las muestras 1 h a TA. A continuación, se realizó la tinción con los diferentes octámeros de A^{g7} /PRPH y A^{g7} control a una concentración final de 8.5 $\mu\text{g/ml}$ durante 15 min en hielo. Los octámeros se prepararon previamente incubando las proteínas A^{g7} /PRPH y A^{g7} /GPI con SA-PE o SA-APC (Columbia Biosciencie) a un ratio final de 5:1 en tampón FACS ON o 1 h a 37°C. Posteriormente, las células fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes durante 30 min a 4 °C.

Paneles de anticuerpos utilizados:**Análisis de linfocitos B anti-PRPH convencionales:**

- Tinción simple: CD19/B220 FITC, A^{g7}/PRPH o A^{g7}/GPI PE, CD3 PE-Cy5, F4/80 PE-Cy5, CD11c PE-Cy5.
- Tinción doble: CD19/B200 FITC, A^{g7}/PRPHC o A^{g7}/GPI PE y APC, CD3 PE-Cy5, F4/80 PE-Cy5, CD11c PE-Cy5.

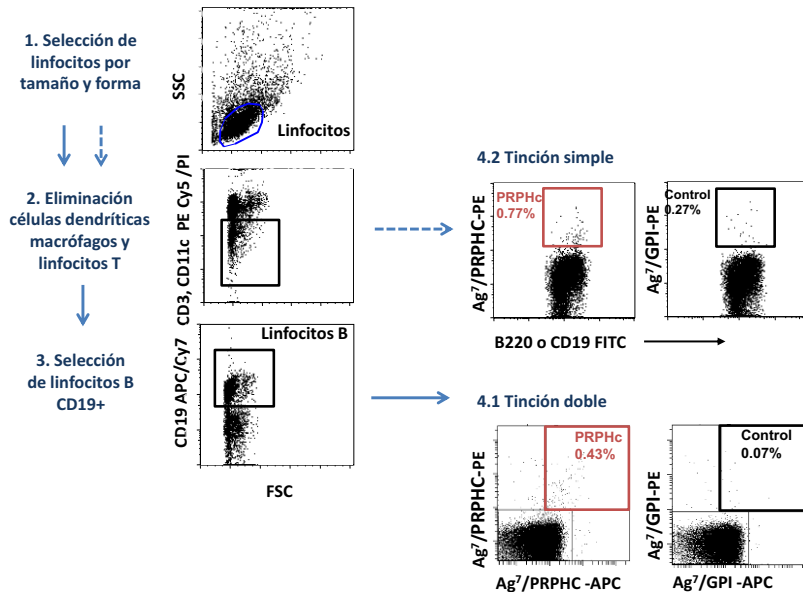


Figura 5. Estrategia de detección de linfocitos B anti-PRPH mediante el uso de octámeros de A^{g7}/PRPH 467-507C. En la imagen se muestran la jerarquía de análisis aplicada para la detección de linfocitos B específicos, tanto por tinción simple como doble.

Análisis de linfocitos B anti-PRPH Marginales/Foliculares: CD23 FITC, A^{g7}/PRPH 467-507C o A^{g7}/GPI PE y APC, CD3 PE-Cy5, F4/80 PE-Cy5, CD11c PE-Cy5, CD19 APC-Cy7 y CD21 Pacific Blue.

Análisis de linfocitos B anti-PRPH B1a y B1b: CD5 FITC, A^{g7}/PRPH 467-507C o A^{g7}/GPI PE y APC, CD3 PE-Cy5, F4/80 PE-Cy5, CD11c PE-Cy5, CD19 APC-Cy7, Mac-1 Pacific Blue.

Análisis de linfocitos B anti-PRPH B T1/T2: IgM FITC, A^{g7}/PRPH 467-507C o A^{g7}/GPI PE y APC, CD3 PE-Cy5, F4/80 PE-Cy5, CD11c PE-Cy5, CD19 APC-Cy7 e IgD Pacific Blue.

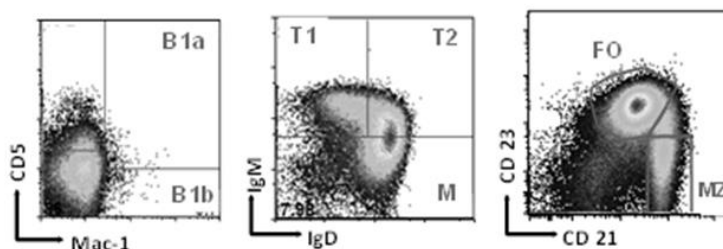


Figura 6. Clasificación de las diferentes poblaciones de linfocitos B en periferia según marcadores de expresión en superficie. Linfocitos B tipo B1: B1a (Mac-1+, CD5+), B1b (Mac-1+, CD5-). Linfocitos B transicionales y maduros: T1 (IgM+IgD^{low/-}), T2 (IgM+IgD+) y M (IgM^{low/-}-IgD+). Linfocitos B tipo B2: FO (CD23+CD21^{low/-}) y MZ (CD23^{low/-}-CD21+).

Finalmente, se lavaron las células y se resuspendieron en tampón FACS con yoduro de propidio (PI, Sigma) 5 µg/ml para teñir y eliminar las células muertas.

| Anticuerpo | Clon |
|------------------------|-----------|
| IgG FITC | Poly4053 |
| IgM FITC | RMM-1 |
| IgD Pacific Blue | 11-26c.2a |
| CD5 FITC | 53-7.3 |
| Mac1 Pacific Blue | M1/70 |
| CD21/CD35 Pacific Blue | 7E9 |
| CD23 FITC | B3B4 |
| B220 FITC | RA3-6B2 |
| CD19 FITC/APC Cy7 | 6D5 |
| CD44 Pacific Blue | IM7 |
| CD86 Pacific Blue | GL-1 |
| CD3 Pe/Cy5 | 17A2 |
| CD11cPe/Cy5 | N418 |
| F4.80Pe/Cy5 | BM8 |

Tabla 5. Listado de anticuerpos usados para análisis por citometría. En la tabla se muestran los clones de los anticuerpos utilizados. Todos ellos fueron adquiridos en Biolegend.

2.7.3.2 Tinción de superficie del hibridoma I6.

Para realizar este experimento se recogieron las células tras alcanzar una confluencia en cultivo del 50-60 %, con el objetivo de garantizar la máxima viabilidad celular. En un primer paso, para confirmar la expresión de BCR en superficie, se realizó una tinción con un anticuerpo anti-IgG FITC de superficie incubando las células 30 min a 4°C. Finalmente, se lavaron las células y se resuspendieron en tampón FACS con yoduro de propidio 5 µg/ml para teñir las células muertas.

Al igual que para las muestras de ratón, la tinción con las diferentes construcciones de A^{g7}/PRPH y sus correspondientes controles, se llevó a cabo tras un bloqueo previo con avidina 0.5 mg/ml incubando las células 1 h a TA. A continuación se realizó la tinción con los

octámeros a una concentración final de 20.1 µg/ml durante 15 min en hielo. Los octámeros se prepararon tal y como se describe en el apartado anterior, a excepción de los preparados para los ensayos de competición donde se incubaron previamente con mAb del sobrenadante de cultivo del hibridoma 228E1 ON a una concentración de 20.1 µg/ml.

2.7.3.3 Análisis mediante citometría de flujo.

Para el análisis por FACS, se utilizaron los citómetros de flujo BD FACScan, BD FACScalibur, BD FACScanto II y BD LSRII Fortessa (BD Biosciences). Los resultados fueron analizados con el programa FlowJo versión 8.7.1 (Tree star, Inc. 1997- 2008).

2.7.4 Aislamiento de linfocitos B anti-periferina y detección específica de secreción de anticuerpos mediante ELISPOT.

Para llevar a cabo este experimento, se aislaron esplenocitos y células procedentes de peritoneo, y se realizó una tinción doble con los octámeros APC-A^{g7}/ A^{g7}/PRPH 467-507C y PE-A^{g7}/ A^{g7}/PRPH 467-507C, y el panel de anticuerpos FITC anti-CD19, PE-Cy5 anti-CD3, anti-F4/80 y anti-CD11c, según se describe en el apartado 3.1.

A continuación se llevó a cabo una separación celular de linfocitos anti-A^{g7}/PRPH APC+PE+ utilizando el separador celular FACSAria (Becton Dickinson, USA). Por otra parte, se prepararon las placas de ELISPOT (*nitrocellulose bottomed 96-well Multiscreen HA filtration plates*; Millipore) mediante preincubación ON a 4°C con 80 µg/ml de proteína recombinante PRPH 429-507 o GST como control. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS/0.1% Tween 20 y se bloqueó con 100% FCS durante 3 h a 37°C. Una vez finalizado el proceso de separación, se retiró el FCS de los pocillos y se sembraron 4000 células positivas por A^{g7}/ A^{g7}/PRPH 467-507C -APC y -PE, 4000 células B CD19+ (control negativo) y 1000 células del hibridoma I6 (control positivo) por pocillo en 200 µl de medio RPMI 10 % FCS, 50 U/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, 2 mM glutamina, 1 mM piruvato sódico, y 50 µM 2-β mercaptoetanol suplementado con 2.5 µg/ml of anti-CD40 Ab (Biolegend), a excepción de los pocillos con el hibridoma. Las placas de ELISPOT se incubaron durante 72 h a 37°C. A los 3 días de estímulo, se lavó la placa tres veces con PBS/0.1% Tween 20 y se incubó 2 h TA con el anticuerpo anti-Ig kappa contra ratón conjugado a biotina (Biolegend). Se continuó con el proceso mediante tres lavados con PBS/0.1% Tween 20, y se realizó una última incubación con avidin-HRP (Bioscience, USA). Finalmente se llevó a cabo el revelado añadiendo sustrato AEC (Sigma-

Aldrich, Mo, USA) y se paró la reacción con H₂O. La lectura de la placa se realizó lector automático de ELISPOT (AID EliSpot Autoimmun Diagnostika GmbH).

3 ANALISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico de datos se utilizaron los programas GraphPad Prism 4.0 y Statgraphics Centurion. Todos los valores mostrados en las gráficas representan la media ± desviación estándar (SD).

La comparativa estadística entre los diferentes grupos experimentales se realizó aplicando Student t test y ANOVA con un pos-test comparativo de Bonferroni. Para experimentos con tamaños muestrales pequeños se aplicó el test U Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ son considerados estadísticamente significativos.

IV.RESULTADOS

RESULTADOS

1 IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL EPITOPO RECONOCIDO POR LINFOCITOS B ANTI-PERIFERINA

1.1 Determinación de la secuencia del epítipo reconocido por hibridomas de células B anti-periferina infiltrantes de islote.

Con el objetivo de identificar y caracterizar la región antigénica o epítipo presente en la periferina (PRPH), en este estudio se generó una librería completa de proteínas recombinantes de fusión a glutatión S-transferasa (GST) con diferentes fragmentos de la isoforma más larga de la periferina denominada Per 61. En la figura 1 se muestra la estructura general de las proteínas. Las diferentes proteínas presentan una región N-terminal formada por una región GST, seguida de una región central correspondiente a la secuencia del péptido de PRPH expresado y una región C terminal con una secuencia de 6 histidinas.



Figura 1. Esquema general de la estructura de las proteínas recombinantes de periferina. Los diferentes péptidos de periferina utilizados en este estudio, se expresaron en la cepa bacteriana *E. coli* en forma de proteínas recombinantes de fusión a GST (glutatión S-transferasa). Dentro de la estructura, el péptido se localiza entre la secuencia de GST del extremo N terminal y una secuencia de 6 histidinas localizada en el extremo C terminal.

La proteína GST, de 211 aa de longitud (26 KDa), se expresa de forma soluble en bacterias *E. coli* y puede ayudar a solubilizar proteínas recombinantes. Por este motivo, su fusión a cualquier péptido puede favorecer la expresión de este, además de impedir su degradación y facilitar el proceso de purificación, al igual que ocurre con la secuencia de histidinas.

Para la generación de la librería de proteínas recombinantes, se llevó a cabo la clonación de los diferentes fragmentos dentro del vector final de expresión pAK-1 entre la secuencia de la GST y la secuencia de histidinas. A continuación, las proteínas fueron expresadas en *E. coli* y purificadas secuencialmente con glutatión S-sefarosa y Ni-NTA agarosa.

Con el objetivo de facilitar la comprensión y seguimiento del estudio se ha asignado una nomenclatura a las diferentes proteínas recombinantes generadas. En la tabla 1, se muestra la nomenclatura de cada péptido y la región dentro de la periferina donde se localizan.

| Nomenclatura Proteínas Recombinantes | Secuencia de aa |
|---|--------------------|
| PRPH 1-84 | M1-F84 |
| PRPH85-140 | S85-E140 |
| PRPH129-193 | L129-K193 |
| PRPH182-239 | A182-E239 |
| PRPH230-293 | E230-S293 |
| PRPH282-386 | K282-E386 |
| PRPH375-450 | N375-E450 |
| PRPH429-507 | I429-Y507 |
| PRPH 429-466 | I429-Q466 |
| PRPH 446-485 | P446-E485 |
| PRPH 467-507 | D467-Y507 |
| PRPH 486-507 | K486-Y507 |
| PRPH 478-507 | T478-Y507 |
| PRPH 467-495 | T478-Y507 |
| PRPH 476-490 | I476-E490 |
| PRPH 481-495 | T481-Q495 |
| PRPH 473-495 | M473-Q495 |
| PRPH 475-495 | L477-Q495 |
| PRPH 477-495 | L477-Q495 |
| PRPH 475-493 | R475-Q493 |
| PRPH 475-491 | L475-S491 |

Tabla 1. Nomenclatura de las proteínas recombinantes de periferina generadas en este estudio. En la columna de la izquierda se indica el nombre asignado a cada proteína, y en la columna de la derecha el aminoácido y la posición del primer y último residuo de la isoforma Per 61 de la proteína.

El estudio inicial de antigenicidad de los diferentes fragmentos se llevó a cabo mediante análisis por *Western Blot (WB)*. Para ello, se utilizó un repertorio de hibridomas de células B anti-PRPH procedentes del infiltrado de islotes pancreáticos, cedidos por el Dr. J. Verdaguer. En la tabla 4 de la sección de materiales y métodos se listan las diferentes líneas de hibridomas de células B utilizados en este estudio.

En un primer paso se generó una librería de 8 péptidos solapantes desde el extremo N terminal al C terminal. Una vez obtenidas las diferentes proteínas, se llevó a cabo un análisis

mediante *SDS-PAGE* (figura 2) con el objetivo de verificar su correcta expresión. El tamaño de todas las proteínas resultó ser el correcto, a excepción del fragmento PRPH 1-84, donde se observó una expresión truncada o parcial de la proteína.

Una vez expresadas y purificadas todas las proteínas, se llevó a cabo un análisis por *WB* con el mAb del sobrenadante de cultivo del hibridoma I6, uno de los 20 hibridomas generados en el laboratorio del Dr. J. Verdaguer que reconocen PRPH. Como se observa en la parte inferior de la figura 2, de todas las regiones de la PRPH expresadas únicamente fue reconocida la región de los últimos 79 aa de la región C-terminal denominada PRPH 429-507.

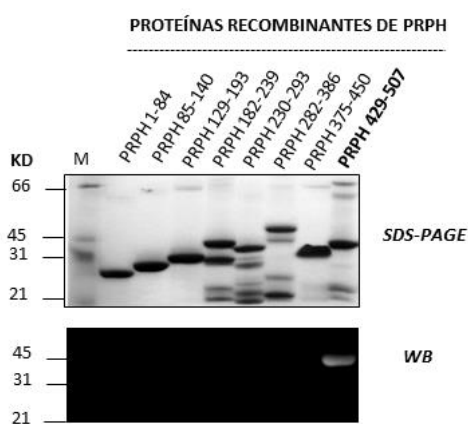


Figura 2. El epítipo de la periferina se localiza en los últimos 79 aa de la región C terminal. En la parte superior de la figura, se muestra el análisis por *SDS-PAGE* al 12.5% de las diferentes proteínas recombinantes expresadas y purificadas. En la parte inferior, se puede observar el resultado del *WB* llevado a cabo con el mAb del hibridoma anti-PRPH, I6.

En un segundo paso, con el objetivo de delimitar la secuencia del epítipo, se diseñó una segunda librería de proteínas recombinantes de la región C terminal. Inicialmente, se generaron 3 nuevas proteínas solapantes de aproximadamente 40 aa de longitud, cubriendo la secuencia completa de PRPH 429-507 (figura 3A). Estas proteínas recibieron el nombre de PRPH 429-466, PRPH 446-485 y PRPH 467-507. Una vez expresadas y purificadas, se llevó a cabo un análisis mediante *WB* con el mAb del sobrenadante del hibridoma I6. Como se muestra en figura 3B, de los tres fragmentos, únicamente PRPH 467-507 fue reconocido por el hibridoma I6, delimitando así el epítipo a los últimos 41 aminoácidos de la región C terminal de la periferina.

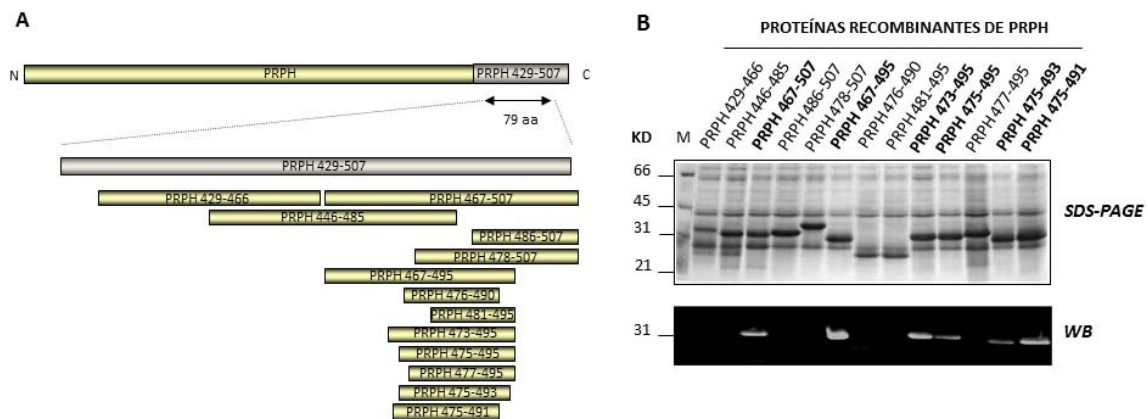


Figura 3. El epítipo de la periferina reconocido por el hibridoma I6 se localiza en la región L475-S491 de la proteína. A. Esquema orientativo de la localización de los péptidos analizados dentro de la secuencia de PRPH 429-507. B. En la parte superior de la figura, se muestra el análisis por *SDS-PAGE* al 12.5% de la expresión de las diferentes proteínas recombinantes generadas. En la parte inferior, se puede observar el resultado de *WB* realizado con el mAb del hibridoma anti-PRPH I6. En negra se señalan las secuencias reconocidas por el hibridoma.

Como se puede observar en la figura 3A, a continuación se generaron nuevas proteínas recombinantes con péptidos de menor tamaño, que cubrían diferentes regiones de PRPH 467-507. Estas proteínas recibieron el nombre de PRPH 486-507, PRPH 478-507, PRPH 467-495, PRPH 476-490, PRPH 481-495, PRPH 473-495, PRPH 475-495, PRPH 477-495, PRPH 475-493 y PRPH 475-491. Una vez expresadas y purificadas, se llevó a cabo un análisis por *WB* con el mAb de I6. El resultado final, mostrado en la figura 3B, reveló la presencia de una secuencia consenso de reconocimiento de 17 aa, localizada en la región L475-S491 de la periferina, presente en las proteínas PRPH 467-495, PRPH 473-495, PRPH 475-495, PRPH 475-493 y PRPH 475-491.

Una vez definida la secuencia del epítipo, y con el objetivo de determinar si la respuesta frente a esta región está restringida únicamente al hibridoma I6, o se trata de una respuesta generalizada frente a la proteína, se analizó el patrón de reconocimiento del resto de hibridomas de células B anti-PRPH (Tabla 4-sección materiales y métodos). Para ello, se llevó a cabo un análisis mediante *dot blot* con las proteínas PRPH 429-507, PRPH 467-507, PRPH 473-495 y PRPH 475-491, y los mAbs del sobrenadante de cultivo de las diferentes líneas. Como se puede observar en la figura 4, los resultados confirmaron que todos los clones de hibridomas

reconocen la misma región L475-S491, apuntando así a la presencia de un epítipo dominante dentro de la periferina.

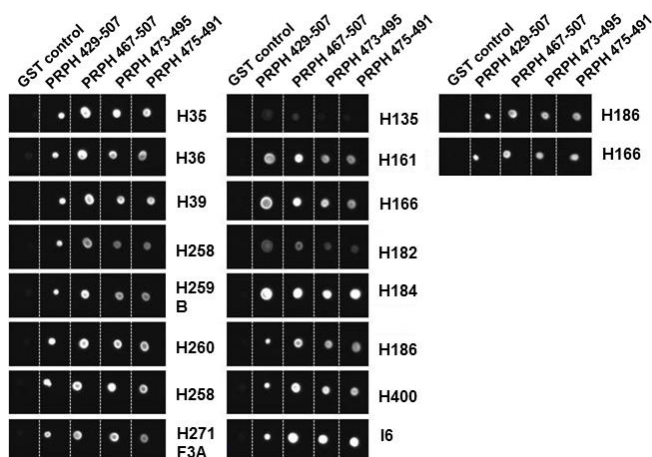


Figura 4. Las diferentes líneas de hibridomas generados a partir de linfocitos B infiltrantes de islotes pancreáticos reconocen la secuencia L475-S491 localizada en la región C terminal de la PRPH. En la imagen se muestra el resultado del dot blot llevado a cabo con las proteínas PRPH 429-507, PRPH 467-507, PRPH 473-495, PRPH 475-491 y la proteína control GST. Los mAb de los clones utilizados, se indican en la parte derecha cada imagen.

Por otra parte, aunque todos los mAbs de las líneas reconocen la misma región, la longitud de la secuencia del epítipo parece ser determinante en la capacidad de unión de los anticuerpos. Como se puede observar en la figura 5, el análisis comparativo mediante ELISA de los fragmentos PRPH 429-507, PRPH 467-507, PRPH 473-495 y PRPH 475-491, revela como el péptido mínimo presente en la proteína PRPH 475-491, es peor reconocido por los mAb de las líneas de hibridomas I6, H161 y H259B, comparado con los de mayor longitud. Este resultado podría indicar que la secuencia mínima del epítipo es reconocida con menor afinidad, probablemente debido a la ausencia de algún residuo importante en el reconocimiento.

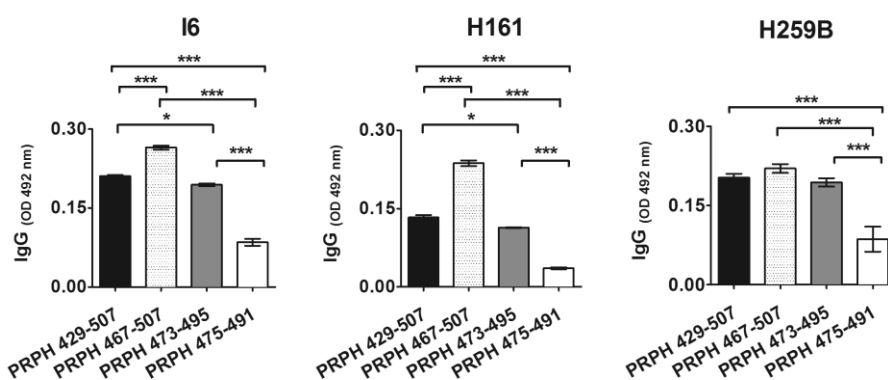


Figura 5. La longitud del epítipo presente en la PRPH determina la capacidad de unión de los anticuerpos. Análisis por ELISA del reconocimiento de las regiones PRPH 429-507, PRPH 467-507, PRPH 473-495 y PRPH 475-491, con los mAb de los clones H6, H161 y H259B. Los datos mostrados (media \pm SD) proceden de la sustracción previa de los valores obtenidos para la proteína control GST, y son representativos de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico aplicado es el modelo ANOVA de un factor (**P < 0.001, *P < 0.05).

1.2 El epítipo presente en la periferina es de tipo lineal y de baja afinidad.

Los análisis por *WB* llevados a cabo en este estudio con las diferentes proteínas recombinantes, se desarrollaron bajo condiciones desnaturalizantes mediante previo calentamiento de las muestras. Por lo tanto, y bajo estas condiciones, podríamos decir que la naturaleza del epítipo presente en la PRPH sería de tipo no conformacional o lineal. Con el objetivo de verificar la linealidad del epítipo, se llevó a cabo un análisis mediante ELISA con la proteína PRPH 429-507 en presencia o ausencia de urea 8 mM, agente desnaturalizante químico. Para ello se utilizó el sobrenadante del hibridoma I6. Como se puede observar en la figura 6, el tratamiento con urea no afecta al reconocimiento de la proteína, por lo que podemos decir que se trata de un epítipo lineal.

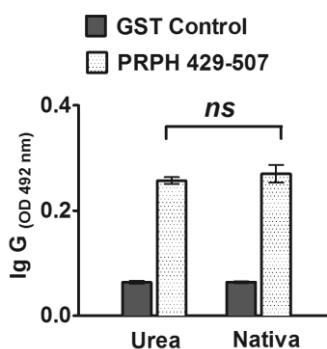


Figura 6. El epítipo presente en la PRPH es lineal. Análisis por ELISA del reconocimiento de la proteína PRPH 429-507 por el mAb del hibridoma I6, en presencia de urea 8 mM o en estado nativo. Los datos mostrados (media \pm SD) proceden de la sustracción previa de los valores obtenidos para la proteína control GST, siendo representativos de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico aplicando es el modelo ANOVA de un factor.

Para demostrar la especificidad de unión de los anticuerpos frente a los péptidos de periferina, dado que estos podrían reconocer otras regiones de la proteína recombinante, se llevaron a cabo diferentes experimentos. Por una parte, se realizaron ensayos de competición mediante ELISA con los mAb de los hibridomas I6, 228E1 y 259B. En estos experimentos, se utilizó la proteína PRPH 473-495 para la detección. Para ello, se llevó a cabo un bloqueo inicial de los mAb, con concentraciones crecientes de péptido sintético soluble PRPH 473-495, utilizando como control un péptido irrelevante a las mismas concentraciones. Como se puede ver en la figura 7, el péptido sintético PRPH 473-495 fue capaz de inhibir al 100% la unión de los mAbs de las diferentes líneas de hibridoma a la proteína PRPH 473-495, confirmando así que los anticuerpos secretados por estos hibridomas anti-PRPH reconocen específicamente el péptido y no otras regiones de la proteína.

Como se puede observar en la gráfica, la inhibición alcanza valores del 100% a concentraciones de péptido altas (1mM aproximadamente), lo que podría indicar que los anticuerpos reconocen el epítipo presente en esta región con baja afinidad.

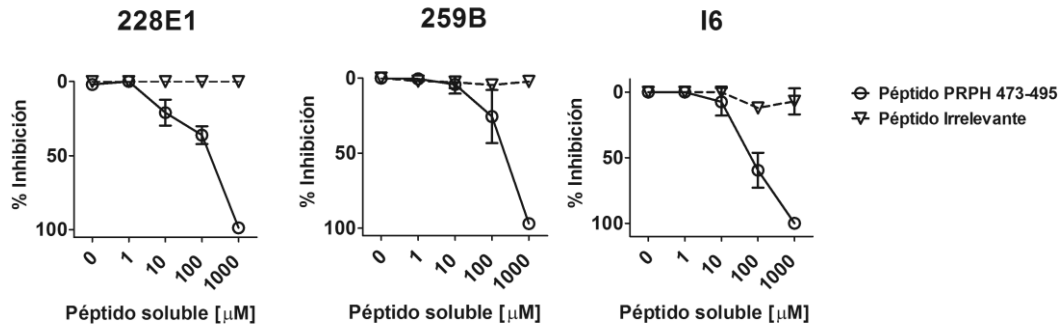


Figura 7. El péptido sintético PRPH 473-495 es capaz de inhibir la unión de los mAb I6, 228E1 y 259B frente a la proteína recombinante PRPH 473-495. ELISA de competición llevado a cabo con proteína PRPH 473-495 pegada a placa. Los Abs de las líneas I6, 228E1 y 259B utilizados para la detección fueron incubados previamente con diferentes concentraciones del péptido sintético PRPH 473-495, y un péptido irrelevante como control. Los valores mostrados (media ± SD) son representativos de tres experimentos independientes.

En una segunda aproximación experimental, y con el objetivo de analizar la capacidad de bloqueo del péptido PRPH 473-495, en la unión de los anticuerpos a periferina expresada en forma nativa, se llevó a cabo un ensayo de competición mediante inmunofluorescencia. Para ello, se utilizó la línea de neuroblastoma N1E-115 que expresa periferina en el citoesqueleto. El experimento se realizó con el sobrenadante del hibridoma 228E1, bloqueando los mAbs con péptido sintético PRPH 473-495 o un péptido irrelevante a 100μM. Como se puede observar en la figura 8, el péptido PRPH 473-495 compite de forma específica con la PRPH nativa, inhibiendo al 100% la unión del anticuerpo.

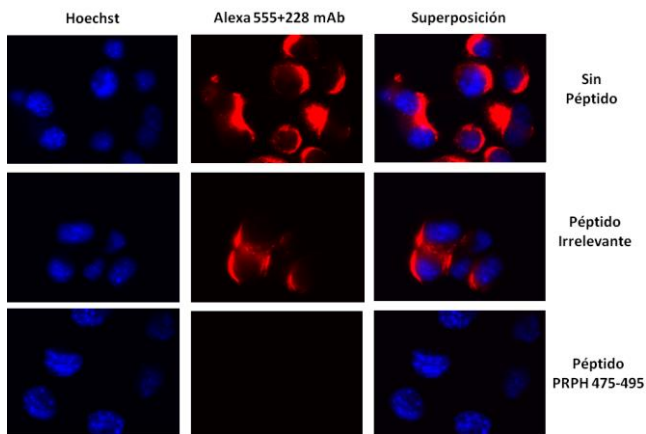


Figura 8. El péptido PRPH 473-495 inhibe la unión del mAb del hibridoma 228E1 a la periferina expresada en la línea celular N1E-115. En la imagen se muestra el ensayo de competición mediante inmunofluorescencia bloqueando la unión del mAb 228 con el péptido PRPH 473-495, un péptido irrelevante o PBS. La detección se llevó a cabo con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Alexa 555 (color rojo). En azul se muestra la tinción de núcleos celulares con Hoechst. Las imágenes mostradas

son representativas de tres experimentos independientes.

Para finalizar, y teniendo en cuenta que en este estudio no se ha podido analizar el reconocimiento frente a los primeros 84 aa de la periferina, los resultados obtenidos en este apartado confirman que los linfocitos B procedentes del infiltrado de islotes pancreáticos reconocen de forma común, un epítipo lineal de 17 aa de longitud localizado en la región L475-S491 del extremo C-terminal de la periferina. Estos datos concuerdan con el trabajo publicado por la Dr. C. Puertas [167], donde el análisis del reconocimiento de los hibridomas anti-PRPH aislados del infiltrado pancreático, revelo que únicamente reconocían las isoformas Per58 y Per61. Como se puede observar en la figura 9, los últimos 6 aa del epítipo mínimo presente en PRPH 475-491, se encuentran truncados en la isoforma Per 56 de la periferina debido a un proceso de procesamiento alternativo, lo que explicaría este resultado.

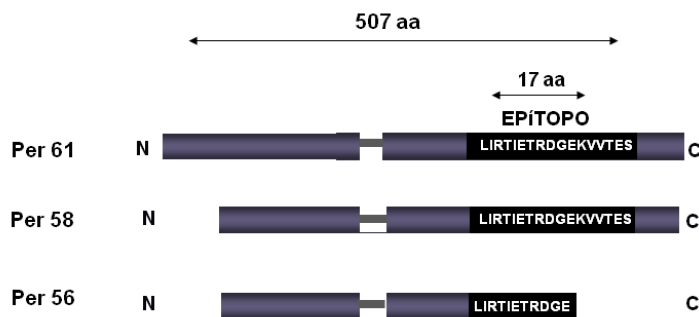


Figura 9. El epítipo L475-S491 de la periferina, se encuentra presente únicamente en las isoformas Per58 y Per61 de la proteína. Esquema de la estructura de las diferentes isoformas de la PRPH. La isoforma Per56 presenta la secuencia del epítipo truncada debido a procesos de splicing alternativo de la proteína.

2 ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL ANTI-PERIFERINA EN RATONES NOD Y CEPAS RESISTENTES A DT1

2.1 Determinación del desarrollo e isotipo de la respuesta de anticuerpos anti-periferina generada en ratones NOD.

Una vez determinada la secuencia del epítopo, utilizando como herramienta principal los hibridomas procedentes de linfocitos B anti-PRPH infiltrantes de islotes, se llevó a cabo un análisis de la respuesta de anticuerpos generada frente a la periferina en ratones. Para ello, se analizaron por ELISA sueros de ratones de 24 semanas de edad utilizando las proteínas PRPH 85-140, PRPH 129-193, PRPH 182-239, PRPH 5 230-293, PRPH 6 282-386, PRPH 375-450 y PRPH 429-507. La detección se realizó con anticuerpos secundarios anti-IgG y anti-IgM de ratón. Como se puede observar en la figura 10, en ratones NOD existe una respuesta predominante de anticuerpos con isotipo IgG frente a la proteína PRPH 429-507, reconocida también por los hibridomas anti-PRPH. Por el contrario, la respuesta de anticuerpos IgM anti-PRPH es casi indetectable tanto a 5 semanas (datos no mostrados) como a 24 semanas.

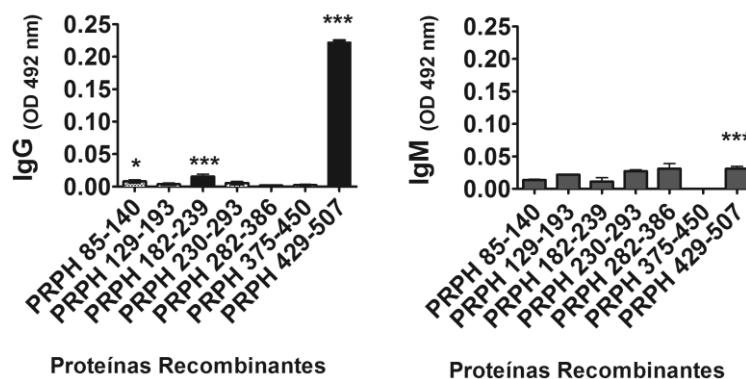


Figura 10. Los ratones NOD desarrollan una respuesta IgG frente a la proteína recombinante PRPH 429-507 de la periferina. ELISA de detección de anticuerpos IgG (izquierda) e IgM (derecha) en suero de hembras NOD de 24 semanas de edad frente a las proteínas PRPH 85-140, PRPH 129-193, PRPH 182-239, PRPH 5 230-293, PRPH 6 282-386, PRPH 375-450 y PRPH 429-507. Los datos mostrados (media \pm SD) son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores obtenidos para la proteína GST control han sido sustraídos previamente. El análisis estadístico aplicado es el modelo de ANOVA de un factor (***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

Con el objetivo de confirmar la especificidad anti-PRPH de los anticuerpos IgG detectados en suero de ratones NOD, se llevó a cabo un ELISA de competición. Para ello, se bloquearon los anticuerpos de suero de ratones de 24 semanas, con concentraciones crecientes de péptido

sintético PRPH 473-495, y un péptido no relevante como control. En este experimento, se utilizó proteína PRPH 473-495 pegada a placa. Como se puede observar en la figura 11, el péptido sintético PRPH 473-495, es capaz de inhibir la unión de los anticuerpos IgG de ratones NOD a la proteína PRPH 473-495. Nuevamente la inhibición de la unión, alcanza casi el 100% a altas concentraciones de péptido, de forma similar a los resultados obtenidos con los mAb de los diferentes hibridomas, indicando que en ratones NOD la respuesta de anticuerpos anti-periferina tendría un perfil de baja afinidad.

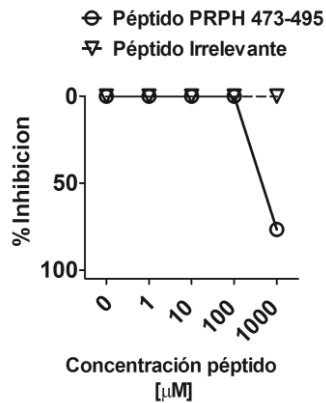


Figura 11. El péptido sintético PRPH 473-495 es capaz de inhibir la unión de los anticuerpos IgG presente en suero de ratones NOD. ELISA de competición con diferentes concentraciones de péptido sintético PRPH 473-495 y péptido irrelevante como control. La detección es llevada a cabo con proteína recombinante PRPH 473-495 pegada a placa. Los valores mostrados (media \pm SD) son representativos de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de estudiar el desarrollo de esta respuesta de anticuerpos, se analizaron los niveles de IgG presentes en suero de ratones NOD de diferentes edades. Para ello, se llevó a cabo un análisis de suero de hembras y machos de ratones NOD de 5, 7, 14 y 24 semanas de edad, mediante ELISA. Para la detección se utilizó proteína PRPH 429-507 pegada a placa.

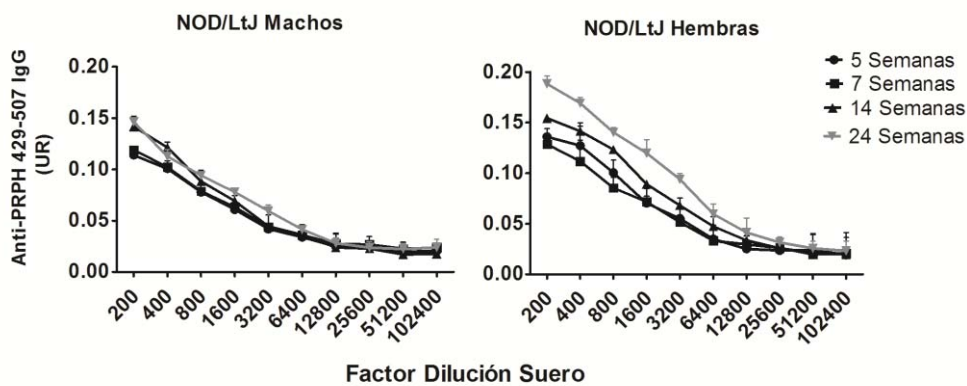


Figura 12. La respuesta Ig G anti-PRPH detectada en suero de ratones NOD aumenta con la edad. ELISA de detección de anticuerpos IgG en suero de machos y hembras NOD de 5, 7, 14 y 24 semanas de edad frente a la proteína PRPH 429-507. Los datos mostrados en forma de unidades relativas (UR) en cada punto y edad, son la media \pm SD de los valores obtenidos para 5 ratones independientes, tras la previa sustracción de los valores obtenidos para la proteína control GST.

Como se puede observar en la figura 12, la presencia de anticuerpos anti-PRPH es detectable al menos a partir de las primeras 5 semanas del desarrollo, y en el caso de las hembras parece aumentar con la edad.

2.2 Análisis de los niveles de anticuerpos anti-periferina en cepas de ratones resistentes a diabetes tipo 1.

La generación de una respuesta IgG de anticuerpos anti-PRPH en ratones NOD de forma temprana, y su incremento durante el desarrollo, podría ser reflejo del proceso de infiltración y destrucción de los islotes pancreáticos. Con el objetivo de analizar esta relación, se llevó a cabo un análisis de anticuerpos anti-PRPH en suero de diferentes cepas de ratones resistentes a la diabetes. En este experimento, se analizó la respuesta en ratones NOR (no desarrollan ni insulinitis, ni DT1), ratones procedentes del cruce F1 [NODxNOR] (desarrollan insulinitis, pero no DT1) y ratones C57BL/6. Para ello, se obtuvo suero de ratones entre las 3 y 31 semanas de edad, y se analizó la presencia de anticuerpos frente a la proteína recombinante PRPH 429-507. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. J. Verdaguer.

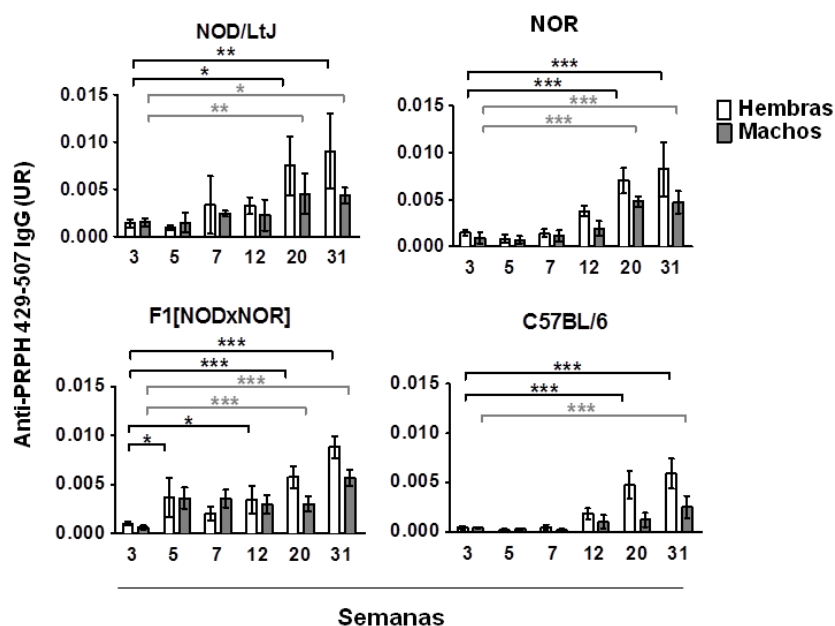


Figura 13. La respuesta de anticuerpos anti-PRPH se desarrolla también en cepas de ratones resistentes a diabetes. ELISA de detección de anticuerpos IgG frente a la proteína PRPH 429-507, en suero de hembras y machos NOD/Ltj, NOR, F1 [NODxNOR] y C57BL/6, de 3, 5, 7, 12, 20 y 31 semanas de edad. Los valores se muestran en forma de unidades relativas (RU), y proceden de la sustracción previa de los valores obtenidos para la proteína control GST y la estandarización frente a los valores obtenidos con un anticuerpo anti-histidinas. En cada barra se representa la media \pm SD de 5 ratones. El análisis estadístico aplicado es el modelo de ANOVA de un factor (**P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05).

Como se puede observar en la figura 13, las diferentes cepas de ratones resistentes a diabetes analizadas en este estudio, desarrollan una respuesta de anticuerpos anti-PRPH. De forma similar a la respuesta detectada en ratones NOD, las hembras parecen desarrollar una respuesta superior comparado con los machos. Sin embargo, el fondo genético NOD parece condicionar la susceptibilidad al desarrollo temprano de esta respuesta, pues en ratones C57BL/6 no emparentados genéticamente con estos, los anticuerpos se detectan de forma más tardía a partir de las 12 semanas. Por tanto, la respuesta de anticuerpos anti-PRPH parece no estar vinculada con el proceso de infiltración destructiva de islotes, lo que indica que podría tratarse de una respuesta natural de anticuerpos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en ratones NOD la presencia temprana de anticuerpo anti-PRPH, podría favorecer el proceso de destrucción de células β pancreáticas.

2.3 Inducción de anticuerpos anti-periferina en ratones NOD tras inmunización con proteína recombinante PRPH 429-507.

Con el objetivo de analizar la capacidad de respuesta *in vivo* de los linfocitos B anti-PRPH, se llevaron a cabo experimentos de inmunización de ratones NOD de 12 semanas con 2 dosis de 100 μ g de proteína GST-PRPH 429-507 en presencia de CAF (*Complete Freund's Adjuvant*) en la primera inmunización, y 100 μ g de proteína en presencia de IAF (*Incomplete Freund's Adjuvant*) en la segunda a los 21 días. Como control se utilizaron ratones naïve de la misma edad. Los ratones fueron sacrificados a los 6 días, y se analizaron los niveles de anticuerpos IgG en suero frente a la proteína recombinante PRPH 467-507, y la proteína control GST mediante ELISA. Como se puede observar en la figura 14, la inmunización con proteína PRPH 467-507 (derecha) induce la producción de anticuerpos anti-PRPH de forma débil comparado con la respuesta de anticuerpos desarrollada frente a GST (izquierda).

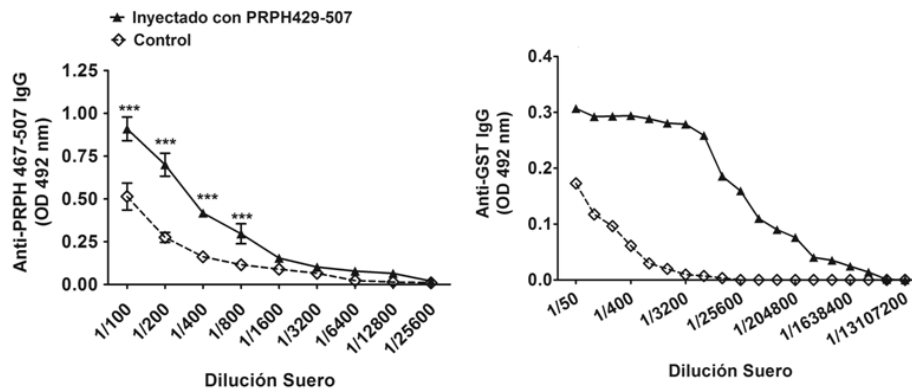


Figura 14. La inmunización de ratones NOD con proteína PRPH 429-507 induce una débil respuesta de anticuerpos IgG anti-periferina en suero. ELISA de detección de anticuerpos Ig G en suero de hembras NOD/Ltj de 12 semanas de edad inmunizadas con dos dosis de 100 µg de proteína recombinante PRPH 429-507, a 0 y 21 días, en presencia de adyuvante CAF e IAF respectivamente. Para la detección de anticuerpos se utilizó la proteína PRPH 467-507. A la izquierda de la figura, se muestra la gráfica de detección de anticuerpos anti-GST y a la izquierda la de anticuerpos anti-PRPH. Los datos representados son la media ± SD de los valores obtenidos para un total de 5 ratones por grupo; en el caso de los anticuerpos anti-PRPH, se han sustraído previamente los valores obtenidos para la proteína GST control. El análisis estadístico aplicado es el modelo de ANOVA de un factor (**P < 0.001).

2.4 Respuesta de anticuerpos anti-periferina en ratones transgénicos NOD TCRα -/- .

Con el objetivo de analizar la importancia de la contribución de los linfocitos T en la respuesta anti-PRPH, se llevó a cabo el análisis de esta respuesta en ratones NOD TCRα-/- . Esta cepa de ratones presenta una mutación a nivel de los genes de expresión de la cadena α del TCR que impide el correcto desarrollo y la maduración de linfocitos T αβ. Se analizaron mediante ELISA los niveles de anticuerpos frente a la proteína PRPH 429-507, en ratones de 9 semanas de edad. Como se puede observar en la figura 15, estos ratones presentan una menor respuesta de anticuerpos en suero comparado con ratones control NOD de la misma edad, lo que pondría de manifiesto la colaboración de los linfocitos T y B en la respuesta.

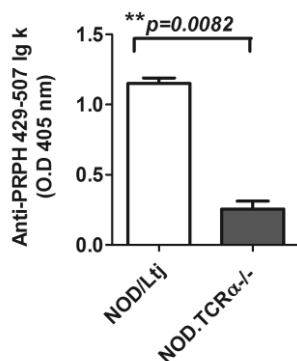


Figura 15. Los ratones NOD.TCRα -/- desarrollan una respuesta deficiente de anticuerpos anti-PRPH. ELISA de detección de anticuerpos anti-PRPH frente a la proteína PRPH 429-507, en suero de machos NOD/Ltj y NOD.TCRα -/- de 9 semanas. Los datos representados son la media ± SD de los valores obtenidos para 5 ratones por grupo. Los valores obtenidos para la proteína GST control han sido sustraídos previamente. El valor de p se ha calculado mediante análisis estadístico por t de Student.

3 ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR ANTI-PERIFERINA EN EL MODELO DE RATON NOD

3.1 Desarrollo de moléculas octaméricas para el estudio de linfocitos B anti-periferina.

Con el objetivo de analizar el desarrollo de la respuesta de linfocitos B *ex vivo*, en este estudio se desarrollaron múltiples estrategias direccionadas a la generación de moléculas de detección específica de linfocitos B anti-PRPH.

En una primera aproximación, se generaron tetrámeros con la proteína recombinante PRPH 429-507 conjugada a moléculas de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). La tinción de linfocitos B resultante mostró un elevado ruido de fondo, posiblemente debido a la unión inespecífica de linfocitos B a la región GST de la proteína. En un segundo intento, se generó por un lado monómeros de péptido sintético PRPH 475-491 conjugado directamente a FITC, y por otro, tetrámeros de péptido sintético PRPH 475-491 conjugados SA-PE. Ambas estrategias fracasaron tiñendo linfocitos B, posiblemente debido a la baja afinidad de los anticuerpos por el epítipo.

Para aumentar la valencia de unión del anticuerpo-péptido y solventar el problema de la baja afinidad, se desarrolló una nueva molécula en forma de octámero con los péptidos presentes en las proteínas PRPH 467-507 y PRPH 473-495. Para ello y usando las construcciones y tecnología utilizadas en la producción de tetrámeros de clase II de nuestro laboratorio, se fusionaron estas secuencias de PRPH a la cadena α y β de la molécula A^{B7}, en posición N y C terminal según se explica en el apartado 1.2 de la sección de materiales y métodos.

Las diferentes estructuras generadas, así como las moléculas control de cada una de ellas se muestran en la figura 16. Como se puede observar, esta estructura presenta una región de unión a biotina que permite su conjugación a moléculas de estreptavidina fluorescentes. Una vez conjugados los dímeros con la estreptavidina, se generan moléculas finales en forma de octámero con los péptidos PRPH 473-495 o PRPH 467-507.

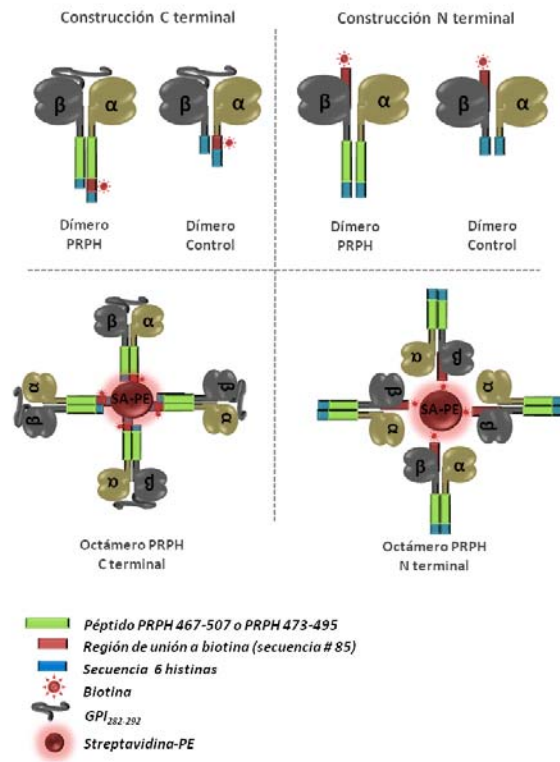


Figura 16. Esquema de la estructura de los octámeros de periferina en posición C terminal y N terminal y sus correspondientes moléculas control. Los fragmento PRPH 467-507 y PRPH 473-495, están fusionados a la región C o N terminal de la cadena α y β de la molécula de clase II $A^{\beta 7}$. La cadena α contiene una secuencia de unión a biotina con capacidad de unirse a una moléculas fluorescentes de estreptavidina (SA-PE) generando así estructuras finales en forma de octámero.

3.2 Validación de los octámeros de periferina para estudios de detección de linfocitos B anti-periferina *ex vivo* en ratones NOD.

Una vez expresadas y purificadas las diferentes construcciones $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507 y $A^{\beta 7}$ /PRPH 473-495 y sus correspondientes controles, se procedió al análisis de su reconocimiento y funcionalidad. En la figura 17, se puede observar un gel con las diferentes proteínas purificadas.

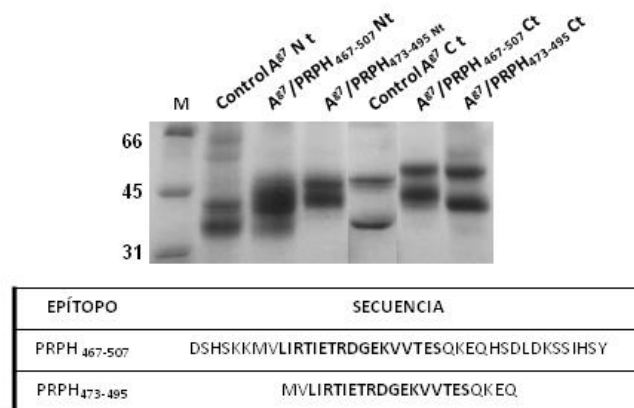


Figura 17. SDS-PAGE de las diferentes proteínas fusionadas a $A^{\beta 7}$ en posición C y N terminal, y sus correspondientes controles. En la tabla de la parte inferior, se muestra la secuencia de la PRPH expresada y en negrita se resalta la localización dentro de la secuencia del epítipo L475-S491.

En un primer paso se analizó mediante ELISA el reconocimiento de las proteínas por los anticuerpos IgG presentes en suero de ratones NOD de 24 semanas de edad. Como se puede observar en la gráfica de la figura 17, los anticuerpos presentes en suero reconocen las estructuras A^{β7}/PRPH 467-507 y A^{β7}/PRPH 473-495 tanto en posición N como C terminal, aunque frente a esta última se detecte una menor señal. A la derecha, se muestra el reconocimiento de las proteínas por los anticuerpos de suero mediante *Dot Blot*.

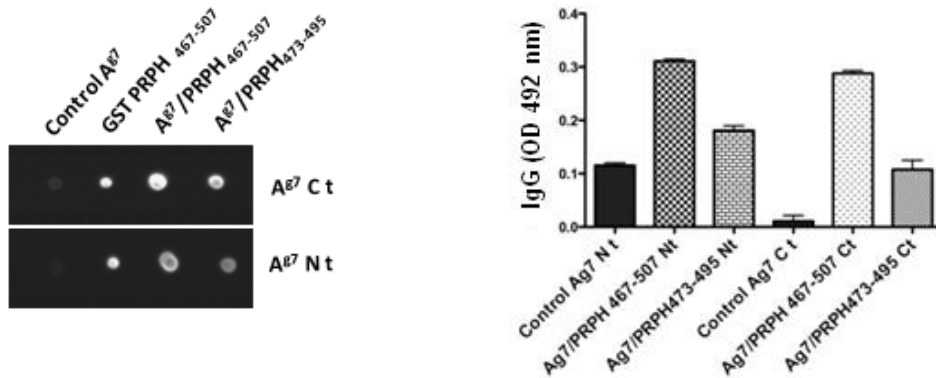


Figura 18. Los péptidos de periferina fusionados a moléculas de A^{β7} son reconocidos por el hibridoma anti-PRPH I6 y los anticuerpos presentes en suero de ratones NOD. En la imagen de la izquierda, se muestra el resultado del análisis del reconocimiento de las proteínas por el mAb del sobrenadante anti-PRPH I6. En la gráfica de la derecha, se muestra mediante ELISA el reconocimiento de anticuerpos IgG de suero de ratones NOD de 24 semanas frente a las diferentes proteínas. Las proteínas se unieron a placa mediante interacción avidina-biotina. Los datos representados son la media ± SD de los valores obtenidos por pocillo.

Tras comprobar el reconocimiento de las proteínas generadas, a continuación se llevó a cabo la tinción de superficie del hibridoma I6 con los diferentes octámeros conjugados a SA-PE. El análisis de las células se realizó mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 19, la molécula A^{β7}/PRPH 467-507 en posición C terminal es capaz de unirse a la superficie del hibridoma, mientras su correspondiente control es negativo. Sin embargo, en el caso de la molécula A^{β7}/PRPH 467-507 en posición N terminal, a pesar de unirse a la superficie del hibridoma, no se puede diferenciar del ruido de fondo de la molécula control, lo que la invalida para su uso. Como se puede observar en la figura, las construcciones con el péptido PRPH 473-495 no se unen al hibridoma, posiblemente debido a un problema de accesibilidad al epítipo dentro de la estructura.

Para todas las moléculas, se probaron diferentes condiciones de tinción, variando el tiempo, temperatura y concentración, con el objetivo de optimizar la tinción.

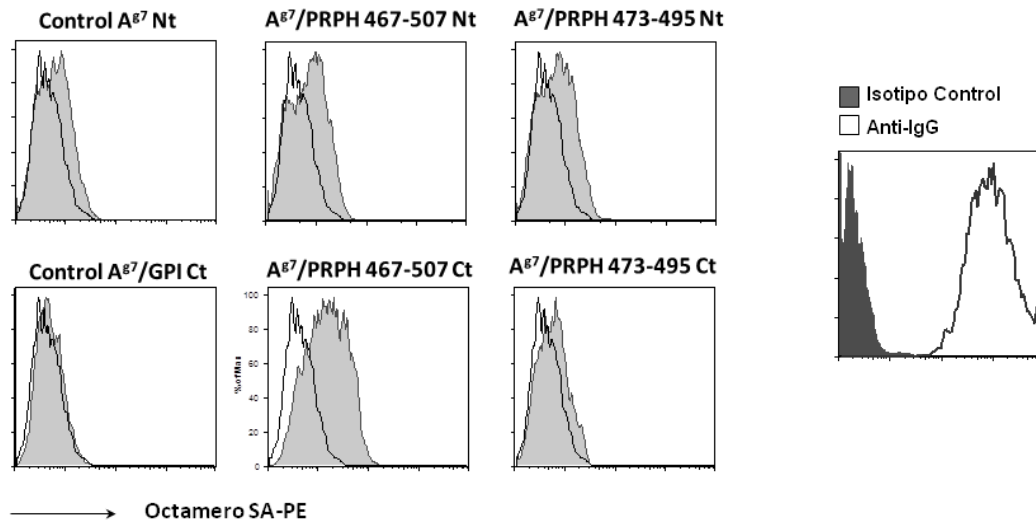


Figura 19. Tinción del hibridoma anti-PRPH I6 con octámeros de periferina. En la parte derecha de la figura, se muestra el histograma del análisis de la expresión de IgG de superficie del hibridoma. En la parte izquierda, se muestran los histogramas resultantes de la tinción con las diferentes construcciones octaméricas de periferina conjugadas a estreptavidina-PE.

La tinción inicial observada con las moléculas A β 7/PRPH 467-507 C a pesar de ser positiva, es poco intensa, probablemente debido a la inestabilidad del hibridoma y a la pérdida de expresión de BCR de superficie. Por este motivo, se decidió realizar una selección por citometría de las células más positivas. Como se puede observar en la figura 20, tras el proceso de separación celular, el hibridoma I6 se tiñe más intensamente con los octámeros A β 7/PRPH 467-507 C. Por otra parte, y para verificar la unión específica del octámero a la superficie de las células, se realizó un experimento de tinción control con la línea de células pre-B E300.19. Como se puede observar en la figura 20 resultó ser negativa. Por tanto, este resultado confirma que la unión del octámero a la superficie del hibridoma I6, no es aleatoria sino que está determinada por la especificidad del BCR de superficie.

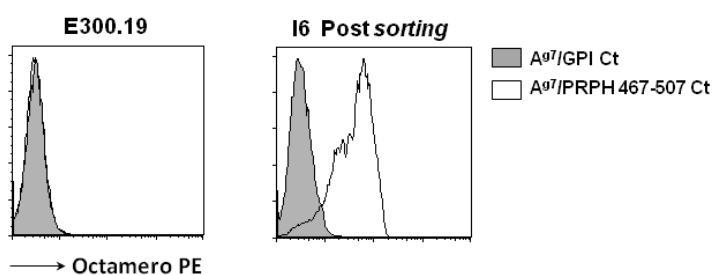


Figura 20. Especificidad de A β 7/PRPH 467-507C por el hibridoma I6. A la izquierda, se muestra la tinción de la línea pre-B E300.19 con los octámeros de A β 7/PRPH 467-507C. A la derecha, la tinción obtenida tras realizar un *sorting* del hibridoma I6 con el octámero A β 7/PRPH 467-507C. A β 7/GPI Ct es la molécula control de la tinción.

Con el objetivo de demostrar la unión específica del octámero al BCR de superficie, se llevó a cabo un experimento de bloqueo de la tinción. Para ello, se incubaron previamente los octámeros A^{g7}/PRPH 467-507C y A^{g7}/GPI, con el mAb del sobrenadante del hibridoma anti-PRPH 228E1. Como se puede observar en la figura 21, el mAb 228E1 es capaz de bloquear la unión de los octámeros A^{g7}/PRPH 467-507C al BCR de superficie del hibridoma I6, lo que demuestra que ambas inmunoglobulinas reconocen el epítipo presente en la molécula octamérica.

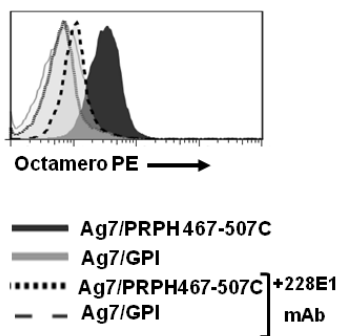


Figura 21. El mAb del hibridoma 228E1 bloquea la unión de octámeros A^{g7}/PRPH 467-507C al BCR de superficie del hibridoma I6. En el histograma se muestra la unión de las construcciones A^{g7}/PRPH 467-507C y Ag7/GPI sin bloquear (líneas continuas) y bloqueadas con el monoclonal de la línea 228E1 (líneas discontinuas) a la superficie del hibridoma anti-PRPH I6.

Una vez analizada la especificidad de unión de los octámeros A^{g7}/PRPH 467-507C a la superficie del hibridoma I6, se llevó a cabo un análisis de detección de linfocitos B CD19 en nódulos pancreáticos, bazo y peritoneo de hembras de ratones NOD de 7 semanas. Como se puede observar en la figura 22, A^{g7}/PRPH 467-507C es capaz de detectar linfocitos B anti-PRPH que varían en porcentaje según el órgano. Así pues, en nódulos pancreáticos se detecta un 0.09%, en bazo un 0.07% y en peritoneo un 0.38%. El porcentaje mostrado está referenciado a la población linfocitos B CD19 totales.

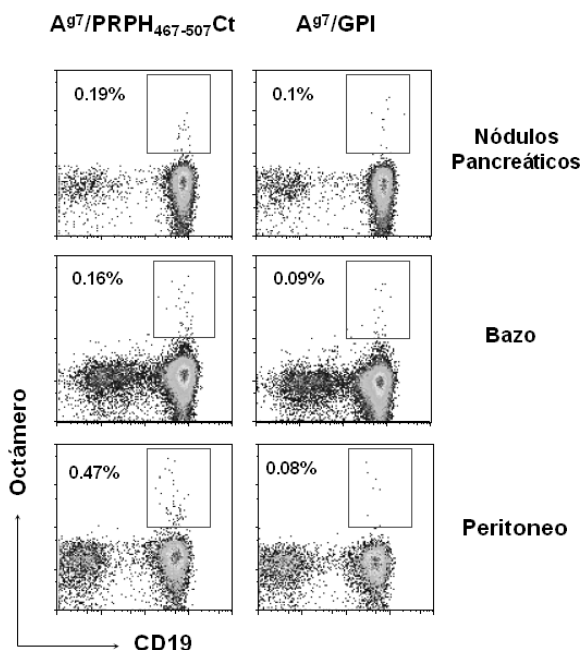


Figura 22. Los octámeros A^{g7}/PRPH 467-507C detectan linfocitos anti-PRPH en diferentes órganos de los ratones NOD. Tinción de nódulos pancreáticos, bazo y peritoneo de hembras de ratón NOD de 7 semanas de edad. Análisis por citometría de flujo, utilizando el panel de anticuerpos CD19+, CD8-, CD4, F4/80-, PI- y octámeros A^{g7}/PRPH 467-507C o A^{g7}/GPI control, conjugados a SA-PE.

Por tanto, estos resultados muestran como los octámeros $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507C son herramientas útiles en la detección de poblaciones de linfocitos B anti-PRPH en ratones NOD. Como se puede observar en la figura 23, la técnica de tinción no está exenta de ruido de fondo. Este ruido puede proceder del reconocimiento del fluorocromo, la estreptavidina u otras regiones de la molécula, aunque en principio los análisis por ELISA no detectan en suero de ratones anticuerpos frente a la molécula control.

Con el objetivo de reducir el ruido de fondo introducido por los fluorocromos, se llevó a cabo una doble tinción con octámeros $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507C y $A^{\beta 7}$ /GPI, conjugados a PE y APC.

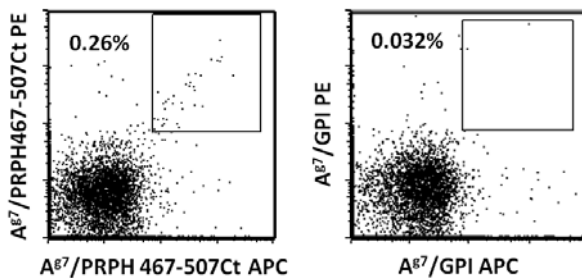


Figura 23. La doble tinción con octámeros $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507C conjugados a dos fluorocromos diferentes reduce el ruido de fondo de la técnica. Tinción de linfocitos B de peritoneo de hembras de ratón NOD de 7 semanas de edad utilizando el panel de anticuerpos CD19+, CD8-, CD4-, F4/80- y PI-, y los octámeros $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507C o $A^{\beta 7}$ /GPI control conjugados a PE y APC.

Como se puede observar en la figura 23, la tinción específica de linfocitos B con la molécula $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507C, se mantiene mientras el ruido de fondo de la molécula control se reduce.

Por último, con el objetivo de demostrar la especificidad anti-PRPH de los linfocitos B marcados con octámeros $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507C en ratones NOD, se llevó a cabo un ensayo de ELISPOT con linfocitos B previamente purificados por separación celular mediante doble tinción con octámeros de $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507C en PE y APC. Para la detección se utilizó la proteína recombinante PRPH 429-507. Tras la separación celular, se sembraron por pocillo 4000 células CD19 anti-PRPH purificadas, 4000 células CD19 totales como control negativo, y 1000 células del hibridoma I6 como control positivo, estimuladas con anticuerpo anti-CD40. Tras 72 horas de cultivo se analizó la secreción de anticuerpos.

Como se puede observar en la figura 24, solamente el hibridoma anti-PRPH y los linfocitos B purificados con los octámeros de $A^{\beta 7}$ /PRPH 467-507C, secretan anticuerpos capaces de reconocer la proteína recombinante PRPH 429-507.

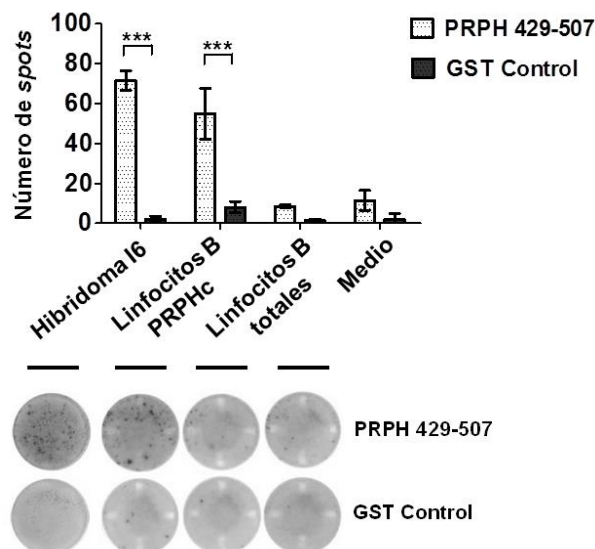


Figura 24. ELISPOT de linfocitos B anti-PRPH purificados con octámeros A^{B7}/PRPH 467-507C. En este experimento, se cultivaron linfocitos B CD19 anti-PRPH procedentes de la separación celular mediante doble tinción con octámeros A^{B7}/PRPH 467-507C PE y APC, linfocitos B CD19 totales como control negativo y células de hibridoma I6 como control positivo. Las células se estimularon durante 72 horas en presencia de anticuerpo anti-CD40, en placas con proteína PRPH 429-507 y proteína GST control unida a membrana. La detección de anticuerpos se llevó a cabo con anticuerpo anti-kappa. La gráfica superior muestra los valores (media \pm SD) representativos de uno de dos experimentos. El análisis estadístico aplicado es el modelo de ANOVA de dos factores (***) $P < 0.001$.

En conjunto, estos experimentos demuestran que la técnica de detección con octámeros A^{B7}/PRPH 467-507C, es válida para el estudio de linfocitos B anti-PRPH.

3.3 Estudio de la distribución de linfocitos B anti-periferina durante el desarrollo de la DT1.

Con el objetivo de analizar el desarrollo de la población de linfocitos B anti-PRPH en ratones NOD, se llevó a cabo un análisis de la frecuencia de estos linfocitos a 4, 6, 8 y 15 semanas de edad en bazo, nódulos pancreáticos y peritoneo. En paralelo, también se analizó el infiltrado celular de islotes pancreáticos de ratones NOD de 5, 10 y 15 semanas de edad. Las muestras obtenidas se procesaron por citometría de flujo, utilizando un panel de anticuerpos específico para linfocitos B compuesto por CD19+, CD8-, CD4-, F4/80-, PI- y octámeros A^{B7}/PRPH 467-507C y A^{B7}/GPI control.

El análisis de la frecuencia de linfocitos B anti-PRPH muestra la presencia de estos linfocitos en todos los órganos analizados en el estudio, a partir de las 4 semanas de edad (figura 25A). Tal como se observó anteriormente con la respuesta de anticuerpos, las hembras presentan

frecuencias superiores de linfocitos B anti-PRPH, comparado con los machos. Como se puede observar en la gráfica de peritoneo, las frecuencias detectadas en esta región son muy superiores a las observadas en el resto de compartimentos analizados, alcanzando sorprendentemente valores de hasta un 0.5% en hembras de 15 semanas de edad.

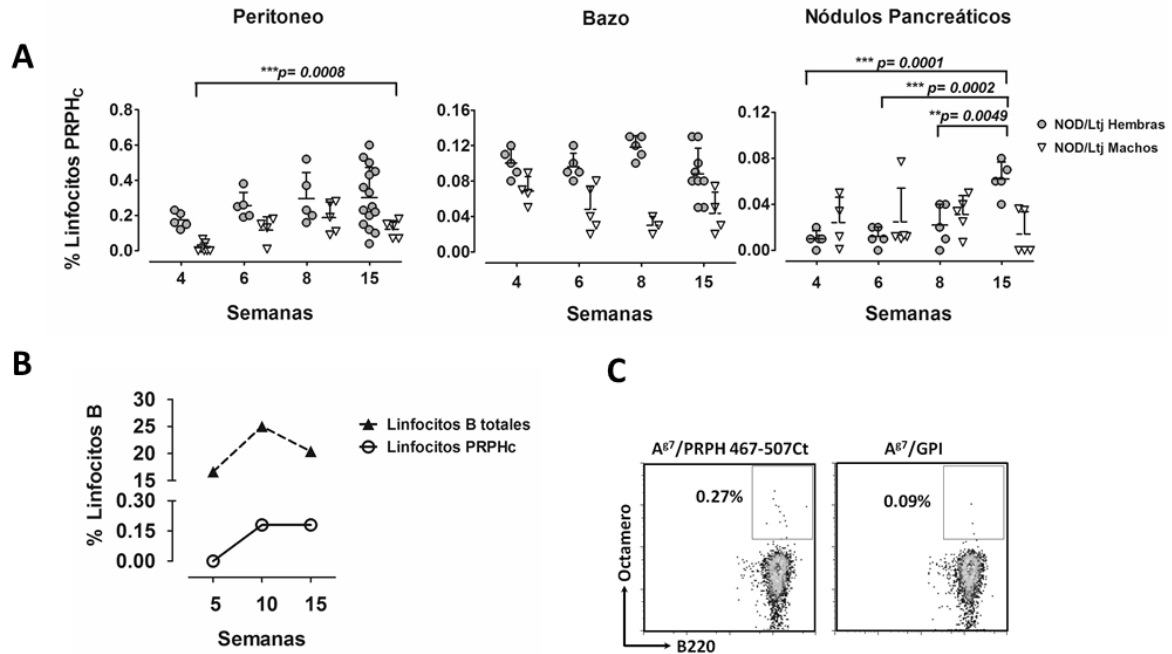


Figura 25. Estudio de la frecuencia de linfocitos B anti-PRPH durante el desarrollo de ratones NOD. A. Análisis por citometría de flujo de la frecuencia y evolución de la población de linfocitos B anti-PRPH en nódulos pancreáticos, bazo y peritoneo de hembras de ratón NOD de 4, 6, 8 y 15 semanas de edad. Panel de anticuerpos utilizados CD19+, CD8-, CD4-, F4/80- y PI- y octámeros A^{B7}/PRPH 467-507C o A^{B7}/GPI control. Los porcentajes se muestran dentro de la población total de linfocitos CD19, una vez sustraídos los valores del octámero control A^{B7}/GPI. El valor de p se ha calculado mediante análisis estadístico por t de Student. B. Análisis de la evolución de la población de linfocitos B anti-PRPH y de linfocitos B totales, dentro del infiltrado de islotes pancreáticos de ratones NOD de 5, 10 y 15 semanas, utilizando el mismo panel de anticuerpos. A la derecha, se muestra una tinción de islotes pancreáticos a 15 semanas de edad.

Por otra parte, se observó un aumento progresivo de la frecuencia de esta población en nódulos pancreáticos y peritoneo hasta las 15 semanas de edad. A nivel de islotes pancreáticos (figura 25B), en ratones de 5 semanas de edad no se pudieron detectar células anti-PRPH presentes en el infiltrado, pero si a partir de las 10 de edad, con una frecuencia del 0.15% que se mantiene constante hasta las 15 semanas de edad. En la figura 25C, se muestra un ejemplo de tinción de islotes con octámeros A^{B7}/PRPH 467-507C.

3.4 Análisis del fenotipo y estado de activación de la población de linfocitos B anti-periferina presente en ratones NOD.

La elevada frecuencia de linfocitos anti-PRPH en peritoneo comparado con otros órganos podría relacionar a esta población con el compartimento de linfocitos B de tipo B1. Con el objetivo de caracterizar la naturaleza de esta población, se llevó a cabo un análisis de fenotipo en ratones NOD de 7 y 10 semanas. Para ello, se utilizaron 2 paneles de anticuerpos, el panel I con los marcadores IgD e IgM, con el objetivo de determinar el estado de maduración de las células en fase transicional T1 (IgM+IgD-) o T2 (IgM+IgD+), y el panel II, con los marcadores Mac1 y CD5, para detectar poblaciones de células B tipo B1 (Mac+, CD5+ [B1a] o CD5-[B1b]) y tipo B2 (Mac1-, CD5-). Ambos paneles comparten un marcaje común con anticuerpos CD19+, CD8-, CD4-, F4/80- y PI-, y doble marcaje con octámeros A^{g7}/PRPH 467-507C PE y APC.

Como se puede observar en la la figura 26A, los octámeros A^{g7}/PRPH 467-507C PE detectan linfocitos B anti-PRPH transicionales de tipo 1 (IgM+IgD-) en bazo y peritoneo. Por otra parte, en todos los compartimentos se detectan linfocitos B anti-PRPH transicionales de tipo 2 (IgM+IgD+), y en torno a un 50% en bazo y nódulos pancreáticos, y un 30% en peritoneo, parecen haber entrado en el compartimento de linfocitos B maduros. Curiosamente a esta edad en peritoneo, se detectan entorno a un 5% de linfocitos negativos para los marcadores IgD e IgM, que parecen haber sufrido procesos de cambio de isotipo. En experimentos paralelos, se intentó comprobar la presencia de linfocitos B anti-PRPH IgG, dado que es la respuesta mayoritaria detectada en suero de ratones, pero debido a la reactividad cruzada con otros isotipos, los resultados no fueron concluyentes.

Por otra parte, el análisis del infiltrado de islotes pancreáticos de ratones NOD de 10 semanas de edad (figura 26C), reveló la presencia de aproximadamente un 68% de linfocitos B anti-PRPH en estado transicional tipo 2 y un 19% en estado de linfocito maduro. No se detectó la presencia de linfocitos B con signos de activación y cambio de isotipo en este compartimento, al menos a esta edad. Es importante destacar que el estudio mediante la detección con octámeros, se restringe a linfocitos B que presentan inmunoglobulinas de superficie, por lo que si estas células con perfil IgG estuvieran en fase terminal de célula plasmática, no podríamos detectar la respuesta.

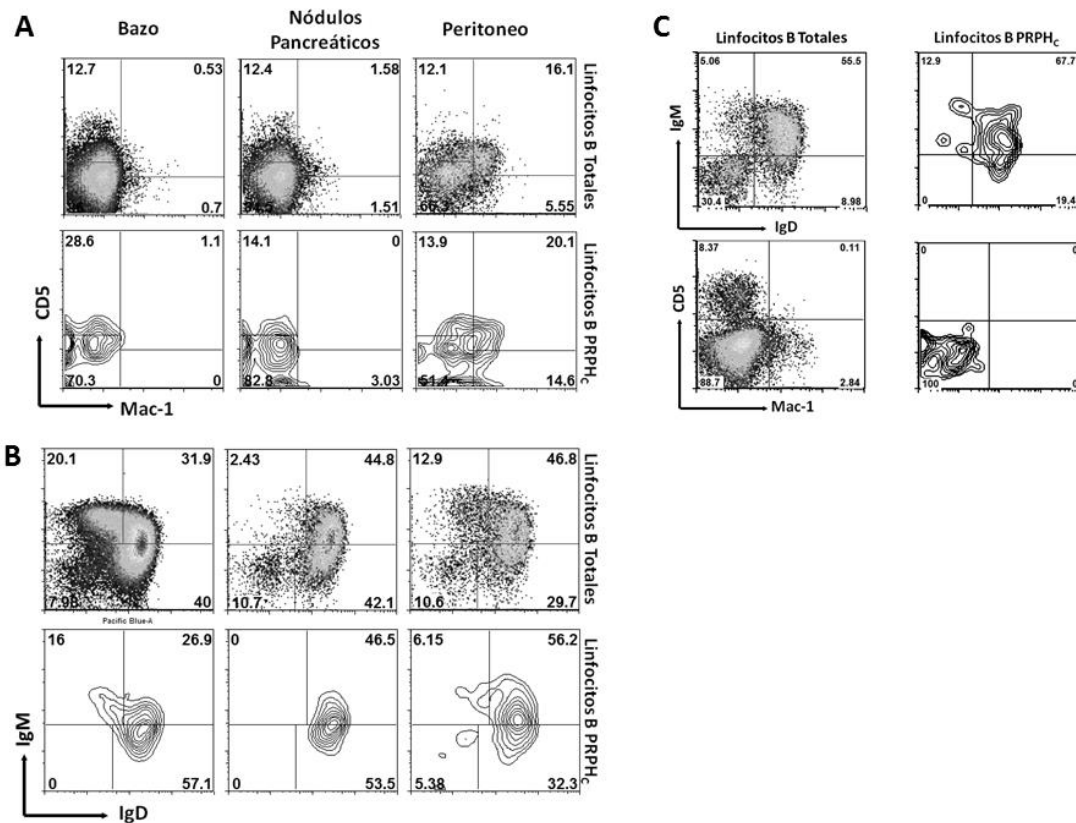


Figura 26. Fenotipo de los linfocitos B anti-PRPH detectados en ratones NOD. A y B. Análisis por citometría de flujo, de células anti-PRPH presentes en nódulos pancreáticos, bazo y peritoneo de hembras de ratón NOD de 7 semanas de edad. Panel de la parte inferior IgD⁺ e IgM⁺, panel de la parte superior Mac1⁺ y CD5⁺. Panel de anticuerpos común CD19⁺, CD8⁻, CD4⁻, F4/80⁻ y PI⁻ y doble marcaje de octámeros A^{β7}/PRPH 467-507C PE y APC. C. Análisis por citometría de flujo del infiltrado de islotes pancreáticos de ratones NOD de 10 semanas de edad. Panel de la parte superior IgD⁺ e IgM⁺, panel de la parte inferior Mac1⁺ y CD5⁺. Panel de anticuerpos común CD19⁺, CD8⁻, CD4⁻, F4/80⁻ y PI⁻, y doble marcaje de octámeros A^{β7}/PRPH 467-507C PE y APC.

Por otra parte, como se muestra en la parte inferior de la figura 26A, la población de linfocitos B anti-PRPH detectados con octámeros de A^{β7}/PRPH 467-507C se distribuye de forma heterogénea entre poblaciones de tipo B2 y tipo B1. En el caso de peritoneo nicho natural de poblaciones B1, en torno a un 50% presentan fenotipo B2, mientras un 35% presenta marcadores de linfocitos B1. Las poblaciones de linfocitos B1 se caracterizan por su capacidad de auto-renovación y como ya se ha explicado anteriormente por la secreción de anticuerpos naturales y autoanticuerpos. Este resultado reforzaría la idea de que el peritoneo podría ser un nicho de linfocitos B anti-PRPH secretores de anticuerpos autoreactivos de isotipo IgG o de linfocitos B anti-PRPH de memoria tipo B2.

Por otra parte, a nivel del infiltrado de islotes pancreáticos de ratones NOD de 10 semanas (figura 26C), pese a detectar la presencia linfocitos B tipo B1, únicamente se han podido

detectar linfocitos anti-PRPH de tipo B2. Por tanto, este resultado indica que pese a la heterogeneidad de esta población, únicamente la respuesta de linfocitos B2 estaría relacionada con el proceso de infiltración de los islotes.

Por otra parte, se llevó a cabo el análisis de la distribución de los linfocitos anti-PRPH dentro del compartimento de linfocitos B foliculares (CD23+CD21-) y linfocitos B marginales (CD23-CD21+). Para ello, se analizaron muestras de bazo de ratones NOD de 7 semanas con el panel de anticuerpos CD23+, CD21+ CD19+, CD8-, CD4-, F4/80- y PI-, y doble marcaje con octámeros A^{β7}/PRPH 467-507C PE y APC. Como se puede observar en la figura 27, la población de linfocitos B anti-PRPH presenta una distribución heterogénea entre ambos compartimentos.

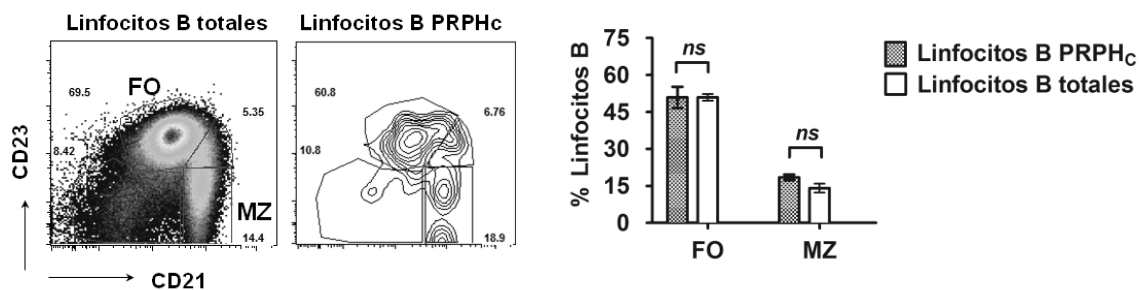


Figura 27. Distribución de los linfocitos B anti-PRPH dentro del compartimento de linfocitos B foliculares y marginales. Análisis de la población de linfocitos B foliculares y marginales anti-PRPH en bazo de hembras de ratón NOD de 7 semanas. Panel de anticuerpos utilizados para el análisis CD23+, CD21+ CD19+, CD8-, CD4-, F4/80- y PI-, y doble marcaje con octámeros A^{β7}/PRPH 467-507C PE y APC. A la izquierda de la imagen, se muestra un ejemplo de tinción, y a la derecha una gráfica comparativa de la frecuencia de distribución de los linfocitos B anti-PRPH y la población de linfocitos B CD19 total. La gráfica muestra los valores (media ± SD) de un grupo de 5 ratones. El análisis estadístico aplicado es el modelo de ANOVA de 1 factor (***P < 0.001).

Por último, se analizó el estado de activación de los linfocitos anti-PRPH en bazo, nódulos pancreáticos y peritoneo. Para ello, se analizó la expresión de la molécula CD86 (B7.2) implicada en señales de activación, y la expresión de CD44 molécula de adhesión implicada en procesos de migración. Para este experimento, se utilizaron hembras NOD de 7 semanas de edad. Como se puede observar en la figura 28, la expresión de CD86 es similar en todos los compartimentos. A nivel de CD44, los linfocitos anti-PRPH de peritoneo presentan una mayor expresión comparado con el resto de órganos y la población general de linfocitos CD19, lo que podría indicar que los linfocitos B anti-PRPH son células con una elevada capacidad de recirculación y migración hacia otros tejidos.

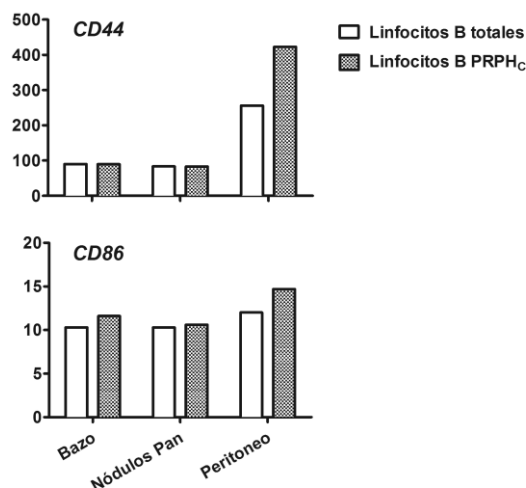


Figura 28. Expresión de CD86 y CD44 en linfocitos B anti-PRPH Análisis de la expresión de CD44 y CD86 en células anti-PRPH por citometría de flujo, en nódulos pancreáticos, bazo y peritoneo de hembras de ratón NOD de 7 semanas de edad. El panel de anticuerpos utilizado comprende CD44+, CD86+ CD19+, CD8-, CD4-, F4/80-, PI-, y doble marcaje con octámeros A⁶⁷/PRPH 467-507C PE y APC. Los valores representados proceden del análisis de 3 ratones. El experimento mostrado, es representativo de 2 experimentos independientes.

3.5 Detección de linfocitos anti-periferina en ratones resistentes a diabetes C57BL/6.

En este apartado, se llevó a cabo el análisis de la frecuencia de la población de linfocitos anti-PRPH, en el modelo de ratón C57BL/6. Los ratones C57BL/6, tal y como observamos previamente, presentan una respuesta de anticuerpos anti-PRPH más tardía que los NOD. Como se puede observar en la figura 29, el análisis en paralelo de los compartimentos de bazo y peritoneo de ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad, revelo la presencia de una frecuencia de linfocitos B anti-PRPH significativamente menor, de casi la mitad, en ratones C57BL/6 con respecto a NOD.

Por lo tanto, pese a que la respuesta anti-PRPH se desarrolla en ambas cepas de forma independiente al proceso de la DT1, se encuentra incrementada tanto a nivel celular como humoral en ratones NOD, lo que podría contribuir al desarrollo del proceso autoinmunitario.

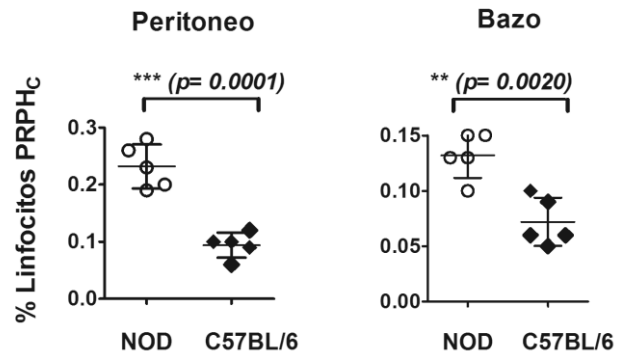


Figura 29. La frecuencia de linfocitos B anti-PRPH es significativamente menor en ratones C57BL/6 comparado con ratones NOD. Detección de células anti-PRPH en bazo y peritoneo de hembras de ratón NOD y C57BL/6 de 7 semanas de edad. Panel de anticuerpos CD19+, CD8-, CD4-, F4/80- y PI- y octámeros A^{B7}/PRPH 467-507C o A^{B7}/GPI control. Los porcentajes se muestran dentro de la población total de linfocitos CD19, tras haber sustraído previamente los valores del octámero control. La gráfica muestra los valores (media \pm SD) de un grupo de 5 ratones por cepa. El valor de p se ha calculado mediante análisis estadístico por t de Student.

4 IMPLICACIÓN DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS B ANTI-PERIFERINA EN DT1

4.1 Aumento de linfocitos B anti-periferina en peritoneo de ratones NOD diabéticos.

Mediante el análisis de la frecuencia de la población anti-PRPH en peritoneo de ratones NOD, se observó la presencia de una elevada dispersión en la frecuencia de esta población en ratones de 15 semanas, edad a la cual muchas hembras debutan como diabéticas.

Por este motivo, y con el objetivo de confirmar la relación de estas variaciones con el estado de la enfermedad, se analizaron los niveles de glucosa en orina de ratones de 15 semanas y se establecieron dos grupos, uno diabético y otro pre-diabético. Posteriormente, se analizó la frecuencia y el número total de linfocitos anti-PRPH presentes en peritoneo. Como muestra la figura 30, el grupo de ratones diabéticos presentaba un mayor número de linfocitos anti-PRPH en peritoneo, comparado con el grupo control de ratones pre-diabéticos. Estos resultados podrían indicar una implicación del compartimento peritoneal en el desarrollo de la enfermedad.

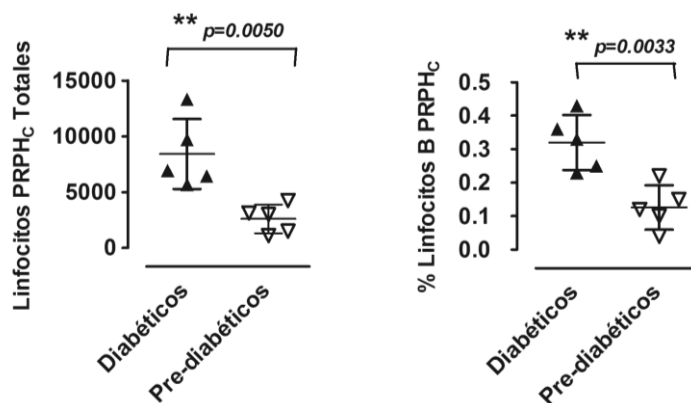


Figura 30. Los linfocitos B anti-PRPH se acumulan preferencialmente en el peritoneo de ratones diabéticos.

Análisis por citometría del lavado peritoneal de hembras de ratón NOD de 15 semanas de edad pre-diabéticas y diabéticas. Panel de anticuerpos CD19+, CD8-, CD4-, F4/80- y PI-, y octámeros A^{β7}/PRPH 467-507C o A^{β7}/GPI control. Los porcentajes se muestran dentro de la población total de linfocitos CD19, tras haber sustraído previamente los valores del octámero control. La gráfica muestra los valores (media ± SD) de un grupo de 5 ratones por grupo experimental. El valor de p se ha calculado mediante análisis estadístico por t de Student.

V.DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los linfocitos B intervienen de forma activa en el desarrollo de diversos procesos autoinmunitarios como artritis, lupus y diabetes tipo 1 (DT1). En el caso de la DT1, se han descrito múltiples autoantígenos implicados en el desarrollo de la enfermedad como la insulina, GAD-65 o IA-2 [163]. La presencia de autoanticuerpos frente a estas proteínas se considera como un importante marcador de predicción y diagnóstico de la DT1 en humanos. La secuencia y naturaleza de los epítomos reconocidos por linfocitos B presentes en estas proteínas ha sido descrita en numerosos trabajos [209, 212].

La periferina (PRPH) es una proteína perteneciente al grupo de filamentos intermedios, con expresión en neuronas del sistema nervioso periférico como células de Schwann y en células del sistema endocrino como las células β -pancreáticas. La presencia de anticuerpos frente a PRPH, fue descrita por primera vez a principios de los años 90 en ratones diabéticos NOD [204, 213], y más recientemente en pacientes diabéticos afectados por diferentes neuropatías [134]. Aunque hasta el momento se desconoce su papel dentro de la DT1, un estudio reciente llevado a cabo por el equipo del Dr. J. Verdaguer [167], ha revelado la presencia de linfocitos B anti-PRPH en el infiltrado de islotes pancreáticos de ratones NOD, susceptibles al desarrollo de diabetes, y en ratones F1 [NOD \times NOR] y F1 [NOD \times NOR]-8.3, que a pesar de no desarrollar diabetes presentan insulinitis. La presencia de linfocitos B anti-PRPH en ratones resistentes a diabetes, apuntaría a la posible implicación de esta población en los pasos iniciales de destrucción de las células β pancreáticas. Estos resultados junto con trabajos que apuntan al desarrollo de una respuesta temprana en islote frente a elementos nerviosos [156], refuerzan la idea de que la periferina podría ser un autoantígeno con un papel importante en el inicio de la respuesta autoinmunitaria.

Dada la importancia del estudio de esta población, en este trabajo se ha llevado a cabo un análisis para determinar y caracterizar la secuencia de epítomos presentes en la periferina, para posteriormente mediante el desarrollo de una innovadora técnica de marcaje específico de linfocitos B anti-PRPH, analizar la evolución y fenotipo de esta población durante el desarrollo de ratones NOD.

Estudios previos sobre la especificidad de los linfocitos B infiltrantes de islote [167], muestra como la mayoría de linfocitos B anti-PRPH reconocen únicamente dos de las tres isoformas generadas por procesamiento alternativo, Per 58 y Per61. Dado que la diferencia existente con la tercera isoforma más corta Per56, son los últimos 21 aa del extremo C terminal, este trabajo postuló la presencia de un epítomo dentro de esta región. En concordancia con estos

resultados, el análisis de antigenicidad de la isoforma Per61 llevado a cabo en este trabajo, revela que la mayoría de los mAbs secretados por los diferentes hibridomas de linfocitos B anti-PRPH infiltrantes de islote analizados, reconocen un epítipo lineal mínimo de 17 aa de longitud localizado en la región L475-S491 del extremo C terminal de la periferina.

Posteriormente, mediante el análisis de anticuerpos en suero de ratones NOD de diferentes edades, hemos comprobado que la respuesta frente a este epítipo es detectable también en periferia. Sin embargo, y a pesar de que estos resultados muestran la presencia de un epítipo dominante dentro de esta región, es necesario tener presente que este análisis no tiene en cuenta los posibles epítipos conformacionales presentes en la proteína en estado nativo, ni en los primeros 84 aa de la región N-terminal, debido a su expresión truncada en el sistema bacteriano utilizado. Por tanto, podemos descartar el desarrollo de una respuesta de linfocitos B anti-periferina frente otros epítipos de origen conformacional o localizados en la región N terminal de la proteína.

El análisis de la respuesta de anticuerpos anti-PRPH en ratones NOD a diferentes edades, muestra el desarrollo de una respuesta mayoritaria en suero de tipo IgG, detectable a partir de las 3 semanas de edad, que aumenta de forma progresiva con la edad del animal. Por el contrario, la presencia de anticuerpos IgM anti-PRPH en estos ratones es casi indetectable. Por otra parte, se ha observado que durante el desarrollo de la respuesta anti-PRPH las hembras presentan un mayor título de anticuerpos comparado con machos. En este sentido, estudios llevados a cabo por el grupo de la Dra. B. Diamond muestran la importancia de los receptores de estrógenos en la regulación del desarrollo y supervivencia de los linfocitos B autoreactivos, de manera que los estrógenos podrían aumentar los niveles de Bcl2 favoreciendo la supervivencia de linfocitos B autoreactivos [214].

La presencia de linfocitos B anti-PRPH infiltrantes en cepas de ratones resistentes a diabetes con insulinitis, F1 [NOD × NOR] y F1 [NOD × NOR]-8.3, pone de manifiesto la importancia de la respuesta frente a esta proteína durante las primeras etapas de inflamación de los islotes. Con el objetivo de analizar la relación entre el proceso de insulinitis y la respuesta de linfocitos B anti-PRPH, en este trabajo hemos llevado a cabo un análisis comparativo de la respuesta de anticuerpos detectada en suero de ratones NOD, que desarrollan insulinitis y diabetes, ratones NOR resistentes a diabetes, sin desarrollo de insulinitis, ratones F1 [NODxNOR] resistentes a diabetes, pero con desarrollo de insulinitis, y ratones C57BL/6 que no desarrollan ni diabetes ni insulinitis. Los resultados obtenidos, muestran la presencia de una respuesta anti-PRPH de tipo IgG en todas las cepas analizadas, aunque hay que señalar que en el caso de la cepa C57BL/6, los anticuerpos anti-PRPH se detectan de forma más tardía, a partir de las 12 semanas de edad. Un estudio reciente corrobora nuestros resultados, al describir la presencia de

anticuerpos anti-PRPH en otras cepas de ratones resistentes a la diabetes, conejos y humanos [215].

Por tanto, a pesar de que la respuesta autoreactiva de linfocitos B anti-PRPH parece no estar relacionada exclusivamente con el proceso de infiltración de islotes, podría estar aumentada en ratones con susceptibilidad a procesos autoinmunitarios. En este sentido, se ha descrito el desarrollo de otros procesos autoinmunes como sialitis en las cepas de ratones NOD y NOR.

Los niveles de expresión de periferina pueden aumentar en situaciones de inflamación mediadas por citocinas pro-inflamatorias como la IL-6 [216], así como en situaciones de regeneración postraumática [217]. Estos datos junto con estudios que demuestran la presencia de una remodelación del sistema nervioso simpático del páncreas en ratones de 3 semanas de edad [153], nos llevan a pensar que el aumento de expresión de periferina durante este proceso podría ser una fuente de autoantígeno, favoreciendo la captación de periferina por parte de los linfocitos B y la presentación a linfocitos T CD4 autoreactivos que podrían colaborar y activar a los linfocitos B anti-PRPH, induciendo procesos de cambio de isotipo en estas células. Esta hipótesis se basa en estudios recientes, donde se ha descrito la presencia de linfocitos anti-PRPH en islotes pancreáticos con signos de hipermutación somática o maduración de afinidad [208]. Hay que señalar que tras la captación del antígeno, el proceso de presentación podría darse *in situ* o tener lugar en otras regiones. Se ha descrito que los nódulos pancreáticos son la principal región implicada en la presentación de antígenos β -pancreáticos y en la activación de linfocitos T CD4 autoreactivos [181], y además se ha demostrado que la presencia de linfocitos B en esta región es necesaria para el desarrollo de esta respuesta [182]. No obstante, a pesar de los indicios que apuntan a una colaboración estrecha con los linfocitos T CD4, hay que tener en cuenta que el cambio de isotipo de linfocitos B, podría ser mediado también por la interacción con células dendríticas del entorno, a través de un mecanismo independiente de la interacción CD40-CD40L [218].

El análisis de la respuesta de anticuerpos de suero de ratones NOD.TCR $\alpha^{-/-}$ deficientes en linfocitos T CD4, muestra la presencia de una respuesta de anticuerpos anti-PRPH disminuida comparada con ratones NOD, lo que reforzaría la idea de estar ante una respuesta de tipo T-dependiente.

A pesar de ello, con los resultados obtenidos hasta el momento no podemos descartar que la respuesta anti-PRPH, pueda tratarse también de una respuesta T-independiente mediada por autoanticuerpos naturales de tipo IgG. Los autoanticuerpos naturales son producidos principalmente por linfocitos de tipo B1, y se sabe que participan en el mantenimiento de la homeostasis de tejidos y el aclaramiento de proteínas liberadas al entorno extracelular durante procesos de senescencia y apoptosis [219]. Se ha descrito la presencia de anticuerpos

naturales frente a otras proteínas del citoesqueleto, como actina o tubulina [220]. Un posible indicio de que los anticuerpos anti-PRPH forman parte del repertorio de anticuerpos naturales, es el resultado obtenido en los experimentos de competición con el péptido PRPH 473-495, donde se observa la baja afinidad de los anticuerpos detectados en suero de ratones NOD y secretados por los hibridomas I6, 228E1 y H259B, una característica común con los anticuerpos naturales.

Posiblemente la población natural de linfocitos B autoreactivos anti-PRPH en condiciones normales o de no autoinmunidad, contribuye al mantenimiento natural de la homeostasis de diferentes tejidos. En situaciones de apoptosis inducida por procesos de inflamación acompañada de defectos a nivel inmunitario, podría convertirse en una población con un papel potencialmente patogénico que podría contribuir al proceso de destrucción del tejido. En ratones NOD, se ha descrito un defecto en la capacidad de fagocitosis de los macrófagos [221], lo que implicaría una deficiencia en el proceso de aclaramiento de proteínas liberadas al entorno extracelular.

Uno de los objetivos planteados en este trabajo de tesis, ha sido el desarrollo de una estrategia de marcaje y detección específica de linfocitos B, que nos permitiese analizar en detalle la población de linfocitos B anti-PRPH, para comprender mejor su naturaleza y su comportamiento durante el desarrollo de la DT1 en ratones NOD.

Para ello, se generaron múltiples construcciones y se analizó su capacidad de unión mediante citometría, usando como herramienta de análisis el hibridoma I6, uno de los clones de linfocitos B anti-PRPH aislados del infiltrado de islote con expresión de BCR en superficie.

Tras múltiples intentos, conseguimos obtener una molécula con capacidad de unión a la superficie del hibridoma I6. Esta molécula que recibe el nombre de A^{B7}/PRPH 467-507C, se compone fundamentalmente de dos copias del péptido 467-507, fusionadas en posición C terminal a las cadenas α y β del complejo mayor de histocompatibilidad I-A^{B7}. Tras la biotilación de la cadena α y la conjugación a moléculas fluorescentes de SA, se generan estructuras octaméricas fluorescentes.

Paralelamente al desarrollo de la molécula A^{B7}/PRPH 467-507C, se generó también una segunda molécula con la secuencia 473-495 de la periferina en posición C terminal que recibió el nombre de A^{B7}/PRPH 473-495C. A pesar de ser reconocida por los anticuerpos presentes en suero de ratones NOD mediante ELISA, a nivel de detección por citometría el resultado fue negativo. Una posible explicación a la no funcionalidad de esta molécula, podría residir en las diferencias de afinidad observadas por ELISA entre las proteínas PRPH 467-507 y PRPH 473-495. En paralelo a estas construcciones, se generaron dos moléculas homólogas donde las secuencias de los péptidos se localizan en posición N terminal, A^{B7}/PRPH 467-507N y A^{B7}/PRPH

473-495N. En este caso, pese a presentar un patrón similar de reconocimiento mediante ELISA, la unión inespecífica de la molécula control desarrollada A^{g7}Nt descartó su posterior uso para estudios de detección.

El diseño de esta estrategia aparentemente más compleja a las utilizadas por otros investigadores hasta el momento [193,196,197], se llevó a cabo tras comprobar en una serie de experimentos paralelos, que la tinción directa con péptidos de periferina o proteínas recombinantes conjugadas a fluorocromos no funcionaba, bien debido a la baja afinidad de los receptores de superficie en el caso de los péptidos, o al elevado ruido de fondo introducido por la proteína GST en el caso de las proteínas recombinantes.

Apoyándonos en los datos que muestran la baja afinidad de los anticuerpos, esta técnica proporciona una ventaja añadida puesto que el aumento de valencia de los octámeros, favorecería la unión estos linfocitos B autoreactivos de baja afinidad. La dirección de esta estrategia es similar a la aplicada en la generación de tetrámeros de MHC de clase I y clase II, para el estudio de linfocitos T CD8 y CD4 autoreactivos respectivamente, en el contexto de enfermedades autoinmunes [222]. El desarrollo de una técnica similar con estructuras tetraméricas de péptido, ha demostrado ser eficaz en la detección y caracterización de la respuesta de linfocitos B anti-dsDNA desarrollada en pacientes afectados por lupus [198].

Con el objetivo de comprobar la especificidad de unión de las moléculas de A^{g7}/PRPH 467-507C al receptor de los linfocitos B anti-PRPH, se ha llevado a cabo un proceso de análisis meticuloso demostrando la capacidad de estas moléculas, para detectar frecuencias de linfocitos B discretas pero específicas en ratones naive NOD. Uno de los experimentos más determinantes de la especificidad de las moléculas, ha sido la comprobación mediante ELISPOT de la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos secretados por linfocitos B purificados con octámeros de A^{g7}/PRPH 467-507C, frente a la proteína recombinante PRPH 429-507. Por otra parte, hemos demostrado como la unión de los octámeros de A^{g7}/PRPH 467-507C al hibridoma I6 puede ser bloqueada por los anticuerpos del hibridoma 228E1, y de forma más importante aún, como el péptido sintético PRPH 473-495 es capaz de bloquear la unión de los anticuerpos secretados por el hibridoma 228E1 a la proteína periferina nativa expresada en la línea de neuroblastoma N1E-115.

Tras la validación de los octámeros de A^{g7}/PRPH 467-507C, realizamos un análisis previo de detección en diferentes compartimentos del ratón NOD. La frecuencia de linfocitos B anti-PRPH detectable en bazo, nódulos pancreáticos y peritoneo de ratones NOD, a pesar de ser discreta era superior a los valores detectados con la molécula control A^{g7}/GPI.

A continuación se analizó el desarrollo de esta población en estos compartimentos, utilizando para ello grupos de ratones NOD, de entre 4 y 15 semanas de edad. Los resultados revelaron,

al igual que ocurre con el desarrollo de la respuesta de anticuerpos, una frecuencia superior de linfocitos anti-PRPH en hembras con respecto a machos, y un aumento progresivo de esta población en nódulos pancreáticos y peritoneo. La frecuencia de linfocitos B anti-PRPH detectada en peritoneo, fue muy superior a la presente en el resto de compartimentos, alcanzando valores de hasta un 0.6% en ratones de 15 semanas de edad. Estos resultados inicialmente no esperados, nos trasladaron nuevamente a la idea de que la naturaleza de esta población de linfocitos B podría ser de tipo B1, puesto que el peritoneo es la región donde se localizan de forma preferencial estas poblaciones.

Con el objetivo de caracterizar la naturaleza de esta población, se llevó a cabo un análisis del fenotipo. Los resultados obtenidos tras el análisis de la expresión de moléculas específicas de estas poblaciones, CD5 y Mac1, revelaron la presencia de una población de linfocitos B anti-PRPH heterogénea dentro de este compartimento. Mientras en peritoneo se detecta un 35% de linfocitos B1 (CD5+/-Mac1+) y un 65% de linfocitos B2 (CD5-Mac1-), en el resto de compartimentos analizados como bazo, nódulos pancreáticos e islotes las poblaciones mayoritarias detectadas son de tipo B2. Por tanto, pese a las evidencias que apuntarían a la posible naturaleza B1 de esta población, parece que, al menos en ratones NOD se desarrollan ambas repuestas. Esta dualidad poblacional, podría explicarse con el modelo de selección, que propone el origen común de ambas poblaciones. Según este, señales de fuerte intensidad estarían relacionadas con la diferenciación a linfocitos B1, mientras que señales de intensidad intermedia o débil dirigirían los linfocitos hacia el compartimento B2 [72]. Por tanto, los octámeros A⁸⁷/PRPH 467-507C, serían una herramienta de gran utilidad a la hora de comprender los mecanismos que subyacen a la diferenciación poblaciones autoreactivas en ratones NOD.

A pesar de que la respuesta anti-PRPH de tipo B1 está minoritariamente representada en los ratones NOD, hay que tener presente que podrían desarrollar una función importante dentro de la DT1. Estudios llevados a cabo por el equipo del Dr. JW Thomas han demostrado la importancia de los linfocitos B1 peritoneales en el desarrollo de la DT1, de forma que la eliminación de esta población mediante lisis hipotónica se traduce en una disminución del infiltrado pancreático y de la DT1 en ratones NOD [179].

Con el objetivo de analizar la distribución de esta población dentro del compartimento B2, en este trabajo, se llevó a cabo un análisis de la distribución de los linfocitos B anti-PRPH dentro de las subpoblaciones de linfocitos FO CD23+CD21- y MZ CD23-CD21+ presentes en bazo. Los resultados obtenidos, revelaron la presencia de linfocitos B anti-PRPH esplénicos en ambos compartimentos. Aproximadamente un 15% de los linfocitos anti-PRPH presentan un fenotipo marginal, mientras que el porcentaje mayoritario presente en bazo es de tipo folicular, lo que

nuevamente indicaría la importancia de la señalización a través del BCR en la maduración y diferenciación de esta población autoreactiva.

Investigaciones recientes han descrito la presencia de linfocitos B MZ en islotes pancreáticos, capaces de procesar y presentar antígenos de insulina activando linfocitos T CD4 *in vitro* [178]. Actualmente, en este estudio no hemos podido confirmar la presencia de linfocitos B anti-PRPH con fenotipo MZ en esta región, pese a que ha sido descrita la presencia de poblaciones MZ en islotes. Sin embargo, si se ha podido detectar la presencia de linfocitos anti-PRPH de tipo B2 (Mac1-CD5-), dentro del infiltrado de islotes, lo que indica la importancia este fenotipo poblacional dentro de la respuesta anti-islote.

Por otra parte, con el objetivo de analizar los compartimentos involucrados en la activación y cambio de isotipo de esta población en ratones NOD, se llevó a cabo un análisis de la expresión de IgM e IgD de superficie. Los resultados obtenidos, revelaron la presencia de linfocitos B anti-PRPH en bazo, nódulos pancreáticos e islotes pancreáticos sin signos aparentes de cambio de isotipo. Sin embargo, es necesario señalar que el análisis llevado a cabo con los octámeros de A^{B7}/PRPH 467-507C, detecta solamente linfocitos B naive o de memoria con expresión de BCR de superficie, por lo que linfocitos en etapas posteriores de diferenciación a célula plasmática, donde hay una internalización del receptor, escaparían a la detección mediante esta técnica. Sin embargo, los resultados del análisis de expresión de IgM e IgD en la superficie de linfocitos B anti-PRPH localizados en la región peritoneal ratones NOD, muestran como alrededor de un 5 % de estos linfocitos parece haber sufrido procesos de cambio de isotipo. Estos resultados nos llevan a pensar, que los linfocitos B anti-PRPH con isotipo IgG2b detectados en islotes de ratones NOD en trabajos previos [208] probablemente han sido activados previamente en una región diferente a islote, como por ejemplo peritoneo, pudiendo migrar posteriormente a páncreas donde se encontrarían en forma de células plasmáticas.

Los fenómenos de hipermutación somática y cambio de isotipo de los linfocitos B, tienen lugar a nivel de los centros germinales de los órganos linfoides secundarios. Recientemente se ha descrito, que los órganos linfoides omentales o cuerpos reticulares de peritoneo son capaces de dar soporte a la activación de linfocitos T y B [223]. Por tanto, y teniendo en cuenta esto, sería factible pensar, que estas regiones podrían estar implicadas en la activación y cambio de isotipo de los linfocitos B anti-PRPH, y en la consecuente activación de linfocitos T CD4 autoreactivos, que posteriormente migrarían a islote. Este proceso por tanto, podría ocurrir en paralelo al descrito en nódulos pancreáticos para otros autoantígenos β -pancreáticos.

Como ya se ha comentado anteriormente, durante el desarrollo del ratón NOD, la frecuencia de linfocitos B anti-PRPH en peritoneo alcanza valores de hasta un 0.6%, muy superiores al

resto de compartimentos analizados. Este resultado indicaría que la región peritoneal podría tener un papel fundamental en el mantenimiento esta respuesta, generando un ambiente idóneo para la acumulación o incluso proliferación de esta población durante el desarrollo de la enfermedad. En este sentido, el análisis del compartimento peritoneal de ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad, revelo la presencia de una frecuencia de linfocitos B anti-PRPH inferior al detectado en ratones NOD de la misma edad. Por otra parte hemos observado cómo tras el debut diabético, los ratones NOD presentan un aumento significativo de linfocitos anti-PRPH en peritoneo comparado con los pre-diabéticos, lo que pone de manifiesto la relación existente entre esta población de linfocitos anti-PRPH y el peritoneo durante el desarrollo de la enfermedad.

Para finalizar y a modo de resumen en este trabajo hemos determinado y caracterizado por primera vez la secuencia de un epítipo reconocido por linfocitos B autoreactivos dentro de la periferina. Además y mediante el desarrollo de una innovadora técnica de marcaje con octámeros de A^{g7}/PRPH 467-507C, hemos podido analizar y caracterizar la población de linfocitos B anti-PRPH en ratones NOD, revelando un posible rol del peritoneo en la dinámica de esta población y la DT1. Estudios posteriores serán necesarios para analizar cuál es la función estos linfocitos B anti-PRPH peritoneales dentro de la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los anticuerpos secretados por los hibridomas anti-periferina (PRPH) procedentes de islotes pancreáticos de ratones F1 [NOD × NOR], F1 [NOD × NOR] 8.3 y NOD 8.3, reconocen un epítipo mínimo localizado en la región L475-S491 de la proteína.
2. Los ratones NOD desarrollan una respuesta mayoritaria de anticuerpos de tipo IgG de baja afinidad temprana frente a la hiperferrina. Sin embargo otras cepas de ratones diabeto-resistentes NOR, F1 [NODxNOR] y C57BL/6 desarrollan también anticuerpos anti-PRPH, por lo que podría tratarse de una respuesta de anticuerpos naturales. A pesar de ello el fondo genético autoinmune NOD parece estar relacionado con el desarrollo acelerado de la respuesta.
3. Las moléculas octaméricas A⁶⁷/PRPH 467-507C son reconocidas de forma específica por el hibridoma I6 y los linfocitos B anti-PRPH de ratón, por lo que los octámeros A⁶⁷/PRPH 467-507C son una herramienta potencialmente útil para el estudio de la respuesta de linfocitos B anti-PRPH en ratones NOD.
4. En ratones NOD se desarrolla una respuesta de linfocitos B temprana detectable a partir de las 4 semanas que aumenta de forma progresiva en nódulos pancreáticos y peritoneo siendo este último el compartimento donde se registran las frecuencias más elevadas de la población.
5. Los linfocitos B anti-PRPH en ratones NOD presentan un perfil de fenotipo poblacional heterogéneo. En bazo, nódulos pancreáticos e islotes se detectan linfocitos de tipo B2, mientras en peritoneo se localizan en el compartimento B2 y el B1. Así mismo el análisis dentro del compartimento B2 revela la presencia de linfocitos B anti-PRPH de tipo folicular y marginal.
6. El análisis del compartimento peritoneal de ratones NOD revela la presencia de linfocitos B anti-PRPH con signos de cambio de clase, lo que indica la importancia de esta región en el proceso de activación y maduración de esta población. Por otra parte hemos observado cómo estas células se acumulan preferencialmente en el compartimento peritoneal de

ratones diabéticos NOD, lo que pone de manifiesto la relación existente entre los linfocitos B anti-PRPH y el curso de la T1D.

**VII.PUBLICACIONES Y ACTIVIDAD
CIENTÍFICA RESULTANTE DE
LA ETAPA PREDOCTORAL**

PUBLICACIONES Y ACTIVIDAD CIENTÍFICA RESULTANTE DE LA ETAPA PREDOCTORAL

Máster

- 2007 **Periferina y Diabetes tipo I (DT1). Determinación del epítipo reconocido por células B autoreactivas. Desarrollo de tetrámeros de MHC-II para el estudio de la respuesta específica de linfocitos T CD4+ autoreactivos.** Universidad de Barcelona y Universidad Autónoma de Barcelona.

Publicaciones científicas

- N. Garabatos, R. Alvarez, J. Carrillo, J. Carrascal, C. Izquierdo, H. D. Chapman, M. Presa, C. Mora, D. V Serreze, J. Verdaguer, and T. Stratmann, **“In vivo detection of peripherin-specific autoreactive B cells during type 1 diabetes pathogenesis.”** J. Immunol., vol. 192, no. 7, pp. 3080–90, Apr. 2014.
- M. Presa, A. Z. Ortiz, N. Garabatos, C. Izquierdo, E. I. Rivas, L. Teyton, C. Mora, D. Serreze, and T. Stratmann, **“Cholera toxin subunit B peptide fusion proteins reveal impaired oral tolerance induction in diabetes-prone but not in diabetes-resistant mice.”** Eur. J. Immunol., vol. 43, no. 11, pp. 2969–79, Nov. 2013.
- E. I. Rivas, J. P. Driver, N. Garabatos, M. Presa, C. Mora, F. Rodriguez, D. V Serreze, and T. Stratmann, **“Targeting of a T cell agonist peptide to lysosomes by DNA vaccination induces tolerance in the nonobese diabetic mouse.”** J. Immunol., vol. 186, no. 7, pp. 4078–87, Apr. 2011.

Comunicaciones en congresos

- Nahir Garabatos et al. (2009). **Análisis de la respuesta autoreactiva de linfocitos B anti-periferina en el modelo de ratón NOD.**III Congres de la Societat Catalana d´ Immunología, Barcelona.
- Nahir Garabatos et al. (2010). **Peripherin auto-reactive B cells: a role in DT1?** 20th New England Regional Workshop Autoimmune Diabetes Mellitus. Woods Hole (EEUU)

Becas de financiación

- 2008-2011 **Beca Pre-doctoral Formación de Personal Investigador (FPI)** del Ministerio de Ciencia e Innovación (MEC).
- 2010 **Beca estancia breve en el extranjero** del MEC. The Jackson Laboratory (EEUU).
- 2005-2007 **Beca de colaboración científica** de la Fundación Bosh y Gimpera.

VIII.BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. V Ravetch and S. Bolland, "IgG Fc receptors.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 19, pp. 275–90, Jan. 2001.
- [2] H. Rus, C. Cudrici, and F. Niculescu, "The role of the complement system in innate immunity.," *Immunol. Res.*, vol. 33, no. 2, pp. 103–12, Jan. 2005.
- [3] R. Ahmed and D. Gray, "Immunological memory and protective immunity: understanding their relation.," *Science*, vol. 272, no. 5258, pp. 54–60, Apr. 1996.
- [4] Janeway, Jr, Paul Travers, Mark Walport, "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.," *New York: Garland Science*, 2001. [
- [5] T. Kurosaki, "Molecular dissection of B cell antigen receptor signaling (review).," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 1, no. 3, pp. 515–27, Mar. 1998.
- [6] M. Reth, "Antigen receptor tail clue.," *Nature*, vol. 338, no. 6214, pp. 383–4, Mar. 1989.
- [7] D. T. Fearon and M. C. Carroll, "Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, pp. 393–422, Jan. 2000.
- [8] J. Mestas and C. C. W. Hughes, "Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 5, pp. 2731–2738, Feb. 2004.
- [9] B. de Bono, M. Madera, and C. Chothia, "VH gene segments in the mouse and human genomes.," *J. Mol. Biol.*, vol. 342, no. 1, pp. 131–43, Sep. 2004.
- [10] F. Matsuda, K. Ishii, P. Bourvagnet, K. -i. Kuma, H. Hayashida, T. Miyata, and T. Honjo, "The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus," *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 11, pp. 2151–2162, Dec. 1998.
- [11] K. M. Brekke and W. T. Garrard, "Assembly and analysis of the mouse immunoglobulin kappa gene sequence.," *Immunogenetics*, vol. 56, no. 7, pp. 490–505, Oct. 2004.
- [12] S. Inoges, A. L.-D. de Cerio, H. Villanueva, F. Pastor, E. Soria, and M. Bendandi, "Idiotype vaccines for lymphoma: Potential factors predicting the induction of immune responses.," *World J. Clin. Oncol.*, vol. 2, no. 6, pp. 237–44, Jun. 2011.
- [13] M. R. Lieber, Y. Ma, U. Pannicke, and K. Schwarz, "Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 9, pp. 712–20, Sep. 2003.
- [14] A. Olaru, H. T. Petrie, and F. Livák, "Beyond the 12/23 rule of VDJ recombination independent of the Rag proteins.," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 10, pp. 6220–6, May 2005.

-
- [15] M. A. Oettinger, D. G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore, "RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination.," *Science*, vol. 248, no. 4962, pp. 1517–23, Jun. 1990.
- [16] Y. Shinkai, G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, and A. M. Stall, "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement.," *Cell*, vol. 68, no. 5, pp. 855–67, Mar. 1992.
- [17] P. Mombaerts, J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou, "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes.," *Cell*, vol. 68, no. 5, pp. 869–77, Mar. 1992.
- [18] A. Villa, S. Santagata, F. Bozzi, S. Giliani, A. Frattini, L. Imberti, L. B. Gatta, H. D. Ochs, K. Schwarz, L. D. Notarangelo, P. Vezzone, and E. Spanopoulou, "Partial V(D)J recombination activity leads to Omenn syndrome.," *Cell*, vol. 93, no. 5, pp. 885–96, May 1998.
- [19] C. Mao, L. Jiang, M. Melo-Jorge, M. Puthenveetil, X. Zhang, M. C. Carroll, and T. Imanishi-Kari, "T cell-independent somatic hypermutation in murine B cells with an immature phenotype.," *Immunity*, vol. 20, no. 2, pp. 133–44, Feb. 2004.
- [20] S. Weller, A. Faili, C. Garcia, M. C. Braun, F. Le Deist, G. de Saint Basile, O. Hermine, A. Fischer, C. A. Reynaud, and J. C. Weill, "CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 3, pp. 1166–70, Jan. 2001.
- [21] V. H. Odegard and D. G. Schatz, "Targeting of somatic hypermutation.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 8, pp. 573–83, Aug. 2006.
- [22] M. S. Neuberger and C. Rada, "Somatic hypermutation: activation-induced deaminase for C/G followed by polymerase eta for A/T.," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 1, pp. 7–10, Jan. 2007.
- [23] J. Chaudhuri and F. W. Alt, "Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 7, pp. 541–52, Jul. 2004.
- [24] A. Rolink, D. Haasner, S. Nishikawa, and F. Melchers, "Changes in frequencies of clonable pre B cells during life in different lymphoid organs of mice.," *Blood*, vol. 81, no. 9, pp. 2290–300, May 1993.
- [25] J. B. Chung, M. Silverman, and J. G. Monroe, "Transitional B cells: step by step towards immune competence.," *Trends Immunol.*, vol. 24, no. 6, pp. 343–9, Jun. 2003.
- [26] K. Tokoyoda, T. Egawa, T. Sugiyama, B.-I. Choi, and T. Nagasawa, "Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development.," *Immunity*, vol. 20, no. 6, pp. 707–18, Jun. 2004.
- [27] S. Pillai and A. Cariappa, "The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 11, pp. 767–777, 2009.

-
- [28] M. Abul K. Abbas, MBBS, Andrew H. Lichtman, MD, PhD and Shiv Pillai, "Cellular and Molecular Immunology, 7th Edition," *Elsevier*, 2011.
- [29] E. ten Boekel, F. Melchers, and A. Rolink, "The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B cell development.," *Int. Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 1013–9, Jun. 1995.
- [30] M. E. Conley, D. Mathias, J. Treadaway, Y. Minegishi, and J. Rohrer, "Mutations in btk in patients with presumed X-linked agammaglobulinemia.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 62, no. 5, pp. 1034–43, May 1998.
- [31] M. Shapiro-Shelef and K. Calame, "Regulation of plasma-cell development.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 3, pp. 230–42, Mar. 2005.
- [32] F. Henningsson, Z. Ding, J. S. Dahlin, M. Linkevicius, F. Carlsson, K.-O. Grönvik, J. Hallgren, and B. Heyman, "IgE-mediated enhancement of CD4+ T cell responses in mice requires antigen presentation by CD11c+ cells and not by B cells.," *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e21760, Jan. 2011.
- [33] D. Allman, R. C. Lindsley, W. DeMuth, K. Rudd, S. A. Shinton, and R. R. Hardy, "Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation.," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 12, pp. 6834–40, Dec. 2001.
- [34] K. T. Merrell, R. J. Benschop, S. B. Gauld, K. Aviszus, D. Decote-Ricardo, L. J. Wsocki, and J. C. Cambier, "Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire.," *Immunity*, vol. 25, no. 6, pp. 953–62, Dec. 2006.
- [35] S. Pillai, A. Cariappa, and S. T. Moran, "Marginal zone B cells.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 161–96, Jan. 2005.
- [36] K. Hayakawa, R. R. Hardy, D. R. Parks, and L. A. Herzenberg, "The 'Ly-1 B' cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice.," *J. Exp. Med.*, vol. 157, no. 1, pp. 202–18, Jan. 1983.
- [37] A. Di Sabatino, R. Carsetti, and G. R. Corazza, "Post-splenectomy and hyposplenic states.," *Lancet*, vol. 378, no. 9785, pp. 86–97, Jul. 2011.
- [38] Y. R. Carrasco and F. D. Batista, "B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 18, no. 3, pp. 286–91, Jun. 2006.
- [39] F. D. Batista, D. Iber, and M. S. Neuberger, "B cells acquire antigen from target cells after synapse formation.," *Nature*, vol. 411, no. 6836, pp. 489–94, May 2001.
- [40] H.-K. Guttormsen, A. H. Sharpe, A. K. Chandraker, A. K. Brigtsen, M. H. Sayegh, and D. L. Kasper, "Cognate Stimulatory B-Cell–T-Cell Interactions Are Critical for T-Cell Help Recruited by Glycoconjugate Vaccines."

-
- [41] K. M. Toellner, A. Gulbranson-Judge, D. R. Taylor, D. M. Sze, and I. C. MacLennan, "Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation.," *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 5, pp. 2303–12, May 1996.
- [42] E. A. Clark and J. A. Ledbetter, "How B and T cells talk to each other.," *Nature*, vol. 367, no. 6462, pp. 425–8, Feb. 1994.
- [43] C. L. Cozine, K. L. Wolniak, and T. J. Waldschmidt, "The primary germinal center response in mice.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 17, no. 3, pp. 298–302, Jun. 2005.
- [44] G. Koopman, H. K. Parmentier, H. J. Schuurman, W. Newman, C. J. Meijer, and S. T. Pals, "Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function-associated antigen 1/intercellular adhesion molecule 1 and very late antigen 4/vascular cell adhesion molecule 1 pathways.," *J. Exp. Med.*, vol. 173, no. 6, pp. 1297–304, Jun. 1991.
- [45] G. Koopman, R. M. Keehnen, E. Lindhout, W. Newman, Y. Shimizu, G. A. van Seventer, C. de Groot, and S. T. Pals, "Adhesion through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) pathways prevents apoptosis of germinal center B cells.," *J. Immunol.*, vol. 152, no. 8, pp. 3760–7, Apr. 1994.
- [46] C. Arpin, J. Déchanet, C. Van Kooten, P. Merville, G. Grouard, F. Brière, J. Banchereau, and Y. J. Liu, "Generation of memory B cells and plasma cells in vitro.," *Science*, vol. 268, no. 5211, pp. 720–2, May 1995.
- [47] H. A. Minges Wols, G. H. Underhill, G. S. Kansas, and P. L. Witte, "The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity.," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 8, pp. 4213–21, Oct. 2002.
- [48] K.-M. Toellner, W. E. Jenkinson, D. R. Taylor, M. Khan, D. M.-Y. Sze, D. M. Sansom, C. G. Vinuesa, and I. C. M. MacLennan, "Low-level hypermutation in T cell-independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell-dependent germinal centers.," *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 3, pp. 383–9, Feb. 2002.
- [49] R. Küppers, "B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 3, no. 10, pp. 801–12, Oct. 2003.
- [50] C. M. Snapper, C. Peschel, and W. E. Paul, "IFN-gamma stimulates IgG2a secretion by murine B cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide.," *J. Immunol.*, vol. 140, no. 7, pp. 2121–7, Apr. 1988.
- [51] D. Aït-Azzouzene, P. Skog, M. Retter, V. Kouskoff, M. Hertz, J. Lang, J. Kench, M. Chumley, D. Melamed, J. Sudaria, A. Gavin, A. Martensson, L. Verkoczy, B. Duong, J. Vela, D. Nemazee, and C. Alfonso, "Tolerance-induced receptor selection: scope, sensitivity, locus specificity, and relationship to lymphocyte-positive selection.," *Immunol. Rev.*, vol. 197, pp. 219–30, Feb. 2004.
- [52] F. D. Batista and N. E. Harwood, "The who, how and where of antigen presentation to B cells.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 1, pp. 15–27, Jan. 2009.

- [53] A. Zandvoort and W. Timens, "The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens.," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 130, no. 1, pp. 4–11, Oct. 2002.
- [54] A. R. Oliver, L. K. Silbart, D. F. Keren, H. J. Van Kruiningen, B. F. Miller, and C. Rearick, "Mucosal unresponsiveness to aflatoxin B1 is not broken by cholera toxin.," *Immunol. Cell Biol.*, vol. 75, no. 1, pp. 47–53, Feb. 1997.
- [55] D. Allman, B. Srivastava, and R. C. Lindsley, "Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells.," *Immunol. Rev.*, vol. 197, pp. 147–60, Feb. 2004.
- [56] N. Baumgarth, "The double life of a B-1 cell : self-reactivity selects for protective effector functions," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 11, no. 1, pp. 34–46, 2010.
- [57] K. Yanaba, J.-D. Bouaziz, K. M. Haas, J. C. Poe, M. Fujimoto, and T. F. Tedder, "A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses.," *Immunity*, vol. 28, no. 5, pp. 639–50, May 2008.
- [58] B. Srivastava, R. C. Lindsley, N. Nikbakht, and D. Allman, "Models for peripheral B cell development and homeostasis.," *Semin. Immunol.*, vol. 17, no. 3, pp. 175–82, Jun. 2005.
- [59] A. Cariappa and S. Pillai, "Antigen-dependent B-cell development.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 14, no. 2, pp. 241–9, Apr. 2002.
- [60] T. Lopes-Carvalho and J. F. Kearney, "Development and selection of marginal zone B cells.," *Immunol. Rev.*, vol. 197, pp. 192–205, Feb. 2004.
- [61] K. Tanigaki, H. Han, N. Yamamoto, K. Tashiro, M. Ikegawa, K. Kuroda, A. Suzuki, T. Nakano, and T. Honjo, "Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells.," *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 5, pp. 443–50, May 2002.
- [62] E. A. Leadbetter, M. Brigl, P. Illarionov, N. Cohen, M. C. Luteran, S. Pillai, G. S. Besra, and M. B. Brenner, "NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 24, pp. 8339–44, Jun. 2008.
- [63] G. Cinamon, M. A. Zachariah, O. M. Lam, F. W. Foss, and J. G. Cyster, "Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport.," *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 1, pp. 54–62, Jan. 2008.
- [64] K. Attanavanich and J. F. Kearney, "Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells.," *J. Immunol.*, vol. 172, no. 2, pp. 803–11, Jan. 2004.
- [65] M. Dono, G. Cerruti, and S. Zupo, "The CD5+ B-cell.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, no. 11, pp. 2105–11, Nov. 2004.
- [66] K. M. Haas, J. C. Poe, D. A. Steeber, and T. F. Tedder, "B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*.," *Immunity*, vol. 23, no. 1, pp. 7–18, Jul. 2005.

- [67] K. R. Alugupalli, J. M. Leong, R. T. Woodland, M. Muramatsu, T. Honjo, and R. M. Gerstein, "B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity.," *Immunity*, vol. 21, no. 3, pp. 379–90, Sep. 2004.
- [68] S. Amu, I. Gjertsson, A. Tarkowski, and M. Brisslert, "B-cell CD25 expression in murine primary and secondary lymphoid tissue.," *Scand. J. Immunol.*, vol. 64, no. 5, pp. 482–92, Nov. 2006.
- [69] A. J. Macpherson, D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel, "A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria.," *Science*, vol. 288, no. 5474, pp. 2222–6, Jun. 2000.
- [70] K. Dorshkind and E. Montecino-Rodriguez, "Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 3, pp. 213–9, Mar. 2007.
- [71] E. Montecino-Rodriguez, H. Leathers, and K. Dorshkind, "Identification of a B-1 B cell-specified progenitor.," *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 3, pp. 293–301, Mar. 2006.
- [72] H. Niiro and E. A. Clark, "Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 12, pp. 945–56, Dec. 2002.
- [73] H. H. Wortis, M. Teutsch, M. Higer, J. Zheng, and D. C. Parker, "B-cell activation by crosslinking of surface IgM or ligation of CD40 involves alternative signal pathways and results in different B-cell phenotypes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 8, pp. 3348–52, Apr. 1995.
- [74] R. Carsetti, "Characterization of B-cell maturation in the peripheral immune system.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 271, pp. 25–35, Jan. 2004.
- [75] Y. Iwata, T. Matsushita, M. Horikawa, D. J. Dilillo, K. Yanaba, G. M. Venturi, P. M. Szabolcs, S. H. Bernstein, C. M. Magro, A. D. Williams, R. P. Hall, E. W. St Clair, and T. F. Tedder, "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells.," *Blood*, vol. 117, no. 2, pp. 530–41, Jan. 2011.
- [77] S. Fillatreau, C. H. Sweeney, M. J. McGeachy, D. Gray, and S. M. Anderton, "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10.," *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 10, pp. 944–50, Oct. 2002.
- [78] P. Lenert, R. Brummel, E. H. Field, and R. F. Ashman, "TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production.," *J. Clin. Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 29–40, Jan. 2005.
- [79] K. Yanaba, J.-D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata, and T. F. Tedder, "The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals.," *J. Immunol.*, vol. 182, no. 12, pp. 7459–72, Jun. 2009.
- [80] A. Yoshizaki, T. Miyagaki, D. J. DiLillo, T. Matsushita, M. Horikawa, E. I. Kountikov, R. Spolski, J. C. Poe, W. J. Leonard, and T. F. Tedder, "Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions.," *Nature*, vol. 491, no. 7423, pp. 264–8, Nov. 2012.

- [82] D. Maseda, S. H. Smith, D. J. DiLillo, J. M. Bryant, K. M. Candando, C. T. Weaver, and T. F. Tedder, "Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production in vivo.," *J. Immunol.*, vol. 188, no. 3, pp. 1036–48, Feb. 2012.
- [83] R. Rojas and G. Apodaca, "Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 3, no. 12, pp. 944–55, Dec. 2002.
- [84] F. Nimmerjahn and J. V. Ravetch, "Fcγ receptors as regulators of immune responses.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 1, pp. 34–47, Jan. 2008.
- [85] C. C. Goodnow, J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, and C. G. Vinuesa, "Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity.," *Nature*, vol. 435, no. 7042, pp. 590–7, Jun. 2005.
- [86] F. Mackay, P. Schneider, P. Rennert, and J. Browning, "BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 21, pp. 231–64, Jan. 2003.
- [87] A. Strasser and P. Bouillet, "The control of apoptosis in lymphocyte selection.," *Immunol. Rev.*, vol. 193, pp. 82–92, Jun. 2003.
- [88] R. Casellas, T. A. Shih, M. Kleinewietfeld, J. Rakonjac, D. Nemazee, K. Rajewsky, and M. C. Nussenzweig, "Contribution of receptor editing to the antibody repertoire.," *Science*, vol. 291, no. 5508, pp. 1541–4, Feb. 2001.
- [89] P. Oberdoerffer, T. I. Novobrantseva, and K. Rajewsky, "Expression of a targeted lambda 1 light chain gene is developmentally regulated and independent of Ig kappa rearrangements.," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 9, pp. 1165–72, May 2003.
- [90] R. Halverson, R. M. Torres, and R. Pelanda, "Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens.," *Nat. Immunol.*, vol. 5, no. 6, pp. 645–50, Jun. 2004.
- [91] S. Liu, M.-G. Velez, J. Humann, S. Rowland, F. J. Conrad, R. Halverson, R. M. Torres, and R. Pelanda, "Receptor editing can lead to allelic inclusion and development of B cells that retain antibodies reacting with high avidity autoantigens.," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 8, pp. 5067–76, Oct. 2005.
- [92] H. von Boehmer and F. Melchers, "Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease.," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 1, pp. 14–20, Jan. 2010.
- [93] R. Casellas, Q. Zhang, N.-Y. Zheng, M. D. Mathias, K. Smith, and P. C. Wilson, "Igkappa allelic inclusion is a consequence of receptor editing.," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 1, pp. 153–60, Jan. 2007.
- [94] A. Enders, P. Bouillet, H. Puthalakath, Y. Xu, D. M. Tarlinton, and A. Strasser, "Loss of the pro-apoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim inhibits BCR stimulation-induced apoptosis and deletion of autoreactive B cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 7, pp. 1119–26, Oct. 2003.
- [95] M. J. Shlomchik, "Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation.," *Immunity*, vol. 28, no. 1, pp. 18–28, Jan. 2008.

- [96] G. J. Nossal and B. L. Pike, "Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 77, no. 3, pp. 1602–6, Mar. 1980.
- [97] J. C. Cambier, S. B. Gauld, K. T. Merrell, and B. J. Vilen, "B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 8, pp. 633–43, Aug. 2007.
- [98] S. B. Hartley, M. P. Cooke, D. A. Fulcher, A. W. Harris, S. Cory, A. Basten, and C. C. Goodnow, "Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death.," *Cell*, vol. 72, no. 3, pp. 325–35, Feb. 1993.
- [99] C. G. Vinuesa, I. Sanz, and M. C. Cook, "Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 12, pp. 845–57, Dec. 2009.
- [100] R. Hanayama, M. Tanaka, K. Miyasaka, K. Aozasa, M. Koike, Y. Uchiyama, and S. Nagata, "Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice.," *Science*, vol. 304, no. 5674, pp. 1147–50, May 2004.
- [101] A. Basten and P. A. Silveira, "B-cell tolerance : mechanisms and implications," *Curr. Opin. Immunol.*, pp. 1–9, 2010.
- [102] H. Kanta and C. Mohan, "Three checkpoints in lupus development: central tolerance in adaptive immunity, peripheral amplification by innate immunity and end-organ inflammation.," *Genes Immun.*, vol. 10, no. 5, pp. 390–6, Jul. 2009.
- [103] A. K. Panigrahi, N. G. Goodman, R. A. Eisenberg, M. R. Rickels, A. Najj, and E. T. Luning Prak, "RS rearrangement frequency as a marker of receptor editing in lupus and type 1 diabetes.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 13, pp. 2985–94, Dec. 2008.
- [104] R. Tisch and H. McDevitt, "Insulin-dependent diabetes mellitus.," *Cell*, vol. 85, no. 3, pp. 291–7, May 1996.
- [105] W. Gepts, "Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus.," *Diabetes*, vol. 14, no. 10, pp. 619–33, Oct. 1965.
- [106] A. K. Foulis, C. N. Liddle, M. A. Farquharson, J. A. Richmond, and R. S. Weir, "The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom.," *Diabetologia*, vol. 29, no. 5, pp. 267–74, May 1986.
- [107] J. Daaboul and D. Schatz, "Overview of prevention and intervention trials for type 1 diabetes.," *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 4, no. 4, pp. 317–23, Dec. 2003.
- [108] E. A. M. Gale, "Can we change the course of beta-cell destruction in type 1 diabetes?," *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 22, pp. 1740–2, May 2002.
- [109] B. Salvioli, M. Bovera, G. Barbara, F. De Ponti, V. Stanghellini, M. Tonini, S. Guerrini, C. Cremon, M. Degli Esposti, M. Koumandou, R. Corinaldesi, C. Sternini, and R. De Giorgio, "Neurology and neuropathology of the pancreatic innervation.," *JOP*, vol. 3, no. 2, pp. 26–33, Mar. 2002.

-
- [110] B. Ahrén, "Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease.," *Diabetologia*, vol. 43, no. 4, pp. 393–410, Apr. 2000.
- [111] Redondo M.J. and F. Gómez-Peralta, "Prediabetes y diabetes tipo 1 de reciente diagnóstico," *Biblioteca de la Sociedad Española de la Diabetes*, 2006. [Online].
- [112] M. Karvonen, M. Viik-Kajander, E. Moltchanova, I. Libman, R. LaPorte, and J. Tuomilehto, "Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group.," *Diabetes Care*, vol. 23, no. 10, pp. 1516–26, Oct. 2000.
- [113] E. A. M. Gale, "A missing link in the hygiene hypothesis?," *Diabetologia*, vol. 45, no. 4, pp. 588–94, Apr. 2002.
- [114] H. Feillet and J.-F. Bach, "On the mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes.," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 11, no. 3–4, pp. 191–4.
- [115] M. J. Redondo, L. Yu, M. Hawa, T. Mackenzie, D. A. Pyke, G. S. Eisenbarth, and R. D. Leslie, "Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States.," *Diabetologia*, vol. 44, no. 3, pp. 354–62, Mar. 2001.
- [116] A. K. Steck and M. J. Rewers, "Genetics of type 1 diabetes.," *Clin. Chem.*, vol. 57, no. 2, pp. 176–85, Feb. 2011.
- [117] T. J. Vyse and J. A. Todd, "Genetic analysis of autoimmune disease.," *Cell*, vol. 85, no. 3, pp. 311–8, May 1996.
- [118] R. Buzzetti, C. C. Quattrocchi, and L. Nisticò, "Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence.," *Diabetes. Metab. Rev.*, vol. 14, no. 2, pp. 111–28, Jun. 1998.
- [119] J. Nerup, P. Platz, O. O. Andersen, M. Christy, J. Lyngsoe, J. E. Poulsen, L. P. Ryder, L. S. Nielsen, M. Thomsen, and A. Svejgaard, "HL-A antigens and diabetes mellitus.," *Lancet*, vol. 2, no. 7885, pp. 864–6, Oct. 1974.
- [120] R. Gianani and G. S. Eisenbarth, "The stages of type 1A diabetes: 2005.," *Immunol. Rev.*, vol. 204, pp. 232–49, Apr. 2005.
- [121] J. A. Todd and L. S. Wicker, "Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models.," *Immunity*, vol. 15, no. 3, pp. 387–95, Sep. 2001.
- [122] H.-S. Jun and J.-W. Yoon, "A new look at viruses in type 1 diabetes.," *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, vol. 19, no. 1, pp. 8–31.
- [123] R. Razavi, Y. Chan, F. N. Afifiyan, X. J. Liu, X. Wan, J. Yantha, H. Tsui, L. Tang, S. Tsai, P. Santamaria, J. P. Driver, D. Serreze, M. W. Salter, and H.-M. Dosch, "TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes.," *Cell*, vol. 127, no. 6, pp. 1123–35, Dec. 2006.

- [124] M. G. von Herrath, M. Oldstone, D. Homann, and U. Christen, "Is activation of autoreactive lymphocytes always detrimental? Viral infections and regulatory circuits in autoimmunity.," *Curr. Dir. Autoimmun.*, vol. 4, pp. 91–122, Jan. 2001.
- [125] H. K. Akerblom and M. Knip, "Putative environmental factors in Type 1 diabetes.," *Diabetes. Metab. Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 31–67, Mar. 1998.
- [126] N. Itoh, T. Hanafusa, A. Miyazaki, J. Miyagawa, K. Yamagata, K. Yamamoto, M. Waguri, A. Imagawa, S. Tamura, and M. Inada, "Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients.," *J. Clin. Invest.*, vol. 92, no. 5, pp. 2313–22, Nov. 1993.
- [127] N. Somoza, F. Vargas, C. Roura-Mir, M. Vives-Pi, M. T. Fernández-Figueras, A. Ariza, R. Gomis, R. Bragado, M. Martí, D. Jaraquemada, and R. Pujol-Borrell, "Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile.," *J. Immunol.*, vol. 153, no. 3, pp. 1360–77, Aug. 1994.
- [128] X. Huang, J. Yuang, A. Goddard, A. Foulis, R. F. James, A. Lernmark, R. Pujol-Borrell, A. Rabinovitch, N. Somoza, and T. A. Stewart, "Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes.," *Diabetes*, vol. 44, no. 6, pp. 658–64, Jun. 1995.
- [129] S. Seewaldt, H. E. Thomas, M. Ejrnaes, U. Christen, T. Wolfe, E. Rodrigo, B. Coon, B. Michelsen, T. W. Kay, and M. G. von Herrath, "Virus-induced autoimmune diabetes: most beta-cells die through inflammatory cytokines and not perforin from autoreactive (anti-viral) cytotoxic T-lymphocytes.," *Diabetes*, vol. 49, no. 11, pp. 1801–9, Nov. 2000.
- [130] G. F. Bottazzo, A. Florin-Christensen, and D. Doniach, "Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies.," *Lancet*, vol. 2, no. 7892, pp. 1279–83, Nov. 1974.
- [131] M. Pietropaolo and G. S. Eisenbarth, "Autoantibodies in human diabetes.," *Curr. Dir. Autoimmun.*, vol. 4, pp. 252–82, Jan. 2001.
- [132] L. Horváth, L. Cervenak, M. Oroszlán, Z. Prohászka, K. Uray, F. Hudecz, É. Baranyi, L. Madácsy, M. Singh, L. Romics, G. Füst, and P. Pánczél, "Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus," 2002.
- [133] B. O. Roep, G. Duinkerken, G. M. Schreuder, H. Kolb, R. R. de Vries, and S. Martin, "HLA-associated inverse correlation between T cell and antibody responsiveness to islet autoantigen in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 26, no. 6, pp. 1285–9, Jun. 1996.
- [134] J. L. Chamberlain, S. J. Pittock, A.-M. Oprescu, C. Dege, M. Apiwattanakul, T. J. Kryzer, and V. A. Lennon, "Peripherin-IgG association with neurologic and endocrine autoimmunity.," *J. Autoimmun.*, vol. 34, no. 4, pp. 469–77, Jun. 2010.

- [136] M. S. Anderson and J. A. Bluestone, "The NOD mouse: a model of immune dysregulation.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 447–85, Jan. 2005.
- [137] P. E. Beales, F. Castri, A. Valiant, G. Rosignoli, L. Buckley, and P. Pozzilli, "Adrenalitis in the non-obese diabetic mouse.," *Autoimmunity*, vol. 35, no. 5, pp. 329–33, Aug. 2002.
- [138] J. P. Driver, D. V Serreze, and Y.-G. Chen, "Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease.," *Semin. Immunopathol.*, vol. 33, no. 1, pp. 67–87, Jan. 2011.
- [139] H. Acha-Orbea and H. O. McDevitt, "The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 8, pp. 2435–9, Apr. 1987.
- [140] J. Yamanouchi, D. Rainbow, P. Serra, S. Howlett, K. Hunter, V. E. S. Garner, A. Gonzalez-Munoz, J. Clark, R. Veijola, R. Cubbon, S.-L. Chen, R. Rosa, A. M. Cumiskey, D. V Serreze, S. Gregory, J. Rogers, P. A. Lyons, B. Healy, L. J. Smink, J. A. Todd, L. B. Peterson, L. S. Wicker, and P. Santamaria, "Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity.," *Nat. Genet.*, vol. 39, no. 3, pp. 329–37, Mar. 2007.
- [141] K. Asano, H. Ikegami, T. Fujisawa, M. Nishino, K. Nojima, Y. Kawabata, S. Noso, Y. Hiromine, A. Fukai, and T. Ogihara, "Molecular scanning of interleukin-21 gene and genetic susceptibility to type 1 diabetes.," *Hum. Immunol.*, vol. 68, no. 5, pp. 384–91, May 2007.
- [142] H. Ueda, J. M. M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D. B. Rainbow, K. M. D. Hunter, A. N. Smith, G. Di Genova, M. H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R. C. J. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H. E. Rance, V. Everett, L. J. Smink, A. C. Lam, H. J. Cordell, N. M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J. F. Hess, M. L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyanthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K. M. Gillespie, D. E. Undlien, K. S. Rønningen, C. Guja, C. Ionescu-Tîrgoviște, D. A. Savage, A. P. Maxwell, D. J. Carson, C. C. Patterson, J. A. Franklyn, D. G. Clayton, L. B. Peterson, L. S. Wicker, J. A. Todd, and S. C. L. Gough, "Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease.," *Nature*, vol. 423, no. 6939, pp. 506–11, May 2003.
- [143] M. Prochazka, D. V Serreze, W. N. Frankel, and E. H. Leiter, "NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice.," *Diabetes*, vol. 41, no. 1, pp. 98–106, Jan. 1992.
- [144] D. V Serreze, E. H. Leiter, G. J. Christianson, D. Greiner, and D. C. Roopenian, "Major histocompatibility complex class I-deficient NOD-B2mnull mice are diabetes and insulinitis resistant.," *Diabetes*, vol. 43, no. 3, pp. 505–9, Mar. 1994.
- [145] H. Yagi, M. Matsumoto, K. Kunimoto, J. Kawaguchi, S. Makino, and M. Harada, "Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 22, no. 9, pp. 2387–93, Sep. 1992.

- [146] Y. Yang and P. Santamaria, "T-cell receptor-transgenic NOD mice: a reductionist approach to understand autoimmune diabetes.," *J. Autoimmun.*, vol. 22, no. 2, pp. 121–9, Mar. 2004.
- [147] S. W. Christianson, L. D. Shultz, and E. H. Leiter, "Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors.," *Diabetes*, vol. 42, no. 1, pp. 44–55, Jan. 1993.
- [148] K. Haskins and M. McDuffie, "Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone.," *Science*, vol. 249, no. 4975, pp. 1433–6, Sep. 1990.
- [149] J. Katz, C. Benoist, and D. Mathis, "Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulinitis in non-obese diabetic mice.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, no. 12, pp. 3358–60, Dec. 1993.
- [150] L. S. Wicker, E. H. Leiter, J. A. Todd, R. J. Renjilian, E. Peterson, P. A. Fischer, P. L. Podolin, M. Zijlstra, R. Jaenisch, and L. B. Peterson, "Beta 2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes.," *Diabetes*, vol. 43, no. 3, pp. 500–4, Mar. 1994.
- [151] P. Santamaria, "Effector lymphocytes in autoimmunity.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 13, no. 6, pp. 663–9, Dec. 2001.
- [152] A. Jansen, F. Homo-Delarche, H. Hooijkaas, P. J. Leenen, M. Dardenne, and H. A. Drexhage, "Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice.," *Diabetes*, vol. 43, no. 5, pp. 667–675, May 1994.
- [153] S. Durant, S. Geutskens, S. C. A. Van Blokland, J. Coulaud, V. Alves, J.-M. Pleau, M. Versnel, H. A. Drexhage, and F. Homo-Delarche, "Proapoptosis and antiapoptosis-related molecules during postnatal pancreas development in control and nonobese diabetic mice: relationship with innervation.," *Lab. Invest.*, vol. 83, no. 2, pp. 227–39, Feb. 2003.
- [154] H. S. Jun, C. S. Yoon, L. Zbytniuk, N. van Rooijen, and J. W. Yoon, "The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 2, pp. 347–58, Jan. 1999.
- [155] F. Saravia and F. Homo-Delarche, "Is innervation an early target in autoimmune diabetes?," *Trends Immunol.*, vol. 24, no. 11, pp. 574–9, Nov. 2003.
- [156] S. Winer, H. Tsui, A. Lau, A. Song, X. Li, R. K. Cheung, A. Sampson, F. Afifiyan, A. Elford, G. Jackowski, D. J. Becker, P. Santamaria, P. Ohashi, and H.-M. Dosch, "Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive.," *Nat. Med.*, vol. 9, no. 2, pp. 198–205, Feb. 2003.
- [157] J. G. M. Rosmalen, P. J. M. Leenen, C. Pelegri, H. A. Drexhage, and F. Homo-Delarche, "Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 13, no. 5, pp. 209–14, Jul. 2002.

- [158] D. V Serreze, S. A. Fleming, H. D. Chapman, S. D. Richard, E. H. Leiter, and R. M. Tisch, "B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice.," *J. Immunol.*, vol. 161, no. 8, pp. 3912–8, Oct. 1998.
- [159] D. V Serreze, H. D. Chapman, D. S. Varnum, M. S. Hanson, P. C. Reifsnyder, S. D. Richard, S. A. Fleming, E. H. Leiter, and L. D. Shultz, "B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new 'speed congenic' stock of NOD.Ig mu null mice.," *J. Exp. Med.*, vol. 184, no. 5, pp. 2049–53, Nov. 1996.
- [160] F. Waldron-Lynch and K. C. Herold, "Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic β -cell function in type 1 diabetes.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 6, pp. 439–52, Jun. 2011.
- [161] L. Yu, G. Eisenbarth, E. Bonifacio, J. Thomas, M. Atkinson, and C. Wasserfall, "The second murine autoantibody workshop: remarkable interlaboratory concordance for radiobinding assays to identify insulin autoantibodies in nonobese diabetic mice.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1005, pp. 1–12, Nov. 2003.
- [162] E. Bonifacio, M. Atkinson, G. Eisenbarth, D. Serreze, T. W. Kay, E. Lee-Chan, and B. Singh, "International Workshop on Lessons From Animal Models for Human Type 1 Diabetes: identification of insulin but not glutamic acid decarboxylase or IA-2 as specific autoantigens of humoral autoimmunity in nonobese diabetic mice.," *Diabetes*, vol. 50, no. 11, pp. 2451–8, Nov. 2001.
- [163] S. M. Lieberman and T. P. DiLorenzo, "A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes.," *Tissue Antigens*, vol. 62, no. 5, pp. 359–77, Nov. 2003.
- [164] D. G. Alleva, P. D. Crowe, L. Jin, W. W. Kwok, N. Ling, M. Gottschalk, P. J. Conlon, P. A. Gottlieb, A. L. Putnam, and A. Gaur, "A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin.," *J. Clin. Invest.*, vol. 107, no. 2, pp. 173–80, Jan. 2001.
- [165] C. C. Chao, H. K. Sytwu, E. L. Chen, J. Toma, and H. O. McDevitt, "The role of MHC class II molecules in susceptibility to type I diabetes: identification of peptide epitopes and characterization of the T cell repertoire.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 16, pp. 9299–304, Aug. 1999.
- [166] K. W. Wucherpennig, "Insights into autoimmunity gained from structural analysis of MHC-peptide complexes.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 13, no. 6, pp. 650–6, Dec. 2001.
- [167] M. C. Puertas, J. Carrillo, X. Pastor, R. M. Ampudia, R. Planas, A. Alba, R. Bruno, R. Pujol-Borrell, J. M. Estanyol, M. Vives-Pi, and J. Verdaguer, "Peripherin is a relevant neuroendocrine autoantigen recognized by islet-infiltrating B lymphocytes.," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 10, pp. 6533–9, May 2007.
- [168] N. M. Le Douarin, "On the origin of pancreatic endocrine cells.," *Cell*, vol. 53, no. 2, pp. 169–71, Apr. 1988.
- [169] M. Ecurat, K. Djabali, C. Huc, F. Landon, C. Bécourt, C. Boitard, F. Gros, and M. M. Portier, "Origin of the beta cells of the islets of Langerhans is further questioned by the

- expression of neuronal intermediate filament proteins, peripherin and NF-L, in the rat insulinoma RIN5F cell line.," *Dev. Neurosci.*, vol. 13, no. 6, pp. 424–32, Jan. 1991.
- [170] F. Saravia-Fernandez, C. Faveeuw, C. Blasquez-Bulant, M. Tappaz, M. Throsby, G. Pelletier, H. Vaudry, M. Dardenne, and F. Homo-Delarche, "Localization of gamma-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in the pancreas of the nonobese diabetic mouse.," *Endocrinology*, vol. 137, no. 8, pp. 3497–506, Aug. 1996.
- [171] H. Noorchashm, N. Noorchashm, J. Kern, S. Y. Rostami, C. F. Barker, and A. Najj, "B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice.," *Diabetes*, vol. 46, no. 6, pp. 941–6, Jun. 1997.
- [172] S. A. W. Greeley, M. Katsumata, L. Yu, G. S. Eisenbarth, D. J. Moore, H. Goodarzi, C. F. Barker, A. Najj, and H. Noorchashm, "Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice.," *Nat. Med.*, vol. 8, no. 4, pp. 399–402, Apr. 2002.
- [173] K. Koczwar, E. Bonifacio, and A.-G. Ziegler, "Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with type 1 diabetes.," *Diabetes*, vol. 53, no. 1, pp. 1–4, Jan. 2004.
- [174] M. Falcone, J. Lee, G. Patstone, B. Yeung, and N. Sarvetnick, "B lymphocytes are crucial antigen-presenting cells in the pathogenic autoimmune response to GAD65 antigen in nonobese diabetic mice.," *J. Immunol.*, vol. 161, no. 3, pp. 1163–8, Aug. 1998.
- [175] W. Wheat, R. Kupfer, D. G. Gutches, G. R. Rayat, J. Beilke, R. I. Scheinman, and D. R. Wegmann, "Increased NF-kappa B activity in B cells and bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, no. 5, pp. 1395–404, May 2004.
- [176] H. Noorchashm, Y. K. Lieu, N. Noorchashm, S. Y. Rostami, S. A. Greeley, A. Schlachterman, H. K. Song, L. E. Noto, A. M. Jevnikar, C. F. Barker, and A. Najj, "I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice.," *J. Immunol.*, vol. 163, no. 2, pp. 743–50, Jul. 1999.
- [177] H. Noorchashm, D. J. Moore, Y. K. Lieu, N. Noorchashm, A. Schlachterman, H. K. Song, C. F. Barker, and A. Najj, "Contribution of the innate immune system to autoimmune diabetes: a role for the CR1/CR2 complement receptors.," *Cell. Immunol.*, vol. 195, no. 1, pp. 75–9, Jul. 1999.
- [178] E. Mariño, M. Batten, J. Groom, S. Walters, D. Liuwantara, F. Mackay, and S. T. Grey, "Marginal-zone B-cells of nonobese diabetic mice expand with diabetes onset, invade the pancreatic lymph nodes, and present autoantigen to diabetogenic T-cells.," *Diabetes*, vol. 57, no. 2, pp. 395–404, Feb. 2008.
- [179] P. L. Kendall, E. J. Woodward, C. Hulbert, and J. W. Thomas, "Peritoneal B cells govern the outcome of diabetes in non-obese diabetic mice.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 34, no. 9, pp. 2387–95, Sep. 2004.

- [180] J. Tian, D. Zekzer, Y. Lu, H. Dang, and D. L. Kaufman, "B cells are crucial for determinant spreading of T cell autoimmunity among beta cell antigens in diabetes-prone nonobese diabetic mice.," *J. Immunol.*, vol. 176, no. 4, pp. 2654–61, Feb. 2006.
- [181] M.-C. Gagnerault, J. J. Luan, C. Lotton, and F. Lepault, "Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice.," *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 3, pp. 369–77, Aug. 2002.
- [182] S. A. Greeley, D. J. Moore, H. Noorchashm, L. E. Noto, S. Y. Rostami, A. Schlachterman, H. K. Song, B. Koeberlein, C. F. Barker, and A. Najj, "Impaired activation of islet-reactive CD4 T cells in pancreatic lymph nodes of B cell-deficient nonobese diabetic mice.," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 8, pp. 4351–7, Oct. 2001.
- [183] P. L. Kendall, G. Yu, E. J. Woodward, and J. W. Thomas, "Tertiary lymphoid structures in the pancreas promote selection of B lymphocytes in autoimmune diabetes.," *J. Immunol.*, vol. 178, no. 9, pp. 5643–51, May 2007.
- [184] C. Hulbert, B. Riseili, M. Rojas, and J. W. Thomas, "B cell specificity contributes to the outcome of diabetes in nonobese diabetic mice.," *J. Immunol.*, vol. 167, no. 10, pp. 5535–8, Nov. 2001.
- [185] P. A. Silveira, E. Johnson, H. D. Chapman, T. Bui, R. M. Tisch, and D. V. Serreze, "The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 32, no. 12, pp. 3657–66, Dec. 2002.
- [186] A. Lanzavecchia, "Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 8, pp. 773–93, Jan. 1990.
- [187] G. M. Brodie, M. Wallberg, P. Santamaria, F. S. Wong, and E. A. Green, "B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes.," *Diabetes*, vol. 57, no. 4, pp. 909–17, Apr. 2008.
- [188] C. A. Acevedo-Suárez, C. Hulbert, E. J. Woodward, and J. W. Thomas, "Uncoupling of anergy from developmental arrest in anti-insulin B cells supports the development of autoimmune diabetes.," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 2, pp. 827–33, Jan. 2005.
- [189] A. I. Ziegler, M. A. Le Page, M. J. Maxwell, J. Stolp, H. Guo, A. Jayasimhan, M. L. Hibbs, P. Santamaria, J. F. Miller, M. Plebanski, P. A. Silveira, and R. M. Slattery, "The CD19 signalling molecule is elevated in NOD mice and controls type 1 diabetes development.," *Diabetologia*, vol. 56, no. 12, pp. 2659–68, Dec. 2013.
- [190] M. G. McHeyzer-Williams, G. J. Nossal, and P. A. Lalor, "Molecular characterization of single memory B cells.," *Nature*, vol. 350, no. 6318, pp. 502–5, Apr. 1991.
- [191] L. J. McHeyzer-Williams, M. Cool, and M. G. McHeyzer-Williams, "Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory b cell compartment.," *J. Exp. Med.*, vol. 191, no. 7, pp. 1149–66, Apr. 2000.

- [192] P. A. Lalor, G. J. Nossal, R. D. Sanderson, and M. G. McHeyzer-Williams, "Functional and molecular characterization of single, (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)-specific, IgG1+ B cells from antibody-secreting and memory B cell pathways in the C57BL/6 immune response to NP.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 22, no. 11, pp. 3001–11, Nov. 1992.
- [193] E. J. Blink, A. Light, A. Kallies, S. L. Nutt, P. D. Hodgkin, and D. M. Tarlinton, "Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization.," *J. Exp. Med.*, vol. 201, no. 4, pp. 545–54, Feb. 2005.
- [194] Y. Tokimitsu, H. Kishi, S. Kondo, R. Honda, K. Tajiri, K. Motoki, T. Ozawa, S. Kadowaki, T. Obata, S. Fujiki, C. Tateno, H. Takaishi, K. Chayama, K. Yoshizato, E. Tamiya, T. Sugiyama, and A. Muraguchi, "Single lymphocyte analysis with a microwell array chip.," *Cytometry. A*, vol. 71, no. 12, pp. 1003–10, Dec. 2007.
- [195] K. Tajiri, H. Kishi, Y. Tokimitsu, S. Kondo, T. Ozawa, K. Kinoshita, A. Jin, S. Kadowaki, T. Sugiyama, and A. Muraguchi, "Cell-microarray analysis of antigen-specific B-cells: single cell analysis of antigen receptor expression and specificity.," *Cytometry. A*, vol. 71, no. 11, pp. 961–7, Nov. 2007.
- [196] V. P. Doucett, W. Gerhard, K. Owler, D. Curry, L. Brown, and N. Baumgarth, "Enumeration and characterization of virus-specific B cells by multicolor flow cytometry.," *J. Immunol. Methods*, vol. 303, no. 1–2, pp. 40–52, Aug. 2005.
- [197] J. Newman, J. S. Rice, C. Wang, S. L. Harris, and B. Diamond, "Identification of an antigen-specific B cell population," vol. 272, pp. 177–187, 2003.
- [198] A. M. Jacobi, J. Zhang, M. Mackay, C. Aranow, and B. Diamond, "Phenotypic characterization of autoreactive B cells--checkpoints of B cell tolerance in patients with systemic lupus erythematosus.," *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. e5776, Jan. 2009.
- [199] K. Hayakawa, R. Ishii, K. Yamasaki, T. Kishimoto, and R. R. Hardy, "Isolation of high-affinity memory B cells: phycoerythrin as a probe for antigen-binding cells.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 5, pp. 1379–83, Mar. 1987.
- [200] S. E. Townsend, C. C. Goodnow, and R. J. Cornall, "Single epitope multiple staining to detect ultralow frequency B cells.," *J. Immunol. Methods*, vol. 249, no. 1–2, pp. 137–46, Mar. 2001.
- [201] F. Landon, M. Lemonnier, R. Benarous, C. Huc, M. Fizman, F. Gros, and M. M. Portier, "Multiple mRNAs encode peripherin, a neuronal intermediate filament protein.," *EMBO J.*, vol. 8, no. 6, pp. 1719–26, Jun. 1989.
- [202] F. Gros-Louis, R. Larivière, G. Gowing, S. Laurent, W. Camu, J.-P. Bouchard, V. Meininger, G. A. Rouleau, and J.-P. Julien, "A frameshift deletion in peripherin gene associated with amyotrophic lateral sclerosis.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 44, pp. 45951–6, Oct. 2004.
- [203] F. Landon, A. Wolff, and B. de Néchaud, "Mouse peripherin isoforms.," *Biol. Cell*, vol. 92, no. 6, pp. 397–407, Sep. 2000.

- [204] C. Boitard, M. C. Villa, C. Becourt, H. P. Gia, C. Huc, P. Sempe, M. M. Portier, and J. F. Bach, "Peripherin: an islet antigen that is cross-reactive with nonobese diabetic mouse class II gene products.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, no. 1, pp. 172–6, Jan. 1992.
- [205] D. L. Kaufman, M. Clare-Salzler, J. Tian, T. Forsthuber, G. S. Ting, P. Robinson, M. A. Atkinson, E. E. Sercarz, A. J. Tobin, and P. V. Lehmann, "Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes.," *Nature*, vol. 366, no. 6450, pp. 69–72, Nov. 1993.
- [206] A. Muir, D. Schatz, and N. Maclaren, "Antigen-specific immunotherapy: oral tolerance and subcutaneous immunization in the treatment of insulin-dependent diabetes.," *Diabetes. Metab. Rev.*, vol. 9, no. 4, pp. 279–87, Dec. 1993.
- [207] R. Tisch, X. D. Yang, R. S. Liblau, and H. O. McDevitt, "Administering glutamic acid decarboxylase to NOD mice prevents diabetes.," *J. Autoimmun.*, vol. 7, no. 6, pp. 845–50, Dec. 1994.
- [208] J. Carrillo, M. Carmen, R. Planas, X. Pastor, A. Alba, T. Stratmann, R. Pujol-borrell, R. Maria, M. Vives-pi, and J. Verdaguer, "Anti-peripherin B lymphocytes are positively selected during diabetogenesis," vol. 45, pp. 3152–3162, 2008.
- [209] J. A. Schroer, T. Bender, R. J. Feldmann, and K. J. Kim, "Mapping epitopes on the insulin molecule using monoclonal antibodies.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 13, no. 9, pp. 693–700, Sep. 1983.
- [210] C. J. Padoa, N. J. Crowther, J. W. Thomas, T. R. Hall, L. M. Bekris, C. Torn, M. Landin-Olsson, E. Ortqvist, J. P. Palmer, A. Lernmark, and C. S. Hampe, "Epitope analysis of insulin autoantibodies using recombinant Fab.," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 140, no. 3, pp. 564–71, Jun. 2005.
- [211] V. Lampasona, M. Bearzatto, S. Genovese, E. Bosi, M. Ferrari, and E. Bonifacio, "Autoantibodies in insulin-dependent diabetes recognize distinct cytoplasmic domains of the protein tyrosine phosphatase-like IA-2 autoantigen.," *J. Immunol.*, vol. 157, no. 6, pp. 2707–11, Sep. 1996.
- [212] H. L. Schwartz, J. M. Chandonia, S. F. Kash, J. Kanaani, E. Tunnell, A. Domingo, F. E. Cohen, J. P. Banga, A. M. Madec, W. Richter, and S. Baekkeskov, "High-resolution autoreactive epitope mapping and structural modeling of the 65 kDa form of human glutamic acid decarboxylase.," *J. Mol. Biol.*, vol. 287, no. 5, pp. 983–99, Apr. 1999.
- [213] R. Tisch, X. D. Yang, S. M. Singer, R. S. Liblau, L. Fugger, and H. O. McDevitt, "Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice.," *Nature*, vol. 366, no. 6450, pp. 72–5, Nov. 1993.
- [214] C. M. Grimaldi, J. Cleary, A. S. Dagtas, D. Moussai, and B. Diamond, "Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation," vol. 109, no. 12, pp. 1625–1633, 2002.
- [215] A. Strom, B. Sonier, H. D. Chapman, M. Mojibian, G.-S. Wang, C. R. Slatculescu, D. V. Serreze, and F. W. Scott, "Peripherin-reactive antibodies in mouse, rabbit, and human blood.," *J. Proteome Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 1203–8, Mar. 2010.

-
- [216] E. Sterneck, D. R. Kaplan, and P. F. Johnson, "Interleukin-6 induces expression of peripherin and cooperates with Trk receptor signaling to promote neuronal differentiation in PC12 cells.," *J. Neurochem.*, vol. 67, no. 4, pp. 1365–74, Oct. 1996.
- [217] C. M. Troy, N. A. Muma, L. A. Greene, D. L. Price, and M. L. Shelanski, "Regulation of peripherin and neurofilament expression in regenerating rat motor neurons.," *Brain Res.*, vol. 529, no. 1–2, pp. 232–8, Oct. 1990.
- [218] M. B. Litinskiy, B. Nardelli, D. M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali, and A. Cerutti, "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL.," *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 9, pp. 822–9, Sep. 2002.
- [219] S. Avrameas, "Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'.," *Immunol. Today*, vol. 12, no. 5, pp. 154–9, May 1991.
- [220] G. Dighiero, B. Guilbert, and S. Avrameas, "Naturally occurring antibodies against nine common antigens in humans sera. II. High incidence of monoclonal Ig exhibiting antibody activity against actin and tubulin and sharing antibody specificities with natural antibodies.," *J. Immunol.*, vol. 128, no. 6, pp. 2788–92, Jun. 1982.
- [221] B. A. O'Brien, Y. Huang, X. Geng, J. P. Dutz, and D. T. Finegood, "Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced.," *Diabetes*, vol. 51, no. 8, pp. 2481–8, Aug. 2002.
- [222] H. Kita, X.-S. He, and M. E. Gershwin, "Application of tetramer technology in studies on autoimmune diseases.," *Autoimmun. Rev.*, vol. 2, no. 1, pp. 43–9, Jan. 2003.
- [223] J. Rangel-Moreno, J. E. Moyron-Quiroz, D. M. Carragher, K. Kusser, L. Hartson, A. Moquin, and T. D. Randall, "Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens.," *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 731–43, May 2009.

IX.ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

| | |
|--|---|
| aa: aminoácidos | MCS: <i>Multiple Cloning Site</i> |
| AEC: 3-amino-9-etilcarbazol | MZ: Linfocitos B marginales |
| A^{g7}: MHC II expresado en ratón NOD | NOD/LtJ: <i>Non-obese diabetic mouse</i> |
| A^{g7}/PRPH8.3Ct: octámeros de PRPH8.3 | NOR: <i>Non-obese resistant mouse</i> |
| APC: <i>Allophycocyanin</i> | ON: Overnight |
| APC-Cy7 : <i>Allophycocyanin Cyanine 7</i> | OPD: o-phenylenediamine |
| BCA: <i>Bicinchoninic acid</i> | PBS: Tampón fosfato salino |
| BCR: Receptor de antígeno de células B | PCR: Reacción en cadena de la polimerasa |
| BSA: albúmina sérica bovina | PE: Phycoerithrin |
| cDNA: DNA complementario a la cadena de RNA mensajero | PE-Cy5: Phycoerithrin Cyanine 5 |
| DNA: Ácido desoxiribonucleico | PI: Propidium Iodide |
| dNTPs: Deoxinucleótido trifosfato | PRPH: Periferina |
| DTT: Ditiotreitól | TA: Temperatura ambiente |
| ECL: <i>enhanced luminol-based chemiluminescent substrate</i> | SA: estreptoavidina |
| ELISA : <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> | SDS: Dodecil sulfato sódico |
| ELISPOT: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent SPOT</i> | SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico |
| FCS: Suero fetal bovino | SPF: <i>Specific Pathogen Free</i> |
| FITC: <i>Fluorescein</i> | T1: Linfocitos B transicionales tipo1 |
| FO: Linfocitos B foliculares | T2: Linfocitos B transicionales tipo2 |
| GST: Glutathion S-transferasa | DT1: Diabetes tipo 1 |
| HBSS: <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> | Tampón FACs: PBS 2% FCS |
| HRP: <i>Horseradish peroxidase</i> | Tampón TBS: Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM |
| Ig: Inmunoglobulina | WB: <i>Western blot</i> |
| IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido | |
| LPS: Lipopolisacárido | |
| mAb: <i>monoclonal antibody</i> | |
| MHC II: <i>Major Histocompatibility Complex class II</i> | |

X. ANEXO

CONTRIBUCIONES

La construcción y generación de proteínas recombinantes de A^{g7} publicadas en esta tesis, proceden del trabajo de investigación de máster realizado por Luis Raimón Álvarez Fortuny, con el título: “Estudio del reconocimiento de anticuerpos anti-periferina”. Máster oficial en Inmunología UB-UAB. Promoción 2007-2008.

ARTÍCULO

The Journal of Immunology

In Vivo Detection of Peripherin-Specific Autoreactive B Cells during Type 1 Diabetes Pathogenesis

Nahir Garabatos,* Raimon Alvarez,* Jorge Carrillo,† Jorge Carrascal,† Cristina Izquierdo,* Harold D. Chapman,‡ Maximiliano Presa,* Conchi Mora,† David V. Serreze,‡ Joan Verdager,† and Thomas Stratmann*

Autoreactive B cells are essential for the pathogenesis of type 1 diabetes. The genesis and dynamics of autoreactive B cells remain unknown. In this study, we analyzed the immune response in the NOD mouse model to the neuronal protein peripherin (PRPH), a target Ag of islet-infiltrating B cells. PRPH autoreactive B cells recognized a single linear epitope of this protein, in contrast to the multiple epitope recognition commonly observed during autoreactive B cell responses. Autoantibodies to this epitope were also detected in the disease-resistant NOR and C57BL/6 strains. To specifically detect the accumulation of these B cells, we developed a novel approach, octameric peptide display, to follow the dynamics and localization of anti-PRPH B cells during disease progression. Before extended insulinitis was established, anti-PRPH B cells preferentially accumulated in the peritoneum. Anti-PRPH B cells were likewise detected in C57BL/6 mice, albeit at lower frequencies. As disease unfolded in NOD mice, anti-PRPH B cells invaded the islets and increased in number at the peritoneum of diabetic but not prediabetic mice. Isotype-switched B cells were only detected in the peritoneum. Anti-PRPH B cells represent a heterogeneous population composed of both B1 and B2 subsets. In the spleen, anti-PRPH B cell were predominantly in the follicular subset. Therefore, anti-PRPH B cells represent a heterogeneous population that is generated early in life but proliferates as diabetes is established. These findings on the temporal and spatial progression of autoreactive B cells should be relevant for our understanding of B cell function in diabetes pathogenesis. *The Journal of Immunology*, 2014, 192: 3080–3090.

B cells are important components of the immune system that assure adequate defense against pathogens in vertebrates. However, their dysregulation can cause autoimmune diseases, being well documented, for example, in the case of lupus erythematosus where the generation of autoantibodies is the primary cause leading to pathology (1). B cells are also implied in autoimmune diseases such as type 1 diabetes (T1D) that has long been thought to be primarily dictated by autoreactive T cells that infiltrate pancreatic islets and selectively destroy insulin-producing β cells (2, 3). In NOD mice, to date one of the best murine models to study the natural pathogenesis of T1D without the necessity of

artificial manipulation, the disease is highly dependent on the presence of B cells, as it is prevented through their elimination by homozygous disruption of membrane Ig- μ (4, 5).

How exactly B cells contribute to the pathogenesis of T1D is still an unsolved question. Ag specificity is key in this process. The reintroduction of transgenes encoding for a BCR that recognizes the xenoantigen hen egg lysozyme into the NOD. $\mu^{-/-}$ background does not restore diabetes in these mice (6); however, the presence of a transgenic insulin-reactive BCR not only restores T1D but even accelerates it (7). The genesis of autoreactive B cells, their tissue distribution, as well as the exact site where they might impinge on autoreactive T cell activation have remained unknown. It is uncertain whether autoreactive B cells play a role in the initiation of the disease and are implicated in early T cell activation and proliferation, for example, in the pancreatic draining lymph nodes (LNs), or whether they are rather instrumental in the final steps of β cell destruction in the islets (8). It has been difficult to track these cells in vivo in wild-type animals owing to their presumed low frequencies and their low BCR affinities to cognate Ags. Thus, studies of these cells have been confined essentially to BCR transgenic mice.

A recent approach to assess the Ag specificities of B cells that might be implicated in T1D has been the generation of hybridomas using B cells present within infiltrated pancreatic islets of NOD mice and related insulinitis-prone strains. About half of the B cell hybrids generated in this study recognized the peripheral nervous tissue (9). It was subsequently suggested that all neuronal-reactive B cells recognized the C-terminal portion of peripherin (PRPH), a cytoskeleton class III intermediate filament protein expressed in neuroendocrine tissues (10). These findings confirmed previous observations of anti-PRPH Abs in NOD mice (11, 12). In humans, anti-PRPH Abs were detected in patients with autoimmune neuropathies and endocrinopathies, but not in T1D patients without

*Department of Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; †Immunology Unit, Department of Experimental Medicine, School of Medicine, University of Lleida and the Institute of Biomedical Research Lleida, 25008 Lleida, Spain; and ‡The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME 04609

Received for publication April 18, 2013. Accepted for publication January 30, 2014.

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation and by European Regional Development funds (Grants SAF2004-02666, SAF2007-65291, SAF2010-18548, SAF2011-29319, and the Ramon y Cajal Program to T.S.; Grant SAF-2006-06970 to J.V.; and Grants PI041310, SAF2006-07757, and SAF2007-31050-E to C.M.) and a Marie Curie action grant (Grant MIRG-2004-12962 to T.S.). N.G. and J.C. were supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN BES-2008-002074 to N.G. and BES-2007-15221 to J.C.). D.V.S. is supported by National Institutes of Health Grants DK46266 and DK95735, as well as by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation and the American Diabetes Association. J.V. and C.M. are associate professors of the Serra-Hunter Program, Catalan Government.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Thomas Stratmann, Department of Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, Diagonal 643, 3^o, 08028 Barcelona, Spain. E-mail address: thomas.stratmann@ub.edu

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: GPI, glucose-6-phosphate isomerase; LN, lymph node; MZ, marginal zone; PRPH, peripherin; T1D, type 1 diabetes.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1301053

accompanying neurologic disorders or in healthy subjects (13). A different group found anti-PRPH Abs in humans and animals independent of T1D; however, the authors reported increased serum titers in the NOD strain compared with other, diabetes-resistant mouse strains (14).

Murine PRPH is expressed in at least four different isoforms of 61, 58, and 56 kDa (hereafter termed PRPH 61, PRPH 58, and PRPH 56, respectively) and 45 kDa (15, 16). With a single exception, in the study of Verdaguer and colleagues (10) all anti-PRPH B cell hybridomas originating from islet-infiltrating B cells from NOD and related mouse strains recognize PRPH 61 and PRPH 58, but not PRPH 56. All three isoforms are composed of an N-terminal head, a central rod, as well as a C-terminal tail sequence. Whereas PRPH 61 and PRPH 58 share an identical tail sequence, replacement of the last 21 aa by an alternate eight-residue sequence is characteristic for PRPH 56. Apart from this variation, PRPH 58 and PRPH 56 are identical in their sequences. In combination, these data suggested, but did not definitively demonstrate, that the recognized epitope was either entirely or partially located in the C-terminal tail sequence of PRPH 61 and 58.

In this study, we have identified the epitope recognized by PRPH-specific, islet-infiltrating B cells. We show that the anti-PRPH B cell response is essentially confined to a single linear epitope in NOD mice. Using a novel approach, that is, the octameric display of this epitope, we have tracked anti-PRPH B cells and show that these cells segregate into different subpopulations in a tissue-specific manner. Surprisingly, anti-PRPH B cells preferentially accumulate in the peritoneal cavity even before insulinitis is initiated and further increase in frequency especially in diabetic animals, in parallel with their penetration into the islets. These findings set the basis to further study peritoneal B cells, as they might be implicated in diabetes pathogenesis. The octamer approach should provide a valuable tool to search for additional B cell specificities in diabetes pathogenesis.

Materials and Methods

Reagents

For molecular cloning, enzymes were obtained from Fermentas (Madrid, Spain). Protein purification was performed using Ni-NTA-Sepharose and glutathione-Sepharose obtained from Amersham Biosciences (Barcelona, Spain). All Abs were purchased from BioLegend (San Diego, CA), Invitrogen (Barcelona, Spain), or BD Pharmingen (San Diego, CA). Streptavidin-PE and -allophycocyanin were obtained from Columbia Biosciences (Columbia, MD). Cell culture media were obtained from Lonza (Barcelona, Spain). Peptides PRPH₁₇₅₋₄₉₁ and PRPH₄₃₅₋₄₄₉ generated by Fmoc solid-phase synthesis exceeded 95% purity and were obtained from GL Biochem (Shanghai, China). Unless otherwise mentioned, all other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Mice and immunizations

NOD/LtJ and NOR mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and further bred in our specific pathogen-free animal facilities. C57BL/6 mice were obtained from Charles River Laboratories (Spain).

To test the humoral or cellular B cell response to PRPH, NOD/LtJ mice were immunized i.p. or s.c. at 6–12 wk of age with 100 µg recombinant PRPH₄₂₉₋₅₀₇ emulsified in CFA (Sigma-Aldrich) or CFA only as a control.

Generation of recombinant PRPH peptides

The cDNA encoding PRPH 61 was amplified by PCR to generate recombinant peptides as indicated (Fig. 1, Table I). Peptides were cloned into a modified pGEX vector (pAK1) (17) between the NcoI and XbaI sites. The final constructs coded for an N-terminal GST portion fused to the peptide and an extended C-terminal hexahistidine tail. Recombinant peptides were expressed in *Escherichia coli* strain BL21. Unless otherwise specified, recombinant fragments were purified in principle by sequential affinity chromatography using glutathione-Sepharose followed by Ni-

NTA-Sepharose as published (18). Purified protein was stored in PBS under addition of 150 mM NaCl at -80°C .

Generation of A^β/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers

A detailed procedure for the generation of A^β/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers will be published elsewhere (N.G., M.P., C.M., J.V. and T.S., manuscript in preparation). In brief, soluble A^β molecules tethered to the N-terminal glucose-6-phosphate isomerase (GPI) peptide 282–292 (A^β/GPI) (19) were used as scaffold for the expression and presentation of peptide PRPH₄₆₇₋₅₀₇. The α- and β-chains of A^β were modified C-terminally by addition of PRPH₄₆₇₋₅₀₇, followed by the extended hexahistidine tail as for the GST fusion proteins. The α-chain was further modified by inserting a site-specific biotinylation sequence no. 85 (20) between the PRPH and the hexahistidine tail. Constructs were transfected into *Drosophila melanogaster*-derived SC2 cells along with a vector conferring puromycin resistance. Protein was expressed using stable cell lines and purified from culture supernatants by metal chelate chromatography, followed by size exclusion chromatography as published (21, 22). Purified protein was biotinylated using the BirA enzyme as published (19). Biotinylation was measured by immunodepletion on avidin-coated agarose beads (Pierce, Rockford, IL), followed by SDS-PAGE analysis. A^β/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers were generated by incubation of the modified A^β dimers with PE- or allophycocyanin-labeled streptavidin in a 5:1 molar ratio.

Islet isolation

Pancreatic islets from NOD females were isolated using a collagenase infusion method (23) and further handpicked into HBSS under a dissecting microscope before overnight culture.

Cell staining and flow cytometry analysis

Single-cell suspensions of spleen, bone marrow, and LNs were generated by mechanical disruption of the corresponding organs in PBS/2% FCS. Peritoneal cells were obtained by flushing the peritoneal cavity with cold solution of PBS/2% FCS. Erythrocytes were removed by lysis. Ag-specific B cell analysis was carried out using PE- or allophycocyanin-labeled A^β/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers or A^β/GPI tetramers as negative control. Cells were incubated with octamers at a final concentration of 8.5 µg/ml in FACS buffer (PBS/5% FCS) for 15 min on ice. For inhibition studies, A^β/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers were preincubated overnight with mAb 228 E1 at 4°C before cell staining (10). For PRPH_C B cell distribution studies and costaining of additional cell surface markers of islet-resident B cells, FITC-labeled anti-B220 or CD19 as well as PE-Cy5-labeled anti-CD3, anti-CD11c, and anti-F4/80 (dump channel) were used. Exclusion of dead cells was done by addition of 5 µg/ml propidium iodide immediately before acquisition. For activation marker analysis, cells were costained using A^β/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers labeled with allophycocyanin as well as with PE (double staining approach) as mentioned above; however, allophycocyanin-Cy7-labeled anti-CD19, Pacific Blue-labeled anti-CD86, or anti-CD44 were used in addition to the mentioned PE-Cy5-labeled Abs for the dump channel. Follicular/marginal zone (MZ) and IgM/IgD PRPH_C B cell phenotype analysis was carried out by the octamer double staining approach together with FITC-labeled anti-CD21 or anti-IgM, Pacific Blue-labeled anti-CD21, or anti-IgD as well as allophycocyanin-Cy7-labeled anti-CD19 and PE-Cy5-labeled anti-CD3, anti-CD11c, and anti-F4/80 anti-CD3 and propidium iodide. Data acquisition was performed using FACScan, FACSCalibur, FACSCanto II, and LSR II instruments (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA). Data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

B cell isolation and activation

B cells were isolated from the respective organs and purified to 97% by positive selection using anti-CD19 Ab-coated MACS MicroBeads according to the manufacturer's specifications (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany). Peritoneal cells were enriched for B cells by removal of adherent cells through incubation during 2 h at 37°C in complete RPMI 1640 media containing 10% FCS, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 50 µM 2-ME. Purity of CD19⁺ lymphocytes was >80%. Pancreatic islets were isolated by collagenase digestion of perfused pancreata as described (24).

For activation, enriched total CD19⁺ B cells and pancreatic islets were resuspended in complete RPMI 1640 media. B cells were cultured at a density of 5×10^5 cells/well in 24-well plates in 1 ml; pancreatic islet were seeded into 96-well plates using 250 µl final volume and 20 islets/well. For activation, LPS was added at 10 µg/ml. After 14 d, culture supernatants were collected to test Ig secretion by an isotype-specific ELISA.

Western and dot blot analysis

For dot blot analysis, 1 μ g protein was directly spotted on a nitrocellulose membrane. For Western blot analysis, 5 μ g purified protein or total *E. coli* cell lysates were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with 5% skim milk in 10 mM Tris, 0.1 M NaCl, pH 7.5, with 0.1% Tween 20 for 2 h at room temperature (TBS-B), incubated overnight at 4°C with sera or hybridoma culture supernatants diluted in TBS-B, and washed. Bound Igs were detected by incubation with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) or biotin anti-mouse IgM (both from BioLegend), followed by avidin-HRP (eBioscience). Binding of secondary Abs was revealed through chemiluminescence using a Fujifilm LAS-3000 system (R&D Systems).

ELISPOT assay

Total splenocytes and peritoneal cells were costained with allophycocyanin-labeled A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C and PE-labeled A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers as well as FITC anti-CD19, PE-Cy5 anti-CD3, anti-F4/80, and anti-CD11c Abs. Labeled cells were sorted using a FACSAria cell sorter (Becton Dickinson). ELISPOT plates (nitrocellulose-bottomed 96-well MultiScreen-HA filtration plates; Millipore) were coated with 80 μ g/ml PRPH₄₂₉₋₅₀₇ fused to GST or GST only and incubated at 4°C overnight. Plates were washed three times with wash buffer (PBS/0.1% Tween 20) and blocked 3 h at 37°C using plain FCS. The FCS was replaced with 4000 sorted PRPH₂ B cells, CD19⁺ total B cells, or 1000 I6 hybridoma cells per well as positive control in 200 μ l RPMI 1640 medium containing 2.5 μ g/ml anti-CD40 Ab (except for the hybridoma). Plates were incubated for 72 h at 37°C. Wells were washed three times and incubated for 2 h at room temperature with biotin-conjugated goat anti-mouse Ig κ (BioLegend). Washed plates were incubated for an additional hour at room temperature with avidin-HRP (eBioscience) and developed by adding 3-amino-9-ethylcarbazole substrate. To stop the reaction, plates were washed with water. The number of spots was evaluated using an AID ELISPOT reader.

ELISA and ELISA competition

MaxiSorp flat-bottomed plates (Nunc) were coated with 10 μ g/ml Ag overnight at 4°C. Whenever GST fusion proteins were used as coating Ags, GST protein lacking the PRPH peptide was used to establish blank controls. For comparative analysis of PRPH fragments varying in length, equal molarity of protein was used for coating, and coating efficiency was verified by a separate ELISA detecting the equal presence of hexahistidine tails using an anti-histidine Ab. Washed plates were blocked with PBS-B (PBS/1 mM EDTA/2.5% BSA) for 3 h at 37°C. Sera or culture supernatants prefiltered in PBS-B as indicated for each experiment were added and incubated overnight at 4°C. Bound Igs were detected using the same Abs as indicated for Western blot analysis. Plates were developed with *o*-phenylenediamine substrate solution and the OD_{492 nm} was measured using a Tecan Infinite M200 microplate reader. Wherever appropriate, values of the GST blank control were subtracted during analysis. For ELISA competition, sera or culture supernatants were preincubated overnight at 4°C with varying concentrations of the synthetic peptide PRPH₄₇₅₋₄₉₁ or PRPH₄₃₅₋₄₄₉ as negative control, transferred to Ag-coated plates, and processed as above. For intraexperimental comparison, experimental values were normalized using an anti-histidine Ab as internal control.

To measure Ab responses of mice immunized with GST-PRPH₄₂₉₋₅₀₇ fusion proteins, A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇ was used as coating agent rather than the GST fusion protein to avoid detection of the dominant anti-GST Ab response. A^{g7}/GPI was used to establish blank controls in these setups.

All ELISAs were repeated at least three times in independent experiments.

Statistical analysis

The data are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). A *p* value <0.05 was considered significant. A *t* test or one-way ANOVA was performed wherever appropriate. Bonferroni pairwise comparison was used to assess significance between different groups.

Animal experiments

All experiments were performed in accordance with the Animal Care and Veterinary Services of the Barcelona Science Park and following the current legislation. All protocols were approved by the Ethics Committee of Animal Experimentation of the Barcelona Science Park.

Results

Epitope mapping of islet-infiltrating anti-PRPH B cells

To identify the epitope recognized by anti-PRPH B cells, we generated a series of eight overlapping recombinant peptides embedded between an N-terminal GST portion and a C-terminal hexahistidine tail and covering the entire length of PRPH 61 (Fig. 1, Supplemental Fig. 1). A sequential purification approach using the GST as well as the histidine tag allowed the generation of full-length peptides as indicated by the expected m.w. during SDS-PAGE analysis with the exception of the N-terminal fragment, PRPH₁₋₈₄, which was consistently expressed in a truncated form (Fig. 1A). Western blot analysis confirmed recognition of the last C-terminal 79 aa (PRPH₄₂₉₋₅₀₇, Table I) by mAb I6, 1 of >20 anti-PRPH mAb previously generated by the Verdaguer Laboratory (9, 10) that had been randomly selected for this study. To further narrow down the epitope, three additional overlapping peptides of the C terminus were generated, of which only the one containing the last 41 aa (PRPH₄₆₇₋₅₀₇) was recognized by the mAb (Table I). Further analysis of N- as well as C-terminal truncated versions of this peptide revealed a consensus sequence of 17 aa, PRPH₄₇₅₋₄₉₁, recognized by mAb I6 (Fig. 1B, Table I). As shown in Table I, the last 6 aa of this epitope are missing in PRPH 56 owing to alternate splicing, explaining the loss of recognition of this isoform by the anti-PRPH mAbs analyzed in the previous study (10).

To establish whether recognition of the PRPH₄₇₅₋₄₉₁ epitope was limited to mAb I6, or common to most anti-PRPH B cell hybridomas, we analyzed the reactivity of 14 additional, randomly selected B cell hybrids from our collection by dot blot. Indeed, all mAbs recognized PRPH₄₇₅₋₄₉₁ (not shown), indicating that this epitope is a major or even the sole epitope recognized by islet-infiltrating anti-PRPH B cells. A previous analysis of the variable BCR regions of the anti-PRPH B cell hybrids revealed that these clones were all independent, with some of them probably deriving directly from the preimmune repertoire with others showing clear signs of somatic hypermutation (25). Although all mAbs derived from these clones reacted with PRPH₄₇₅₋₄₉₁, the optimal epitope might differ between the individual B cells. Indeed, a comparative ELISA analysis of four PRPH fragments containing the 475-491 epitope but differing in length owing to adjacent N- and C-terminal amino acids showed that the analyzed mAbs had different affinities for these fragments. Unexpectedly, but possibly due to steric hindrance, the longest fragment was not always best recognized (Fig. 1C).

A nonconformational-dependent PRPH epitope is recognized by islet-infiltrating B cells

The PRPH target Ag of islet-infiltrating B cells was detected by analysis of cell lysates under denaturing conditions (10). Similarly, to carry out the epitope mapping, GST fusion proteins were denatured by heating prior to SDS-PAGE and Western blot analysis. Epitope recognition under these conditions argued for the epitope to be nonconformational. To further test this possibility, we carried out a dot blot analysis using a selection of recombinant PRPH-derived peptides that either had been denatured by heating or had been left untreated. The I6 hybridoma chosen for this analysis recognized the epitope both in the untreated or treated form (not shown). Similarly, treatment with urea of PRPH₄₂₉₋₅₀₇ did not alter its recognition by I6 when tested by ELISA (Fig. 1D). A synthetic version of peptide PRPH₄₇₅₋₄₉₁ was able to partially prevent binding of I6 by competition to plate-bound PRPH₄₂₉₋₅₀₇ (not shown). Inhibition assays using a longer peptide, PRPH₄₇₃₋₄₉₅, which was recognized with higher affinity according to the ELISA shown in Fig. 1D, inhibited three randomly selected anti-PRPH

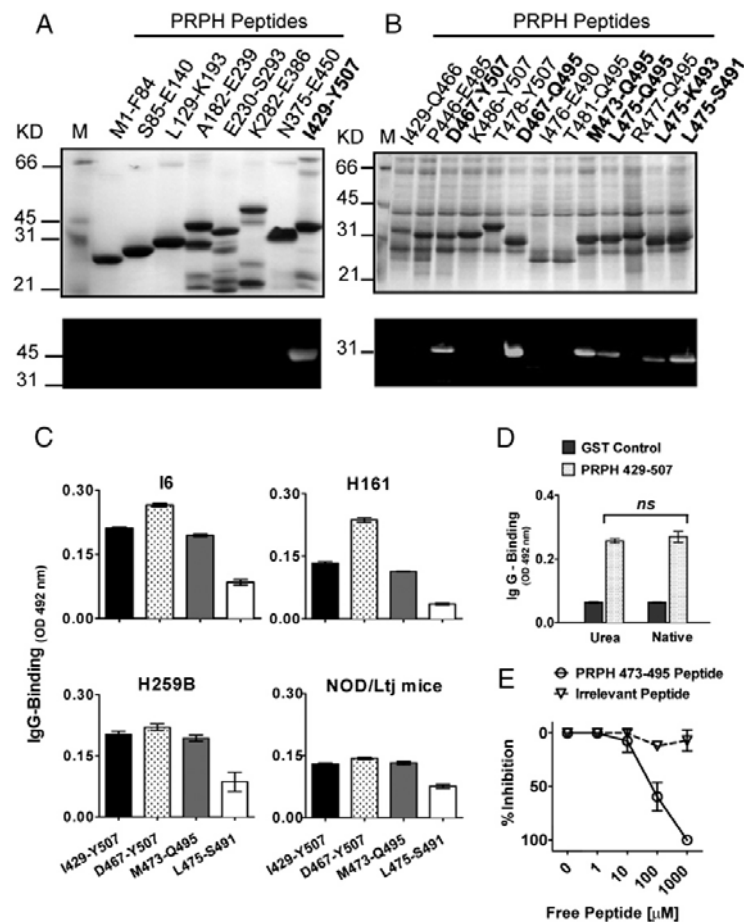


FIGURE 1. Identification of a C-terminal epitope recognized by islet-infiltrating anti-PRPH B cells. **(A)** SDS-PAGE analysis of purified overlapping PRPH peptides (*top*) and Western blot analysis of the same fragments using mAb I6 as primary Ab (*bottom*). The recognized peptide is highlighted in bold (see also Supplemental Fig. 1). **(B)** Fine mapping of the epitope recognized by mAb I6. SDS-PAGE analysis (*top*) and Western blot analysis of the same fragments using I6 as primary Ab (*bottom*). Crude *E. coli* protein extracts from induced cultures were analyzed. The recognized peptides are highlighted in bold (see also Table I). **(C)** Differential recognition of peptides PRPH₄₂₉₋₅₀₇, PRPH₄₆₇₋₅₀₇, PRPH₄₇₃₋₄₉₅, and PRPH₄₇₅₋₄₉₁ by representative B cell hybridomas and sera collected from 19-wk-old NOD mice. Peptides were coated to ELISA plates, incubated with culture supernatants from the hybridoma cultures or mouse sera, and specific Abs were detected using anti-mouse IgG. Values of the GST blank control were subtracted during analysis. Sera dilution was 1:300. **(D)** mAb I6 recognizes a linear epitope. ELISA analysis of coated PRPH₄₂₉₋₅₀₇ and GST as a control, both treated with urea or left untreated, is shown. Bound mAb was detected as in (C). Data (means \pm SD) are representative of three independent experiments. The *p* value was determined by a Mann-Whitney *t* test; not significant at *p* > 0.05. **(E)** mAb I6 recognizes a synthetic version of PRPH₄₇₃₋₄₉₅. An ELISA competition assay is shown using plate-bound GST-PRPH₄₇₃₋₄₉₅ and free, synthetic peptide PRPH₄₇₃₋₄₉₅ for competition. mAb I6 was preincubated using the indicated concentrations of free peptide overnight and next added to coated plates. Bound mAb was detected as in (C). The irrelevant synthetic PRPH₄₃₅₋₄₄₉ peptide was used as a control in this assay. Data (means \pm SD) are representative of three independent experiments.

mAbs binding to 100% at 1 mM (Fig. 1E, Supplemental Fig. 2A). PRPH₄₇₃₋₄₉₅ was also able to completely block binding of mAb 228 E1, the Ab used previously by us to identify PRPH as an autoantigen (10), to native PRPH expressed by the neuroblastoma N1E-115 (Supplemental Fig. 2B). Taken together, the results confirmed that PRPH₄₇₅₋₄₉₁ was the minimal linear epitope recognized, although longer epitopes confer stronger Ab binding.

Anti-PRPH humoral response in insulinitis-prone and insulinitis-resistant mouse strains

We further investigated how the response to the C-terminal portion of PRPH evolved in the diabetes-prone NOD mouse compared with

the genetically closely related but diabetes-resistant NOR, (NOD \times NOR) F₁, as well as C57BL/6 strains. Whereas (NOD \times NOR) F₁ mice develop insulinitis, this pathology is negligible in NOR mice and completely absent in C57BL/6 mice. Sera of 3- to 31-wk-old mice were analyzed by ELISA for Abs against PRPH₄₂₉₋₅₀₇. PRPH-specific Abs were detected in all strains (Fig. 2). However, the response was delayed and less pronounced in C57BL/6 mice. These data indicated that although neither insulinitis nor diabetes was a requirement for the generation of anti-PRPH Abs, genes related to the NOD background were possibly implicated in this accelerated response. In all strains, at ages of 20 and 31 wk, the anti-PRPH response was more pronounced in females than in males.

Table I. Mapping of the epitope recognized by islet-infiltrating anti-PRPH B cells

| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | Amino Acid ^a | Recognition by I6 Hybridoma |
|---|--|-----|-----|---|-----|-----|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| IATYRKLLEGEESRISVPVHSPASLSLKTTPPEMEPLQDSHSHKMMVL LIRTIETRDGEKVV TESQKEQHSDDLKSSSIHSY | | | | | | | | 429-507 | + |
| IATYRKLLEGEESRISVPVHSPASLSLKTTPPEMEPLQ | | | | | | | | 429-466 | - |
| | PVHSPASLSLKTTPPEMEPLQDSHSHKMMVL LIRTIETRDGE | | | | | | | 446-485 | - |
| | | | | DSHSHKMMVL LIRTIETRDGEKVV TESQKEQHSDDLKSSSIHSY | | | | 467-507 | + |
| | | | | | | | KVVTESQKEQHSDDLKSSSIHSY | 486-507 | - |
| | | | | | | | TIETRDGEKVVTESQKEQHSDDLKSSSIHSY | 478-507 | - |
| | | | | DSHSHKMMVL LIRTIETRDGEKVV TESQKEQ | | | | 467-495 | + |
| | | | | | | | IRTIETRDGEKVVTE | 476-490 | - |
| | | | | | | | TRDGEKVVTESQKEQ | 481-495 | - |
| | | | | | | | MVL LIRTIETRDGEKVV TESQKEQ | 473-495 | + |
| | | | | | | | LIRTIETRDGEKVV TESQKEQ | 475-495 | + |
| | | | | | | | RTIETRDGEKVVTESQKEQ | 477-495 | - |
| | | | | | | | LIRTIETRDGEKVV TESQK | 475-493 | + |
| | | | | | | | LIRTIETRDGEKVV TES | 475-491 | + |
| IATYRKLLEGEESRISVPVHSPASLSLKTTPPEMEPLQDSHSHKMMVL LIRTIETRDGE <u>LLRPQPEL</u> | | | | | | | | C-terminal of PRPH 56 ^b | - |

Amino acid sequence of the GST-PRPH-6H fusion proteins corresponding to PRPH only is shown. Consensus sequence is in bold; partial epitope of PRPH 56 is in bold and italics.

^aThe amino acid numeration of the 61-kDa isoform of PRPH is indicated.

^bFor comparison, the C terminus of PRPH 56 is shown. The last 21 aa of PRPH 61 and PRPH 58 are deleted in PRPH 56 and replaced by an eight-residue sequence (underlined).

The anti-PRPH response in the NOD mouse is focused to the C terminus

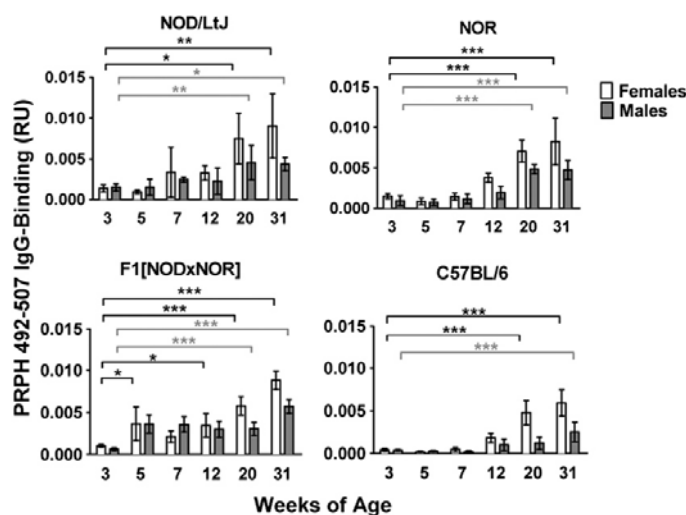
All B cell hybridomas analyzed in this study that had been isolated from pancreatic islets recognized the C terminus of PRPH 61 and PRPH 58. This prompted us to analyze whether this was an islet-restricted phenomenon, or whether the C-terminal response was systemic. Of the seven overlapping fragments (covering PRPH₈₅ to PRPH₅₀₇) analyzed by Western blot (not shown) or ELISA, only PRPH₄₂₉₋₅₀₇ was clearly recognized by sera from 5- (not shown) and 24-wk-old NOD females. Of the two Ig classes analyzed, IgG was clearly detected, whereas the IgM response was much less pronounced (Fig. 3A, 3B). To test the extent to which the in vivo response was directed against the PRPH₄₇₃₋₄₉₅ epitope, we carried out a competition ELISA using NOD sera. The synthetic peptide PRPH₄₇₃₋₄₉₅ inhibited polyclonal Ab binding to plate-bound PRPH₄₇₃₋₄₉₅ by ~80% at high concentration (1 mM; Fig. 3C).

This result indicated that a sizable proportion of the anti-PRPH response was directed against PRPH₄₇₃₋₄₉₅. However, based on the high peptide concentration needed for competition, the Abs were likely of low affinity. Bearing in mind the caveats that the first 84 aa were incompletely analyzed, as PRPH₁₋₈₄ did not express at full length in *E. coli*, and that only nonconformational peptides or peptides of unconfirmed conformations of PRPH were scanned in these assays, these results suggest that a dominant and possibly exclusive response was generated against the C terminus of PRPH. Because Abs against PRPH₄₂₉₋₅₀₇ were detected as early as 3 wk of age in NOD mice when these mice are still free of insulinitis, this argued for a response originating in tissues different from pancreatic islets.

A weak boost response upon immunization with PRPH₄₂₉₋₅₀₇

Because the anti-PRPH response was present in mouse strains that develop neither insulinitis nor diabetes and was detectable as early as

FIGURE 2. Anti-PRPH humoral response in diabetes-prone and diabetes-resistant strains. ELISA detection of anti-PRPH IgG in sera harvested from NOD, NOR, (NOD × NOR) F₁ hybrids, and C57BL/6 mice. For detection, PRPH₄₂₉₋₅₀₇ was coated to plates. Relative unit (RU) values were normalized to an internal anti-hexahistidine Ab control run in each experiment to allow cross-plate comparisons of data. Sera dilution was 1:300. Data are the means ± SD of three to five mice in each group. The *p* value was determined by a one-way ANOVA test for each female and male group. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.



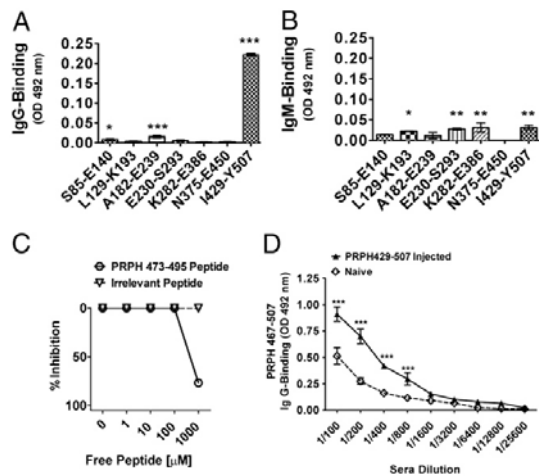


FIGURE 3. IgG, but not IgM, anti-PRPH response in NOD mice. **(A)** ELISA detection of anti-PRPH IgG in sera harvested from 24-wk-old NOD mice. For detection, overlapping peptides covering PRPH₈₅₋₅₀₇ (compare with Fig. 1) were coated to plates. Bound IgG was detected using anti-mouse IgG. Values of the GST blank control were subtracted during analysis. Data (mean values \pm SD) are representative of three independent experiments. The *p* value was determined by a one-way ANOVA test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, comparing Ab binding to PRPH peptides with the GST control. **(B)** ELISA detection of anti-PRPH IgM in sera harvested from 24-wk-old NOD mice. The assay was carried out as in (A) with the difference that bound IgM was revealed using an anti-IgM Ab. Values of the GST blank control were subtracted during analysis. Data (mean values \pm SD) are representative of three independent experiments. The *p* value was determined by a one-way ANOVA test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, comparing Ab binding to PRPH peptides with the GST control. **(C)** Detection of Abs specific for the synthetic PRPH₄₇₃₋₄₉₅ peptide in NOD sera. An ELISA competition assay is shown using plate-bound PRPH₄₇₃₋₄₉₅ and free, synthetic PRPH₄₇₃₋₄₉₅ for competition. Sera from 24-wk-old NOD females were preincubated using the indicated concentrations of free peptide overnight and next added to coated plates. Bound mAb was detected as in (A). The irrelevant synthetic PRPH₄₃₅₋₄₄₉ peptide was used as a control in this assay. **(D)** ELISA detection of PRPH₄₆₇₋₅₀₇-specific IgG in sera from NOD females after immunization with two doses of 100 μ g PRPH₄₂₉₋₅₀₇ at days 0 and 21 emulsified in CFA and IFA, respectively. Age-matched (12-wk-old) naive NOD females served as controls. Recognition of plate-bound PRPH₄₆₇₋₅₀₇ was analyzed. Specific IgG was detected as in (A); values of the GST blank control were subtracted during analysis. Sera dilution was 1:300 unless indicated otherwise in the figure. Mean values \pm SD of from five mice per group are shown. The *p* value was determined by a two-way ANOVA test. ****p* < 0.001, comparing immunized with naive control mice.

3 wk after birth, it possibly represented a natural Ab response. Such responses cannot be boosted upon immunization with Ag and are primarily made up by IgM Abs. To test whether the response to PRPH increased upon immunization, we injected into NOD females recombinant PRPH₄₂₉₋₅₀₇ emulsified in CFA, boosted after 3 wk using the same protein emulsified in IFA and analyzed the specific Ab response 4 d later by ELISA. Immunization with GST only served as control. Animals mounted a strong humoral response to GST, indicating that anti-GST B cells were fully responsive (Supplemental Fig. 3). Conversely, the response to PRPH₄₆₇₋₅₀₇ was substantially weaker (Fig. 3D). In conclusion and in light of the lacking IgM response mentioned earlier, the comparatively weak boost response pointed toward a low-affinity Ab response.

In vivo detection of PRPH-specific B cells by A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers

To analyze the genesis of the anti-PRPH response, we searched for Ag-specific B cells *in vivo* using fluorescently labeled peptide. However, several conventional approaches, such as FITC labeling of synthetic peptide, peptide coating of fluorescent beads, biotinylated GST peptide fusion proteins, or biotinylated synthetic peptide, both incubated with PE-labeled streptavidin, failed to detect PRPH-specific B cells. The GST fusion protein stained B cells nonspecifically, and the synthetic peptide did not substantially stain I6 (not shown), the sole hybridoma of islet-infiltrating anti-PRPH B cells of our collection that expressed surface IgG. We argued that this problem might be overcome by increasing the peptide valency. To do so, we used the intrinsic heterodimeric nature of MHC class II molecules and fused PRPH₄₆₇₋₅₀₇ to the C termini of the α - and β -chain of soluble, recombinant A^{g7} molecules, the sole MHC class II variant expressed by the NOD mouse. PRPH₄₆₇₋₅₀₇ rather than PRPH₄₇₅₋₄₉₁ was used to generate these constructs because, overall, this peptide was best recognized by all hybridomas analyzed. A^{g7} heterodimeric molecules were further stabilized by fusion of a peptide (GPI) at the N terminus of the β -chain that folds into the peptide-binding groove (19). In this format, the A^{g7}/GPI molecule served as scaffold to facilitate expression and purification of the PRPH peptides. Site-specific biotinylation at the C terminus of the A^{g7} α -chain and incubation of these fusion proteins (A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C) with fluorescently labeled streptavidin leads to the octameric display of the peptide (Fig. 4A).

We first verified the specificity of the reagent by assessing its ability to stain clone I6. The B cell hybrid was stained by an anti-IgG Ab as well as by A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers, but not by the A^{g7} control scaffold reagent that lacked PRPH₄₆₇₋₅₀₇ (tetramers of A^{g7}/GPI; Fig. 4B). The BCR was key for staining by the octamers, as a pre-B cell line lacking surface Ig was not stained (not shown). The staining was peptide specific as it could be blocked by preincubation of the A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers with the anti-PRPH mAb 228E1 (Fig. 4B). When spleens from 7-wk-old NOD females were analyzed (Fig. 4C), on average 0.19% of B cells were stained by A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers compared with 0.1% by the A^{g7}/GPI tetramer control, suggesting that ~0.09% of B cell were specific for PRPH₄₆₇₋₅₀₇ and demonstrating that the octamers did not stain all B cells indistinguishably.

An Ab response against A^{g7} in the NOD mouse has been suggested previously, and B cells of this specificity therefore should recognize and thus might be stained by A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers as well (11). Additionally, the analysis of rare Ag-specific B cells is hampered by the presence of B cells that recognize PE (26). B cell staining by our control reagent also suggested that some recognition irrelevant to the PRPH peptide occurred. To minimize nonspecific B cell detection, we generated A^{g7}/PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers labeled with either PE or allophycocyanin and incubated peritoneal cells with both octamers simultaneously. In parallel, peritoneal cells were incubated with control A^{g7}/GPI tetramers prepared with the same fluorochromes. If, on the one hand, A^{g7}-specific B cells were present and stained by the octamer, they should also be stained by the tetramer control, owing to the identical A^{g7} scaffold. On the other hand, the double color approach should serve to eliminate either allophycocyanin- or PE-specific B cells, as those cells would be stained by either the PE- or the allophycocyanin-containing reagent only, but not by both simultaneously. As shown in Fig. 4D, A^{g7}-specific B cells were essentially absent or not stained, as no double-positive cells using the tetramer control reagent became apparent. On the contrary, ~0.25% of B cells were detected by the double color octamer staining approach, alleviating concerns of

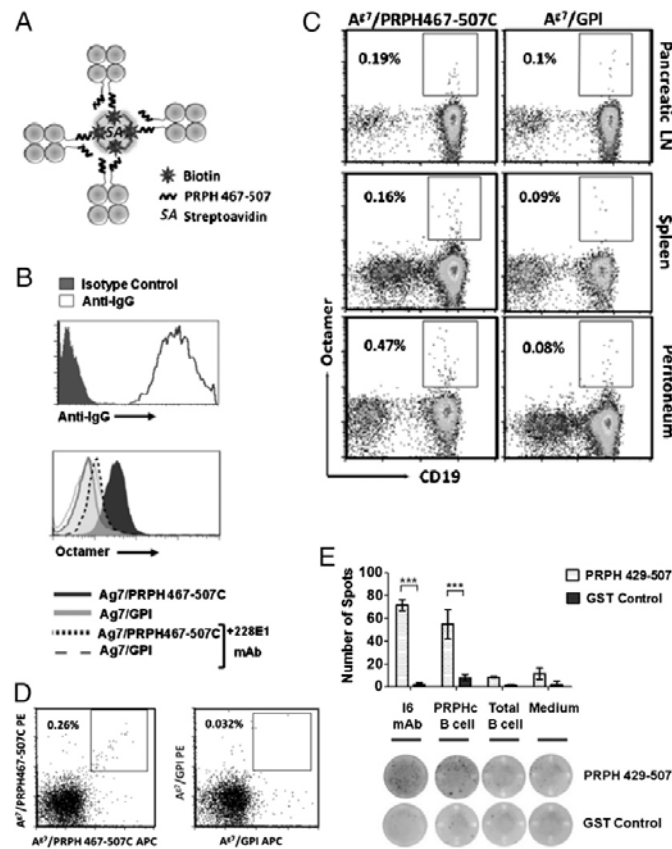


FIGURE 4. Ag-specific B cell staining by the $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamer. (A) Schematic representation of the $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamer. $PRPH_{467-507}$ is fused to the C terminus of the α - and β -chain of $A^{\beta 7}$; the α -chain is site-specifically labeled with biotin. SA, fluorescent streptavidin. (B) The B cell hybridoma I6 expressed surface IgG as detected through an IgG-specific Ab by FACS analysis (top). Staining is shown of the same hybridoma by the $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamer, but not by the $A^{\beta 7}/GPI$ tetramer control molecule (bottom). Staining is lost when the $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamer is preincubated with the anti-PRPH mAb 228 E1 (right). (C) Detection of PRPH_C B cells in pancreatic LNs, spleen, and peritoneum by $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamers. A FACS analysis of a 7-wk-old NOD female is shown. B cells were gated on $CD8^{-}$, $CD4^{-}$, $CD11c^{-}$, $F4/80^{-}$, propidium iodide (PI)⁻, and $CD19^{+}$. Left panels show staining with $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamers; right panels show staining with $A^{\beta 7}/GPI$ tetramers. (D) Detection of PRPH_C B cells by FACS analysis by a two-color staining approach in the peritoneum of a 7-wk-old NOD female. Total peritoneal cells were incubated with $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamers (left) or the control $A^{\beta 7}/GPI$ (right), both labeled with allophycocyanin or PE. B cells are gated on $CD8^{-}$, $CD4^{-}$, $CD11c^{-}$, $F4/80^{-}$, PI⁻, and $CD19^{+}$. (E) Ag specificity of PRPH_C B cells detected by ELISPOT analysis. Four thousand PRPH_C B cells, labeled using the two-color approach as explained in (C), or 4000 $CD19^{+}$ total B cells were sorted by FACS into ELISPOT plates, coated with $PRPH_{429-507}$ or GST as background control. Cells were cultivated for 72 h in the presence of anti-CD40 Abs, and secreted Ag-specific Abs were detected using an anti-mouse κ Ab. As positive control, only 1000 I6 hybridomas cells were seeded in parallel to compensate for the stronger proliferative capacity of these cells. Data (means \pm SD) are representative of two independent experiments. The *p* value was determined by a two-way ANOVA test. ****p* < 0.001.

single PE- or allophycocyanin-positive B cells. Therefore, the two-color approach served to detect PRPH-specific B cells only (hereafter referred to as PRPH_C B cells).

As a final proof of the suitability of the $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamer for PRPH_C B cell identification, we applied the double color octamer staining approach to sort B cells and to analyze their specificity by ELISPOT. Four thousand octamer⁺ or total $CD19^{+}$ octamer⁻ B cells were sorted into plates coated with GST- $PRPH_{429-507}$ or with GST only, stimulated with anti-CD40 Ab, and secreted Abs were detected with a anti-mouse κ Ab (Fig. 4E). For comparison, 1000 I6 hybridoma cells were seeded into coated plates as parallel experiments showed that after the 3-d incubation

period, a similar cell number was obtained in the three cultures due to the strong proliferation of the hybridoma. Similar amounts of spots were identified in the well containing either PRPH_C B cells or I6 hybridoma cells, whereas $CD19^{+}$ octamer⁻ B cell-containing wells were undistinguishable from wells containing medium only. The presence of PRPH-specific Ab secretion was also evidenced by a darker color of the membrane found exclusively in wells that had received either octamer⁺ B cells or I6 hybrids and that had been coated with $PRPH_{429-507}$. Neither I6 nor PRPH_C B cells recognized coated GST. Collectively, these results conclusively validated $A^{\beta 7}/PRPH_{467-507}C$ octamers as a tool to detect PRPH_C B cells.

In vivo distribution of PRPH_C B cells

We used the A^{β} /PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamers to analyze the distribution of PRPH_C B cells in vivo in NOD mice (Figs. 4C, 5A). PRPH_C B cells were detected in the spleen, LNs (only pancreatic LNs are shown), as well as in the peritoneum at ages between 4 and 15 wk. Overall, more PRPH_C B cells were detected in females compared with males. Unexpectedly, the highest percentages of PRPH_C B cells were found in the peritoneum with up to 0.5% of total B cells in females. In the peritoneum and pancreatic LN PRPH_C B cells progressively increased in females where they peaked at week 15, the oldest age analyzed. We wondered whether the increment of PRPH_C B cells correlated with disease progression. Indeed, a separate set of experiments revealed that the peritoneum of 15-wk-old diabetic NOD females contained significantly more PRPH_C B cells than did age-matched, nondiabetic individuals (Fig. 5B). In pancreatic islets, PRPH_C B cells were undetectable at 5 wk of age, but at 10 and 15 wk of age, ~0.2% in infiltrating B cells stained with the octamers (Fig. 5C, only 15-wk-old mice are shown). These results suggested that the primary site of PRPH_C B cell proliferation might not be the pancreas or pancreatic islets but rather the peritoneum. Alternatively, PRPH_C

B cells may preferentially home to the peritoneum. A third explanation for the dearth of PRPH_C octamer⁺ B cells in pancreatic islets could be their rapid conversion at this site into a plasma cell-like phenotype that would escape detection by the octamer due to downregulation of the BCR as previously shown (Ref. 27 and N.G., not shown). Further support for this idea was the detection of anti-PRPH Abs in islet culture supernatants (not shown). To establish whether PRPH_C B cells were augmented in diabetes-prone NOD mice compared with disease-resistant C57BL/6 mice, we analyzed 7-wk-old females from both strains side-by-side. Although present in both strains, PRPH_C B cells were significantly elevated in females of the NOD compared with the C57BL/6 strain in spleen and peritoneum (Fig. 5D).

Tissue-dependent phenotypic variations of PRPH_C B cells

The presence of PRPH_C B cells in the peritoneum was a further indication that at least a portion of these cells might belong to the natural B-1 B cell compartment. Approximately 30% of PRPH_C B cells expressed CD5 in the peritoneum (Fig. 6A, top panels), indicating that these cells belonged to the B-1a subtype. Additionally, 15% of PRPH_C B cells were stained by Mac-1 but not by CD5, a hallmark of B-1b B cells (28), which was close to triple the

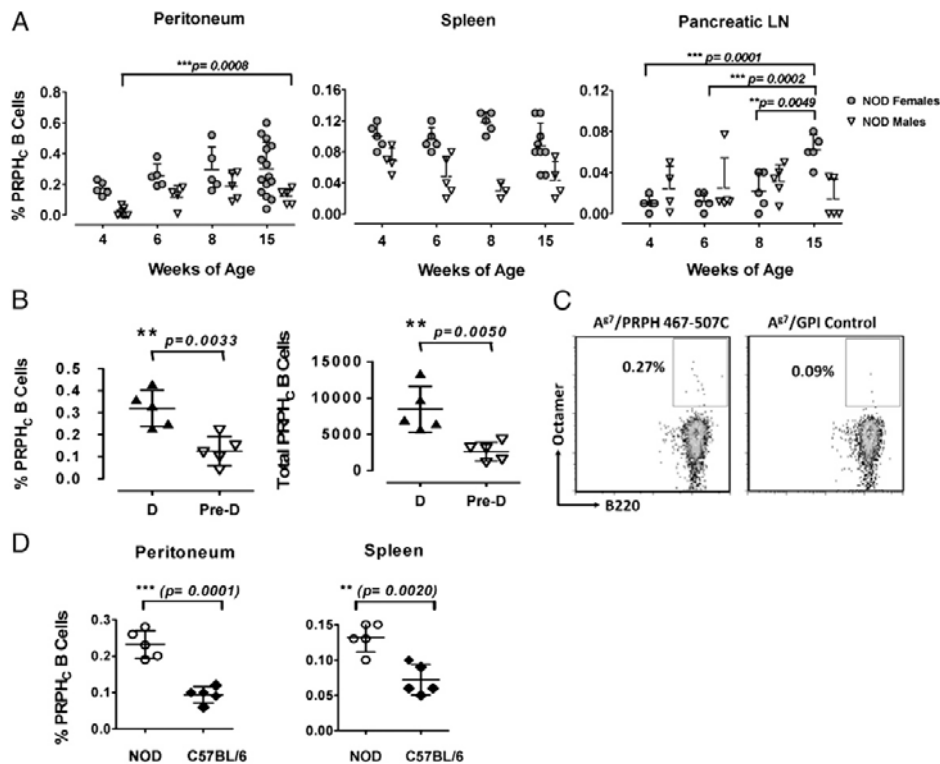


FIGURE 5. PRPH_C B cell distribution in NOD and C57BL/6 mice. **(A)** FACS analysis of PRPH_C B cells in the peritoneum, spleen, and pancreatic LNs in NOD males and females ($n = 5$ –15/age group). PRPH_C B cells are shown in the indicated organs and ages as percentage of total CD19⁺ B cells. A^{β} /PRPH₄₆₇₋₅₀₇C octamer⁺ cells were gated on CD3⁺, CD11c⁺, F4/80⁺, propidium iodide (PI)⁺, and B220⁺. Values obtained with the A^{β} /GPI control were subtracted during analysis. Error bar indicates mean values \pm SD. The p value was determined by a Mann–Whitney t test. **(B)** Analysis of PRPH_C B cells in the peritoneum of diabetic and prediabetic 15-wk-old NOD/LtJ females ($n = 5$). PRPH_C B cells were analyzed as in **(A)**. In left panel, PRPH_C B cells are indicated as a percentage of total i.p. B220⁺ B cells; in right panel, total numbers of i.p. PRPH_C B cells of the same analysis are shown. Error bar indicates mean values \pm SD. The p value was determined by a Mann–Whitney t test. **(C)** Representative FACS profile of islet-infiltrating PRPH_C B cells from 15-wk-old NOD/LtJ females (a pooled analysis of five animals is shown). PRPH_C B cells were analyzed as in **(A)**. **(D)** Comparative analysis of PRPH_C B cells in the peritoneum and spleen in 7-wk-old NOD and C57BL/6 females ($n = 5$). PRPH_C B cells were analyzed as in **(A)**. Error bar indicates mean values \pm SD. The p value was determined by a Mann–Whitney t test.

percentage detected in total CD19⁺ B cells at the same site. In the spleen and pancreatic LNs, most PRPH_C B cells were CD5⁻ Mac1⁻. Whereas percentages, owing to the relatively low cell number, are susceptible to fluctuation, the results nevertheless

mirrored the percentages of total CD19⁺ B cells at these sites and clearly demonstrated that PRPH_C B cells are a heterogeneous population. Costaining with anti-IgM and anti-IgD revealed that in all sites the majority of PRPH_C B cells were either IgD⁺ or IgM⁺ IgD⁻, very similar to total CD19⁺ B cells (Fig. 6A, bottom panels). However, some switching to IgG, the isotype expressed by virtually all PRPH_C B cell hybridomas derived from pancreatic islets (25), might be supported in the peritoneum, the only site where IgM⁻ IgD⁻ cells among this population were observed. On the contrary, ~10% of IgM⁻ IgD⁻ cells were found at all sites within the total CD19⁺ B cell population. In infiltrated islets, B-1a and B-1b B cell were identified in CD19⁺ total, but not in PRPH_C B cells (Fig. 6B). Contrary to total B cells where ~30% had switched their isotype based on absence of IgM/IgD expression (3-fold more than found in spleen, pancreatic LNs, or peritoneum), IgM⁻ IgD⁻ PRPH_C B cells were essentially absent at this site.

Finally, we analyzed the phenotype of PRPH_C B cells in the spleen by costaining with anti-CD21 and anti-CD23 Abs (Fig. 6C). At this site, ~50% of PRPH_C B cells were double positive for these markers, a typical phenotype of follicular B cells, whereas ~15% of PRPH_C B cells resembled MZ B cells (CD21^{high}CD23^{low}). This was comparable to the frequencies detected in the total B cell population and a further confirmation of the heterogeneity of anti-PRPH_C B cells.

Discussion

The implication of B cells in T1D has long been recognized. Humoral responses toward autoantigens such as insulin or glutamic acid decarboxylase were discovered several decades ago, and autoantibodies have served to establish the diagnosis of T1D risk in the clinic (29, 30). The study of the corresponding cellular responses, however, has proven much more cumbersome. Cytometric detection of Ag-specific B cells by increasing the valency of epitopes has been reported for BCR transgenic or immunized mice, using either random coupling to a fluorescent carrier molecule or tetramerization of the biotinylated Ag (31–33). The detection of autoreactive B cells in nontransgenic naive mice or patients using similar methods either failed or was not reported to our knowledge (7, 34). Especially in wild-type NOD mice, the identification of autoreactive B cells that recognize natural autoantigens has been hampered by the low affinities of autoreactive BCRs for their cognate Ags (35). However, recent achievements to prevent T1D by targeting Ag-specific B cells call for novel approaches to be able to track these cells for preclinical and clinical studies (36). The previously suggested presence of PRPH-specific B cells in pancreatic islets (9, 10) prompted us to conduct an in-depth analysis of this B cell reactivity using a novel approach consisting of the octameric display of the cognate Ag and to search for the sites of autoreactive B cell accumulation.

The first relevant finding in the present study was that all PRPH-specific B cells recognized the same core epitope, although, as expected owing to the BCR variants previously described (25), their fine specificities were different. Our findings also indicate a dominant response to this epitope in young animals that is maintained at least until 24 wk of age, the oldest age that was analyzed in a side-by-side comparison of the seven expressed fragments covering the 61-kDa isoform of PRPH₈₅₋₅₀₇. Do other epitopes of a similar significance exist that we may have overlooked in our study? We cannot completely exclude this for several reasons, including the partially missing N-terminal 84 aa that eluded our analysis as well as the mentioned limitation that we only analyzed protein fragments of unknown tertiary structure. Furthermore, some epitopes close to the fragment boundaries might have been lost. However, albeit PRPH as a target Ag of islet-infiltrating

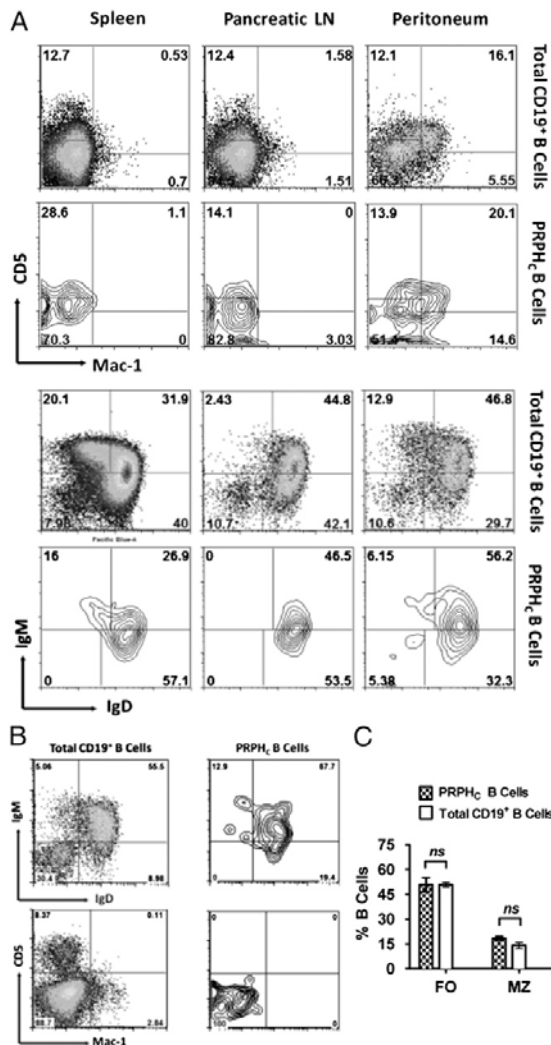


FIGURE 6. PRPH_C B cells segregate into different subpopulations and are activated in a tissue-specific fashion. (A) FACS analysis of PRPH_C B cell subpopulations in the peritoneum, spleen, and pancreatic LNs of 7-wk-old NOD females. PRPH_C B cells were gated using the two-color approach explained in Fig. 4C and further analyzed using anti-CD5 and Mac-1 (top panels) or anti-IgM and anti-IgD Abs (bottom panels). Plots are representative of three independent experiments. (B) FACS analysis of islet-infiltrating PRPH_C B cell phenotypes from 10-wk-old NOD/LtJ females (a pooled analysis of five animals is shown). Analysis as in (A); left panels, CD19⁺ total B cells; right panels, PRPH_C B cells. Top, IgM versus IgD, bottom CD5 versus Mac-1 analysis. Plots are representative of two independent experiments. (C) Analysis of PRPH_C B cell phenotypes in the spleen of 8-wk-old NOD/LtJ females ($n = 5$). PRPH_C B cells were first quantified by the two-color approach explained in Fig. 4C and further analyzed using the CD23 and CD21 markers (FACS profiles not shown). Total B cells are shown for comparison. FO, follicular B cells; MZ, MZ B cells. Error bars indicate mean values \pm SD. Values were not significantly different as determined by a one-way ANOVA test.

B cells has been detected using denaturalizing conditions (10), the neuronal recognition pattern of all clones had been carried out using air-dried cryosections (9), a technique that can preserve three-dimensional protein structures. If, at least in case of the islet, a dominant B cell population recognizing a different epitope of PRPH was present at this site, it is likely that this population would form part of the hybridoma collection previously generated. However, all hybrids that we analyzed recognized the C-terminal epitope. The humoral response toward the PRPH C terminus was not restricted to the NOD strain but was also found in other NOD-related and unrelated strains. In the four strains analyzed, the response was weakest in C57BL/6 mice and delayed compared with other strains. In all strains, the response was more pronounced in females. Although the function of anti-PRPH B cells still needs to be established, it is tempting to speculate that NOD background-related genes might be involved in the increase of this cell specificity.

The second noteworthy finding, facilitated by the octamer approach, was the tissue distribution of PRPH_C B cells. The highest percentages of these cells were found in the peritoneum. However, these cells were not limited to the NOD strain, but were also found, albeit at lower levels, in C57BL/6 mice, as expected from our data demonstrating the existence of anti-PRPH Abs in this strain. The high percentages of PRPH_C B cells in the peritoneal cavity combined with the low Abs affinities detected by ELISA inhibition and the comparatively weak Abs response upon immunization were indicative that these cells may form part of the natural B cell compartment or produce low-affinity Abs (37). The CD5/Mac-1 analysis indicated that PRPH_C B cells did not form a homogeneous B cell population. In the peritoneum, ~50% of these cells belonged either to the B-1a or the B-1b population, but the vast majority of PRPH_C B cells in pancreatic LNs and spleen were CD5⁺, indicating that they were either follicular B cells, MZ B cells, or possibly in part B-1b cells that are CD5⁻ and do not express Mac-1 outside the peritoneum (28, 38). A BCR analysis should reveal whether the B-1 peritoneal population is of different clonal origin that may explain the heterogeneity of PRPH_C B cells. B-1 cells have been implied previously to play a role in T1D pathogenesis. Hypotonic lysis leading to B-1a B cell depletion in the peritoneum leads to a delayed disease onset in NOD mice (39). Very recently, it has been suggested that the possible role of B-1 cells in T1D is to promote autoreactive T cell access to pancreatic islets, possibly by the induction of VCAM-1 expression on the pancreatic vasculature (40). It is thus possible that some of the PRPH_C B cells are involved in a similar process. PRPH_C B cells in the islet were negative for Mac-1 and CD5; however, it is possible that these markers were lost during the overnight culture process. Coanalysis of CD21 versus CD23 expression revealed that PRPH_C B cells were not limited to the B-1 B cell compartment. Rather, we detected tissue-specific differences: in the spleen, most PRPH_C B cells resembled follicular B cells, yet ~15% could also be classified as MZ B cells. MZ B cells have recently been described to invade pancreatic islets and to have the capacity to present autoantigens such as insulin, leading to T cell activation *in vitro* (41). We have not yet established whether some PRPH_C B cells in the islets could be classified as MZ B cells.

A further question remaining to be solved is whether and where these cells are implicated in Ag presentation. A recent report has shown that even tolerant energized B cells are fully capable of Ag presentation and T cell activation (42). Ag presentation could occur in the peritoneum or in pancreatic LNs, besides others. It has previously been suggested that pancreatic LNs are the critical site of islet Ag-specific T cell priming to condition their capacity to infiltrate the islets (43), and the removal of these LNs led to an

almost complete protection against insulinitis and diabetes (44). Passive or active transport of PRPH from the pancreas released during physiological β cell death (43) could be a source of Ag for PRPH_C B cells that is subsequently presented to the corresponding T cells. However, PRPH_C B cells may also pick up Ag or simply get activated in the peritoneum and then home directly to pancreatic LNs, a mechanism previously described (45). In females, as the disease progressed, the increment of PRPH_C B cells in the peritoneum was paralleled by an increment of these cells in pancreatic LNs. Whether this is due to proliferation in one of these sites only, followed by trafficking, or whether these populations proliferate or simply accumulate at different sites independently remains to be established.

As mentioned previously, islet-infiltrating PRPH_C B cells secrete IgG, and in the present study, serum IgM levels were only marginal. This begs the question where and under which conditions isotype switching is induced in NOD females. The IgM/IgD analysis suggests that it occurred neither in the spleen nor in pancreatic LNs, as essentially no IgM/IgD double-negative cells were detected at these sites. Switching might take place in the peritoneum where CD19⁺ IgM/IgD double-negative cells were detected. In case of the peritoneum, it is possible that omental milky spots are involved in this process, as it has recently been described that isotype switching and somatic hypermutation are supported in this tissue (46). Another possibility is that switching and affinity maturation take place in the islets themselves. However, if this is the case, it is much less pronounced compared with the total B cell population that was composed by almost a third of switched B cells. Tertiary lymphoid structures associated to pancreatic islets have been described previously (47–49), and therefore local switching events could be supported at this site.

Whether the response to PRPH is T cell-dependent is still an open issue. We are currently investigating this question. The BCR analysis of islet-infiltrating PRPH-reactive B cells showed that some, but not all, had undergone somatic hypermutation (25), a clue that argues for a T cell/B cell interaction. The rather high percentages of PRPH_C B cells in the peritoneum already detectable at young age seemingly advocates against it, as does the finding that some PRPH_C B cells belong to the B-1 B cell subpopulation. Because the phenotypical analysis argues for a heterogeneous B cell population, it is possible that this response is partially, but not completely, T cell-independent. T cell-independent activation of autoreactive B cells has recently been described, which is not staged in germinal centers but at the T cell zone/red pulp border (50, 51). Whether the same holds true for PRPH_C B cells needs to be analyzed further. The identification of PRPH-specific autoreactive T cells, that is, by MHC tetramers, would prove invaluable to gain a deeper insight of the collaboration between both cell types in T1D pathogenesis.

The response against PRPH adds to a growing list of autoantigens derived from neuronal tissues for which a causative link to the pathogenesis of T1D has been shown (52, 53). The detection of elevated percentages of B cells especially in recent-onset diabetic animals recognizing such an Ag in the peritoneum is unexpected. It should encourage the search for further autoreactive B cell populations in the peritoneum. The octamer approach is likely to prove valuable for this endeavor.

Acknowledgments

We thank Dr. M. McHeyzer-Williams and Dr. P. Más for critical reading of the manuscript, and Dr. L. Teyton for providing us with constructs and cell lines for expression of A β /GPI. We thank the cytometry facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer for technical help.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Favas, C., and D. A. Isenberg. 2009. B-cell-depletion therapy in SLE: what are the current prospects for its acceptance? *Nat. Rev. Rheumatol.* 5: 711–716.
- Lehuen, A., J. Diana, P. Zaccane, and A. Cooke. 2010. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 501–513.
- Wong, F. S., and L. Wen. 2005. B cells in autoimmune diabetes. *Rev. Diabet. Stud.* 2: 121–135.
- Serreze, D. V., H. D. Chapman, D. S. Varnum, M. S. Hanson, P. C. Reifsnnyder, S. D. Richard, S. A. Fleming, E. H. Leiter, and L. D. Shultz. 1996. B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new “speed congenic” stock of NOD.Ig μ null mice. *J. Exp. Med.* 184: 2049–2053.
- Akashi, T., S. Nagafuchi, K. Anzai, S. Kondo, D. Kitamura, S. Wakana, J. Ono, M. Kikuchi, Y. Nihou, and T. Watanabe. 1997. Direct evidence for the contribution of B cells to the progression of insulinitis and the development of diabetes in non-obese diabetic mice. *Int. Immunol.* 9: 1159–1164.
- Silveira, P. A., E. Johnson, H. D. Chapman, T. Bui, R. M. Tisch, and D. V. Serreze. 2002. The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors. *Eur. J. Immunol.* 32: 3657–3666.
- Hulbert, C., B. Riseick, M. Rojas, and J. W. Thomas. 2001. B cell specificity contributes to the outcome of diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 167: 5535–5538.
- Mariño, E., B. Tan, L. Binge, C. R. Mackay, and S. T. Grey. 2012. B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes. *Diabetes* 61: 2893–2905.
- Carrillo, J., M. C. Puertas, A. Alba, R. M. Ampudia, X. Pastor, R. Planas, N. Riutort, N. Alonso, R. Pujol-Borrell, P. Santamaria, et al. 2005. Islet-infiltrating B-cells in nonobese diabetic mice predominantly target nervous system elements. *Diabetes* 54: 69–77.
- Puertas, M. C., J. Carrillo, X. Pastor, R. M. Ampudia, R. Planas, A. Alba, R. Bruno, R. Pujol-Borrell, J. M. Estanyol, M. Vives-Pi, and J. Verdaguer. 2007. Peripherin is a relevant neuroendocrine autoantigen recognized by islet-infiltrating B lymphocytes. *J. Immunol.* 178: 6533–6539.
- Boitard, C., M. C. Villa, C. Becourt, H. P. Gia, C. Huc, P. Sempé, M. M. Portier, and J. F. Bach. 1992. Peripherin: an islet antigen that is cross-reactive with nonobese diabetic mouse class II gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 172–176.
- Villà, M.-C., C. Bécourt, H. P. Gia, P. Sempé, M.-M. Portier, J.-F. Bach, and C. Boitard. 1992. Autoantibodies against pancreatic β -cells: characterization by Western blot analysis in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *J. Autoimmun.* 5: 47–58.
- Chamberlain, J. L., S. J. Pittock, A.-M. Oprescu, C. Dege, M. Apiwattanakul, T. J. Kryzer, and V. A. Lennon. 2010. Peripherin-IgG association with neurologic and endocrine autoimmunity. *J. Autoimmun.* 34: 469–477.
- Strom, A., B. Sonier, H. D. Chapman, M. Mojibian, G.-S. Wang, C. R. Slatculescu, D. V. Serreze, and F. W. Scott. 2010. Peripherin-reactive antibodies in mouse, rabbit, and human blood. *J. Proteome Res.* 9: 1203–1208.
- Landon, F., A. Wolff, and B. de Néchaud. 2000. Mouse peripherin isoforms. *Biol. Cell* 92: 397–407.
- McLean, J., H. N. Liu, D. Miletic, Y. C. Weng, E. Rogasova, L. Zimman, J. Kriz, and J. Robertson. 2010. Distinct biochemical signatures characterize peripherin isoform expression in both traumatic neuronal injury and motor neuron disease. *J. Neurochem.* 114: 1177–1192.
- Harper, J. F., J.-F. Huang, and S. J. Lloyd. 1994. Genetic identification of an autoinhibitor in CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochemistry* 33: 7267–7277.
- Stratmann, T., S. R. Schmid, J. F. Harper, and A. S. Kang. 1997. Bacterial expression and purification of recombinant *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein. *Protein Expr. Purif.* 11: 72–78.
- Stratmann, T., N. Martin-Orozco, V. Mallet-Designe, L. Poirot, D. McGavern, G. Losyev, C. M. Dobbs, M. B. A. Oldstone, K. Yoshida, H. Kikutani, et al. 2003. Susceptible MHC alleles, not background genes, select an autoimmune T cell reactivity. *J. Clin. Invest.* 112: 902–914.
- Schatz, P. J. 1993. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology (NY)* 11: 1138–1143.
- Stratmann, T., V. Apostolopoulos, V. Mallet-Designe, A. L. Corper, C. A. Scott, I. A. Wilson, A. S. Kang, and L. Teyton. 2000. The I-Ag7 MHC class II molecule linked to murine diabetes is a promiscuous peptide binder. *J. Immunol.* 165: 3214–3225.
- Corper, A. L., T. Stratmann, V. Apostolopoulos, C. A. Scott, K. C. Garcia, A. S. Kang, I. A. Wilson, and L. Teyton. 2000. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes. *Science* 288: 505–511.
- Ablamunits, V., D. Elias, and I. R. Cohen. 1999. The pathogenicity of islet-infiltrating lymphocytes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Clin. Exp. Immunol.* 115: 260–267.
- Puertas, M. C., J. Carrillo, X. Pastor, R. M. Ampudia, A. Alba, R. Planas, R. Pujol-Borrell, M. Vives-Pi, and J. Verdaguer. 2007. Phenotype and functional characteristics of islet-infiltrating B-cells suggest the existence of immune regulatory mechanisms in islet milieu. *Diabetes* 56: 940–949.
- Carrillo, J., M. C. Puertas, R. Planas, X. Pastor, A. Alba, T. Stratmann, R. Pujol-Borrell, R. M. Ampudia, M. Vives-Pi, and J. Verdaguer. 2008. Anti-peripherin B lymphocytes are positively selected during diabetogenesis. *Mol. Immunol.* 45: 3152–3162.
- Townsend, S. E., C. C. Goodnow, and R. J. Cornall. 2001. Single epitope multiple staining to detect ultralow frequency B cells. *J. Immunol. Methods* 249: 137–146.
- Serreze, D. V., H. D. Chapman, M. Niens, R. Dunn, M. R. Kehry, J. P. Driver, M. Haller, C. Wasserfall, and M. A. Atkinson. 2011. Loss of intra-islet CD20 expression may complicate efficacy of B-cell-directed type 1 diabetes therapies. *Diabetes* 60: 2914–2921.
- Hardy, R. R., and K. Hayakawa. 2001. B cell development pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 595–621.
- Knip, M., and H. Siljander. 2008. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun. Rev.* 7: 550–557.
- Zhang, L., M. Nakayama, and G. S. Eisenbarth. 2008. Insulin as an autoantigen in NOD/human diabetes. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 111–118.
- McHeyzer-Williams, L. J., M. Cool, and M. G. McHeyzer-Williams. 2000. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel B220 memory B cell compartment. *J. Exp. Med.* 191: 1149–1166.
- Newman, J., J. S. Rice, C. Wang, S. L. Harris, and B. Diamond. 2003. Identification of an antigen-specific B cell population. *J. Immunol. Methods* 272: 177–187.
- Wang, Y.-H., and B. Diamond. 2008. B cell receptor revision diminishes the autoreactive B cell response after antigen activation in mice. *J. Clin. Invest.* 118: 2896–2907.
- O'Connor, K. C., K. A. McLaughlin, P. L. De Jager, T. Chitnis, E. Bettelli, C. Xu, W. H. Robinson, S. V. Cherry, A. Bar-Or, B. Banwell, et al. 2007. Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. *Nat. Med.* 13: 211–217.
- Thomas, J. W., P. L. Kendall, and H. G. Mitchell. 2002. The natural autoantibody repertoire of nonobese diabetic mice is highly active. *J. Immunol.* 169: 6617–6624.
- Henry, R. A., P. L. Kendall, and J. W. Thomas. 2012. Autoantigen-specific B-cell depletion overcomes failed immune tolerance in type 1 diabetes. *Diabetes* 61: 2037–2044.
- Coutinho, A., M. D. Kazatchkine, and S. Avrameas. 1995. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 812–818.
- Baumgarth, N. 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 34–46.
- Kendall, P. L., E. J. Woodward, C. Hulbert, and J. W. Thomas. 2004. Peritoneal B cells govern the outcome of diabetes in non-obese diabetic mice. *Eur. J. Immunol.* 34: 2387–2395.
- Ryan, G. A., C. J. Wang, J. L. Chamberlain, K. Attridge, E. M. Schmidt, R. Kenefick, L. E. Clough, K. Dunussi-Joannopoulos, K.-M. Toellner, and L. S. K. Walker. 2010. B1 cells promote pancreas infiltration by autoreactive T cells. *J. Immunol.* 185: 2800–2807.
- Mariño, E., M. Batten, J. Groom, S. Walters, D. Liuwantara, F. Mackay, and S. T. Grey. 2008. Marginal-zone B-cells of nonobese diabetic mice expand with diabetes onset, invade the pancreatic lymph nodes, and present autoantigen to diabetogenic T-cells. *Diabetes* 57: 395–404.
- Kendall, P. L., J. B. Case, A. M. Sullivan, J. S. Holderness, K. S. Wells, E. Liu, and J. W. Thomas. 2013. Tolerant anti-insulin B cells are effective APCs. *J. Immunol.* 190: 2519–2526.
- Turley, S., L. Poirot, M. Hattori, C. Benoist, and D. Mathis. 2003. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *J. Exp. Med.* 198: 1527–1537.
- Gagnerault, M.-C., J. J. Luan, C. Lotton, and F. Lepault. 2002. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J. Exp. Med.* 196: 369–377.
- Turley, S. J., J.-W. Lee, N. Dutton-Swain, D. Mathis, and C. Benoist. 2005. Endocrine self and gut non-self intersect in the pancreatic lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17729–17733.
- Rangel-Moreno, J., J. E. Moyron-Quiroz, D. M. Carragher, K. Kusser, L. Hartson, A. Moquin, and T. D. Randall. 2009. Omental milky spots develop in the absence of lymphoid tissue-inducer cells and support B and T cell responses to peritoneal antigens. *Immunity* 30: 731–743.
- Ludewig, B., B. Odermatt, S. Landmann, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 1998. Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *J. Exp. Med.* 188: 1493–1501.
- Kendall, P. L., G. Yu, E. J. Woodward, and J. W. Thomas. 2007. Tertiary lymphoid structures in the pancreas promote selection of B lymphocytes in autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 178: 5643–5651.
- Lee, Y., R. K. Chin, P. Christiansen, Y. Sun, A. V. Tumanov, J. Wang, A. V. Chervonsky, and Y.-X. Fu. 2006. Recruitment and activation of naive T cells in the islets by lymphotoxin beta receptor-dependent tertiary lymphoid structure. *Immunity* 25: 499–509.
- Herlands, R. A., S. R. Christensen, R. A. Sweet, U. Hershberg, and M. J. Shlomchik. 2008. T cell-independent and Toll-like receptor-dependent antigen-driven activation of autoreactive B cells. *Immunity* 29: 249–260.
- William, J., C. Euler, S. Christensen, and M. J. Shlomchik. 2002. Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science* 297: 2066–2070.
- Winer, S., H. Tsui, A. Lau, A. Song, X. Li, R. K. Cheung, A. Sampson, F. Affifyan, A. Elford, G. Jackowski, et al. 2003. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat. Med.* 9: 198–205.
- Razavi, R., Y. Chan, F. N. Affifyan, X. J. Liu, X. Wan, J. Yantha, H. Tsui, L. Tang, S. Tsai, P. Santamaria, et al. 2006. TRPV1⁺ sensory neurons control β cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* 127: 1123–1135.

Supplemental Information

In vivo detection of peripherin-specific autoreactive B cells during type 1 diabetes pathogenesis

Nahir Garabatos^{*}, Raimon Alvarez^{*}, Jorge Carrillo[†], Jorge Carrascal[†], Cristina Izquierdo^{*}, Harold D. Chapman[‡], Maximiliano Presa^{*}, Conchi Mora[†], David V. Serreze[‡], Joan Verdaguer[†] and Thomas Stratmann^{*§}

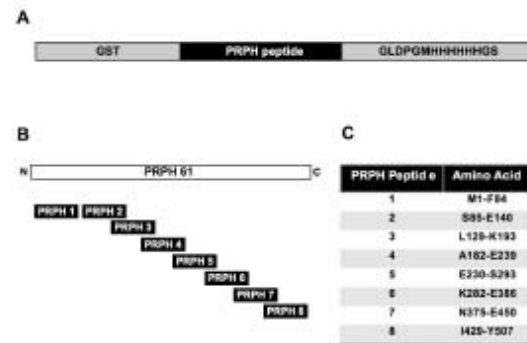
^{}Department of Physiology and Immunology, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain*

[†]Immunology Unit, Department of Experimental Medicine, School of Medicine, University of Lleida and IRB Lleida, 25008 Lleida, Spain

[‡]The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA

This document contains the following items:

1. Supplemental Figure S1 PRPH GST fusion proteins.
2. Supplemental Figure S2 Identification of PRPH₄₇₃₋₄₉₅ as the epitope recognized by anti-PRPH mAbs.
3. Supplemental Figure S3 Humoral response to GST in NOD females.

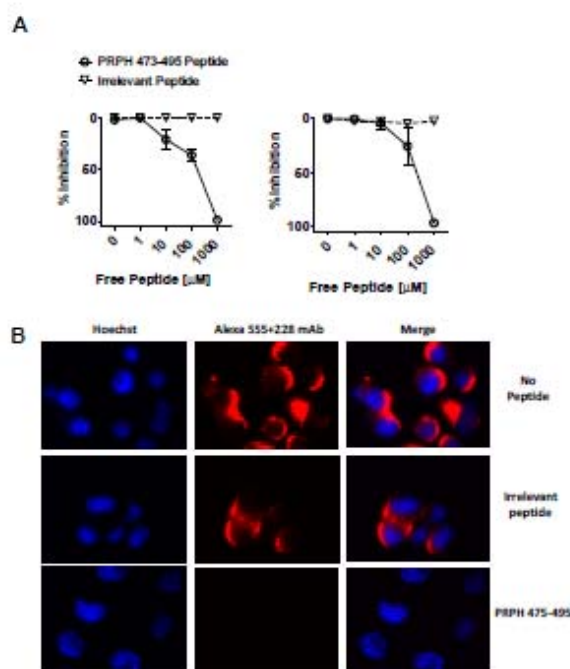


Supplemental Figure S1 PRPH GST fusion proteins.

(A) PRPH peptides were cloned into a modified pGEX vector. The vector coded for GST, followed by the PRPH peptide and a tail sequence containing a histidine tag.

(B) Approximate location of the 8 PRPH peptides within the PRPH 61 KD isoform. All but the first 2 peptides overlapped by 10 to 22 amino acids.

(C) Table showing the first and last amino acid of PRPH peptides 1 to 8.

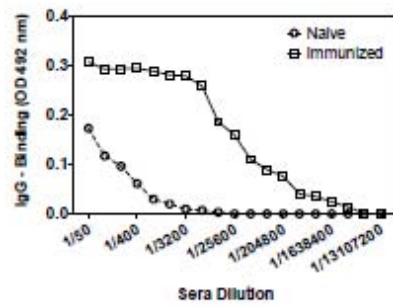


Supplemental Figure S2. Identification of PRPH₄₇₃₋₄₉₅ as the epitope recognized by anti-PRPH mAbs.

(A) mAb 228 E1 (left) and 259 B (right) recognize a synthetic version of PRPH₄₇₃₋₄₉₅. An ELISA competition assay is shown, using plate-bound GST-PRPH₄₇₃₋₄₉₅ and free synthetic peptide PRPH₄₇₃₋₄₉₅ for competition. mAbs were preincubated using the indicated concentrations of free peptide overnight and next added to coated plates. Bound mAb was detected using anti-mouse IgG. Values of the GST blank control were subtracted during analysis. The irrelevant synthetic PRPH₄₃₅₋₄₄₉ peptide was used as a control in this assay.

(B) PRPH₄₇₃₋₄₉₅ blocks binding to native PRPH.

Murine N1E115 neuroblastoma cells expressing PRPH were seeded on poly-lysine cover slips overnight, fixed with PBS 4% formaldehyde and permeabilized with PBS containing 0.01% of Triton. Cells were stained overnight with mAb 228 E1 pre-incubated with PBS only, with 100 μ M PRPH₄₇₃₋₄₉₅ peptide or with 100 μ M PRPH₄₃₅₋₄₄₉ as irrelevant peptide, followed by incubation of a secondary antibody Alexa 555-tagged goat anti-mouse IgG antibody (10 μ g/ml). Cells were counterstained with Hoechst and analyzed in a DMIRB Leica Fluorescence Microscopy. Data are representative of three independent experiments.



Supplemental Figure S3 Humoral response to GST in NOD females.

NOD females were immunized at day 0 and day 21 i.p. with GST emulsified in CFA and IFA, respectively, and the presence of anti-GST IgG was analyzed 4 days later in sera by ELISA using coated GST protein. The response of naïve versus immunized mice is shown.