

RESULTADOS

SEGUNDA PARTE: AUTOANTÍGENOS INVOLUCRADOS EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE

1. Precauciones

Las precauciones generales, enumeradas en el apartado 1 de resultados en la primera parte de esta tesis, se han considerado en esta segunda parte, para asegurar que todos los datos obtenidos fueran comparables aún entre antígenos diferentes.

La especificidad de todos los productos de PCR obtenidos fue confirmada por hibridación con una sonda complementaria específica, y fueron repetidos posteriormente mediante PCR radioactiva.

2. Diseño de cebadores para detectar transcritos de MOG.

El gen MOG humano tiene un tamaño de 11.1 Kb y se organiza en 10 exones. Los transcritos dominantes de MOG, sin embargo, están codificados por 8 exones homólogos (Hilton et al., 1995). La estructura del gen MOG se encuentra representada en el gráfico 8 y ayudará en la interpretación de las variantes de splicing alternativo del mRNA del MOG humano. Se han descrito 9 variantes de splicing alternativo del mRNA: 4 isoformas alfa, 4 isoformas beta, y una forma corta. Como puede apreciarse en el gráfico 8, todas las variantes de splicing del mRNA contienen el péptido señal codificado por el exón 1, el primer dominio transmembrana codificado por el exón 4, y parte del dominio citoplasmático codificado por el exón 5. Además, todas las variantes, excepto la alfa 4, contienen el dominio Ig-like codificado por el exón 2, y todas, excepto la beta 4, contienen el exón 7.

La principal diferencia entre las formas alfa y beta está en que las formas beta contienen un exón 8 mas largo. La forma corta se diferencia de las formas alfa y beta en que ha perdido parte del exón 6 y no contiene los exones 7 ni 8.

Para poder diferenciar las formas de *splicing* de MOG, diseñamos un cebador *sense* complementario a las secuencias contenidas en el exón 1, común a todas las isoformas de MOG, y un par de cebador antisense en los exones 7 y 8 para amplificar formas alfa y beta, respectivamente. Con estos cebadores, se pueden amplificar y diferenciar por el tamaño molecular, las 4 formas alfa y las 4 formas beta. Sin embargo, debido a la homología de la secuencias, la forma corta de MOG no puede ser diferenciada de las alfa y beta.

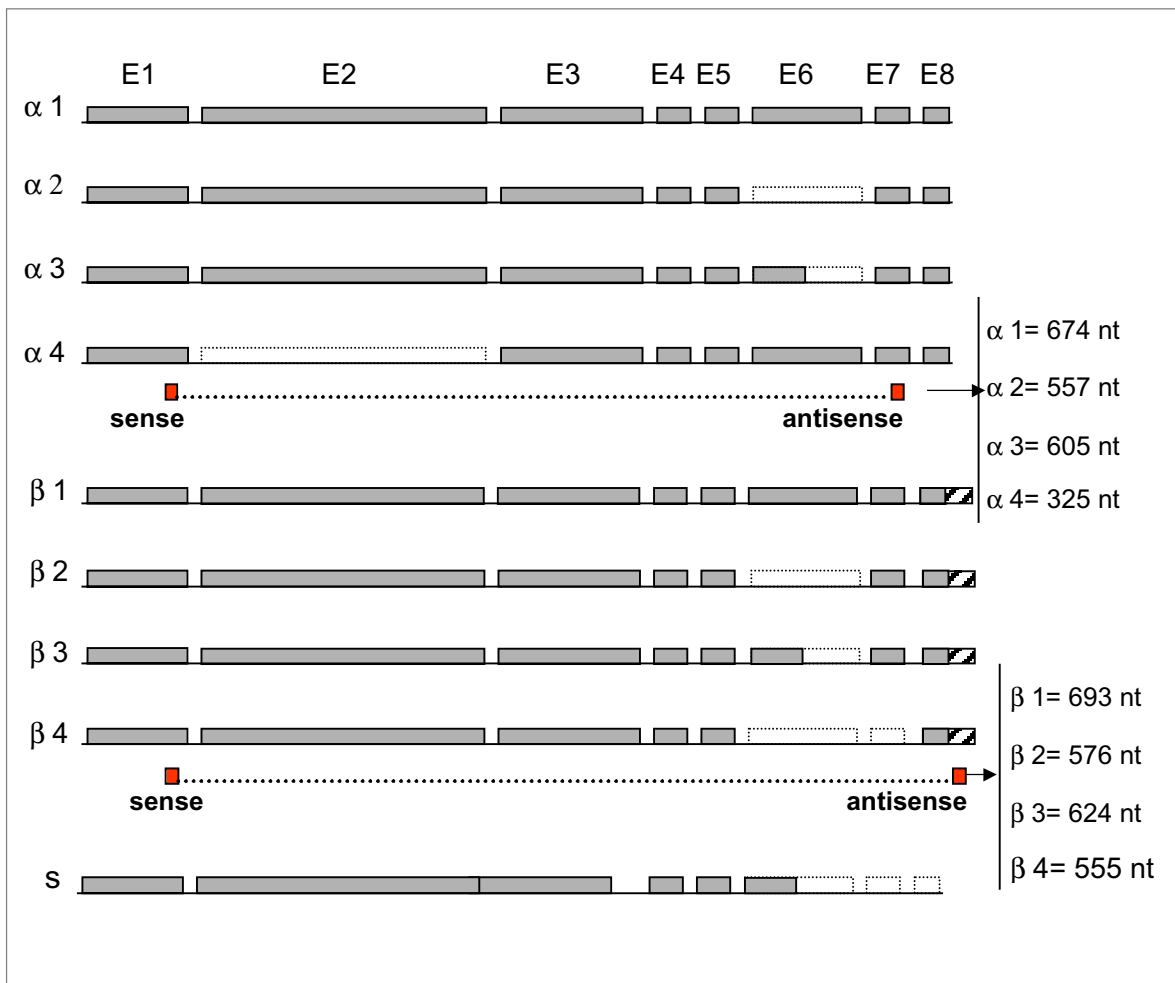


Gráfico 8: Esquema de la organización genómica de MOG. E: exones

3. Titulación de la sensibilidad de los cebadores y curvas de reacción de PCR

La influencia de los cebadores en la sensibilidad de la detección fue determinada mediante los experimentos de titulación. Estos experimentos se realizaron por PCR, amplificando cantidades conocidas de amplímero purificado y cuantificado, obtenido previamente a partir de cerebro humano. De 0,1 a 10^8 copias de cada amplímero se colocaron como molde en la reacción de PCR, obteniéndose umbrales de detección entorno a las 10 copias (Figura 2.1).

Las condiciones de amplificación de los transcritos de antígenos del SNC fueron ajustadas mediante curvas de reacción en el panel de tejidos control. Estas curvas nos permitieron determinar el número de ciclos óptimo para la detección de cada autoantígeno en el timo (ver Figura 2.2 y Tabla III).

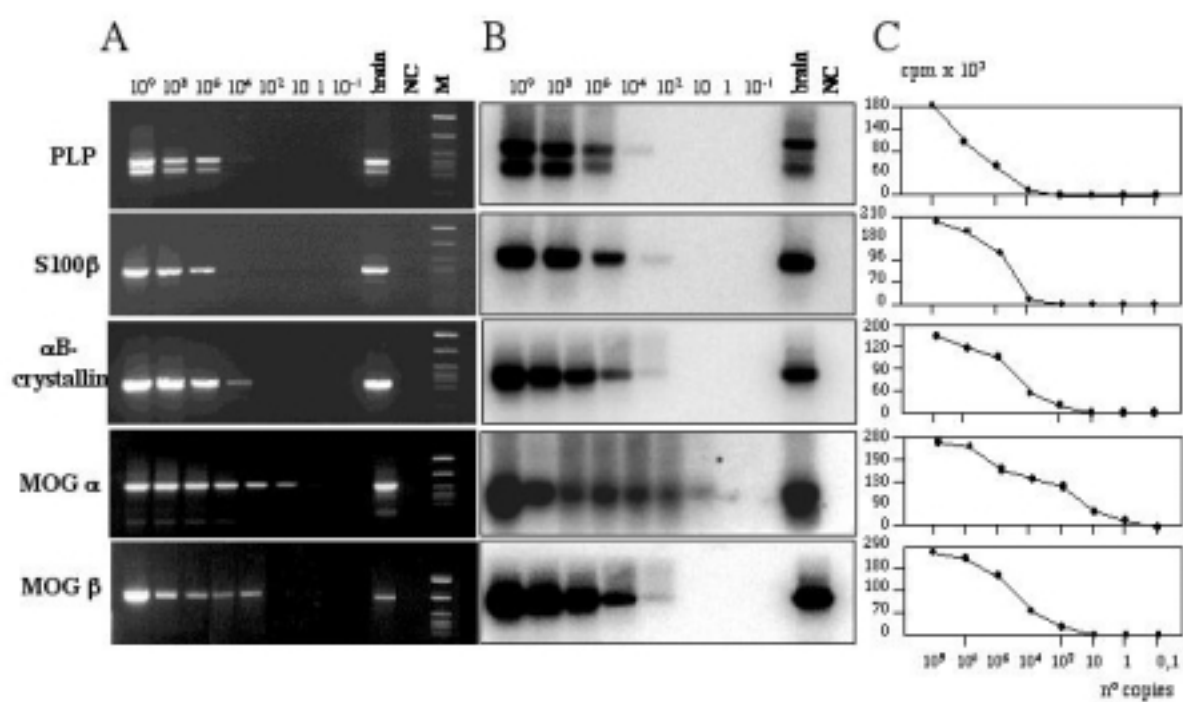


Figura 2.1 Titulación de la sensibilidad de los cebadores. A, bromuro de etidio. B, hibridación con oligosondas específicas marcadas con ^{32}P . C, Cuantificación.

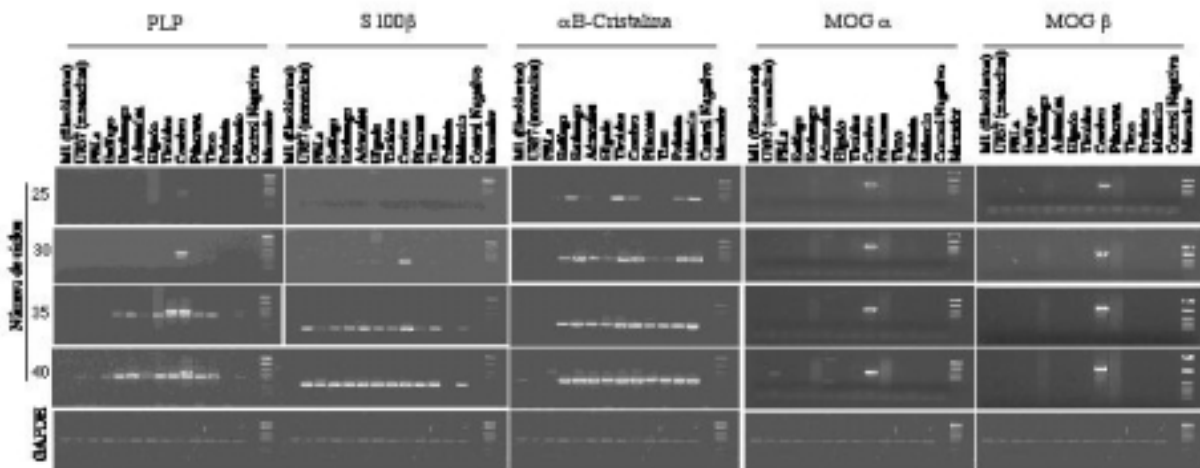


Figura 2.2 Curvas de reacción de PCR: Los antígenos fueron amplificados en el panel de tejidos controles a 25, 30, 35 y 40 ciclos de reacción. El control positivo utilizado fue cerebro.

De acuerdo a las condiciones preestablecidas, transcritos de PLP, S-100 β y α B-cristalina fueron claramente amplificados en cerebro, pero también en otros tejidos control como esófago, estómago, glándulas adrenales, hígado, tiroides, páncreas y próstata. En contraste, las isoformas alfa $_1$ y beta $_1$ de MOG fueron amplificadas exclusivamente en cerebro (figura 2.3 A). La especificidad de los productos de PCR obtenidos fue confirmada por hibridación con una sonda complementaria específica marcada con ^{32}P (figura 2.3 B). Todos los transcritos de α B-cristalina obtenidos a partir de tejidos control humanos fueron hibridados con la sonda específica, como puede apreciarse en la figura 2.3 B. En contraste, el producto de α B-cristalina obtenido a partir de retina de rata no hibridó debido a que la sonda complementaria utilizada fue específica para la secuencia humana de α B-cristalina, pero no de rata.

Todas las membranas hibridadas de cada autoantígeno, y sus correspondientes experimentos de titulación fueron expuestos simultáneamente en las placas radiosensibles (Fujifilm, Fuji photo film co. LTD) y los valores de las c.p.m. obtenidas en la cuantificación fueron convertidos en número de copias.

Los resultados obtenidos en el panel de tejidos control sugieren que los antígenos PLP, S-100 β y α B-cristalina no guardan una expresión restringida como se pensaba, y que también se encuentran expresados fuera del SNC. Las isoformas alfa $_1$ y beta $_1$ de MOG, reflejaron una expresión claramente restringida al cerebro, y no fueron detectadas en ninguno de los tejidos control estudiados. Los resultados obtenidos de la cuantificación de la expresión en los tejidos control se esquematizan en el gráfico 9.

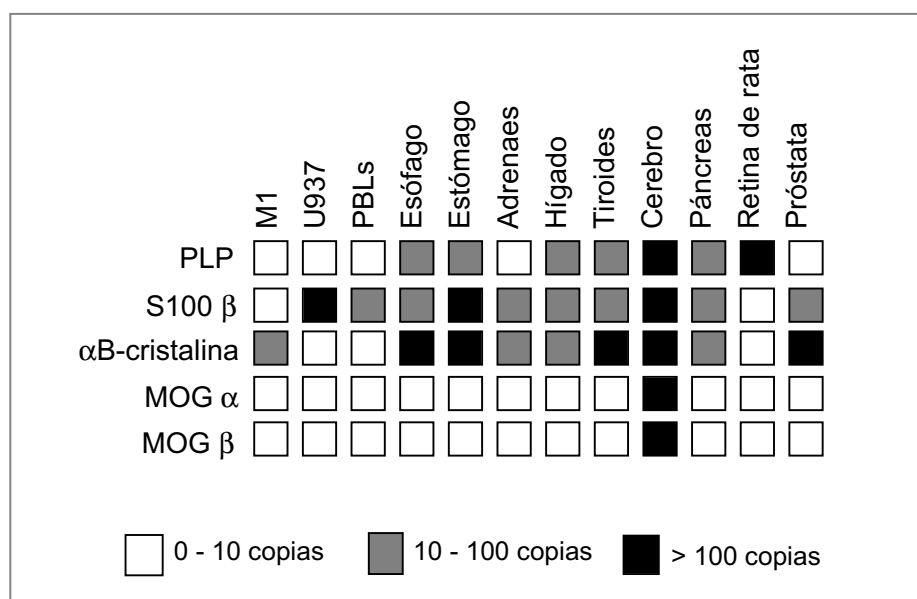


Gráfico 9: Niveles de transcripción de los antígenos del SNC en los tejidos control

4. Los autoantígenos del SNC, excepto MOG, se expresan en el timo humano

La expresión de los autoantígenos del SNC se estudió en un panel de 14 timos normales y tres muestras tímicas patológicas. Tránscritos de α B-cristalina y S100 β fueron detectados en todas las glándulas tímicas (17/17, 100%), a niveles muy similares. El nivel de expresión de éstos autoantígenos fue además independiente de la edad y paralelo a la expresión de GAPDH (figura 2.4).

Los tránscritos del autoantígeno PLP fueron detectados en todas las glándulas tímicas (17/17, 100%). La forma predominante de expresión fue la forma corta derivada de *splicing* alternativo, conocida como DM20. En cambio, la forma *full-length* de PLP se detectó principalmente en cerebro, en retina de rata y en una minoría de las glándulas tímicas en bajo nivel de expresión (4/17, 23%)

Observamos variaciones interindividuales en los niveles de expresión tímica de DM20. Estas variaciones fueron claras cuando se inspeccionaron los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio a la luz UV, y fueron confirmadas posteriormente en la cuantificación de las membranas hibridadas y de las PCR radioactivas. La posibilidad de que la variabilidad observada se debiera a heterogeneidad de las muestras se descartó mediante precaución de extraer el mRNA de bloques representativos de toda la glándula, de normalizar los cDNAs y de repetir al menos tres veces la PCR a partir de muestras diferentes de RNA. Los resultados fueron siempre consistentes.

Las isoformas de MOG no fueron detectadas en ninguno de los 17 timos estudiados. Esto no se debió a problemas de sensibilidad de la técnica empleada porque con nuestro sistema de amplificación, 35 ciclos de reacción nos permitieron detectar las isoformas α_1 y β_1 en cerebro, con una sensibilidad de 10 a 100 copias. Además, no detectamos MOG fuera del SNC, aún incrementando hasta 45 el número de ciclos de reacción de PCR radioactiva, o mediante hibridación con sondas específicas marcadas con 32 P (Figura 2.4). Los resultados de la cuantificación de la expresión de los antígenos del SNC en las muestras tímicas se encuentran esquematizados en el gráfico 10.

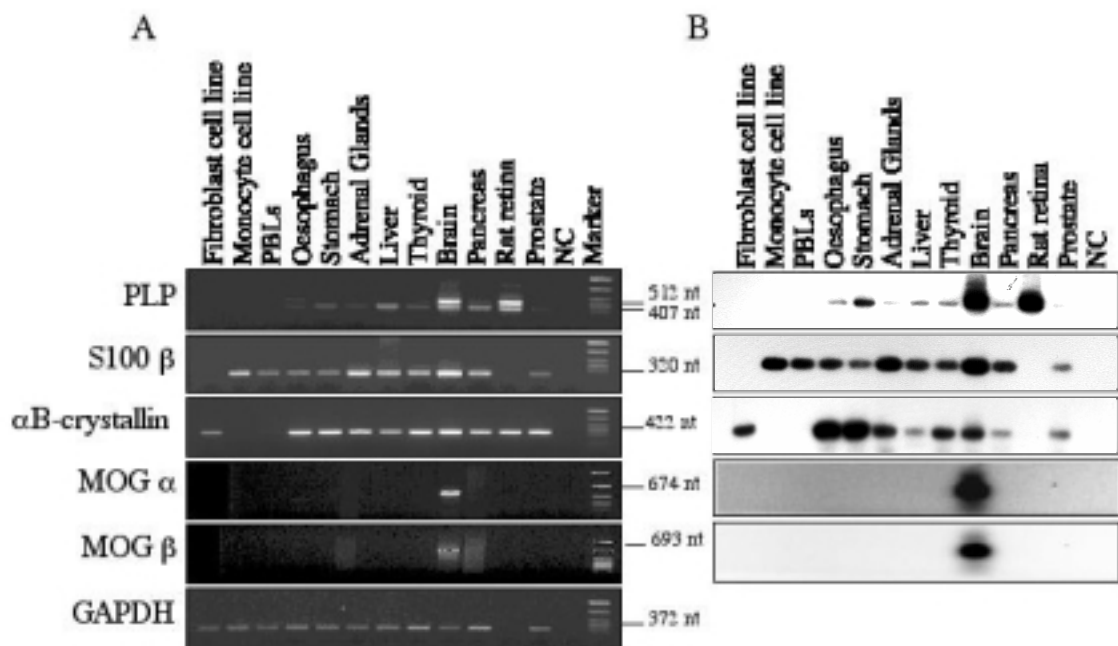


Figura 2.3 Amplificación de los antígenos del SNC en los tejidos controles.
 A, Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. B, Southern blot.

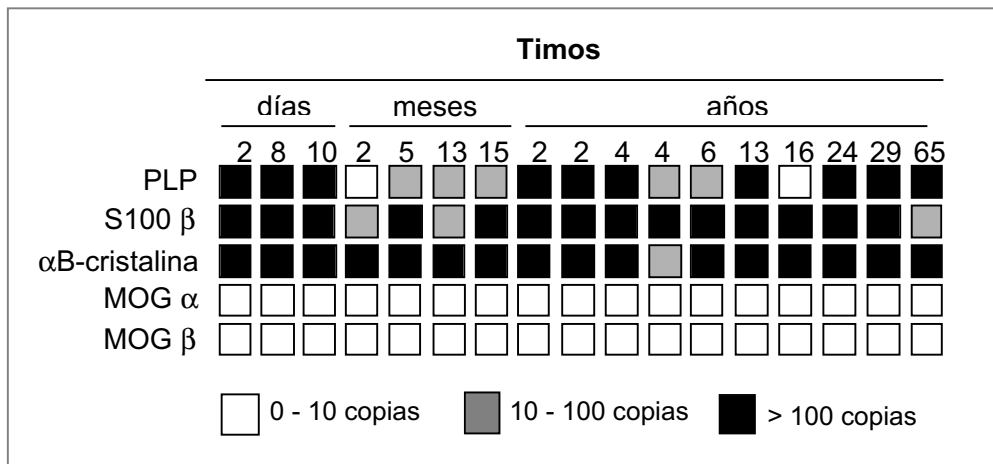
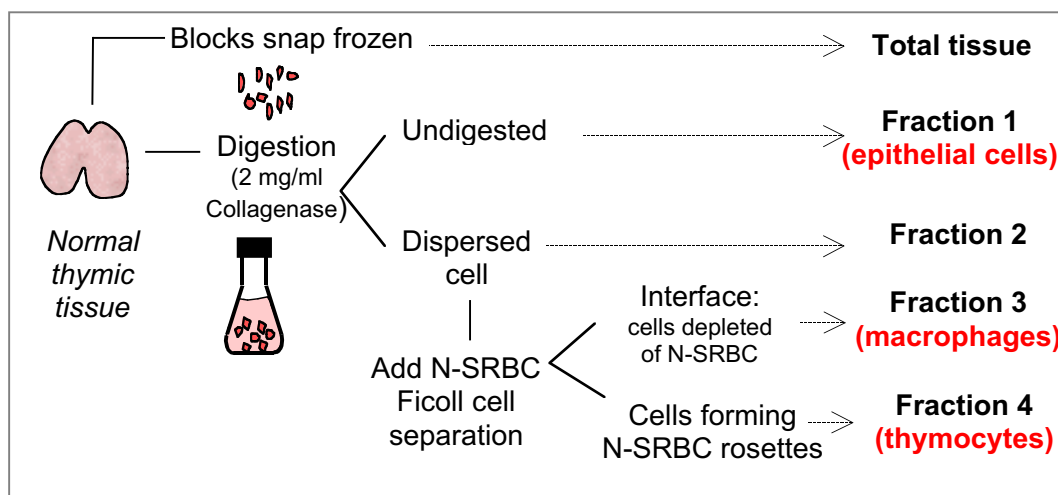


Gráfico 10: Niveles de transcripción de los antígenos del SNC en los timos

5. Transcripción de los antígenos del SNC en las fracciones celulares tímicas

Con el objetivo de localizar la población celular tímica responsable de la transcripción de los autoantígenos del SNC, estudiamos mediante RT-PCR los niveles de expresión de PLP, S-100β y αB-cristalina en fracciones celulares tímicas. Las fracciones celulares fueron obtenidas por digestión enzimática y caracterizadas por citometría de flujo e inmunofluorescencia (Sospedra et al., 1998). El procedimiento de obtención se esquematiza en la figura del pie de página. Las seis glándulas tímicas a partir de las cuales se obtuvieron las fracciones eran timos normales y con diferentes edades: 7 días, 12 días, 1 mes, 14 meses, 15 meses y 12 años. Los cDNAs fueron previamente normalizados según la expresión de GAPDH, lo cual permitió la comparación de la expresión de antígenos entre ellas. Todas las fracciones fueron positivas para los autoantígenos del SNC, como era de esperar, ya que la composición de cada fracción celular resultó principalmente enriquecida en algún tipo celular pero heterogénea debido al procedimiento de obtención. No obstante, la fracción 1, enriquecida en células epiteliales, fue la que presentó mayores niveles de expresión de transcritos de PLP, S-100β y αB-Cristalina (figura 2.5).



Procedimiento de obtención de las fracciones celulares tímicas (ver apartado de *Materiales y Métodos*, página 24)

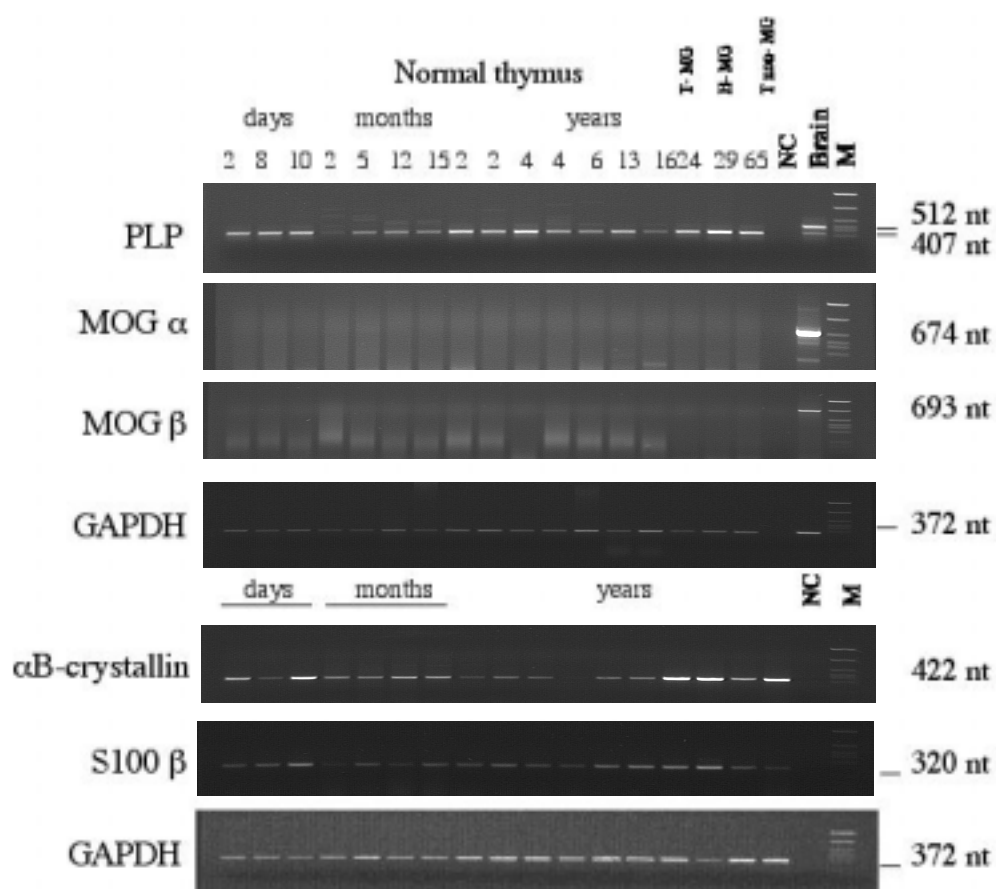


Figura 2.4 A, Expresión de los antígenos del SNC en el panel de timos. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

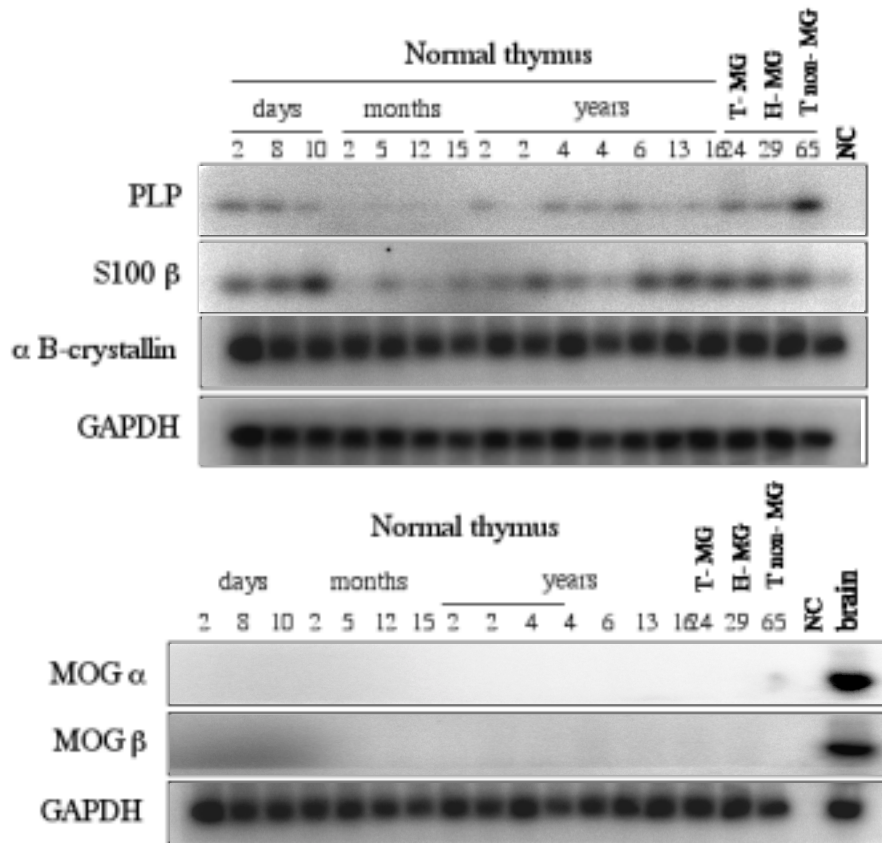


Figura 2.4 B, Expresión de los antígenos del SNC en los timos por PCR radioactiva

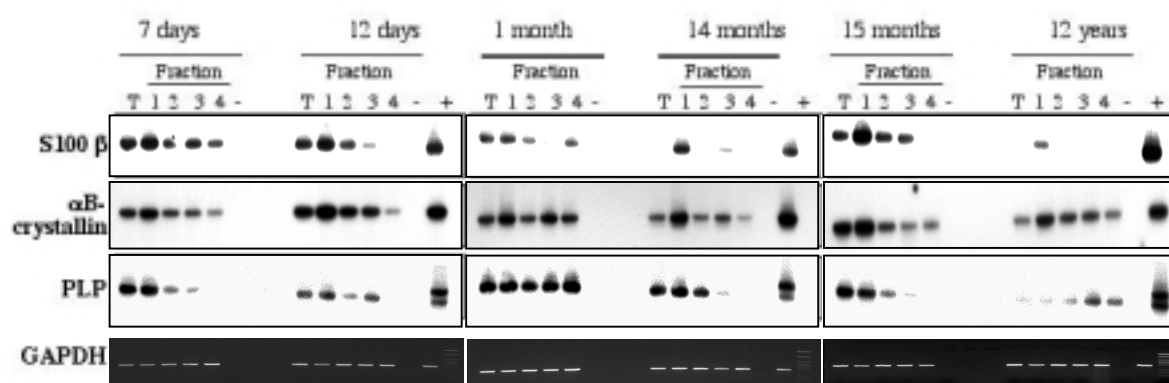


Figura 2.5 Expresión de los antígenos del SNC en las subpoblaciones tímicas aisladas a partir de seis glándulas de diferentes edades. T, tejido total; -, control negativo; +, control positivo (cerebro)

6. Transcripción de los antígenos del SNC en las microdisecciones tímicas

Con el fin de identificar la localización histológica de las células responsables de la transcripción de estos autoantígenos en el timo, estudiamos por RT-PCR la expresión de PLP y S100 β en las microdisecciones obtenidas de cortezas y médulas tímicas. Los cDNAs de las cortezas y las médulas fueron normalizados para el gen GAPDH tal como se describió. Encontramos transcritos de PLP y de S100 β , tanto las cortezas como en las médulas tímicas, pudiendo predecirse una expresión ligeramente superior en las médulas (Figura 2.6)

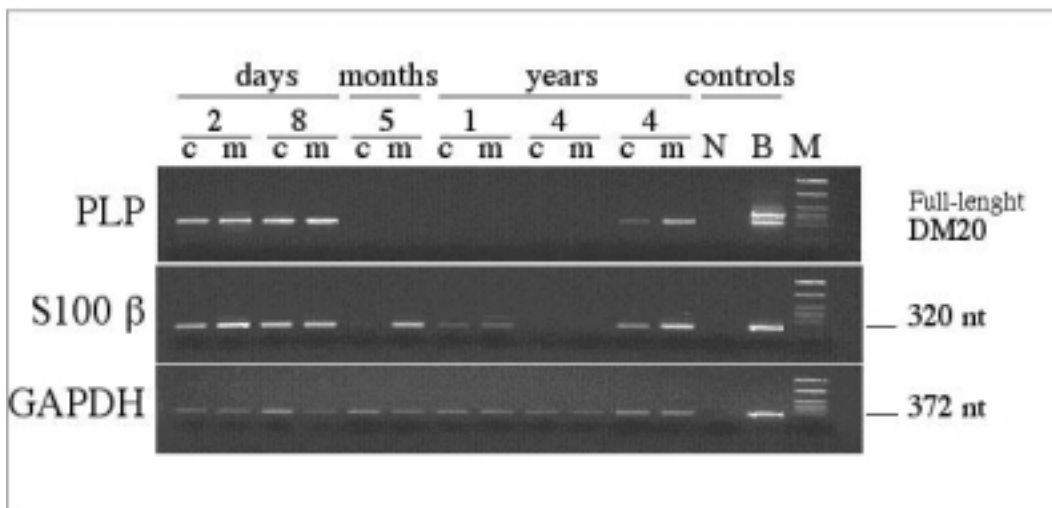


Figura 2.6: PCR de las microdisecciones de cortezas y médulas tímicas: *c*, cortezas; *m*, médulas; *N* control negativo; *B*, control positivo (*brain*); *M* marcador de peso molecular

DISCUSIÓN Resultados Parte II

Los autoantígenos del sistema nervioso central se consideraron durante mucho tiempo anatómicamente secuestrados y por lo tanto separados del sistema inmunológico a través de la barrera hemato-encefálica. Este concepto ha cambiado con la observación de que ciertos antígenos específicos del sistema nervioso central se encuentran expresados en tejidos periféricos. En este trabajo, mediante RT-PCR, Southern blot y PCR radioactiva demostramos expresión de los principales autoantígenos involucrados en Esclerosis Múltiple, con excepción de MOG, en tejidos periféricos y en el timo. La relación entre la expresión tímica de éstos antígenos y la inducción de tolerancia central se podría presumir, excepto para MOG, el cual constituye un ejemplo clásico de antígeno secuestrado.

La expresión de los autoantígenos involucrados en Esclerosis Múltiple en tejidos humanos linfoides y no linfoides ha sido previamente estudiada por otros autores (Lauriola et al., 1984) (Klein et al., 2000; Mathisen et al., 1993; van Sechel et al., 1999). Nuestro trabajo, sin embargo, es el primero en el que se analiza la expresión de los principales autoantígenos involucrados en Esclerosis Múltiple de manera sistemática, en un panel amplio de tejidos normales linfoides y no linfoides, y de timos de diferentes edades. Este abordaje sistemático sumado al empleo de una metodología semi-cuantitativa normalizada nos permitió la comparación de resultados de diferentes antígenos en distintas muestras de tejidos.

α B-cristalina

α B-cristalina es una proteína del shock térmico (Klemenz et al., 1991) que fue identificada como autoantígeno por su capacidad de inducir respuestas proliferativas en los linfocitos de sangre periférica de pacientes con MS (van Noort et al., 1995). Sin embargo, α B-cristalina no es un antígeno encefalitogénico en ratones (van Stipdonk et al., 2000), hecho que se ha atribuido a la existencia de tolerancia central debido a la expresión intratímica del mismo (van Sechel et al., 1999). En humanos, en contraste, la respuesta proliferativa de las células T frente a éste antígeno se atribuyó a la falta de tolerancia central, debido a la ausencia de expresión de α B-cristalina en el timo (van Sechel et al., 1999).

En este trabajo, detectamos la expresión de α B-cristalina en todos los timos humanos estudiados. Aunque nuestros resultados contrastan con los de van Sechel et al., debe notarse que estos autores estudiaron la expresión de α B-cristalina en una sola glándula tímica humana.

S100β

S100β es una proteína que une el calcio y que se encuentra abundantemente expresada en los astrocitos (Baimbridge et al., 1992). Experimentos en ratas demuestran que cuando se

transfieren linfocitos T específicos contra S100 β previamente expandidos *in-vitro*, éstas células provocan una forma de EAE asociada a úveo-retinitis (Kojima et al., 1994). Siendo la S100 β una proteína de expresión ubicua, las lesiones confinadas al sistema nervioso central y al ojo son un hecho interesante. Aunque la expresión tímica de la S100 β ha sido previamente observada en rata (Kojima et al., 1997) y en humanos (Lauriola et al., 1984), quisimos evaluar la expresión en nuestro panel de timos de diferentes edades. Tal y como era de esperar, nuestros datos confirman la expresión de S100 β en los tejidos controles y en los timos humanos. No detectamos variaciones interindividuales en los niveles de expresión, ni tampoco observamos variantes de *splicing* alternativo de esta proteína. Por lo tanto, la demostración de células T reactivas periféricas contra S100 β en individuos normales (Schmidt et al., 1997) podría atribuirse a ignorancia de las células T.

Proteína proteolipídica (PLP)

PLP es el principal componente proteico de la mielina en el sistema nervioso central, y es además un importante autoantígeno involucrado en MS. En el modelo animal (EAE) existen, por ejemplo, dos péptidos de PLP (PLP₁₃₉₋₁₅₁ y PLP₁₇₈₋₁₉₁) que son altamente encefalitogénicos en ratones SLJ/J (Greer et al., 1996; Tuohy et al., 1989). Sin embargo, la existencia de tolerancia central a esta proteína ha sido claramente demostrada por la fuerte respuesta de las células T provocada por inmunización con PLP a ratones deficientes en PLP y a ratones de la cepa salvaje (Klein et al., 2000). En estos animales, se demostró además que la tolerancia de las células T frente a la PLP depende exclusivamente de la expresión de este antígeno en el epitelio tímico medular. Sin embargo, debido a que se puede inducir EAE en ratones SLJ/J, la tolerancia no es completa y se ha atribuido a que los dos epitopes más encefalitogénicos de la PLP no se encuentran expresados en el timo (Anderson et al., 2000; Klein et al., 2000). Aunque estas observaciones se ha hecho en ratones, Klein et al. (Klein et al., 2000) demostró una expresión exclusiva de la forma corta de PLP, la variante de *splicing* DM20 en una muestra tímica humana, sugiriendo que en humanos podría ocurrir el mismo mecanismo de escape a la tolerancia central de células T.

En nuestro trabajo, hemos extendido y confirmado sus observaciones. Demostramos expresión de PLP en todas las glándulas tímicas estudiadas, con variaciones interindividuales en los niveles de transcripción. Variaciones interindividuales en la expresión tímica no se habían descrito anteriormente para autoantígenos del sistema nervioso central. Esta observación tiene importancia ya que se ha demostrado, al menos para tres autoantígenos (insulina, antígeno retinal S y MBP) que la variabilidad en los niveles de expresión tímica se asocian a susceptibilidad a padecer la enfermedad autoinmune (Egwuagu et al., 1997; Liu et al., 2001; Pugliese et al., 1997; Vafiadis et al., 1997).

MOG

De acuerdo a nuestras observaciones, MOG es el caso mas genuino de autoantígeno secuestrado, cuya expresión se encuentra restringida al sistema nervioso central. Las pequeñas cantidades de MOG presentes en los oligodendrocitos, hace improbable la hipótesis de que este antígeno, en condiciones fisiológicas, pueda ser liberado a la circulación sanguínea y a través de ella llegue al timo. La ausencia de tolerancia central contra MOG podría explicar la respuesta humoral y celular frente a este antígeno que se observa en los pacientes con MS.

Nuestros resultados respecto de MOG concuerdan con observaciones hechas en ratones por Iglesias et al. (Iglesias et al., 2001), quien mediante RT-PCR detectó transcritos de MOG exclusivamente en el sistema nervioso central. Además, en experimentos con ratones que expresan una Ig transgénica específica para MOG, Litzemberger et al demostró que no existen diferencias en el repertorio de células B, entre los ratones transgénicos que expresan Ig específica de MOG y ratones deficientes en MOG, indicando que MOG no participa en el establecimiento del repertorio inmune (Litzemberger et al., 2000).

La expresión de MBP en timo no ha sido evaluada en este trabajo, debido a que existe una amplia evidencia de que en el timo se expresa una forma de *splicing* alternativo de MBP, llamada *golli*-MBP, pero no la forma clásica de este antígeno (Mathisen et al., 1993). La expresión de *golli*-MBP ha sido demostrada por Sospedra et al. en un panel de timos humanos de diferentes edades (Sospedra et al., 1998). De forma similar a PLP, algunos epitopes contenidos en la forma clásica de MBP estarían restringidos al sistema nervioso central (Pribyl et al., 1993).

Entre los diferentes linajes celulares presentes en el timo, las células dendríticas y las células epiteliales han sido involucradas en la expresión de antígenos y también en la contribución en el proceso de inducción de la tolerancia (Antonia et al., 1995; Klein et al., 1998; Pugliese et al., 2001; Smith et al., 1997; Sospedra et al., 1998). Los resultados obtenidos con los experimentos de fraccionamiento celular tímico a partir de tejido tímico total, sugieren que las células epiteliales tímicas son las responsables de la expresión de antígenos del sistema nervioso central. Además, los resultados de la microdissección de cortezas y médulas tímicas, sugieren que al menos dos antígenos, S100 β y α B-cristalina, se expresan mayoritariamente en el compartimento medular, aunque también, en menor medida, en el compartimento cortical del timo humano. Recientemente, empleando métodos mas precisos de purificación de poblaciones celulares estromales tímicas de ratón, Klein et

al. identificó a las células epiteliales medulares como el tipo celular especializado en la expresión de un amplio rango de antígenos (Derbinski et al., 2001; Klein et al., 2001).

Los resultados obtenidos a partir de numerosos modelos animales demuestran la correlación entre la expresión tímica de antígenos, la frecuencia precursores de células T autorreactivas en la periferia, y la susceptibilidad a la enfermedades autoinmunitarias. La expresión intratímica de antígenos es esencial para el mantenimiento de la tolerancia (Klein and Kyewski, 2000b) y puede intervenir ya sea en la delección de las células T autorreactivas (Klein et al., 2000; Klein and Kyewski, 2000a) o en el proceso de selección de un repertorio de células T regulatorias (Sakaguchi, 2000; Seddon and Mason, 2000). Aunque existen muchos ejemplos en modelos animales de una clara respuesta autoinmunitaria dirigida contra epitopes que no se encuentran representados en el timo (Huseby and Goverman, 2000; Klein et al., 2001), en humanos este efecto es mas difícil de demostrar por su background genético mas complejo. No obstante, los resultados presentados aquí podrían sugerir que la tolerancia central frente a los antígenos que se encuentran representados en el timo humano podría reducir las oportunidades de desarrollar enfermedades autoinmunes.

RESULTADOS

TERCERA PARTE: AUTOANTÍGENOS PROSTÁTICOS

1. Precauciones

Las precauciones generales, enumeradas en el apartado 1 de resultados en la primera parte de esta tesis, se han considerado en esta tercera parte, para asegurar que todos los datos obtenidos fueran comparables aún entre antígenos diferentes.

La especificidad de todos los productos de PCR obtenidos fue confirmada por hibridación con una sonda complementaria específica.

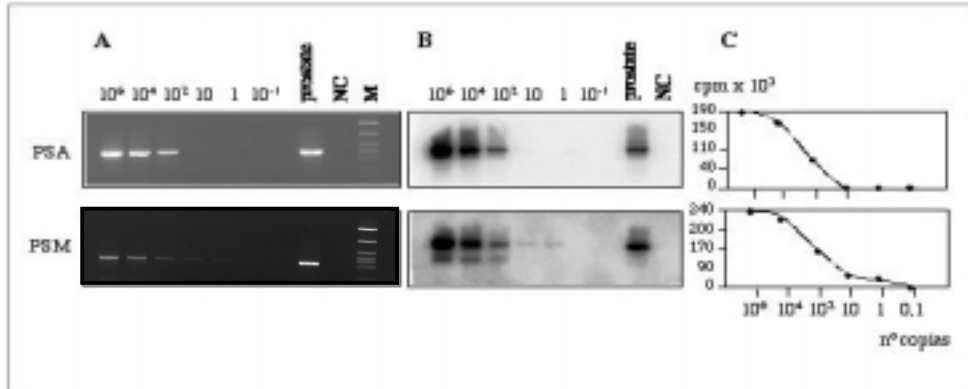
2. Titulación de la sensibilidad de los cebadores y curvas de reacción de PCR

La influencia de los cebadores en la sensibilidad de la detección fue determinada mediante los experimentos de titulación. Estos experimentos se realizaron por PCR, amplificando cantidades conocidas de amplímero purificado y cuantificado, obtenido previamente a partir de próstata humana normal. De 0,1 a 10^6 copias de cada amplímero se colocaron como molde en la reacción de PCR, obteniéndose umbrales de detección entorno a las 100 copias para PSA y a las 10 copias para PSM (Figura 3.1).

Las condiciones de amplificación de los transcritos de los antígenos prostáticos fueron ajustadas mediante curvas de reacción en el panel de tejidos control. Estas curvas nos permitieron determinar el número de ciclos óptimo para la detección de cada autoantígeno en el timo (Tabla III).

De acuerdo a las condiciones preestablecidas, transcritos de PSA fueron claramente amplificados en próstata, pero también en casi todos los otros tejidos control, excepto en glándula adrenal, cerebro y retina de rata (Figura 3.2). Transcritos de PSM fueron amplificados en próstata, pero también en esófago, glándula adrenal, hígado, tiroides y cerebro (figura 3.2). La especificidad de los productos de PCR obtenidos fue confirmada por hibridación con una sonda complementaria específica marcada con ^{32}P . Todas las membranas hibridadas de cada autoantígeno, y sus correspondientes experimentos de titulación fueron expuestos simultáneamente en las placas radiosensibles (Fujifilm, Fuji photo film co. LTD) y los valores de las c.p.m. obtenidas en la cuantificación fueron convertidos en número de copias. Los niveles de transcripción de PSA y PSM fueron de más de 100 copias en próstata, mientras que en todos los tejidos control fueron inferiores a las 100 copias (débilmente positivos) excepto para PSM en hígado y cerebro, que fueron claramente positivos, expresando más de 100 copias del antígeno.

Figura 3.1 Titulación de la sensibilidad de los cebadores . A, Bromuro de Etidio ; B Hibridación con sondas específicas marcadas con ^{32}P ; C, Cuantificación



Los resultados de la amplificación de PSA y PSM obtenidos a partir del panel de tejidos control sugieren que los antígenos PSA y PSM no guardan una expresión restringida a la próstata, sino que también se encuentran débilmente expresados en otros tejidos periféricos. Los resultados de la cuantificación de los transcritos de PSA y de PSM en los tejidos controles se hallan esquematizados en el gráfico 11.

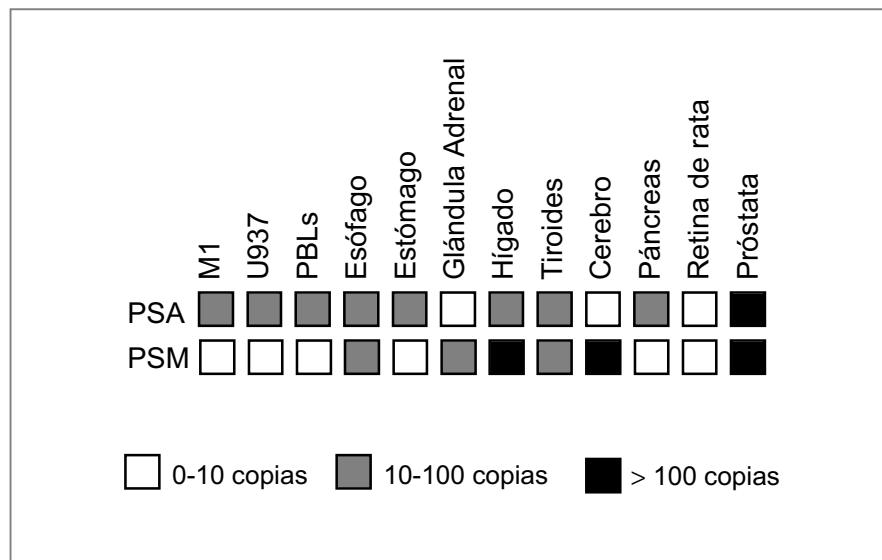
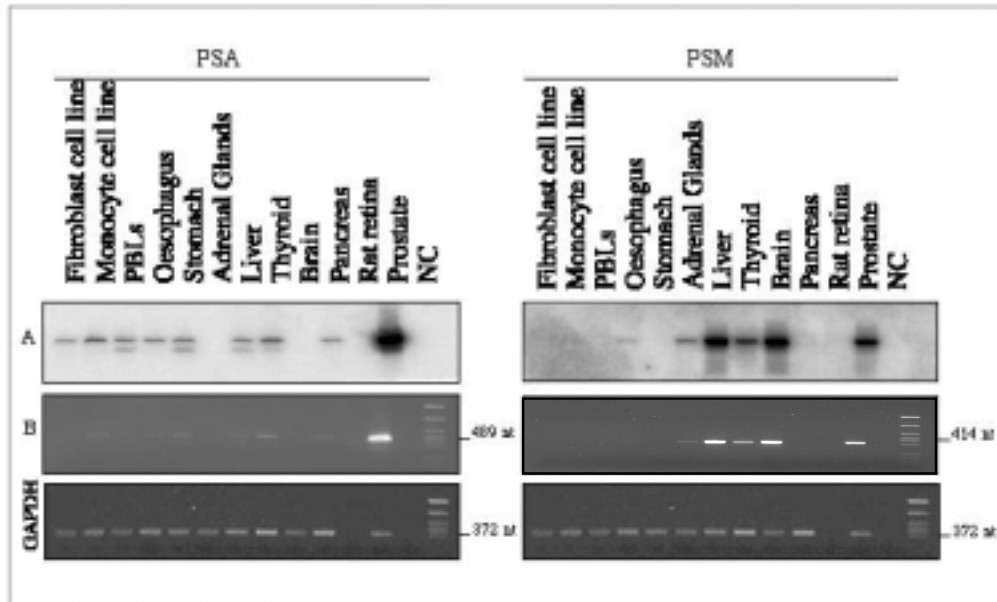


Gráfico 11: Transcripción de los antígenos prostáticos en los tejidos control

Figura 3.2 Amplificación de los antígenos prostáticos en los tejidos controles : A, hibridación con la sonda específica marcada con ^{32}P ; B, geles de agarosa 2% teñidos con BrEt; NC, control negativo; control positivo: próstata.



3. Los autoantígenos prostáticos se expresan en el timo humano

La expresión de los autoantígenos prostáticos se estudió en un panel de 17 timos: 14 timos normales y tres muestras tímicas patológicas. Tránscrios de PSA fueron detectados en 12 glándulas tímicas (12/17, 70,58%). El nivel de expresión de éste autoantígeno fue variable entre las diferentes glándulas, pero dichas variaciones no guardaron relación con la edad ni con el sexo de los individuos (figura 3.3).

Los tránscrios del autoantígeno PSM fueron detectados en 14 glándulas tímicas (14/17, 82,35%). Para PSM también observamos variaciones interindividuales en los niveles de expresión tímica, que fueron confirmadas posteriormente en la cuantificación de las membranas hibridadas y de las PCR radioactivas. La posibilidad de que la variabilidad observada se debiera a heterogeneidad de la muestras se descartó mediante la precaución de extraer el mRNA de bloques representativos de toda la glándula, de normalizar los cDNAs y de repetir al menos tres veces la PCR a partir de muestras diferentes de RNA (Figura 3.3). Los resultados de la cuantificación de la expresión de los antígenos prostáticos en las glándulas tímicas se hallan esquematizados en el gráfico 12.

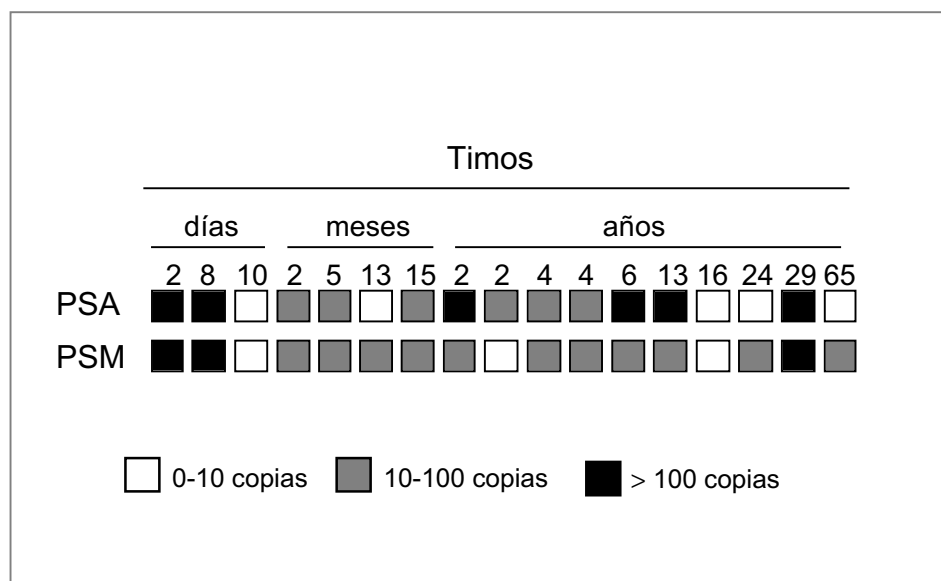
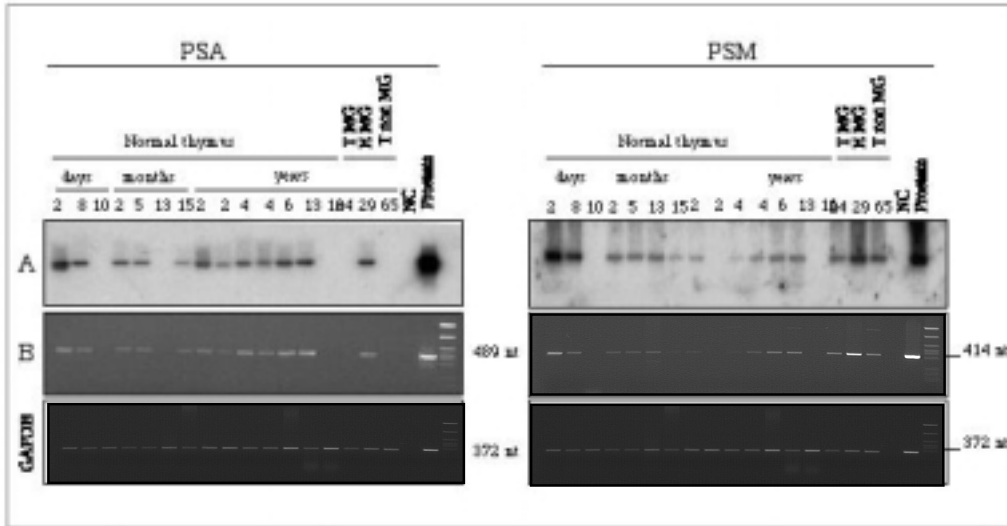


Gráfico 12: Transcripción de los antígenos prostáticos en las glándulas tímicas

Figura 3.3 Expresión de los antígenos prostáticos en el panel de glándulas tímicas
 A, Hibridación con sonda específica B, Gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio



4. Transcripción de los antígenos prostáticos en las fracciones celulares tímicas

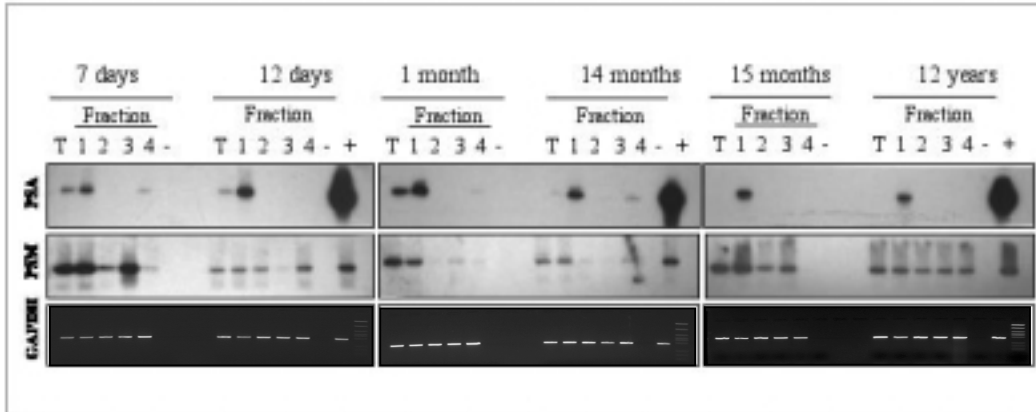
Con el objetivo de localizar la población celular tímica responsable de la transcripción de los autoantígenos prostáticos, estudiamos mediante RT-PCR los niveles de expresión de PSA y PSM en fracciones celulares tímicas. Las fracciones celulares fueron obtenidas por digestión enzimática y caracterizadas por citometría de flujo e inmunofluorescencia (Sospedra et al., 1998) tal como se describió en el apartado de resultados de la segunda parte de esta tesis.

Las seis glándulas tímicas a partir de las cuales se obtuvieron las fracciones eran timos normales y con diferentes edades: 7 días, 12 días, 1 mes, 14 meses, 15 meses y 12 años.

Los cDNAs fueron previamente normalizados según la expresión de GAPDH, lo cual permitió la comparación de la expresión de antígenos entre ellas. A pesar de que la composición de cada fracción celular resultó principalmente enriquecida en algún tipo celular pero heterogénea debido al procedimiento de obtención (ver apartado de Materiales y Métodos) la fracción 1, enriquecida en células epiteliales, fue la única fracción que presentó transcritos de PSA (ver figura 3.4).

La expresión de PSM en las fracciones celulares, por el contrario, no resultó tan claramente restringida a una fracción como en el caso de PSA, sino que sólo en las fracciones procedentes de 3 timos (1 mes, 14 meses y 15 meses) la expresión de PSM fue mayor en la fracción enriquecida en células epiteliales (figura 3.4).

Figura 3.4 Expresión del AChR en las subpoblaciones tímicas



Expresión de los antígenos prostáticos en las subpoblaciones tímicas obtenidas a partir de seis glándulas de diferentes edades.

DISCUSIÓN Resultados Parte III

Los resultados obtenidos señalan que la expresión de los antígenos prostáticos PSA y PSM en el timo humano es variable e independiente de la edad o del sexo del individuo.

El PSA es una serinoproteasa se expresa en altos niveles en el tejido prostático, pero también en bajos niveles en otros tejidos. Normalmente es sintetizado por las células epiteliales prostáticas y es secretado al fluido seminal. Además, pequeñas cantidades que proceden de la próstata pueden detectarse en la sangre de varones, donde una pequeña proporción circula libre y el resto unido a ciertos inhibidores de proteasas.

La expresión de PSA está regulada por andrógenos, el promotor del gen en la próstata contiene dos elementos reguladores dependientes de los andrógenos que le confieren una fuerte expresión en dicho órgano (Cleutjens et al., 1997). En cambio, líneas celulares de origen no prostático, PBLs y ciertos tejidos pueden expresar bajas cantidades de PSA tal como hemos observado en el panel de tejidos controles de la figura 3.2 y en concordancia con otros autores (Smith et al., 1995).

La expresión de los antígenos PSA en tejidos humanos linfoides y no linfoides no ha sido previamente estudiada por otros autores. Nuestro trabajo es el primero en el que se analiza la expresión de ambos antígenos de manera sistemática, en un panel amplio de tejidos normales linfoides y no linfoides, y de timos de diferentes edades. Este abordaje nos permitió concluir que a pesar de que la expresión del PSA en la próstata y en la circulación sanguínea depende de los andrógenos y está relacionado con la madurez sexual del individuo, las células epiteliales tímicas expresan PSA desde los primeros días de vida, a niveles de expresión similares a los de otros antígenos específicos de tejido, sin relación con la edad o el sexo del individuo acorde a lo que parece ser una propiedad intrínseca de las células epiteliales tímicas (Derbinski et al., 2001; Klein et al., 2001).

El PSM es una α -dipeptidasa expresada en la superficie de las células epiteliales prostáticas (Gregorakis et al., 1998) que se emplea como marcador específico del epitelio prostático, ya que las células basales son negativas. Otros autores, además de nosotros, han detectado expresión de PSM fuera de la próstata, como por ejemplo en la mucosa duodenal y en los túbulos renales (Lintula and Stenman, 1997).

Encontramos que el PSM también se expresó en el timo humano (14 de 17 glándulas tímicas fueron positivas, figura 3.3), sin relación con la edad ni con el sexo, pero la expresión no resultó tan claramente restringida a las células epiteliales tímicas como el caso de PSA.

La transcripción de los antígenos prostáticos en el timo en edades tempranas sugiere que estos antígenos estarían disponibles para la inducción de tolerancia central, y/o la generación de clones de células T regulatorias específicas, tal como se deduce de los experimentos en ratones de Taguchi (Taguchi et al., 1994). No obstante, sería importante determinar en el futuro si las variaciones individuales en los niveles tímicos de los antígenos prostáticos observados en este trabajo influye en el proceso de tolerización, y si acaso la respuesta autoinmune observada en los pacientes con prostatitis crónica (Alexander et al., 1997; Ponniah et al., 2000) es debida a un repertorio de linfocitos T autorreactivos que no fueron adecuadamente eliminados durante la maduración intratímica.

DISCUSIÓN GENERAL

La expresión intratímica de antígenos específicos de tejido es una condición esencial para la inducción de la tolerancia, tal y como se ha podido observar a partir de numerosos modelos animales donde existe una evidente respuesta autoinmunitaria dirigida contra epitopes que no se encuentran representados en el timo (Huseby and Goverman, 2000; Klein et al., 2001) (Klein and Kyewski, 2000b). La expresión tímica de antígenos interviene en la inducción de la tolerancia central a través de dos mecanismos: en la delección de las células T autorreactivas (Klein et al., 2000; Klein and Kyewski, 2000a) y/o en el proceso de selección de un repertorio de células T regulatorias (Sakaguchi, 2000; Seddon and Mason, 2000).

La expresión de los antígenos específicos de tejido en el timo parece ser una propiedad intrínseca de las células epiteliales tímicas, así como de las células presentadoras de antígenos derivadas de la médula ósea. Estudios recientes sugieren que las células epiteliales medulares y las células presentadoras de antígeno de origen hematopoiético podrían complementarse en la función de presentar los antígenos, en el sentido de que los antígenos hematopoiéticos y extracelulares serían presentados por las células dendríticas y los macrófagos, mientras que los antígenos específicos de tejido serían presentados por las células epiteliales (Derbinski et al., 2001; Klein et al., 2001).

La expresión genes específicos de tejidos observada en el timo incluye no solo antígenos involucrados en enfermedades autoinmunes, como en la diabetes, la uveítis, la Miastenia Gravis y la esclerosis múltiple sino también proteínas secretorias, de membrana, estructurales, factores de transcripción y hormonas (Charukamnoetkanok et al., 1998; Hanahan, 1998; Heath et al., 1998; Jolicoeur et al., 1994; Martens et al., 1996; Sospedra et al., 1998; Werdelin et al., 1998).

Si bien no se puede asumir una estricta correlación entre la expresión intratímica de un gen y tolerancia frente al producto proteico que codifica dicho gen, en ciertos casos se ha podido demostrar que la expresión en el epitelio tímico es suficiente para inducir tolerancia (Klein et al., 2001; Kojima et al., 1997; Smith et al., 1997), mientras que la expresión tímica incompleta, debido a una modificación transcripcional del mRNA, conduce a la exclusión de ciertos epitopes del mecanismo de tolerancia central. En este contexto, cuando los antígenos se encuentran expresados en el timo, el principal mecanismo de tolerancia que ocurre es la delección de las células T autorreactivas. Sin embargo, frente a aquellos epitopes que no se encuentran representados en el timo, el mecanismo de tolerancia aplicado es la ignorancia, y habría salida de células potencialmente autorreactivas a la periferia, tal como se observa en el repertorio normal de animales sanos, y también en humanos. Normalmente estas células son inofensivas, y solo por inducción de

autoinmunidad en los animales, y por factores desconocidos en los seres humanos, éstas células se activan y producen enfermedad autoinmunitaria.

Los estudios de *Klein et al.* de la expresión intratímica de la PLP y su papel en la tolerancia central en ratones, representan un ejemplo típico de como la expresión tímica incompleta de un autoantígeno predispone a autoinmunidad. Como ya se describió, la PLP existe en dos isoformas, derivadas del *splicing* alternativo: la forma completa o *full length*, y la forma corta que ha perdido una porción de 35 aminoácidos, llamada DM20. Ambas formas se encuentran expresadas en la mielina del SNC, mientras que solo la forma corta, DM20 se encuentra expresada en el timo y en otros tejidos periféricos. Como consecuencia, durante la inducción de tolerancia central, la delección tímica afecta a todas las células T específicas frente a aquellos epitopes que se encuentran representados en el timo, pero excluye a las células autorreactivas frente a los epitopes contenidos en la porción de 35 aminoácidos que no están expresados en el timo. Las células T autorreactivas con los epitopes contenidos en la porción de 35 aminoácidos ausente en el timo escapan a la delección y representan una población de células T no tolerantes. En las cepas de ratones susceptibles, como la SJL/J, las células T específicas se mantienen inofensivas, ignorantes, a pesar de la presencia del antígeno en el sistema nervioso central, y nunca se activan de manera espontánea. Bajo condiciones experimentales como es la inmunización con PLP, estas células se activan y producen EAE (Klein et al., 2000).

Además, es importante destacar existen cepas *susceptibles* y cepas *resistentes* a la EAE debido a que la expresión tímica incompleta de un antígeno facilita el escape de células autorreactivas a la periferia siempre y cuando se exprese un haplotipo de MHC llamado “permisivo”. Los epitopes de las células T se seleccionan por unión a un tipo de MHC determinado, por lo tanto las células T autorreactivas que escapan a la tolerancia central serán patogénicas solo en las cepas de ratones cuyos MHC seleccionen los epitopes de PLP localizados justo en la porción de 35 aminoácidos, no representados en el timo. Por ejemplo, en la cepa de ratones BL/6 (que presentan el haplotipo de MHC H-2^b) la tolerancia central elimina todas las células T autorreactivas, ya que los epitopes de PLP no residen en la porción de los 35 aminoácidos. Por el contrario, en la cepa de ratones SJL/J (que presentan el haplotipo H-2^s) el epítipo dominante de PLP se encuentra en la porción de 35 aminoácidos, ausente en el timo.

En esta tesis demostramos que la expresión de PLP en el timo humano está restringida a la forma corta, DM20. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas por *Klein et al.* en ratones (Klein et al., 2000). Si bien la susceptibilidad a la esclerosis múltiple en humanos presenta asociación con ciertos haplotipos de MHC de clase II, los mecanismos no están claros y resultan complicados de analizar porque la especificidad del repertorio de

células T es muy amplio (Schmidt, 1999; Steinman, 1996) pero se podría sugerir que las moléculas de MHC asociadas con susceptibilidad a esclerosis múltiple podrían unir con afinidad baja o moderada a los epítopes de los antígenos que no se encuentran representados en las isoformas de las proteínas expresadas en el timo.

Cabe mencionar que la expresión tímica de la proteína básica de mielina (MBP) no ha sido evaluada en este trabajo, debido a que existe una amplia evidencia de que en el timo se expresa una forma de *splicing* alternativo de MBP, llamada *golli*-MBP, pero no la forma clásica de este antígeno (Mathisen et al., 1993). De forma similar a PLP, algunos epítopes contenidos en la forma clásica de MBP estarían restringidos al sistema nervioso central (Pribyl et al., 1993). La expresión de *golli*-MBP ha sido previamente demostrada por Sospedra et al. en un panel de timos humanos de diferentes edades (Sospedra et al., 1998).

Además de las diferencias *cualitativas* entre las formas de expresión de la PLP en el timo humano y en el sistema nervioso central, que pueden conducir a la exclusión de ciertos epítopes de la tolerancia central, observamos diferencias *cuantitativas* en la expresión intratímica, reflejadas por variaciones interindividuales en los niveles de transcripción. Variaciones interindividuales en la expresión tímica no se habían descrito anteriormente para autoantígenos del sistema nervioso central. Esta observación tiene importancia ya que se ha demostrado, al menos para tres autoantígenos (insulina, antígeno retinal S y MBP) que la variabilidad en los niveles de expresión tímica se asocian a susceptibilidad a padecer la enfermedad autoinmune (Egwuagu et al., 1997; Liu et al., 2001; Pugliese et al., 1997; Vafiadis et al., 1997).

En esta tesis también se describen variaciones interindividuales en los niveles de la expresión tímica de las subunidades alfa y delta del receptor de acetilcolina, las cuales no se habían observado anteriormente, y que dan lugar a investigar si acaso la expresión de estos genes en el timo está asociada a variantes alélicas “*protectoras*” que condicionan altos niveles de transcripción, o a variantes alélicas de “*susceptibilidad*”, que condicionan bajos niveles de expresión intratímica. El estudio de estos genes en el timo humano y la identificación de posibles polimorfismos que regulan los niveles de expresión son aspectos a considerar en futuras investigaciones, así como también la posibilidad de extender estas observaciones a otros genes de autoantígenos involucrados en enfermedades autoinmunitarias.

El análisis sistemático de la expresión tímica de los diversos antígenos involucrados en la patología autoinmunitaria, junto al estudio del repertorio de las células T autorreactivas específicas en la periferia durante el curso clínico de las enfermedades, encierra la posibilidad de la tolerización de la población de las células T específicas. Este tipo de tratamiento se ha implementado con cierto éxito en el modelo animal de EAE, cuando las

células T específicas fueron *pre-tolerizadas* para impedir la extensión de la respuesta inmunitaria hacia otros epitopes, especialmente frente a aquellos epitopes de PLP que no se encuentran representados en el timo (Kennedy et al., 1990).

El análisis de nuestros resultados en su conjunto: la presencia intratímica, las variaciones cualitativas y las diferencias cuantitativas interindividuales observadas en ciertos antígenos, (pero no en todos) con apoyo en las observaciones hechas en modelos animales, nos inducen a especular que los fenotipos *resistentes* a padecer enfermedades autoinmunes podrían ser aquellos en los cuales la tolerancia central representa un mecanismo efectivo para eliminar los antígenos que se encuentran representados en el timo, expresados a niveles superiores al umbral mínimo necesario, sumado a la expresión de haplotipos de MHC incapaces de unir a los epitopes que no están no representados en el timo. Por el contrario, la expresión tímica baja o nula de los autoantígenos, sumado a la expresión de haplotipos de moléculas de MHC capaces de presentar efectivamente los epitopes ausentes en el timo, se correlacionaría con fenotipos de *susceptibilidad* a las enfermedades autoinmunes.

La transcripción de los autoantígenos específicos de tejido analizados en este trabajo parece estar circunscrita al grupo de células de origen epitelial, y a la médula tímica, en concordancia con recientes estudios realizados en ratón (Derbinski et al., 2001). Curiosamente, la proteína *AIRE*, se expresa también en las células epiteliales medulares en el timo (Heino et al., 1999). Las mutaciones en el gen *AIRE* son responsables de un complejo desorden poliendocrino autoinmune, asociado a hipoparatiroidismo, diabetes mellitus insulino dependiente, enfermedad de Addison y la presencia de autoanticuerpos frente a una gran variedad de autoantígenos (Peterson et al., 1998). Se piensa que este gen está involucrado de alguna manera en la inducción de tolerancia frente a autoantígenos periféricos en las células epiteliales medulares, y que por lo tanto, un fallo en la función de este gen, y en consecuencia cualquier disfunción en las células epiteliales medulares, tendría una profunda trascendencia inmunológica.

Si los mecanismos de inducción de tolerancia requieren la expresión intratímica de los autoantígenos, de nuestros resultados se deriva una cuestión obvia, que es como se establece la tolerancia frente a los antígenos que no están representados en el timo. MOG es el caso mas genuino de autoantígeno secuestrado, cuya expresión se encuentra restringida al sistema nervioso central, y representa el único autoantígeno cuya tolerancia no puede ser establecida en el timo, al menos mediante los mecanismos de tolerancia central hasta ahora conocidos, dependientes de la expresión intratímica del antígeno. Aunque existe tolerancia frente a este antígeno en los individuos sanos, se observa respuesta

humoral y celular frente a este antígeno en los pacientes con MS, y en varias especies es posible inducir EAE mediante la inmunización activa con MOG.

Se acepta que la inmunogenicidad de MOG puede deberse a que se encuentra realmente secuestrado del sistema inmunológico a través de la barrera hemato-encefálica, ya no se detectan transcritos de MOG fuera del SNC ni en ratones (Iglesias et al., 2001), ni en humanos, tal como lo demuestran los experimentos presentados en esta tesis.

En ausencia de expresión tímica de MOG, es posible que no se establezca tolerancia central y que las células T específicas no delecionadas en el timo alcancen la periferia y formen parte del repertorio de células T autorreactivas. La tolerancia en la periferia se mantendría por ignorancia, ya que las células T reactivas contra MOG no contactan con su antígeno, debido a que MOG no se expresa fuera del sistema nervioso central, y porque la barrera hemato-encefálica impide la entrada de las células T ignorantes dentro del mismo.

Datos obtenidos a partir de elegantes modelos animales transgénicos, cuyas células B expresan las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo monoclonal específico contra MOG, indican que no existen diferencias en el repertorio de células B, entre los ratones transgénicos y los ratones deficientes en MOG, indicando que MOG no participa en el establecimiento del repertorio inmune (Litzenburger et al., 2000). Se ha observado que existen mecanismos adicionales que regulan la composición y la función del repertorio de las células B y T reactivas contra MOG, como por ejemplo, la existencia de una reacción antigénica cruzada que induce la edición de la cadena ligera del receptor transgénico de la célula B específica contra MOG.

Si bien se desconoce la identidad del antígeno capaz de provocar la reacción cruzada, los miembros de la superfamilia de proteínas B-7 *like*, especialmente la butirofilina, son candidatos potenciales ya que comparten homología de secuencia del extremo N-terminal del dominio Ig-like (Iglesias et al., 2001). La butirofilina es un componente específico de la leche, y se ha descrito que se puede generar una respuesta T encefalitogénica frente a MOG, (y también se puede suprimir) como consecuencia del mimetismo molecular entre MOG y la proteína láctea, en EAE y en esclerosis múltiple (Stefflerl et al., 2000). Estos resultados sugieren que tal vez el repertorio específico de células reactivas contra MOG podría estar restringido por señales tolerogénicas derivadas del consumo de leche o de productos lácteos, que por otra parte podrían inducir tolerancia oral contra epitopes definidos de MOG, y reducir la respuesta inflamatoria en los pacientes con esclerosis múltiple (Stefflerl et al., 2000). De momento estos conceptos son solo especulativos, pero explican las respuestas T específicas contra MOG o la inducción de anticuerpos de tipo conformacionales solo en un grupo limitado de pacientes con esclerosis múltiple (Haase et al., 2001; Iglesias et al., 2001; Kerlero de Rosbo et al., 1997).

