



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Programa de doctorat en Immunologia Avançada

Mecanismos de tolerancia al receptor de la tirotropina (TSHR):
Análisis de su contribución a la respuesta autoinmune en la
enfermedad de Graves

Autor: Ana María Marín Sánchez

Directores: Dr. Roger Colobran Oriol y Dr. Ricardo Pujol Borrell

Tutor: Dr. Ricardo Pujol Borrell

Fecha de depósito: Marzo 2020



Ricardo Pujol Borrell y Roger Colobran i Oriol ambos doctores y docentes en la
Universitat Autònoma de Barcelona

Certifican que:

La tesis titulada: "**Mecanismos de tolerancia al receptor de la tirotropina
(TSHR): Análisis de su contribución a la respuesta autoinmune en la
enfermedad de Graves**" ha sido realizada bajo su supervisión por Dña Ana M^a
Marín Sánchez y ha sido aprobada para ser presentada y defendida para optar al
grado de Doctor en Inmunología por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona, a 03 de Marzo de 2020


Digitally signed by
RICARDO PUJOL
BORRELL - DNI
37646607T
Date: 2020.03.03
21:53:46 +01'00'

Dr. Ricardo Pujol Borrell


Digitally signed
by ROGER
COLOBRAN
ORIOLE
Date: 2020.03.04
16:47:42 +01'00'

Dr. Roger Colobran Oriol

A Mauro y a Sofía

AGRADECIMIENTOS

Realizar una tesis doctoral a tiempo parcial mientras trabajaba como facultativo en el Hospital Vall d'Hebron ha resultado muy difícil para mí. Por eso el haber llegado hasta aquí es gracias a muchas personas que han estado a mi lado a lo largo de estos años.

En primer lugar agradecerles a mis dos directores que me hayan guiado hasta el final. Gracias a Ricardo Pujol que ha sido mi jefe, mi director, mi tutor, pero sobre todo mi mentor, del que no dejo nunca de aprender. Y gracias a Roger Colobran que me ha dedicado el tiempo que no tenía siempre con mensajes de ánimo y me ha enseñado que ser técnicamente minuciosa y exigente será lo que sustente mis resultados a posteriori.

A Mónica y a Manolo, primero los facultativos que me enseñaron y me dieron la oportunidad de ejercer, después mis compañeros de fatigas desde los orígenes del "servicio de inmuno del Valle" y ahora mis amigos que cada día me han animado y a veces hasta regañado para que terminara esta tesis. Ya está chicos, ¿y ahora qué?

A Alicia Sellés y a Daniel Álvarez por su gran ayuda para realizar muchos de los experimentos que han dado lugar a este trabajo. También a Mireia Giménez que me acompañó los primeros años y me enseñó los "intrínquilis" de la extracción de RNA en el VHIR. Al Dr Francesc Rudilla y a Elena Enrich por su colaboración con los experimentos de NGS.

A los cirujanos y endocrinólogos del HUGTiP y el HUVH por su inestimable ayuda reclutando a los pacientes y coordinando la recogida tras las intervenciones para que nosotros pudiésemos obtener "un poquito de muestra". Y mil gracias a los pacientes y sus familias que al consentir que utilicemos sus muestras han hecho posible realizar este trabajo de investigación.

A mis compañeras Elena, Romina, Isabel, Paz y Maite por su empatía, su apoyo y por cubrirme cuando tenía que "montar PCRs para la tesis". Gracias por tener siempre palabras de ánimo para mí y por darme tantos momentos divertidos.

A todas las técnicas y enfermeras del servicio pero especialmente a "mis chicas de autoinmunidad": Marga, Lulú y Cinta por animarme a empezar y demostrarme que se

puede con todo... aunque haya días que hay que hacer un poco de teatro para que te hagan caso.

Cuando ya eres facultativo la ilusión vuelve muchas veces de la mano de los residentes, y cuando eres un facultativo haciendo la tesis hay momentos en los que necesitas mucha ilusión. Por eso quiero agradecer a "mis residentes": Clara, Dani, Laura, Gemma y Janire por ese empujón que me ha dado como facultativo y tutora el tener que daros ejemplo y acabar de una vez la tesis.

A mis compañeros del servicio de Medicina Interna que le daban "vidilla" a mis días sacándome de la rutina y en especial Carmen Pilar Simeón por haberme animado siempre a hacer la tesis... no ha sido de sistémicas pero al final la he hecho.

A Barcelona que me ha permitido realizar el trabajo experimental rodeada de todas estas personas maravillosas y a Bologna que me ha permitido pararme, pensar y plasmar lo que he aprendido en este trayecto.

Y por último, porque son los más importantes: a mi familia. A mis padres que me dieron la oportunidad de desarrollar mi curiosidad, estudiar y llegar hasta aquí. A mi hermano y hermanas que me han hecho de babysitter para que yo pudiese trabajar y me han animado tanto estos últimos años. A Mauro que me ha acompañado y apoyado cada día desde que comencé mi camino como doctoranda, siempre con ese toque de humor que me recuerda que "no es para tanto". Y a mi hija Sofía que, aunque me ha quitado mucho tiempo, es la que realmente me ha dado la fuerza para acabar lo que empecé.

Ha sido un camino muy difícil, pero muy enriquecedor... gracias a todos por acompañarme.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS FRECUENTES

APECED	<i>Autoimmune Polyendocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy</i>
CHRNA1	Subunidad alfa del receptor de la acetilcolina
cTEC	Células epiteliales de la corteza tímica
DC	Célula dendrítica
DMI	Diabetes tipo I
DP	Timocito doble positivo
EAI	Enfermedad Autoinmune
ECD	Ectodominio
EG	Enfermedad de Graves
flTSHR	Receptor de la tirotropina de longitud completa (<i>full-length TSHR</i>)
HLA	Complejo principal de histocompatibilidad humano
INS	Insulina
LRRD	Dominio rico en repeticiones de leucinas (<i>Leucine Rich Repeat Domain</i>)
MG	<i>Myasthenia Gravis</i>
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mTEC	Células epiteliales de la médula tímica (<i>medullary Thymic Epithelial Cells</i>)
pMHC	Complejo péptido propio-MHC
TBAb	Anticuerpos bloqueantes del receptor de la tirotropina
TCR	Receptor del linfocito T
TG	Tiroglobulina
TH	Tiroiditis de Hashimoto
TPO	Peroxidasa tiroidea
TRA	Antígenos restringidos a tejido (<i>Tissue Restricted Antigen</i>)
TRAb	Anticuerpos contra el receptor de la tirotropina
Treg	Linfocitos T reguladores
TSAb	Anticuerpos estimulantes del receptor de la tirotropina
TSH	Hormona estimulante del tiroides o Tirotropina (<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>)
TSHR	Receptor de la tirotropina (<i>Thyroid Stimulating Hormone Receptor</i>)
OR	Odds Ratio
RR	Riesgo relativo

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de los linfocitos de T en el timo	3
Figura 2. Estructura de AIRE	8
Figura 3. Etapas de la patogénesis de las enfermedades autoinmunes órgano-específicas: Hipótesis de los múltiples puntos de control	12
Figura 4. Etiología multifactorial de la enfermedad de Graves.....	20
Figura 5. Modelo teórico de la EG en el tiroides.....	26
Figura 6. Esquema TSHR y tipos de anticuerpos anti-TSHR	29
Figura 7. Función del TSHR en el tiroides	32
Figura 8. Estructura TSHR	35
Figura 9. TSHR escisión y desprendimiento	36
Figura 10. Esquema del gen <i>TSHR</i> y sus dos principales variantes de <i>splicing</i>	37
Figura 11. Posible escenario de presentación del TSHR en el timo	88
Figura 12. Posible escenario de presentación del TSHR en periferia.....	88

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades autoinmunes de tiroides	14
Tabla 2. Caracterización de los antígenos y anticuerpos principales en las AITD.....	15
Tabla 3. Principales síntomas y signos físicos en la enfermedad de Graves	17
Tabla 4. Distribución extratiroidal del TSHR.....	33

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA Y AUTOINMUNIDAD	2
1.1. Tolerancia central: Selección de linfocitos T en el timo	3
1.1.1. Presentación antigénica en la corteza: Selección positiva.....	4
1.1.2. Presentación antigénica en la médula: Selección negativa	5
1.1.2.1. mTEC y expresión promiscua en el timo	6
1.1.2.2. Otras células presentadoras de antígenos en el timo.....	9
1.1.1. Selección por ligando agonista: Generación de linfocitos T reguladores	11
1.2. Autoinmunidad y tolerancia central.....	11
2. TIROIDOPATÍAS AUTOINMUNES	13
2.1. Generalidades	13
2.2. Antígenos y Anticuerpos Anti-Tiroideos.....	14
3. LA ENFERMEDAD DE GRAVES	16
3.1. Concepto, historia y epidemiología.....	16
3.2. Manifestaciones clínicas	17
3.3. Diagnóstico	19
3.4. Factores precipitantes y de predisposición.....	20
3.4.1. Género femenino y embarazo	20
3.4.2. Factores ambientales	21
3.4.3. Factores genéticos	23
1.1.2.3. Loci de susceptibilidad para EG compartidos por otras EAI.....	23
1.1.2.4. TSHR: un locus de susceptibilidad específico de EG	25
3.5. Inmunopatogénesis.....	26
3.5.1. Linfocitos y células epiteliales tiroideas	27
3.5.2. Anticuerpos anti TSHR.....	29
3.6. Modelos animales de EG.....	31
4. EL RECEPTOR DE LA TIROTROPINA (TSHR)	32
4.1. Función y localización	32
4.2. Estructura y modificaciones postraduccionales.....	34
4.3. Gen y transcritos	37
4.4. Relevancia funcional de los polimorfismos en el intrón 1 del TSHR.....	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	41
HIPÓTESIS	42

OBJETIVOS	42
RESULTADOS.....	43
CAPITULO 1: PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS DEL <i>TSHR</i> EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES	44
<i>Objetivos</i>	44
<i>Motivación</i>	44
<i>Resumen artículo 1</i>	45
<i>Resumen artículo 2</i>	47
<i>Artículo 1</i>	49
<i>Artículo 2</i>	51
CAPITULO 2: INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE <i>AIRE</i> EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES Y OTRAS EAI	53
<i>Objetivos</i>	53
<i>Motivación</i>	53
<i>Resumen de resultados</i>	54
<i>Artículo 3</i>	55
CAPITULO 3: EXPRESIÓN DEL <i>TSHR</i> Y SUS ISOFORMAS EN TIMO Y TIROIDES	57
<i>Objetivos</i>	57
<i>Motivación</i>	57
<i>Resumen de resultados</i>	58
<i>Artículo 4</i>	61
DISCUSIÓN GENERAL.....	75
CONCLUSIONES.....	93
BIBLIOGRAFÍA.....	97
ANEXOS	111
ANEXO 1. SECUENCIAS Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS	112
ANEXO 2. PUBLICACIONES Y TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS (2014-2020)	119

INTRODUCCIÓN

1. TOLERANCIA INMUNOLÓGICA Y AUTOINMUNIDAD

El sistema inmunitario (SI) ya no es visto únicamente como un sistema de protección y defensa frente a las infecciones sino como un sistema que vigila determinados aspectos de la homeostasis y que puede dar lugar a enfermedad cuando sus respuestas son excesivas, van dirigidas contra antígenos ambientales o propios o cuando falla la capacidad de respuesta¹. En los dos extremos del gradiente de respuestas del SI encontramos: la activación, durante la **defensa** frente a patógenos y células tumorales, y la no respuesta frente a lo que es "propio", la **tolerancia**.

Para poder responder frente a la infinidad de potenciales patógenos, el sistema inmunitario genera una gran diversidad de receptores antigénicos tanto en linfocitos B (BCR) como en linfocitos T (TCR) capaces de abarcar el amplísimo espectro de antígenos a reconocer. Debido a la naturaleza aleatoria de varios de los procesos que intervienen en la generación de estos receptores entre los que se encuentra la recombinación de segmentos génicos, es inevitable que el repertorio de especificidades de linfocitos B y T incluya clonas portadoras de receptores contra antígenos propios. La **tolerancia central** es la eliminación activa de clonas autorreactivas durante el desarrollo de los linfocitos B y T en la médula ósea y en el timo respectivamente. A pesar de que los mecanismos de tolerancia central limitan de forma considerable la proporción de linfocitos T y B autorreactivos, todo individuo adulto posee una proporción de células autorreactivas circulantes que pueden conducir al desarrollo de una respuesta autoinmunitaria. La **tolerancia periférica** engloba al conjunto de procesos que actúan después de la maduración de los linfocitos y están dirigidos a controlar a las células autorreactivas en los órganos linfoides secundarios y en los tejidos. Existen cinco mecanismos principales que contribuyen al control de los linfocitos autorreactivos en periferia: la anergia, la falta de cooperación T-B, las moléculas inhibitoras, la supresión activa y la ignorancia inmunológica.

La **autorreactividad**, o reconocimiento de estructuras propias, es por tanto un fenómeno fisiológico. Hablamos de **autoinmunidad** cuando los mecanismos de tolerancia fracasan y se activan los linfocitos autorreactivos dando lugar a una respuesta autoinmune claramente detectable. Y solo cuando esta respuesta autoinmune causa síntomas clínicos evidentes hablamos de **enfermedad autoinmune** (EAI).

1.1. Tolerancia central: Selección de linfocitos T en el timo

Los precursores de los linfocitos T migran hacia el timo desde el hígado (en el feto) o la médula ósea (en adultos) e ingresan en él atravesando el endotelio de las vénulas postcapilares en región de transición corticomedular. En la zona subcortical los precursores de los timocitos se dividen por mitosis asimétrica comportándose como células madre y dando lugar a los timocitos más inmaduros CD3-TCR-CD8-CD4- o dobles negativos (DN). Los timocitos DN migran desde el seno subcapsular y la región cortical externa del timo, a través de la corteza, hacia la médula tímica. Mientras están en la corteza los timocitos expresan por primera vez el TCR y a continuación aquellos timocitos con TCR $\alpha\beta^+$ comienzan a coexpresar tanto CD4 como CD8 (dobles positivos, DP). A medida que avanzan hacia la médula van madurando hasta convertirse en linfocitos T CD4⁺ restringidos por el MHC de clase II o linfocitos T CD8⁺ restringidos por el MHC de clase I (*single positive*, SP) (Figura 1).

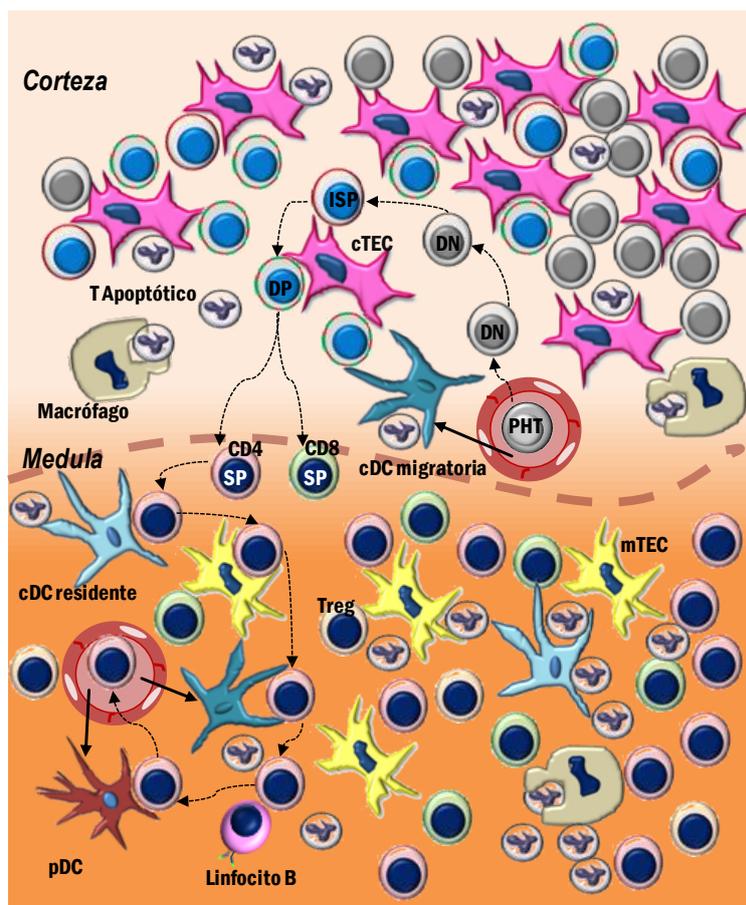


Figura 1. Desarrollo de los linfocitos de T en el timo

El reconocimiento en el timo de péptidos unidos a las moléculas del MHC es crucial para el desarrollo de los linfocitos T. Paradójicamente el reconocimiento de "lo propio" puede dar lugar a efectos diametralmente opuestos. Por un lado es esencial para la supervivencia y mantenimiento de los linajes de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, es decir para la **selección positiva** de los timocitos. Por otro lado el reconocimiento de lo propio puede llevar a la muerte de timocitos mediante **selección negativa**, también llamada selección clonal o bien puede llevar a las células a destinos alternativos como la diferenciación a células T reguladoras (T_{reg}) proceso que se ha denominado por algunos autores como **selección por ligando agonista**².

Existen dos modelos de selección de los timocitos en el timo que proponen que son la afinidad o la avidez del complejo TCR-péptido propio-MHC (TCR-pMHC) los determinantes clave de la selección T. Aquellos timocitos DP que expresan TCR con ninguna o muy baja afinidad/avidez por los complejos TCR-pMHC mueren por un mecanismo de ignorancia (*death by neglect*). Este mecanismo es el responsable de la pérdida del 80-90% de los timocitos durante la selección tímica. Los timocitos con una afinidad/avidez intermedia por el complejo TCR-pMHC reciben una señal de supervivencia (**selección positiva**) que determina su diferenciación hacia el linaje CD4 o CD8. Por último, las uniones de alta afinidad/avidez entre el TCR y el pMHC inducen muerte por apoptosis (**selección negativa o eliminación clonal**)^{3,4}. Las interacciones de media-alta afinidad/avidez también pueden determinar que los timocitos se diferencien hacia el linaje de células T reguladoras naturales (nTregs) que se caracterizan por ser FOXP3⁺. Debido al mecanismo implicado en su generación, las nTregs tienen un repertorio de TCR sesgado hacia el auto-reconocimiento⁵.

Estos procesos de selección transcurren en diferentes momentos y microambientes en el timo, la **corteza** y la **médula**, que están compuestos por distintos tipos de células presentadoras de antígeno (APC).

1.1.1. Presentación antigénica en la corteza: Selección positiva

En la corteza tímica el repertorio de timocitos DP consta de células cuyos receptores podrían teóricamente reconocer cualquier antígeno peptídico (propio o extraño) presentado por cualquier molécula MHC (tanto propia como no propia). La supervivencia o **selección positiva** de estos timocitos, está supeditada a interacciones

permisivas con principalmente un tipo de APC, las **células epiteliales tímicas corticales** (*cortical thymic epithelial cells*, cTEC), cuyas largas prolongaciones citoplasmáticas forman una red a través de la cual deben pasar los timocitos para alcanzar la médula^{6,7}. Cuando los timocitos DP reconocen vía TCR el complejo pMHC que se presenta en las cTEC, reciben señales de supervivencia críticas y se diferencian en linfocitos T CD4+ o CD8+ a través de un proceso aún no totalmente aclarado^{8,9}.

Gracias a una maquinaria específica para la proteólisis las cTEC muestran un conjunto de péptidos propios únicos que son esenciales para la selección positiva de células T restringidas por MHC y la generación de un TCR funcional. En el caso de la presentación de proteínas de **origen citosólico** vía MHC de clase I las cTEC cuentan con una variante del proteasoma, el timoproteasoma, que posee una unidad catalítica única, $\beta 5t$, que tiene preferencia por sustratos diferentes de los proteasomas de otros tipos celulares¹⁰. De la misma manera para el procesamiento de **péptidos extracelulares** vía MHC de clase II las cTEC disponen de una proteasa lisosomal exclusiva, la catepsina L y de serin proteasas timo específicas (*thymus-specific serine protease*, TSSP)¹¹.

A pesar de la elevada expresión de moléculas de MHC de clase II en las cTECs, se sabe que la presentación de proteínas exógenas por la vía endocítica clásica en sus moléculas de MHC de clase II es ineficiente^{12,13}. Parece confirmado que son procesos de autofagia, concretamente la macroautofagia, los encargados de la degradación de proteínas intracelulares que abastecen de antígenos a la vía de presentación MHC clase II que da forma a los compartimentos de linfocitos CD4+^{14,15}.

Por otro lado, algunos estudios han demostraron que, además de la selección positiva, la corteza también es un sitio para la selección negativa de células T autorreactivas frente a antígenos ubicuos. Al parecer este proceso está mediado principalmente por células dendríticas residentes en la corteza, en lugar de cTEC¹⁶.

1.1.2. Presentación antigénica en la médula: Selección negativa

Tras la selección positiva los timocitos ya comprometidos con el linaje CD4 o CD8, comienzan a expresar CCR7 y migran desde la corteza a la médula al ser atraídos por las quimiocinas CCL19 y CCL21 (ligandos de CCR7) producidas en gran cantidad por las **células epiteliales tímicas de la médula** (*medullary thymic epithelial cells*,

mTEC). En la médula, los timocitos SP interactúan con APCs, como las propias mTEC y las células dendríticas, y estas interacciones normalmente resultan en la eliminación de las células T autorreactivas. Casi todas las células T que reconocen los complejos de pMHC son eliminadas (**selección negativa**)^{2,17}.

Finalmente aquellos linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ que poseen un TCR funcional sin una reactividad significativa a los antígenos propios expresan el receptor para el 1-fosfato esfingosina (S1PR) y salen del timo siguiendo el gradiente de 1-fosfato esfingosina (S1P) en el torrente sanguíneo. De aquí migrarán a los órganos linfoides secundarios, como el bazo y los ganglios linfáticos, y recircularán por todo el cuerpo.

La médula tímica tiene una arquitectura anatómica compleja que favorece las interacciones celulares y la convierte en un microambiente esencial para la tolerancia T^{17,18}. Dos hechos principales que hacen que la médula tímica sea crucial en la inducción de tolerancia: la expresión ectópica o promiscua de antígenos con expresión restringida a tejidos específicos (TRA, *tissue-restricted antigens*) por las mTEC y la presencia de un único conjunto especializado de APCs hematopoyéticas: células dendríticas y linfocitos B residentes en el timo.

1.1.2.1. mTEC y expresión promiscua en el timo

Cada tejido se caracteriza por la expresión, estrechamente controlada, de un determinado conjunto de genes. Sin embargo, contradiciendo esta regla, las **mTEC** son capaces de transcribir un gran número de genes que codifican antígenos cuya expresión, por su función, se esperaba restringida a uno (o unos pocos) tejidos. A estos antígenos se le denomina **antígenos restringidos a tejido** (TRA, *tissue restricted antigens*). Esta expresión génica "promiscua" o ectópica de TRA por las mTEC permite la eliminación de linfocitos T específicos para autoantígenos que normalmente solo se encuentran en la periferia^{13,19}.

Las mTEC representan menos de un 1% del total de células tímicas y se caracterizan por la expresión de citoqueratina 5, CD326, MHC clase II y CD80. Según el grado de expresión de MHC de clase II y CD80, se clasifican en dos grupos, mTEC^{hi} y mTEC^{low}. A nivel poblacional las mTEC^{hi} expresan el mayor espectro de genes observado en ningún otro tipo celular, ya que incluye más del 85% de todos los transcritos codificantes del genoma²⁰. Además en las mTEC se detectan una variedad

mucho más amplia de variantes de splicing y/o RNAs editados de TRA que en sus tejidos periféricos equivalentes²¹. Por lo tanto las mTEC proporcionan una representación casi completa de autoantígenos periféricos²² y, aunque se estima que la expresión del gen de un TRA concreto se limita a solo 1–3% de todas las mTEC²³, se ha comprobado en ratones que la deficiencia específica de expresión en el timo de un único TRA, como la insulina, induce diabetes autoinmune^{24,25}.

a) Regulación de la expresión promiscua en el timo

Hasta la fecha se conocen dos reguladores de la transcripción que controlan expresión promiscua de TRA en las mTEC: **Aire** (*autoimmune regulator*), descrito en 1997^{26,27} y **Fezf2** (*Forebrain Embryonic Zinc Finger-like 2*) descubierto en 2015²⁸. En el timo del ratón *Aire* se expresa en aproximadamente en el 30% de las mTEC^{hi} y en una población de linfocitos B, mientras que *Fezf2* se detecta en más del 80% de las mTEC. Se estima que entre los dos cubren el 60% de los TRA expresados por las mTEC, pero los conjuntos de genes regulados por ambos son esencialmente no redundantes, aunque se solapan en algunos TRA². También sus mecanismos de acción son diferentes, mientras que *Fezf2* contiene dominios de unión directa al DNA y parece actuar como un factor de transcripción clásico, *Aire* actúa como una plataforma de acoplamiento para diferentes complejos multiproteicos que facilitan la transcripción de genes silenciados^{28,29}.

A diferencia de los ratones *knock-out* para *Aire* (*Aire*^{-/-}), que desarrollan una autoinmunidad multiorgánica que se acentúa con la edad, los ratones de la línea germinal *knock-out* para *Fezf2* (*Fezf2*^{-/-}) mueren poco después del nacimiento por defectos en el desarrollo del sistema nervioso. En los experimentos de injerto tímico con timos de ratones *Fezf2*^{-/-} o con células epiteliales tímicas *knockout* específicas para *Fezf2*, los ratones desarrollaron autoinmunidad espontánea con evidencia de infiltrados de órganos tisulares y autoanticuerpos pero en un espectro distinto al observado en ratones *Aire*^{-/-}^{28,30}. En la actualidad no hay descritas mutaciones de *FEZF2* en humanos que provoquen enfermedad autoinmune, mientras que las mutaciones que inactivan el gen *AIRE* causan el síndrome poliglandular autoinmune tipo 1 (APS1) también llamado APECED (*autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy*). El APS1 se caracteriza por el desarrollo de varias enfermedades autoinmunes que afectan fundamentalmente a glándulas endocrinas

como las paratiroides, las suprarrenales o los islotes pancreáticos asociadas con candidiasis mucocutánea crónica.

Se han identificado más de 110 mutaciones a lo largo del gen *AIRE* asociadas con APS1 u otras enfermedades autoinmunes. Dependiendo de la localización de las mutaciones a lo largo del gen *AIRE* humano y el dominio de la proteína AIRE afectado (Figura 2), la manifestación clínica puede ser diferente^{29,31}.

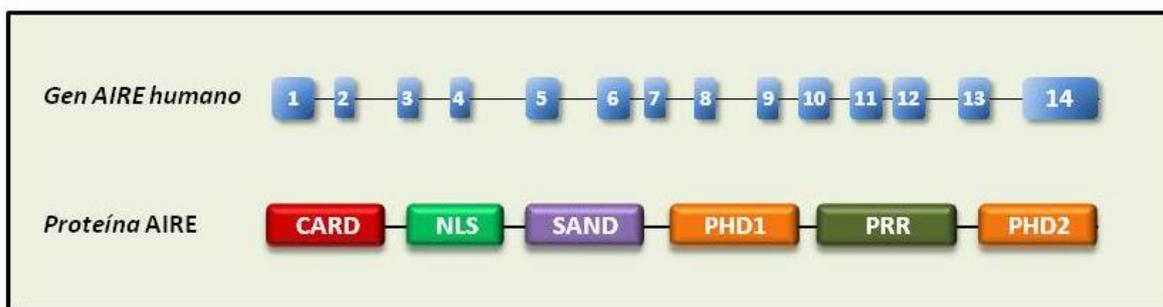


Figura 2. Estructura de AIRE

*El gen AIRE en humanos se localiza en el brazo largo del cromosoma 21 (21q22.3) y posee 11.9 kb distribuidas en 14 exones que codifican una proteína de 545 aa con un peso molecular de 56 KDa. La estructura de proteína AIRE incluye cinco subdominios: el dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasa) que es importante en la oligomerización de la proteína; el dominio NLS (Señal de Localización Nuclear) que media su migración desde el citoplasma al núcleo; el dominio SAND (SP100, AIRE1, NucP41 / P75 y DEAF1) involucrados en la promoción de las interacciones proteína-proteína; y dos dominios de PHD, PHD-1 y PHD-2, que funcionan como lectores de códigos de histonas, que interactúan y ayudan en la apertura de la cromatina*²⁵⁹.

b) Vías de presentación de TRA por las mTEC

Un determinado antígeno propio expresado por unas pocas mTEC puede ser visto por los linfocitos T de dos maneras: a través de la **presentación directa** por las propias mTEC o mediante la **transferencia de antígenos** y la presentación por APCs vecinas como las células dendríticas (DC). Este segundo mecanismo puede extender el área de presentación tolerogénica más allá del patrón de expresión topológicamente restringido a las mTEC.

Hay una gran cantidad de estudios apoyan la idea de que la **presentación directa** por parte de las mTEC es un mecanismo de tolerancia exquisitamente eficiente³². La presentación directa de antígenos expresados de forma **endógena** por mTEC induce de forma eficiente la selección negativa tanto de los linfocitos T CD8+^{33,34} como de los T CD4+³⁵⁻³⁷. Sin embargo, al igual que las cTEC, las mTEC son notoriamente

ineficientes en la presentación vía MHC clase II de sustratos **extracelulares** y parecen haber desarrollado estrategias para enfocar su ligandoma de MHC de clase II a los antígenos propios endógenos^{13,38}. Las mTEC pueden cargar péptidos endógenos en el MHC de clase II mediante mecanismos que dependen del proteasoma y del transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP) y que requieren una fuga del contenido del retículo endoplasmático hacia los compartimientos de carga del MHC de clase II³⁹ o por procesos de autofagia¹⁵. Como las cTEC, las mTEC también recurren a procesos de macroautofagia para cargar en las moléculas MHC de clase II los péptidos de proteínas endógenas del citoplasma, los orgánulos o el núcleo⁴⁰. Sin embargo las proteínas de la membrana parecen ser inherentemente capaces de acceder a los compartimientos de carga del MHC de clase II independientemente de la macroautofagia⁴¹.

La segunda ruta por la que los antígenos derivados de las mTEC son presentados a los timocitos es por transferencia y posterior presentación por las DC localizadas en la médula tímica que proporciona un microambiente especializado propicio para la **transferencia intercelular** de antígenos^{17,33}. Aunque los detalles del mecanismo de transferencia del antígeno no están bien establecidos se ha comprobado que esta cooperación con las DC es necesaria para inducir tolerancia de los linfocitos CD4+ a ciertos antígenos presentados por las mTEC^{6,32}. Esta transferencia es unidireccional de mTEC a DC y es una vía de presentación que no está restringida a moléculas secretadas, sino que cubre la mayor parte de los compartimientos celulares incluyendo los antígenos del citoplasma, la membrana y el núcleo celular¹⁷.

1.1.2.2. Otras células presentadoras de antígenos en el timo

Además de las mTEC, la médula tímica contiene otras células presentadoras de antígeno implicadas en la selección de los timocitos en desarrollo. Cada uno de estos tipos celulares puede presentar un ligandoma pMHC diverso y por tanto inducir tolerancia, con mayor o menor eficacia, a una colección distinta de péptidos.

Las **células dendríticas** (DC) representan aproximadamente un 0,5% del total la celularidad tímica. Dos tercios de las DC tímicas pertenecen al linaje **convencional** (cDC) y se pueden clasificar en dos grupos: las **cDC migratorias** (CD11c^{hi} CD11b⁺ CD8 α -SIRP α +) que se localizan tanto en la médula como en la corteza a donde llegan

desde la periferia y las **cDC residentes** (CD11c^{hi} CD11b- CD8α+ SIRPα-) que son de origen intratímico y ocupan preferentemente la médula. El ligandoma pMHC de ambos subconjuntos celulares es diferente, mientras el de las cDC migratorias pueden contener epítomos derivados de antígenos propios que han sido capturados en la periferia, las cDC residentes parecen estar mejor equipadas para presentar antígenos propios que se capturan dentro del microambiente tímico. Además las cDC residentes son particularmente eficientes en la presentación de antígenos exógenos en el contexto de HLA de clase I y tienen una mayor capacidad de presentación cruzada (*cross-presentation*) *in vitro* en comparación con el subconjunto migratorio⁷.

Alrededor de un tercio de las DC tímicas pertenecen al linaje **plasmacitoide** (pDC, CD11c^{int} B220+ PDCA-1+), son de origen extratímico y pueden inducir tolerancia central a los autoantígenos capturados en la periferia⁴². Cabe destacar que, a diferencia de ambos subconjuntos de cDC, las pDC no captan antígenos transferidos por las mTEC. La activación de los receptores tipo Toll (TLRs) evita que tanto los cDC como los pDC que han estado en contacto con patógenos emigren al timo, previniendo así que puedan inducir tolerancia central a patógenos^{3,43}.

Los **linfocitos B** representan el 0,1-0,5% de los timocitos⁴⁴⁻⁴⁶, la mayor parte se originan por linfopoyesis B intratímica mientras que una pequeña proporción migran desde la periferia. A diferencia de los linfocitos B convencionales de periferia (B-2), los linfocitos B intratímicos tienen características destacadas de APC, como los altos niveles de expresión de las moléculas MHC de clase II y CD80⁴⁵. Es de destacar que los linfocitos B del timo también expresan AIRE y muestran propiedades tolerogénicas al migrar al timo^{45,47}. Varios estudios han establecido su capacidad para mediar la selección negativa de linfocitos T CD4+ pero no de CD8+^{48,49}. Su papel como APC se ha documentado en diferentes escenarios: como presentadoras de superantígenos⁵⁰ o captura y presentación de antígenos mediada por el receptor del linfocito B (BCR)⁴⁴, a través de la expresión específica de un autoantígeno⁴⁹ o expresando selectivamente moléculas del MHC en los linfocitos B⁴⁸.

Por último, el papel como células presentadoras de antígeno de los **macrófagos** en el timo, donde tienen una función crucial en la eliminación de timocitos apoptóticos, sigue estando poco estudiado aunque parece que son menos eficientes que las DC o las mTEC en inducir tolerancia⁵¹⁻⁵³.

1.1.1. Selección por ligando agonista: Generación de linfocitos T reguladores

Si bien parece claro que las uniones de alta afinidad/avidez entre el TCR y el pMHC conducen a la eliminación clonal, no todos los timocitos inmaduros autorreactivos se eliminan por selección negativa convencional. La evidencia creciente sugiere que las señales del TCR medias-fuertes también pueden conducir a la supervivencia y diferenciación de otras poblaciones de linfocitos T, incluidos los T reguladores naturales (nTreg), los linfocitos NKT invariantes (iNKT) y los linfocitos intraepiteliales (IEL)⁵⁴. Este proceso se ha denominado **selección por ligando agonista** (*agonist selection*) porque la selección se realiza según la capacidad de reconocer complejos de autoantígeno-MHC².

Aproximadamente el 80% del repertorio de linfocitos Treg se origina en el timo y se denominan Treg naturales (nTreg). Los TRA expresados por mTEC también se utilizan en esta vía de selección y, tanto las diferentes subpoblaciones de DCs tímicas⁴³ como los linfocitos B intratímicos⁵⁵ contribuyen a la generación de nTreg dando lugar a un linaje de células T autorreactivo que carece de potencial autoinmune y en su lugar confiere tolerancia a través de la regulación inmune. Los nTreg, que se distribuyen principalmente en la médula tímica, migrarán a los tejidos periféricos donde median la supresión sobre un amplio espectro de células efectoras de la respuesta inmunitaria, T CD4, T CD8, B y NK e inducen un fenotipo tolerogénico a DC y macrófagos.

1.2. Autoinmunidad y tolerancia central

A pesar de que algunos síndromes monogénicos, como el APECED, el síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) o el síndrome de Arcadi-Goutières, nos muestran que el fallo en uno solo de los controles que mantienen la tolerancia es capaz de provocar una enfermedad autoinmune⁵⁶, en el caso de las EAI humanas más frecuentes, como las que afectan a las glándulas endocrinas o al sistema osteoarticular, existe evidencia de que su patogenia sería consecuencia de un fallo combinado y acumulativo en varios de los puntos de control de la tolerancia (*multiple checkpoints hypothesis of autoimmunity*) al que contribuyen un amplio número de polimorfismos génicos, agentes ambientales y probablemente, eventos estocásticos⁵⁷ (Figura 2).

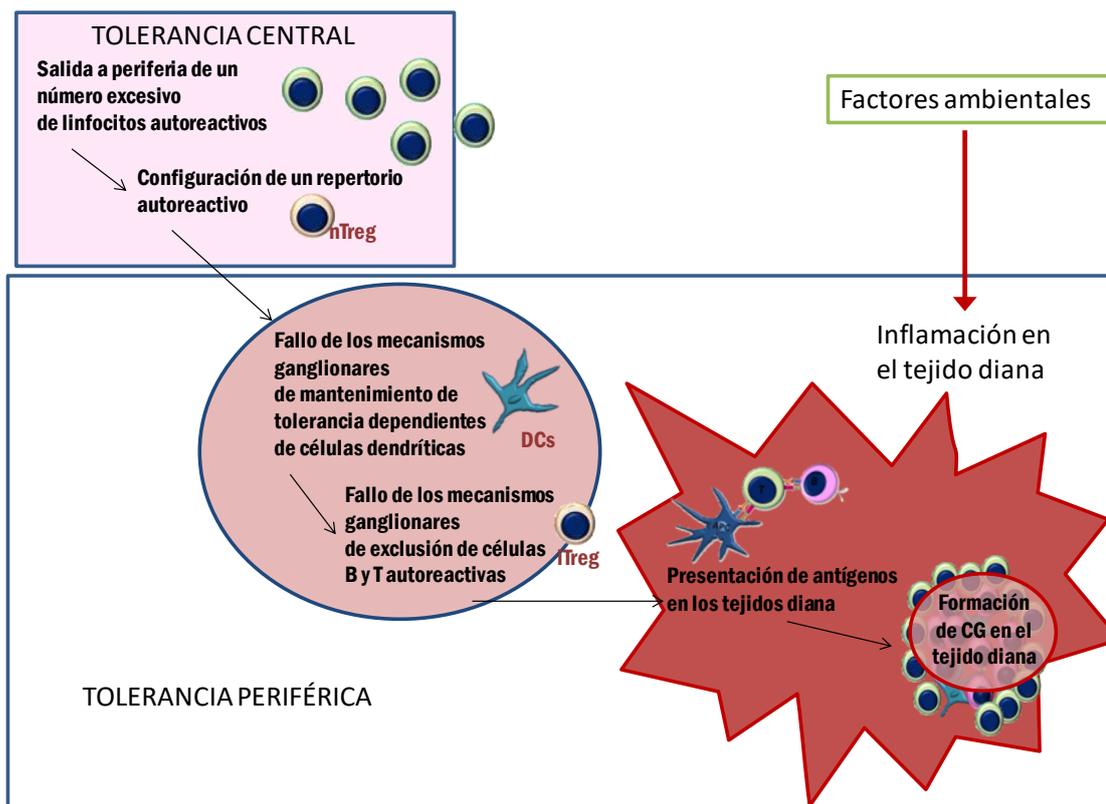


Figura 3. Etapas de la patogénesis de las enfermedades autoinmunes órgano-específicas: Hipótesis de los múltiples puntos de control

Figura inspirada en los trabajos de Diane Mathis y Chris Goodnow

A nivel central, existen un número cada vez mayor de estudios que ilustran cómo defectos en puntos de control en el timo conducen a la generación de linfocitos T autorreactivos en algunas enfermedades autoinmunes organoespecíficas. Por ejemplo, la **baja expresión en mTEC** de la cadena pesada de la miosina 6 correlaciona con un mayor número de linfocitos T autorreactivos y autoanticuerpos frente a este autoantígeno en la miocarditis autoinmune⁵⁸. También se han descrito determinados polimorfismos genéticos en regiones reguladoras de TRA Aire-dependientes, como la subunidad α del receptor de acetilcolina muscular (CHRNA1)⁵⁹ o la insulina^{60,61}, que reducen su expresión en timo, pero no en periferia y correlacionan con una mayor susceptibilidad a padecer miastenia gravis y diabetes tipo 1 respectivamente.

En el modelo experimental de encefalomiелitis aguda (EAE) inducida por la PLP (*proteolipid protein*) de la mielina se ha demostrado que el **procesamiento diferencial de transcritos en timo y periferia** tiene como resultado la generación de epítomos dominantes T presentes en periferia pero no en timo⁶². La PLP tiene dos isoformas

resultantes del *splicing* alternativo del mRNA: PLP es la isoforma más larga que se encuentra en el sistema nervioso central y DM20 es la isoforma más corta que se expresa en timo y otros tejidos periféricos. La expresión de DM20 en el epitelio tímico resulta suficiente para conferir tolerancia T frente a todos los epítomos de PLP en cepas de ratones C57BL/6 resistentes a EAE. En contraste, el epítomo T principal en ratones SJL/J, muy susceptibles a EAE, estaba codificado por el exón específico de PLP del sistema nervioso central, pero no por DM20 tímico. Ejemplos similares se han descrito en la diabetes tipo I (DMI) con las proteínas IA-2 (*insulinoma-associated tyrosine phosphatase-like protein*)⁶³ o la IGRP (*islet-specific glucose-6- phosphatase catalytic subunit-related protein*)⁶⁴.

Se observan efectos análogos cuando estas variantes truncadas se generan por la presencia codones de inicio alternativos que pueden conducir a una falta de transcripción promiscua de determinados epítomos en las mTEC, dando lugar a una evasión de la tolerancia central frente a ese epítomo⁶⁵.

Por último las **modificaciones post-traduccionales** de autoantígenos que afectan a epítomos T y que ocurren de manera exclusiva en tejidos periféricos pero no en mTEC, pueden tener el mismo efecto. Ejemplos de esto los encontramos en la glicosilación del colágeno tipo II y la citrulinización de péptidos en la artritis reumatoide⁶⁶, o la desamidación de insulina en el caso de diabetes tipo 1^{67,68}.

2. TIROIDOPATÍAS AUTOINMUNES

2.1. Generalidades

La autoinmunidad afecta a la glándula tiroidea más que a ningún otro órgano humano, siendo las **enfermedades autoinmunes del tiroides** (AITD) el grupo de desórdenes autoinmunes más prevalente en nuestra especie⁶⁹.

El término AITD abarca una amplia gama de entidades (Tabla 1) con la **enfermedad de Graves** (EG) y la **tiroiditis de Hashimoto** (TH) como las dos presentaciones clínicas principales. A pesar de que los rasgos clínicos de la EG y del TH son claramente distintos, la tirotoxicosis en EG y el hipotiroidismo en TH, ambas entidades

se caracterizan por la presencia de un infiltrado linfocítico en el parénquima tiroideo y la producción de anticuerpos dirigidos contra la glándula tiroidea.

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades autoinmunes de tiroides

Hipertiroidismo autoinmune	Enfermedad de Graves
Tiroiditis autoinmunes	Tiroiditis de Hashimoto Tiroiditis atrófica Tiroiditis post-parto Tiroiditis inducida por fármacos Tiroiditis asociada a SPA*

*SPA: Síndromes poliglandulares autoinmunes

Se estima que la prevalencia de las AITD es de un 5% sin embargo, la prevalencia de enfermedad subclínica, manifestada por la producción de anticuerpos anti-tiroideos sin síntomas clínicos, puede ser mucho mayor⁷⁰. Y, como ocurre en la mayoría de las enfermedades autoinmunes, el riesgo es de 5 a 10 veces mayor en mujeres que en hombres⁶⁹.

Entre un 1-2% de las mujeres desarrollan hipotiroidismo autoinmune, que representa la etapa final tanto de la tiroiditis atrófica como la TH, y un 1% sufren EG^{71,72}. La tiroiditis posparto, caracterizada por una disfunción tiroidea transitoria en el primer año después del parto, afecta al 5% de las mujeres y, alrededor del 20% de estas mujeres desarrollan hipotiroidismo permanente en los siguientes 5-10 años⁷³.

Las AITD son el prototipo de enfermedad autoinmune órgano-específica, pero los mecanismos que desencadenan la respuesta inmune contra la tiroides aún no están claros.

2.2. Antígenos y Anticuerpos Anti-Tiroideos

La autoinmunidad tiroidea implica la rotura de la tolerancia frente a proteínas tiroideas, de las que las mejor caracterizadas son: la **tiroglobulina** (TG), proteína principal de la coloide, la **tiroperoxidasa** (TPO), enzima que cataliza la organificación del yodo, y el **receptor de la hormona estimulante del tiroides** (TSHR). Los anticuerpos anti-TPO y/o anti-TG se asocian a la TH y, en menor grado, a la EG. Los anticuerpos estimulantes dirigidos contra el TSHR (**TSAb**) son la causa directa de la EG. También se han descrito, aunque con menor frecuencia, anticuerpos frente a otros

antígenos tiroideos como la anhidrasa carbónica 2, la megalina, las hormonas T3 y T4, el simporter sodio-yodo (NIS) y la pendrina.

En la Tabla 2 se resumen las características básicas de los antígenos y anticuerpos principales en las AITD^{74,75} que, en el caso del TSHR en la EG, serán desarrolladas en profundidad a lo largo de los siguientes capítulos.

Tabla 2. Caracterización de los antígenos y anticuerpos principales en las AITD

Antígenos	TG	TPO	TSHR
Localización	Intrafolicular, soluble en el coloide	Intracelular, unido a la membrana	Extracelular, unido a la membrana
Acceso al antígeno	Con o sin destrucción del tejido	Tras destrucción del tejido	Sin destrucción del tejido
Peso molecular	2 x 300 kDa	2 x100 kDa	120 kDa
Función	Acumulación Iodo	Iodación de la Tg	Transducción de la señal de la TSH
Concentración en tiroides	++++	++	+
Modificaciones post-traduccionales	Glicosilación 12% Dimerización	Glicosilación 10% Dimerización Unión a Ca y grupo Hemo	Glicosilación ~40% Multimerización? Sulfatación Rotura intramolecular y liberación
Localización gen	8q24.22	2p25.3	14q31.1
Longitud gen (ID RefSeq. Gen)	274939 pb (NG_015832.1)	136265 pb (NG_011581.1)	197778 bp (NG_009206.1)
Polimorfismos	Si	No	Si
Anticuerpos	Anti-Tg	Anti-TPO	Anti-TSHR
Tipo de anticuerpo	Policlonal, pocos epítomos	Policlonal, un dominio inmunodominante	Oligoclonal, diferentes epítomos
Clase de anticuerpo	IgG1, IgG4 > IgG2, IgG3; bajos niveles de IgA e IgM en individuos sanos	IgG1, IgG4 > IgG2, IgG3; bajos niveles de IgA	Mayoritariamente IgG1
Niveles séricos	Altos (niveles patológicos tras el tratamiento)	Intermedios (niveles patológicos tras el tratamiento)	Bajos (normalización tras el tratamiento)
Prevalencia en AITD	>50% en HT y EG	>80% en HT y EG	~90% EG; ~10% HT
Acción	No definida	Poca acción <i>per se</i> , posible ADCC	Estimulantes, bloqueantes, apoptosis

3. LA ENFERMEDAD DE GRAVES

3.1. Concepto, historia y epidemiología

En áreas con aporte suficiente de yodo en la dieta, la enfermedad de Graves es la causa más frecuente de hipertiroidismo. Su patogenia es única entre las endocrinopatías autoinmunes ya que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos estimulantes dirigidos contra el TSHR que imitan la acción de la propia tirotropina (*thyroid stimulating hormone*, TSH) induciendo una hiperactividad del tiroides. Es interesante que la disfunción tiroidea se asocie con cierta frecuencia a manifestaciones extratiroideas, como la oftalmopatía de Graves o con menos frecuencia, al mixedema localizado, típicamente pretibial.

La primera descripción que existe de esta patología fue realizada en 1786 por el médico inglés Caleb Parry, pero fue a Robert James Graves (1796-1853) a cuyo nombre quedó ligada la enfermedad por su publicación en 1835 de una serie de cuatro pacientes en los que se asociaba taquicardia y bocio⁷⁶. Carl Adolph Basedow fue el primero en destacar la asociación con el exoftalmos en 1840⁷⁷, razón por la que también se la denomina enfermedad de Basedow o de Graves-Basedow.

La fisiopatología de la enfermedad se desconocía hasta que en 1956 Adams y Purves descubrieron en el suero de pacientes con EG una sustancia estimuladora del tiroides con una acción más duradera que la TSH a la que denominaron “factor estimulante de acción prolongada sobre la tiroides” (*long-acting thyroid stimulator*, LATS)^{78,79}. No fue hasta 1964 cuando dos grupos independientes, demostraron que el LATS se trataba de una inmunoglobulina^{80,81}, lo que por primera vez introdujo el revolucionario concepto de que la autoinmunidad puede tanto estimular como destruir el órgano diana.

Al descubrimiento del TSHR en 1966⁸² le siguieron las observaciones de que el LATS activaba la adenilato ciclasa del tirocito y competía con la TSH por la unión al TSHR. La primera prueba en humanos de que el LATS estimulaba la glándula tiroides provino de experimentos de infusión en voluntarios humanos⁸³ y posteriormente de la detección transitoria de anticuerpos contra el TSHR (**TRAb**) en el suero de neonatos hipertiroides de madres con EG y TRAb persistente⁸⁴.

En la actualidad la EG es la causa más común de hipertiroidismo con una incidencia anual de 20 a 50 casos por cada 100,000 personas/año y una prevalencia global que varía de 0.5% a 2% de la población. Es más común en países con suficiente yodo, donde representa entre el 70% y el 90% de los casos de tirotoxicosis. Al igual que ocurre en otras enfermedades autoinmunes, la EG es más prevalente en las mujeres, con una proporción aproximada de 5:1 y, aunque la incidencia alcanza su nivel máximo entre los 30 y los 50 años de edad, los síntomas pueden aparecer a cualquier edad⁸⁵.

3.2. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la EG se pueden dividir en aquellas que se deben al exceso de hormonas tiroideas circulantes y aquellas específicas de la enfermedad (Tabla 3).

Tabla 3. Principales síntomas y signos físicos en la enfermedad de Graves

Síntomas	Signos de hipertiroidismo	Signos extratiroideos
Pérdida de peso	Taquicardia, fibrilación auricular	Oftalmopatía*
Palpitaciones	Hipertensión sistólica	– Retraso y/o retracción de los párpados
Disnea	Insuficiencia cardíaca	– Proptosis (exoftalmos)
Temblor	Pérdida de peso	– Visión doble (disfunción de los músculos extraoculares)
Cansancio, fatiga, debilidad muscular	Temblor fino, hipercinesia, hiperreflexia	– Edema periorbital, quemosis, inyección de la esclerótica
Intolerancia al calor, aumento de la sudoración	Piel cálida y húmeda	– Queratitis por exposición
Aumento de la frecuencia de las deposiciones	Eritema palmar y onicólisis	– Neuropatía óptica
Ansiedad, estado de ánimo alterado, insomnio	Debilidad muscular	
Nerviosismo, hiperactividad	Pérdida del cabello	Dermopatía localizada (mixedema pretibial)*
Prurito	Bocio difuso, palpable y sopro tiroideo*	
Sed y poliuria	Estado mental y cambios en el estado de ánimo (por ejemplo, manía o depresión)	Acropaquia*
Alteraciones menstruales en las mujeres (oligomenorrea o amenorrea)		
Pérdida de la libido		
Síntomas oculares (hinchazón, dolor, visión doble, enrojecimiento).		

* Síntomas específicos de EG

Tabla adaptada de Smith TJ, Hegedüs L. Graves' Disease. *N Engl J Med.* 2016;375(16):1552–65.

El inicio de los **síntomas hipertiroideos** es generalmente gradual y la mayoría de los pacientes acuden a la consulta por nerviosismo, dificultad para dormir, fatiga, pérdida de peso, temblores y palpitaciones. También pueden presentarse otros síntomas como disnea, fatiga, intolerancia al calor o sudoración (Tabla 3). La afectación cardiovascular es más habitual en pacientes ancianos, con fibrilación auricular y, con menos frecuencia, insuficiencia cardíaca congestiva^{72,85}.

Entre las **características específicas** de EG, se pueden encontrar una o más de las siguientes:

- **Bocio:** un agrandamiento difuso de la glándula tiroides de tamaño variable, más frecuente en pacientes menores de 60 años. La histología muestra hiperplasia, gotitas de coloide intracelular, reducción del coloide folicular y una infiltración linfocítica a zonas (multifocal) compuesta principalmente por linfocitos T aunque pueden estar presentes muchos linfocitos B. Raramente se ven centros germinales linfoides en las primeras fases, pero en los casos crónicos son frecuentes⁸⁵. En el epitelio del tiroides se evidencia un aumento de la expresión de moléculas de HLA de clase I y una expresión inapropiada de clase II fundamentalmente HLA-DR⁸⁶.
- **Oftalmopatía de Graves:** que se caracteriza por una expansión e inflamación de los tejidos retroorbitarios, especialmente la grasa retrobulbar y de los músculos del ojo que resultan en exoftalmos (proptosis). A menudo la distrofia de los músculos oculares afecta su función lo que conduce a diplopía⁸⁵. La oftalmopatía es probablemente la característica más invalidante y psicológicamente perturbadora y puede afectar en gran medida la calidad de vida de los pacientes, tanto por sus consecuencias funcionales como por el cambio en su apariencia física.
- **Dermopatía:** un edema sin prurito, de color rojizo, con pápulas ocasionales, generalmente localizadas en la región pretibial (mixedema pretibial). La dermatopatía aparece en 1 a 4% de los pacientes y se asocia invariablemente con la oftalmopatía.
- **Acropaquia:** caracterizada por dedos en palillo de tambor y la hinchazón de los tejidos blandos de la última falange de los dedos de manos y pies. Es una manifestación extremadamente rara de EG y se encuentra en pacientes con EG grave y de larga duración con oftalmopatía y mixedema pretibial.

3.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la EG se basa en las características clínicas y las alteraciones bioquímicas. Si el diagnóstico es dudoso una gammagrafía tiroidea o una ecografía pueden ser útiles. La **tirotoxicosis** se diagnostica por niveles séricos elevados de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3), asociados con una TSH disminuida. Si se encuentra tirotoxicosis en un paciente con signos extratiroideos, como oftalmopatía o mixedema pretibial, el diagnóstico de EG es claro y la presencia de autoanticuerpos antitiroideos nos lo confirmará y ayudará a distinguir la EG del bocio multinodular tóxico y otras formas de hipertiroidismo.

Los anticuerpos patognomónicos de la EG son los anticuerpos **estimulantes** del receptor de TSH (**TSAb**) que se detectan en el suero de aproximadamente el 98% de los pacientes con EG no tratados aunque este porcentaje puede variar en función del método utilizado para su detección. Además de los TSAbs, en algunos pacientes de EG y sobre todo de tiroiditis autoinmunitaria, se pueden detectar autoanticuerpos contra el TSHR que carecen de actividad agonista pero son capaces de **bloquear** la acción de la TSH (**TBAbs**)⁸⁷. Para detectar los TSAbs se utilizan ensayos basados en la competición por la unión del ligando (TSH o un anticuerpo monoclonal humano anti-TSHR) al TSHR (**TBI** de *thyrotropin-binding inhibiting*). Existen ensayos biológicos que miden la producción de AMPc por monocapas de células que expresan TSHR (**TSI** de *thyroid-stimulating immunoglobulin*), que pueden ser cultivos primarios de tirocitos humanos, líneas transfectadas con el gen del TSHR o la línea de tiroides de rata FRTL5. Dado que tanto los TBAbs como los TSAbs serán positivos en los ensayos de TBI, la ventaja del bioensayo es que detecta específicamente los TSAbs⁸⁸. A pesar de esto, en la práctica clínica actual, la mayoría de los laboratorios diagnósticos implementan métodos TBI de segunda o tercera generación, por su mayor rapidez, trazabilidad y posibilidad de automatización. La segunda generación de ensayos TBI utiliza preparaciones porcinas o receptor humano recombinante (rhTSHR) junto con TSH marcada con una molécula capaz de proporcionar una señal fluorescente o de luz. La tercera generación emplea un anticuerpo anti-TSHR monoclonal humano marcado para competir con los TRAbs del suero del paciente. Los ensayos TBI de segunda y tercera generación proporcionan una excelente sensibilidad y especificidad comparables.

La medida de anticuerpos contra el TSHR (TRAb) es una herramienta muy valiosa en el diagnóstico diferencial entre la EG y la tirotoxicosis debida a otras causas. Las concentraciones séricas de TRAb son significativamente más bajas que los anti-TPO y anti-TG y tienden a disminuir en pacientes tratados con un fármaco antitiroideo. Si persisten altas concentraciones de TRAb, es probable que el paciente se vuelva hipertiroideo nuevamente cuando se suspenda el medicamento.

Los anticuerpos anti-TPO y anti-TG en suero, aunque detectables en la mayoría de los pacientes con EG, generalmente no son útiles para el diagnóstico de la enfermedad.

3.4. Factores precipitantes y de predisposición

La identificación inequívoca de los factores etiológicos que subyacen a la EG todavía no se ha logrado. Los datos epidemiológicos apuntan a la interacción entre la **susceptibilidad genética** y **desencadenantes ambientales** como el elemento clave que conduce a la ruptura de la tolerancia y el desarrollo de la enfermedad (Figura 4).

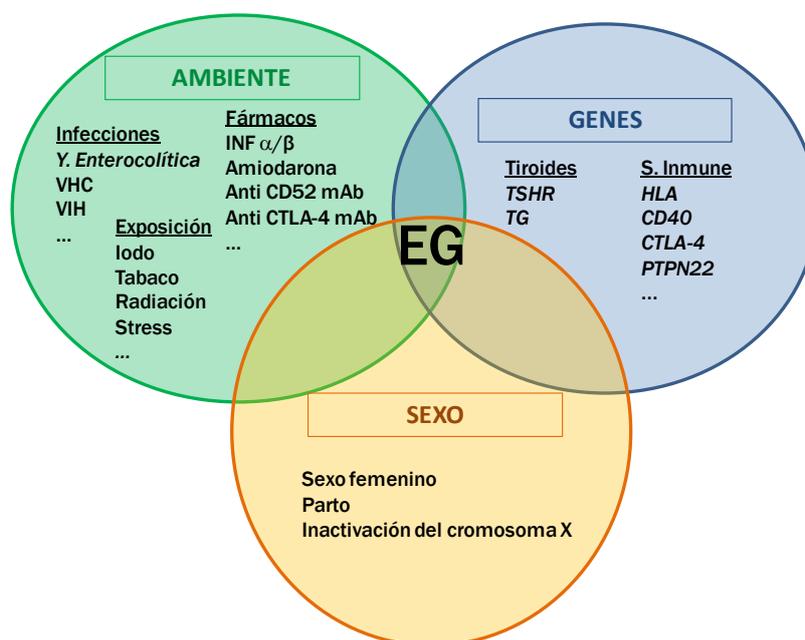


Figura 4. Etiología multifactorial de la enfermedad de Graves

3.4.1. Género femenino y embarazo

A pesar de la clara asociación del género femenino con la EG, con una proporción de 5 mujeres por cada hombre afecto, el mecanismo sigue siendo

desconocido. Aunque existe evidencia de que cantidades moderadas de estrógenos aumentan la reactividad inmunológica⁸⁹, el hecho de que la mayor susceptibilidad a la EG se mantenga después de la menopausia hace factible que sea el cromosoma X la fuente de dicha predisposición. Diversos estudios han asociado las AITD, y concretamente la EG, con la inactivación sesgada del cromosoma X (OR 2.54; IC 95%, 1.58–4.10)^{90–92}.

La EG postparto es una presentación común⁹³, sin embargo el embarazo como factor de riesgo sigue estando en entredicho dado que mujeres multíparas no sufren EG con mayor frecuencia. Se ha propuesto que el lento retroceso de la inmunosupresión que ocurre después del parto da como resultado una mayor reactividad inmune, y esto contribuye al desarrollo de la enfermedad tiroidea posparto, incluida la aparición o recurrencia de la EG^{73,94}. La detección de células fetales en sangre y tejido tiroideo de madres con enfermedad de Hashimoto y EG^{95,96} también ha planteado la posibilidad de que el microquimerismo fetal juegue un papel en el desarrollo de las AITD⁹⁷. Se sugiere la hipótesis de que las respuestas inmunitarias maternas contra antígenos fetales extraños pueden desencadenar enfermedades autoinmunes.

3.4.2. Factores ambientales

Entre los factores no genéticos postulados en precipitar la EG se encuentran el exceso de yodo, los fármacos como la amiodarona y el alentuzumab (anti-CD52), las infecciones, el tabaco y el estrés⁹⁸. Cómo estos diversos factores interactúan para conferir un riesgo de enfermedad sigue sin conocerse.

El **tabaco** es un factor de riesgo bien establecido para la EG con una OR de 3.3 (95% CI, 2.09–5.22) para el hipertiroidismo y de 4.40 (95% CI, 2.88–6.73) para la oftalmopatía de Graves cuando se comparan fumadores actuales con individuos que nunca han sido fumadores^{99–101}. Este riesgo desaparece a los pocos años de dejar de fumar.

El **yodo** y los fármacos que contienen yodo como la amiodarona o los medios de contraste yodados pueden precipitar la EG en un individuo susceptible^{101–103}. En poblaciones deficientes en yodo es más probable el yodo precipite la tirotoxicosis al permitir que los TRAb sean efectivos para estimular la formación de hormona tiroidea.

La forma más característica de la EG asociada a **fármacos** es la que ocurre tras la reconstitución inmunológica, ya sea después de la depleción deliberada de los linfocitos con un anticuerpo monoclonal contra CD52 (alemtuzumab o campath-1H) o durante la recuperación de la linfopenia CD4+ inducida por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) cuando dichos pacientes se tratan con terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA)¹⁰⁴. Curiosamente el efecto del anti-CD52 precipitando la EG se ha demostrado en pacientes tratados de esclerosis múltiple¹⁰⁵, pero no cuando esta terapia se utiliza para otras enfermedades como la artritis reumatoide¹⁰⁶ lo que pone de manifiesto la importancia del trasfondo genético y la disregulación de la tolerancia en la patogénesis de la EG.

En comparación con sujetos sanos o pacientes con bocio nodular tóxico, los pacientes con EG a menudo presentan antecedentes de algún tipo de **estrés** psicológico antes del inicio de su hipertiroidismo¹⁰⁷. En general el estrés puede inducir un estado de supresión inmune aunque no hay explicaciones biológicas claras sobre cómo los trastornos inmunológicos causados por el estrés afectan a las enfermedades autoinmunes.

Aunque existe cierta evidencia de que **agentes infecciosos** como *Yersinia enterocolitica*, algunos retrovirus o el virus de la hepatitis C pueden estar involucrados en la patogénesis de la EG, hasta la fecha no se ha demostrado la implicación directa de ninguno de ellos en el inicio o desarrollo de la enfermedad. La infección por *Yersinia enterocolitica* ha sido ampliamente estudiada porque los pacientes con EG presentan inmunoglobulinas que inhiben la unión de la TSH a las membranas externas de la bacteria, y el suero de algunos pacientes que se están recuperando de infecciones por *Yersinia* bloquea la unión de la TSH a sus receptores. Además se ha visto que existe reactividad cruzada entre las proteínas de la membrana externa de *Y. enterocolitica* y los epítomos de los TRAb¹⁰⁸⁻¹¹¹. Sin embargo la evidencia clínica sobre el papel de la infección por *Yersinia* sigue siendo controvertida ya que los pacientes que tienen o han tenido infecciones con este microorganismo no tienen disfunción tiroidea¹¹².

Se han propuesto dos modelos para explicar la inducción de autoinmunidad por agentes infecciosos: por lado un modelo de **mimetismo molecular** que sugiere que las similitudes de secuencia entre las proteínas virales o bacterianas y las proteínas propias pueden inducir una respuesta inmune cruzada a los antígenos propios. Por otro

lado, el modelo de la **activación de la célula espectadora** que propone que la infección viral de un determinado tejido puede inducir una inflamación local (por ejemplo, mediante la liberación de citoquinas), lo que resulta en la activación de linfocitos T autorreactivos que estaban inactivos o suprimidos por mecanismos reguladores periféricos. Lo interesante de este segundo modelo es que muchos tipos diferentes de infecciones conducirían al mismo fenotipo de enfermedad clínica¹¹³.

3.4.3. Factores genéticos

Aunque la etiología de la EG es polifactorial, la combinación de datos de estudios de gemelos y modelos biométricos muestra que más del 75% del riesgo para el desarrollo de EG es atribuible a factores genéticos¹¹⁴. Los estudios familiares, estudios de genes candidatos y los estudios GWAS han identificado numerosos genes vinculados con la susceptibilidad a AITD. Los polimorfismos que se han asociado consistentemente a EG se encuentran principalmente en la región HLA, pero también en los genes de regulación de la respuesta inmune *CTLA4* y *PTPN22* y en dos genes específicos del tiroides, la *TG* y el *TSHR*.

1.1.2.3. Loci de susceptibilidad para EG compartidos por otras EAI

La primera asociación de la EG con el **complejo principal de histocompatibilidad humano** (HLA) se describió para el alelo de clase I HLA-B8 (RR 1,5-3,5)¹¹⁵. Sin embargo, estudios posteriores de casos y controles en población caucásica establecieron una asociación más fuerte con los alelos de HLA de clase II DRB1*03, DQA1*0501 y, en menor medida DQB1*02, que forman el haplotipo de susceptibilidad DR3 (RR 2.5-5). También se identificó un haplotipo DR7 (DRB1*07, DQB1*02 y DQA1*0201) como haplotipo de protección¹¹⁶. Comparando estos dos haplotipos, el mapeo de aminoácidos basado en los alelos genotipados en DRB1 permitió identificar el aminoácido en posición β 74 como el que mostraba una evidencia más fuerte de asociación con EG¹¹⁷. Mientras que el alelo DRB1*03 que forma parte del haplotipo DR3 predisponente codifica una arginina en β 74, el alelo DRB1*07 del haplotipo protector DR7 codifica glutamina en β 74, lo que sugiere que los cambios de aminoácidos en β 74 pueden provocar las asociaciones observadas.

El antígeno 4 del linfocito T citotóxico (**CTLA4**), presente en linfocitos T efectoros activados y Treg, es uno de los principales reguladores de la respuesta inmune,

esencial para la tolerancia de los linfocitos T a los antígenos propios y para la función de los Treg. Diversos polimorfismos en *CTLA4* se han asociado a AITD^{118,119} pero también a otras EAI como a la diabetes tipo 1 (DMI), la artritis reumatoide (AR) o al lupus eritematoso sistémico (LES)¹²⁰⁻¹²². Concretamente la asociación de los polimorfismos A49G (Thr17Ala, rs231775) y C60T (3'UTR, rs3087243) con la EG está bien establecida. Los genotipos del SNP rs3087243 asociados a EG se han vinculado con niveles reducidos de ARNm de una isoforma de CTLA4 soluble¹²³ aunque este fenómeno no fue consistente con los niveles de CTLA4 encontrados en los pacientes¹²⁴.

El gen *PTPN22*, localizado en el cromosoma 1p13, codifica la fosfatasa citoplasmática linfoide (Lyp) o PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*). PTPN22 participa en vías de señalización complejas, por un lado Lyp es un potente inhibidor de la activación del linfocito T a través de la interacción con la quinasa Csk y la desfosforilación de las quinasas Lck y Fyn pero además PTPN22 también regula positivamente la señalización de las vías PRR (*Pattern Recognition Receptor*) y de interferón tipo 1, así como una activación dependiente de IFN-gamma^{125,126}. El polimorfismo R620W (rs2476601) en el exón 14 del *PTPN22*, que sustituye una arginina en la posición 620 por un triptófano, se ha asociado a una mayor predisposición a diversas EAI como la EG, la DMI, la AR y el LES^{118,120-122}. Al mismo tiempo R620W también parece tener un efecto protector en la esclerosis múltiple, la enfermedad inflamatoria intestinal o la enfermedad de Behçet¹²⁷. Estos efectos tan diversos pueden deberse a las complejas interacciones de PTPN22 en las vías de señalización celular. Por un lado la sustitución R620W parece tener un efecto de ganancia de función que incrementa la habilidad de LYP para suprimir la activación de los linfocitos T y B¹²⁸, pero al mismo el tiempo puede reducir la señalización vía TLR, la producción de IFN tipo 1 y la inmunorregulación¹²⁶.

La tiroglobulina, **TG**, es una gran proteína de 2.671 aminoácidos que constituye el 80% del contenido de proteína de la tiroides y está yodada en 10-12 residuos Tyr que sirven como sustrato para la síntesis de las hormonas T4 y T3. Polimorfismos en el gen *TG*, localizado en el cromosoma 8q24, se han asociado tanto a HT como a EG¹²⁹⁻¹³¹. Existen varios mecanismos propuestos por los cuales los SNP en *TG* podrían influir en la susceptibilidad a la AITD. Por un lado se ha sugerido un efecto epistático entre un alelo en el exón 33 de la TG (1980Arg) y el HLA-DRβ-Arg74, de manera que el HLA-

DR β -Arg74 presentaría los alelos de los SNPs de la TG asociados a la enfermedad de manera más eficiente a los linfocitos T¹³². También existe evidencia de un SNP en el promotor del TG en la posición -1623, que contiene un sitio para el factor regulador de interferón 1 (IRF1), que afecta la eficiencia de la transcripción¹³³, y existe otro SNP intrónico (rs2294025) que afecta el proceso de *splicing* y, en consecuencia, la expresión de la isoforma TG¹³⁴.

1.1.2.4. TSHR: un locus de susceptibilidad específico de EG

El receptor de la hormona estimulante de la tiroides (**TSHR**) se expresa mayoritariamente en la membrana plasmática de las células foliculares del tiroides y desempeña un papel central en la regulación de su función y crecimiento. Al ser el autoantígeno principal en la EG ha sido un gen de susceptibilidad candidato objeto de muchos estudios genéticos desde antes de la llegada de los estudios de asociación genómica amplios mediante el estudio de miles de SNPs (GWAS).

En 1997 el análisis de ligamiento de genes candidatos realizado en un pequeño grupo de familias con miembros afectados de AITD permitió a Tomer et al. identificar un locus de 25cM en el cromosoma 14q31 asociado con EG que fue designado como GD-1¹³⁵. En el centro de este locus se encontraba el gen *TSHR*, además de otros genes candidatos (ej. DIO2, IGH, ESR2). Un año después, en un estudio ampliado con 53 familias de pacientes con AITD este mismo grupo confirmó la asociación específica del locus GD-1 con la EG y no con la tiroiditis de Hashimoto¹³⁶. Sin embargo, estos estudios no fueron concluyentes al establecer la asociación del *TSHR* con la EG. Finalmente en 2005 el equipo del Dr. Gough consigue establecer de manera definitiva esta asociación analizando 40 SNP del *TSHR* en dos cohortes caucásicas: una cohorte de 1059 casos de GD y 971 controles y otra con 1366 casos de AITD y 1061 controles¹³⁷. Este enfoque condujo a la identificación del SNP rs2268458 (ubicado en el intrón 1 de *TSHR*) como el marcador con la asociación a EG más fuerte (OR = 1.3). Además esta asociación genética del TSHR con la EG no se producía en pacientes con hipotiroidismo autoinmune confirmando al *TSHR* como el único locus de susceptibilidad específico de EG descrito hasta la fecha.

Desde entonces, gracias al desarrollo del mapa de haplotipos del genoma humano (*HapMap*) y de las tecnologías para el genotipado de múltiples SNP, numerosos

estudios han relacionado otros polimorfismos del *TSHR* con la EG en diferentes poblaciones. La revisión de los polimorfismos del *TSHR* descritos en asociación con la EG forma parte de uno de los objetivos de esta tesis y se desarrollará con detalle en el primer capítulo de resultados.

3.5. Inmunopatogénesis

Se presume que el proceso autoinmune que conduce a la EG comienza con la interacción de los receptores de linfocitos T autorreactivos específicos de tiroides, que han escapado de los mecanismos de tolerancia central (tímica) y periférica, con las moléculas de MHC de clase II que presentan péptidos tiroideos (por ejemplo del TSHR). Esta presentación, acompañada de señales coestimuladoras, produce su activación y el reclutamiento de linfocitos B autorreactivos con la resultante producción de anticuerpos antitiroideos⁷². El hecho de si la primera interacción se produce en los ganglios linfáticos a los que drena la glándula tiroidea o en la glándula en sí, aún no se conoce con exactitud (Figura 5).

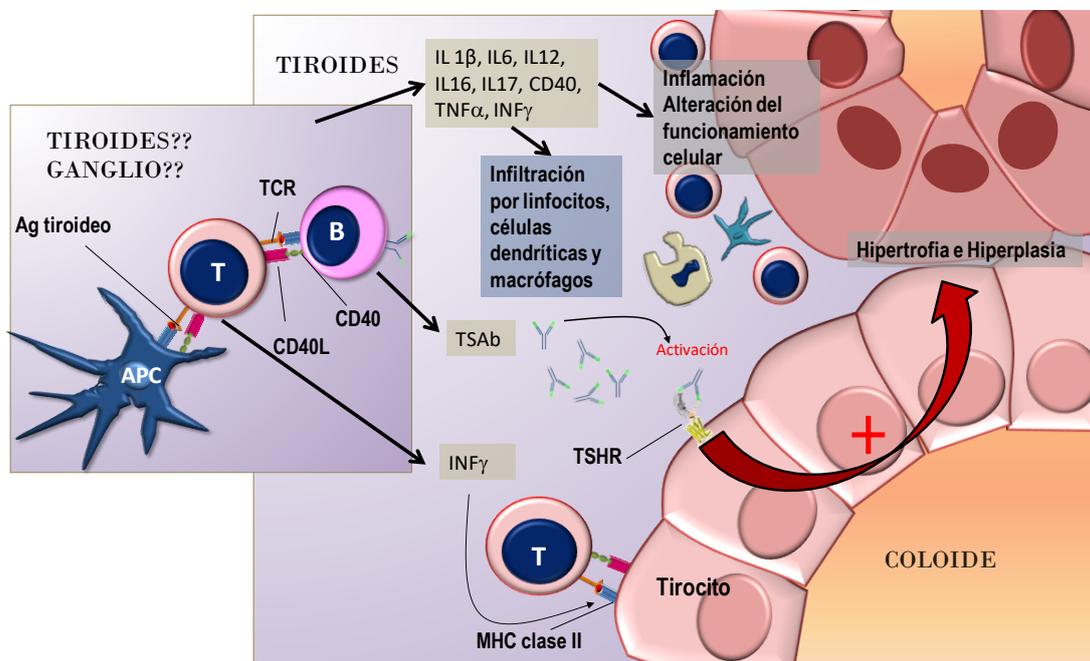


Figura 5. Modelo teórico de la EG en el tiroides

Modificada de Smith, T.J., and L. Hegedüs. 2016. Graves' Disease. N. Engl. J. Med. 375:1552–1565.

3.5.1. Linfocitos y células epiteliales tiroideas

Tanto los linfocitos T como los B son necesarios para el desarrollo de la EG. En las glándulas tiroideas de los pacientes con EG se pueden encontrar todos los tipos de **linfocitos T** (Th1, Th2, Th17, Treg y T citotóxicos CD8⁺)^{138,139}. Al ser una patología en la que predomina una respuesta humoral, durante años se ha considerado una enfermedad Th2, sin embargo, dado que su fisiopatología está ligada a los TRAb de la subclase IgG1 que son inducidos por el IFN- γ , el concepto actual es que los linfocitos T específicos del tiroides en la EG actúan inicialmente como Th1 y es más adecuado considerarla una mezcla de respuestas Th1 y Th2 ¹⁴⁰.

Una evidencia del papel de los linfocitos T en la etiología de la EG surge de que los TCR de linfocitos T aislados del tejido tiroideo de pacientes son producto de un número limitado de familias de genes de la región variable (V)^{141,142}. Esta observación sugiere que el tejido tiroideo de estos pacientes atrae y activa linfocitos T con TCRs concretos, en vez de inespecíficamente.

Los **linfocitos B** desempeñan un papel esencial en la EG ya que son los productores de autoanticuerpos activadores dirigidos contra el TSHR (TSAb) patognomónicos de la enfermedad. Se ha propuesto que una fuente importante de TSAb son las células plasmáticas que forman parte del infiltrado linfocítico tiroideo¹⁴³⁻¹⁴⁵, pero es muy probable que una proporción muy importante proceda de órganos linfoides secundarios y de médula ósea.

Los linfocitos B reconocen antígenos solubles intactos a través de su BCR, sintetizan anticuerpos específicos y presentan fragmentos de estos antígenos a linfocitos T CD4⁺, que a su vez mantienen recíprocamente la activación de los linfocitos B. En esta interacción entre los linfocitos B y T las señales de CD40 son críticas para el cambio de clase de inmunoglobulina y la diferenciación de los linfocitos B.

Hay que tener en cuenta que entre el 55% y el 75% de los linfocitos B inmaduros que salen de la médula muestran cierto grado de autorreactividad o polirreactividad, y que estas especificidades no se eliminan hasta que alcanzan los puntos de control de tolerancia periférica en el bazo¹⁴⁶. Además, algunos autores han argumentado que para algunas clases de autoantígenos, la tolerancia de las células B no se logra por delección o anergia, sino en gran medida por la falta de la cooperación con las células T ¹⁴⁷.

Las **células epiteliales tiroideas** además de expresar los antígenos tiroideos, como el TSHR, la TG y la TPO, pueden liberar quimiocinas y, por lo tanto, pueden participar en el reclutamiento de las células inmunes. En la EG, las células epiteliales de la tiroides también expresan moléculas HLA de clase II especialmente moléculas de HLA-DR^{86,148,149}. Esta expresión podría ser el resultado directo de infecciones virales u otras infecciones de las células epiteliales de la tiroides, o puede ser inducida por citocinas como el IFN- γ producido por linfocitos T que han sido atraídos a la glándula ya sea por una infección o directamente por la presencia de antígenos tiroideos. Así mismo, la expresión de HLA de clase II permitiría a los tirocitos presentar antígenos virales a linfocitos T y antígenos tiroideos a linfocitos T específicos de la tiroides¹⁴⁹. La importancia de la presencia de moléculas MHC de clase II en células no hematopoyéticas en la EG quedó patente con el modelo de EG en ratón generado por el grupo de Shimojo y colaboradores, el primer modelo animal que consiguió con éxito generar EG en ratones. Este modelo, que consigue inducir hipertiroidismo al inmunizar ratones con fibroblastos transfectados con TSHR humano, solo es eficaz cuando las células también expresan MHC de clase II¹⁵⁰.

En las células foliculares tiroideas de las glándulas tiroideas en pacientes con EG junto con la expresión aberrante de HLA clase II se ha descrito la expresión de ICAM-1¹⁵¹ y CD40¹⁵². Por lo tanto, estas células pueden expresar todas las moléculas de superficie requeridas para la presentación de antígenos y/o para ser reconocidas como células diana en contexto de la enfermedad autoinmune tiroidea.

A pesar de que las células dendríticas de la glándula tiroidea se han visto relacionadas con la tiroiditis autoinmune¹⁵³ existen pocos estudios de su participación en la EG. Algunos trabajos hacen sospechar que tienen un papel importante en la EG, por ejemplo la inmunización de ratones con células dendríticas cargadas con TSHR ha tenido éxito en la inducción de hipertiroidismo¹⁵⁴. Además en las glándulas tiroideas de enfermos con EG no solo se encontró un mayor número de DC sino que además éstas estaban interaccionando tanto con linfocitos T como con los tirocitos¹⁵⁵.

En resumen, podemos decir que en la EG existen potencialmente tres vías intratiroidales de presentación del TSHR a los linfocitos T específicos de la tiroides: por los propios tirocitos, por células dendríticas intra- o extra-tiroideas o por los linfocitos B directamente.

3.5.2. Anticuerpos anti TSHR

La estimulación tiroidea resultante de la autoinfusión de plasma de pacientes con EG realizada por Adams⁸³ fue la confirmación absoluta del papel de los anti-TSHR (TRAb) en la inducción de hipertiroidismo humano y una de las primeras demostraciones de transferencia de anticuerpos causantes de enfermedades autoinmune.

En el suero de los pacientes con EG y ratones inmunizados con TSHR humano (hTSHR) se pueden detectar tres variedades de TRAb que se clasifican como **estimulantes** (TSAb), **bloqueantes** (TBAb) o "**neutros**" (TNAb) en base a su modulación de la señal del AMP cíclico (Figura 6).

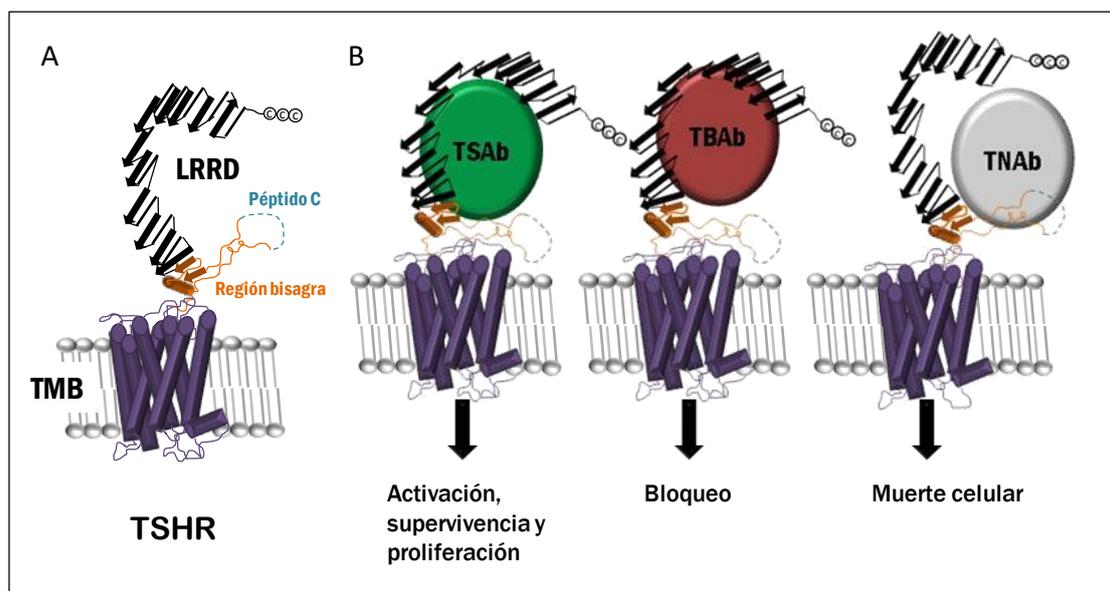


Figura 6. Esquema TSHR y tipos de anticuerpos anti-TSHR

A. El TSHR se compone de 3 dominios estructurales: un dominio extracelular compuesto por dominios de repeticiones ricos en leucina (LRRD), un dominio serpentina transmembrana (TMB) y una región bisagra que une ambas fracciones. Este receptor puede sufrir la escisión intramolecular de un fragmento de la región bisagra (péptido C). B. Los TSAb se unen a epítomos conformacionales del LRRD y la región bisagra provocando un cambio conformacional del receptor que imita la acción de la TSH activando el receptor. Los TBAb también reconocen epítomos conformacionales del LRRD aunque no de la región bisagra. Esta unión no provoca la activación del TSHR per impide la unión de la hormona. Los TNAb se unen a epítomos lineales de la región bisagra y, aunque no compiten con la TSH ni inducen la producción de AMPc pueden participar en la activación de señales de apoptosis. Modificado de Morshed et al. 2012

Los **TSAb**, se encuentran en el 98% de los enfermos con EG^{156,157} y son la causa del hipertiroidismo debido a que son capaces de imitar la acción de la tirotropina en su receptor a través del inicio de una señalización similar, pero no idéntica¹⁵⁸. Los TSAb se unen exclusivamente a epítomos conformacionales en la región de repeticiones ricas

en leucina del ectodominio de TSHR (Figura 6) y compiten con la TSH¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Son usualmente IgG1, lo que sugiere que son oligoclonales¹⁶², a diferencia de los anti-TPO o los anti-TG que son policlonales.

Los **TBAb** tienen características similares a lo TSAb, y al igual que ellos compiten con la TSH para unirse al TSHR pero, una vez unidos, no pueden inducir la transducción de señales por sí mismos¹⁵⁸ (Figura 6). Al impedir físicamente la interacción de la TSH con el ectodominio bloquean la acción tirotrópica de la hormona y son capaces de causar hipotiroidismo. Algunos pacientes con EG tienen una mezcla de TRAb, tanto estimulantes como bloqueantes, y la presentación clínica depende del equilibrio entre estos diferentes anticuerpos¹⁶³.

Hasta la fecha, se han aislado cuatro **anticuerpos monoclonales** (MAb) contra el TSHR de hibridomas generados con linfocitos de sangre periférica de pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune. Dos de estos autoanticuerpos (M22 y K1-18) tienen actividad estimulante del tiroides, mientras que los otros 2 (K1-70 y 5C9) tienen actividad bloqueante del tiroides. K1-18 y K1-70 se obtuvieron de hibridomas de un mismo paciente. Todos ellos pertenecen a la subclase IgG1, tienen una alta afinidad y especificidad por el TSHR y son biológicamente activos a muy bajas concentraciones (nmol/L). Estos MAb estimulantes y bloqueantes compiten entre sí por la unión al TSHR e inhiben la unión al receptor de la TSH y de otros MAb contra el TSHR producidos en animales experimentales. Además los TRAb de sueros de pacientes con EG inhiben la acción de estos monoclonales lo que sugiere que los sitios de unión en el TSHR para ambos tipos de MAb (estimulantes y bloqueantes) y los TRAb en el suero de los pacientes se superponen aunque puede haber diferencias discretas. Es decir, los 4 MAb son representativos de TRAb de sueros de pacientes. M22 y K1-70 han sido fundamentales para entender cómo los TRAb interactúan con el TSHR y su alta afinidad por el TSHR los hace particularmente adecuados para su uso como ligandos en ensayos para la determinación de autoanticuerpos contra TSHR en suero¹⁶¹.

Algunos MAb generados en hámsters inmunizados se unen a epítomos lineales de la región bisagra, incluido el péptido eliminado tras la escisión intramolecular del TSHR (Figura 6). Estos TRAb se han denominado "**neutros**" (TNAbs) porque no activan el TSHR ni bloquean la estimulación de la TSH¹⁶⁴, pero parece que pueden desempeñar un papel en las cascadas de señalización que conducen a la apoptosis^{165,166}. Aunque se

ha demostrado la presencia de TRAb dirigidos contra epítomos lineales de la región bisagra del TSHR en suero de pacientes con EG¹⁶⁵, hasta la fecha, no se han clonado autoanticuerpos de TSHR "neutros" humanos y su papel en la patogenia de la EG sigue siendo poco conocida.

3.6. Modelos animales de EG

Salvo los humanos, ninguna otra especie del reino animal desarrolla EG espontáneamente. En los modelos experimentales, los autoanticuerpos contra TSHR inducidos por la inmunización convencional con proteína TSHR y una variedad de adyuvantes son solo anticuerpos bloqueantes que no estimulan la glándula tiroidea y no inducen la EG experimental^{167,168}. El modelo de ratón Shimojo de la EG fue el primer sistema para generar ratones hipertiroides. Para ello se inyectaron por vía intraperitoneal fibroblastos que expresaban los antígenos TSHR y MHC de clase II, lo que resultó en hipertrofia tiroidea y la presencia de TSAb en el suero¹⁵⁰. Un hipertiroidismo similar con TSAb también puede inducirse en ratones o hámsters mediante la inyección de células eucarióticas intactas que expresan el TSHR humano (hTSHR) o mediante la inyección de vectores de plásmidos/adenovirales que codifican el hTSHR o, más eficientemente, su subunidad A^{*169,170}. Hay que señalar que para la inmunización es necesario utilizar el TSHR humano o su subunidad A ya que los ratones inmunizados con TSHR de ratón no desarrollan anticuerpos de TSHR debido a la tolerancia central al TSHR endógeno. Recientemente se ha descrito un modelo de ratón que desarrolla espontáneamente TSAb similares a los de la EG humana. Este resultado se logró mediante la expresión intratiroidea de la subunidad A del hTSHR en ratones NOD.H2h4 que están genéticamente predispuestos a desarrollar tiroiditis pero que, sin el transgen, no generan TSAb¹⁷¹.

Aunque cada modelo animal tiene algunas limitaciones, juntos nos han dado algunas claves para comprender la EG humana:

1) El *background* genético desempeña un papel esencial en el desarrollo de TSAb ya que enfoques de inmunización similares produjeron diferentes resultados en diferentes cepas de ratones.

* La subunidad A del hTSHR es la subunidad extracelular del receptor que se genera tras la escisión del péptido C localizado en la región bisagra de la molécula. Ver figura 9 en el apartado 4.2.

2) La subunidad A del TSHR libre muestra ventajas significativas sobre el TSHR de longitud completa para inducir TSAb. Los primeros 289 residuos aa de la subunidad A de TSHR, expresados por un vector de adenovirus, indujeron hipertiroidismo de Graves con mayor frecuencia que el receptor no escindido ^{172,173}.

3) El modelo de Shimojo ha enfatizado particularmente que la expresión aberrante de MHC clase II en no-APC es un factor que contribuye a la EG.

4. EL RECEPTOR DE LA TIROTROPINA (TSHR)

El receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR) es el antígeno principal en la EG. El TSHR es un miembro de la familia de receptores de clase A acoplados a proteína G (GPCR), evolutivamente relacionado con dos receptores de hormonas gonadotróficas: el receptor de la hormona estimulante de folículos (FSHR) y el receptor de la hormona luteinizante (LH) y la gonadotropina coriónica (LHCGR). Estos tres receptores constituyen la subfamilia de los receptores de hormonas glicoproteicas (GPHR).

4.1. Función y localización

El TSHR se expresa mayoritariamente en la membrana basolateral de los tirocitos, y es esencial para el crecimiento de la glándula y la secreción y síntesis de hormonas tiroideas. La TSH, producida por las células tirotrópicas localizadas en la adenohipófisis, se une a su receptor TSHR y provoca la activación de diferentes subtipos de proteínas G y vías de señalización (Figura 7).

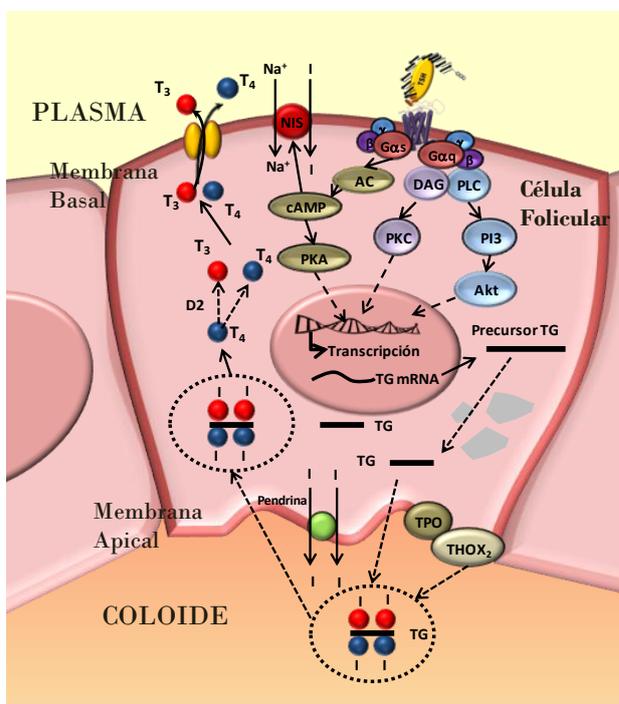


Figura 7. Función del TSHR en el tiroides

TG, tiroglobulina;
 TPO, peroxidasa tiroidea;
 NIS, *simportador I/Na+*;
 AC, *adenilato ciclasa*;
 PKA, *Proteína quinasa A*;
 PLC, *fosfolipasa C*;
 Akt, *Proteína quinasa B*;
 PKC, *Proteína quinasa C*;
 DAG, *diacilglicerol*;
 PI3, *fosfatidilinositol trifosfato*;
 THOX₂, *Oxidasa tiroidea 2*;
 D2 *Deiodinasa 2*

Figura modificada de Latif et al. 2009
 y Colicchia et al. 2014

Las señales inducidas por las proteínas Gs y Gq son las de mayor importancia¹⁷⁴. La proteína Gs, activa la cascada adenilato ciclasa/AMPC que regula la captación de iodo y la transcripción de TG, TPO y el simportador Na⁺/I⁻ (NIS). La TG se almacena en el lumen folicular y, en la membrana apical, la oxidación por la TPO permite la yodación de residuos de tirosina de la TG, a través de la formación de H₂O₂ por la oxidasa tiroidea 2 (THOX₂). La TG yodada se transforma en tiroxina (T4) que puede ser transformada en su forma activa, la triyodotironina (T3) por la deiodinasa 2 (D2) (Figura 7).

El TSHR también puede activar la proteína Gq que media la activación de la fosfolipasa C y la vía fosfatidil inositol 3 fosfato/Diacilglicerol (IP3/DAG) que activan la proteína quinasa C (PKC) y proteína quinasa B (Akt). El Ca²⁺ y la PLC regulan la liberación de iodo, la producción de H₂O₂ y la iodación de la TG mientras que la vía Akt es necesaria para la supervivencia y proliferación de los tirocitos¹⁵⁸ (Figura 7).

La expresión del TSHR no es única del tiroides, en las últimas décadas se ha demostrado su presencia en células madre embrionarias y una variedad de tejidos maduros especialmente en fibroblastos, adipocitos, tejido óseo y timo pero a un nivel significativamente menor (Tabla 4)¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

Tabla 4. Distribución extratiroidal del TSHR

Localización	mRNA	Proteína	Referencias
Timocitos	+	+	209,245
Fibroblastos y adipocitos	+	+	260
Pituitaria	+	+	261,262
Hueso	+	+	179
Hepatocitos	+	+	180
Endotelio	+	+	263,264
Músculo liso	+	+	265
Testículo	+	+	266,267
Endometrio	+	+	268
Ovario	+		269
Leucocitos y dendríticas	+		270-272
Linfocitos B tímicos	+		243
Eritrocitos		+	273
Células embrionarias		+	274

Las diversas localizaciones del TSHR indican que la función de la TSH no se limita a la controlar la producción de hormonas tiroideas, pero su función extratiroidal sigue siendo actualmente poco conocida. La TSH se ha visto implicada en la inducción de lipólisis¹⁷⁸, en la modulación de la actividad de los osteoclastos¹⁷⁹ y en hepatocitos parece participar en la síntesis y transformación del colesterol hepático, contribuyendo así directamente a la hipercolesterolemia^{180,181}. El efecto pro-inflamatorio que tiene la TSH sobre los macrófagos ha ayudado a esclarecer las causas de la predisposición a la arteriosclerosis que sufren los pacientes con hipotiroidismo¹⁸².

La expresión retro-orbitaria del TSHR, en combinación con los receptores IGF-1, expresados en los fibroblastos y adipocitos detrás del ojo, parece estar involucrada en la patogenia de la oftalmopatía de Graves^{183,184}.

4.2. Estructura y modificaciones postraduccionales

El gen del TSHR (*ID NCBI: 7253*), localizado en el cromosoma 14q31, codifica una proteína de 764 aminoácidos (aa) (84.4 KDa) que durante su paso a la superficie celular sufre complejas modificaciones post-traduccionales dando lugar a una proteína madura de 100-120 KDa. Estos eventos post-traduccionales pueden influenciar la antigenicidad del receptor.

Al igual que el resto de miembros de la familia de GPHR, el TSHR se compone de un **péptido señal** (21 aa), un gran **ectodominio** glicosilado (ECD: residuos 22 a 409; 388 aa) y un **dominio transmembrana** con una corta cola C-terminal intracelular (TMB: residuos 410 a 764; 354 aa)^{174,185} (Figura 8).

El dominio **TMB** es un dominio serpentina formado por 7 pasos transmembrana conectados intracelularmente por bucles que interactúan con las proteínas G cuando el receptor es activado.

El **ECD** está compuesto por la cola N-terminal, un dominio de repeticiones ricas en leucina (**LRRD**) flanqueado por dos cajas de cisteínas (Cb-1: Cys24-Cys36 y Cb-2: Cys283-Cys301) y una **región bisagra** o dominio de escisión (*cleavage domain*, CD: 120 aa) que conecta el ECD con el dominio TMB. El cluster de cisteínas N-terminal, Cb-1, es importante para el correcto plegamiento y transporte intracelular del receptor mientras que los clusters de cisteínas Cb-2 y Cb-3, en el extremo C-terminal del

ectodominio, sirven en la formación de puentes disulfuro entre el LRRD y la región bisagra.

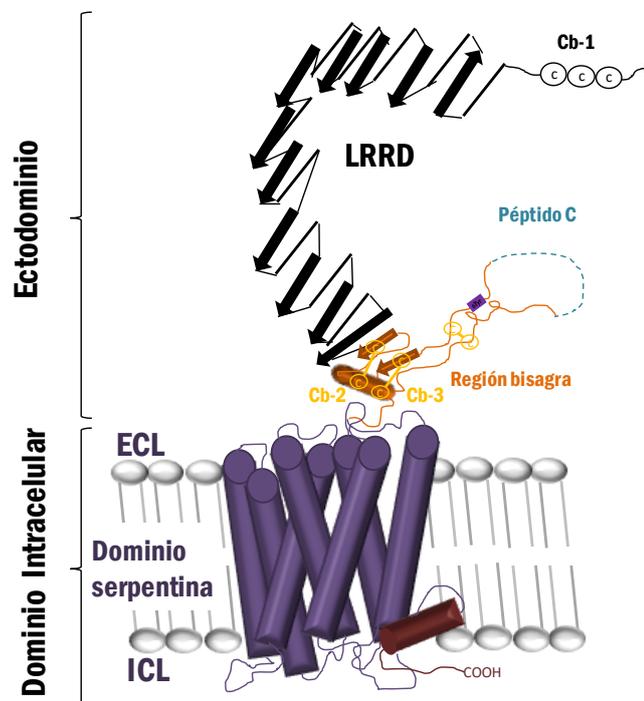


Figura 8. Estructura TSHR

LRRD: dominio rico en repeticiones de leucinas; ECL: Bucles extracelulares; ICL: Bucles intracelulares

El **LRRD** posee 11 motivos de repeticiones ricas en leucina (LRR) de 20-25 residuos de longitud con estructura tipo lámina β -giro-hélice α donde las láminas β quedan orientadas hacia la superficie interna. Esta disposición hace que el LRRD adquiera una forma de cuchilla tipo guadaña con un ligero giro desde el extremo N hacia el extremo C¹⁷⁴. Tanto la TSH como la mayoría de los TRAb interactúan con la superficie cóncava del LRRD¹⁷⁵. Los estudios con un panel de anticuerpos que mapeaban los epítomos de TSHR para bloquear la unión de TSH al receptor demostraron la existencia de tres regiones distintas y discontinuas (aa 246-260, 277-296 y 381-385) que se pliegan juntas para formar un el bolsillo de unión (*binding-pocket*) de la TSH¹⁸⁶.

La estructura de la **región bisagra** del TSHR, que se extiende aproximadamente desde los residuos 289 al 409, es la menos conocida debido a su bajo nivel de homología con otros GPHR y parece ser la responsable de varias diferencias de función como la unión a hormonas o transmisión de la señal al dominio TMB. Se sabe que los residuos Glu-

297, Glu-303 influyen de manera significativa en la unión de la hormona al TSHR y además el Glu-297 también está parcialmente involucrado en transmisión intramolecular de la señal¹⁸⁷. Además, la sulfatación en la tirosina 385 localizada en la región C-terminal de la región bisagra parece ser crítica para la unión de alta afinidad de la TSH y la activación del receptor¹⁸⁸.

La fracción extracelular del TSHR humano está muy glicosilada en seis sitios de N-glicosilación (Asn77, Asn99, Asn113, Asn177, Asn198, Asn302), lo que supone entre un 30 a un 40 % del peso molecular del receptor. La glicosilación desempeña un papel importante en el plegamiento y expresión en superficie del TSHR, pero no parece estar implicada en la unión a la hormona¹⁸⁹.

El TSHR puede sufrir la escisión intramolecular de un fragmento de aproximadamente 50 aminoácidos (**péptido C**: aprox entre los residuos 303 a 367) en la región bisagra quedando unidas la fracción extracelular (**Subunidad A**: residuos 22 a 302 aprox. 35 KDa) y la fracción transmembrana (**Subunidad B**: residuos 368 a 764 aprox. 46 KDa) por puentes disulfuro (Figura 9)^{190,191}.

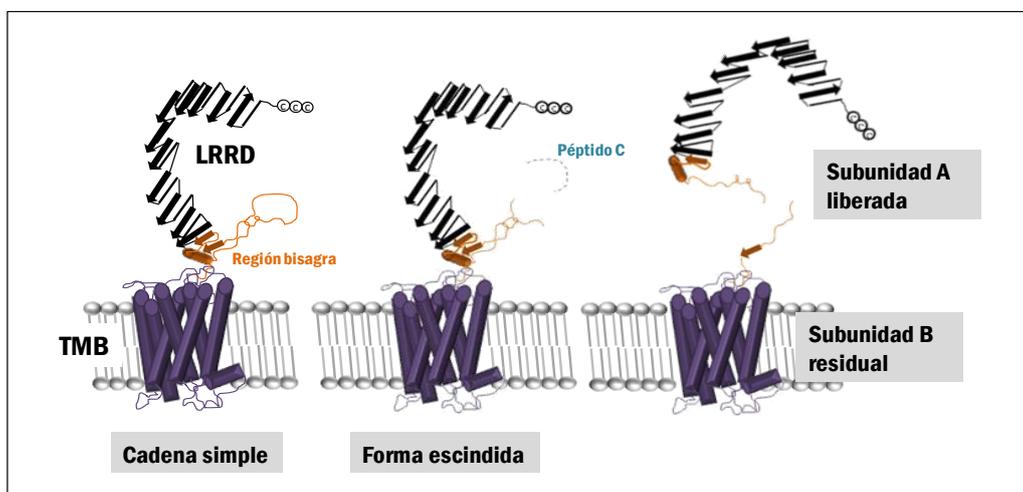


Figura 9. TSHR escisión y desprendimiento

El enzima responsable de este proceso de escisión aún no se ha identificado pero la presencia de N-glicanos de tipo complejo en la subunidad A y la ausencia de formas escindidas intracelulares^{192,193} sugieren que la escisión ocurre en la superficie celular. Ambas formas del TSHR, tanto la de cadena simple como la de dos subunidades (forma escindida), se detectan en la superficie celular aunque la proporción de cada una de ellas no está bien establecida^{192,194,195}. Los datos *in vitro* sugieren que tras la

reducción de los puentes disulfuro, la subunidad A hidrosoluble puede desprenderse y ser liberada a periferia mientras que la subunidad B permanece anclada a la membrana^{196,197}. Aunque este fenómeno no ha podido ser demostrado *in vivo*, el exceso de subunidades B en comparación con la subunidad A en membranas plasmáticas de tejido tiroideo humano purificado podría indicar que la escisión y desprendimiento de la subunidad A están ocurriendo también *in vivo*¹⁹⁸.

Existe evidencia de que el TSHR puede unirse formando multímeros en la superficie celular pero no está muy claro el número de protómeros que se asocian y si la multimerización es causada por la sobreexpresión de TSHR en los sistemas de expresión heterólogos que se usan en la mayoría de los estudios^{199,200}.

4.3. Gen y transcritos

La proteína TSHR humana está codificada por un solo gen de 197.778 bp ubicado en el cromosoma 14q31 (*ID NCBI: 7253; ID Ensembl ENSG00000165409*) con 10 exones. Los 9 primeros exones codifican la mayor parte de la fracción extracelular de la proteína (1 al 294 aa) (péptido señal, LRRD y parte de región bisagra) mientras que el exon 10 codifica el dominio TMB completo y el resto de la región bisagra (aa 295-764) (Figura 10).

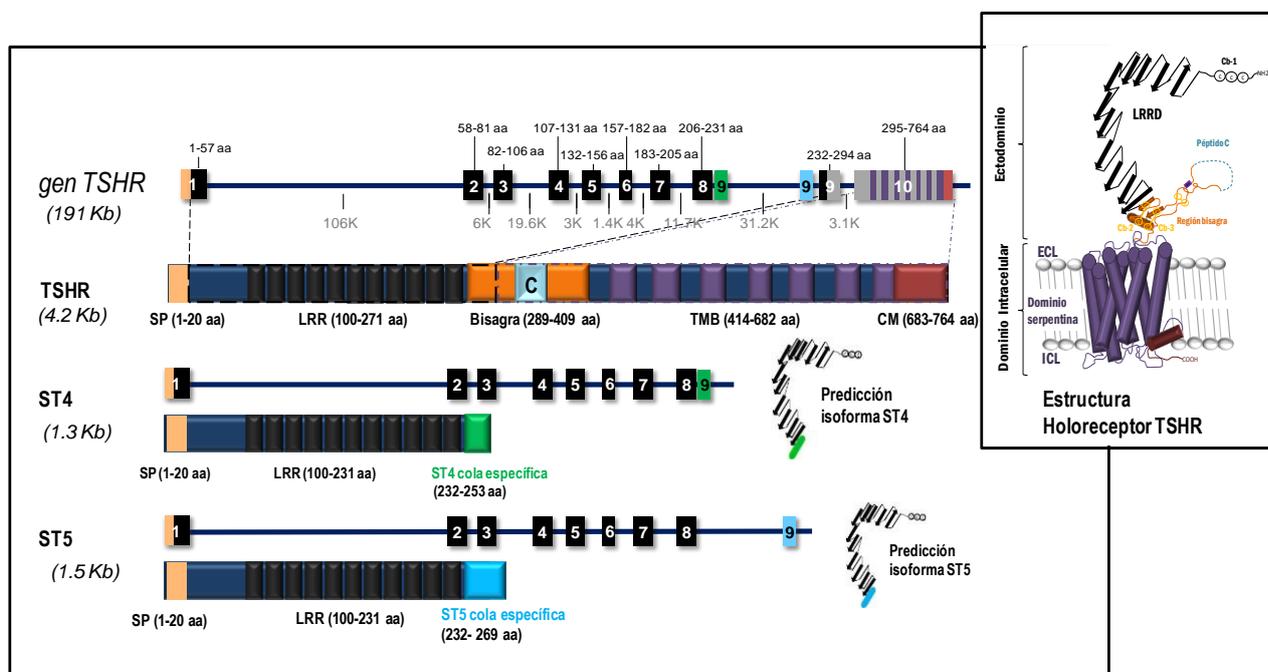


Figura 10. Esquema del gen *TSHR* y sus dos principales variantes de *splicing*

Además del ORF único que da lugar al receptor completo (*ID Ensembl: ENST00000298171.6*) se han descrito más de 7 variantes de splicing del TSHR^{201,202} (www.ensembl.org). De todas ellas las denominadas ST4 de 1.3 KDa (1102bp, 253 aa) y ST5 de 1.7 KDa (1654 bp, 269 aa) son las más abundantes y para las que hay mayor evidencia de expresión proteica²⁰¹⁻²⁰⁴. Los transcritos ST4 y ST5 comparten con la forma canónica los 8 primeros exones, pero contienen un noveno exón alternativo, retenido dentro del intrón 8 del gen, que es único y diferente para cada uno de ellos y ambos carecen del exón 10 (Figura 10).

De traducirse, tanto ST4 como ST5 incluirían la mayoría de los motivos LRR de la región extracelular de unión a TSH, pero no la región bisagra ni el dominio transmembrana de la TSHR por tanto generarían isoformas solubles del TSHR que no coinciden plenamente con la subunidad A ya que difieren en el extremo C terminal (Figura 10) (Ver Anexo 1. Secuencias y alineamiento de secuencias).

4.4. Relevancia funcional de los polimorfismos en el intrón 1 del TSHR

La asociación del *TSHR* con la EG se ha acotado a una región de 40 Kb que se encuentra en el intrón 1 (106 Kb) del gen. Dentro de esa región los SNPs rs179247 y rs12101255 son los mayores factores de riesgo en la población caucásica (ORs 1.45 y 1.87 respectivamente)²⁰⁵. El mecanismo molecular que subyace a la asociación de los SNPs intrónicos del *TSHR* y el riesgo a padecer EG ha sido solo parcialmente elucidado. En la actualidad existen dos hipótesis no mutuamente excluyentes que intentan explicar cómo estos polimorfismos pueden contribuir a la presentación del TSHR como una diana para el sistema inmunológico en los seres humanos.

Por un lado, en 2009 el grupo del Dr. Gough de la Universidad de Birmingham propuso que los polimorfismos del intrón 1 asociados a EG participan en la regulación del *splicing* alternativo del mRNA del TSHR en el tiroides²⁰⁶. Brand et al. encontraron que en aquellas muestras de tiroides de pacientes portadores de los alelos de riesgo para EG en los SNPs rs179247 y rs12101255, existía una mayor expresión relativa de las variantes ST4 y ST5 y sugirieron que estas isoformas "solubles" pueden ser más inmunogénicas, mecanismo que puede estar relacionado con una pérdida de la tolerancia periférica.

Pocos años después, nuestro equipo encontró que la presencia del alelo protector del SNP rs179247 se asociaba con una mayor expresión de mRNA del *TSHR* en timo pero no en el tiroides²⁰⁷. Planteamos entonces la hipótesis de que este mecanismo podría favorecer la selección negativa de los linfocitos T autorreactivos para el *TSHR*, al igual que ocurre para otros genes asociados a otras enfermedades autoinmunes como son el gen *INS* en diabetes tipo 1⁶¹ o el gen *CHRNA1* en *miastenia gravis*⁵⁹.

Ambas hipótesis proponen la participación de los SNPs localizados en el intrón 1 de gen *TSHR* en la expresión génica de dicho gen, estableciendo dos mecanismos (la modulación de los niveles de expresión en el timo y el splicing alternativo en el tiroides) por los cuales se podrían alterar los mecanismos de tolerancia central y periférica explicando así el desarrollo de la EG. Validar o refutar de estas dos hipótesis ha sido el objetivo principal de esta tesis y, en general, este trabajo trata de aportar evidencia acerca del papel de la tolerancia central al *TSHR* y el papel de ésta en la patogénesis de la enfermedad.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La pérdida de tolerancia al receptor de la tirotropina -TSHR- que conduce a la enfermedad de Graves está en parte condicionada por polimorfismos del propio gen *TSHR* y por la inmunogenicidad de sus diferentes isoformas.

OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis se basan en la idea de que un conocimiento detallado de la regulación y del nivel de la expresión del receptor de la tirotropina (TSHR) y de sus isoformas en el timo y en tiroides puede ayudar a comprender porqué se pierde la tolerancia a esta proteína y porque se generan anticuerpos estimulantes.

Objetivos bibliográficos basados en la revisión y actualización del conocimiento sobre el papel del TSHR y la tolerancia central en la EG:

- B1. Revisar los estudios genéticos publicados sobre la asociación de polimorfismos del *TSHR* en la susceptibilidad en la EG.
- B2. Revisar las evidencias de la expresión del *TSHR* en timo, con especial énfasis en la expresión en timocitos.
- B3. Revisar los datos existentes que apoyan cada una de las dos hipótesis planteadas para explicar la asociación del *TSHR* con la EG.
- B4. Revisar los estudios genéticos publicados sobre la asociación de polimorfismos de *AIRE* y enfermedades autoinmunes en humanos.

Objetivos experimentales centrados en las bases genéticas de la pérdida de tolerancia central al TSHR en la enfermedad de Graves:

- E1. Analizar el posible papel de los polimorfismos del gen *AIRE* en la susceptibilidad a la EG.
- E2. Confirmar mediante secuenciación masiva el efecto de los polimorfismos del intrón 1 del *TSHR* sobre su expresión en timo y en tiroides.
- E3. Cuantificar la expresión de las principales isoformas del *TSHR* generadas por *splicing* alternativo en timo y tiroides.
- E4. Evaluar el efecto de los polimorfismos del intrón 1 del *TSHR* asociados a EG en la expresión de las principales isoformas del *TSHR* generadas por *splicing* alternativo en timo y tiroides.

RESULTADOS

CAPITULO 1: PAPEL DE LOS POLIMORFISMOS DEL *TSHR* EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES

Objetivos

- B1.Revisar los estudios genéticos publicados sobre la asociación de polimorfismos del *TSHR* en la susceptibilidad en la EG.
- B2.Revisar las evidencias de la expresión del *TSHR* en timo, con especial énfasis en la expresión en timocitos.
- B3.Revisar los datos existentes que apoyan cada una de las dos hipótesis planteadas para explicar la asociación del *TSHR* con la EG.

Artículos

Genetics of Graves' Disease: Special Focus on the Role of TSHR Gene

Pujol-Borrell R, Giménez-Barcons M, Marín-Sánchez A, Colobran R. Horm Metab Res. 2015 Sep;47(10):753-66. doi: 10.1055/s-0035-1559646.

Central Tolerance Mechanisms to TSHR in Graves' Disease: Contributions to Understand the Genetic Association

Pujol-Borrell R, Álvarez-Sierra D, Jaraquemada D, Marín-Sánchez A, Colobran R. Horm Metab Res. 2018 Dec;50(12):863-870. doi: 10.1055/a-0755-7927.

Motivación

Cuando inicié esta tesis doctoral en 2014 nuestro grupo ya llevaba varios años investigando los mecanismos de pérdida de tolerancia central en diversas enfermedades autoinmunes, entre ellas la enfermedad de Graves. En un trabajo anterior, en el que se analizaron 54 SNP del *TSHR* de 135 pacientes con EG y 192 controles, nuestro grupo había confirmado la asociación del SNP rs179247, que se encuentra en el intrón 1 del gen, con la EG en nuestra población²⁰⁷. Investigando la influencia de este SNP en la expresión del *TSHR* tanto en timo como en tejido tiroideo se constató que la expresión tímica del *TSHR* de aquellos pacientes con el alelo

protector rs179247G era mayor que en los individuos con el alelo de riesgo rs179247A, hecho que no ocurría en tejido tiroideo. Esta observación dio lugar a la hipótesis de que este alelo podría favorecer la selección negativa de los linfocitos T autorreactivos frente al TSHR en el timo en los sujetos genéticamente susceptibles a EG. En este mismo trabajo también se analizó la expresión de TSHR en las diferentes poblaciones de células tímicas y se observó que la expresión del *TSHR* no estaba limitada a las mTEC sino que aparecía también en cTEC, DCs y, sorprendentemente, el nivel más elevado de expresión lo presentaban los timocitos doble positivos.

De estos resultados surgió la necesidad de:

- 1) Revisar los estudios genéticos de asociación de polimorfismos del *TSHR* con EG, para confirmar nuestros resultados y ver si había otros polimorfismos del *TSHR* asociados.
- 2) Revisar y poner a prueba las dos hipótesis propuestas para explicar la influencia de los SNP del intrón 1 del TSHR sobre la predisposición a EG (modulación del *splicing* alternativo vs expresión en timo) centrándonos en los posibles mecanismos de tolerancia al TSHR y los mecanismos por los que esta tolerancia se pierde en algunos casos, originando EG.
- 3) Revisar el poco conocimiento publicado sobre la expresión del TSHR en timocitos.

Resumen artículo 1

Genetics of Graves' Disease: Special Focus on the Role of TSHR Gene

Pujol-Borrell R, Giménez-Barcons M, Marín-Sánchez A, Colobran R.

Horm Metab Res. 2015 Sep;47(10):753-66. doi: 10.1055/s-0035-1559646.

El principal objetivo de esta revisión era analizar los estudios genéticos de asociación con la EG, con especial énfasis en el papel del TSHR. Con este trabajo pudimos comprobar que los estudios de GWAS no solo confirman los estudios clásicos de asociación de genes candidatos como *HLA*, *CTLA4*, *PTPN22* y *TSHR* con la EG, sino que han ampliado considerablemente esta lista de genes (ver Tabla 1 del artículo). Sin embargo, todos los genes descritos tienen una modesta contribución a la

predisposición a la EG y la mayoría de ellos participan en la regulación de la respuesta inmune reforzando la idea de que la EG es la consecuencia de una respuesta adaptativa crónica a determinados antígenos tiroideos. El gen del TSHR, autoantígeno principal de la EG, sigue siendo el único gen que predispone específicamente a EG y no a HT.

Este ejercicio de revisión también confirmó que los diversos estudios en poblaciones caucásica y asiática ratifican la asociación genética de los SNP del intrón 1 del *TSHR* con el riesgo de padecer EG. Concretamente la asociación de 5 SNP, que están en estrecho de desequilibrio de ligamiento y entre los que se encuentran rs179247 y rs12101255, ha sido demostrada por varios grupos independientes (ver Tabla 2 del artículo).

Desde 2011, siguen vigentes las dos hipótesis, no mutuamente excluyentes, que intentan explicar los mecanismos de acción de estos polimorfismos. Por un lado, la hipótesis de un fallo en la tolerancia periférica, propone que los SNP del intrón 1 del *TSHR* asociados a EG influyen en el *splicing* alternativo del *TSHR* y considera que las isoformas solubles del TSHR serán más inmunogénicas que la forma completa del receptor. Esta hipótesis, aunque en parte avalada por los modelos animales, no ha sido comprobada por otros grupos, ni tampoco se ha descubierto el mecanismo por el que los SNP pueden modular el proceso de *splicing*. Por otro lado nuestra hipótesis de un fallo parcial en la tolerancia central al TSHR ha sido confirmada y ampliada por Tomer et al, que demostraron que uno de los SNP de esta región de 40 Kb del intrón 1 forma parte de un lugar de unión al factor represor de la transcripción PLZF, regulado por IFN- α ²⁰⁸. Por lo tanto estos SNP estarían involucrados en una interacción genética-epigenética que regularía la expresión tímica del *TSHR* y facilitaría el escape de linfocitos T autorreactivos frente al TSHR contribuyendo al inicio de la EG.

La expresión del TSHR en los timocitos ha sido documentada por muy pocos grupos, entre ellos el nuestro, pero parece claro que los timocitos son las células que más contribuyen a la expresión del TSHR en el timo. Experimentos *in vitro* demuestran que el TSHR en los timocitos es funcional y, aunque no está del todo clara la función que desempeña en ellos, parece actuar como un factor que acelera su maduración en las etapas de ISP y DP²⁰⁹. De hecho, la capacidad de los timocitos de activarse por TSA b, podría explicar tanto la hiperplasia tímica que ocurre en pacientes con EG, como la generación de TSA b de alta afinidad mediante un mecanismo de estimulación iterativo

de los timocitos por los propios TSAbs producidos en periferia (ver Figura 2 del artículo).

Resumen artículo 2

Central Tolerance Mechanisms to TSHR in Graves' Disease: Contributions to Understand the Genetic Association

Pujol-Borrell R, Álvarez-Sierra D, Jaraquemada D, Marín-Sánchez A, Colobran R. Horm Metab Res. 2018 Dec;50(12):863-870. doi: 10.1055/a-0755-7927.

Esta segunda revisión se focaliza en intentar comprender los mecanismos por los que los polimorfismos en el intrón 1 del *TSHR* confieren susceptibilidad a la EG. A la vista de los resultados de expresión-funcional del *TSHR* en los timocitos que habíamos publicado en 2015²¹⁰ y de los datos de expresión génica de los transcritos del *TSHR* que estábamos obteniendo y que presumimos son traducidos a proteínas, decidimos centrar el trabajo en analizar cómo estos nuevos resultados pueden afectar a la pérdida de tolerancia central al *TSHR*. La presencia de una inesperada abundancia de transcritos cortos del *TSHR* - que hasta ese momento nos había pasado desapercibida - nos llevó a plantear por primera vez la posibilidad de que las formas solubles y la molécula completa de *TSHR* se procesaran en el timo de forma diferente y que la consecuencia sea una tolerancia incompleta a la región bisagra y al dominio transmembrana del *TSHR*.

Artículo 1

Genetics of Graves' Disease: Special Focus on the Role of TSHR Gene.

Pujol-Borrell R, Giménez-Barcons M, Marín-Sánchez A, Colobran R.

Horm Metab Res. 2015 Sep;47(10):753-66. doi: 10.1055/s-0035-1559646.

Artículo 2

Central Tolerance Mechanisms to TSHR in Graves' Disease: Contributions to Understand the Genetic Association.

Pujol-Borrell R, Álvarez-Sierra D, Jaraquemada D, Marín-Sánchez A, Colobran R. Horm Metab Res. 2018 Dec;50(12):863-870. doi: 10.1055/a-0755-7927.

CAPITULO 2: INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE AIRE EN LA ENFERMEDAD DE GRAVES Y OTRAS EAI

Objetivos

- E1. Analizar el posible papel de los polimorfismos del gen *AIRE* en la susceptibilidad a la EG.
- B4. Revisar los estudios genéticos publicados sobre la asociación de polimorfismos de *AIRE* y enfermedades autoinmunes en humanos.

Artículo

AIRE genetic variants and predisposition to polygenic autoimmune disease: The case of Graves' disease and a systematic literature review

Colobran R, Giménez-Barcons M, Marín-Sánchez A, Porta-Pardo E, Pujol-Borrell R.

Hum Immunol. 2016 Aug;77(8):643-651. doi: 10.1016/j.humimm.2016.06.002. Epub 2016 Jun 4. Review. PMID: 27266815.

Motivación

Tanto los experimentos publicados por nuestro laboratorio en 2011²⁰⁷ como la revisión que habíamos realizado en 2015²¹¹ confirmaban el importante papel de la tolerancia central en la EG.

Como ya se comentó en la introducción, uno de los actores principales durante la selección negativa de los linfocitos T en el timo es la proteína AIRE, que sabemos que tiene un papel fundamental en la expresión promiscua de TRA en las mTEC. Las mutaciones que inactivan total o parcialmente el gen *AIRE* causan APECED, un síndrome de poliautoinmunidad endocrina que especialmente afecta a las glándulas adrenales y paratiroides asociado con la presencia de una candidiasis mucocutánea crónica. La incidencia de AITD en pacientes APECED, aunque no es uno de los síntomas más prevalentes, es significativamente más elevada que en población normal²¹². Además, en un trabajo previo de nuestro grupo²⁰⁷ constatamos que el *TSHR* se expresaba en mTEC a niveles muy bajos, similares a otros TRA como TPO, pero inferior a los TRA AIRE dependientes mejor estudiados como INS o ATP4A. Por

tanto, la expresión de TSHR en las mTEC podría ser, por baja, fácilmente afectada por polimorfismos de AIRE que redujesen su eficiencia en la inducción de la expresión promiscua de TRA.

A raíz de estos datos nos surge la pregunta: ¿Existen polimorfismos en el gen *AIRE* que se asocien a la EG? y, a la vista de los resultados que obtuvimos, nos surgió otra cuestión: ¿qué se sabe de la asociación de los polimorfismos de *AIRE* en otras enfermedades autoinmunes?

Resumen de resultados

Para investigar la asociación de los polimorfismos de *AIRE* con la EG seleccionamos aquellos polimorfismos de *AIRE* que capturaban gran parte de su variabilidad genética (comúnmente llamados tagSNP) y los genotipamos en un grupo de 150 pacientes con EG y 200 donantes sanos que usamos como grupo control. Además de los 27 tagSNP seleccionados incluimos dos mutaciones de AIRE de baja frecuencia que se habían descrito asociadas tiroiditis autoinmune (G228W y V301M). El análisis de distribución alélica de los 18 SNP que presentaron una MAF (*minor allele frequency*) >0.05 no mostró ninguna asociación significativa con EG, lo que indica que las variantes genéticas de *AIRE* analizadas no juegan un papel relevante en la susceptibilidad genética a EG. Para contextualizar estos resultados decidimos hacer una revisión sistemática de la literatura en busca de la evidencia existente de las asociaciones de los polimorfismos y mutaciones en heterocigosis de *AIRE* con otras enfermedades autoinmunes poligénicas. En general, si bien en un inicio diversos polimorfismos de *AIRE* se habían asociado con alopecia areata o vitíligo, los estudios posteriores de GWAS no confirman estas asociaciones. Solo en el caso de la artritis reumatoide en la población asiática parecen confirmarse la asociación de *AIRE* con la enfermedad. Los trabajos que analizan las mutaciones monoalélicas de AIRE en la enfermedad de Addison autoinmune y el hipoparatiroidismo (dos de las manifestaciones más prevalentes en la APECED) tampoco han encontrado una contribución concluyente de éstas en su etiología.

Artículo 3

AIRE genetic variants and predisposition to polygenic autoimmune disease: The case of Graves' disease and a systematic literature review.

Colobran R, Giménez-Barcons M, Marín-Sánchez A, Porta-Pardo E, Pujol-Borrell R. *Hum Immunol.* 2016 Aug;77(8):643-651. doi: 10.1016/j.humimm.2016.06.002. Epub 2016 Jun 4. Review. PMID: 27266815.

CAPITULO 3: EXPRESIÓN DEL *TSHR* Y SUS ISOFORMAS EN TIMO Y TIROIDES

Objetivos

- E1. Confirmar mediante secuenciación masiva el efecto de los polimorfismos del intrón 1 del *TSHR* sobre su expresión en timo y en tiroides.
- E2. Cuantificar la expresión de las principales isoformas del *TSHR* generadas por *splicing* alternativo en timo y tiroides.
- E3. Evaluar el efecto de los polimorfismos del intrón 1 del *TSHR* asociados a EG en la expresión de las principales isoformas del *TSHR* generadas por *splicing* alternativo en timo y tiroides.

Artículo

Regulation of TSHR Expression in the Thyroid and Thymus May Contribute to TSHR Tolerance Failure in Graves' Disease Patients Via Two Distinct Mechanisms

Marín-Sánchez, A., D. Álvarez-Sierra, O. González, A. Lucas-Martin, A. Sellés-Sánchez, F. Rudilla, E. Enrich, R. Colobran, and R. Pujol-Borrell. 2019. *Frontiers Immunology* 2019; 10:1–12. doi:10.3389/fimmu.2019.01695.

Motivación

Como ya se ha señalado en diversas ocasiones en este trabajo existen dos hipótesis, propuestas por grupos diferentes para explicar la asociación genética del *TSHR* con la susceptibilidad a EG: nuestra hipótesis, que sugiere un fallo en la tolerancia central y que propone que los polimorfismos del gen influyen en la expresión diferencial del *TSHR* y la hipótesis de Gough et al. que sugiere un fallo en la tolerancia periférica y propone que los polimorfismos del *TSHR* modularían el *splicing* alternativo del receptor. Estas hipótesis surgen en nuestro caso del análisis de los resultados de expresión relativa y alelo-específica del *TSHR* obtenidos mediante qPCR y ASQT (*allele specific transcript quantification*) en tejido tímico y tiroideo de individuos genotipados para el SNP de riesgo rs179247²⁰⁷. En el caso del grupo de

Gough es consecuencia del análisis los cocientes de expresión entre el transcrito del receptor completo (fTSHR) y los transcritos cortos ST4 y ST5 mediante qPCR en 12 muestras de tejido tiroideo previamente genotipadas para los SNP de riesgo rs179247 y rs12101255²⁰⁶. Hay que señalar que estas dos hipótesis no se excluyen mutuamente pues los polimorfismos del intrón 1 del TSHR pueden predisponer a EG por más de un mecanismo.

El objetivo principal de esta tesis es poner a prueba estas dos hipótesis en un mismo estudio con un número amplio de muestras en ambos tejidos (timo y tiroides) aplicando una metodología más precisa a la usada en los estudios anteriores como la secuencia masiva o NGS para validar o refutar cada una de las dos hipótesis sin dejar lugar a dudas.

De hecho, antes de comenzar este trabajo no se había estudiado la expresión de las principales variantes de *splicing* del *TSHR* en el timo y pensábamos que podía ser trascendente evaluarla para poder compararla con su expresión en tiroides y por la importancia que tiene el timo en la configuración del repertorio de linfocitos T.

Resumen de resultados

Para validar nuestros resultados de expresión alélica diferencial del *TSHR* diseñamos cebadores y adaptadores que nos permitiesen la secuenciación mediante NGS de una región de 233 bp que contenía el SNP rs179247. Seleccionamos muestras criopreservadas de timo y tiroides de individuos heterocigotos para el SNP rs179247 y de cada muestra extrajimos tanto DNA genómico (gDNA) como RNA del que obtuvimos el correspondiente DNA complementario (cDNA). Los resultados, obtenidos de 19 muestras de timo y 8 de tiroides, mostraron una transcripción preferencial del alelo protector (G) frente al alelo de riesgo (A) en el cDNA tímico (ratio G:A de 1.5 ± 0.2) (ver Figura 4 del artículo). Este efecto no se constataba en el cDNA tiroideo, donde obtuvimos una ratio G:A de 1 ± 0.1 , similar al que encontrábamos en el gDNA que nos servía como control de representación bialélica equilibrada.

Para evaluar el efecto de los SNP del intrón 1 asociados a EG sobre la transcripción diferencial de las dos variantes de *splicing* del *TSHR* mayoritarias, ST4 y ST5, valoramos mediante qPCR su niveles de expresión en muestras de cDNA de 88

muestras, 49 de tiroides y 39 de timo, que previamente habíamos genotipado para 2 de los SNP de riesgo (rs179247 y rs12101255) y uno que no está asociado a EG (rs2288495) que nos sirvió como control. Ni en tejido tiroideo, ni en timo observamos un efecto significativo de los SNP de riesgo sobre la expresión relativa de las isoformas (ver Figura 5 del artículo), sin embargo, analizando los niveles de expresión tanto de la forma completa del receptor como de sus isoformas en timo y tiroides obtuvimos dos resultados inesperados. En primer lugar la relativa alta expresión del *TSHR* en el timo, y en segundo lugar unos niveles de ST4 equiparables a los de la forma completa del receptor en ambos tejidos (ver Figura 2 del artículo), nos llevaron a plantear la posibilidad de que existan dos vías de presentación del receptor en timo que podrían explicar la fragilidad de la tolerancia central a TSHR por un mecanismo de tolerancia incompleta a parte del receptor.

Artículo 4

Regulation of TSHR Expression in the Thyroid and Thymus May Contribute to TSHR Tolerance Failure in Graves' Disease Patients Via Two Distinct Mechanisms

Marín-Sánchez, A., D. Álvarez-Sierra, O. González, A. Lucas-Martin, A. Sellés-Sánchez, F. Rudilla, E. Enrich, R. Colobran, and R. Pujol-Borrell. 2019. *Frontiers Immunology* 2019; 10:1–12. doi:10.3389/fimmu.2019.01695.



Regulation of *TSHR* Expression in the Thyroid and Thymus May Contribute to TSHR Tolerance Failure in Graves' Disease Patients via Two Distinct Mechanisms

OPEN ACCESS

Edited by:

Ludger Klein,
Ludwig Maximilian University of
Munich, Germany

Reviewed by:

Sandra M. McLachlan,
Cedars-Sinai Medical Center,
United States
Terry Francis Davies,
Icahn School of Medicine at
Mount Sinai, United States

*Correspondence:

Roger Colobran
rcolobran@vhebron.net
Ricardo Pujol-Borrell
rpujol@vhebron.net

Specialty section:

This article was submitted to
Immunological Tolerance and
Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 06 May 2019

Accepted: 08 July 2019

Published: 18 July 2019

Citation:

Marín-Sánchez A, Álvarez-Sierra D,
González O, Lucas-Martin A,
Sellés-Sánchez A, Rudilla F, Enrich E,
Colobran R and Pujol-Borrell R (2019)
Regulation of *TSHR* Expression in the
Thyroid and Thymus May Contribute
to TSHR Tolerance Failure in Graves'
Disease Patients via Two
Distinct Mechanisms.
Front. Immunol. 10:1695.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01695

Ana Marín-Sánchez^{1,2,3}, Daniel Álvarez-Sierra^{2,3}, Oscar González⁴, Ana Lucas-Martin⁵, Alicia Sellés-Sánchez², Francesc Rudilla⁶, Emma Enrich⁶, Roger Colobran^{1,2,3*} and Ricardo Pujol-Borrell^{1,2,3*}

¹ Immunology Division, FOCIS Center of Excellence, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, ² Diagnostic Immunology Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain, ³ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, ⁴ Surgery Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain, ⁵ Endocrinology Division, Hospital Universitari Germans Trias Pujol, Badalona, Spain, ⁶ Immunogenetics and Histocompatibility Laboratory, Blood and Tissue Bank, Transfusional Medicine Group, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

Graves' disease (GD) involves the presence of agonistic auto-antibodies against the thyrotropin receptor (TSHR), which are responsible for the clinical symptoms. While failure of TSHR tolerance is central to GD pathogenesis, the process leading to this failure remains poorly understood. Two mechanisms intimately linked to tolerance have been proposed to explain the association of SNPs located in *TSHR* intron 1 to GD: (1) differential alternative splicing in the thyroid; and (2) modulation of expression in the thymus. To elucidate the relative contribution to these two mechanisms to GD pathogenesis, we analyzed the level of full-length and ST4 and ST5 isoform expression in the thyroid ($n = 49$) and thymus ($n = 39$) glands, and the influence of intron 1-associated SNPs on such expression. The results show that: (1) the level of flTSHR and ST4 expression in the thymus was unexpectedly high (20% that of the thyroid); (2) while flTSHR is the predominant isoform, the levels are similar to ST4 (ratio flTSHR/ST4 = 1.34 in the thyroid and ratio flTSHR/ST4 in the thymus = 1.93); (3) next-generation sequencing confirmed the effect of the TSHR intron 1 polymorphism on TSHR expression in the thymus with a bias of 1.5 ± 0.2 overexpression of the protective allele in the thymus compared to the thyroid; (4) GD-associated intron 1 SNPs did not influence *TSHR* alternative splicing of ST4 and ST5 in the thyroid and thymus; and (5) three-color confocal imaging showed that TSHR is associated with both thymocytes, macrophages, and dendritic cells in the thymus. Our findings confirm the effect of intron 1 polymorphisms on thymic TSHR expression and we present evidence against an effect on the relative expression of isoforms. The high level of ST4 expression in the thymus and its distribution

within the tissue suggest that this would most likely be the isoform that induces central tolerance to TSHR thus omitting most of the hinge and transmembrane portion. The lack of central tolerance to a large portion of TSHR may explain the relatively high frequency of autoimmunity related to TSHR and its clinical consequence, GD.

Keywords: Graves' disease, TSHR, tolerance, splicing isoforms, thymus, thyroid, next-generation sequencing

INTRODUCTION

Graves' disease (GD) is a highly prevalent autoimmune disease characterized by the presence of agonistic auto-antibodies against the thyrotropin receptor (TSHR), which are responsible for hyperthyroidism and extrathyroidal manifestations (1, 2). Failure of tolerance to the TSHR is central to the pathogenesis of GD; however, our understanding of the process that leads to this failure remains incomplete.

The strong contribution of genetic factors to GD is best demonstrated in twin concordance studies that suggest that as much as 79% of the risk of developing GD is hereditary (3). During the past 25 years, classical genetic approaches and more recently, genome-wide association studies (GWAS), have identified several gene loci whose polymorphisms may contribute to GD susceptibility. Among the confirmed genes in the HLA region, *CTLA4* and *PTPN22* confer a higher risk; however, individual contributions, with the exception of HLA, are limited (4–6). The products of these genes participate in the regulation of the immune response and have been implicated in other autoimmune diseases but do not explain why the autoimmune response focuses on the thyroid gland. Common polymorphisms have also been found in the genes specifically expressed in the thyroid [e.g., the thyrotropin receptor [*TSHR*] or thyroglobulin [*TG*] (7, 8)]; however, only the association with *TSHR* has been repeatedly confirmed [reviewed in (4, 5, 9, 10)]. Since the loss of tolerance to TSHR is the central mechanism for GD pathogenesis, there is a great interest in understanding how these *TSHR* polymorphisms contribute to the failure of tolerance.

TSHR consists of 10 exons encoding a 764 amino acid protein of ~95 kDa that is converted to a 120 kDa protein following substantial glycosylation (11). The original TSHR peptide chain undergoes proteolytic cleavage, generating two subunits: (1) the A-subunit, encoded by exons 1–9, which constitutes the extracellular domain; and (2) the B-subunit, encoded by exon 10, which consists of a transmembrane region plus a 5 kDa C connecting peptide (12). Following the excision of the C peptide, the A- and B-subunits remain linked by disulfide bridges that can be subsequently reduced, and the A-subunit is partially shed, whereas B-subunit will remain anchored to the membrane (13, 14). Controversy remains regarding the persistence of single chain (uncleaved) TSHR on the surface of thyrocytes and to what extent subunit A is physiologically shed (15, 16).

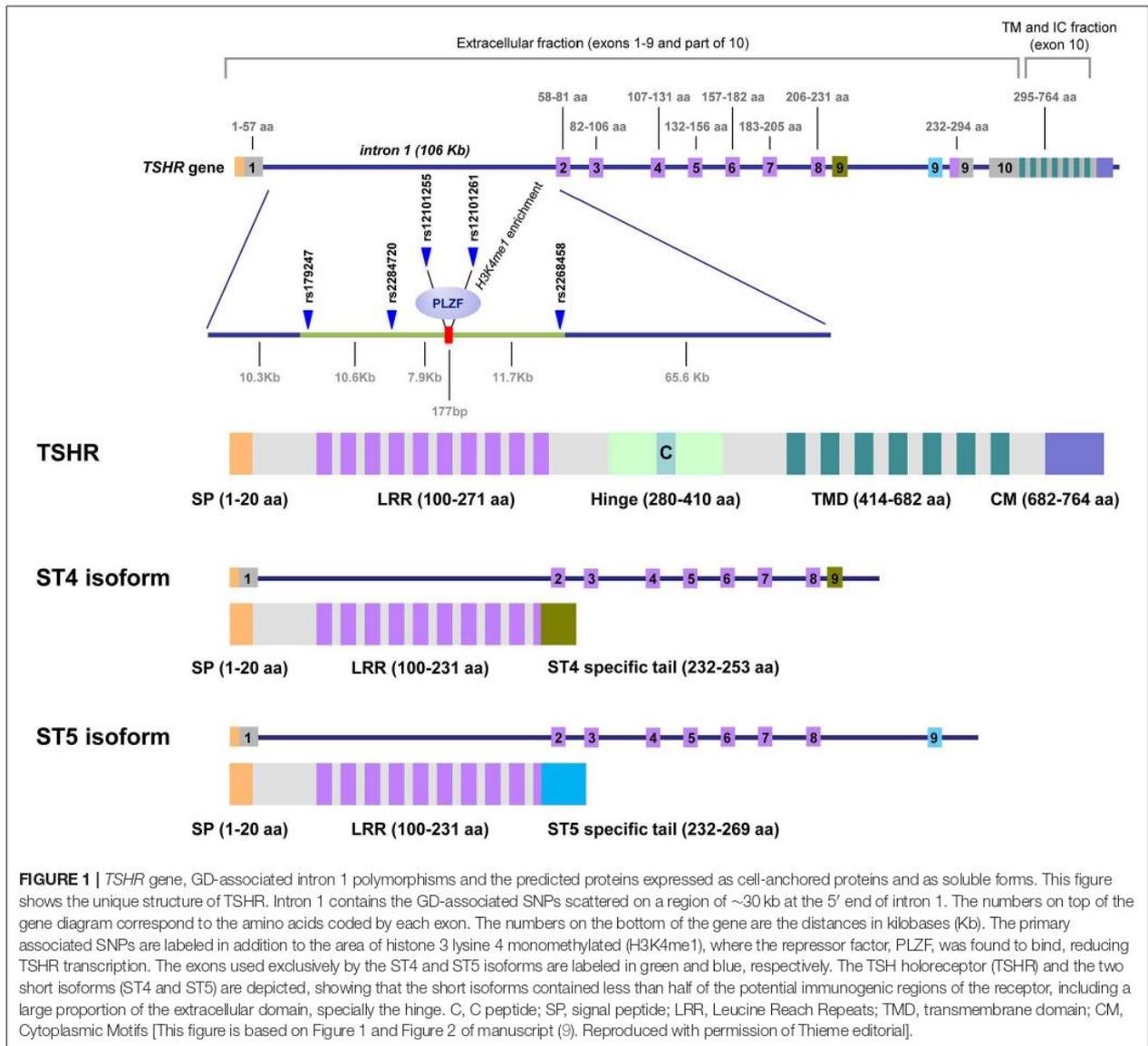
The *TSHR* gene is expressed at medium to low levels in the thyroid (207 copies per million transcripts) and is extremely low in all other tissues (data from the GTEx portal, <0.3 transcripts per million in subcutaneous fat or 0.5 in the brain), except for AIRE-expressing orbital fibrocytes from GD patients

with ophthalmic pathologies (17). As a reference, the classical housekeeping gene, *GAPDH*, has 813 transcripts per million in the thyroid.

In addition to the full-length TSHR (flTSHR), five truncated TSHR transcripts have been reported in multiple studies, of which ST4 (1.3 kb) and ST5 (1.7 kb) are the most highly expressed (18–20). ST4 and ST5 share the first eight exons with the flTSHR but contain an additional ninth exon that is unique and different in ST4 and ST5, both of which lack exon 10. These unique exons are encoded in two different regions of intron 8, which are selected and retained in the mRNA of the corresponding alternatively spliced forms. If translated, both ST4 and ST5 would encode most of the leucine-rich repeats containing the TSH-binding extracellular region, but neither the hinge nor the transmembrane domain of the TSHR; therefore, it is plausible that they are secreted (Figure 1).

Different studies have demonstrated a significant association between SNPs in the 40 kb region in the 5' side of the large intron 1 (106 kb) of *TSHR* with GD [reviewed in (5)] (Figure 1). Two different but not mutually exclusive mechanisms have been postulated to explain this association. Brand et al. proposed that these SNPs influence mRNA splicing, which results in increased levels of the ST4 and ST5 transcripts encoding the short isoforms (21). The authors proposed that the short ST4 and ST5 variants would be translated into the putatively soluble TSHR forms, released into the circulation where they become available to antigen presenting cells in the periphery, where they may contribute to inducing an autoimmune response to the TSHR. However, it is unclear why these isoforms are immunogenic, rather than tolerogenic or ignored, in this hypothesis. In one experimental model, the soluble TSHR A subunit is more immunogenic than the membrane-bound TSHR (22); however, ST4 and ST5 differ from Subunit A in one exon and is difficult to predict their immunogenicity. Therefore, Brand et al. postulate the failure in peripheral tolerance as the crucial checkpoint for the development of GD.

The second proposed mechanism is based on our finding that the GD-associated SNPs in the intron 1 alleles modulate *TSHR* expression in the thymus. By measuring the levels of allele-specific *TSHR* mRNA in the thymus, we demonstrated that individuals carrying the protective genotype have higher levels of thymic *TSHR* mRNA compared to those with the disease-predisposing genotype. According to the well-established mechanisms of central tolerance, the expression of self-antigens in the thymus is required to develop a tolerant T cell repertoire (23, 24); a dose response relationship between the amount of a self-antigen in the thymus, and the frequency of T cells clones that can recognize it in the periphery, which has been



demonstrated for the insulin gene in type 1 diabetes (25, 26) and is well-established in animal models (27).

Interestingly, Tomer et al. has recently provided some confirmatory evidence to our proposal, as they also found that intrathyroidic *TSHR* expression was lower in individuals homozygous for the disease-associated allele. In addition, these authors have shown that the effect of SNPs in intron 1 on the expression of *TSHR* may depend on the differential affinity of the allele for the PLZF transcription repressor factor. In turn, PLZF is regulated by IFN- α (28) and it is known that there is a strong IFN signature in the GD thyroid glands (29, 30). Moreover, IFN- α therapy can trigger thyroid autoimmunity when administered for hepatitis C virus infection (31). These authors propose that IFN- α can contribute to triggering GD by reducing *TSHR* expression in the thymus.

These two non-mutually exclusive mechanisms propose that the SNPs located in intron 1 participate in the regulation of *TSHR* expression through: (1) differential alternative splicing in the thyroid; and (2) modulation of expression levels in the thymus. To date, the effect of *TSHR* intron 1 polymorphisms on the differential expression of its isoforms (ST4 and ST5) has only been analyzed in the thyroid, in which the level of expression is relatively high compared with the thymus. However, although the level of TSHR expression and presumably its isoforms in the thymus is lower, it can be critical since it is in the thymus where the T lymphocyte repertoire is configured.

To better understand how the complex expression of *TSHR* in both the thymus and thyroid can modulate central and peripheral tolerance to TSHR, it is useful to precisely identify the levels of different isoform expression in these two tissues and analyze

the influence of intron 1-associated SNPs on their expression. The results presented here constitute a detailed analysis of *TSHR* isoform expression in each tissue and provide insight into how TSHR tolerance may fail.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

In this retrospective study, the diagnosis was made based on thyroid hormone levels, thyroid antibodies, including TSHR antibodies and ultrasound and scintiscan images, by experienced endocrinologists. Thyroid tissue was obtained from 49 patients (43 females, 7 males; age range: 15–71 years) recruited from the Endocrinology Clinics of Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (HUGTiP) and Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), both of which are affiliated with the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) (**Supplementary Table 1**). The samples were processed as previously described (32).

Thymic tissue was obtained from 39 patients undergoing corrective cardiac surgery (31 pediatric and 8 adult patients; 15 females and 24 males; age range: 4 days–72 years), from the Departments of Heart Surgery of HUGTiP or HUVH. All samples were processed within 4 h of resection under sterile conditions, as previously described (33) (**Supplementary Table 2**).

Informed consent was obtained from all participants and the studies have been approved by the local institutional ethics review board of the participating institutions (ref PR AG-145/2011).

DNA and RNA Isolation

Both genomic DNA (gDNA) and total RNA were isolated from the total thyroid and thymus tissue using standard methods (QIAamp DNA Mini QIAcube Kit and RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Germany). An additional step of DNase I treatment was applied to the RNA samples (RNase-free DNase set kit, QIAGEN). To check for contaminating gDNA in the RNA samples, 100 ng of the total RNA were subjected to 45 cycles of PCR using specific primers for a 309 nt non-transcribed region of the *CTLA4* promoter. Only samples free of DNA were used for subsequent experiments.

Genotyping TSHR Polymorphisms

DNA from the gland donors was genotyped for the two SNPs (rs179247 and rs12101255) known to be strongly associated with GD and for one non-associated SNP (rs2288495), by real-time PCR using TaqMan[®] SNP genotyping assays (TaqMan[®] SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems, UK).

Allele-Specific Quantification Using Massive Parallel Sequencing [Next-Generation Sequencing [NGS]]

To more precisely assess the effect of the rs179247 allele on the overall TSHR transcription, we used massive parallel sequencing (NGS). DNA-free RNA samples from the thyroid and thymus were obtained as described. To preserve the pre-mRNA in the complementary DNA (cDNA) synthesis step, retro-transcription of the RNA samples was performed using random primers (First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR [AMV], Roche, Basel,

Switzerland). The specific primers were designed for the *TSHR* gene intron 1 region containing the rs179247 SNP (233 bp amplicon) (**Supplementary Table 3**).

Library Preparation, DNA Sequencing, SNP Calling, and Genotyping

Briefly, the target-specific primers were synthesized using CS1/CS2 tags (Fluidigm, San Francisco, CA) followed by a two-step PCR reaction. First, the region of interest was amplified with target-specific tagged primers, and second, the sample-specific barcode and adapters were introduced to generate the sequencing library (Fluidigm). A GeneAmp[®] PCR System 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used for the amplification. PCR products were pooled and purified using a MinElute Gel Extraction Kit (50) (Qiagen). The pool was run using the paired-end sequencing method on a MiSeq sequencing system (Illumina, San Diego, CA, USA) using the MiSeq reagent kit v2 (500 cycles) (Illumina). Finally, the FASTQ files were analyzed for the SNP rs179247 by read mapping and variant calling using the CLC Genomic Workbench software version 9.5.1 (CLC Bio, Qiagen, Aarhus, Denmark). A total of 19 thymus and 8 thyroid samples from heterozygous individuals for the SNP rs179247 were tested (**Supplementary Table 4**).

Quantification of the Relative Gene Expression by qPCR

The level of gene expression for the full-length human *TSHR* mRNA (flTSHR) and two *TSHR* alternatively spliced transcripts (ST4 and ST5) were measured by qPCR using Taqman probes. DNA-free RNA samples from the thyroid and thymus were obtained as described above. The cDNA was synthesized using Oligo(dT) primers (First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR [AMV], Roche). To measure the level of flTSHR expression, we used a pre-designed TaqMan[®] Gene Expression Assay that spans the *TSHR* exons 9 and 10 (assay ID: Hs01053841_m1). To measure the flTSHR, ST4, and ST5 transcripts, we used the primers and probes as described by Brand et al. (21) (**Supplementary Table 5**). When checking the sequences of the primers and probes, we realized that the ST5 probe sequence used by Brand et al. did not coincide with the ST5 consensus sequence by one nucleotide, and we modified the ST5 probe accordingly (**Supplementary Table 5**). Reactions were run on an Abi Prism[®] 7900 HT instrument (Applied Biosystems) in triplicate and the CT average was used for further statistical analysis. The CV was always < 15%. Normalization of the results was performed in accordance with the relative quantification $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (34) with respect to the constitutive expression of the *GAPDH* gene. To display the results of the ST4 and ST5 isoform expression, we also used the ratio to flTSHR (35).

TSHR Detection in Thymocytes and Thymic APCs by Indirect Immunofluorescence

To investigate how TSHR is presented in the thymus, we stained thymic 5 μ m cryostat sections with monoclonal antibodies (mAbs) specific for TSHR (clone 49, Thermofisher, Waltham, MA, USA), CD68 as a macrophage marker (clone Y1/82A Biologend, San Diego, CA, USA), and CD11c as a

dendritic cell marker (clone CBR-p150/4G1, ThermoFisher). To avoid cross-reactivity, the Ig isotype or species-specific secondary labeled anti-sera were used. For each protocol, the controls included sections incubated with the conjugated secondary anti-sera without the corresponding primary antibody to assess the background. Sections in which each of the primary antibodies in the protocol were omitted to detect any possible cross-reactions. Samples from five different glands (1 male and four female donors; age range: 10 months to 3 years and 7 months) were used. The sections were first examined under a UV photomicroscope equipped with the adequate filters and selected sections were examined under a confocal microscope (FV1000, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

Statistical Analysis

Descriptive data were presented as the mean \pm standard deviation (SD) or median and semi interquartile range (SIR). The data were analyzed using a non-parametric test, U-Mann Whitney test, or Kruskal-Wallis test with a multiple comparisons correction (Dunn's test), except for the analysis of the NGS data, which followed a normal distribution (*t*-test). The accepted *p*-value is <0.05 . We used GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Software, La Jolla CA) for the statistical analysis and figure generation.

RESULTS

Analysis of *TSHR* Transcripts in the Thymus and Thyroid

We analyzed the relative expression of full-length *TSHR* (flTSHR) transcripts by qPCR and its two major alternatively

spliced transcripts (ST4 and ST5) from the cDNA of 39 and 49 samples collected from the thymus and thyroid tissue, respectively. The level of flTSHR expression in the thymus was higher than expected, which was $\sim 20\%$ of the expression observed in the thyroid (median thymus: 651 ± 580 vs. median thyroid: 2860 ± 1792) (Figure 2A). Although these expression levels are similar to those mentioned by Kim van der Weerd (36), they are higher than the expression levels reported in several databases [e.g., BioGps (37) or EMBL-EBI Expression Atlas [https://www.ebi.ac.uk/gxa]]. Recently, this relatively high level of ST4 expression in the thymus was also reported by Latif et al., who designated it TSHR v1.3 (16).

Age was found to have an effect on *TSHR* expression in the thymus. The average level of flTSHR expression in donors aged 0 to 11 years-old was $1,135 \pm 1,110$ and from donors ages 40 to 80 years old was 436 ± 657 ($p < 0.05$) (Figure 2B). Since our thymus samples were from relatively young patients, this may explain the discrepancy with levels recorded in the databases.

It is of interest that the relative levels of flTSHR and ST4 expression were not as different as expected in the thymus and thyroid and they were higher for flTSHR than for ST4 (thyroid flTSHR $2,860 \pm 1,792$, ST4 $2,135 \pm 961$, ratio flTSHR/ST4 = 1.34; thymus flTSHR 651 ± 580 , ST4 337 ± 299 , ratio flTSHR/ST4 = 1.93). In contrast, the level of isoform ST5 expression was substantially lower in both tissues (thyroid ST5 303 ± 104 and thymus ST5 15 ± 8). Interestingly, the level of ST5 expression was proportionally much lower in the thymus compared with the thyroid (ST5 represents 6% compared to 1.5% of the total transcripts (flTSHR+ ST4 + ST5) in the thyroid and thymus, respectively) (Figure 2A). This difference is also

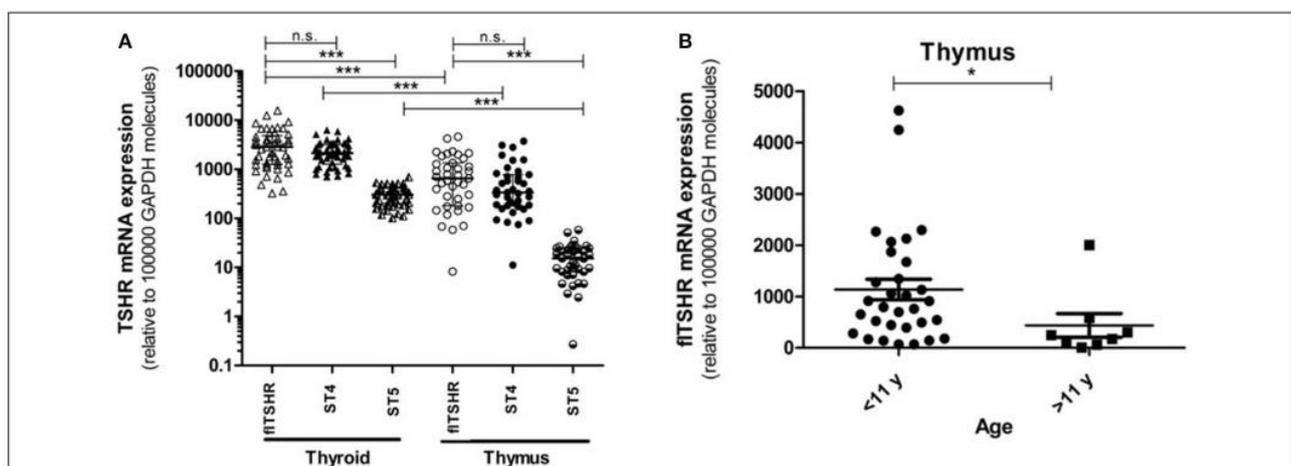
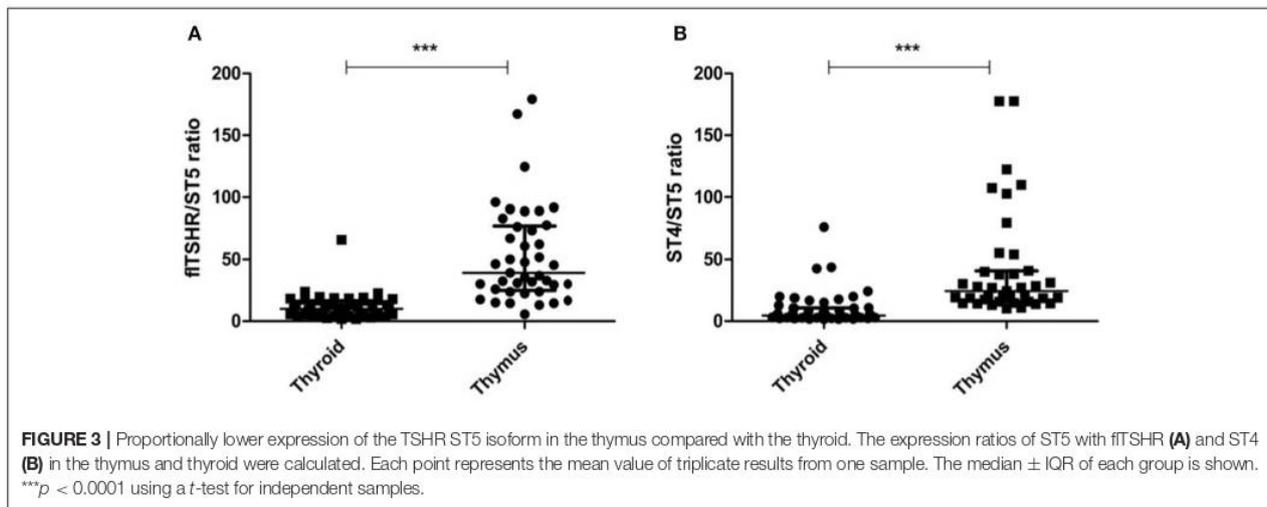


FIGURE 2 | Gene expression of the *TSHR* isoforms in the thymus and thyroid. **(A)** mRNA expression of the full-length *TSHR* (flTSHR) and its isoforms (ST4 and ST5) in the thymus and thyroid. The relative level of mRNA expression was measured using quantitative PCR of the cDNA from 49 thyroid and 39 thymus samples. Each sample was tested in triplicate and the standard deviation was always $<15\%$ of the mean value. Values were normalized to *GAPDH* expression using the comparative CT method and expressed as copies per 100,000 copies of *GAPDH*. Each point represents the mean value of triplicate results from one sample. The median \pm IQR of each group is shown. *** $p < 0.0001$, Kruskal Wallis test with a Dunn's multiple comparison test. **(B)** The relative mRNA expression of flTSHR in the thymus samples was stratified into pediatric (0–11 years; $n = 31$) and adults (40–80 years; $n = 8$) samples. The mean \pm SEM of each group is shown. * $p < 0.05$ using a *t*-test for independent samples.



reflected when comparing the ratios of ST5 expression with fTSHR or ST4 in both tissues (thyroid fTSHR/ST5 = 9.86 vs. thymus fTSHR/ST5 = 39.01; $p < 0.0001$) (Figure 3A) (thyroid ST4/ST5 = 4.5 vs. thymus ST4/ST5 = 24.3; $p < 0.0001$) (Figure 3B).

The above results indicate that substantial soluble TSHR likely exists within the thymus, which is primarily derived from the transcription of ST4. Thus, this expression may have implications for establishing central TSHR tolerance.

NGS Confirms the Thymus-Specific Influence of *TSHR* Expression by GD-Associated SNPs

We previously demonstrated that the risk allele, rs179247 (one of the main *TSHR* GD-associated SNPs), determined lower *TSHR* expression in the thymus but not in the thyroid (38). However, since we used a semiquantitative technique (allele-specific transcript quantification by qPCR using FRET probes), we decided to apply massive parallel sequencing, which is a more reliable quantitative technique, for the comparison of rs179247 *TSHR* allele expression in heterozygous individuals. It should be emphasized that since rs179247 is located in intron 1, we took care in obtaining the cDNA from the pre-mRNA (immature RNA before the splicing process). The designed primers do not discriminate between cDNA and gDNA and consequently, the contaminating gDNA must be absent to obtain reliable results.

Allele-specific quantification was measured in the gDNA and the cDNA from 19 thymus and 8 thyroid samples from heterozygous donors (previously genotyped for rs179247). We obtained good coverage, with a mean depth in the gDNA samples of 27,000 \times (i.e., 27,000 sequences or “reads” interrogating the rs179247 position) and 9,000 \times in the cDNA samples, with no significant differences between the thymus and thyroid samples (Table 1). The results showed that the ratio between the G (protecting) and the A (predisposing) alleles for gDNA was

TABLE 1 | Allele-specific transcript quantification by NGS.

	Sample type	Depth of coverage ^a	Balance ^b	Counts (G allele)	Frequency (G allele) %
THYROID					
102	gDNA	29548x	0.49	15,054	50.95
	cDNA	9305x	0.49	4,926	52.94
218	gDNA	25800x	0.49	13,283	51.48
	cDNA	5006x	0.49	2,746	54.85
355	gDNA	15027x	0.49	7,771	51.71
	cDNA	9200x	0.50	4,940	53.70
381	gDNA	25044x	0.49	12,633	50.44
	cDNA	23579x	0.49	12,361	52.42
409	gDNA	25049x	0.50	12,726	50.80
	cDNA	14221x	0.49	7,211	50.71
430	gDNA	29863x	0.49	15,038	50.36
	cDNA	1693x	0.49	764	45.13
452	gDNA	32564x	0.49	16,484	50.62
	cDNA	1738x	0.50	877	50.46
92	gDNA	20911x	0.49	10,717	51.25
	cDNA	13439x	0.49	6,916	51.46
THYMUS					
101	gDNA	28664	0.49	14,453	50.42
	cDNA	6933	0.49	3,960	57.12
117	gDNA	35762	0.49	18,282	51.12
	cDNA	5912	0.49	3,764	63.67
119	gDNA	24245	0.49	12,165	50.18
	cDNA	4570	0.49	2,663	58.27
126	gDNA	28552	0.50	14,280	50.01
	cDNA	4510	0.49	2,481	55.01

(Continued)

TABLE 1 | Continued

	Sample type	Depth of coverage ^a	Balance ^b	Counts (G allele)	Frequency (G allele) %
145	gDNA	33290	0.50	16,932	50.86
	cDNA	17575	0.49	9,996	56.88
159	gDNA	25178	0.50	12,664	50.30
	cDNA	6616	0.49	4,299	64.98
16	gDNA	22447	0.49	11,221	49.99
	cDNA	13429	0.49	8,649	64.41
171	gDNA	30800	0.49	15,640	50.78
	cDNA	4138	0.49	2,438	58.92
188	gDNA	29066	0.49	14,720	50.64
	cDNA	342	0.48	185	54.09
195	gDNA	31457	0.49	16,255	51.67
	cDNA	3656	0.50	2,235	61.13
197	gDNA	31543	0.49	16,169	51.26
	cDNA	8058	0.49	4,385	54.42
225	gDNA	26017	0.49	13,152	50.55
	cDNA	18406	0.49	11,164	60.65
229	gDNA	31049	0.50	15,955	51.39
	cDNA	7373	0.50	4,392	59.57
235	gDNA	31949	0.49	16,325	51.10
	cDNA	14662	0.49	8,516	58.08
263	gDNA	33124	0.49	16,852	50.88
	cDNA	16402	0.49	9,478	57.79
28	gDNA	27355	0.49	13,931	50.93
	cDNA	6143	0.49	3,593	58.49
38	gDNA	4047	0.49	2,110	52.14
	cDNA	6701	0.50	4,253	63.47
4	gDNA	25273	0.49	12,879	50.96
	cDNA	16769	0.49	9,802	58.45
72	gDNA	31112	0.49	15,957	51.29
	cDNA	7426	0.49	4,277	57.59

Results of cDNA samples are indicated in bold.

^a The number of unique reads (i.e., sequences) which interrogate the position of rs179247.

^b Balance between reads from the forward or reverse primer. A value of 0.5 indicates that half of the reads come from each primer (i.e., there is no strand bias).

always 1 in both the thyroid and thymus, reflecting the existence of the same number of maternal and paternal DNA copies in each cell (Figure 4; Table 1). For cDNA, the percentage of reads corresponding to the G allele in the thyroid was ~50% (range: 45.1–54.8%) with a G/A allele ratio of 1 ± 0.1 SD. In contrast, the G/A allele ratio in the thymus was 1.5 ± 0.2 SD, with a mean of 59.1% (ranging: 54.1–65%). These findings indicate that there is unbalanced allele transcription only in the thymus (reflecting a tissue-specific effect) and demonstrates that the protective *TSHR* G allele is preferentially transcribed.

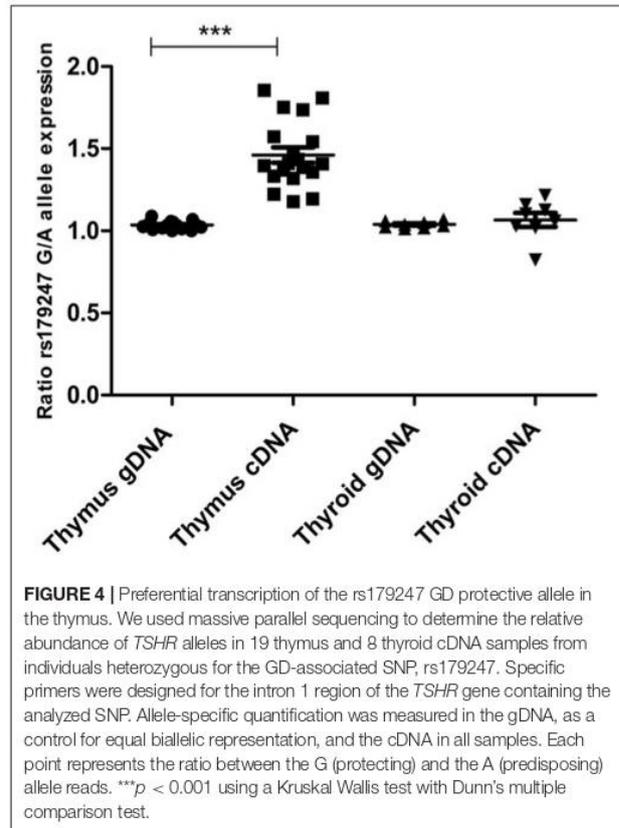


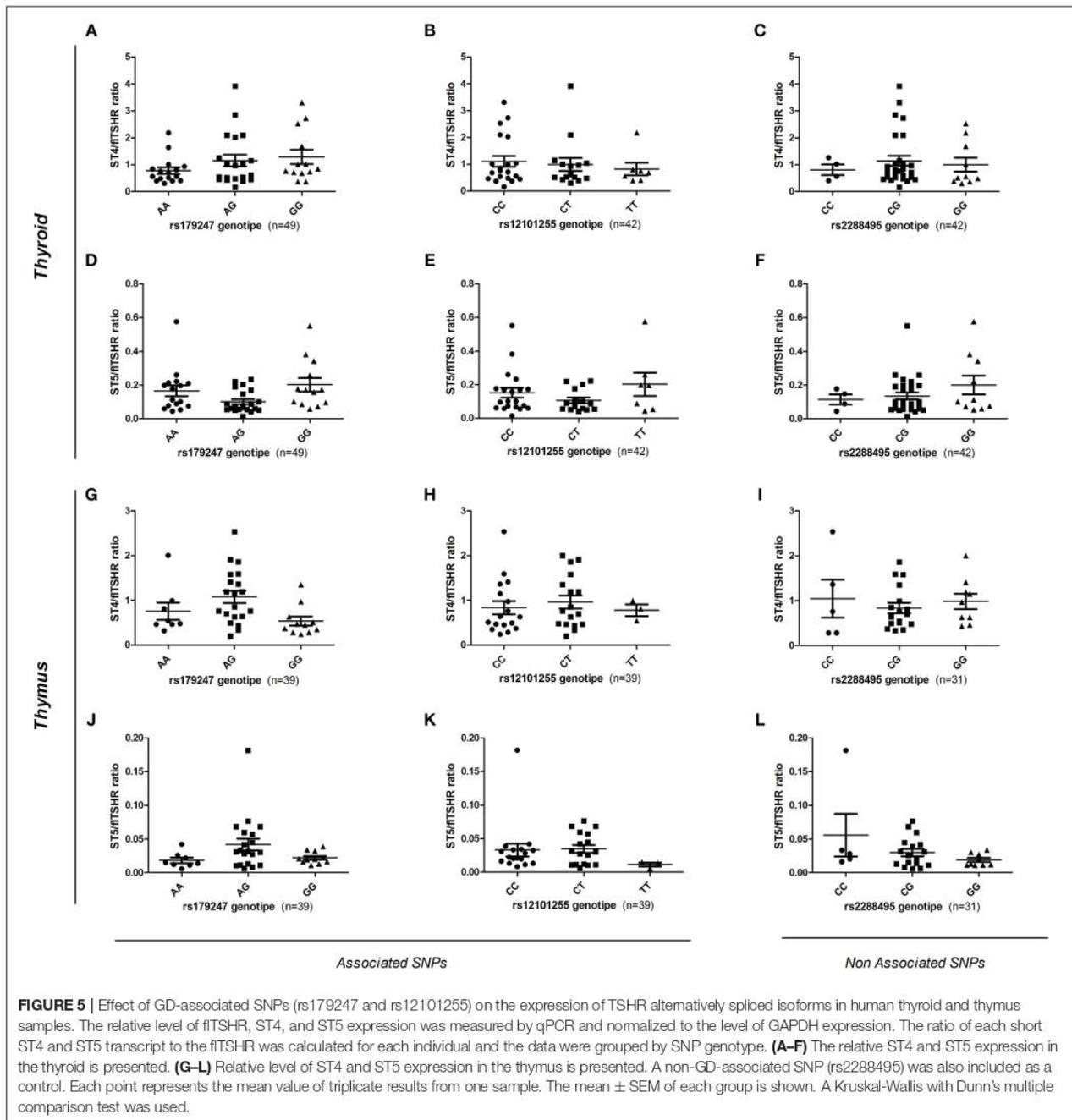
FIGURE 4 | Preferential transcription of the rs179247 GD protective allele in the thymus. We used massive parallel sequencing to determine the relative abundance of *TSHR* alleles in 19 thymus and 8 thyroid cDNA samples from individuals heterozygous for the GD-associated SNP, rs179247. Specific primers were designed for the intron 1 region of the *TSHR* gene containing the analyzed SNP. Allele-specific quantification was measured in the gDNA, as a control for equal biallelic representation, and the cDNA in all samples. Each point represents the ratio between the G (protecting) and the A (predisposing) allele reads. *** $p < 0.001$ using a Kruskal Wallis test with Dunn's multiple comparison test.

GD-Associated Intron 1 SNPs Do Not Influence Alternative *TSHR* Splicing in the Thyroid and Thymus

To assess the effect of intron 1 GD-associated SNPs on the differential transcription of alternatively spliced *TSHR* isoforms, gDNA samples from donors ($n = 88$, 49 thyroid and 39 thymus donors) were genotyped for the rs179247 and rs12101255 SNPs associated with GD, and for the control SNP, rs2288495 (located in the 3' UTR of *TSHR*, not in linkage disequilibrium with rs179247; $r = 0.05$) (21, 38). The relative level of flTSHR, ST4, and ST5 expression was measured in the thymus and thyroid by qPCR and normalized to the level of *GAPDH* expression. The ratio of each of the truncated ST4 and ST5 transcripts to flTSHR was calculated for each individual and the data were grouped by SNP genotype (Figure 5).

In the thymus samples, there was no overall significant effect of the genotypes on ST4 or ST5 expression, either normalized to *GAPDH* or expressed as a ratio to flTSHR (Figures 5A–F). Specifically, there were no statistically significant differences between the protective (GG for rs179247 and CC for rs12101255) and the predisposing genotypes (AA for rs179247 and TT for rs12101255). These results differ from those reported by Brand et al. in their original publication (21).

In the analysis of the relative expression of the ST4 and ST5 transcripts in the thymic samples, there is no



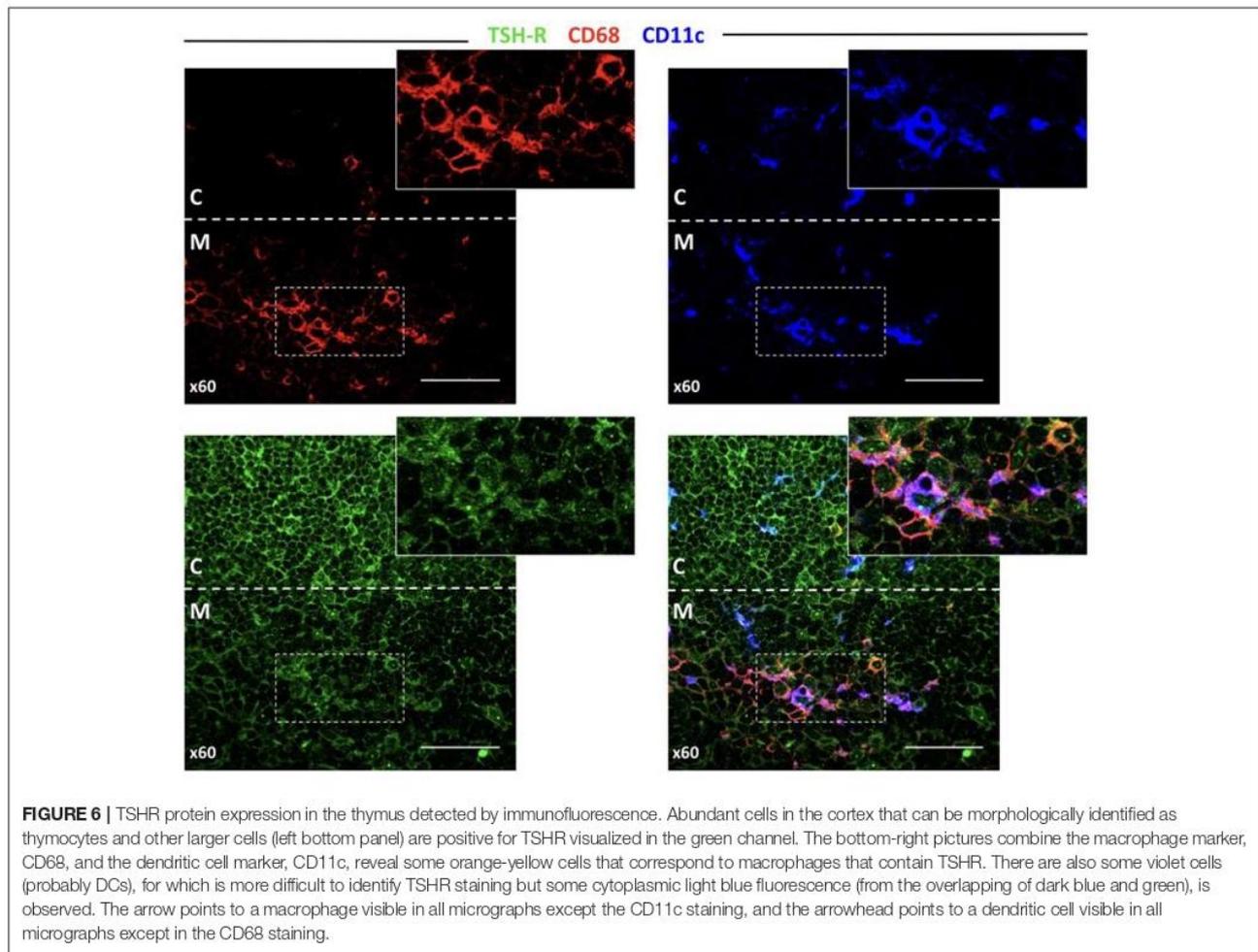
overall significant effect of the genotypes for ST4 or ST5 expression relative to fTSHR (Figures 5G–L). There are no statistically significant differences between the protective and the predisposing genotypes. In both the thymus and thyroid, the control SNP was not associated with GD (rs2288495), but was also not significantly different.

In addition to the codominant and the most likely recessive models considered above, we have also considered the dominant model for the rs179247G and rs21201255C alleles; however,

no statistical differences were found for either of these models (Supplementary Figure 1).

TSHR Is Associated With Both Thymocytes, Macrophages, and Dendritic Cells in the Thymus

It would be extremely interesting to elucidate how TSHR and its isoforms are processed and presented in the thymus, as this should determine the level of central tolerance and



more specifically, which epitopes escape this central tolerance. Since there are no TSHR isoform-specific antibodies available, after testing several reagents, we finally selected a mAb that resulted in clear staining in the thymus and low background in the lymphoid tissue (Supplementary Figure 2). As seen in Figure 6, the thymocytes located in the inner cortical areas of the thymus are clearly stained for TSHR. Interestingly, some positive dots were observed, indicative of small quantities of TSHR associated with both CD68⁺ macrophages and CD11c⁺ dendritic cells.

DISCUSSION

In this article, we report three significant findings: (1) relatively high expression of the short ST4 and ST5 *TSHR* transcripts was observed in the thymus, which may have implications for the establishment of central TSHR tolerance; (2) massive parallel sequencing was used to definitively correlate the differential effect of GD-associated rs179247 SNP alleles on *TSHR* transcription in the thymus but not in the thyroid; and (3) there was an absence of an effect of GD-associated SNPs (rs179247 and rs12101255) in modulating mRNA splicing in the thyroid and

thymus, resulting in similar levels of ST4 and ST5 transcripts between samples from individuals homozygous for the risk or protective genotype.

This is the first study to simultaneously address the two mechanisms proposed to explain the functional role of *TSHR* intron 1 GD-associated SNPs. The mechanism, which involves defective central tolerance, was initially proposed by our group. In our previous study, we showed that individuals with the rs179247 GD-protective genotype displayed higher levels of thymic *TSHR* expression than those with the disease-associated genotype (38). This finding has been also later reported by Yaron Tomer's group (28). In both studies, the results were obtained measuring gene expression by qPCR in genotyped individuals; however, since this approach is vulnerable to individual confounding factors that can influence the results (e.g., individual genetic background, age, and sex differences), we used an allele-specific quantification (ASQ) method to quantify the contribution of each allele (risk vs. protective) in heterozygous individuals. This ASQ method was a qPCR-based semiquantitative technique and confirmed higher levels of protective allele expression in the thymus (38). In the present study, we aimed to definitely corroborate these results

using a more robust quantitative technique of massive parallel sequencing (NGS). The high on-target coverage that was obtained (>9,000 reads in cDNA samples) allowed us to precisely quantify the number of transcripts expressed from each allele in heterozygous individuals. We confirmed the unbalanced tissue-specific transcription of the two alleles with the observation that the GD-protective allele was expressed 1.5-fold more on average, compared to the GD-predisposing allele in the thymus, but not in the thyroid. Although it remains unclear how these moderate differences in the expression of a self-antigen in the thymus have such an important effect on establishing the level of central tolerance, they may be related to the limited window of opportunity that maturing thymocytes have to interact with tissue-restricted antigens in the thymus (39). The magnitude of this imbalance here reported by NGS is in the same order of magnitude of that detected by ourselves using ASQ by qPCR (38), and of that reported by Pugliese et al. and Vafiadis et al. for the insulin gene in the first publications describing this phenomenon (25, 40).

The second mechanism used to explain the functional role of *TSHR* intron 1 GD-associated SNPs was proposed by Brand et al. and highlighted the differential regulation of mRNA splicing by these SNPs. The authors showed that GD-risk alleles of intron 1 SNPs (rs179247 and rs12101255) were associated with a relative increase in ST4 and ST5 expression, which would result in a higher production of variants encoding putatively more antigenic soluble TSHR isoforms (21). In our study, when we attempted to replicate this experiment, rs179247 and rs12101255 did not affect the transcription of the ST4 and ST5 isoforms in the thyroid or thymus. Although these results differ with those reported by Brand et al. for an unknown reason, this discrepancy may be the result of our study involving a much larger series of thyroid samples. We used 49 thyroid samples compared with the 12 samples used by Brand et al. In their study, when the 12 samples were divided by genotype, the result was small groups consisting of only three to five samples each (one of which had a high dispersion of the values), which the authors stated required further confirmation (21). Additionally, the ST5 probe sequence described in Brand et al. had an incorrect nucleotide when compared with the current reference genome. Furthermore, it is difficult to predict if this mismatch had an effect on ST5 quantification.

We believe that our results are robust due to the use of highly reliable and quantitative methods (NGS for ASQ and probe-specific qPCR for gene expression). The age, clinical conditions, and presence of thyroid autoantibodies in the donors had no effect on the results, and they were excluded as confounding factors (data not shown). Therefore, we can conclude that *TSHR* intron 1 GD-linked SNPs are associated with different levels of thymic *TSHR* expression, but not with differential mRNA splicing.

Perhaps the most striking finding in the present study is the demonstration of high levels of short *TSHR* transcript expression, especially ST4, in the thymus [recently confirmed by Latif et al. (16)]. This is relevant if we consider the peculiar distribution of *TSHR* expression within the thymus. Different from most other restricted tissue antigens (RTAs), while the

TSHR receptor is only minimally expressed by medullary thymic epithelial cells (mTECs), it is expressed at relatively high levels by double positive thymocytes themselves, for which it appears to play a role in maturation and differentiation (9, 36, 38, 41). Therefore, it should be assumed that there are two sources of TSHR protein in the thymus: (1) the TSHR anchored in the thymocyte membrane and the soluble ST4 and ST5 isoforms generated by alternative splicing. We and others consider that the ST4 and ST5 isoforms are translated (ST4 and ST5 mRNA have all the features of mature transcripts), even if no experimental evidence is available. According to the transcript levels, soluble short TSHR isoforms may be present at levels comparable to that of membrane-anchored TSHR. It would be important to determine which of these two forms (soluble vs. membrane-anchored) play the main role in the establishment of central tolerance to TSHR. It is difficult to answer to this question with certainty given the present data and reagents. As previously shown by van der Weerd (36) and ourselves (41), as well as by our IFL experiments in this paper, TSHR is mainly expressed in double positive thymocytes; however, low levels are also observed in both macrophages and dendritic cells. There are currently no reagents that can be used to identify the isoforms detected by IFLs in these APCs. Massive quantities of double positive thymocytes die by apoptosis in the thymus cortical compartment. It is known that they are disposed by macrophages that ingest apoptotic cells. Importantly, macrophages are much less efficient than mTEC or thymic dendritic cells at inducing tolerance to self-autoantigens, which should apply to thymocyte antigens (42, 43). In contrast, soluble TSHR isoforms are likely engaged by thymic dendritic cells, which are highly efficient at inducing negative selection. If central tolerance to TSHR is predominantly dependent on the two soluble ST4 and ST5 isoforms, the C terminal segment consisting of 533 aa out of the 764 aa of the full length TSHR molecule would not be subjected to the tolerization process. In GD, although the pathogenic stimulating antibodies are directed at the N terminal LRR in the ectodomain, tolerance is ultimately dependent on T cells. Thus, B cells that recognize the ectodomain may receive help from T cells that recognize epitopes in the long C terminal stretch of TSHR, to which tolerance is incomplete. This is an important issue because a demonstrated mechanism of central tolerance failure is the expression of different protein isoforms in both the thymus and periphery. This was first demonstrated by Klein and Kyewski in experimental acute encephalomyelitis induced by the myelin proteolipid protein in SJL/J mice (44). Since this original description, similar results have also been demonstrated for the islet antigen, I-A2 (45), and is also used to explain autoantibodies to post-translationally modified proteins (e.g., citrullinated peptides in rheumatoid arthritis) (46). In addition, the role of TSHR expression in the thymus for protection against the development of pathogenic anti-TSHR antibodies has recently been demonstrated in a mouse model (47). Therefore, we propose that a crucial mechanism for the failure of TSHR tolerance is the lack of presentation of the full-length TSHR molecule by tolerogenic APCs in the thymic medulla.

Collectively, the results of the present study support the functional role of *TSHR* intron 1 GD-associated SNPs

in modulating central tolerance through influencing the intrathymic expression of *TSHR*. In addition, these findings provide a novel explanation as to why the loss of tolerance to TSHR occurs with relatively high frequency (i.e., differential expression of isoforms in the thymus vs. thyroid). Furthermore, a deeper analysis of the differential isoform expression (i.e., measurements of the corresponding proteins, the presence of TSHR peptides in the thymic ligandome) and epitope specificity of TSHR-specific autoreactive T cells should be assessed in future studies.

DATA AVAILABILITY

This manuscript contains previously unpublished data. The name of the repository and accession number(s) are not available.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of local institutional ethics review board of the participating institutions, with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by Vall d'Hebron Hospital (HUVH) Research Ethics Committee (Approval reference PR AG-145/2011).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AM-S collected the samples, performed the qPCR experiments, analyzed the data, and wrote part of the manuscript. AS-S contributed to the collection and processing of the samples, as well as the qPCR experiments. FR and EE performed the ASQ NGS experiments. DÁ-S performed the immunofluorescence

experiments. AL-M and OG reviewed the clinical and surgical data in patient records. RC and RP-B were responsible for designing the study, checking the experimental protocols and results and writing the manuscript, and approving the final draft.

FUNDING

This study was funded by Instituto de Salud Carlos III, grants PI14/00848, and PI17/00324, co-financed by the European Regional Development Fund (ERDF). DÁ-S is in recipient of a predoctoral fellowship from the Vall d'Hebron Research Institute (VHIR).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the patients and their parents that agreed to donate part of the thymus and thyroid surgical specimen for research projects. We are also very grateful to the heart surgery teams at Pediatric Hospital Vall d'Hebron (Dr. Raul Abella) and Hospital Germans Trias i Pujol (Dr. X. Ruyra) and the endocrine surgery teams at Hospital Vall d'Hebron Dr. J. M. Balibrea, Dr. Enric Caubet, Dr. J. M. Fort and Dr. Aroa Gómez and Dr. Irene Bello from the Surgery Department for the procurement of thyroid samples; Dr. Teresa Pont, the transplant coordinator for organizing the circuits for organ donor tissue collection. We thank ScienceDocs Inc. (<https://www.sciencedocs.com>) for language editing.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01695/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid*. (2007) 17:911–22. doi: 10.1089/thy.2007.0170
- Smith TJ, Hegedüs L. Graves' disease. *N Engl J Med*. (2016) 375:1552–65. doi: 10.1056/NEJMr1510030
- Brix TH, Kyvik KO, Christensen K, Hegedüs L. Evidence for a major role of heredity in graves' disease: a population-based study of two danish twin cohorts. *J Clin Endocrinol Metab*. (2001) 86:930–4. doi: 10.1210/jcem.86.2.7242
- Brand OJJ, Gough SCLCL. Genetics of thyroid autoimmunity and the role of the TSHR. *Mol Cell Endocrinol*. (2010) 322:135–43. doi: 10.1016/j.mce.2010.01.013
- Pujol-Borrell R, Giménez-Barcons M, Marín-Sánchez A, Colobran R. Genetics of Graves' disease: special focus on the role of TSHR gene. *Horm Metab Res*. (2015) 47:753–66. doi: 10.1055/s-0035-1559646
- Lee HJ, Li CW, Hammerstad SS, Stefan M, Tomer Y. Immunogenetics of autoimmune thyroid diseases: a comprehensive review. *J Autoimmun*. (2014) 64:82–90. doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.009
- Ban Y, Greenberg DA, Concepcion E, Skrabanek L, Villanueva R, Tomer Y. Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2003) 100:15119–24. doi: 10.1073/pnas.2434175100
- Dai YD, Rao VP, Carayanniotis G. Enhanced iodination of thyroglobulin facilitates processing and presentation of a cryptic pathogenic peptide. *J Immunol*. (2002) 168:5907–11. doi: 10.4049/jimmunol.168.11.5907
- Pujol-Borrell R, Álvarez-Sierra D, Jaraquemada D, Marín-Sánchez A, Colobran R. Central tolerance mechanisms to TSHR in Graves' disease: contributions to understand the genetic association. *Horm Metab Res*. (2018) 50:863–70. doi: 10.1055/a-0755-7927
- Stefan M, Faustino LC. Genetics of thyroid-stimulating hormone receptor—relevance for autoimmune thyroid disease. *Front Endocrinol*. (2017) 8:1–6. doi: 10.3389/fendo.2017.00057
- Kursawe R, Paschke R. Modulation of TSHR signaling by posttranslational modifications. *Trends Endocrinol Metab*. (2007) 18:199–207. doi: 10.1016/j.tem.2007.05.002
- Rapoport B, McLachlan SM. TSH receptor cleavage into subunits and shedding of the A-subunit; a molecular and clinical perspective. *Endocr Rev*. (2016) 37:114–34. doi: 10.1210/er.2015-1098
- Chazenbalk GD, Tanaka K, Nagayama Y, Kakinuma A, Jaume JC, McLachlan SM, et al. Evidence that the thyrotropin receptor ectodomain contains not one, but two, cleavage sites. *Endocrinology*. (1997) 138:2893–9. doi: 10.1210/endo.138.7.5259
- Kleinau G, Worth CL, Kreuchwig A, Biebermann H, Marcinkowski P, Scheerer P, et al. Structural–functional features of the thyrotropin receptor: a class A G-protein-coupled receptor at work. *Front Endocrinol*. (2017) 8:86. doi: 10.3389/fendo.2017.00086

15. Chen CR, Chazenbalk GD, Wawrowsky KA, McLachlan SM, Rapoport B. Evidence that human thyroid cells express uncleaved, single-chain thyrotropin receptors on their surface. *Endocrinology*. (2006) 147:3107–13. doi: 10.1210/en.2005-1514
16. Latif R, Mezei M, Morshed SA, Ma R, Ehrlich R, Davies TF. A modifying autoantigen in Graves' disease. *Endocrinology*. (2019) 160:1008–20. doi: 10.1210/en.2018-01048
17. Fernando R, Lu Y, Atkins SJ, Mester T, Branham K, Smith TJ. Expression of thyrotropin receptor, thyroglobulin, sodium-iodide symporter, and thyroperoxidase by fibrocytes depends on AIRE. *J Clin Endocrinol Metab*. (2014) 99:1236–44. doi: 10.1210/jc.2013-4271
18. Hunt N, Willey KP, Abend N, Balvers M, Jähner D, Northemann W, et al. Novel splicing variants of the human thyrotropin receptor encode truncated polypeptides without a membrane-spanning domain. *Endocrine*. (1995) 3:233–40. doi: 10.1007/BF02994449
19. Graves PN, Tomer Y, Davies TF. Cloning and sequencing of a 1.3 KB variant of human thyrotropin receptor mRNA lacking the transmembrane domain. *Biochem Biophys Res Commun*. (1992) 187:1135–43. doi: 10.1016/0006-291X(92)91360-3
20. Takeshita A, Nagayama Y, Fujiyama K, Yokoyama N, Namba H, Yamashita S, et al. Molecular cloning and sequencing of an alternatively spliced form of the human thyrotropin receptor transcript. *Biochem Biophys Res Commun*. (1992) 188:1214–9. doi: 10.1016/0006-291X(92)91360-3
21. Brand OJ, Barrett JC, Simmonds MJ, Newby PR, McCabe CJ, Bruce CK, et al. Association of the thyroid stimulating hormone receptor gene (TSHR) with Graves' disease. *Hum Mol Genet*. (2009) 18:1704–13. doi: 10.1093/hmg/ddp087
22. Chen CR, Pichurin P, Nagayama Y, Latrofa F, Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim. *J Clin Invest*. (2003) 111:1897–904. doi: 10.1172/JCI17069
23. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. (1987) 49:273–80. doi: 10.1016/0092-8674(87)90568-X
24. Cheng M, Anderson MS. Thymic tolerance as a key brake on autoimmunity. *Nat Immunol*. (2018) 19:659–64. doi: 10.1038/s41590-018-0128-9
25. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet*. (1997) 15:289–92. doi: 10.1038/ng0397-289
26. Sabater L, Ferrer-Francesch X, Sospedra M, Caro P, Juan M, Pujol-Borrell R. Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus. *J Autoimmun*. (2005) 25:312–8. doi: 10.1016/j.jaut.2005.08.006
27. Malhotra D, Linehan JL, Dileepan T, Lee YJ, Purtha WE, Lu JV, et al. Tolerance is established in polyclonal CD4 + T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat Immunol*. (2016) 17:187–95. doi: 10.1038/ni.3327
28. Stefan M, Wei C, Lombardi A, Li CW, Concepcion ES, Inabnet WB, et al. Genetic-epigenetic dysregulation of thymic TSH receptor gene expression triggers thyroid autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2014) 111:12562–7. doi: 10.1073/pnas.1408821111
29. Ruiz-Riol M, Armengol Barnils Mdel P, Colobran Oriol R, Sánchez Pla A, Borràs Serres FE, Lucas-Martin A, et al. Analysis of the cumulative changes in Graves' disease thyroid glands points to IFN signature, plasmacytoid DCs and alternatively activated macrophages as chronicity determining factors. *J Autoimmun*. (2011) 36:189–200. doi: 10.1016/j.jaut.2011.01.002
30. Yin X, Sachidanandam R, Morshed S, Latif R, Shi R, Davies TF. MRNA-Seq reveals novel molecular mechanisms and a robust fingerprint in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*. (2014) 99:E2076–83. doi: 10.1210/jc.2014-1735
31. Tomer Y, Blackard JT, Akeno N. Interferon alpha treatment and thyroid dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*. (2007) 36:1051–66; x–xi. doi: 10.1016/j.ecd.2007.07.001
32. Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, Fernández-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, Pujol-Borrell R. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol*. (2001) 159:861–73. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61762-2
33. Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Domínguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol*. (1998) 161:5918–29.
34. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. (2005) 39:75–85. doi: 10.2144/05391RV01
35. Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. (2010) 50:227–30. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.11.001
36. Bogers AJJC, van Hagen PM, Schrijver B, Visser TJ, van der Weerd K, van der Lelij A-J, et al. Thyrotropin acts as a T-cell developmental factor in mice and humans. *Thyroid*. (2014) 24:1051–61. doi: 10.1089/thy.2013.0396
37. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol*. (2009) 10:R130. doi: 10.1186/gb-2009-10-11-r130
38. Colobran R, Armengol Mdel P, Faner R, Gärtner M, Tykocinski LO, Lucas A, et al. Association of an SNP with intrathymic transcription of TSHR and graves' disease: a role for defective thymic tolerance. *Hum Mol Genet*. (2011) 20:3415–23. doi: 10.1093/hmg/ddr247
39. Brennecke P, Reyes A, Pinto S, Rattay K, Nguyen M, Küchler R, et al. Single-cell transcriptome analysis reveals coordinated ectopic gene-expression patterns in medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol*. (2015) 16:933–41. doi: 10.1038/ni.3246
40. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Zalberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*. (1997) 15:293–7. doi: 10.1038/ng0397-293
41. Giménez-Barcons M, Colobran R, Gómez-Pau A, Marín-Sánchez A, Casteràs A, Obiols G, et al. Graves' disease TSHR-Stimulating Antibodies (TSABs) induce the activation of immature thymocytes: a clue to the riddle of TSABs generation? *J Immunol*. (2015) 194:4199–206. doi: 10.4049/jimmunol.1500183
42. Szondy Z, Garabuczi É, Tóth K, Kiss B, Köröskényi K. Thymocyte death by neglect: Contribution of engulfing macrophages. *Eur J Immunol*. (2012) 42:1662–7. doi: 10.1002/eji.201142338
43. Guerri L, Peguillet I, Geraldo Y, Nabti S, Premel V, Lantz O. Analysis of APC types involved in CD4 tolerance and regulatory T cell generation using reaggregated thymic organ cultures. *J Immunol*. (2013) 190:2102–10. doi: 10.4049/jimmunol.1202883
44. Klein L, Klugmann M, Nave K-AA, Tuohy VK, Kyewski B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med*. (2000) 6:56–61. doi: 10.1038/71540
45. Diez J, Park Y, Zeller M, Brown D, Garza D, Ricordi C, et al. Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen. *Diabetes*. (2001) 50:895–900. doi: 10.2337/diabetes.50.4.895
46. Raposo B, Merky P, Lundqvist C, Yamada H, Urbonaviciute V, Niaudet C, et al. T cells specific for post-translational modifications escape intrathymic tolerance induction. *Nat Commun*. (2018) 9:353. doi: 10.1038/s41467-017-02763-y
47. McLachlan SM, Aliesky HA, Banuelos B, Lesage S, Collin R, Rapoport B. High-level intrathymic thyrotropin receptor expression in thyroiditis-prone mice protects against the spontaneous generation of pathogenic thyrotropin receptor autoantibodies. *Clin Exp Immunol*. (2017) 188:243–53. doi: 10.1111/cei.12928

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Marín-Sánchez, Álvarez-Sierra, González, Lucas-Martin, Sellés-Sánchez, Rudilla, Enrich, Colobran and Pujol-Borrell. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo principal de este trabajo de tesis era el análisis conjunto, tanto en timo como en tiroides, de algunos de los mecanismos de pérdida de tolerancia al TSHR que pueden contribuir a la fisiopatología de la EG. Como ésta es una enfermedad autoinmune frecuente y conocida desde 1786 existen multitud de trabajos de investigación que han dado lugar a miles de publicaciones. Nuestro grupo lleva más de 10 años estudiando los mecanismos que pueden llevar a la pérdida de tolerancia al TSHR en la EG. Debido a esto fue necesario realizar un trabajo de revisión crítica detallado de las publicaciones de asociación genética en la EG y los mecanismos de pérdida de tolerancia al TSHR propuestos antes de comenzar el trabajo experimental.

Papel de los polimorfismos de *AIRE* en la Enfermedad de Graves. Un aspecto central de nuestra propuesta es que la menor expresión de TSHR en el timo se asociaba con una mayor susceptibilidad a padecer una enfermedad tan frecuente como es la EG, y pensábamos que había que investigar si esta expresión podía estar de alguna manera influida por *AIRE*. El análisis de la distribución alélica de las 29 variantes genéticas seleccionadas de *AIRE* en 150 pacientes con EG y 200 muestras de control, no ha demostrado una asociación significativa de los polimorfismos *AIRE* con la EG. Aunque debido al número limitado de casos de este estudio no podemos descartar la existencia de asociaciones débiles (odds ratios inferiores a 1,5) de los SNP de *AIRE* con el riesgo de desarrollar EG, nuestros resultados concuerdan con los estudios que indican que las mutaciones patogénicas de *AIRE* en heterocigosis no predisponen a padecer AITD^{213,214}. De hecho, exceptuando la mutación G228W descrita en seis miembros de una familia italiana que causa el síndrome APECED con una alta prevalencia de tiroiditis²¹⁵ y la mutación V301M descrita en un paciente con insuficiencia adrenocortical, diabetes insípida parcial e hipotiroidismo autoinmune²¹⁶, las AITD (y especialmente la EG) son manifestaciones raras del APECED²¹⁷.

La revisión de la literatura nos ha llevado al descubrimiento de que la mayoría de los estudios tampoco han podido confirmar una asociación clara de las variantes de *AIRE* con otras enfermedades autoinmunes poligénicas, algunas de ellas muy prevalentes en el APECED (ej. la alopecia areata o la enfermedad de Addison se presentan en más del 70% de los enfermos). A excepción de la artritis reumatoide en población asiática, la mayor parte de las asociaciones positivas débiles previamente informadas no se han confirmado en los estudios de GWAS.

Estos análisis sugieren que mientras que las mutaciones inactivadoras de *AIRE* provocan escenarios de autoinmunidad severa, la función de *AIRE* se ve mínimamente afectada por los polimorfismos comunes en la población general. Este hecho podría deberse a que al ser un gen crucial para el funcionamiento del sistema inmune la evolución habría tolerado sólo aquellos polimorfismos que no modifican significativamente su función. La observación de que disminuciones muy moderadas de la expresión en el timo de determinados TRA (*tissue-restricted antigens*) como la INS o el TSHR es suficiente para conferir susceptibilidad al T1D o EG^{60,207} apoyaría el concepto de que se trata de un gen que no tolera polimorfismos que modifiquen su función.

Aunque en un trabajo previo de nuestro grupo detectábamos expresión de *TSHR* en mTEC²⁰⁷, esta expresión era muy baja, no se correlacionaba con la expresión de *AIRE*, y los niveles de expresión de TSHR en mTEC-DR^{hi} y mTEC-DR^{low} eran similares, lo que ya nos hacía sospechar que el TSHR no es un TRA controlado por *AIRE* y posiblemente tampoco por *FEZF2*, descrito posteriormente²⁸. Parece que, si bien la expresión del *TSHR* en tejido tiroideo está bajo el control del factor de transcripción tiroidea TTF1 (que regula también la transcripción de otros genes específicos del tiroides ej. *TPO*, *TG*), esto no sucede en el timo donde, a diferencia del TSHR, el TTF1 no se detecta en timocitos, cTEC, mTEC o DCs²⁰⁷. Por lo tanto la regulación de la transcripción del *TSHR* en los timocitos debe estar bajo el control de otros factores de transcripción aún por determinar.

Asociación genética de los polimorfismos en el intrón 1 del *TSHR* y la EG: análisis de los dos mecanismos propuestos. En nuestra primera revisión pudimos constatar que se ha acumulado ya mucha evidencia que avala la asociación de los polimorfismos del *TSHR*, y más concretamente los del intrón 1 del gen, con la EG (ver Resultados capítulo 1, artículo 1, tabla 2). De hecho en los últimos 3 años han surgido nuevos trabajos, entre ellos dos metaanálisis^{218,219} que concluyen que los SNP rs179247 y rs12101255 están significativamente asociados con un mayor riesgo a padecer EG en todos los modelos genéticos. Sin embargo, el mecanismo concreto por el que estos SNP intrónicos pueden promover la pérdida de tolerancia al TSHR afectando a la expresión o a la regulación de la expresión del receptor o sus isoformas sigue sin conocerse. El objetivo principal de esta tesis ha sido poner a prueba las dos hipótesis

propuestas para explicar el papel de los polimorfismos del intron 1 del *TSHR* asociados con EG.

La primera hipótesis, propuesta en 2009 por Brand et al., se basa en la influencia de los SNP del *TSHR* asociados a la EG en los procesos de *splicing* del receptor²⁰⁶. En este trabajo, que los propios autores definen como preliminar por el reducido número de muestras incluidas, analizan los niveles de expresión de mRNA en tejido tiroideo humano de la forma completa del receptor (flTSHR) y de dos isoformas cortas de TSHR (ST4 y ST5), y encuentran que los SNP altamente asociados a la EG (rs179247 y rs12101255) están relacionados con cambios en los niveles de expresión de las variantes cortas del *TSHR*, ST4 y ST5, en relación a la flTSHR. Nosotros, al replicar los experimentos de Brand con un número mayor de muestras de tejido tiroideo humano, no hemos detectado un efecto significativo los alelos de riesgo de estos SNP en la expresión de ST4 o ST5, ya sea normalizada frente a GAPDH o expresada en relación a la flTSHR. Concretamente el análisis comparativo de los genotipos protectores (GG para rs179247 y CC para rs12101255) y los predisponentes (AA para rs179247 y TT para rs12101255) no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Es probable que estas discrepancias entre nuestros resultados y los originalmente publicados surjan del mayor número de muestras analizadas, 49 glándulas tiroideas en nuestro estudio frente a 12 tiroides estudiados por Brand et al. ya que cuando estas 12 muestras se dividieron por genotipo, se obtuvieron pequeños grupos de solo tres a cinco muestras cada uno (uno de los cuales con una elevada dispersión de los valores), por lo que los autores ya declaraban que requería confirmación adicional²⁰⁶. Además, la secuencia de la sonda ST5 descrita en Brand et al. tenía un nucleótido incorrecto en comparación con el genoma de referencia actual y es difícil predecir si este desajuste tuvo un efecto en la cuantificación de ST5.

En esta primera hipótesis, que propone un fallo de la tolerancia periférica al TSHR, el concepto de que las isoformas solubles del receptor serán más inmunogénicas que la flTSHR se basa en dos observaciones: 1) que los autoanticuerpos TSHR se dirigen preferentemente a la subunidad A extracelular¹⁷³ y 2) que la inyección intramuscular de la subunidad A del TSHR es un requisito absoluto para inducir la producción de autoanticuerpos TSHR e hipertiroidismo en un modelo de ratón²²⁰. Sin embargo hay que tener en cuenta que los modelos de EG en ratón que utilizan la subunidad A (no idéntica a ST4 y ST5) en su mayoría no consiguen en reproducir las características

típicas de la enfermedad en el ser humano como el sesgo de género, la histología tiroidea con hiperplasia epitelial e infiltración linfocitaria²²¹. Es más, aunque en la EG los anticuerpos estimulantes patógenos se dirigen al LRRD N-terminal en el ectodominio^{87,222}, la tolerancia depende en última instancia de los linfocitos T^{223–225}. Por lo tanto, los linfocitos B que reconocen el ectodominio pueden recibir ayuda de los linfocitos T que reconocen cualquier porción de la molécula del TSHR. Este hecho ha sido demostrado en el modelo experimental de Miastenia Gravis en el que se ha comprobado que existen tanto epítomos de la subunidad alfa del receptor de la acetilcolina (CHRNA1) compartidos por linfocitos B y T, como linfocitos T autorreactivos frente a epítomos únicos que además son capaces de estimular a linfocitos B para producir anticuerpos frente a epítomos diversos del receptor^{226–229}

Como el objetivo de esta tesis era realizar un análisis simultáneo de las dos hipótesis propuestas de fallo de tolerancia al TSHR también quisimos comprobar la influencia de los SNP de riesgo rs179247 y rs12101255 en la expresión de las variantes cortas del TSHR en el timo. El análisis de los resultados de expresión de las ST4 y ST5 en las 39 muestras de timo refuta la existencia de una influencia significativa de estos SNP en el *splicing* alternativo del TSHR.

El segundo mecanismo, planteado por nuestro grupo, que propone un fallo en la tolerancia central, surge al encontrar una mayor expresión del TSHR en timo, pero no en tiroides, en aquellos individuos con el alelo protector del SNP rs179247²⁰⁷. En aquel trabajo, no solo la expresión génica del TSHR fue significativamente menor (26.3 %) en el grupo de glándulas con genotipo AA vs GG, sino que la edad de inicio en los enfermos de EG portadores del alelo de riesgo de también era más temprana (29.8 ± 10.5 vs. 39.0 ± 10.5). Este efecto fue confirmado posteriormente por el grupo de Yaron Tomer²⁰⁸. En ambos estudios, los resultados se obtuvieron midiendo la expresión génica del *TSHR* por qPCR en individuos genotipados, además nosotros utilizamos un método de ASQ (*Allele-Specific Quantification*) para cuantificar la contribución de cada alelo (riesgo versus protección) en individuos heterocigotos para rs179247. De esta forma comprobamos que en estos sujetos la expresión en el timo del alelo protector, G, era mayor que la del alelo de riesgo, A, hecho que no se reproducía en las muestras de tiroides²⁰⁷. Dado que el método ASQ utilizado es una técnica semicuantitativa también basada en qPCR, nuestro objetivo en este trabajo de tesis ha sido corroborar definitivamente estos resultados utilizando una técnica cuantitativa

más robusta basada en la secuenciación masiva (NGS). Para ello diseñamos los primers y adaptadores que nos permitiesen la amplificación de una región de 233 bp que contenía el SNP rs179247 y realizamos la secuenciación en muestras de DNA complementario (cDNA) y DNA genómico (gDNA) extraído de glándulas tanto tímicas como tiroideas. En estos experimentos obtuvimos una alta cobertura (> 9,000 lecturas en muestras de cDNA) lo que nos permitió cuantificar con precisión el número de transcritos de cada alelo expresadas en individuos heterocigotos para el SNP rs179247. Además, los resultados en gDNA nos proporcionaron un control interno de representación bialélica equilibrada descartando así la existencia de una amplificación diferencial sistemática de uno de los alelos durante la NGS. De esta forma hemos podido confirmar que existe una transcripción desequilibrada de los dos alelos y que ésta es específica de tejido ya que alelo G -protector de EG- se expresó una media de 1.5 ± 0.2 veces más que el que alelo A -que predispone a EG- en el timo, pero no en el tiroides (ver figura 4 del capítulo 3 de resultados).

Por lo tanto, la Enfermedad de Graves, la Diabetes tipo 1 (DMI)^{60,61} y la Miastenia Gravis (MG)⁵⁹, son ejemplos de EAI organoespecíficas humanas en las cuales el control genético de la expresión tímica del autoantígeno se ha mapeado a una región no codificante del gen en cuestión. En los tres casos, los polimorfismos genéticos afectan la regulación génica tímica pero no la específica del tejido periférico donde estos antígenos se expresan fisiológicamente, y los niveles bajos de expresión tímica del autoantígeno se han asociado a un mayor riesgo de padecer a la enfermedad^{59,207,230}. Existe un modelo reciente de tiroiditis espontánea en ratones transgénicos sobre el que se verifica que los niveles elevados de expresión intratímicos de TSHR humano (hTSHR) protegen contra la generación espontánea de autoanticuerpos patógenos contra dicho receptor²³¹. Este modelo surge del cruce de una línea de ratones NOD/H2^{h4}, que desarrollan tiroiditis espontáneamente con producción de anticuerpos anti-TPO y anti-TG pero no contra el TSHR, con dos líneas de ratón BALB/c transgénicas (una de alta, *Hi expressor* y otra de baja expresión, *Lo-expressor*) en las que se ha dirigido la expresión de la subunidad A del hTSHR al tiroides del ratón usando del promotor de la TG²³². El resultado de estos cruces son dos tipos de cepas transgénicas NOD.H2h4: una con alta expresión subunidad A del hTSHR (*Hi-expressor TSHR/NOD.H2^{h4}*) y otra con baja expresión (*Lo-expressor TSHR/NOD.H2^{h4}*) tanto en timo como en tiroides. Ambas líneas producen anticuerpos

anti-TPO y anti-TG pero, mientras que en los ratones *Hi-expressor TSHR/NOD.H2^{h4}* no se detectan anticuerpos contra el hTSHR, las hembras de los ratones *Lo-expressor TSHR/NOD.H2^{h4}* desarrollan anticuerpos contra hTSHR capaces de inhibir la unión a la TSH^{231,233,234}. Aunque este modelo experimental no consigue reproducir los síntomas de EG, ya que los ratones no tienen hipertiroidismo (al ir los autoanticuerpos dirigidos contra el TSHR humano pero no del ratón), ha permitido demostrar en ratones que la baja expresión intratímica del mRNA del *TSHR* está asociada con la producción de TRAb. Sin embargo, sigue sin explicarse cómo diferencias tan moderadas en la expresión de un autoantígeno en el timo humano pueden tener un efecto tan importante en el establecimiento del nivel de tolerancia central ya que hay que considerar que los niveles de TSHR intratímicos de la línea *Hi-expressor TSHR/NOD.H2^{h4}* son hasta 200 veces más elevados que en el ratón *Lo-expressor TSHR/NOD.H2^{h4}*^{231,233}. Es posible que este hecho se relacione con las muy limitadas oportunidades que tienen los timocitos para interactuar con los antígenos específicos de tejido durante su maduración en el timo de manera que la magnitud de la expresión de los antígenos en la médula tímica constituiría un factor limitante crítico en el establecimiento de la tolerancia⁶. La diferencia media en los niveles de expresión del *TSHR* entre los alelos protectores y predisponentes que encontramos nosotros por NGS está en el mismo orden de magnitud del que detectábamos utilizando qPCR²⁰⁷ y es similar a la descrita con la *INS* en DMI^{60,61} o con la *CHRNA1* en MG⁵⁹.

En el caso del *CHRNA1* en la MG, se ha demostrado que las variaciones alélicas del SNP rs16862847, situado en el promotor del gen, eliminan un motivo de unión de un factor de unión al ADN (IRF8)⁵⁹, sin embargo, el mecanismo molecular mediante el cual el SNP rs179247 del *TSHR* puede modular la expresión del receptor aun no está claro. No se sabe si este SNP es directamente responsable de los efectos funcionales, o si está en desequilibrio de ligamiento con algún elemento en *cis* aún no identificado. En un estudio contemporáneo al nuestro, el equipo de Tomer ha propuesto un mecanismo epigenético para explicar este efecto²⁰⁸. Este grupo, partiendo de la premisa de que las variantes asociadas a la enfermedad pueden interactuar específicamente (a través de modificaciones epigenéticas) con factores ambientales para influir en la susceptibilidad a la enfermedad, identificó una región de cromatina en la que el DNA queda accesible marcada por el enriquecimiento en H3K4me1 (histona-H3-lisina4 monometilada) inducida por IFN α que se coincide con dos SNP

adyacentes del intrón 1 del *TSHR* asociados al EG: rs12101255 y rs12101261. Los estudios funcionales revelaron que concretamente la región que coincide con el sitio rs12101261 (en desequilibrio de ligamiento con rs179247) contiene un lugar de unión al factor represor de la transcripción PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger protein*), regulado por IFN- α . Demostraron que la unión a PLZF estaba restringida a la variante de rs12101261 asociada a la enfermedad y que esta variante se correlacionaba a su vez con niveles más bajos de ARNm de *TSHR* tímico en individuos portadores del genotipo que predispone a la enfermedad, en comparación con individuos portadores del genotipo protector de la enfermedad. De esta forma los autores sugieren que la pérdida de interacciones genético-epigenéticas adecuadas debido a las influencias microambientales, como la producción sostenida de IFN α durante las infecciones virales, afectaría la regulación de los SNP de susceptibilidad del *TSHR* dando como resultado una expresión genética alterada. Aunque en este estudio no se demuestra que el IFN- α esté actuando en el timo de los sujetos con EG, sí se relaciona con observaciones previas en que la administración terapéutica de IFN tipo 1 puede desencadenar autoinmunidad tiroidea^{208,235}. Es más, sabemos que existe una clara *signature* de expresión de IFN en el transcriptoma de las glándulas de EG^{153,208}.

Otro mecanismo propuesto, aunque no experimentalmente validado, de cómo estos SNP intrónicos podrían modular la expresión del *TSHR* ha sido por la presencia de regiones potenciadoras (*enhancers*) en el intrón 1 del gen que se superponen a los polimorfismos de riesgo para EG²³⁶. También se ha sugerido la posible participación de los miRNA²³⁷ y, aunque existen numerosos trabajos que establecen determinados miRNAs como biomarcadores de EG²³⁸, apenas existen estudios sobre la expresión de estos miRNA en el tiroides y menos en el timo, ni existe evidencia alguna de su posible interacción con los polimorfismos en el intrón 1 del *TSHR*. La intervención de los lncRNA es una hipótesis atractiva aun por estudiar en el caso de la regulación de la expresión del *TSHR*. Un estudio reciente demuestra que muchos lncRNA se localizan conjuntamente o están cerca de SNP que confieren riesgo de desarrollar determinadas enfermedades autoinmunes (ej. EM, LES o AR) y que los genotipos de estos SNP se asocian con la expresión de lncRNA²³⁹. En este sentido, dado el tamaño excepcionalmente grande del intrón 1 del *TSHR* (106 kb) y que actualmente ya hay anotados al menos 5 lncRNA *anti sense* al gen del *TSHR* humano ([RNAcentral](#)), sería interesante explorar mecanismos como el descrito recientemente por Kulkarni et al. en

el que las variantes de un polimorfismo intergénico modulan la expresión de un lncRNA que aumenta la estabilidad del mRNA del CCR5 previniendo su degradación y aumentando su expresión en superficie²⁴⁰.

Abundancia inesperada de TSHR en el timo. En comparación con otros genes de proteínas tiroideas como la TPO o la TG, el *TSHR* se expresa a niveles moderadamente bajos en el tiroides. Los datos actuales del análisis RNAseq de 653 glándulas de tiroides incluidas en el proyecto GTEx (*Genotype-Tissue Expression* www.gtexportal.org) muestran un promedio de expresión del *TSHR* de 200 transcripciones por millón (TPM), frente a las 1180 TPM de la *TPO* y muy por debajo de *TG* con 7600 TPM (datos de www.gtexportal.org fecha 16/01/2020). Al iniciar este trabajo carecíamos de datos de RNAseq sobre la expresión del *TSHR* en el timo en esta u otras bases de datos de transcriptómica. Por eso, cuando analizamos los datos de expresión tímica del *TSHR* y sus variantes de *splicing* uno de los hallazgos que más nos llamó la atención fue encontrar una inesperada abundancia de transcritos del *TSHR*. El nivel de expresión de flTSHR en el timo fue más alto de lo esperado, aproximadamente un 20% de la expresión observada en la tiroides. Este nivel es muy superior los niveles de expresión tímica de otros TRA conocidos como la insulina (*INS*) o la ATPasa H⁺/K⁺ (*ATP4A*). En un principio, el encontrar esta abundancia de TSHR en el timo, poco documentada anteriormente, nos hizo reevaluar nuestros propios experimentos. Ya en 2011 en el trabajo de Colobran et al. mediante qPCR²⁰⁷, y posteriormente en 2014 mediante western blot²⁴¹, detectábamos niveles elevados de TSHR en timo pero las bases de datos de expresión génica (ej. BioGPS o EMBL-EBI Expression atlas) no avalaban estos resultados que, en el caso del western blot, habíamos considerado exagerados debido a la normalización por el contenido de proteína en lugar de por número de células (ya que en el contenido total de proteínas tiroideas, las proteínas del coloide diluyen las celulares). Revisando la escasa literatura existente sobre la expresión tímica del TSHR en humanos vimos que el equipo de van der Weerd²⁰⁹ informaba de niveles de TSHR en timo en torno a un cuarto de los encontrados en tiroides, dato similar al que obtenemos nosotros. Hemos comprobado que la expresión tímica del TSHR es dependiente de la edad ya que el nivel medio de expresión en los donantes mayores de 40 años es aproximadamente un 50% del que encontramos de las muestras pediátricas. Este es un dato coherente con el proceso de involución que sufre el timo con el envejecimiento y el hecho que la mayoría se las

muestras de timo de nuestro estudio provienen de pacientes relativamente jóvenes (31 pediátricos vs 8 adultos), puede explicar la discrepancia con los niveles registrados en las bases de datos. En este sentido hay que remarcar la notable falta de datos de expresión génica de la glándula tímica en las bases de datos existentes, en las que o bien el timo no está incluido en los estudios de transcriptómica (ej. GTE_x) o bien son timos de adulto cuyos datos no son representativos del tejido pediátrico (ej. BioGPS) o, cuando provienen de donantes pediátricos, el número de muestras es bajo o son solo muestras patológicas (ej. EMBL-EBI Expression atlas).

Pero **¿dónde se está expresando el TSHR en el timo?** Aunque en un inicio suponíamos que la expresión del TSHR que encontrábamos en muestras de timo total estaría restringida a mTEC, el análisis de expresión en las distintas subpoblaciones tímicas realizado por Colobran et al. nos desveló que el nivel de expresión del TSHR en mTEC era mínimo comparado con el que se detectaba en timocitos inmaduros²⁰⁷. De hecho los últimos estudios de transcriptómica no encuentran niveles de expresión significativa de este receptor en mTEC²⁴²⁻²⁴⁴. En este trabajo hemos comprobado mediante inmunofluorescencia que los timocitos ubicados en las áreas corticales internas del timo están claramente marcados para TSHR (ver figura 6 del capítulo 3 de resultados). De hecho existe cada vez una mayor evidencia de que se expresa, a niveles relativamente altos, en los timocitos DP donde parece desempeñar un papel en su maduración y diferenciación^{209,210}. La presencia del TSHR en la membrana de los timocitos DP y el hecho de ser un receptor funcional capaz de ser activado por TSA_b explicaría la hiperplasia tímica detectada frecuentemente en pacientes con EG²⁴⁵ y podría ser una pista para entender porqué los anticuerpos contra el TSHR son preferentemente activadores más que bloqueantes. Nosotros proponemos que la interacción, a través de anticuerpos anti-TSHR, entre el tejido linfóide periférico y el timo conduciría a un ciclo iterativo de estimulación que favorecería la selección de linfocitos productores de TSA_b con una afinidad progresivamente más alta (ver Resultados capítulo 1, artículo 1, figura 2).

Nos encontramos por tanto ante un antígeno que no está confinado a mTEC en el timo, del que no conocemos el factor de transcripción en timo pero parece que no está regulado por AIRE, que lo están expresando los timocitos DP y que además es relativamente abundante en el timo. Y a raíz de estos datos, surge una cuestión: ¿podemos seguir considerando al TSHR un TRA? Los autoantígenos se han

clasificado en función de su patrón de expresión en dos grupos: aquellos que tienen un patrón de expresión ubicua y aquellos cuyo patrón de expresión está confinado a una o unas pocas (máximo 3) localizaciones anatómicas, conocidos como TRA. Debido a la baja o nula expresión que se había encontrado del TSHR en la mayoría de los tejidos extratiroides, ha venido considerándose desde el inicio como un TRA, sin embargo en los últimos años la expresión tanto del TSHR como de algunas de sus isoformas se ha reportado en células embrionarias y en numerosos tejidos especialmente en médula ósea, adipocitos, fibroblastos y en el timo (ver introducción tabla 4). Es más nosotros, mediante western blot²¹⁰ y mediante inmunofluorescencia (IFL) (ver figura 6 del capítulo 3 de resultados), hemos podido comprobar que la expresión del TSHR preferentemente en los timocitos inmaduros DP, lo convierte en un antígeno de amplia distribución en la corteza tímica, aunque casi desaparece en médula. Esto es importante porque se espera que un antígeno expresado de forma "ubicua" en el timo sea visible para los timocitos en desarrollo en la corteza tan pronto como estas células expresen un TCR funcional, en la etapa DP y parece que esta expresión ubicua conduce a una reducción eficiente del número de linfocitos T CD4+ específicos del antígeno. Por el contrario, debido a su expresión confinada a mTEC, se espera que los TRA sean presentados después de que los linfocitos T SP comprometidos con el linaje CD4 o CD8 se hayan reubicado en la médula. Esto conlleva que la reducción en términos numéricos de CD4+ específicas de antígeno es menor, aunque una fracción sustancial de éstos serán linfocitos Treg FOXP3+³. Es posible que, dados los bajos niveles de expresión (fuera del tiroides o del timo) no podamos considerar el TSHR un antígeno estrictamente ubicuo, pero ¿podríamos considerarlo dentro del timo como un antígeno específico de timocitos? Existen algunos trabajos en ratones, aunque ninguno en humanos, sobre la inducción de tolerancia a los antígenos de los propios timocitos. Parece que los timocitos también pueden desempeñar un papel en la selección de los linfocitos T CD4 restringidos por MHC II mediante contactos timocito-timocito²⁴⁶⁻²⁴⁹. Aunque los timocitos de ratón no expresan MHC II, los timocitos humanos sí, y en un modelo de ratón en el que MHC II se expresó únicamente en timocitos, se desarrollaron linfocitos T CD4 + funcionalmente competentes y capaces de colaborar con linfocitos B^{247,250}. Curiosamente el factor de transcripción PLZF se expresa en timocitos fetales humanos y de ratón y es un marcador de linfocitos que han sido seleccionados positivamente vía interacciones timocito-timocito (linfocitos T-T CD4+)²⁵⁰. Esto es interesante ya que, si consideramos los resultados del trabajo de

Stefan et al.²⁰⁸, podría explicar la influencia de los SNP intrónicos sobre la expresión diferencial del TSHR en los timocitos mediante las interacciones de PLZF con las variantes de riesgo de los SNP del intrón 1 del gen. De expresarse este factor de transcripción específicamente en timocitos, y no en los tirocitos, podría ser la clave para entender porqué en condiciones no inflamatorias, sin una clara presencia del IFN- α en el timo, detectamos el efecto de las variantes de riesgo solo sobre la expresión del TSHR en el timo y no el tiroideo.

Importancia de la abundancia de transcritos cortos del *TSHR* en el timo: nuevos escenarios de presentación en timo y periferia. Puede que el hallazgo más sorprendente en esta tesis haya sido la demostración de altos niveles de expresión de los transcritos cortos del *TSHR*, especialmente ST4, en el timo. Mientras que la variante ST5 tiene niveles de expresión sustancialmente menores a los de la flTSHR, las expresiones relativas de la flTSHR y ST4 son equiparables tanto en tiroides como en el timo, con una proporción flTSHR/ST4 de 1.34 y 1.93 respectivamente. Recientemente estos niveles relativamente altos de expresión de ST4 en el timo han sido confirmados por el grupo de Terry Davies, quienes denominan esta variante TSHR v1.3²⁰⁴. Aunque el ARNm de ST4 y ST5 tiene todas las características de los transcritos maduros hasta ahora solo este grupo ha clonado y expresado la isoforma ST4²⁰⁴. Sus resultados *in vitro* indican que ST4 es capaz de competir por la TSH y puede ser inmunogénica, en tanto existen TRAb (que no TSAbs) capaces de unirse a péptidos específicos de la secuencia de ST4 que no están presentes en el receptor completo²⁰⁴.

De traducirse, las isoformas del TSHR ST4 y ST5 carecerían de la fracción transmembrana, serían solubles y podrían ser secretadas por lo que, a la luz de nuestros resultados, es probable que exista una cantidad sustancial de TSHR soluble dentro del timo, que derivaría principalmente de la transcripción de ST4. Por lo tanto podemos suponer que existen dos fuentes de proteína TSHR en el timo: el TSHR anclado en la membrana del timocito y las isoformas solubles ST4 y ST5. Y lo que es más, de acuerdo con los niveles de transcripción, las isoformas cortas y solubles del TSHR pueden estar presentes en niveles comparables a los del TSHR anclado en membrana. ¿Cuál de estas dos formas (soluble vs anclada a la membrana) desempeña el papel principal en el establecimiento de la tolerancia central a TSHR? Es difícil responder a esta pregunta con certeza dados los datos y reactivos actuales. La inducción de

tolerancia central es un complejo proceso que depende tanto de la composición y el papel de los distintos tipos de APC como de los conjuntos de autoantígenos presentados en el timo. Los autoantígenos pueden ser suministrados por el proteoma de las células epiteliales residentes (cTECs y mTEC) o por APC como DCs, macrófagos, linfocitos B e incluso por los propios timocitos^{17,251}. Aunque nuestros resultados de IFL son aun preliminares y deben ser confirmados con otros métodos, también hemos observado la presencia del TSHR tanto en macrófagos como en DC que podrían estar presentando el fITSHR o sus isoformas en el timo (ver figura 6 del capítulo 3 de resultados).

Además, tal y como se explica en la introducción de este trabajo, entre los mecanismos descritos de fallo de tolerancia central está la existencia de un procesamiento diferencial de transcritos en timo y periferia que tiene como resultado la generación de epítomos dominantes T presentes en periferia pero no en timo. Esto ha sido demostrado en el modelo experimental de encefalomiелitis aguda con las isoformas de la proteína proteolípídica de la mielina (PLP)⁶² y también en diabetes tipo I con las proteínas IA-2 (*insulinoma-associated tyrosine phosphatase-like protein*)⁶³ o la IGRP (*islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*)⁶⁴. Debido a que actualmente no existen reactivos específicos adecuados para identificar las isoformas ST4 o ST5 por IFL nosotros no hemos podido concretar su localización en el timo pero, a pesar de esto, nuestros resultados sugieren nuevos escenarios posibles para la presentación del TSHR y sus isoformas a nivel central y en periferia (Figuras 11 y 12).

En el timo cantidades masivas de timocitos DP mueren por apoptosis en el compartimento cortical y estas células apoptóticas son fagocitadas por los macrófagos tímicos. Por lo tanto serían los macrófagos las principales APCs encargadas de presentar el TSHR originalmente anclado a la membrana de los timocitos DP (fITSHR). Como se comentó en la introducción, los macrófagos son mucho menos eficientes que mTEC o las DCs tímicas para inducir tolerancia a los autoantígenos propios^{51,53,252}. Por otro lado, las isoformas solubles del TSHR probablemente son capturadas por las DCs tímicas, que son altamente eficientes para inducir la selección negativa. De esta forma, si la tolerancia central al TSHR depende predominantemente de las dos isoformas solubles ST4 y ST5, el segmento terminal C que consta de 533 aa de los 764 aa de la molécula de TSHR de longitud completa no estaría sujeto al proceso de tolerización (Figura 11).

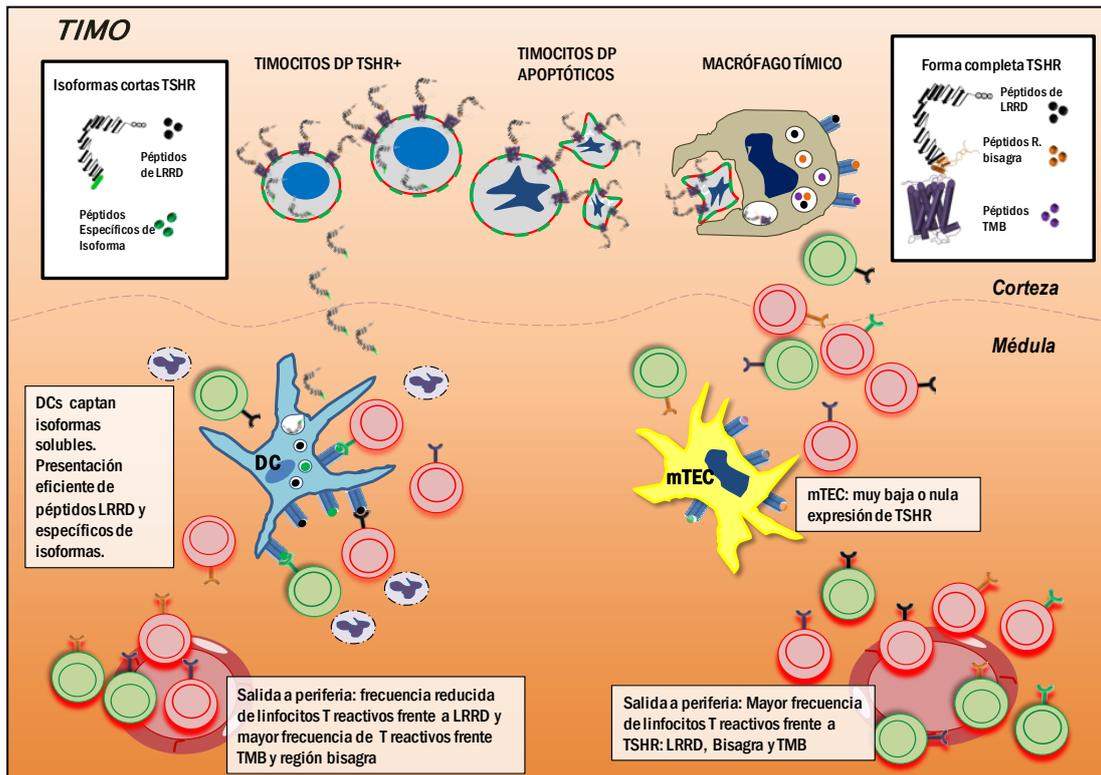


Figura 11. Posible escenario de presentación del TSHR en el timo

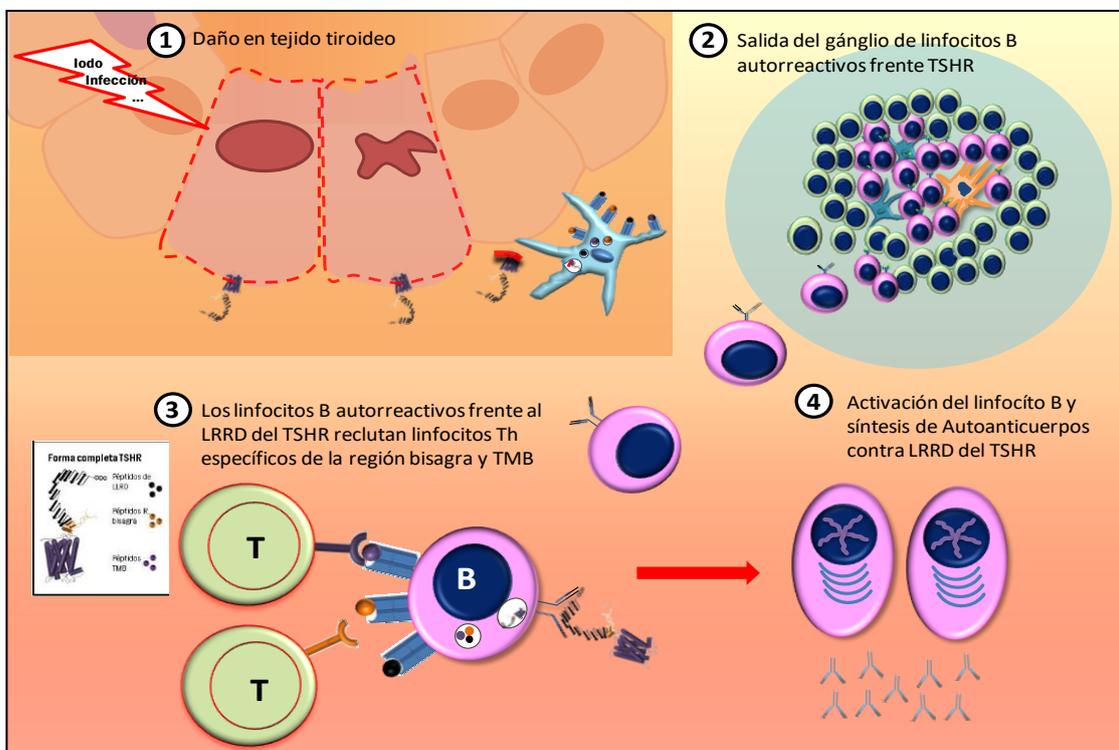


Figura 12. Posible escenario de presentación del TSHR en periferia

Según esta hipótesis la situación **en periferia** podría ser la siguiente: tras un daño tisular en tiroides (ej. iodo, infección) los linfocitos B que reconocen el LRRD del ectodominio del TSHR podrían recibir ayuda de los linfocitos T autorreactivos específicos del largo fragmento C terminal del receptor (regiones bisagra y transmembrana) que habrían escapado de timo lo que conduciría a la síntesis y secreción del TRAb (Figura 12).

Hasta la fecha la gran mayoría de los estudios que han investigado los epítomos T del TSHR en la EG han examinado solo la secuencia del dominio extracelular del holorreceptor (ECD)²⁵³⁻²⁵⁶, al considerarla la más inmunogénica. Por lo tanto carecemos de datos sobre la inmunogenicidad del fragmento C terminal del receptor que podría estar jugando un papel importante en el proceso cooperación T-B en periferia. Este concepto podría explicar el fallo de los intentos para inducir tolerancia terapéutica. De hecho, el primer ensayo de inmunoterapia antígeno-específica para la EG en humanos utiliza una combinación de dos péptidos (apitopos) previamente descritos en modelos murinos de la enfermedad como epítomos T inmunodominantes ambos en el ECD del TSHR^{257,258}, pero no péptidos del fragmento C-terminal. Considerando que la EG es uno de los trastornos autoinmunes más comunes y que ninguna de las opciones de tratamiento actuales son ideales, la inmunoterapia es una aproximación muy atractiva ya que, a diferencia de la DM1, si se consigue restaurar la tolerancia al TSHR es probable que la función endocrina tiroidea subyacente permanezca intacta durante muchos años, lo que significa que los pacientes tienen el potencial de una cura efectiva a largo plazo. Sin embargo, la fase I de este primer ensayo, aunque obtiene resultados prometedores con una disminución de los niveles de triyodotironina libre (fT3) en 7 de los 10 pacientes tratados, no ha alcanzado los resultados deseados ya que solo en cinco se normalizaban los niveles de fT3 al finalizar las 18 semanas de tratamiento²⁵⁷.

En este trabajo proponemos que un mecanismo crucial que explica la fragilidad de la tolerancia al TSHR es la falta de presentación de la molécula del TSHR de longitud completa por APC tolerogénicas en la médula tímica. Existen pocos trabajos del papel de los macrófagos como APC en el timo y, aunque se atribuye un mayor papel a las DCs se conoce poco sobre de los mecanismos de presentación de antígenos "ubicuos", solubles en el timo o fruto de la fagocitosis de los propios timocitos. Este escenario se complica si tenemos en cuenta los nuevos datos de transcriptómica que detectan

niveles de TSHR en los linfocitos B tímicos capaces de contribuir a la selección negativa de linfocitos T CD4^{45,47}. Además, aunque existe aun muy poco conocimiento de este mecanismo de presentación en humanos, la presencia del TSHR en los propios timocitos abre otra interesante posibilidad que es la presentación directa timocito-timocito.

Las diferencias en el grado de inmunogenicidad de las isoformas del TSHR vs la forma completa del receptor es algo que nos ha quedado pendiente de estudiar en esta tesis. De hecho, aunque nos quedan numerosas cuestiones abiertas, sería fundamental realizar un estudio más profundo de la expresión de estas isoformas *in vivo*. Posteriormente sería interesante analizar el ligandoma tímico buscando la presencia de péptidos específicos de la forma completa del receptor y de sus isoformas o bien diseñar un panel de tetrámeros que nos permitiera determinar la especificidad del epítipo de las células T autorreactivas frente al TSHR en los pacientes de EG.

Cuestiones abiertas

1. ¿Qué epítomos del TSHR/ isoformas reconocen los TCR de linfocitos T (CD4+ th1/th2 y Treg) de los pacientes con EG vs controles?
2. ¿Qué función tiene el TSHR en los timocitos? ¿Se confirma el papel de esta expresión en el mecanismo iterativo de interacción de los timocitos inmaduros con los TSAbs que conducen a la maduración de la afinidad y selección de anticuerpos activadores del TSHR (en pacientes de EG)?
3. ¿Cuáles son los mecanismos moleculares por los que SNPs del intrón 1 del *TSHR* están influyendo en la expresión del *TSHR*? ¿Es el PLZF el factor que controla la transcripción del *TSHR* en el timo? ¿Intervienen los lncRNA?
4. ¿Se traducen los transcritos cortos del TSHR en proteínas estables? ¿Son las isoformas ST4 y ST5 secretadas por los tirocitos o los timocitos?
5. Si las isoformas son capaces de competir por la TSH (o por los TRAbs) en el tiroides ¿Qué consecuencias tiene para la función de la TSH en tiroides? ¿Pueden tener un papel de protección frente a TSAbs (por competición con fTSHR)?
6. ¿Pueden las isoformas causar interferencias en la detección de TRAbs? (Si no se encuentran en suero... no es probable)
7. ¿Cuáles son las vías de presentación del TSHR y sus isoformas en el timo? ¿Puede esto explicar la elevada frecuencia con la que se pierde la tolerancia a esta molécula en la población general?
8. ¿Qué está ocurriendo en la periferia (tiroides y/o ganglio) de controles vs EG o genéticamente susceptibles a EG? ¿Se están presentando las isoformas solubles o la holoforma? ¿Difieren las vías de presentación en tiroides y ganglio en la inducción de tolerancia periférica vs activación en función de si se presenta la forma soluble vs la unida a membrana? ¿Qué APCs presentan qué en el tiroides/ ganglio?

CONCLUSIONES

Conclusiones tras el abordaje de los objetivos bibliográficos

- El *TSHR* sigue siendo el único gen descrito que predispone específicamente a EG y no a HT. Numerosos estudios (más de 15 hasta 2015) ratifican la asociación genética de los SNP del intrón 1 del *TSHR* con el riesgo de padecer EG en poblaciones caucásica y asiática.
- La expresión del *TSHR* en los timocitos ha sido documentada por muy pocos grupos, pero parece claro que los timocitos son las células que más contribuyen a la expresión del *TSHR* en el timo. Experimentos *in vitro* demuestran que el *TSHR* en los timocitos es funcional y, parece actuar como un factor que acelera su maduración.
- La hipótesis de un fallo en la tolerancia periférica propuesta por Brand et al, aunque en parte avalada por los modelos animales, no había sido (hasta ahora), comprobada por otros grupos, ni tampoco se ha descubierto el mecanismo por el que los SNP pueden modular el proceso de *splicing*. Por otro lado nuestra hipótesis de un fallo parcial en la tolerancia central al *TSHR* ha sido confirmada y ampliada por Tomer et al, que demostraron que uno de los SNP de esta región de 40 Kb del intrón 1 forma parte de un lugar de unión al factor represor de la transcripción PLZF, regulado por IFN- α .
- Solo en el caso de la artritis reumatoide en la población asiática se confirma la asociación de los polimorfismos de *AIRE* con la enfermedad. Tampoco se ha encontrado una contribución concluyente de las mutaciones monoalélicas de *AIRE* en la etiología en la enfermedad de Addison y el hipoparatiroidismo.

Conclusiones tras el abordaje de los objetivos experimentales

- No existe una asociación significativa de los polimorfismos comunes de *AIRE* con la EG.
- Los SNP del intrón 1 del *TSHR* asociados a un mayor riesgo a padecer EG (rs179247 y rs12101255) no afectan al *splicing* alternativo (que genera las isoformas ST4 y ST5) ni en tiroides ni en timo.
- El SNP rs179247 del intrón 1 del *TSHR* asociado a un mayor riesgo a padecer EG, influye en los niveles de expresión de *TSHR* tímico. La secuenciación masiva demuestra definitivamente la transcripción preferente del alelo protector del SNP

rs179247 en el timo y confirma que este efecto es tejido-específico (ya que se observa en timo pero no en tiroides).

- La isoforma ST4 se expresa a niveles equivalentes a la forma completa del receptor tanto en timo como en tiroides, mientras que la expresión de ST5 es significativamente menor.
- La expresión relativamente alta tanto de la flTSHR como de su variante de ST4 en el timo pueden tener implicaciones para el establecimiento de la tolerancia central TSHR.

Propuesta

- La falta de presentación de la molécula de TSHR de longitud completa por APC tolerogénicas en la médula tímica puede ser un mecanismo que explique el fallo de la tolerancia central al TSHR.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mujal, A. M. & Krummel, M. F. Immunity as a continuum of archetypes. *Science* (80-.). **364**, 28–29 (2019).
2. Takaba, H. & Takayanagi, H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol.* **38**, 1–12 (2017).
3. Klein, L., Robey, E. A. & Hsieh, C. S. Central CD4+ T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 7–18 (2019).
4. Daniels, M. A. *et al.* Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* **444**, 724–9 (2006).
5. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–64 (2012).
6. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833–844 (2009).
7. Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 377–391 (2014).
8. Singer, A., Adoro, S. & Park, J.-H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4/CD8 lineage choice NIH Public Access. *Nat Rev Immunol* **8**, 788–801 (2008).
9. Pobeziński, L. A. *et al.* Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat Immunol* **13**, 569–578 (2012).
10. Murata, S. *et al.* Regulation of CD8 + T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* (80-.). **316**, 1349–1353 (2007).
11. Nakagawa, T. *et al.* Cathepsin L: Critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* (80-.). **280**, 450–453 (1998).
12. Kasai, M. *et al.* Difference in antigen presentation pathways between cortical and medullary thymic epithelial cells. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2101–2107 (1996).
13. Klein, L., Roettinger, B. & Kyewski, B. Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2476–86 (2001).
14. Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N. & Klein, L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* **455**, 396–400 (2008).
15. Nedjic, J., Aichinger, M., Mizushima, N. & Klein, L. Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr. Opin. Immunol.* **21**, 92–97 (2009).
16. McCaughy, T. M., Baldwin, T. A., Wilken, M. S. & Hogquist, K. A. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J. Exp. Med.* **205**, 2575–84 (2008).
17. Koble, C. & Kyewski, B. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J. Exp. Med.* **206**, 1505–13 (2009).
18. Cosway, E. J. *et al.* Redefining thymus medulla specialization for central tolerance. *J. Exp. Med.* **214**, 3183–3195 (2017).
19. Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. & Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *J. Immunol.* **196**, 2915–2922 (2016).
20. Sansom, S. N. *et al.* Population and single-cell genomics reveal the Aire dependency, relief from Polycomb silencing, and distribution of self-antigen expression in thymic epithelia. *Genome Res.* **24**, 1918–1931 (2014).
21. Danan-Gotthold, M., Guyon, C., Giraud, M., Levanon, E. Y. & Abramson, J. Extensive RNA editing and splicing increase immune self-representation diversity in medullary thymic epithelial cells. *Genome Biol.* **17**, 1–13 (2016).
22. Abramson, J. & Anderson, G. Thymic Epithelial Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 85–118 (2017).

23. Smith, K. M., Olson, D. C., Hirose, R. & Hanahan, D. Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int. Immunol.* **9**, 1355–65 (1997).
24. Fan, Y. *et al.* Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *EMBO J.* **28**, 2812–2824 (2009).
25. DeVoss, J. *et al.* Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J. Exp. Med.* **203**, 2727–2735 (2006).
26. Nagamine, K. *et al.* Positional cloning of the APECED gene. *Nat. Genet.* **17**, 393–8 (1997).
27. Aaltonen, J. *et al.* An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat. Genet.* **17**, 399–403 (1997).
28. Takaba, H. *et al.* Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance. *Cell* **163**, 975–987 (2015).
29. Passos, G. A., Speck-Hernandez, C. A., Assis, A. F. & Mendes-da-Cruz, D. A. Update on Aire and thymic negative selection. *Immunology* **153**, 10–20 (2018).
30. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395–401 (2002).
31. Bruslerud, Ø., Oftedal, B. E., Wolff, A. B. & Husebye, E. S. AIRE-mutations and autoimmune disease. *Curr. Opin. Immunol.* **43**, 8–15 (2016).
32. Klein, L., Hinterberger, M., von Rohrscheidt, J. & Aichinger, M. Autonomous versus dendritic cell-dependent contributions of medullary thymic epithelial cells to central tolerance. *Trends Immunol.* **32**, 188–193 (2011).
33. Gallegos, A. M. & Bevan, M. J. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med.* **200**, 1039–49 (2004).
34. Oukka, M., Cohen-Tannoudji, M., Tanaka, Y., Babinet, C. & Kosmatopoulos, K. Medullary thymic epithelial cells induce tolerance to intracellular proteins. *J. Immunol.* **156**, 968–75 (1996).
35. Hinterberger, M. *et al.* Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4+T cell tolerance. *Nat. Immunol.* **11**, 512–519 (2010).
36. Klein, L., Klein, T., Rütter, U. & Kyewski, B. CD4 T Cell Tolerance to Human C-reactive Protein, an Inducible Serum Protein, Is Mediated by Medullary Thymic Epithelium. *J. Exp. Med.* **188**, 5–16 (1998).
37. Oukka, M. *et al.* CD4 T cell tolerance to nuclear proteins induced by medullary thymic epithelium. *Immunity* **4**, 545–53 (1996).
38. Atibalentja, D. F., Byersdorfer, C. A. & Unanue, E. R. Thymus-Blood Protein Interactions Are Highly Effective in Negative Selection and Regulatory T Cell Induction. *J. Immunol.* **183**, 7909–7918 (2009).
39. Tewari, M. K., Sinnathamby, G., Rajagopal, D. & Eisenlohr, L. C. A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat. Immunol.* **6**, 287–294 (2005).
40. Aichinger, M., Wu, C., Nedjic, J. & Klein, L. Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance. *J. Exp. Med.* **210**, 287–300 (2013).
41. Dongre, A. R. R. *et al.* In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. **31**, (2001).
42. Hadeiba, H. *et al.* Plasmacytoid Dendritic Cells Transport Peripheral Antigens to the Thymus to Promote Central Tolerance. *Immunity* (2012). doi:10.1016/j.immuni.2012.01.017
43. Lopes, N., Sergé, A., Ferrier, P. & Irla, M. Thymic Crosstalk Coordinates Medulla Organization and T-Cell Tolerance Induction. *Front. Immunol.* **6**, 365 (2015).
44. Perera, J., Meng, L., Meng, F. & Huang, H. Autoreactive thymic B cells are efficient antigen-presenting cells of cognate self-antigens for T cell negative selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 17011–17016 (2013).
45. Yamano, T. *et al.* Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction. *Immunity* **42**, 1048–1061 (2015).

46. Cepeda, S. *et al.* Age-Associated Decline in Thymic B Cell Expression of Aire and Aire-Dependent Self-Antigens. *Cell Rep.* **22**, 1276–1287 (2018).
47. Yamano, T., Steinert, M. & Klein, L. Thymic B Cells and Central T Cell Tolerance. *Front. Immunol.* **6**, 376 (2015).
48. Kleindienst, P., Chretien, I., Winkler, T. & Brocker, T. Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo. *Blood* **95**, 2610–6 (2000).
49. Frommer, F. & Waisman, A. B Cells Participate in Thymic Negative Selection of Murine Auto-reactive CD4+ T Cells. *PLoS One* **5**, e15372 (2010).
50. Fujihara, C. *et al.* T Cell–B Cell Thymic Cross-Talk: Maintenance and Function of Thymic B Cells Requires Cognate CD40–CD40 Ligand Interaction. *J. Immunol.* **193**, 5534–5544 (2014).
51. Volkman, A., Zal, T. & Stockinger, B. Antigen-presenting cells in the thymus that can negatively select MHC class II-restricted T cells recognizing a circulating self antigen. *J. Immunol.* **158**, 693–706 (1997).
52. Guerri, L. *et al.* Analysis of APC types involved in CD4 tolerance and regulatory T cell generation using reaggregated thymic organ cultures. *J. Immunol.* **190**, 2102–10 (2013).
53. Szondy, Z., Garabuczi, É., Tóth, K., Kiss, B. & Köröskényi, K. Thymocyte death by neglect: Contribution of engulfing macrophages. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1662–1667 (2012).
54. Hogquist, K. A. & Jameson, S. C. The self-obsession of T cells: how TCR signaling thresholds affect fate ‘decisions’ and effector function. *Nat. Immunol.* **15**, 815–23 (2014).
55. Walters, S. N., Webster, K. E., Daley, S. & Grey, S. T. A role for intrathymic B cells in the generation of natural regulatory T cells. *J. Immunol.* **193**, 170–6 (2014).
56. Cheng, M. H. & Anderson, M. S. Monogenic autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 393–427 (2012).
57. Goodnow, C. C. Multistep Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Cell* **130**, 25–35 (2007).
58. Lv, H. J. *et al.* Impaired thymic tolerance to α -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 1561–73 (2011).
59. Giraud, M. *et al.* An IRF8-binding promoter variant and AIRE control CHRNA1 promiscuous expression in thymus. *Nature* **448**, 934–937 (2007).
60. Pugliese, A. *et al.* The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat. Genet.* **15**, 293–7 (1997).
61. Vafiadis, P. *et al.* Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDD2 locus. *Nat. Genet.* **15**, 289–92 (1997).
62. Klein, L., Klugmann, M., Nave, K.-A., Tuohy, V. K. & Kyewski, B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* **6**, 56–61 (2000).
63. Diez, J. *et al.* Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen. *Diabetes* **50**, 895–900 (2001).
64. de Jong, V. M. *et al.* Alternative splicing and differential expression of the islet autoantigen IGRP between pancreas and thymus contributes to immunogenicity of pancreatic islets but not diabetogenicity in humans. *Diabetologia* **56**, 2651–2658 (2013).
65. Pinto, S. *et al.* Misinitiation of intrathymic *MART-1* transcription and biased TCR usage explain the high frequency of MART-1-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* **44**, 2811–2821 (2014).
66. Scally, S. W. *et al.* A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **210**, 2569–2582 (2013).
67. Lummel, M. van *et al.* Posttranslational Modification of HLA-DQ Binding Islet Autoantigens in Type 1 Diabetes. *Diabetes* **63**, 237–247 (2014).
68. Lummel, M. van *et al.* Epitope Stealing as a Mechanism of Dominant Protection by HLA-DQ6 in Type 1 Diabetes. *Diabetes* **68**, 787–795 (2019).

69. McLeod, D. S. A. & Cooper, D. S. The incidence and prevalence of thyroid autoimmunity. *Endocrine* **42**, 252–265 (2012).
70. Tomer, Y. Mechanisms of autoimmune thyroid diseases: from genetics to epigenetics. *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 147–56 (2014).
71. Weetman, A. P. Autoimmune Thyroid Disease. *Autoimmunity* **37**, 337–340 (2004).
72. Smith, T. J. & Hegedüs, L. Graves' Disease. *N. Engl. J. Med.* **375**, 1552–1565 (2016).
73. Stagnaro-Green, A. Postpartum Thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 4042–4047 (2002).
74. Fröhlich, E. & Wahl, R. Thyroid autoimmunity: Role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
75. McLachlan, S. M. & Rapoport, B. Breaking tolerance to thyroid antigens: changing concepts in thyroid autoimmunity. *Endocr. Rev.* **35**, 59–105 (2014).
76. Graves, R. J. Newly observed affection of the thyroid gland in females. *Clin. Lect. London Med. Surg. J.* **7**, 516–517 (1835).
77. von Basedow, C. A. Exophthalmos durch Hypertrophic des Zellgewebes in der Auhenhöhle. *Wochenschr Heilk* 197–220 (1840).
78. Adams, D. & Purves, H. Abnormal responses in the assay of thyrotropins. *Proc Univ Otago Med Sch* 11–12 (1956).
79. Adams, D. Pathogenesis of the hyperthyroidism of Graves' disease. *BrMedJ* **1**, 1015–9 (1965).
80. Meek, J. C., Eric Jones, A., Lewis, U. J. & Vanderlaan, W. P. Characterization Of The Long-Acting Thyroid Stimulator Of Graves' Disease. *Biochemistry* **52**, 342–349 (1964).
81. Kriss, J. P., Pleshakov, V. & Chien, J. R. Isolation and identification of the Long-Acting Thyroid Stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 1005–28 (1964).
82. Pastan, I., Roth, J. & Macchia, V. Binding Of Hormone To Tissue: The First Step In Polypeptide Hormone Action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **56**, 1802 (1966).
83. Adams, D. D. *et al.* Stimulation of the Human Thyroid by Infusions of Plasma Containing LATS Protector. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **39**, 826–832 (1974).
84. McKencie, J. M. & Zakarija, M. Fetal and Neonatal Hyperthyroidism and Hypothyroidism due to Maternal TSH Receptor Antibodies. *Thyroid* **2**, 155–159 (1992).
85. Menconi, F., Marcocci, C. & Marinò, M. Diagnosis and classification of Graves' disease. *Autoimmun. Rev.* **13**, 398–402 (2014).
86. Pujol-Borrell, R., Hanafusa, T., Chiovato, L. & Bottazzo, G. F. Lectin-induced expression of DR antigen on human cultured follicular thyroid cells. *Nature* **304**, 71–73 (1983).
87. Rapoport, B., Chazenbalk, G. D., Jaume, J. C. & McLachlan, S. M. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr. Rev.* **19**, 673–716 (1998).
88. McLachlan, S. M. & Rapoport, B. Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa. *Thyroid* **23**, 14–24 (2013).
89. Ngo, S. T., Steyn, F. J. & McCombe, P. A. Gender differences in autoimmune disease. *Front. Neuroendocrinol.* **35**, 347–369 (2014).
90. Brix, T. H. *et al.* High Frequency of Skewed X-Chromosome Inactivation in Females with Autoimmune Thyroid Disease: A Possible Explanation for the Female Predisposition to Thyroid Autoimmunity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 5949–5953 (2005).
91. Invernizzi, P. *et al.* X chromosome monosomy: a common mechanism for autoimmune diseases. *J. Immunol.* **175**, 575–8 (2005).
92. Simmonds, M. J. *et al.* Skewed X Chromosome Inactivation and Female Preponderance in Autoimmune Thyroid Disease: An Association Study and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E127–E131 (2014).
93. Jansson, R. *et al.* The postpartum period constitutes an important risk for the development of clinical Graves' disease in young women. *Acta Endocrinol. (Copenh).*

- 116**, 321–325 (1987).
94. Weetman, A. P. Immunity, thyroid function and pregnancy: Molecular mechanisms. *Nat. Rev. Endocrinol.* **6**, 311–318 (2010).
 95. Ando, T., Imaizumi, M., Graves, P. N., Unger, P. & Davies, T. F. Intrathyroidal Fetal Microchimerism in Graves' Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 3315–3320 (2002).
 96. Klintschar, M., Schwaiger, P., Mannweiler, S., Regauer, S. & Kleiber, M. Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 2494–8 (2001).
 97. Galofré, J. C. Microchimerism in graves' disease. *J. Thyroid Res.* **2012**, 724382 (2012).
 98. Effraimidis, G. & Wiersinga, W. M. Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur. J. Endocrinol.* **170**, R241–52 (2014).
 99. Prummel, M. F. & Wiersinga, W. M. Smoking and risk of Graves' disease. *JAMA* **269**, 479–82 (1993).
 100. Holm, I. A. *et al.* Smoking and other lifestyle factors and the risk of graves' hyperthyroidism. *Arch. Intern. Med.* **165**, 1606–1611 (2005).
 101. Tanda, M. L. *et al.* Thyroid autoimmunity and environment. *Horm. Metab. Res.* **41**, 436–442 (2009).
 102. Bogazzi, F., Tomisti, L., Bartalena, L., Aghini-Lombardi, F. & Martino, E. Amiodarone and the thyroid: A 2012 update. *J. Endocrinol. Invest.* **35**, 340–348 (2012).
 103. Bartalena, L. Diagnosis and management of Graves disease: a global overview. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 724–34 (2013).
 104. Weetman, A. Immune reconstitution syndrome and the thyroid. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **23**, 693–702 (2009).
 105. Coles, A. J. *et al.* Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet* **354**, 1691–1695 (1999).
 106. Lorenzi, A. R. *et al.* Morbidity and mortality in rheumatoid arthritis patients with prolonged therapy-induced lymphopenia: Twelve-year outcomes. *Arthritis Rheum.* **58**, 370–375 (2008).
 107. Mizokami, T., Wu Li, A., El-Kaissi, S. & Wall, J. R. Stress and Thyroid Autoimmunity. *Thyroid* **14**, 1047–1055 (2004).
 108. Wang, Z. *et al.* Identification of outer membrane porin F protein of *Yersinia enterocolitica* recognized by antithyrotropin receptor antibodies in Graves' disease and determination of its epitope using mass spectrometry and bioinformatics tools. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 4012–4020 (2010).
 109. Benvenga, S., Guarneri, F., Vaccaro, M., Santarpia, L. & Trimarchi, F. Homologies between proteins of *Borrelia burgdorferi* and thyroid autoantigens. *Thyroid* **14**, 964–966 (2004).
 110. Hargreaves, C. E. *et al.* *Yersinia enterocolitica* provides the link between thyroid-stimulating antibodies and their germline counterparts in Graves' disease. *J. Immunol.* **190**, 5373–81 (2013).
 111. Brix, T. H., Hansen, P. S., Hegedüs, L. & Wenzel, B. E. Too early to dismiss *Yersinia enterocolitica* infection in the aetiology of Graves' disease: Evidence from a twin case-control study. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **69**, 491–496 (2008).
 112. Effraimidis, G., Tijssen, J. G. P., Strieder, T. G. A. & Wiersinga, W. M. No causal relationship between *Yersinia enterocolitica* infection and autoimmune thyroid disease: evidence from a prospective study. *Clin. Exp. Immunol.* **165**, 38–43 (2011).
 113. Tomer, Y. & Huber, A. The etiology of autoimmune thyroid disease: A story of genes and environment. *J. Autoimmun.* **32**, 231–239 (2009).
 114. Brix, T. H., Kyvik, K. O., Christensen, K. & Hegedüs, L. Evidence for a Major Role of Heredity in Graves' Disease: A Population-Based Study of Two Danish Twin Cohorts ¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 930–934 (2001).
 115. Grumet, F. C., Payne, R. O., Konishi, J. & Kriss, J. P. HL-A antigens as markers for disease susceptibility and autoimmunity in Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **39**, 1115–9 (1974).
 116. Chen, Q. Y. *et al.* HLA-DRB1*08, DRB1*03/DRB3*0101, and DRB3*0202 are

- susceptibility genes for Graves' disease in North American Caucasians, whereas DRB1*07 is protective. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 3182–6 (1999).
117. Simmonds, M. J. *et al.* Regression mapping of association between the human leukocyte antigen region and Graves disease. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 157–163 (2005).
 118. Yanagawa, T., Hidaka, Y., Guimaraes, V., Soliman, M. & DeGroot, L. J. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 41–5 (1995).
 119. Ni, J. *et al.* CTLA-4 CT60 (rs3087243) polymorphism and autoimmune thyroid diseases susceptibility: A comprehensive meta-analysis. *Endocr. Res.* **39**, 180–188 (2014).
 120. Wang, J. *et al.* Common variants on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 polymorphisms contributes to type 1 diabetes susceptibility: evidence based on 58 studies. *PLoS One* **9**, e85982 (2014).
 121. Chung, S. A. *et al.* Meta-analysis of genetic polymorphisms in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) reveals shared susceptibility loci with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 3463–71 (2012).
 122. Liu, J. & Zhang, H.-X. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a comprehensive meta-analysis. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **17**, 226–31 (2013).
 123. Ueda, H. *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* **423**, 506–511 (2003).
 124. Oaks, M. K. & Hallett, K. M. Cutting edge: a soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *J. Immunol.* **164**, 5015–8 (2000).
 125. Bottini, N. *et al.* A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat. Genet.* **36**, 337–338 (2004).
 126. Wang, Y. *et al.* The autoimmunity-associated gene PTPN22 potentiates toll-like receptor-driven, type 1 interferon-dependent immunity. *Immunity* **39**, 111–22 (2013).
 127. Vang, T., Miletic, A. V., Bottini, N. & Mustelin, T. Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. *Autoimmunity* **40**, 453–61 (2007).
 128. Stanford, S. M., Mustelin, T. M. & Bottini, N. Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases. *Semin. Immunopathol.* **32**, 127–36 (2010).
 129. Tomer, Y. *et al.* Common and unique susceptibility loci in Graves and Hashimoto diseases: results of whole-genome screening in a data set of 102 multiplex families. *Am. J. Hum. Genet.* **73**, 736–47 (2003).
 130. Ban, Y. *et al.* Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15119–24 (2003).
 131. Skrabanek, L. *et al.* Multiple SNPs in Intron 41 of Thyroglobulin Gene Are Associated with Autoimmune Thyroid Disease in the Japanese Population. *PLoS One* **7**, e37501 (2012).
 132. Hodge, S. E. *et al.* Possible interaction between HLA-DR β 1 and thyroglobulin variants in Graves' disease. *Thyroid* **16**, 351–355 (2006).
 133. Stefan, M. *et al.* Novel variant of thyroglobulin promoter triggers thyroid autoimmunity through an epigenetic interferon α -modulated mechanism. *J. Biol. Chem.* **286**, 31168–31179 (2011).
 134. Zhao, S.-X. *et al.* Robust evidence for five new Graves' disease risk loci from a staged genome-wide association analysis. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3347–62 (2013).
 135. Tomer, Y., Barbesino, G., Keddache, M., Greenberg, D. A. & Davies, T. F. Mapping of a Major Susceptibility Locus for Graves' Disease (GD-1) to Chromosome 14q31. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 1645–1648 (1997).
 136. Tomer, Y., Barbesino, G., Greenberg, D. A., Concepcion, E. & Davies, T. F. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease. III. Detailed analysis of chromosome 14 localizes Graves' disease-1 (GD-1) close to multinodular goiter-1 (MNG-1). International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 4321–7 (1998).
 137. Dechairo, B. M. *et al.* Association of the TSHR gene with Graves' disease: the first

- disease specific locus. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 1223–30 (2005).
138. Morshed, S. A., Latif, R. & Davies, T. F. Delineating the autoimmune mechanisms in Graves' disease. *Immunol. Res.* **54**, 191–203 (2012).
 139. Zha, B. *et al.* Distribution of Lymphocyte Subpopulations in Thyroid Glands of Human Autoimmune Thyroid Disease. *J. Clin. Lab. Anal.* **28**, 249–254 (2014).
 140. Rapoport, B. & McLachlan, S. M. Graves' hyperthyroidism is antibody-mediated but is predominantly a Th1-type cytokine disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 4060–4061 (2014).
 141. Davies, T. F. *et al.* Evidence of Limited Variability of Antigen Receptors on Intrathyroidal T Cells in Autoimmune Thyroid Disease. *N. Engl. J. Med.* **325**, 238–244 (1991).
 142. Heufelder, A. E., Wenzel, B. E. & Scriba, P. C. Antigen receptor variable region repertoires expressed by T cells infiltrating thyroid, retroorbital, and pretibial tissue in Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 3733–3739 (1996).
 143. Paschke, R. *et al.* Regional stimulation of thyroid epithelial cells in Graves' disease by lymphocytic aggregates and plasma cells. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **125**, 459–465 (1991).
 144. Paschke, R., Bruckner, N., Schmeidl, R., Pfiester, P. & Usadel, K. H. Predominant intraepithelial localization of primed T cells and immunoglobulin-producing lymphocytes in Graves' disease. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **124**, 630–6 (1991).
 145. McLachlan, S. M. *et al.* TSH receptor antibody synthesis by thyroid lymphocytes. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **24**, 223–230 (1986).
 146. Wardemann, H. *et al.* Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science (80-.)* **301**, 1374–1377 (2003).
 147. Taylor, J. J. *et al.* Deletion and anergy of polyclonal B cells specific for ubiquitous membrane-bound self-antigen. *J. Exp. Med.* **209**, 2065–2077 (2012).
 148. Hanafusa, T. *et al.* Aberrant Expression of Hla-Dr Antigen on Thyrocytes in Graves' Disease: Relevance for Autoimmunity. *Lancet* **322**, 1111–1115 (1983).
 149. Bottazzo, G. F., Pujol-Borrell, R., Hanafusa, T. & Felmann, M. Role of Aberrant HLA-DR Expression and Antigen Presentation in Induction of Endocrine Autoimmunity. *Lancet* **322**, 1115–1119 (1983).
 150. Shimojo, N. *et al.* Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11074–9 (1996).
 151. Tolosa, E., Roura, C., Martí, M., Belfiore, A. & Pujol-Borrell, R. Induction of intercellular adhesion molecule-1 but not of lymphocyte function-associated antigen-3 in thyroid follicular cells. *J. Autoimmun.* **5**, 119–35 (1992).
 152. Faure, G. C., Bensoussan-Lejzerowicz, D., Bene, M. C., Aubert, V. & Leclere, J. Coexpression of CD40 and class II antigen HLA-DR in Graves' disease thyroid epithelial cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* (1997). doi:10.1006/clin.1997.4391
 153. Ruiz-Riol, M. *et al.* Analysis of the cumulative changes in Graves' disease thyroid glands points to IFN signature, plasmacytoid DCs and alternatively activated macrophages as chronicity determining factors. *J. Autoimmun.* **36**, 189–200 (2011).
 154. Kita-Furuyama, M. *et al.* Dendritic cells infected with adenovirus expressing the thyrotrophin receptor induce Graves' hyperthyroidism in BALB/c mice. *Clin. Exp. Immunol.* **131**, 234–40 (2003).
 155. Kabel, P. J., Voorbij, H. A. M., De Haan, M., Van Der Gaag, R. D. & Drexhage, H. A. Intrathyroidal dendritic cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **66**, 199–207 (1988).
 156. Costagliola, S. *et al.* Second Generation Assay for Thyrotropin Receptor Antibodies Has Superior Diagnostic Sensitivity for Graves' Disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 90–97 (1999).
 157. Zöphel, K., Roggenbuck, D. & Schott, M. Clinical review about TRAb assay's history. *Autoimmun. Rev.* **9**, 695–700 (2010).
 158. Latif, R., Morshed, S. A., Zaidi, M. & Davies, T. F. The Thyroid-Stimulating Hormone Receptor: Impact of Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone

- Receptor Antibodies on Multimerization, Cleavage, and Signaling. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **38**, 319–341 (2009).
159. Sanders, J. *et al.* Human monoclonal thyroid stimulating autoantibody. *Lancet (London, England)* **362**, 126–8 (2003).
160. Ando, T. *et al.* A monoclonal thyroid-stimulating antibody. *J. Clin. Invest.* **110**, 1667–1674 (2002).
161. Furmaniak, J., Sanders, J., Núñez Miguel, R. & Rees Smith, B. Mechanisms of Action of TSHR Autoantibodies. *Horm. Metab. Res.* **47**, 735–752 (2015).
162. Weetman, A. P. *et al.* Thyroid-stimulating antibody activity between different immunoglobulin G subclasses. *J. Clin. Invest.* **86**, 723–727 (1990).
163. Diana, T. *et al.* Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clin. Exp. Immunol.* **189**, 304–309 (2017).
164. Tonacchera, M. *et al.* Patient with monoclonal gammopathy, thyrotoxicosis, pretibial myxedema and thyroid-associated ophthalmopathy; demonstration of direct binding of autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Eur. J. Endocrinol.* **134**, 97–103 (1996).
165. Morshed, S. A., Ando, T., Latif, R. & Davies, T. F. Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades. *Endocrinology* **151**, 5537–49 (2010).
166. Sun, S. *et al.* Antigenic “Hot-Spots” on the TSH Receptor Hinge Region. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **9**, 765 (2019).
167. Ando, T., Latif, R., Daniel, S., Eguchi, K. & Davies, T. F. Dissecting linear and conformational epitopes on the native thyrotropin receptor. *Endocrinology* **145**, 5185–5193 (2004).
168. Oda, Y. *et al.* Epitope Analysis of the Human Thyrotropin (TSH) Receptor Using Monoclonal Antibodies. *Thyroid* **10**, 1051–1059 (2009).
169. McLachlan, S. M., Nagayama, Y. & Rapoport, B. Insight into Graves' hyperthyroidism from animal models. *Endocr. Rev.* **26**, 800–832 (2005).
170. Luo, Y., Yoshihara, A., Oda, K., Ishido, Y. & Suzuki, K. Excessive Cytosolic DNA Fragments as a Potential Trigger of Graves' Disease: An Encrypted Message Sent by Animal Models. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, 144 (2016).
171. McLachlan, S. M. & Rapoport, B. A transgenic mouse that spontaneously develops pathogenic TSH receptor antibodies will facilitate study of antigen-specific immunotherapy for human Graves' disease. *Endocrine* (2019). doi:10.1007/s12020-019-02083-9
172. Kikuoka, S. *et al.* The Formation of Thyrotropin Receptor (TSHR) Antibodies in a Graves' Animal Model Requires the N-Terminal Segment of the TSHR Extracellular Domain. *Endocrinology* **139**, 1891–1898 (1998).
173. Chazenbalk, G. D. *et al.* Thyroid-stimulating autoantibodies in Graves disease preferentially recognize the free A subunit, not the thyrotropin holoreceptor. *J. Clin. Invest.* **110**, 209–217 (2002).
174. Kleinau, G. *et al.* Structural–Functional Features of the Thyrotropin Receptor: A Class A G-Protein-Coupled Receptor at Work. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, 86 (2017).
175. Davies, T. F., Ando, T., Lin, R. Y., Tomer, Y. & Latif, R. Thyrotropin receptor-associated diseases: From adenomata to Graves disease. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 1972–1983 (2005).
176. Colicchia, M. *et al.* Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. *Hum. Reprod. Update* **20**, 884–904 (2014).
177. Williams, G. R. Extrathyroidal expression of TSH receptor. *Ann. Endocrinol. (Paris)*. **72**, 68–73 (2011).
178. Vizek, K., Rázová, M. & Melichar, V. Lipolytic effect of TSH, glucagon and hydrocortisone on the adipose tissue of newborns and adults in vitro. *Physiol. Bohemoslov.* **28**, 325–31 (1979).
179. Abe, E. *et al.* TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell* **115**, 151–162 (2003).

180. Zhang, W. *et al.* Presence of thyrotropin receptor in hepatocytes: Not a case of illegitimate transcription. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 4636–4642 (2009).
181. Song, Y. *et al.* Thyroid-Stimulating Hormone Increases HNF-4 α Phosphorylation via cAMP/PKA Pathway in the Liver. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
182. Yang, C. *et al.* Thyrotropin aggravates atherosclerosis by promoting macrophage inflammation in plaques. *J. Exp. Med.* jem.20181473 (2019). doi:10.1084/jem.20181473
183. Iyer, S. & Bahn, R. Immunopathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of the TSH receptor. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 281–9 (2012).
184. Smith, T. J. & Janssen, J. A. M. J. L. Building the Case for Insulin-Like Growth Factor Receptor-I Involvement in Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, 167 (2017).
185. Kreuchwig, A., Kleinau, G., Kreuchwig, F., Worth, C. L. & Krause, G. Research resource: Update and extension of a glycoprotein hormone receptors web application. *Mol. Endocrinol.* **25**, 707–712 (2011).
186. Jeffreys, J. *et al.* Characterization of the thyrotropin binding pocket. *Thyroid* **12**, 1051–61 (2002).
187. Mueller, S., Kleinau, G., Jaeschke, H., Paschke, R. & Krause, G. Extended hormone binding site of the human thyroid stimulating hormone receptor: Distinctive acidic residues in the hinge region are involved in bovine thyroid stimulating hormone binding and receptor activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 18048–18055 (2008).
188. Costagliola, S. *et al.* Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J.* **21**, 504–13 (2002).
189. Ząbczyńska, M., Kozłowska, K. & Pocheć, E. Glycosylation in the Thyroid Gland: Vital Aspects of Glycoprotein Function in Thyrocyte Physiology and Thyroid Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
190. Chazenbalk, G. D. *et al.* Evidence That the Thyrotropin Receptor Ectodomain Contains Not One, But Two, Cleavage Sites. *Endocrinology* **138**, 2893–2899 (1997).
191. Rapoport, B. & McLachlan, S. M. TSH receptor cleavage into subunits and shedding of the A-subunit; a molecular and clinical perspective. *Endocr. Rev.* **37**, 114–134 (2016).
192. Misrahi, M. *et al.* Processing of the precursors of the human thyroid-stimulating hormone receptor in various eukaryotic cells (human thyrocytes , transfected L cells and baculovirus-infected insect cells). **719**, 711–719 (1994).
193. Tanaka, K., Chazenbalk, G. D., McLachlan, S. M. & Rapoport, B. Subunit structure of thyrotropin receptors expressed on the cell surface. *J. Biol. Chem.* **274**, 33979–84 (1999).
194. Furmaniak, J. *et al.* The TSH receptor: structure and interaction with autoantibodies in thyroid disease. *Acta Endocrinol. Suppl. (Copenh)*. **281**, 157–65 (1987).
195. Russo, D. *et al.* A new structural model for the thyrotropin (TSH) receptor, as determined by covalent cross-linking of TSH to the recombinant receptor in intact cells: evidence for a single polypeptide chain. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1607–12 (1991).
196. Couet, J. *et al.* Shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. Involvement of a matrix metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **271**, 4545–52 (1996).
197. Tanaka, K., Chazenbalk, G. D., McLachlan, S. M. & Rapoport, B. The shed thyrotropin receptor is primarily a carboxyl terminal truncated form of the A subunit, not the entire A subunit. *Mol. Cell. Endocrinol.* **150**, 113–9 (1999).
198. Loosfelt, H. *et al.* Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 3765–3769 (1992).
199. Latif, R., Graves, P. & Davies, T. F. Oligomerization of the human thyrotropin receptor: fluorescent protein-tagged hTSHR reveals post-translational complexes. *J. Biol. Chem.* **276**, 45217–24 (2001).
200. Urizar, E. *et al.* Glycoprotein hormone receptors: Link between receptor homodimerization and negative cooperativity. *EMBO J.* **24**, 1954–1964 (2005).
201. Hunt, N. *et al.* Novel splicing variants of the human thyrotropin receptor encode truncated polypeptides without a membrane-spanning domain. *Endocrine* **3**, 233–240 (1995).

202. Kakinuma, A. & Nagayama, Y. Multiple messenger ribonucleic acid transcripts and revised gene organization of the human TSH receptor. *Endocr. J.* **49**, 175–80 (2002).
203. Graves, P. N., Tomer, Y. & Davies, T. F. Cloning and sequencing of a 1.3 KB variant of human thyrotropin receptor mRNA lacking the transmembrane domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1135–43 (1992).
204. Latif, R. *et al.* A Modifying Autoantigen in Graves' Disease. *Endocrinology* (2019). doi:10.1210/en.2018-01048
205. Płoski, R. *et al.* Thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) intron 1 variants are major risk factors for graves' disease in three European caucasian cohorts. *PLoS One* (2010). doi:10.1371/journal.pone.0015512
206. Brand, O. J. *et al.* Association of the thyroid stimulating hormone receptor gene (TSHR) with Graves' disease. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1704–13 (2009).
207. Colobran, R. *et al.* Association of an SNP with intrathymic transcription of TSHR and graves' disease: A role for defective thymic tolerance. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3415–3423 (2011).
208. Stefan, M. *et al.* Genetic-epigenetic dysregulation of thymic TSH receptor gene expression triggers thyroid autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12562–7 (2014).
209. van der Weerd, K. *et al.* Thyrotropin Acts as a T-Cell Developmental Factor in Mice and Humans. *Thyroid* **24**, 1051–1061 (2014).
210. Giménez-Barcons, M. *et al.* Graves' Disease TSHR-Stimulating Antibodies (TSABs) Induce the Activation of Immature Thymocytes: A Clue to the Riddle of TSABs Generation? *J. Immunol.* **194**, 4199–4206 (2015).
211. Pujol-Borrell, R., Giménez-Barcons, M., Marín-Sánchez, A. & Colobran, R. Genetics of Graves' Disease: Special Focus on the Role of TSHR Gene. *Horm. Metab. Res.* **47**, 753–766 (2015).
212. Ferre, E. M. N. *et al.* Redefined clinical features and diagnostic criteria in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *JCI Insight* **1**, (2016).
213. Meyer, G. *et al.* Screening for an AIRE-1 mutation in patients with Addison's disease, type 1 diabetes, Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis as well as in APECED syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **54**, 335–338 (2001).
214. Nithiyanthan, R. *et al.* A Heterozygous Deletion of the Autoimmune Regulator (AIRE1) Gene, Autoimmune Thyroid Disease, and Type 1 Diabetes: No Evidence for Association 1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 1320–1322 (2000).
215. Cetani, F. *et al.* A novel mutation of the autoimmune regulator gene in an Italian kindred with autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy, acting in a dominant fashion and strongly cosegregating with hypothyroid autoimmune thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 4747–52 (2001).
216. Oftedal, B. E. *et al.* Dominant Mutations in the Autoimmune Regulator AIRE Are Associated with Common Organ-Specific Autoimmune Diseases. *Immunity* **42**, 1185–1196 (2015).
217. Wémeau, J. L., Proust-Lemoine, E., Ryndak, A. & Vanhove, L. Thyroid autoimmunity and polyglandular endocrine syndromes. *Hormones* **12**, 39–45 (2013).
218. Xiong, H. *et al.* Genetic associations of the thyroid stimulating hormone receptor gene with Graves diseases and Graves ophthalmopathy: A meta-analysis. *Sci. Rep.* **6**, 30356 (2016).
219. Gong, J. *et al.* Association of polymorphisms of rs179247 and rs12101255 in thyroid stimulating hormone receptor intron 1 with an increased risk of Graves' disease: A meta-analysis. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Medical Sci.]* **36**, 473–479 (2016).
220. Chen, C. R. *et al.* The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim. *J. Clin. Invest.* **111**, 1897–1904 (2003).
221. Seetharamaiah, G. S. Animal models of Graves' hyperthyroidism. *Autoimmunity* **36**, 381–387 (2003).
222. Chen, C.-R. *et al.* Crystal structure of a TSH receptor monoclonal antibody: insight into Graves' disease pathogenesis. *Mol. Endocrinol.* **29**, 99–107 (2015).

223. Lanzavecchia, A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* **314**, 537–9 (1985).
224. Noelle, R. J., Snow, E. C., Uhr, J. W. & Vitetta, E. S. Activation of antigen-specific B cells: role of T cells, cytokines, and antigen in induction of growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 6628–6631 (1983).
225. Bishop, G. A. & Hostager, B. S. B lymphocyte activation by contact-mediated interactions with T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 278–285 (2001).
226. Rosenberg, J. S. & Zouhair Atassi, M. Intersite helper function of T cells specific for a protein epitope that is not recognized by antibodies. *Immunol. Invest.* **26**, 473–489 (1997).
227. Oshima, M., Yokoi, T., Deitiker, P. & Atassi, M. Z. T cell responses in EAMG-susceptible and non-susceptible mouse strains after immunization with overlapping peptides encompassing the extracellular part of Torpedo californica acetylcholine receptor α chain. Implication to role in myasthenia gravis of autoi. *Autoimmunity* **27**, 79–90 (1998).
228. Atassi, M. Z. & Oshima, M. Autoimmune responses against acetylcholine receptor: T and B cell collaboration and manipulation by synthetic peptides. *Crit. Rev. Immunol.* **17**, 481–95 (1997).
229. Infante, A. J. & Kraig, E. Myasthenia gravis and its animal model: T cell receptor expression in an antibody mediated autoimmune disease. *Int. Rev. Immunol.* **18**, 83–109 (1999).
230. Durinovic-Belló, I. *et al.* Class III alleles at the insulin VNTR polymorphism are associated with regulatory T-cell responses to proinsulin epitopes in HLA-DR4, DQ8 individuals. *Diabetes* **54**, (2005).
231. McLachlan, S. M. *et al.* High-level intrathymic thyrotrophin receptor expression in thyroiditis-prone mice protects against the spontaneous generation of pathogenic thyrotrophin receptor autoantibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **188**, 243–253 (2017).
232. Pichurin, P. N. *et al.* Targeted Expression of the Human Thyrotropin Receptor A-Subunit to the Mouse Thyroid: Insight into Overcoming the Lack of Response to A-Subunit Adenovirus Immunization. *J. Immunol.* **176**, 668–676 (2006).
233. Rapoport, B., Aliesky, H. A., Banuelos, B., Chen, C. & McLachlan, S. M. A Unique Mouse Strain That Develops Spontaneous, Iodine-Accelerated, Pathogenic Antibodies to the Human Thyrotrophin Receptor. *J. Immunol.* **194**, 4154–4161 (2015).
234. Rapoport, B., Banuelos, B., Aliesky, H. A., Hartwig Trier, N. & McLachlan, S. M. Critical Differences between Induced and Spontaneous Mouse Models of Graves' Disease with Implications for Antigen-Specific Immunotherapy in Humans. *J. Immunol.* **197**, 4560–4568 (2016).
235. Stefan, M. & Faustino, L. C. Genetics of Thyroid-Stimulating Hormone Receptor—Relevance for Autoimmune Thyroid Disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, 1–6 (2017).
236. Fujii, A. *et al.* TSHR Gene Polymorphisms in the Enhancer Regions Are Most Strongly Associated with the Development of Graves' Disease, Especially Intractable Disease, and of Hashimoto's Disease. *Thyroid* **27**, 111–119 (2017).
237. Coppède, F. Epigenetics and Autoimmune Thyroid Diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, 149 (2017).
238. Wang, B., Shao, X., Song, R., Xu, D. & Zhang, J. A. The emerging role of epigenetics in autoimmune thyroid diseases. *Front. Immunol.* **8**, 396 (2017).
239. Aune, T. M. *et al.* Expression of long non-coding RNAs in autoimmunity and linkage to enhancer function and autoimmune disease risk genetic variants. *J. Autoimmun.* **81**, 99–109 (2017).
240. Kulkarni, S. *et al.* CCR5AS lncRNA variation differentially regulates CCR5, influencing HIV disease outcome. *Nat. Immunol.* **20**, 824–834 (2019).
241. Giménez-Barcons, M. *et al.* Autoimmune predisposition in Down syndrome may result from a partial central tolerance failure due to insufficient intrathymic expression of AIRE and peripheral antigens. *J. Immunol.* **193**, 3872–3879 (2014).

242. St-Pierre, C. *et al.* Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells. *Sci. Rep.* **3**, 1860 (2013).
243. Gabrielsen, I. S. M. *et al.* Transcriptomes of antigen presenting cells in human thymus. *PLoS One* **14**, e0218858 (2019).
244. Brennecke, P. *et al.* Single-cell transcriptome analysis reveals coordinated ectopic gene-expression patterns in medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.* **16**, 933–41 (2015).
245. Murakami, M. *et al.* Thymic hyperplasia in patients with Graves' disease. Identification of thyrotropin receptors in human thymus. *J. Clin. Invest.* **98**, 2228–34 (1996).
246. Eun, Y. C. *et al.* Thymocyte-thymocyte interaction for efficient positive selection and maturation of CD4 T cells. *Immunity* **23**, 387–396 (2005).
247. Kim, E. J. *et al.* CD4 + T cells from MHC II-dependent thymocyte-thymocyte interaction provide efficient help for B cells. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 897–903 (2011).
248. Li, W. *et al.* An alternate pathway for CD4 T cell development: Thymocyte-expressed MHC class II selects a distinct T cell population. *Immunity* **23**, 375–386 (2005).
249. Melichar, H. J., Ross, J. O., Taylor, K. T. & Robey, E. A. Stable Interactions and Sustained TCR Signaling Characterize Thymocyte–Thymocyte Interactions that Support Negative Selection. *J. Immunol.* **194**, 1057–1061 (2015).
250. Lee, Y. J. *et al.* Generation of PLZF+ CD4+ T cells via MHC class II-dependent thymocyte-thymocyte interaction is a physiological process in humans. *J. Exp. Med.* **207**, 237–246 (2010).
251. Breed, E. R., Lee, S. T. & Hogquist, K. A. Directing T cell fate: How thymic antigen presenting cells coordinate thymocyte selection. *Semin. Cell Dev. Biol.* **84**, 2–10 (2018).
252. Guerri, L. *et al.* Analysis of APC types involved in CD4 tolerance and regulatory T cell generation using reaggregated thymic organ cultures. *J. Immunol.* **190**, 2102–10 (2013).
253. Côté-Bigras, S. *et al.* Interferon-gamma ELISPOT detecting reactivity of T cells to TSH receptor peptides in Graves' disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **80**, 296–300 (2014).
254. Inaba, H., Martin, W., De Groot, A. S., Qin, S. & De Groot, L. J. Thyrotropin receptor epitopes and their relation to histocompatibility leukocyte antigen-DR molecules in graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 2286–2294 (2006).
255. Inaba, H., Groot, L. J. De & Akamizu, T. Thyrotropin receptor epitope and human leukocyte antigen in Graves' disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **7**, (2016).
256. Inaba, H. *et al.* Immune response of mice transgenic for human histocompatibility leukocyte antigen-dr to human thyrotropin receptor-extracellular domain. *Thyroid* **19**, 1271–1280 (2009).
257. Pearce, S. H. S. *et al.* Antigen-Specific Immunotherapy with Thyrotropin Receptor Peptides in Graves' Hyperthyroidism: A Phase I Study. *Thyroid* thy.2019.0036 (2019). doi:10.1089/thy.2019.0036
258. Jansson, L., Vrolix, K., Jahraus, A., Martin, K. F. & Wraith, D. C. Immunotherapy with apitopes blocks the immune response to tsh receptor in HLA-dr transgenic mice. *Endocrinology* **159**, 3446–3457 (2018).
259. Perniola, R. Twenty years of AIRE. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
260. Bahn, R. S. *et al.* Thyrotropin Receptor Expression in Graves' Orbital Adipose/Connective Tissues: Potential Autoantigen in Graves' Ophthalmopathy ¹. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 998–1002 (1998).
261. Prummel, M. F. *et al.* Expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in the folliculo-stellate cells of the human anterior pituitary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 4347–4353 (2000).
262. Brokken, L. J., Scheenhardt, J. W., Wiersinga, W. M. & Prummel, M. F. Suppression of serum TSH by Graves' Ig: evidence for a functional pituitary TSH receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 4814–7 (2001).
263. Balzan, S. *et al.* Proangiogenic effect of TSH in human microvascular endothelial cells through its membrane receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, 1763–1770 (2012).
264. Tian, L. *et al.* Effects of TSH on the function of human umbilical vein endothelial cells. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, 215–22 (2014).

265. Sellitti, D. F. *et al.* Thyrotropin regulation of cyclic adenosine monophosphate production in human coronary artery smooth muscle cells. *Thyroid* **10**, 219–225 (2000).
266. Davies, T. F., Smith, B. R. & Hall, R. Binding of thyroid stimulators to guinea pig testis and thyroid. *Endocrinology* **103**, 6–10 (1978).
267. Kumar, R. S. *et al.* Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish): potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* **167**, 1–9 (2000).
268. Aghajanova, L. *et al.* Thyroid-stimulating hormone receptor and thyroid hormone receptors are involved in human endometrial physiology. *Fertil. Steril.* **95**, 230–7, 237.e1–2 (2011).
269. Sun, S. C. *et al.* Thyrostimulin, but not thyroid-stimulating hormone (TSH), acts as a paracrine regulator to activate the TSH receptor in mammalian ovary. *J. Biol. Chem.* **285**, 3758–3765 (2010).
270. Chabaud, O. & Lissitzky, S. Thyrotropin-specific binding to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **7**, 79–87 (1977).
271. Bağrıaçık, E. Ü. & Klein, J. R. The Thyrotropin (Thyroid-Stimulating Hormone) Receptor Is Expressed on Murine Dendritic Cells and on a Subset of CD45RB high Lymph Node T Cells: Functional Role for Thyroid-Stimulating Hormone During Immune Activation. *J. Immunol.* **164**, 6158–6165 (2000).
272. Klein, J. R. The immune system as a regulator of thyroid hormone activity. *Experimental Biology and Medicine* **231**, 229–236 (2006).
273. Balzan, S. *et al.* Presence of a functional TSH receptor on human erythrocytes. *Biomed. Pharmacother.* **61**, 463–7 (2007).
274. Ma, R., Latif, R. & Davies, T. F. Human embryonic stem cells form functional thyroid follicles. *Thyroid* **25**, 455–461 (2015).

Bases de datos consultadas:

Ensembl Genome Browser: <https://www.ensembl.org/index.html>

National Center for Biotechnology Information (NCBI): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

SSFA-GPHR (Sequence- Structure- and Function- Analysis of GPHR): <http://www.ssfa-gphr.de/>

RNAcentral: <https://rnacentral.org/>

Genotype-Tissue Expression - GTEx Portal: <https://gtexportal.org/home/>

BioGPS: <http://biogps.org/#goto=welcome>

EMBL-EBI Expression atlas: <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>

Immune Epitope Database (IEDB): <https://www.iedb.org/>

ANEXOS

ANEXO 1. SECUENCIAS Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS

Tráncritos del GEN TSHR (ID NCBI: 7253; ID RefSeq GENE: NG_009206.1; ID Ensembl GENE ENSG00000165409)

1. TSHR canónico (*Homo sapiens thyroid stimulating hormone receptor (TSHR), transcript variant 1, mRNA; ID Ensembl: ENST00000298171.6; ID RefSeq mRNA: NM_000369.3; ID RefSeq Protein: NP_000360.2*)

Secuencia consenso codificante (*Consensus Coding Sequence (CCDS)*) TSHR canónico (ID CCDS: 9872.1) (2295 nt)

ATGAGGCCGGCGGACTTGCTGCAGCTGGTGCTGCTGCTCGACCTGCCAGGGACCTGGCGGAATGGGGTGTTCGTCTCCACCTGCGAGTGCCATCAGGAGGAGGACTTCAGAGTCACTGCAAGGATATTCAACGCATCCCCAGCTTACCGCCCAGTACGCAGACTCTGAGCTTATTGAGACTCACCTGAGAACTATTCCAAGTCATGCATTTTCTAATCTGCCCAATTTTCCAGAATCTACGTATCTATAGATGTGACTCTGCAGCAGCTGGAATCACACTCCTTCTACAATTTGAGTAAAGTGACTCACATAGAAATTCGGAATACCAGGAACTAACTTACATAGACCCTGATGCCCTCAAAGAGCTCCCCCTCCTAAAGTTCCTTGGCATTTCACACTGGACTTAAAATGTTCCCTGACCTGACCAAAGTTTATTCCACTGATATATTCTTTACTTGAATTACAGACAACCCTTACATGACGTCAATCCCTGTGAATGCTTTTCAGGGACTATGCAATGAAACCTTGACACTGAAGCTGTACAACAATGGCTTTACTTCAGTCCAAAGGATATGCTTTCAATGGGACAAAGCTGGATGCTGTTTACCTAAACAAGAATAAATACCTGACAGTTATTGACAAAAGATGCATTTGGAGGAGTATACAGTGGACCAAGCTTGCTGGACGTGTCTCAAACCAGTGTCACTGCCCTTCCATCCAAAGGCCTGGAGCACCTGAAGGAACTGATAGCAAGAAACACCTGGACTCTTAAGAACTTCCACTTTCCTTGAGTTTCCTTCACCTCACACGGGCTGACCTTTCTTACCCAAGCCACTGCTGTGCTTTTAAGAATCAGAAGAAAATCAGAGGAATCCTTGAGTCCTTGATGTGTAATGAGAGCAGTATGCAGAGCTTGCGCCAGAGAAAACTGTGAATGCCTTGAATAGCCCCCTCCACCAGGAATATGAAGAGAATCTGGGTGACAGCATTGTTGGGTACAAGGAAAAGTCCAAGTTCAGGATACTCATAACAACGCTCATTATTACGTCTTCTTTGAAGAACAAGAGGATGAGATCATTGGTTTGGCCAGGAGCTCAAAAACCCCCAGGAAGAGACTCTACAAGCTTTTGACAGCCATTATGACTACACCATATGTGGGGACAGTGAAGACATGGTGTGTACCCCCAAGTCCGATGAGTTCAACCCGTGTGAAGACATAATGGGCTACAAGTTCCTGAGAATTGTGGTGTGGTTCCGTTAGTCTGCTGGCTCTCCTGGGCAATGTCTTTGTCTGCTTATTCTCCTCACCAGCCACTACAACTGAACGTCCCCGCTTTCTCATGTGCAACCTGGCCTTTGCGGATTTCTGCATGGGGATGTACCTGCTCCTCATCGCCTCTGTAGACCTCTACACTCACTCTGAGTACTACAACCATGCCATCGACTGGCAGACAGGCCCTGGGTGCAACACGGCTGGTTTCTTCACTGTCTTTGCAAGCGAGTTATCGGTGTATACGCTGACGGTCATCACCTGGAGCGCTG

GTATGCCATCACCTTCGCCATGCGCCTGGACCGGAAGATCCGCCTCAGGCACGCATG
 TGCCATCATGGTTGGGGGCTGGGTTTGGCTGCTTCCTTCTCGCCCTGCTTCCTTTGGTG
 GGAATAAGTAGCTATGCCAAAGTCAGTATCTGCCTGCCCATGGACACCGAGACCCCT
 CTGCTCTGGCATATATTGTTTTTGTCTGACGCTCAACATAGTTGCCCTTCGTCATCGT
 CTGCTGCTGTTATGTGAAGATCTACATCACAGTCCGAAATCCGCAGTACAACCCAGGG
 GACAAAGATACCAAAAATTGCCAAGAGGATGGCTGTGTTGATCTTCACCGACTTCATAT
 GCATGGCCCCAATCTCATTCTATGCTCTGTCAGCAATTCTGAACAAGCCTCTCATCAC
 TGTTAGCAACTCCAAAATCTTGCTGGTACTCTTCTATCCACTTAACTCCTGTGCCAATC
 CATTCTCTATGCTATTTTACCAAGGCCTTCCAGAGGGATGTGTTTCATCCTACTCAG
 CAAGTTTGGCATCTGTAAACGCCAGGCTCAGGCATACCGGGGGCAGAGGGTTCTCC
 AAAGAACAGCACTGATATTCAGGTTCAAAAAGGTTACCCACGAGATGAGGCAGGGTCT
 CCACAACATGGAAGATGTCTATGAACTGATTGAAAACCTCCCATCTAACCCCAAAGAAG
 CAAGGCCAAATCTCAGAAGAGTATATGCAAACGGTTTTG **TAA**

Secuencia proteica TSHR FL (764 aa) (exones en colores alternados) (*ID RefSeq Protein: NP_000360.2*)

MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPSTQT**LK**LIETHLR**TIPS**
HAFSNL**PNISRI**YV**SID**VT**LQQL**ESH**SFY**NLSKV**THIE**IR**NTR**N**LT**YID**PD**AL**KEL**PL**LKFL**GI**FNT**GL
 KM**FP**DLTKV**Y**ST**DI**FF**ILE**IT**DN**PY**MTS**IPV**NA**F**QGL**C**NET**LT**LK**LY**NG**F**TSV**Q**GY**A**FNG**TK**LDA**V**YL**
 N**KN**K**YL**T**VID**K**DA**F**GG**V**YSG**PS**L**L**DVS**Q**TS**V**TAL**PS**KGL**E**HL**K**ELI**AR**NT**W**TL**K**KL**PL**SLS**F**LHL**TR**AD**
 L**SYP**SH**CCA**F**KN**Q**KKIR**G**ILES**LM**CNE**SS**MQ**SL**RQR**KS**VNAL**NS**PLH**Q**EY**E**EN**L**GDS**I**VGY**KE**KSK**F**QD**
 T**HNN**A**HYY**V**FF**E**EQE**DE**IIG**F**GQ**EL**KNP**Q**EET**L**QAF**D**SHY**D**Y**T**IC**G**DE**M**VCT**PK**SDEF**NP**CE**D**IM**GY
 K**FL**R**IV**V**WF**V**SL**L**ALL**GN**VF**V**LL**L**ILL**T**SHY**KL**NV**PR**FL**MC**NL**A**FAD**FC**MGM**Y**LL**L**IAS**V**DLY**TH**SE**Y**YN**
 H**AID**W**Q**T**GP**C**NT**A**GFF**T**VF**A**S**EL**SV**Y**TL**T**VIT**LER**WY**A**IT**F**AM**R**LDR**K**IR**L**RH**A**CI**M**VGG**W**VCC**F**LL**
 A**LL**PL**VGI**SS**YAK**V**SIC**L**PMD**T**ET**PL**AL**A**YIV**F**VL**T**LN**I**VAF**V**IV**CC**CV**K**IYI**T**VR**NP**QYN**PG**KD**TK
 I**AK**R**MA**V**LIF**T**DF**IC**MA**P**IS**F**YALS**A**IL**N**KPL**I**T**V**NS**K**ILL**V**LF**Y**PL**NS**CAN**P**FLYA**I**FT**K**A**F**Q**R**D**V**F**
 I**LL**SK**FG**I**CK**R**QA**Q**AY**R**GQ**R**V**PP**KN**ST**DI**Q**VQ**K**V**T**HE**M**RQ**GL**N**M**ED**V**YEL**I**EN**SH**LTP**KK**QG**Q**ISEE**
 Y**MQ**T**VL**

2. Variante de splicing ST4 (*transcript variant 2, NM_001018036, ENST00000342443.10*)

Secuencia mRNA ST4

ATGAGG**CCG**CGG**GACT**T**GCT**G**CAG**CT**G**T**GCT**G**CTG**CT**G**CT**GAC**CT**G**CC**AGG**G**ACT**G
 G**CG**G**AA**T**G**GG**G**T**G**T**CG**T**CT**CC**ACC**CT**G**CG**AG**T**G**CC**AT**C**AG**G**AG**G**AG**ACT**TC**AG**A**
 G**T**C**AC**CT**G**CA**AG**G**AT**ATT**CA**AC**GC**AT**CCC**AG**CTT**AC**CG**CC**AG**T**AC**CG**CAG**ACT**CT**GA
 AG**CTT**ATT**G**AG**ACT**C**AC**CT**G**AGA**ACT**ATT**CCA**AG**T**C**AT**GC**AT**TT**T**CT**AAT**CT**G**CC**CAA**
 T**AT**TT**CC**AG**AA**T**CT**AC**GT**AT**CT**AT**AG**AT**GT**GA**CT**CT**G**C**AG**C**AG**CT**G**GA**AT**C**AC**ACT**CC**
 T**T**CT**ACA**AT**TT**G**AG**T**AA**AG**T**GA**CT**C**AC**AT**AG**AA**TT**CG**GA**AT**ACC**AG**GA**ACT**T**AA**CTT**
 AC**AT**AG**ACC**CT**G**AT**G**CC**CT**CAA**AG**CT**CCC**CT**C**T**AA**AG**TT**C**CT**T**G**GC**AT**TT**T**CAA
 C**ACT**G**G**ACT**T**AAA**AT**G**TT**CC**CT**G**AC**CT**G**AC**CAA**AG**TTT**ATT**CC**ACT**G**AT**AT**ATT**CT**TT**A**

TACTTGAAATTACAGACAACCCTTACATGACGTCAATCCCTGTGAATGCTTTTCAGGG
 ACTATGCAATGAAACCTTGACACTGAAGCTGTACAACAATGGCTTTACTTCAGTCCAA
 GGATATGCTTTCAATGGGACAAAGCTGGATGCTGTTTACCTAAACAAGAATAAATACC
 TGACAGTTATTGACAAAGATGCATTTGGAGGAGTATACAGTGGACCAAGCTTGCTGCT
 GCCTCTTGGAAAGAAAGTCCTTGTCCTTGGAGACTCAGTAGGCCCAACGCTCCAGTATGCCATC
 ATGATGCTGCTAAGGCAGCCACCTTGGTGTACATGCTCACAGAGGCTCTGTTTCATGGAGCA
 GCTGCTGTTTGAAAAATTTGAAATGCAAGATCCACAACCTAGATGGAAGGCACTCTAGTCTTT
 GCAGAAAAAATGTACCTGAATGTACATTGCACAATGCCTGGCACAAGAAGGAAGAATATA
 AATGATAGTTGACTCGTCTGTGGAAGAACTTACAATCATGGGGAAAGATGGAATAAAAAACA
 TTTTTTAAACAGCATGAAAA

CCDS Nucleotide Sequence ST4 (ID CCDS 32131.1) (762 nt)

ATGAGGCCGGCGGACTTGCTGCAGCTGGTGTGCTGCTGCTCGACCTGCCAGGGACCTGGGCGGAATGGGG
 TGTTTCGTCTCCACCCTGCGAGTGCCATCAGGAGGAGGACTTCAGAGTCACCTGCAAGGATATTCAACGC
 ATCCCCAGCTTACCGCCCAGTACGCAGACTCTGAAGCTTATTGAGACTCACCTGAGAACTATTCCAAGT
 CATGCATTTTCTAATCTGCCCAATATTTCCAGAATCTACGTATCTATAGATGTGACTCTGCAGCAGCTG
 GAATCACACTCCTTCTACAATTTGAGTAAAGTGACTCACATAGAAATTCGGAATACCAGGAACCTTAAC
 TACATAGACCCTGATGCCCTCAAAGAGCTCCCCCTCTAAAGTTCCTTGGCATTTC AACACTGGACTT
 AAAATGTTCCCTGACCTGACCAAAGTTTATTCCACTGATATATCTTTATACTTGAAATTACAGACAAC
 CCTTACATGACGTCAATCCCTGTGAATGCTTTTCAGGGACTATGCAATGAAACCTTGACACTGAAGCTG
 TACAACAATGGCTTTACTTCAGTCCAAGGATATGCTTTCAATGGGACAAAGCTGGATGCTGTTTACCTA
 AACAGAATAAATACCTGACAGTTATTGACAAAAGATGCATTTGGAGGAGTATACAGTGGACCAAGCTTG
 CTGCTACCTCTTGGAAAGAAAGTCCTTGTCCTTTGAGACTCAGAAGGCCCCACGCTCCAGTATGCCATCA
 TGA

ST4 Traducción mRNA --> Proteína (NP_001018046.1) (253 aa)

MRPADLLQLVLLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPS
 HAFSNLPNISRIYVSI DVTLQQLESH SFYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLKFLGIFNTGL
 KMF PDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYL
 NKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLPLGRKSLSFETQKAPRSSMPS

3. Variante de splicing ST5 Secuencia mRNA

ATGAGGCCGGCGGACTTGCTGCAGCTGGTGTGCTGCTGCTCGACCTGCCAGGGACCTG
 GCGGAATGGGGTGTTCGTCTCCACCCTGCGAGTGCCATCAGGAGGAGGACTTCAGA
 GTCACCTGCAAGGATATTCAACGCATCCCCAGCTTACCGCCAGTACGCAGACTCTGA
 AGCTTATTGAGACTCACCTGAGA ACTATTCCAAGTCATGCATTTTCTAATCTGCCCAA
 TATTTCCAGAATCTACGTATCTATAGATGTGACTCTGCAGCAGCTGGAATCACACTCC
 TTCTACAATTTGAGTAAAGTGACTCACATAGAAATTCGGAATACCAGGAACCTTAACCT
 ACATAGACCCTGATGCCCTCAAAGAGCTCCCCCTCTAAAGTTCCTTGGCATTTC
 CACTGGACTTAAAATGTTCCCTGACCTGACCAAAGTTTATTCCACTGATATATCTTTA

TACTTGAAATTACAGACAACCCTTACATGACGTCAATCCCTGTGAATGCTTTTCAGGG
 ACTATGCAATGAAACCTTGACACTGAAGCTGTACAACAATGGCTTTACTTCAGTCCAA
 GGATATGCTTTCAATGGGACAAAGCTGGATGCTGTTTACCTAAACAAGAATAAATACC
 TGACAGTTATTGACAAAGATGCATTTGGAGGAGTATACAGTGGACCAAGCTTGCTATT
 CCTAATGAGTCCATGGAGACTTACTGCACCTGGATCTGTGTTCAAAGACTCCAAAGACCTGAA
 AGTGAAGACTAGCTCCTGGGACACTGAAGCTGAGAACTCCAGACCCAAA TGATACTTATGAC
 TCCACCCTTGGTTCACCTGTATCTTTTTGGACACAACATCCCTTATTTCTTTGTCTGAATTTAG
 TATCTGCCCCTTCATAAAAAATGCTTTGAGAATTGAAACCAGCTTCTGAATCACCTGGAGAGC
 ATCTTAAATAATGCAGATTCCAGCCTCCACAAACAGAGATTATAATTCATTTGGTCTGGAAT
 GTGTCTCAATCTGTATTACAGGTGATTCTGATGCTGGTCCAGAGTGATCCCTGGACTAGAAAT
 GCTGATTTGCAGAGTGATAAACTGCCAGTTTTTCCCAAATTATCTGCCTCAATGCTGTCTCC
 ATCACTTAGAACATTAGGGCAGTTTTAAAGAAGGCACCGAATTCTTTGACACTCTTCCCATT
 AAGAGGTGGACTGTATGTCCTCTGCCCTGAATTTGATAGTTCTTTAGAATCTGGCTGACAT
 AATGTGGGAAGGTCAAGCCACATGGAGTAGCCACAGCAACAGTCCAGCTGAGCTCAGTCTT
 TGAGTCACCTCAGCCTGGCACCAGACATGCCAGTGAAGGAAATTGCAGATAATCCCAACCC
 CCAGGCATTGAGTCATCCAGACTCCAGATCTTCCAGCTGACGCCCCAGACATCACAGAAC
 AGAGACAACCTATCCCACCATTCCCTGTTCAAATTAATGATCCATAAAACCTATGCTCATAA
 TAAAAAGATTGTTGCTTT

ST5 Traducción mRNA--> Proteína

MRPADLLQLVLLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPS
 HAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGL
 KMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYL
 NKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLFLMSPWRLTAPGSVFKDSDKDLKVKTSWDEAENSRPKStopYLS
 topLHPWFVTVSFWTQHPLFLCLNFSICPLHKNALRIETSFStopITWRASStopIMQIPSLHKQRLSto
 pFIWGMCLNLYRStopFStopCWSRVIPGLEMLICRVINCQFFPKLSASMLSPSLRTLQGFStopKK
 APNSLTLFPLRGGLYVLCFStopIStopStopFSStopNLADIMWEGQATWSSHSNSPSStopAQSLSH
 LSPGTRHASEGNCRStopSQPPGIESSQTPDLPSStopRPRHRTETTYPHHSLFKLMIHKTYAHNKKI
 VA

Predicción secuencia proteica ST5 (269 aa)

MRPADLLQLVLLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPS
 HAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGL
 KMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYL
 NKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLFLMSPWRLTAPGSVFKDSDKDLKVKTSWDEAENSRPK

ANEXOS

Alineamiento de secuencias proteicas TSHR forma canónica, ST4 y ST5

aa	1	57	81	100				
TSHR	MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNL							
ST4	MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNL							
ST5	MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNL							
Dominios #	MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNL							
TSHR								
Linear Epitopes	MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNL							
No linear Epitopes	MRPADLLQLVLLLDLPRDLGGMGCSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNL							
aa	101	106	131	156	182	200		
TSHR	SKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKEPLLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGT							
ST4	SKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKEPLLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGT							
ST5	SKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKEPLLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGT							
Dominios #	SKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKEPLLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGT							
TSHR								
Linear Epitopes	SKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKEPLLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGT							
No linear Epitopes	SKVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKEPLLLKFLGIFNTGLKMFDPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGT							
aa	201	205	231	253	260#	269	294	300
TSHR	KLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQKKIRGILES							SLM
ST4	KLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQKKIRGILES							SLM
ST5	KLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQKKIRGILES							SLM
Dominios #	KLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQKKIRGILES							
TSHR								
Linear Epitopes	KLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHCCAFKNQKKIRGILES							

ANEXOS

No linear Epitopes	KLDVAVYL NK NKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVS Q TSVTALPSKGLEHLK E LI ARN TWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPSHCCAFKNQKKIRGILESLM
aa	301 400
TSHR	CNESSMQSLRQ R KSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSK FQ DTHNNAHYVFF EEQ EDEIIGFGQELKNP QE ETLQAFDSHYDY TIC GDSEDMV CTP
ST4	-----
ST5	-----
Dominios #	CNESSMQSLR q rksvnalnspl h qeyeenlgdsivgykeksk f qdt <hnnahyyvffeeqedeiigfgeELKNPQEETLQAFDSHyDYTICGDSEDMVCTP</hnnahyyvff
TSHR (peptide C)	
Linear Epitopes	CNESSMQSL RQ RKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSK FQ DTHNNAHYVFF EEQ EDEIIGFGQEL KNPQE ETLQAFDSHYDY TIC GDSEDMV CTP
aa	401 500
TSHR	KSDEFN PC EDIMGYKFLRIVVWFVSL L LALLGNVFVLLILLTSHYKLN V PRFLMCN L AFADFCMGMYLLLIASVDLYTHSEY N HAI D W Q TGPGCNTAGFF
ST4	-----
ST5	-----
Dominios TSHR	KSDEFN PC EDIMGYKFLRIVVWFVSL L LALLGNVFVLLILLT S HYKLN V PRFLMCN L AFADFCMGMYLLLIASVDLYTHSEY N HAI D W Q TGPGCNTAGFF
Linear Epitopes	KSDEFN PC EDIMGYK FLRIVVWFVSL LALLGNVFVLLILLTSHYKLN V PRFLMCN L AFADFCMGMYLLLIASV D LYTHSEY N HAI D W Q TGPG C NTAGFF
aa	501 600
TSHR	TVFASELSVY T TLTVITLERWYAIT F AMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCC F LLALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIVFVLT L NIVAFVIVCC
ST4	-----
ST5	-----
Dominios TSHR	TVFASELSVY T TLTVITLERWYAIT F AMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCC F LLALLPLVGISSYAKVSICLPMDTETPLALAYIVFVLT L NIVAFVIVCC
Linear Epitopes	TVFASELSVY T TLTVITLERWYAIT F AMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCC F LLALLPLVGI SSYAKVSICLPMDTETPLA LAYIVFVLT L NIVAFVIVCC
aa	601 700
TSHR	YVKIYITVRNPQYNPGDKDTKI A K R MAVLI F TDFICMAPISFYALSAILNKPLITVSNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAI F TKAFQ R DV F ILLSK F GICK
ST4	-----

ANEXOS

ST5 -----

Dominios TSHR YVKIYITVRNPQYNPGDKDGTKIAKRMAVLI FTDFICMAPISFYALSAILNKPLITVSNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAI FTKAFQRDVFILLSKFGICK

Linear Epitopes YVKIYITVRNPQYNPGDKDGTKIAKRMAVLI FTDFICMAPISFYALSAILNKPLITVSNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAI FTKAFQRDVFILLSKFGICK

aa 701 764

TSHR RQAQAYRGQRVPPKNSTDIQVQKVTHEMRQGLHNMEDVYELIENSHLTPKKQGQISEEYMQTVL

ST4 -----

ST5 -----

Dominios TSHR RQAQAYRGQRVPPKNSTDIQVQKVTHEMRQGLHNMEDVYELIENSHLTPKKQGQISEEYMQTVL

Leyenda de colores: Dominios # TSHR					
Signal peptide 1-21	leucine-rich repeat LRR	leucine rich repeat LRR	Hinge region	Peptide e	Paso transmembrana
ICL (bucle intracelular)	ECL (buce extracelular)	Cys de Cys Box	Helix 8	PDZ-Binding	

ANEXO 2. PUBLICACIONES Y TRABAJOS PRESENTADOS A CONGRESOS (2014-2020)

Publicaciones relacionadas con AITD

Regulation of TSHR Expression in the Thyroid and Thymus May Contribute to TSHR Tolerance Failure in Graves' Disease Patients Via Two Distinct Mechanisms. Ana Marín-Sánchez, Daniel Álvarez-Sierra, Oscar González, Ana Lucas-Martin, Alicia Sellés-Sánchez, Francesc Rudilla, Emma Enrich, Roger Colobran, Ricardo Pujol-Borrell. 2019. *Frontiers in Immunology* (*Forma parte de esta tesis)

PD-1/PD-L1 Expression In Human Autoimmune Thyroid Disease (AITD): Clues To Pathogenesis And To Immunotherapy Associated Autoimmunity. Daniel Álvarez-Sierra, Ana Marín Sánchez, Paloma Ruiz Blázquez, Carmen de Jesús Gil, Carmela Iglesias Felip, Óscar González, Anna Casteras, Roger Colobran, Ricardo Pujol Borrell. 2019. *Journal of Autoimmunity*

Central Tolerance Mechanisms to TSHR in Graves' Disease: Contributions to Understand the Genetic Association. Pujol-Borrell, R., D. Álvarez-Sierra, D. Jaraquemada, A. Marín-Sánchez, and R. Colobran. 2018. *Horm. Metab. Res.* (*Forma parte de esta tesis)

AIRE genetic variants and predisposition to polygenic autoimmune disease: The case of Graves' disease and a systematic literature review. Colobran R, Giménez-Barcons M, Marín-Sánchez A, Porta-Pardo E, Pujol-Borrell R. 2016. *Hum Immunol.* (*Forma parte de esta tesis)

Genetics of Graves' Disease: Special Focus on the role of TSHR Gene. R. Pujol-Borrell, M. Gimenez-Barcons, A. Marín-Sánchez, R. Colobran. 2015. *Horm Metab* (*Forma parte de esta tesis)

Graves' Disease TSHR-Stimulating Antibodies (TSAbs) Induce the Activation of Immature Thymocytes: A Clue to the Riddle of TSAbs Generation? Giménez-Barcons M, Colobran R, Gómez Pau A, Marín-Sánchez A, Casteràs A, Obiols G, Abella R, Fernández-Doblas J, Tonacchera M, Pujol-Borrell R. 2015 *J. Immunol*

Autoimmune Predisposition in Down Syndrome May Result from a Partial Central Tolerance Failure due to Insufficient Intrathymic Expression of AIRE and Peripheral Antigens. Mireia Giménez-Barcons, Anna Casteràs, Maria del Pilar Armengol, Eduard Porta, Paula A. Correa, Ana Marín, Ricardo Pujol-Borrell, and Roger Colobran. *The Journal of Immunology*, 2014.

Comunicaciones a congresos relacionadas con AITD

TSHR isoforms differential expression in thyroid and thymus: implications for the autoimmune response in Graves' disease. Ana Marín-Sánchez, Alicia Sellés-Sánchez, Francesc Rudilla, Daniel Álvarez de la Sierra, Roger Colobran, Ricardo Pujol-Borrell. FOCIS 2019 (Boston, Junio 2019) (Póster).

PD1 and PD-L1 in Graves' disease: new clues for pathogenesis Daniel Alvarez-Sierra, Carmen de Jesús-Gil, Ana Marín-Sánchez, Paloma Ruiz-Blázquez, Carmela Iglesias, Paolo Nuciforo, Óscar González, Anna Casteras, Gabriel Obiols, Ricardo Pujol-Borrell FOCIS 2019 (Póster)

Contribution of intronic SNPs to the differential expression of TSHR isoforms in thyroid and thymus: implications for the autoimmune response in Graves' disease. Ana María Marín Sánchez, Alicia Selles Sánchez, Francesc Rudilla Salvador, Daniel Alvarez De La Sierra, Roger Colobran Oriol, Ricardo Pujol Borrell. 41 Congreso Sociedad Española de Inmunología (Sevilla, Mayo 2019) (Comunicación oral).

TSHR Stimulating Antibodies (TSAbs) from Graves' Disease Patients Stimulate Thymocytes and may Contribute to the TSAb Response maturation. Giménez-Barcons M, Colobran R, Gómez Pau A, Marín-Sánchez A, Casteràs A, Obiols G, Abella R, Fernández-Doblas J, Tonacchera M, Lucas-Martin A, Pujol-Borrell R. FOCIS 2015. (Póster)

Otras publicaciones no relacionadas con AITD

Statin-induced myalgia and myositis: an update on pathogenesis and clinical recommendations. Selva-O'Callaghan A, Alvarado-Cardenas M, Pinal-Fernández I, Trallero-Araguás E, Milisenda JC, Martínez MÁ, Marín A, Labrador-Horrillo M, Juárez C, Grau-Junyent JM. *Expert Rev Clin Immunol.* 2018.

Novel risk factors related to cancer in scleroderma. Bernal-Bello D., de Tena JG, Guillén-Del Castillo A, Selva-O'Callaghan A, Callejas-Moraga EL, Marín-Sánchez AM, Fonollosa-Pla V, Simeón-Aznar CP. *Autoimmunity Reviews* 2017.

Mixed Connective Tissue Disease and Epitope Spreading: An Historical Cohort Study. Escolà-Vergé L, Pinal-Fernandez I, Fernandez-Codina A, Callejas-Moraga EL, Espinosa J, Marin A, Labrador-Horrillo M, Selva-O'Callaghan A. *J Clin Rheumatol.* 2017

Statin-associated autoimmune myopathy: A distinct new IFL pattern can increase the rate of HMGCR antibody detection by clinical laboratories. A. Marín-Sánchez, M. Alvarado-Cardenas, M.A. Martínez, L. Martínez-Martínez, I. Pinal-Fernandez ,M. Labrador-Horrillo, E. Balada, X.Mundet-Tuduri, L. Gonzalez-Mera, J.Casademont , E. Martínez Acebes, P.J. Moreno, C. Juarez, J.M. Grau-Junyent, R. Pujol-Borrell, A. Selva-O'Callaghan. *Autoimmunity Reviews* 2016

Estatinas y autoinmunidad. Marcelo Alvarado Cárdenas, Ana Marín Sánchez y Joan Lima Ruiz , Grupo para estudio de Autoinmunidad y Estatinas. *Revisión Med Clin (Barc).* 2015

Utilidad de los autoanticuerpos en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes sistémicas con afectación cutánea. Anticuerpos antinucleares y antígenos extraíbles del núcleo. (Parte 1) Cecilia Juárez-Dobjanschi, Carla Ferrándiz-Pulido, Ana Marín-Sánchez y Vicente García-Patos Briones. *Piel (Barc)*. 2014

Utilidad de los autoanticuerpos en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes sistémicas con afectación cutánea. Anticuerpos antinucleares y antígenos extraíbles del núcleo. (Parte 2) Cecilia Juárez-Dobjanschi, Carla Ferrándiz-Pulido, Ana Marín-Sánchez y Vicente García-Patos Briones. *Piel (Barc)*. 2014

Anti-SSA/Ro52 autoantibodies in scleroderma: results of an observational, cross-sectional study A. Sánchez-Montalvá, A. Fernández-Luque, C.P. Simeón, V. Fonollosa-Plà, A. Marín, A. Guillén, M. Vilardell. *Clin Exp Rheumatol* 2014.

