

# **Estudi del TCR dels limfòcits de pàncrees i perifèria en la diabetis T1 humana.**

**Descripció del perfil clonal de les famílies gèniques TRAV i TRBV i identificació del CDR3 de les cèl.lules T intra-illot, de melsa i de PBMCs.**

**Eva Codina Busqueta**

Memòria de tesi per optar al grau de  
Doctor en Immunologia.

Treball dirigit per Mercè Martí Ripoll  
Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia

Institut de Biotecnologia i Biomedicina  
**U**niversitat **A**utònoma de **B**arcelona  
2012



Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia  
Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB)  
Universitat Autònoma de Barcelona  
Laboratori d'Immunologia cel.lular.

La **Dra. Mercè Martí Ripoll**, certifica que la tesi titulada:

Estudi del TCR dels limfòcits de pàncrees i perifèria en la diabetis T1 humana.

Ha estat realitzada per Eva Codina Busqueta sota la seva direcció i considera que és apta per a ser presentada i optar al grau de Doctor en Immunologia per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Per a que en quedi constància, firma la present certificació a Bellaterra  
..... de..... de 2012.







Dedico aquest treball a Andreu Codina i Josep Busqueta,





## ❖ INDEX

ABREVIATURES .....	1
RESUM .....	5
INTRODUCCIÓ .....	7
<b>1) LIMFÒCITS T .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1) Característiques i subpoblacions de limfòcits T</b>	<b>11</b>
<b>1.2) TCR (T cell receptor)</b>	<b>14</b>
1.2.1) Reordenament del TCR: Generació de diversitat	15
1.2.1.1) <i>Cadena alfa (TRA).</i>	16
1.2.1.2.) <i>Cadena beta (TRB).</i>	17
1.2.1.3) <i>Mecanisme del reordenament del TCR</i>	18
<b>1.3) Reconeixement d'antigen</b>	<b>21</b>
1.3.1) Complex TCR-pMHC.	21
1.3.2) Co-receptors i molècules accessòries.	23
1.3.3) Interacció TCR-pMHC	24
<b>1.4) Mecanisme de la tolerància</b>	<b>27</b>
1.4.1) Maduració dels limfòcits i tolerància central	27
1.4.2) Mecanismes de la tolerància perifèrica	31
<b>2) DIABETIS Tipus 1 .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1) Causes</b>	<b>35</b>
<b>2.2) Òrgan diana</b>	<b>37</b>
<b>2.3) Característiques dels limfòcits T intrapancreàtics en la DT1</b>	<b>40</b>
2.3.1) Expansions monoclonals al pàncrees diabètic	44
<b>2.4) Perifèria</b>	<b>45</b>
2.4.1) Estructura de la melsa.	45
2.4.2) Les cèl.lules B de la zona marginal	46
2.4.3) Melsa i autoreactivitat	48
<b>HIPÒTESI .....</b>	<b>51</b>
<b>OBJECTIUS .....</b>	<b>53</b>

<b>MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>55</b>
<b>1) MOSTRES:</b>	<b>57</b>
<b>1.1) Mostres control per al calibratge de la tècnica</b>	<b>57</b>
<b>1.2)Mostres control experimentals</b>	<b>57</b>
<b>1.3)Mostres problema</b>	<b>58</b>
<b>2.PROTOCOLS:</b>	<b>60</b>
<b>2.1)Extracció de mRNA</b>	<b>60</b>
<b>2.2)Retrotranscripció</b>	<b>61</b>
<b>2.3)PCR GAPDH</b>	<b>62</b>
<b>2.4)PCR CD3<math>\gamma</math></b>	<b>62</b>
<b>2.5)PCR de gradient de temperatura</b>	<b>63</b>
<b>2.6)PCR multiplex V<math>\alpha</math></b>	<b>64</b>
<b>2.7)PCR multiplex V<math>\beta</math></b>	<b>66</b>
<b>2.8)Spectratyping (Genotipatge)</b>	<b>69</b>
<b>2.9)Seqüenciació</b>	<b>70</b>
<b>2.10)Clonatge</b>	<b>71</b>
2.10.1) Vector PBE	71
2.10.2) Preparació de l'insert	72
2.10.3) Generació de les cèl.lules competents	72
2.10.4) Lligació i Transformació	74
2.10.5) Selecció de colònies i extracció plasmídica	75
2.10.6) Seqüenciació i anàlisi del $\beta$ -CDR3	75
<b>2.11) Anàlisi estadístic de les dades de seqüenciació</b>	<b>76</b>
<b>2.12) Citometria de flux</b>	<b>77</b>
<b>2.13) PCR Real-Time de CD3<math>\gamma</math>, GAPDH i FOXP3.</b>	<b>77</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>79</b>
<b>OBJECTIU I .....</b>	<b>81</b>
<i>Optimitzar la metodologia experimental per l'estudi del TCR, mitjançant el disseny d'una RT-PCR multiplex per a l'anàlisi del repertori TRAV i TRBV.</i>	
<b>1.1)PCR multiplex</b>	<b>84</b>
1.1.1) Anàlisi de les famílies gèniques TRAV	84

1.1.2) Anàlisi de les famílies gèniques TRBV	87
<b>1.2) Genotipatge (spectrapping)</b>	<b>88</b>
<b>1.3) Identificació de les expansions clonals</b>	<b>89</b>
<b>OBJECTIU II</b> .....	<b>91</b>
<i>Analitzar el repertori de famílies gèniques TRBV i la presència d'expansions monoclonals en el digerit total i en els illots purificats del pàncrees d'un donant diabètic tipus 1.</i>	
<b>2.1) Presència de cèl.lules T al pàncrees diabètic i controls</b>	<b>94</b>
<b>2.2) Diversitat de famílies gèniques TRBV</b>	<b>95</b>
<b>2.3) Distribució de CDR3 en les famílies TRBV</b>	<b>97</b>
<b>2.4) Expansions monoclonals a les famílies TRBV amplificades</b>	<b>99</b>
<b>OBJECTIU III</b> .....	<b>101</b>
<i>Identificar a la perifèria les expansions clonals de l'infiltrat intra-illot.</i>	
<b>3.1) Cerca de les expansions monoclonals intra-illot a la melsa</b>	<b>104</b>
<b>3.2) Identitats clonals entre expansions T al pàncrees i a la melsa</b>	<b>108</b>
<b>3.3) Comparació del repertori de la melsa i de sang perifèrica</b>	<b>110</b>
<b>OBJECTIU IV</b> .....	<b>113</b>
<i>Determinar l'existència d'un biaix en la diversitat del TCR de les cèl.lules infiltrants del pàncrees, a partir de la identificació d'elements de restricció en les regions CDR3 de la cadena beta del TCR.</i>	
<b>4.1) Distribució de les mides de CDR3 i l'ús de segments TRBJ</b>	<b>118</b>
<b>4.2) Valoració de les propietats dels aminoàcids de la regió CDR3</b>	<b>119</b>
<b>4.3) Definició de motius de restricció a les regions <math>\beta</math>-CDR3</b>	<b>128</b>
4.3.1) Anàlisi del patró de restricció dels CDR3 d'11aa	131
4.3.2) Anàlisi del patró de restricció dels CDR3 de 12aa	132
4.3.3) Anàlisi del patró de restricció dels CDR3 de 13aa	133
4.3.4) Anàlisi del patró de restricció dels CDR3 de 14aa	134
<b>4.4) Relació del biaix CDR3 a pàncrees amb les expansions a la melsa</b>	<b>135</b>
<b>OBJECTIU V</b> .....	<b>140</b>
<i>Comparar el TCR de línies i clons generats in vitro a partir de l'infiltrat d'illots amb les dades de les expansions in vivo del pàncrees diabètic</i>	
<b>5.1) Repertori TRAV i TRBV de les línies L1 i L2</b>	<b>140</b>

5.1.1) Repertori TRAV i TRBV i clonalitat de la línia parental L1	141
5.1.2) Repertori TRAV i TRBV i clonalitat de la línia parental L2	143
<b>5.2) Repertori TRAV i TRBV de les línies oligoclonals i clons.</b>	<b>145</b>
5.2.1) TCR i genotipatge de les línies oligoclonals de L1	145
5.2.2) TCR i genotipatge de les línies oligoclonals de L2	148
<b>5.3) Comparació de les línies oligoclonals obtingudes de L1 i L2</b>	<b>150</b>
5.3.1) Freqüència d'expressió V $\alpha$ 1, V $\alpha$ 22, V $\beta$ 11, V $\beta$ 13.1	151
5.3.2) Seqüenciació V $\alpha$ 1, V $\alpha$ 22, V $\beta$ 11, V $\beta$ 13.1	152
5.3.2.1) Seqüències V $\beta$ 11 i V $\beta$ 13.1	153
5.3.2.2) Seqüències V $\alpha$ 1 i V $\alpha$ 22	153
5.3.3) Anàlisi per citometria de flux	156
<b>5.4) Comparació del clon de TCR dual aïllat <i>in vitro</i> amb la restricció de regions <math>\beta</math>-CDR3 establerta <i>in vivo</i> al pàncrees</b>	<b>158</b>
5.5) El clon amb TCR dual no expressa FOXP3.	160
<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>163</b>
<b>CONCLUSIONS PER OBJECTIUS.....</b>	<b>181</b>
<b>ANNEXOS .....</b>	<b>185</b>
<b>Figures suplementàries</b>	<b>187</b>
<b>Taules suplementàries</b>	<b>195</b>
<b>Materials i mètodes suplementaris</b>	<b>201</b>
<b>Article publicat</b>	<b>205</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>207</b>
<b>AGRAÏMENTS .....</b>	<b>225</b>

## ❖ ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
Ag	Antigen
AIRE	Factor de transcripció <i>autoimmune regulator</i>
APC	Cèl.lula presentadora d'antigen
$\beta$ -CDR3	<i>Loop</i> CDR3 de la cadena beta del TCR
BALT	Teixit limfoid associat al bronqui
BCR	Receptor de la cèl.lula B
$C\alpha$ / TRAC	Fragments gènics de la zona constant de la cadena alfa del TCR
C-A-S	Motius d'aminoàcids conservats a l'extrem N-terminal del CDR3
$C\beta$ / TRBC	Fragments gènics de la zona constant de la cadena beta del TCR
CD	Cluster de diferenciació
CD25	Cluster de diferenciació 25 (cadena alfa del receptor de la IL-2)
CDR	Regió determinant de la complementarietat
cTEC	Cèl.lules epitelials corticals tímiques
CTLA-4.	Antígen-4 associat al limfòcit T citotòxic
$D\beta$ / TRBD	Fragments gènics de la zona diversitat de la cadena beta del TCR
DC	Cèl.lules dendrítiques
DN	Cèl.lules doble negatives
DNA	Sigles a l'anglesa de l'àcid desoxiribonucleic
DP	Cèl.lules doble positives
DT1	Diabetis tipus I
EAE	Encefalitis alèrgica experimental
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GAD65	Isoforma 65 de la descarboxilasa del àcid glutàmic
HLA	Antígens leucocitaris humans
IA-2	Antigen 2 associat a insulinoma
IAA	Autoanticòs contra insulina

• ABREVIATURES •

ICA	Anticòs contra les cèl.lules d'illots
IDDM	Diabetis mellitus insulina-dependent
IFN	Interferó
Ig	Immunoglobulina
IGRP	Glucosa-6-fosfatasa específica d'illot
IL	Interleucina
ITAM	Motiu d'activació de l'immunoreceptor basat en tirosina
J $\alpha$ / TRAJ	Fragments gènics de la zona d'unió de la cadena alfa del TCR
J $\beta$ / TRBV	Fragments gènics de la zona d'unió de la cadena beta del TCR
LCL	Línia cel.lular limfoblastoide
LTC	Limfòcits T citotòxics
MHC	Molècules del Complex Principal d'Histocompatibilitat
MLN	Limfonodes mesentèrics
mTEC	Cèl.lules epitelials medul.lars tímiques
NDN	Part central del CDR3 que inclou TRBD i aa d'inserció o delecció
NKT	Cèl.lules T citocides naturals
NL	Nòdul limfàtic
NOD	Ratolí diabètic no-obès
o/n	<i>Overnight</i>
PBMCs	Cèl.lules mononuclears de sang perifèrica
PLN	Nòduls limfàtics pancreàtics
pMHC	Combinació d'antigen unit a MHC (complex pèptid-MHC)
PP	Cèl.lules pancreàtiques productores de polipèptid
PTC	<i>Premature termination codon</i>
RAG	Gens activadors de la recombinació
RSS	Seqüències senyal de recombinació
SCF	<i>Stem cell factor</i>
S-MZ	Zona marginal esplènica.
SI	Sistema immunitari.
SP	Cèl.lules single positive
TCR	Receptor de la cèl.lula T

TRA	Locus germinal de la cadena alfa del TCR
TRB	Locus germinal de la cadena beta del TCR
TRD	Locus germinal de la cadena delta del TCR
Tregs	Cèl.lules T reguladores
TRG	Locus germinal de la cadena gamma del TCR
V $\alpha$ / TRAV	Fragments gènics de la zona variable de la cadena alfa del TCR
V $\beta$ / TRBV	Fragments gènics de la zona variable de la cadena beta del TCR

• ABREVIATURES •



## ❖ RESUM

Els limfòcits T autorreactius, responsables de la destrucció de les cèl.lules beta pancreàtiques en la DT1, presenten un repertori TCR esbiaixat segons s'ha demostrat al model experimental del ratolí NOD. Per a definir el repertori TCR autorreactiu en la diabetis humana, hem estudiat les poblacions i expansions monoclonals intra-illot d'un pàncrees de debut i les hem comparat amb les de la sang perifèrica i a la melsa del mateix individu.

L'estudi de les cèl.lules T intra-pancreàtiques ha mostrat un repertori divers però amb cinc expansions monoclonals per a les famílies gèniques V $\beta$ 1, V $\beta$ 7, V $\beta$ 11, V $\beta$ 17, i V $\beta$ 22. Mitjançant el  $\beta$ -CDR3, s'ha identificat la mateixa expansió monoclonal V $\beta$ 22 als illots i a la melsa, i també se n'ha detectat la seqüència en PBMCs. Per a valorar el biaix als TCR, s'ha analitzat 139 seqüències CDR3 de cadena beta de diferents clons infiltrants i s'ha observat una prevalença d'alguns aminoàcids a l'NDN, que indica una restricció allunyada de l'atzar. Les seqüències CDR3 de les cinc expansions monoclonals pancreàtiques (incloent la comú a la melsa) s'ajusten a la restricció en NDN definida a partir dels limfòcits del pàncrees. El sub-clonatge i la expansió *in-vitro* (amb extracte d'illots i anti-CD3) de l'infiltrat pancreàtic, ha mostrat una alteració del repertori original però ha permès aïllar un clon present a l'infiltrat que expressa un doble TCR i que manté també els paràmetres de restricció definits a l'infiltrat original.

El clon V $\beta$ 22 s'ajusta a la restricció de  $\beta$ -CDR3 establerta a l'infiltrat, i representa la única expansió monoclonal del pàncrees observada a la sang perifèrica i la melsa de l'individu. Aquest clon, es podria haver expandit o acumulat *in situ* per la presència d'un autoantigen comú en ambdós òrgans i d'aquesta manera es postula que la melsa de l'individu podria contribuir a la perpetuació de la malaltia per expansió o retenció d'alguns clons T autorreactius.



# INTRODUCCIÓ



## ❖ INTRODUCCIÓ

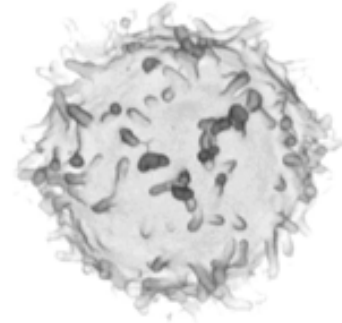
La funció del sistema immunitari (SI) és la defensa de l'organisme contra una gran varietat de patògens (bacteris, fongs i paràsits) desenvolupant una resposta adaptada a cada tipus. En cas d'una infecció es posen en marxa els mecanismes de la immunitat innata i si no són suficients per eliminar el patògen, s'activa la resposta adaptativa o específica. Un cop eliminat l'agent infecciós es torna a un estat de repòs per tal de mantenir l'homeòstasi del SI. La tolerància vers estructures pròpies es dona gràcies al mecanisme de la tolerància central als òrgans limfoides primaris, on s'eliminen els limfòcits autorreactius. Les cèl.lules T pateixen un procés de maduració al timus, però l'eliminació de cèl.lules T autorreactives no és completa i un cop emigren queden sotmeses als mecanismes de tolerància perifèrica. El trencament de la tolerància es dona quan es reconeixen estructures pròpies com a antígens estranys, donant lloc a una resposta auto-reactiva que condueix a l'autoimmunitat. L'etiopatogènia de les malalties autoimmunitàries és encara desconeguda, però els mecanismes efectors són, en molts casos, limfòcits T CD4+ i CD8+. La Diabetis tipus I (DT1) és un exemple de malaltia autoimmunitària òrgan-específica en la que es produeix la destrucció de les cèl.lules  $\beta$  pancreàtiques, productores d'insulina, per part de cèl.lules T autoreactives.



## 1. LIMFÒCITS T

### 1.1. Característiques i subpoblacions de limfòcits T.

Els limfòcits (**Figura 1**) són les cèl.lules del SI encarregades de dur a terme la resposta immunitària adaptativa, recirculen per la sang i la limfa i són capaços de migrar als òrgans limfoides i teixits. Els limfòcits es poden dividir en dues grans poblacions: els limfòcits B encarregats de dirigir la resposta humoral, on el mecanisme efector són els anticossos que neutralitzen toxines i opsonitzen patògens, i els **limfòcits T**, responsables de la immunitat cel.lular mediada per cèl.lules T efectores i macròfags activats.



**Figura 1.**  
**Limfòcit** en Microscopia  
 Electrònica de Scanning.  
 De: artnscience  
 (<http://s297.photobucket.com/albums/mm236/artnscience/>).

Els limfòcits T maduren al timus des d'on surten a circulació com a cèl.lules T madures o pre-immunes. Les cèl.lules T reconeixen antigen a través d'un receptor especialitzat denominat **receptor de cèl.lula T (TCR)** que interacciona amb les molècules del Complex Principal d'Histocompatibilitat (MHC) encarregades de presentar pèptids procedents d'antígens processats. El TCR està constituït per dues cadenes polipeptídiques i s'ha descrit dos tipus de poblacions de limfòcits T depenent del tipus de cadenes que el formen: els limfòcits T alfa-beta ( $\alpha\beta$ ), de TCR format per una cadena alfa i una beta, i els gamma-delta ( $\gamma\delta$ ), de TCR format per una cadena gamma i una delta. Els limfòcits T $\alpha\beta$  són majoritaris en circulació (90-99% de les cèl.lules T madures perifèriques en humans) [1] i els millor estudiats en quant a la seva funció i la seva implicació en autoimmunitat. Els limfòcits T  $\gamma\delta$  són més desconeguts i diferents als  $\alpha\beta$  tant en la distribució, principalment en mucoses, funció implicada en la defensa en aquestes localitzacions tant exposades a patògens, i gran restricció del seu TCR.

Els limfòcits T  $\alpha\beta$  es divideixen en diferents subpoblacions segons la seva funció en la resposta:

- **Els Limfòcits T col.laboradors (o *helper*):** Expressen el co-receptor **CD4** i el seu mecanisme efector és la síntesi de citocines. S'han definit diferents subpoblacions de limfòcits T CD4<sup>+</sup> amb funcions efectores diferents depenent del patró de citocines que produeixen, com són:

- › **Les cèl.lules Th1** productores d' IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  i IL-2 estan implicades en la resposta cel.lular activant la funció bactericida dels macròfags, provocant la proliferació de cèl.lules T citotòxiques entre altres accions. La seva inducció està relacionada amb el factor de transcripció de llinatge cel.lular T-Bet.

- › **Les cèl.lules Th2** productores d' IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13. IL-4 i IL-5 estan relacionades amb el canvi d'isotip a IgE. La resposta Th2 és important enfront a paràsits , en que sensibilitza els mastòcits i els activa provocant la contracció muscular i la inflamació, i en al.lèrgies. La seva inducció està relacionada amb el factor de transcripció de llinatge cel.lular GATA3.

- › **Les cèl.lules Th17** sintetitzen IL-17, una citocina pro-inflamatòria que activa, en fibroblasts i cèl.lules epitelials, la síntesi de CXCL8, una quimiocina que indueix la quimiotaxis de neutròfils contribuint al manteniment del focus inflamatori. La seva inducció està relacionada amb el factor de transcripció de llinatge cel.lular ROR $\gamma$ t.

- **Els Limfòcits T citotòxics (LTC):** Expressen a la seva membrana el co-receptor **CD8**. La funció citotòxica resulta de la inducció d'apoptosi a les cèl.lules diana pel mecanisme del Fas-Fas-L o per lliurament de mediadors anomenats perforines i granzimes.



- **Les Cèl.lules T reguladores:** Actuen inhibint la proliferació de les cèl.lules T efectores. Tot i que és desconegut el mecanisme supressor, són molt importants en el manteniment de l'homeòstasi del SI ja que l'absència d'aquestes poblacions cel.lulars s'associa a fenòmens d'autoimmunitat generalitzada.

- › **Les nTregs (T reguladores naturals)** són cèl.lules CD4<sup>+</sup> que es caracteritzen per presentar, des de que surten del timus, alts nivells d'expressió de la molècula **CD25** (cadena alfa del receptor de la IL-2) i la capacitat reguladora. La seva inducció està relacionada amb el factor de transcripció de llinatge cel.lular FOXP3 i produeixen les citocines reguladores IL-10 i TGF- $\beta$ .

- › **Les cèl.lules T reguladores induïdes** inclouen les **iTregs** que s'indueixen en perifèria durant la resposta immune quan en la seva activació expressen el factor FOXP3 i adquireixen un fenotip regulador de manera transitòria. Altres cèl.lules reguladores induïdes en perifèria són **les Tr1 i les Th3**, que produeixen elevades quantitats de IL-10 o TGF $\beta$  respectivament, ambdues de funció immunomoduladora.

- **Les Cèl.lules NKT:** Representen un percentatge molt baix dels limfòcits circulants i es caracteritzen per secretar elevades quantitats de citocines quan s'activen. Les cèl.lules NKT **invariants** (iNKT) expressen un TCR molt restringit, que en humans està format per una cadena alfa amb els segments gènics V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 i un repertori restringit de cadenes V $\beta$ . Reconeixen CD1d com a molècula presentadora i glicolípidis com a antígens, pel que s'implica aquestes cèl.lules en la immunitat innata. S'han descrit altres cèl.lules NKT que reconeixen les altres isoformes del CD1 (a, b i c).

## 1.2. TCR (*T cell receptor*)

El receptor d'antigen de la cèl.lula T (TCR), és un heterodímer ancorat a la membrana, format per dues cadenes polipeptídiques unides entre sí per un pont disulfur. Aquestes cadenes tenen una part transmembrana i una intracitoplasmàtica molt curta, de manera que el TCR va sempre acompanyat d'un complex molecular multicatenari anomenat CD3, necessari per l'expressió i transducció de senyals del TCR [2]. El receptor (TCR)  $\alpha\beta$  és el majoritari entre els limfòcits T madurs i reconeix els pèptids presentats al context de glicoproteïnes de MHC (HLA en humans) classe I o II, depenent de la ruta en que les proteïnes són processades[1, 3, 4].

Cadascuna de les cadenes del TCR està formada per un domini variable (V), que es genera per reordenament de segments gènics, i un domini constant (C) els quals es pleguen donant lloc a dues làmines beta antiparal.leles unides per un pont disulfur, una característica estructural de la superfamília de les immunoglobulines (Figura 2). Dins el domini V hi ha tres regions d'hipervariabilitat, emmarcades per regions de seqüència més conservada (*framework regions*). Aquestes regions s'anomenen CDR (regions determinants de complementaritat), ja que formen una superfície complementària a la superfície d'interacció amb pMHC i és on es concentra la major variabilitat entre els diferents TCRs [5-7].

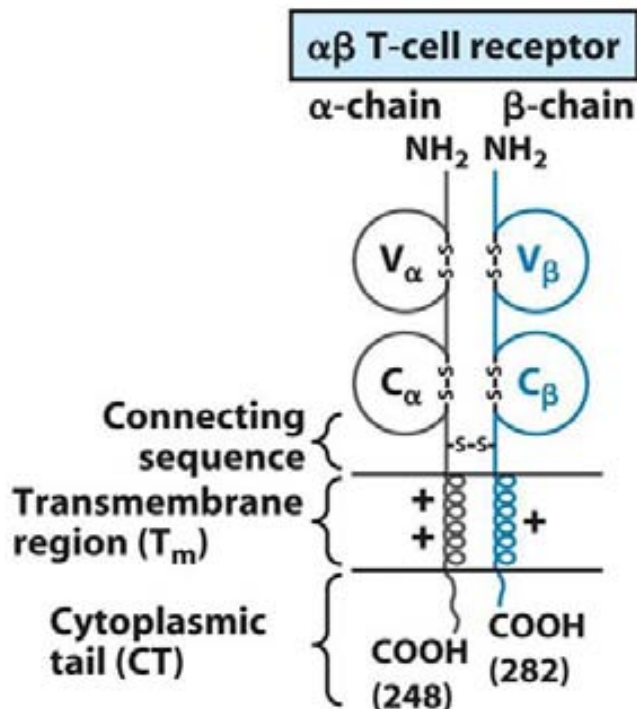


Figura 2. Esquema del TCR  $\alpha\beta$ .

De: Kuby Immunology. W.H. Freeman, 6th ed. 2007.

### 1.2.1. Reordenament del TCR: Generació de diversitat.

Per tal d'enfrontar-se a l'enorme diversitat d'antígens ambientals, l'organisme processa un vast repertori de cèl·lules T que, a nivell combinatorial arriba a l'ordre de  $10^{16}$  i, després de superar les seleccions positiva i negativa, donen un nombre de TCRs diferents aproximadament de  $10^7$  en humans (i  $10^6$  en ratolí). Aquesta gran diversitat de TCRs es genera per reordenament dels dominis variables del TCR i reflexa la possibilitat de reconèixer infinites combinacions d'antigen unit a MHC (complex pèptid-MHC). [8, 9]

El genoma humà inclou quatre *loci* germinals del TCR: TRA (14q11.2), TRB (7q34), TRG (7p14), i TRD (14q11.2), estant aquest últim inclòs dins el *locus* TRA. Aquests *loci* contenen quatre grups de segments gènics diferents: V (*variable*), D (*diversity*, només en TRB i TRD), J (*junction*) i C (*constant*). Els quatre tipus de gens estan compostos per subgrups o famílies gèniques que comparteixen almenys un 75% d'identitat a nivell de nucleòtids [1, 10]. La recombinació en el DNA germinal d'un segment V, un D (només per les cadenes  $\beta$  i  $\delta$ ) i un J constitueix un gen VDJ o VJ que codificarà pel domini variable de la cadena polipeptídica, al que li seguirà un gen C que codificarà per la part constant [1] **(Figura 3)**.

Dels tres *loops* hipervariables de les cadenes del TCR, CDR1 i 2 són codificats al segment gènic V. CDR3, en canvi, es dona en la unió entre els segments gènics V i J (i els segments D en les cadenes TRB). La diversitat de CDR3 és significativament incrementada per l'adició i deleció de nucleòtids en dos passos de la unió entre segments gènics. Els nucleòtids afegits s'anomenen N- (*non template encoded*). La diversitat N-, resulta de la deleció de nucleòtids als extrems dels segments gènics codificants V, D i J, per acció d'una endonucleasa, i a l'adició a l'atzar de nucleòtids per part de l'enzim TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*), [1, 11] **(Figura 3)**.

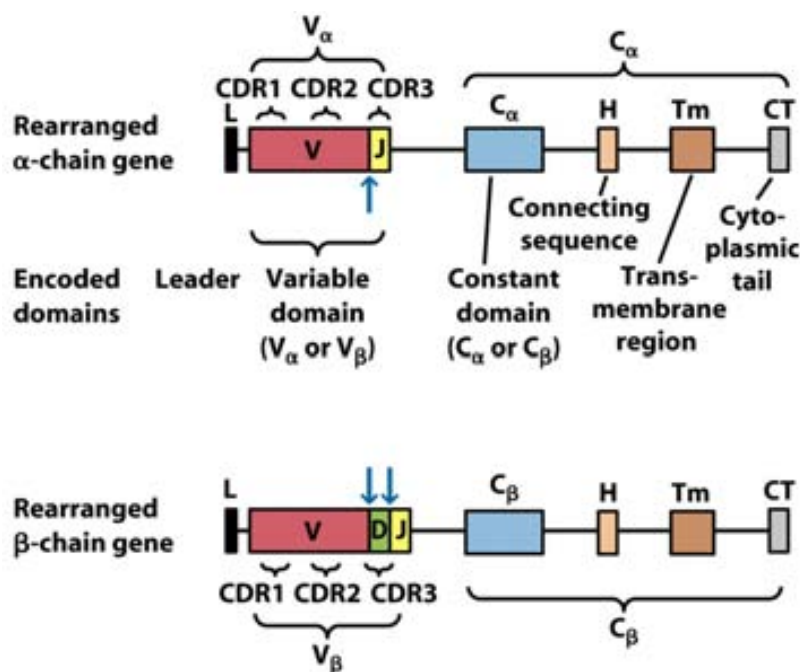


Figura 3. Esquema del reordenament dels gens  $\alpha\beta$ , mostrant els exons que codifiquen els diferents dominis del receptor i la posició aproximada dels CDR. La regió hipervariable CDR3 inclou l'extrem final del segment V, D sencer i el principi de J, incloent els nucleòtids N entre V-D i D-J. De: Kuby Immunology. W.H. Freeman, 6th ed. 2007.

### 1.2.1.1. Cadena alfa (TRA).

El grup de gens V de la cadena alfa està format per 54 gens (TRAV segons la nomenclatura actual) dels quals 43-45 gens són funcionals i es troben agrupats en 32-34 subgrups o famílies (en l'última actualització a Juliol de 2011, *www.IMGT.org*). Els gens J estan constituïts per un total de 61 TRAJ dels quals 50 són funcionals i la part constant de la cadena alfa està codificada per un únic gen (TRAC) (segons *www.IMGT.org* a Juny de 2011) [12-14]. Per a la síntesi de la cadena alfa del TCR, es donarà primerament la unió d'un dels gens V amb un dels J, delectant-se el DNA que els separa. El DNA reordenat VJ és reconegut per la polimerasa que comença a transcriure en un transcrit immadur, que inclou des de VJ fins al gen C, i madura a un mRNA que conté només la part codificant VJC i serà traduït en una cadena alfa (veure **Figura 4**). [15]

## 1.2.1.2. Cadena beta (TRB).

El *locus* de la cadena beta conté en 64-67 gens TRBV (40-48 funcionals) agrupats en 30 famílies (21-23 famílies funcionals) (en la última actualització a Juliol de 2011, *www. IMGT.org*); dos gens TRBD, 14 TRBJ i dos gens TRBC (segons *www. IMGT.org* a Juny de 2011). La disposició d'aquests gens és diferent ja que els gens V estan seguits d'un *cluster* duplicat D-J-C (**Figura 4**): el primer format per un gen TRD1 seguit per sis TRBJ i el TRBC1; i el segon per TRBD2, vuit TRBJ i el gen TRBC2. [16-18]. Per la síntesi de la cadena beta són necessaris dos reordenaments successius: el primer uneix un dels gens D amb un dels J i el segon un gen V amb el DJ. De la mateixa manera que les cadenes  $\alpha$ , el gen VDJ es transcriu finalment en un mRNA madur que conté el reordenament seguit del gen C (**Figura 4**). [1, 19]

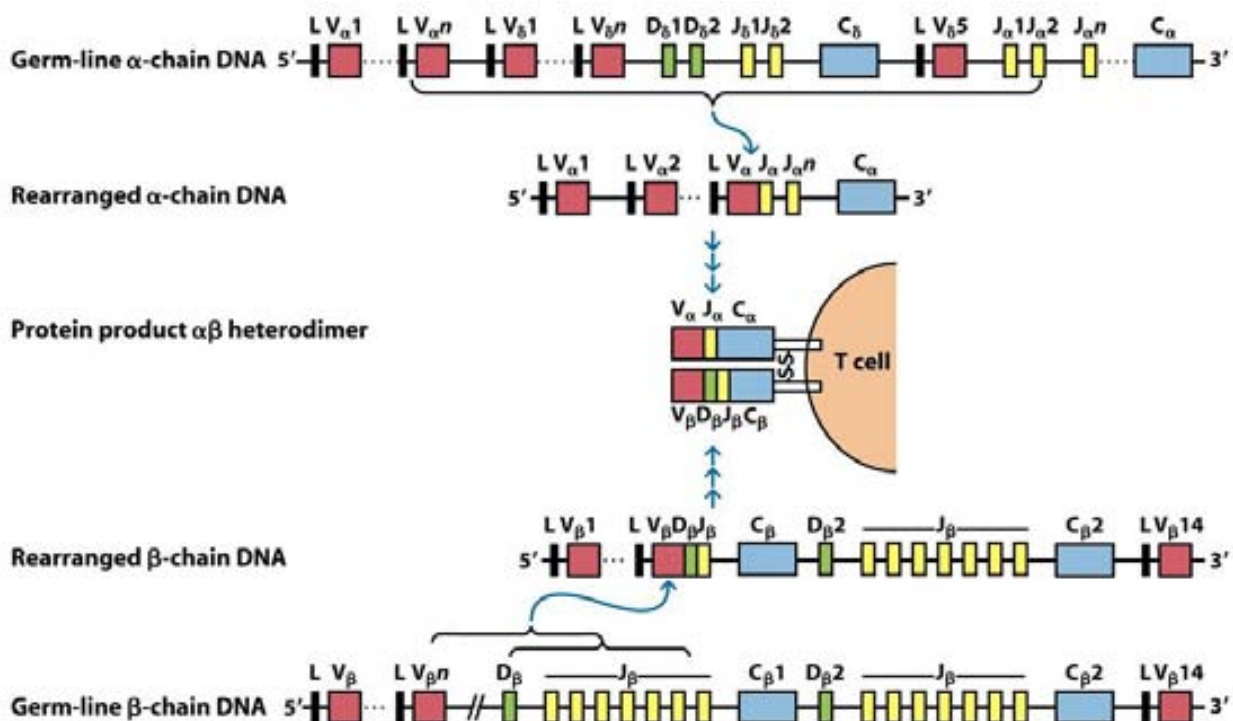


Figura 4. Esquema del reordenament i expressió en humans de les cadenes alfa i beta del TCR.

De: *Kuby Immunology*. W.H. Freeman, 6th ed. 2007.

1.2.1.3. *Mecanisme del reordenament del TCR: Recombinació amb exclusió al·lèlica.*

- *Recombinació*

Els mecanismes del reordenament del DNA germinal del TCR són similars als descrits pel BCR (*B cell receptor*). L'enzim recombinassa reconeix les senyals de recombinació (RSS), formades per un heptàmer i nonàmer conservats, que es troben flanquejant cada gen V, D i J germinal (a 3' dels fragments gènics V, 5' dels J i a 5' i 3' dels D). Les seqüències heptàmer i nonàmer estan separades per 12±1 o 23±1 nucleòtids i la recombinació és efectiva entre senyals separats per un espaiador de 12±1 i un de 23±1 parells de bases (regla del 12/23), impedit-se reordenaments entre dos gens V o dos J. Pel contrari, els fragments gènics TRBD (i TRDD) tenen un espaiador de 12pb en 5' i un de 23pb en 3', de manera que possibilita reordenaments V-D-D-J (rars per al *locus* TRB però bastant freqüents en TRD) [20]. [1, 11]

En la majoria casos per al *loci* del TCR, els segments gènics a unir V i J o D-J) estan en la mateixa orientació de transcripció al DNA i el reordenament es dona per **unió delecional**. Si es troben en orientació transcripcional oposada, es forma una **nansa d'inversió** i el DNA intermitg queda retingut al cromosoma en orientació invertida. Aquest darrer cas s'exemplifica per als reordenaments de TRBV31 murina i TRBV30 humana (localitzades més enllà del segment TRDC2). [1, 11, 21]

En la recombinació, les seqüències RSS s'uneixen mitjançant interaccions entre proteïnes que reconeixen específicament la mida de l'espaiador, llavors la molècula de DNA es trenca i es relliga amb una configuració diferent. La recombinació es dona als extrems de les seqüències heptàmer en RSSs, creant la **unió senyal** i alliberant el DNA intermitg quant els segments a unir estan en direcció directa, seguidament la unió dels segments gènics que queden al cromosoma crea la **unió codificant**. [11]

El complex enzimàtic que porta a terme la recombinació s'anomena **recombinasa V(D)J**. Els components limfoid-específics de la recombinasa s'anomenen **RAG-1** i **RAG-2** i són codificats per dos gens activadors de la recombinació (*RAG-1* i *RAG-2*) que s'expressen en timòcits només al moment de reordenar el seu TCR, [22]. Les altres proteïnes del complex recombinassa són principalment proteïnes modificadores de DNA ubiqües, involucrades en la reparació dels trencaments de DNA de doble cadena i la modificació dels extrems de cadenes de DNA trencades. Són: l' heterodímer **Ku**, que forma un anell al voltant del DNA i s'associa amb una subunitat catalítica pteoin kinasa, DNA-PKcs, per a constituir la **protein kinasa DNA-dependent (DNA-PK)**; la proteïna **Artemis**, que té activitat nucleasa; i l'enzim **DNA lligasa IV** que forma un complex amb la proteïna de reparació de DNA **XRCC4**. [11]

Inicialment, dos complexos proteics RAG (constituïts per RAG-1 i RAG-2) reconeixen i alineen ambdues RSSs que acoten la reacció de tall, s'estableix la regla 12/23, l'activitat endonucleasa dels complexos proteics RAG, produeix dos trencaments de cadena simple al DNA en 5' de cada RSS unida, deixant un grup 3'-OH lliure al final de cada segment codificant. El grup 3'-OH crea un "hairpin" a l'extrem de la regió codificant del segment gènic i produeix un trencament de doble cadena als extrems de les seqüències dels dos heptàmers. Els extrems 5' del DNA es mantenen units per **Ku** i són lligats per un complex de **DNA lligasa IV** i **XRCC4** per formar la **unió senyal**. [11, 22]

La formació de la **unió codificant** és més complexa però es dona més ràpid que la unió senyal. Els extrems del DNA amb *harpins* segueixen units per **Ku**, que recluta la subunitat DNA-PKcs. **Artemis** és reclutada per al complex, és activada per fosforilació amb **DNA-PK** i llavors obre els *harpins* fent un *nick* de cadena simple al DNA. Aquest *nick* es pot donar en diferents punts del *harpin*, fet que dona variabilitat de seqüència en la unió final. Els enzims de reparació de DNA en el complex, modifiquen els *harpins* oberts **eliminant nucleòtids**, mentre que al mateix temps l'enzim **TdT** (*terminal deoxynucleotidyl*

*transferase*), que és també part del complex recombinassa, **afegeix nucleòtids** a l'atzar als extrems de cadena simple (**nucleòtids N-** del CDR3). L'addició i deleció de nucleòtids pot ocórrer en qualsevol ordre. Finalment la **DNA lligasa IV** uneix els extrems processats, reconstituïnt el cromosoma que inclou el gen reordenat. Aquest procés de reparació crea diversitat en la unió entre segments gènics. [11, 22]

Degut a que el nombre total de nucleòtids afegits en la recombinació és a l'atzar, aquest fet amb freqüència altera la pauta de lectura de la seqüència codificant a partir del punt d'unió. Aquestes alteracions impliquen la pèrdua de la proteïna funcional i per tant són reordenaments no-productius. Dos de cada tres reordenaments ho són.

- *Exclusió al·lèlica.*

El procés de recombinació somàtica i síntesis de les cadenes del TCR es produeix al timus durant la maduració i diferenciació del limfòcit, i es dona en un ordre determinat. En el cas dels limfòcits  $\alpha\beta$ , el primer *locus* que es reordena és el de la cadena  $\beta$ , si el reordenament de la cadena és productiu, el reordenament de l'al·lel  $\beta$  de l'altre cromosoma queda inhibit. Aquest fenomen es coneix amb el nom **d'exclusió al·lèlica** i té com a conseqüència que la majoria de cèl·lules T expressen un únic TCR. Seguidament, es dona el mateix procés de reordenament per a la cadena  $\alpha$ . Tot i així, s'han descrit exemples, sobretot per la cadena  $\alpha$ , on hi ha reordenament dels dos al·lells. S'ha identificat que fins un terç dels limfòcits T madurs expressen dues cadenes  $\alpha$  i per tant dos TCR  $\alpha\beta$  diferents en membrana [23] i una petita (sobre un 1%) de les cel·lules T humanes perifèriques s'ha trobat que expressin dos  $V\beta$ s diferents [24, 25].



### 1.3. Reconeixement d'antigen: Funció dels limfòcits T

#### 1.3.1. Complex TCR-pMHC.

La resposta funcional dels limfòcits T s'inicia amb el reconeixement específic pel TCR de complexos p-MHC expressats a la superfície de les APC (Figura 5), que genera senyals bioquímiques al nucli de la cèl.lula T per a la seva activació, proliferació i diferenciació en cèl.lula efectora [9]. Un sol p-MHC a la superfície d'una cèl.lula presentadora d'antigen (APC) pot, seqüencialment, provar fins 200 TCR's  $\alpha\beta$  [26] gràcies a les baixes afinitats i les ràpides taxes de dissociació que s'ha mesurat per les unions TCR-pMHC, i al fet de l'existència potencial d'infinits TCRs. [27, 28]

- *MHC*:

L'**MHC** (*Major Histocompatibility Complex*) consisteix en un complex gènic codificat al cromosoma 6 en humans (cromosoma 12 en ratolí) on es localitzen gens de proteïnes implicades en la presentació i el processament d'antigen.

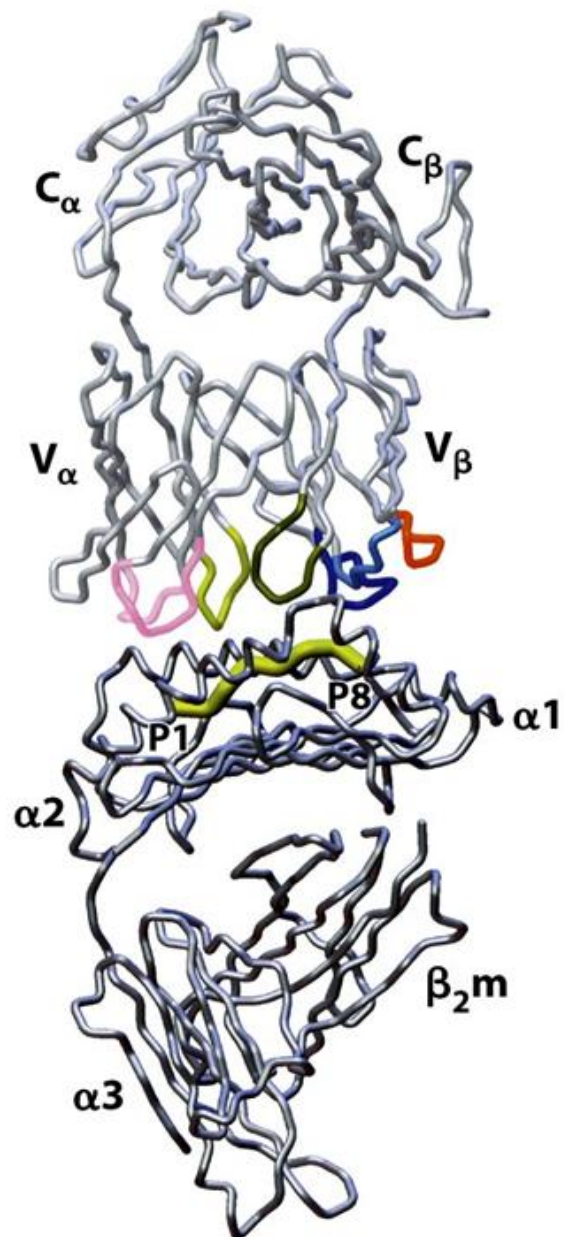


Figura 5. Interacció TCR-pMHC classe I. Diagrama del complex ternari de TCR unit a MHC i pèptid (verd). CDR1 i 2 de la cadena alfa s'indiquen de color rosat, CDR1 i 2 de la cadena beta s'indiquen en blau i CDR3 d'ambdues cadenes en verd. De: *Kuby Immunology*. W.H. Freeman. 6th ed. 2007.

**Les molècules de MHC clàssiques** són de dos tipus, de classe I (MHC-I) i de classe II (MHC-II), i la seva funció és la de presentar pèptid a la superfície de les cèl·lules que les expressen. Les molècules del MHC necessiten unir en la seva estructura pèptids de certa mida procedents de la degradació proteica cel·lular, per adquirir estabilitat, plegar-se correctament i expressar-se a la membrana. [15].

En les molècules d'MHC classe I, la zona d'unió a pèptid està formada pels dominis  $\alpha 1$  i  $\alpha 2$  de la cadena pesada  $\alpha$ , la qual s'ancora a la membrana amb el domini  $\alpha 3$  i s'associa a una subunitat de cadena lleugera addicional, la  $\beta 2$ -microglobulina ( $\beta 2m$ ), (**Figura 5**). Les molècules de classe II estan formades per dues cadenes pesades ancorades a la membrana,  $\alpha$  i  $\beta$ , que mitjançant els dominis  $\alpha 1$  i  $\beta 1$  formen el lloc d'unió a pèptid. En ambdues classes d'MHC, l'estructura del lloc d'unió a pèptid és la mateixa, on una làmina beta de set segments representa la base del solc d'unió i els laterals estan formats per dues hèlix-  $\alpha$ . Residus polimòrfics es situen dins i al voltant de la ranura d'unió, amb la finalitat de proporcionar la diversitat requerida, en propietats químiques i forma, que proporciona els motius d'unió específics de cada al·lel d'MHC. [11, 29]

Les molècules d'MHC classe I, uneixen pèptids de 8-10 residus (majoritàriament nonàmers), incloent els extrems i els residus d'anclatge en solcs (*pockets*) que varien entre al·lells i que permeten la unió de repertoris de pèptids diferents, [30, 31]. Els pèptids més llargs poden unir-se per extensió a C-terminal o, a causa de la fixació dels seus extrems, sobresortir de la ranura d'unió i proporcionar una superfície addicional per al reconeixement del TCR, [32-34]. En l'MHC de classe II, la ranura és oberta per ambos laterals i els extrems del pèptid no es fixen, de manera que els pèptids solen ser molt més llargs que en l'MHC de classe I (15-20aa), i queden units en conformació estesa amb els extrems sobresortint a cada banda. [29, 32]

### 1.3.2. Co-receptors i molècules accessòries.

A part del TCR, en la cèl.lula T hi ha altres molècules que intervenen en el reconeixement d'antigen i són necessàries per dur a terme la seva activació completa: els **co-receptors** i les **molècules accessòries**.

La **primera senyal** d'activació de la cèl.lula T està constituïda per la interacció del TCR-pMHC i el **co-receptor** CD4 o CD8. Les cadenes  $\alpha\beta$  del TCR no posseeixen dominis de senyalització intracel.lular, però estan unides al CD3, complex multicatenari format per 4 cadenes diferents  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  i  $\zeta$  que interactuen en forma de dímers ( $\epsilon\gamma$ ,  $\epsilon\delta$  i  $\zeta\zeta$ ). Les regions intra-citoplasmàtiques de les cadenes CD3 contenen motius ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activation motif*) implicats directament en la transducció de la senyal d'unió a antigen enviada pel TCR [15]. La primera senyal es completa amb la senyalització del coreceptor, que interacciona amb regions conservades de les molècules de MHC de classe II i classe I, respectivament. [15] **Figura 6**.

Per altra banda, la interacció de la cèl.lula T necessita de les **molècules accessòries** com CD2, LFA-1, CD28 i CD45R, que interaccionen amb lligands expressats a les APC o la cèl.lula diana. La interacció entre CD28 i el seus lligands CD80 i CD86 constitueix el que s'anomena **segona senyal**, necessària per la completa activació de la cèl.lula T. [15] **Figura 6**.

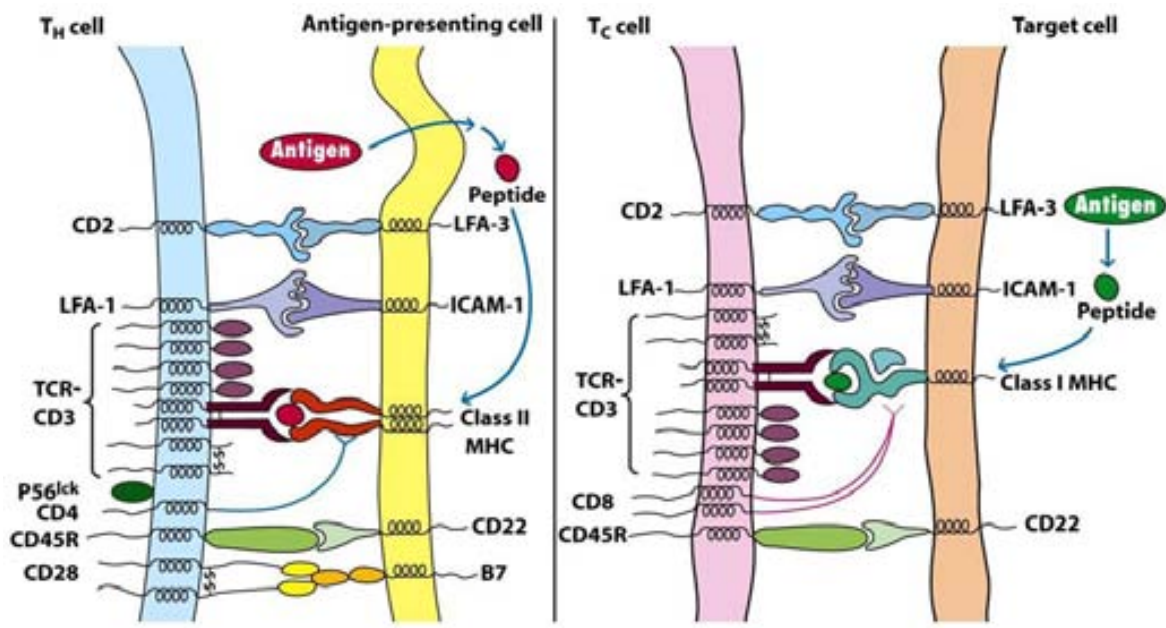
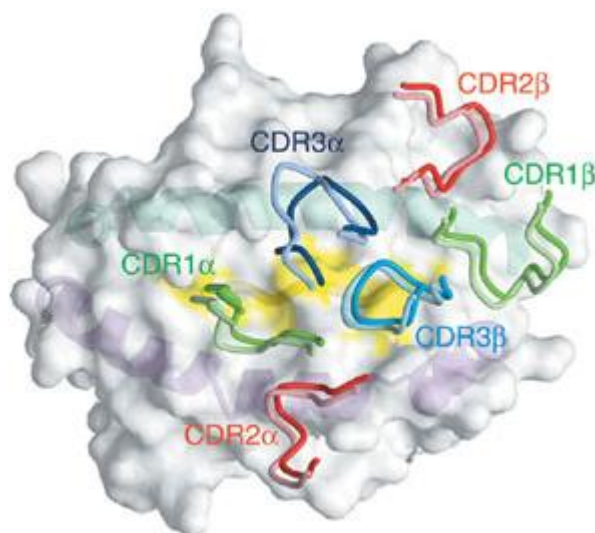


Figura 6. Esquema de les molècules principals del complex de sinapsi immunològica. **Correceptors.** Diagrama esquemàtic de les interaccions entre TCR i p-MHC i de diverses molècules accessòries amb els seus lligands, en la cèl·lula presentadora d'antigen (esquerra) i cèl·lula diana (dreta). De: *Kuby Immunology. W.H. Freeman, 6th ed. 2007.*

### 1.3.3. Interacció TCR-pMHC: Importància de les regions CDR3 del TCR.

Quinze anys després de que es descriguessin les primeres estructures cristal·logràfiques del receptor TCR  $\alpha\beta$  unit a p-MHC classe I [3, 4], la interacció TCR-pMHC encara representa una incògnita, principalment perquè la zona d'unió es divideix funcional i estructuralment en varis components que formen col·lectivament superfícies compostes. La zona del TCR d'unió a p-MHC inclou els components variables pre-codificats genèticament, CDR1 i CDR2, a més dels components generats en la recombinació somàtica, CDR3. Per altra banda, la part del MHC visible per al TCR consisteix en una zona de plegament helicoidal bastant conservada però que inclou una altra part molt variable donada per la diversitat dels pèptids presentats [29, 35, 36], **Figures 5 i 7.**

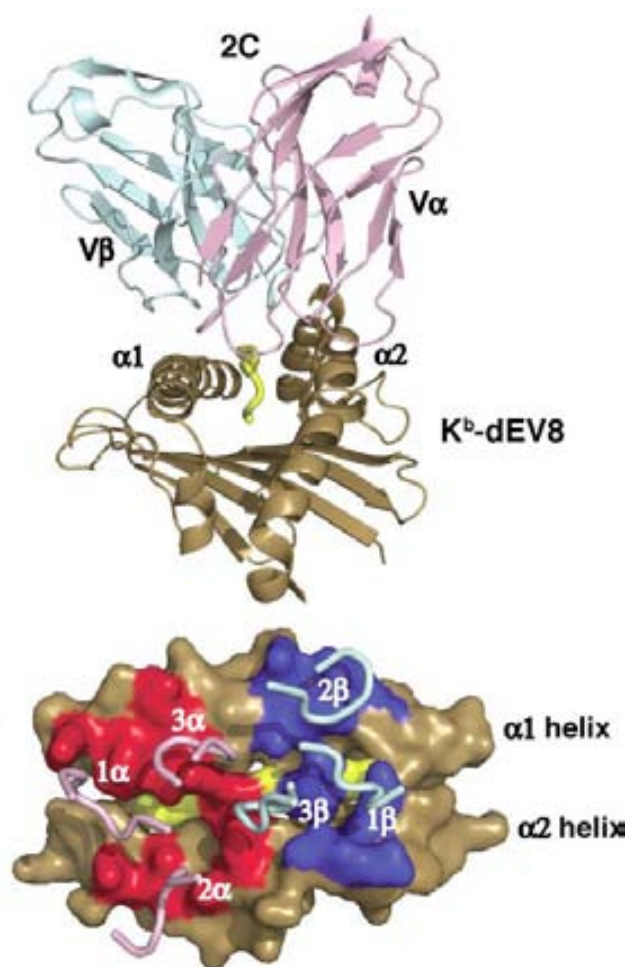
Els contactes de cada *loop* CDR amb el complex pMHC són diversos i encara no hi ha conclusions definitives sobre la seva contribució en la unió TCR-pMHC. Des de 1996, s'ha desenvolupat una base de dades amb multitud de cristalls de complexos TCR-pMHC (actualment 66 TCR-pMHC-I i 14 TCR-pMHC-II) (veure [www.IMGT.org](http://www.IMGT.org) o [www.pdb.org](http://www.pdb.org)). Els estudis de cristal·lografia de rajos X, plantegen un escenari en que el TCR s'aproximaria a pMHC en diagonal, impulsat per forces electrostàtiques de llarg abast o per mitjà d'un esdeveniment d'unió de baixa afinitat, i finalment utilitzaria la plasticitat inherent dels *loops* CDR per a maximitzar l'adaptació i contactar pMHC, determinant així el resultat final de l'acoblament [29]. S'ha mostrat que l'heterodímer TCR s'orienta aproximadament en diagonal respecte a l'eix llarg del solc d'unió de pMHC, i els *loops* CDR3, que són les regions més variables del TCR, es posicionen sobre el centre de la interfase d'unió on contacten directament amb el pèptid antigènic unit dins la cavitat de la molècula MHC, mentre que els elements més conservats del TCR (CDR1 i CDR2) i les hèlixs del MHC s'acoblen en contactes que envolten aquesta unió central CDR3-pèptid [3, 37-39], **Figura 8**.



**Figura 7. Orientació relativa dels *loops* CDR** (BM3.3 anclat en VSV8-H-2K<sup>b</sup>)

De: Reiser et. al. CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition. *Nature Immunology* (2003).

L' elevada variabilitat en seqüència i longitud dels *loops* CDR3 de la cadena  $\alpha$  i  $\beta$ , permeten la valoració de l'extensió i les característiques de la diversitat clonal entre repertoris T antigen-específics [7]. L'anàlisi de la seqüència de les regions CDR3- $\beta$  o CDR3- $\alpha$  es pot utilitzar per a determinar les característiques clonals d'una resposta T particular donat que, quant un clon s'expandeix, això queda reflectit amb l'augment d'un determinat CDR3 en relació a la resta de seqüències. Tot i el paper significatiu del segments gènics TRV, la major diversitat i per tant determinació de la especificitat d'antigen en la interacció TCR-pMHC, depèn principalment d'aquestes regions CDR3, amb una importància relativament major de la  $\beta$ -CDR3, [3, 37, 40].



**Figura 8. Orientació de *binding* del TCR 2C amb lligand pròpi.** Les cadenes  $\alpha$  i  $\beta$  del TCR 2C (en rosat i blau-cian) contacten amb p-MHC pròpi Kb-dEV8 en marró (groc el pèptid). Només es mostra la regió Fv del TCR i els dominis  $\alpha$ 1 i  $\alpha$ 2 de l'MHC. A la imatge inferior es mostra l'empremta dels *loops* CDR aïllats sobre la superfície del lligand. La superfície de contacte del 2C sobre el complex pMHC es remarca en vermell (V $\alpha$ ) i blau (V $\beta$ ).

De: L. A. Colf et al., *How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC*. Cell (2007)

#### 1.4. Mecanisme de la tolerància: Prevenció natural de l'autoimmunitat.

L'organisme compta amb els **mecanismes de tolerància central i de tolerància perifèrica** que seleccionen i controlen les poblacions de cèl.lules T (i B) que circulen en perifèria ja que un inconvenient de la generació de diversitat és la possibilitat de reconèixer estructures pròpies i desencadenar un fenomen d'autoimmunitat. Tot i la eficàcia del procés de la tolerància central, escapen a circulació perifèrica un petit percentatge de cèl.lules T amb TCRs autorreactius i es per això que els mecanismes de tolerància perifèrica, de regulació, s'encarreguen de mantenir-les inhibides. Una alteració en la selecció tímica o dels mecanismes de tolerància perifèrics poden conduir a l'activació de cèl.lules T autorreactives que poden desencadenar el trencament de la tolerància, un fet que és també influït per factors genètics, ambientals i infecciosos. [11, 41].

##### 1.4.1 Maduració dels limfòcits i tolerància central: La selecció tímica.

**La selecció tímica** és el primer nivell de regulació per generar un repertori de limfòcits T efectiu per reconèixer antígens externs però tolerant en front a estructures pròpies (**tolerància central**). L'eliminació per apoptòsi de limfòcits al timus és molt elevada, ja que la majoria dels timòcits corticals no sobreviuen a la selecció i només del 1-3% aconseguen sobreviure i sortir del timus. [11, 42-44]

Els precursors accedeixen al timus per les vènules post capil.lars, que es situen a la zona córtico-medular i per quimiotaxi migren a la zona subcapsular on comencen a proliferar en resposta a les citocines com la IL-7, produïdes per les cèl.lules epitelials de l'estroma subcapsular. Els timòcits passen per varies fases de desenvolupament, que son marcades per canvis en l'estatus dels gens i en la expressió del seu receptor TCR, alhora que per canvis en l'expressió de proteïnes de la superfície cel.lular com el complex CD3 i els co-receptors CD4 i

CD8. Quan els progenitors accedeixen al timus, des del moll de l'os, carèixen de la majoria de molècules de membrana i el seu TCR encara resta sense reordenar, les interaccions amb l'estroma tímica desencadenen una primera fase de diferenciació en el llinatge de les cèl·lules T seguit de proliferació i expressió de les primeres molècules de superfície com per exemple CD2. Al final d'aquesta fase, la qual dura aproximadament una setmana, els timòcits presenten marcadors distintius del llinatge T però no encara cap dels marcadors de cèl·lules T madures, com són el complex CD3 i els co-receptors CD4 i CD8, així que aquestes cèl·lules s'anomenen **dobles negatives (DN)**. [11, 42-44]

Aquesta fase DN es subdivideix en quatre estadis segons la expressió de la molècula d'adhesió CD44, CD25 (la cadena alfa del receptor d'IL-2) i Kit (el receptor per SCF). Al principi, els timòcits DN expressen Kit i CD44 però no CD25; s'anomenen **DN1**. En l'estadi DN1, les cèl·lules T encara presenten els gens codificants d'ambdues cadenes del TCR en configuració nativa (sense reordenar). A mida que els timòcits maduren, comencen a expressar CD25 a la superfície i passen a ser anomenats **DN2**; el reordenament del *locus* de la cadena beta del TCR comença en l'estadi DN2 amb D $\beta$  a J $\beta$  i continua en l'estadi **DN3** amb el reordenament V $\beta$  a DJ $\beta$ . Quan la expressió de CD44 i Kit es redueix, s'anomenen DN3. Les cèl·lules que no aconsegueixen reordenar la cadena beta es mantenen en DN3 (CD44baix CD25+) i moren; les que en canvi aconsegueixen expressar la cadena beta, perden la expressió de CD25 i passen a l'estadi **DN4**, en la qual proliferen, **Figura 9**. [11]

En l'estadi pre-T DN3, reordenen el segment V-D-J al *locus* de la cadena  $\beta$  del TCR, que s'associa a una cadena pre-TCR  $\alpha$  invariant, l'anomenat **pre-T $\alpha$** . La interacció a través del pre-T $\alpha$  inhibeix el reordenament de l'altre al·lel de la cadena  $\beta$  (**fenomen de l'exclusió al·lèlica**, veure apartat 1.2.1.3) i indueix l'expressió de CD4 i CD8 i la seva proliferació, [42-44]. El pre-TCR s'expressa a la superfície cel·lular en complex amb les molècules CD3. La unió de CD3 i pre-TCR provoca proliferació cel·lular, inhibició de qualsevol altre reordenament



beta i l'expressió dels coreceptors CD4 i CD8, entrant en l'estadi de doble-positives, [11]. En l'estadi de **doble-positives (DP, CD4+ i CD8+)** es recombina V-J del *locus*  $\alpha$  i es sintetitza la cadena polipeptídica  $\alpha$  expressant ja una petita quantitat de TCR a la superfície cel.lular, formant-se el complex TCR-CD3. La estructura del locus alfa permet varis intents successius de reordenament, de manera que reordena correctament en la majoria dels timòcits. [11]

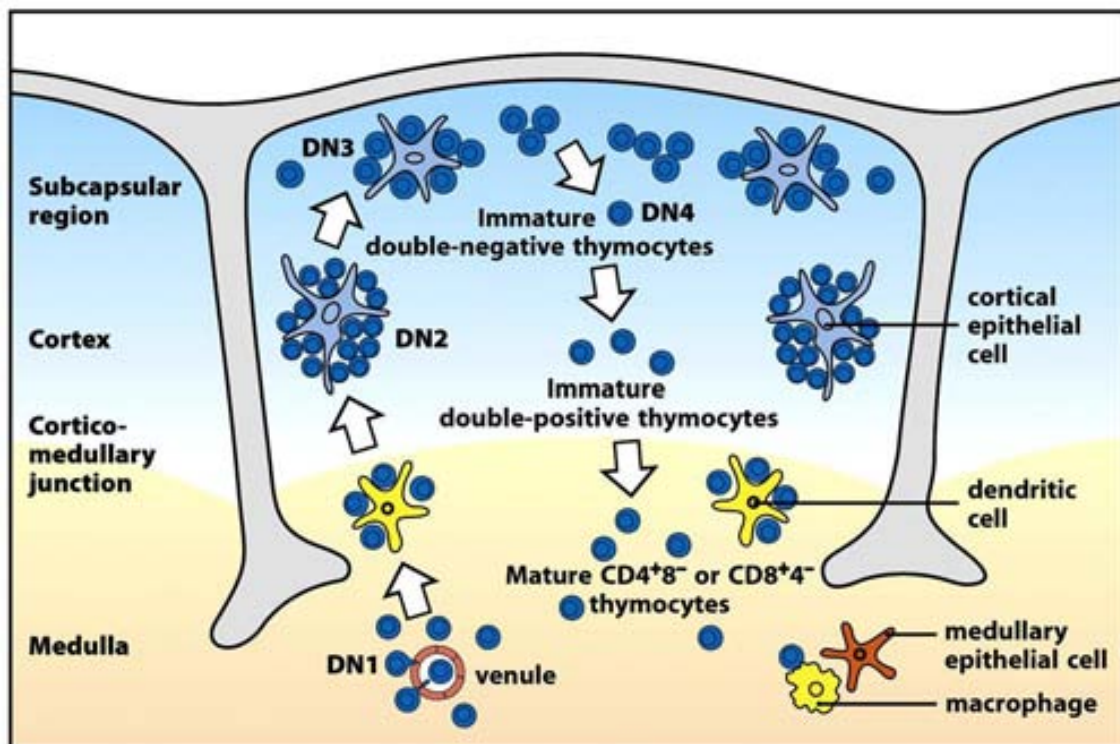


Figura 9. Esquema de la maduració dels limfòcits T al timus.

De: Murphy, K. et. al. Janeway's Immunobiology. 7th ed. 2008.

L'expressió del TCR permet al timòcit la possibilitat de contactar amb les cèl.lules que formen l'estroma tímica que expressen molècules d'MHC com són les cèl.lules epitelials corticals i medul.lars (cTEC i mTEC respectivament) i les cèl.lules dendrítiques (DC); i iniciar el procés de selecció que es divideix en dues etapes: **la selecció positiva i la negativa.**

**La selecció positiva**, es produeix sobre les cèl.lules DP principalment a la zona cortical. Els timòcits DP expressen inicialment baixos nivells de TCR. La interacció del TCR amb molècules de l'MHC indueix una senyal de supervivència per continuar el procés maduratiu, i passen a expressar alts nivells de TCR, mentre que els timòcits que no contacten moren per "abandonament" (*dead by neglect*). Els timòcits seleccionats maduren a l'estat SP (deixen d'expressar un dels dos coreceptors i esdevenen CD4 o CD8) i migren cap a la zona cortico-medul.lar i medul.la on passen **la selecció negativa**, procés pel que els timòcits que interaccionen amb elevada afinitat per complexos MHC-pèptid-propri moren per apoptòsi. Al contrari, les cèl.lules que interactuen amb baixa afinitat amb estructures pròpies, i que seran poc autoreactives, sortiran a circulació, per a formar el repertori perifèric [11, 42-44].

En ratolí, els timòcits tarden unes 3 setmanes entre la entrada dels progenitors al timus i la seva exportació en perifèria ja madures, [45]. Ha estat de gran rellevància per a comprendre com es selecciona el repertori en front a antígens restringits de teixit (TRA), el descobriment del factor de transcripció AIRE (*autoimmune regulator*) que representa un paper crucial controlant la expressió ectòpica d'alguns antígens tissulars a les mTEC, per exemple de la insulina [45].

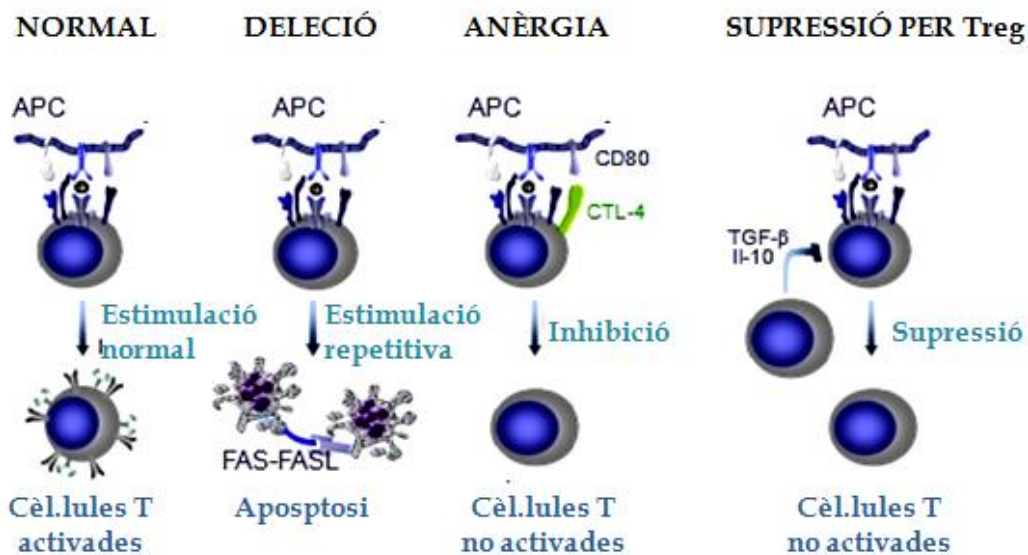
#### 1.4.2. Mecanismes de la tolerància perifèrica.

La prevenció de l'autoimmunitat, no s'aconsegueix únicament mitjançant la tolerància central sinó que consisteix en un conjunt de mecanismes, cadascun parcialment efectiu, que actuen coordinadament per aportar a l'organisme una protecció eficient contra l'autoimmunitat però sense inhibir la capacitat del sistema immunològic per a respondre efectivament als patògens. Tot i ser imprescindible, el procés de selecció que es dona al timus és incomplet ja que s'ha descrit la presència de cèl.lules autorreactives en individus sans, les quals es mantenen silents gràcies a l'acció dels **mecanismes de tolerància perifèrica**. [11, 46]

El manteniment de la tolerància perifèrica inclou varis mecanismes. Alguns són passius, com la **ignorància clonal** en que els autoantígens són ignorats pel SI, al mantenir-se segrestats al teixit d'origen o bé mancar-hi un estímul prou fort que recluti les cèl.lules autorreactives. I altres inclouen una acció d'immunomodulació activa com **l'anèrgia perifèrica** en que les cèl.lules autorreactives s'inactiven per falta d'un estímul prou fort i del co-estímul adequat, la **delecció clonal** en que es dona apoptosi de les cèl.lules post-activació, i sobretot la supressió per part de les **cèl.lules reguladores** sobre els clons autorreactius mitjançant certes citocines i senyals intercel.lulars, **Figura 10**. [11, 46, 47]. Aquest últim inclou els mecanismes de supressió mediada per cèl.lules reguladores, veure apartat 1.1, incloses en la població CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>.

Recentment, l'estudi de la tolerància s'ha centrat en aquesta població de cèl.lules, les **Tregs**, que podrien ser un nexa entre els processos de tolerància central i perifèrica. Aquesta, sembla ser una població de cèl.lules T CD4<sup>+</sup> que expressen CD25 de forma natural, es generen al timus on requereixen un mecanisme de selecció diferent a la resta de cèl.lules, donat que el seu TCR reconeix antígens amb elevada afinitat i la seva generació depèn del factor FOXP3.

Un cop a la perifèria tenen un paper molt rellevant en el manteniment de la tolerància ja que l'absència de FOXP3 indueix un síndrome d'autoimmunitat generalitzada tal i com s'ha descrit en la malaltia IPEX [48, 49] i en ratolí Scurffy [50]. Les cèl.lules T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> es detecten en la sang perifèrica humana i tenen la capacitat de suprimir *in vitro* la proliferació i la producció de citocines de les cèl.lules tant CD4<sup>+</sup> com CD8<sup>+</sup> mitjançant un sistema dependent de contacte, [51]. S'ha descrit el defecte de la capacitat supressora d'aquesta subpoblació CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en malalts d'autoimmunitat com l'esclerosi múltiple [52], el síndrome poliglandular autoimmunitari tipus II [53] i la diabetis T1 [51].



**Figura 10. Diferents formes d'inducció de la tolerància perifèrica dels limfòcits T.** A) Deleció en que es dona apoptosi induïda per estimulació repetitiva. B) Anèrgia o no-resposta per aparició de la molècula CTLA-4. C) Supressió per aparició de les cèl.lules T reguladores.

Adaptació pròpia de: T. Kamradt et. al. *Tolerance and Autoimmunity*. *N Engl J Med*. 2001.

[www.inmunologiaenlinea.es](http://www.inmunologiaenlinea.es)

## 2. DIABETIS Tipus 1. Malaltia autoimmunitària òrgan específica.

Les malalties autoimmunitàries es manifesten quan hi ha un trencament de la tolerància del SI a les estructures pròpies, encara que el mecanisme que les desencadena és desconegut. Es poden dividir en dos grups: les sistèmiques, que afecten a varis teixits ja que l'autoantigen és ubic, i les òrgan-específiques, on la resposta va dirigida contra un teixit o tipus cel.lular, com és el cas de la Diabetis de tipus 1 (DT1).

**La diabetis tipus 1 (DT1 o *insulin-dependent diabetes mellitus*, IDDM)** és conseqüència de la destrucció de les cèl.lules beta productores d'insulina dels illots de Langerhans del pàncrees. Aquesta pèrdua de cèl.lules beta, segueix a la infiltració leucocitària dels illots (insulitis) dirigida pels limfòcits T i resulta principalment en deficiència d'insulina i hiperglucèmia. L'inici clínic de la malaltia es manifesta, després d'un període asimptomàtic, quan ha desaparegut el 90% de les cèl.lules beta [54-57]. Els pacients presenten hiperglucèmia, cetoacidosi, glucosúria, i complicacions cròniques com l'aterosclerosi arterial progressiva que pot acabar en necrosi isquèmica de les extremitats i els òrgans interns i obstrucció microvascular amb lesió de la retina, glomèruls renals i nervis perifèrics. La DT1 es diagnostica més freqüentment en infants i adolescents, i la seva incidència varia segons la situació geogràfica. A Europa la major incidència ha estat descrita als països nòrdics i a Sardenya, mentre que al Japó la incidència és baixa [58].

La DT1 es classifica com una malaltia autoimmunitària per la presència de:

i) **Autoanticossos** contra els illots (ICA, *islet cell autoantibody*), insulina (IAA, *insulin autoantibodies*), descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD), *insuloma associated protein 2* (IA-2), etc. [59-62]. No es té clar però, si aquests autoanticossos poden contribuir a causar la malaltia o ser conseqüència de la lesió del teixit causada pels limfòcits T i l'alliberació anòmala d'antígens. [61]

ii) **Insulitis.** S'observen infiltrats leucocitaris dins i al voltant dels illots de Langerhans. [61, 63, 64]. La distribució espacial dels leucòcits en la insulitis associada amb la destrucció de les cèl.lules beta és intrigant ja que els illots de Langerhans tenen dues fronteres que els limfòcits no solen creuar normalment: L'endoteli que delimita la vasculatura de les glàndules endocrines i el teixit connectiu lax que forma la barrera entre els components endocrins i exocrins del pàncrees. Alguns leucòcits es localitzen dins l'illot però la majoria es concentren a la perifèria, estenent-se entre els espais tissulars entre les glàndules exocrines. Aquest continu d'infiltració limfocítica a la diabetis tipus 1 dins i al voltant de l'illot i entre els acinis, suggereix que les barreres normals contra la migració leucocitària entre els illots i els teixits exocrins es trenquen durant el procés de patogènesi.[65]

iii) **Limfòcits autorreactius.** En models animals es pot transferir la malaltia a receptors sans mitjançant la transferència de cèl.lules T autoreactives [64, 66]. L'especificitat dels limfòcits T autorreactius descrita és, principalment, contra epítops de la insulina, GAD i IA2 [67, 68]. En humans, el grup de Kent et al. [63] ha descrit cèl.lules T anti-insulina a partir de sang perifèrica d'un pacient diabètic i ha mostrat que la insulina és reconeguda per cèl.lules T presents als nòduls limfàtics propers a l'òrgan diana. A més, va analitzar els TCR i detectà restricció de cadenes  $\alpha$  i  $\beta$ , cosa que suggereix expansió oligoclonal en els malalts.

## 2.1. Causes: Predisposició per HLA i influència ambiental.

L'etiopatogènia de la diabetis T1 és encara desconeguda, tot i que es coneix que es una malaltia multi-factorial en que influeixen factors genètics de susceptibilitat i multitud de factors ambientals [62, 69], els quals inclouen principalment l'historial d'infeccions del pacient [70-72] i el contacte amb agents tòxics [73], però també la dieta [74, 75], la higiene i la salut [72, 76] i inclús la influència de factors psicosocials [77] i estocàstics [11].

Tot i que la DT1 és una malaltia poligènica (a novembre de 2011 s'han descrit més de 40 *loci* "IDDM" de susceptibilitat a la DT1 en humans i 27 *loci* "idd" en ratolí segons la base de dades de referència [www.t1dbase.org](http://www.t1dbase.org)), els gens que principalment contribueixen a la susceptibilitat de desenvolupar la malaltia corresponen a *locus* HLA de classe II [62, 78]. Depenent de la edat del debut, del 30% fins a un 50% dels pacients amb DT1 són heterozigots per a HLA-DQA1\*0501 DQB1\*0201 (DQ2) i DQA1\*0301 DQB1\*0302 (DQ8) associats als al·lels DR3 i DR4. La molècula HLA-DQA1\*0102 DQB1\*0602 (DQ6) associada a DR2 és relaciona en canvi amb protecció dominant respecte a la malaltia [79]. El paper proposat dels gens HLA en l'autoimmunitat, es basa en la especificitat d'unió d'aquests al·lels a certs pèptids procedents de la degradació dels autoantígens que dirigeixen la resposta autoimmune (com la insulina, GAD 65 o IA-2) [62, 69].

Sobre aquesta predisposició genètica, es postula que actuen els factors ambientals que poden desequilibrar la balança de l'homeòstasi immunitària cap al desenvolupament d'un procés d'autoimmunitat. Els factors ambientals, com per exemple algunes infeccions víriques (com el coxsackie virus [80-82], citomegalovirus [70] o el virus de la rubèola [71]), es postula que poden afectar aquest equilibri alliberant a l'organisme neo-autoantígens derivats d'estrès metabòlic o processos inflamatoris [83], molècules pro-inflamatòries [80] o

inclús mimòtops [82, 84, 85]. Aquests processos, augmenten el risc d'activar poblacions més o menys minoritàries de cèl.lules autorreactives prèviament circulants fins a un punt en que els mecanismes de regulació ja no ho poden compensar (sobretot si presenten alguna disfunció) i es desencadena el procés d'autoimmunitat, el qual sembla que esdevé retro-alimentat pel fenomen de l'*epitope-spreading* [8, 62, 69].



## 2.2. Òrgan diana: El pàncrees.

El pàncrees és un òrgan retroperitoneal que té forma cònica amb un procés unciforme medial i inferior, un cap, un coll, un cos i una cua. El cap es localitza en la concavitat del duodè o nansa duodenal formada per la primera, segona i tercera porcions del duodè i la cua puja obliquament cap a l'esquerra, on queda juxtaposada amb la melsa. **Figura 11.**

El pàncrees és una glàndula que té dues funcions, una funció endocrina i una altra exocrina. La funció endocrina consisteix en produir i segregar dues hormones importants, entre altres, la insulina i el glucagó, a partir de les estructures anomenades **illots de Langerhans**. La funció exocrina consisteix en la producció del suc pancreàtic que es bolca a la segona porció del duodè. El suc pancreàtic està format per aigua, bicarbonat, i nombrosos enzims digestius.

- **Illots de Langerhans: Composició i distribució cel.lular**

Els illots de Langerhans són estructures petites situades en el pàncrees que són crucials per a la homeòstasi de la glucosa. Als illots es troben quatre tipus de cèl.lules endocrines secretores d'hormones, com són, les cèl.lules alfa productores de glucagó, que eleva el nivell de glucosa a la sang, les cèl.lules beta productores d'insulina, que disminueix els nivells de glucosa sanguínia, les delta productores de somatostatina, que té com a funció inhibir la secreció d'insulina i glucagó, les cèl.lules PP pancreàtiques productores de polipèptid (*pancreatic polypeptide producing cells*) i les cèl.lules  $\epsilon$  secretores de ghrelina. Estudis quantitativs indiquen que la composició dels illots consisteix en un 70% de cèl.lules beta, un 20% de cèl.lules alfa, <10% de cèl.lules delta i <5% de cèl.lules PP. [86, 87]

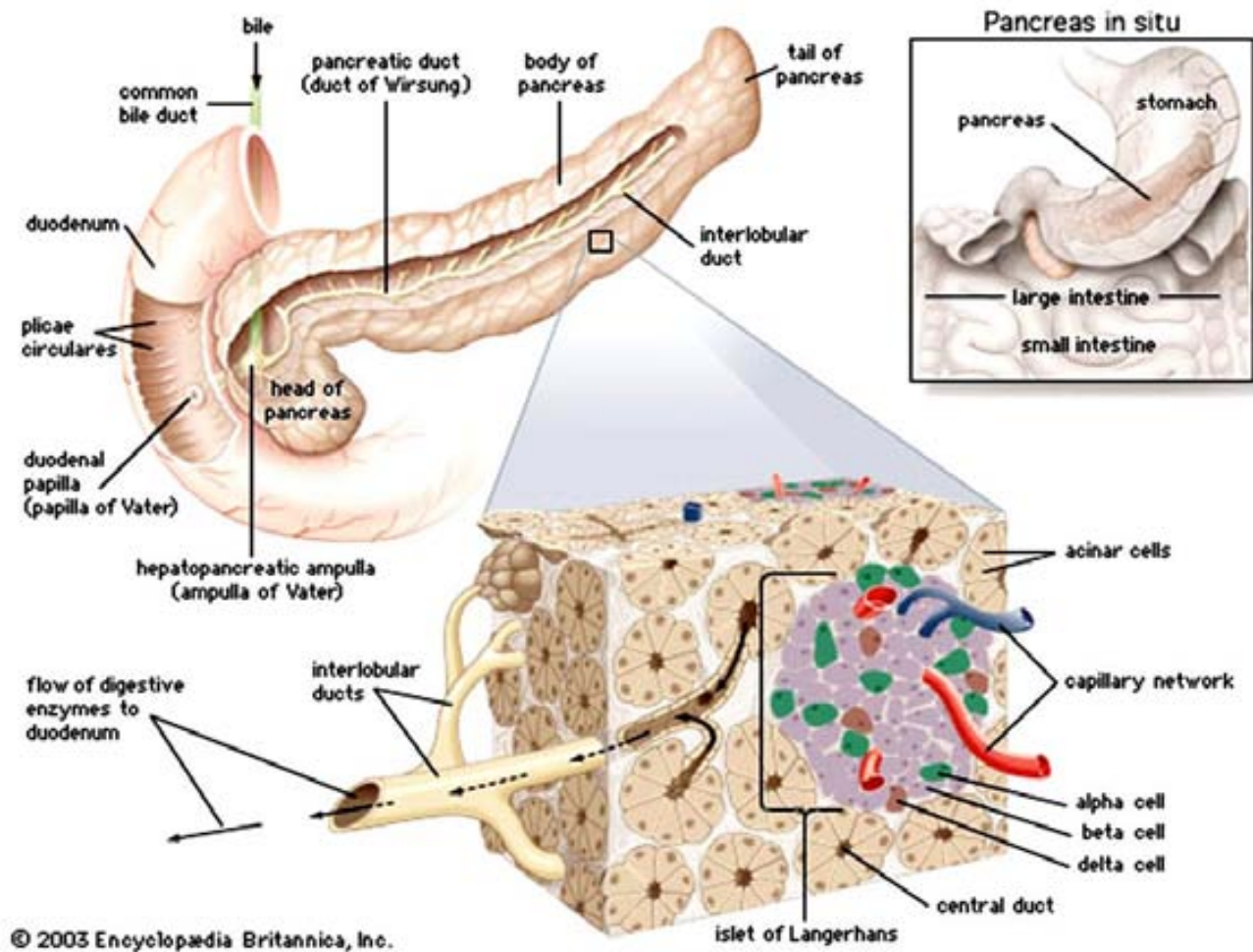
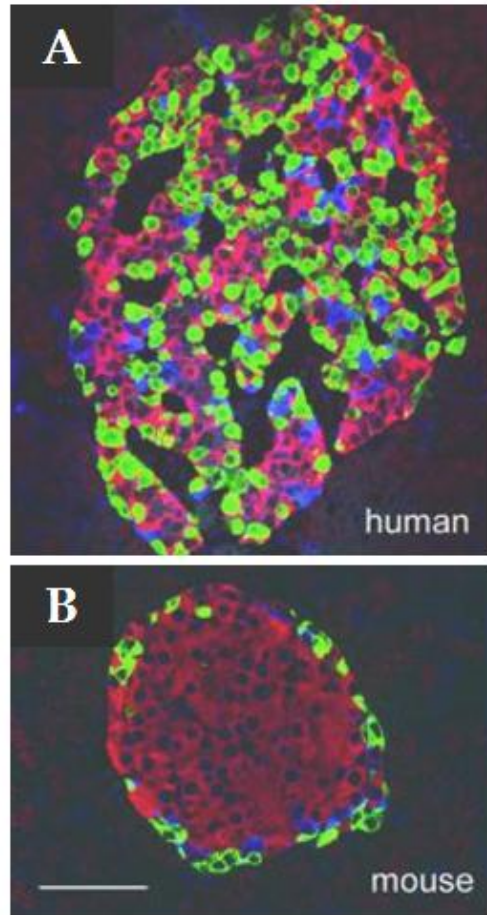


Figura 11. Detall anatómic del pàncrees i els illots de Langerhans.

Als illots de rosegadors, les cèl.lules beta, que són predominants, s'agrupen al centre de l'illot, generalment rodó, amb la resta de cèl.lules, alfa, delta i PP, formant un mantell que les envolta. Així, en rosegadors hi ha una clara separació de diferents tipus cel.lulars en diferents regions de l'illot, la qual cosa suggereix que hi ha subdivisions anatòmiques. En illots humans però la descripció canvia ja que la distribució cel.lular és molt més dispersa. [86] Als illots humans la majoria de les cèl.lules beta, alfa i delta es troben alineades al llarg dels vasos sanguinis sense cap ordre o disposició en particular.[87] **Figura 12.**

**Figura 12. Seccions de pàncrees amb tinció immunohistoquímica d'illots de Langerhans d'humà (A), i de ratolí (B).** Micrografies de confocal (seccions òptiques 1- $\mu$ m). Les cèl.lules productores d'insulina (vermell), de glucagó (verd), i de somatostatina (blau), es troven distribuïdes a l'atzar en els illots humans. Per contra en ratolí, les cèl.lules d' insulina es localitzen a la part central i les productores de glucagó i somatostatina a la perifèria de l'illot.

Adaptat de: *Cabrera, O. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. Proc Natl Acad Sci U S A. (2006)*



### 2.3. Característiques dels limfòcits T intrapancreàtics en la DT1

El procés autoimmunitari lligat a la diabetis T1 cursa amb un procés d'infiltració immunitària dels illots de Langerhans pancreàtics per part de limfòcits dels llinatges B, T i macròfags [65, 88] en que es dona la destrucció selectiva de les cèl.lules beta mediada principalment per cèl.lules T autorreactives. Aquesta afirmació es sustenta en evidències com que les cèl.lules T són presents a la insulinitis, que la progressió de la malaltia es retrasa mitjançant immunosupressors dirigits contra cèl.lules T i que les cèl.lules T autoreactives poden ser detectades a la circulació sanguínia de pacients amb DT1.[62, 65, 89, 90].

- *Limfòcits CD4+ o CD8+?*

Els leucòcits infiltrants inclouen limfòcits T CD4+ i CD8+ i també limfòcits B, però s'ha demostrat que els limfòcits T citotòxics (CTLs) CD8+ són un component essencial per al desenvolupament de la diabetis, tal com s'ha deduït de la expressió incrementada de MHC classe I a les cèl.lules dels illots infiltrats, i de la identificació de varis epítops T1D reconeguts per CTL i detectats en pacients diabètics T1 de recent debut i també de llarga evolució. [61, 65, 91-94]

Per altra banda, el paper dels limfòcits T CD4+ en la patogènesi de la DT1 és acceptat àmpliament degut a les evidències en el model de ratolí NOD de la dependència de CD4+ per al desenvolupament de la malaltia i la forta associació entre alguns al·lels humans d'HLA classe II i el risc de diabetis T1. S'ha identificat també varis epítops de T1D que són reconeguts per les cèl.lules T CD4+. [95-97]

- *Autoantígens:*

En el mecanisme de patogènesi de la diabetis T1, s'han implicat varis autoantígens potencials [98], però pel que fa a les cèl.lules T, se n'ha identificat d'específiques vers antígens com la insulina [99, 100], la tirosin fosfatasa ICA512 (IA-2) [101], la fogrina (IA-2beta) [102], el polipèptid amiloide d'illots (IAPP) [103], la cromogranina A (Chg A)[104] i en particular la descarboxilasa de l'àcid glutàmic (GAD) com a un dels més estudiats [55, 97, 99, 101, 105].

En el model de ratolí NOD, l'especificitat antigènica de les cèl.lules T intra-pancreàtiques s'ha mostrat que es dona amb un procés inicial de resposta contra insulina i posteriorment divergeix vers altres antígens [106-110]. El desenvolupament de la T1D en ratolí NOD sembla ser dependent d'un sol epítot de la cadena B de la Insulina [106], però els epítots en ratolí NOD poden no ser els mateixos que els reconeguts per les cèl.lules T patogèniques humanes [96].

En humà, les dianes dels limfòcits T només han pogut ser identificades per anàlisi de les cèl.lules T en perifèria, degut principalment al problema de disponibilitat de teixit pancreàtic. S'han pogut identificar *in vitro* cèl.lules T autoreactives per expansió enfront de insulina, GAD, I-A2 i IGRP [111-114] o *ex vivo* per tinció positiva amb tetràmers específics d'auto-pèptid (per GAD65, preproinsulina, proinsulina i la cadena B de la insulina) [115, 116]. També cal tenir en compte que en el procés autoimmunitari, la situació d'estrès que afecta el teixit diana exposa **nous antígens** i alguns d'ells poden inclús arribar a la perifèria i activar petites poblacions de cèl.lules T potencialment autoreactives que en condicions normals mai haurien estat estimulades, contribuint al que es coneix com efecte d'*epitope spreading* [96, 104].

- *Repertori TCR*

En varietat de malalties autoimmunitàries com la encefalomièlitis [117], l'artritis reumatoide [118], l'esclerosi múltiple [119], la psoriasis [120], la malaltia inflamatòria intestinal [121] o el mal de Kawasaki [122, 123], s'ha descrit la presència d'infiltrats anòmals de cèl.lules T a l'òrgan afectat que mostren en molts casos un esbiaixament del repertori de TCRs.

Pel que fa a la DT1, el repertori TCR de les cèl.lules infiltrants s'ha estudiat extensament en el **model NOD** [66, 124-129]. S'ha observat que la resposta autoreactiva no és homogèniament distribuïda i cada illot pot ser infiltrat per un o varis clons T [130] però s'ha descrit també que les cèl.lules T, en estadis inicials de la infiltració, presenten al pàncrees poca diversitat a nivell de famílies en les cadenes del TCR i un biaix a les seves seqüències CDR3, indicadores de clonalitat, fet que no es detecta als limfonodes pancreàtics (PLN) ni a la circulació sanguínia [126, 127, 131, 132].

Pel que fa a la T1D **en humà**, també s'han realitzat al llarg dels anys alguns estudis de restricció TCR de les cèl.lules infiltrants tot i les dificultats que implica aconseguir biòpsies de pàncrees i el fet que en necròpsies, la malaltia ja ha estat molt avançada. Quant apareixen els símptomes de la T1D, la majoria dels illots pancreàtics han estat destruïts. S'ha observat que la fase en la que es troba la patologia pot alterar molt els repertoris TCR presents i que el procés acaba en un infiltrat massiu policlonal, però hi ha dades de que en contrast, l'infiltrat inicial presentaria més o menys restricció [92, 133, 134], en coincidència amb les dades del model NOD [66, 126, 131, 135, 136].

Principalment als anys 90, es van desenvolupar varis treballs que, tot i aquestes dificultats, identificaven al teixit diana, o bé en PBMCs, restriccions del repertori TCR dels pacients. Entre ells, Kontiainen et. al estudià el TCR en PBMCs de varis pacients i descrigué una resposta oligoclonal en 18 diabètics recent-diagnosticats però amb selecció de diferents elements del TCR en cada pacient [137]; Hanninen et. al. descrigué com les cèl.lules V $\beta$ 8 eren sobrerepresentades, i també en menor grau les V $\beta$ 5, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 6 i V $\beta$ 12, en illots d'un diabètic [138]; Posteriorment, Conrad et. al observà la expansió selectiva de V $\beta$ 7 (però no de cap V $\alpha$  en concret) al TCR de les cèl.lules intra-illot de dos pacients en debut [133]; Santamaria et. al., va descriure restricció de repertori TCR amb l'increment de V $\beta$ 3 i V $\alpha$ 14 en un cas i heterogeneïtat i V $\alpha$ 22 /V $\alpha$ 14 en un altre per a les seqüències d'allojerts de pàncrees en diabètics [134], i Luppi et. al., al 2000, observà alta freqüència de V $\beta$ 7 en PBLs de diabètics [139].

En resum, varis anàlisis del repertori TCR en la T1D humana han mostrat dominància d'algunes famílies TRBV (o TRAV), però amb gran heterogeneïtat entre individus, sent molt determinades segons l'HLA, i no limitades a una mida de reordenament concreta.

### 2.3.1. Expansions monoclonals al pàncrees diabètic

Als anys 90 ja es va plantejar i demostrar la hipòtesi de que, en la DT1 humana, determinats clons cel.lulars fossin expandits al teixit diana. Yamagata et. al., va estudiar PBLs i biòpsies pancreàtiques de 8 pacients de T1D de recent debut i observà trànscripats TRAV incrementats al pàncrees, corresponents a una o unes poques seqüències CDR3 en cada pacient estudiat, com foren les seqüències úniques  $V\alpha 6$ -<MRE(oG)DGRG STLGR>,  $V\alpha 4$ -<LNTNAG(oD)> i  $V\alpha 2$ -<V(oG)TTGSARQ> i les oligoclonals  $V\alpha 6$ -<NSNQAGTA> en 3/5 i  $V\alpha 6$ -<MEDKGGSE> en 2/5, [140]. Per altra banda, un estudi exhaustiu que comparava el repertori TRBV d'expansions T en al.lloinjerts de pàncrees i PBMCs de dos pacients amb T1D recurrent [134], havia també mostrat certa oligoclonalitat als illots, amb la identificació d'algunes seqüències dominants com  $V\alpha 14$ -<CVARLMFG> en 17/42 clons,  $V\beta 3.1$ -<CASLTYSGRETQYF> en 6/26,  $V\alpha 22$ -<CALRNYGGSQGNLIFG> en 14/33 i  $V\beta 13$ -<CASTNTGGPEAFF> en 11/33. Resultats similars es van obtenir en les cèl.lules T expandides a partir de limfonodes pancreàtics (PLN) [63], i en aquest darrer estudi, l'aïllament d'un clon T insulina-específic  $V\beta 29$ -<CS/VEATRA/DTQYFG> i  $V\alpha 8.3$ -<CA/VGALA/GTASKLTFG> expandit del lloc de drenatge autoinflamatori del pàncrees, indicava a més la insulina com a antigen diana en la diabetis. No hi ha encara descripció d'expansions T monoclonals als illots humans, però aquestes dades són un clar indicatiu de la presència de clonotips dominants en l'infiltrat.



## 2.4. Perifèria: La melsa

### 2.4.1 Estructura de la melsa.

La melsa és un òrgan limfoide secundari situat a l'hipocondri esquerre, darrere de l'estómac i prop del diafragma. La seva superfície externa consisteix en una càpsula fibrosa amb algunes fibres musculars llises que penetra profundament en el parènquima de l'òrgan. En la melsa es distingeix la **polpa vermella** que és principalment un reservori de cèl.lules hematopoiètiques com eritròcits i plaquetes, de destrucció d'eritròcits i reciclatge del ferro i la **polpa blanca** que conté el teixit limfoide. **Figura 13.** [11, 15, 41, 141]. La polpa blanca, és molt rica en limfòcits T, que es disposen més propers i al voltant de les arterioles que travessen la melsa formant el PALS (*periarteriolar lymphoid sheath*), mentre que els limfòcits B es disposen més exteriors, localitzats en regions anomenades **centres germinals**. Al centre germinal dels **fol.licles limfoides**, també s'hi troba cèl.lules reticulars dendrítiques i macròfags, així com en la **zona marginal** d'aquests (àrea que envolta els fol.licles limfoides) hi ha macròfags especialitzats que, al costat de les cèl.lules fol.liculars dendrítiques dels fol.licles primaris (fol.licles no estimulats sense centre germinal clar), s'ocupen de la presentació d'antigen als limfòcits B. [11, 15, 41, 141].

La melsa, funciona com un important filtre sanguini, en que la majoria de limfòcits recirculen i s'intercanvien constantment entre la circulació i els teixits, i és també el principal lloc de resposta immunitària contra els antígens procedents de la sang. [15, 41, 141].

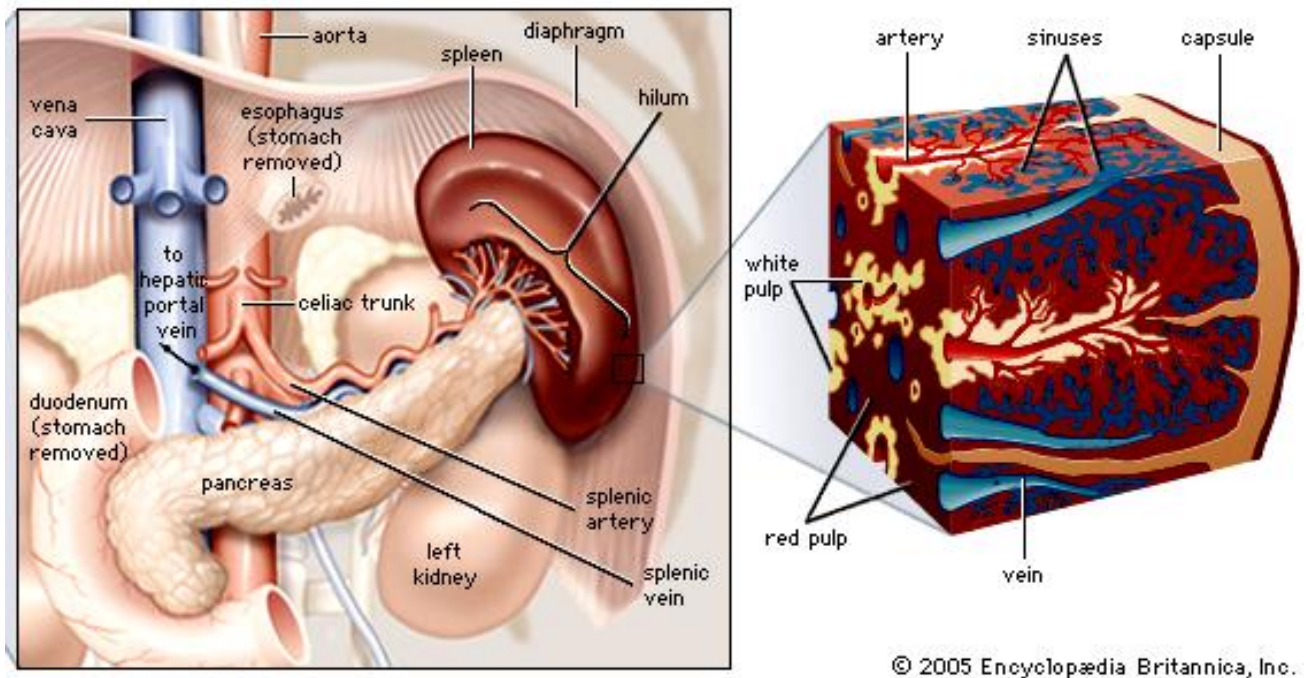


Figura 12. Detall anatòmic de la melsa i una secció on s'observa la càpsula, la polpa vermella i la polpa blanca.

#### 2.4.2. Les cèl.lules B de la zona marginal: Memòria i multi-reactivitat?.

La **zona marginal** esplènica (S-MZ), està especialment preparada per a una ràpida resposta humoral i és única en la seva capacitat per iniciar una resposta immune als bacteris encapsulats (antígens independents de cèl.lules T tipus 2 (TI-2)). Les infeccions per bacteris transmiseses per la sang signifiquen un alt risc de sèpsia i un sistema de defensa ràpida de primera línia, capaç de produir grans quantitats d'anticossos neutralitzats en un curt període de temps, és necessari per prevenir la bacterièmia. Aquest sistema, ha de ser capaç de reaccionar amb àmplia especificitat, fins i tot si això implica **reaccionar amb baixa afinitat / avidesa**, [142]. La zona marginal esplènica (S-MZ) és especialment adequada per a aquesta funció. La S-MZ, conté principalment cèl.lules B pre-activades, amb la màxima densitat de receptor de complement 2

(CD21) i IgM en superfície [143], i la seva estructura resulta en una gran reducció del flux sanguini, que hi permet un contacte acurat entre els antígens i les cèl.lules efectores [142, 144, 145].

Un bon nombre d'estudis en rata i humà, han demostrat que la zona marginal de la melsa conté gran quantitat de **cèl.lules B memòria**, [146-149]. En concret en la melsa d'humà, la majoria de cèl.lules B de la S-MZ (més del 85%) són mutades somàticament, [150, 151]. Aquesta abundància de cèl.lules memòria i una sèrie de característiques úniques, com són un microambient del flux sanguini baix, el baix llindar d'activació, l'alta expressió de receptor de complement 2 i multi-reativitat [142], indica la capacitat d'aquestes poblacions de respondre directament a una infecció per antígens procedents de la sang i donar lloc a una eficient i ràpida producció d'anticossos. [152]. Les cèl.lules B S-MZ són capaces de respondre ràpida i eficientment a tot tipus d'antígens de transmissió sanguínia, fins i tot en l'absència de receptors de cèl.lula B amb gaire alta especificitat [146, 153] ni del contacte específic amb les cèl.lules T, [142, 149, 152, 154].

A la zona marginal de la melsa però, no hi ha només cèl.lules B. Constitueix una àrea interessant en què es combinen varietat de tipus cel.lulars. Diversos d'aquests tipus de cèl.lules semblen tenir una posició fixa a la zona marginal, com els macròfags de la zona marginal, i, en menor mesura, les cèl.lules B de zona marginal. Però per altres com els limfòcits T, cèl.lules B petites, i les cèl.lules dendrítiques, la zona marginal és només una residència temporal. És aquesta combinació de les poblacions de cèl.lules relativament residents i l'afluència contínua de cèl.lules immunocompetents provinents de la sang, el que transforma la zona marginal en una àrea dinàmica, particularment apte per al processament d'antígens i el reconeixement que no es troba en cap altre òrgan limfoide. [145]

### 2.4.3. Melsa i autoreactivitat.

- *Zona marginal, multireactivitat i autoreactivitat?*

Durant els anys 90 es va estudiar amb profunditat les cèl.lules B de la zona marginal, determinant la seva capacitat multireactiva i inclús autoreactiva.

En un model de ratolí transgènic, es va demostrar que només un nombre limitat de clons de cèl.lules B colonitza la S-MZ i que aquesta selecció depèn de l'expressió de CD19 [152], un coreceptor dels limfòcits B que disminueix el llindar de l'estimulació del receptor depenent d'antigen [155]. Dammers et al. [146], van analitzar els gens Vh de cèl.lules B de la S-MZ en ratolins adults no vacunats, i van mostrar que la població de cèl.lules B *naïve* de la S-MZ tenien una regió CDR3 de 2-3 aminoàcids de mitja més curtes en comparació amb l'observat en les cèl.lules B fol·liculars. Hi ha diversos exemples que mostren que els mAbs polireactius tendeixen a tenir regions H-CDR3 més curtes [156-159], suggerint que les cèl.lules B S-MZ són més multi-reactives, [146]. Chen et al. [153], ja va demostrar al 1997 que un repertori de cèl.lules B **autoreactives** de baixa afinitat poden poblar la S-MZ. Van utilitzar ratolins transgènics que expressaven un transgèn de la cadena pesada  $\mu$  de línia germinal reordenat, Vh81X, que es coneix que condueix a la generació d'anticossos IgM multireactius. Les cèl.lules B que expressaven aquesta cadena es localitzaven principalment a la S-MZ. En el model murí de lupus eritematós, es coneix la implicació de la zona marginal de la melsa en la autoreactivitat [160], les cèl.lules B autoreactives dsDNA específiques es troben principalment en el compartiment MZ de la melsa [161].

- *En la diabetis T1: Cèl.lules T.*

En la diabetis tipus 1, tal com s'ha demostrat al ratolí NOD, l'activació de cèl.lules T autoreactives succeeix al PLN, des d'on les cèl.lules T efectores migren al torrent sanguini i acaben arribant al pàncrees [162]. En aquest model, la melsa pot acollir cèl.lules T autoreactives, ja que els esplenòcits d'un animal diabètic poden transferir la malaltia a receptors sans, tal com va mostrar Wicker et. al. en un experiment de transferència adoptiva d'esplenòcits, que induïa ratolins a convertir-se en diabètics amb una major freqüència i a una edat més jove que els seus companys de ventrada no tractats [163], a més, la circulació de limfòcits T diabetogènics en la melsa sembla que pot tenir lloc inclús anteriorment a la seva arribada al teixit diana,[163-165]. Haskins et. al. al 1988, [164] ja van descriure el clon T BDC-2.5 de limfòcits T CD4 +, que va ser generat a partir de cèl.lules de LN i melsa d'un ratolí NOD enfront d'extracte d'illots *in vitro*, i van observar que presentava especificitat i proliferava amb l'antigen de cèl.lules dels illots *in vitro* i *in vivo*, atacant els illots pancreàtics. Lennon et. al. [165], van generar ratolins retrogènics per TCR, que expressaven dues poblacions diferents de cèl.lules T, diabetogèniques i no-diabetogèniques, demostrant que les cèl.lules T *bystander* no es podien acumular en els illots pancreàtics i, per tant, l'entrada als illots i l'acumulació sembla ser fortament relacionada amb l'especificitat d'antigen dels illots. El 67% dels TCRs clonats de cèl.lules T CD4+, eren capaços de mediar infiltració als illots i desencadenar diabetis, demostrant que els limfòcits accedeixen a l'òrgan diana si reconeixen l'antigen *in situ*. No obstant, aquesta dada no contradiu que a la melsa s'acumulin i mantinguin cèl.lules T de memòria. Els estudis que indicaven l'emmagatzematge de cèl.lules T de la memòria central i la contribució en la expansió de cèl.lules T de memòria efectora en la infecció secundària, podrien explicar la major presència de cèl.lules T autorreactives a la melsa un cop iniciada la resposta auto-reactiva, [166]. De moment, en humans no hi ha dades que confirmin l'expansió de cèl.lules T autoreactives a la melsa.

Kent et al., van aïllar un clon T insulina-específic de PLN humà, però l'anàlisi del repertori deTCR de la melsa autòloga del donant no va permetre identificar el clon, suggerint que no hi havia expansió o retenció de cèl.lules T insulina-específiques a la melsa [63].

La melsa és un òrgan intercalat a la circulació sanguínia i no rep de forma directe el drenatge limfàtic de cap òrgan. En aquest context, la cèl.lula B com a cèl.lula presentadora d'antigen, a més de la CD, pren rellevància. Cèl.lules B autorreactives de l'infiltrat de pàncrees diabètics s'han identificat a la melsa de ratolí NOD i al torrent sanguini de pacients diabètics humans respectivament [167, 168]. Les cèl.lules B, s'han mostrat com a eficients presentadores d'autoantígens al PLN i la melsa del ratolí NOD, amb alt nivell d'expressió de molècules co-estimulatòries [169, 170], així que limfòcits B de la melsa autorreactius i presentadors d'autoantigen podrien potencialment activar i expandir clons autorreactius T *in situ* en el cas del NOD.

## ❖ HIPÒTESI

*A la T1D, la destrucció de les cèl·lules  $\beta$  productores d'insulina està mediada per cèl·lules T autoreactives. Aquest fet està associat a la presència d'infiltrats leucocitaris a l'òrgan diana entre els quals es troben les cèl·lules T efectores que participen en l'inici i/o en la progressió de la malaltia. En el model animal del NOD, s'ha descrit que el trencament de la tolerància es produeix vers un nombre reduït d'autoantígens, principalment la insulina, i que la resposta es diversifica posteriorment degut al fenomen de l'"epitope spreading". En la TD1 humana es desconeix la diversitat de l'infiltrat tant en el moment del debut com durant l'evolució de la malaltia. El motiu principal és la dificultat per aconseguir mostres de donants diabètics. L'estudi del repertori TCR de les cèl·lules intra-pancreàtiques en el moment del debut és una aproximació indirecta per a determinar l'existència de clons de cèl·lules T més expandits que la resta i per tant dominants en la resposta auto-reactiva. En l'establiment d'aquest procés autoimmunitari, es desconeix si la melsa com a òrgan de la perifèria té un paper en el desenvolupament o cronicitat de la malaltia. A partir de l'anàlisi del TCR es pot establir i comparar el repertori TRAV i TRBV expressat a l'òrgan diana i a la perifèria, melsa i sang perifèrica, usant com a biomarcador la seqüència CDR3, la qual és única per a cada clon de cèl·lula T.*

•HIPÒTESI•



## ❖ OBJECTIUS

### GENERAL

Caracteritzar la diversitat del repertori dels TCRs expressats per les cèl.lules T de l'infiltrat intra-illot i relacionar-ho amb la perifèria utilitzant el CDR3 com a biomarcador.

### ESPECÍFICS

- I. Optimitzar la metodologia experimental per l'estudi del TCR, mitjançant el disseny d'una RT-PCR *multiplex* per a l'anàlisi del repertori TRAV i TRBV.
- II. Analitzar el repertori de famílies gèniques TRBV i la presència d'expansions monoclonals en el digerit total i en els illots purificats del pàncrees d'un donant diabètic tipus 1.
- III. Identificar a la perifèria les expansions clonals de l'infiltrat intra-illot.
- IV. Determinar l'existència d'un biaix en la diversitat del TCR de les cèl.lules infiltrants del pàncrees, a partir de la identificació d'elements de restricció en les regions CDR3 de la cadena beta del TCR.
- V. Comparar el TCR de línies i clons generats *in vitro* a partir de l'infiltrat d'illots amb les dades de les expansions *in vivo* del pàncrees diabètic.

•OBJECTIUS•

# **MATERIALS I MÈTODES**



## 1. MOSTRES.

### 1.1. Mostres control per al calibratge de la tècnica.

- **E-PBMCS** > PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) estimulats en cultiu: Cèl.lules mononuclears de sang perifèrica, recollida en heparina al 1%, aïllades mitjançant gradient de densitat amb (*Ficoll-Hypaque. LYMPHOPREP*) i estimulades en cultiu durant 3 dies amb PHA-L (*leuco-PHA. SIGMA*) 1ug/ml i IL-2 20U/ml en medi RPMI suplementat amb un 10% de serum fetal boví (FCS).

### 1.2. Mostres control experimentals.

- **C-PB1, C-PB2 i C-PB3** > PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) no estimulats: Cèl.lules mononuclears de sang perifèrica obtingudes de tres donants sans en heparina al 1 %, aïllades mitjançant gradient de densitat (*Ficoll-Hypaque. LYMPHOPREP*).
- **C-S** > Melsa: Bloc teixit de melsa d'aproximadament uns 30mg de pes procedent d'un donant sa. Aquesta mostra va ser seleccionada per coincidència amb la mostra del donant diabètic T1 "Case 1" en edat, sexe tipatge d' HLA.
- **C-ISL i C-TD** > Pàncrees: Dues mostres de pàncrees de donants d'òrgans. **C-ILS** és una mostra d'illots de Langerhans aïllats amb una puresa 90% i **C-TD** és una mostra de teixit total de pàncrees. Aquestes mostres varen ser cedides per la Dra. M. Vives-Pi.

### 1.3. Mostres problema (donant diabètic T1 “Case 1”).

S'utilitza per a aquest estudi les mostres conservades en nitrogen líquid procedents d'un donant diabètic tipus 1 (T1D), dona de 19 anys d'edat que va morir als 5 dies del debut de la malaltia. El donant va ser caracteritzat prèviament en Somoza et. al. [61], estudi en que aquest pàncrees està referit com a *Case 1*. El tipatge d'HLA classe II és DR4, DRw13, (DRw6), DRw52/53, DQ1, DQ3 (DQ8). La pacient fou positiu per anticossos ICA i IAA.

- **DM-ISL i DM-TD** > Pàncrees: **DM-ISL** són illots de Langerhans recolectats manualment amb una puresa >90% per microscopia estereoscòpica i cedits per la Dra. M. Vives-Pi com a mRNA amb index RIN d'integritat de 7. **DM-TD** és una mostra de digerit total corresponent al teixit criopreservat obtingut després de la digestió amb col.lagenasa i DNAsa [61].
- **DM-PB** > PBMCS: Cèl.lules mononuclears de sang perifèrica obtingudes per gradient de densitat (*Ficoll-Hypaque*. *LYMPHOPREP*) i criopreservades.
- **DM-S1, DM-S2 i DM-S3** > Melsa: Cadascuna d'aquestes mostres correspon a un bloc de teixit de melsa, d'aproximadament 30mg de pes, criopreservats.
- **PB100.X** > Línies *in vitro* de cèl.lules T del pàncrees diabètic: Línies oligoclonals de cèl.lules T generades a partir de l'infiltrat limfocitari del pàncrees *Case 1*. La nomenclatura d'aquestes línies és PB100 seguit d'una numeració específica. El protocol d'expansió de l'infiltrat es descriu breument a continuació:

› Protocol d'expansió de les línies "PB100.X":

El sobrenedant del cultiu *over night* d'illots purificats del digerit del pàncrees diabètic es va centrifugar, i els limfòcits obtinguts es van expandir amb IL-2 i cèl.lules autòlogues de melsa irradiades (8.000 Rad) com a *feeders* durant una setmana. El cultiu es va dividir en dues línies que es van restimular amb dos protocols diferents: la línia PB100.L1 expandida amb anti-CD3 soluble (OKT3) i la línia PB100.L2 expandida amb extracte cru d'illots purificats de pàncrees de donants sans a 10ug/ml final. A més de l'estímul respectiu, ambdós cultius es van fer créixer en presència de 20U/ml de rIL-2 (cedida per Hoffman-Laroche) i una barreja de cèl.lules *feeder* irradiades a 8000 Rad i formada per una línia limfoblastoide del propi donant generada a partir de la infecció de cèl.lules de la melsa amb virus d'Epstein-Barr i melsa autòloga en una relació de 1 a 10, respectivament. El medi de cultiu usat era Iscove's Modified Dulbecco's Medium suplementat amb antibiòtics, i 10% de sèrum A humà descomplementat.

Després d'una setmana en cultiu, les línies es van clonar per dilució límit. Es van sembrar plaques amb les següents dilucions: 100, 30, 10, 3, 1 i 0,3 c/w per al clonatge amb anti-CD3; i 300, 100, 30, 10, 3 i 1 c/w per al clonatge amb extracte d'illots. Les línies oligoclonals resultants es van expandir en presència de IL-2 i cèl.lules *feeder* irradiades (línia limfoblastoide autòloga i *buffy-coat* de donants en una proporció 1:10) i anti-CD3 o extracte d'illots, en les mateixes condicions que les línies parentals L1 i L2.

*Pellets* secs de al voltant d'uns 5 milions de cèl.lules T dels cultius de les línies "PB100.X", es van rentar dues vegades en PBS i centrifugar finalment en tubs *ependorf*, 10' al màxim de velocitat a la microfuga. Un cop rentades, es tragué el sobrenedant i s'emmagatzemaren en nitrogen líquid fins al seu ús.

## 2. PROTOCOLS.

### 2.1. Extracció de mRNA: Digestió cel·lular i obtenció del RNA missatger total.

La extracció d'mRNA de les mostres de teixits i PBMCS es va fer segons el cas mitjançant el kit "RNeasy Micro" o "RNeasy Plus Mini" (QIAGEN), seguint les instruccions indicades per la casa comercial, homogeneïtzant la mostra amb una xeringa i agulla de 20G.

Per a l'extracció d'mRNA de les línies T "PB100", es va utilitzar entre 3 i 5 milions de cèl·lules en "pellet sec" i s'aplicà el producte TRIZOL.

Seguint les instruccions del fabricant, es va afegir a la mostra 500ul de *TRIZOL-Reagent* (INVITROGEN) i es deixà reposar 5min a TA. S'hi afegí 100µl de cloroform i, després de vortejar 15 segons, es deixà reposar 3min a TA i es centrifugà a 12000g 15min a 4°C. Per tal de precipitar el RNA, es va a recuperar la fase aquosa superior, que conté el RNA, i s'hi afegí un volum 1:1 d'isopropanol. Es barrejà per inversió del tub 3 cops i es deixà reposar a TA 10min, es centrifugà a 12000g 15min a 4°C. Amb cura per a no distorsionar el *pellet*, es va retirar el sobrenedant i, aquest, es va rentar dues vegades amb etanol al 70% per tal de reduir les restes de fenol, centrifugant a 7500g 5min. Tenint sempre cura de no distorsionar el *pellet* de RNA, s'abocà el sobrenedant i, amb l'ajuda de la pipeta, es van eliminar bé les restes d'etanol que poguessin quedar adherides a les parets del tub. Finalment es va deixar evaporar les restes d'etanol durant uns 20min a TA a la campana de fums. El *pellet* de RNA, es va resuspendre en 20µl d'aigua DEPC.

Les mostres d'mRNA es va emmagatzemar a -80°C fins al moment del seu ús. La valoració de la puresa i la concentració es va realitzar abans de la utilització de la mostra amb l'espectrofotòmetre (*EPPENDORF BioPhotometer*) a partir dels valors d'absorbància a 260 i 280nm. Per a totes les mostres s'aconseguí una puresa (A260/280) superior a 1,8.



## 2.2. Retrotranscripció: Síntesi de cDNA.

Per a la retrotranscripció d'1µg de motlle mRNA, es va fer un "Mix" 2X de 10µl dels reactius de retrotranscripció que, posteriorment, es barrejà amb un volum igual de la mostra mRNA. El "Mix" 2X de reactius (10µl) contenia en tots els casos 500ng d' Oligo dT, DTT (dithiothreitol) a 0'01M, dNTPs a 1mM cadascun, 20U d'*RNASEOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (INVITROGEN)* i l'enzim *Reverse Transcriptase* adequat segons el cas, amb el *buffer* corresponent. S'afegí, a aquest *Mix*, l'RNA (diluït en volum de 10µl) i es realitza la reacció segons les instruccions del fabricant.

Per a les extraccions de mostres de teixits i PBMCS control, s'aplicà la retrotranscriptassa 100U de *M-MMLV Reverse transcriptase (INVITROGEN)*, per a la extracció de la mostra DM-PB s'utilitzà 200U *SuperScript III (INVITROGEN)*, molt més sensible per a menors concentracions d'mRNA, i per als clons "PB100.X", 100U de *M-MLV Reverse Transcriptase (USB)*.

El cDNA obtingut, a una concentració aproximada de 40ng/µl (considerant un 80% d'efectivitat en la reacció) es va emmagatzemar a -20°C.

### **2.3. PCR GAPDH:** *Comprovació de la qualitat del cDNA.*

S'amplificà per PCR el cDNA d'un gen d'expressió ubiqua (*house keeping gene*) com és el de la GAPDH (Gliceraldehid-3-Fosfo-Deshidrogenassa). La detecció de GAPDH es va realitzar en totes les mostres i com a control positiu de la qualitat i integritat del mRNA i cDNA sintetitzat.

Es van incubar 20ng de cDNA (0'5µl) amb una barreja formada per: *Reaction Buffer with 2mM MgCl<sub>2</sub> (BIOTOOLS)* a 1X final, 0'2mM de cada dNTP, ambdós primers (*sense 5'CTTCTTTTGCCTCGCCAG3'* i *antisense 5'AGCCCCAGCCTTCTCCA3'*) a concentració final de 0'3 mM i 0'6U de Taq polimerasa (*BIOTOOLS*), ajustant a un volum final de reacció de 15µl.

El programa d'amplificació usat fou: 3min de desnaturalització, 28 cicles de 30s a 95°C, 30s 65°C i 30s a 72°C; i, finalment, 7min a 72°C en un termociclador *PERKIN ELMER Geneamp 2400*. L' amplificat es va avaluar per electroforesi en gel d'agarosa al 2% corregut 45min a 90V.

### **2.4. PCR CD3γ:** *Comprovació de la qualitat del cDNA i presència de limfòcits T .*

S'amplificà per PCR el cDNA d'un gen d'expressió constant en limfòcits T com és el de la cadena gamma de CD3. La detecció de CD3γ es va realitzar en totes les mostres com a control de la qualitat i integritat del mRNA i cDNA sintetitzat i de la abundància de limfòcits T en les mostres processades.

Es van incubar 40ng de cDNA (1µl) amb una barreja constituïda per: *Reaction Buffer with 2mM MgCl<sub>2</sub> (BIOTOOLS)* a 1X final, 0'2mM de cada dNTP, ambdós primers (*sense 5'CTGTCCTCATCCTGGCTAT3'* i *antisense 5'GGGTCCTTGGCATTACTT3'*)

a concentració final de 0'3 mM i 0'6U de Taq polimerasa (BIOTOOLS), ajustant a un volum final de reacció de 15µl. El programa d'amplificació usat fou: 2min de desnaturalització a 95°C, 35 cicles de 30s a 95°C, 30s 58°C i 30s a 72°C; i, finalment, 5min a 72°C en un termociclador PERKIN ELMER Geneamp 2400. L'amplificat es va avaluar per electroforesi en gel d'agarosa al 2% corregut 45min a 90V.

### **2.5. PCR de gradient de temperatura:** *Determinació de la temperatura d'annealing límit que permet cada primer Vα.*

Per a fer aquest tipus de PCR, s'utilitzà el termociclador MyCycler (BIORAD), que permet aquesta opció de gradient en la temperatura, la qual aporta a cada pouet una temperatura diferent seguint un gradient establert dins d'un rang de temperatura acotat.

Aquesta PCR es realitzà en 10 tubs per a cada primer Vα a estudiar; 8 d'igual "Mix" de reactius, però que rebrien diferent temperatura d'annealing durant els cicles d'amplificació, i 2 tubs control negatiu (sense el cDNA mostra) que amplificarien a màxima i mínima temperatura d'annealing.

La "Mix" constava per tub, a volum final total de 15µl, de:

0'2µg de cDNA de PBL, 1X de "Reaction Buffer with 2mM MgCl<sub>2</sub> (BIOTOOLS)", dNTPs a 0,25mM cadascun; cada primer a 0'5 mM i 0.2U de Taq polimerasa (BIOTOOLS). El control negatiu usat fou cDNA d'una línia cel.lular limfoblastoide (LCL).

El programa d'amplificació amb el termociclador fou de 5min de desnaturalització a 80°C ; 35 cicles de 30s a 95°C, 30s a temperatura gradient dins el rang de 58 a 72°C, 30s a 72°C; i finalment 5min a 72°C.

## 2.6. PCR multiplex V $\alpha$ : Detecció de les famílies gèniques TRAV.

Per a aquesta PCR, s'utilitzà els *primers* descrits per Genevée et al. [10], que apareixen llistats a la **Taula 1**; La nomenclatura dels *primers* ha estat revisada amb l'eina *online* FASTA i les bases de dades de seqüències d'EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) i IMGT/LIGM-DB (Université Montpellier 2, Montpellier, France), [1]. En aquest treball s'ha mantingut l'ús de la nomenclatura original tal com apareix a l'article de referència de Genevée et al, [10].

Els *primers* corresponents a 29 famílies gèniques TRAV es van agrupar segons paràmetres de temperatura d'*annealing* semblant i diferent mida d'amplímer. El disseny dels 12 grups de *primers* anomenats "MIX A" I a XII i detallats a la **Taula 2**, es descriu amb més detall a l'apartat de resultats.

Primer es va fer la barreja dels reactius comuns als 12 tubs per a un volum final a repartir de 17 $\mu$ l/tub. La barreja de reactius contindria: 20ng de cDNA mostra/tub, 2 $\mu$ l de "Reaction Buffer with 2mM MgCl<sub>2</sub> (BIOTOOLS)" a 10X, 2 $\mu$ l de dNTPs a 2'5mM cadascun, 2 $\mu$ l del *primer* "constant Reverse" (C $\alpha$ ) a 5 $\mu$ M i 0.6 $\mu$ l de Taq polimerasa 1U/ $\mu$ l (BIOTOOLS). El volum final a repartir per tub fou de 17 $\mu$ l. A cada tubet, es va afegir 3 $\mu$ l del "MIXA" de *primers* corresponent, que contenia cada *primer* a concentració entre 1,22 $\mu$ M i 3,3 $\mu$ M tal com s'indica a la **Taula 2**. S'obtingué d'aquesta manera un volum final d'amplificació de 20 $\mu$ l/tub (17 de barreja i 3 $\mu$ l del MIXA corresponent).

Les condicions d'amplificació aplicades, foren un programa consens per poder amplificar tots els MIXA alhora: 3min a 97°C de desnaturalització inicial, 30 cicles de 1min a 94°C de desnaturalització, 1min a 60°C d'*annealing* i 1min a 72°C d'elongació. Finalment 5min a 72°C d'extensió final. El termociclador usat fou PERKIN ELMER Geneamp 2400.

TRAV (Nomenclatura actual IMGT)	V $\alpha$ (Nomenclatura antiga)	Seqüència (Genevée et al. 1992)
TRAV 8	V $\alpha$ 1	5'- GGC ATT AAC GGT TTT GAG GCT GGA -3'
TRAV 12	V $\alpha$ 2	5'- CAG TGT TCC AGA GGG AGC CAT TGT -3'
TRAV 17	V $\alpha$ 3	5'- CCG GGC AGC AGA CAC TGC TTC TTA -3'
TRAV 26	V $\alpha$ 4	5'- TTG GTA TCG ACA GCT TCA CTC CCA -3'
TRAV 6	V $\alpha$ 5	5'- CGG CCA CCC TGA CCT GCA ACT ATA -3'
TRAV 14	V $\alpha$ 6	5'- TCC GCC AAC CTT GTC ATC TCC GCT -3'
TRAV 1	V $\alpha$ 7	5'- GCA ACA TGC TGG CGG AGC ACC CAC -3'
TRAV 13	V $\alpha$ 8	5'- CAT TCG TTC AAA TGT GGG CAA AAG -3'
TRAV 16	V $\alpha$ 9	5'- CCA GTA CTC CAG ACA ACG CCT GCA -3'
TRAV 27	V $\alpha$ 10	5'- CAC TGC GGC CCA GCC TGG TGA TAC -3'
TRAV 2	V $\alpha$ 11	5'- CGC TGC TCA TCC TCC AGG TGC GGG -3'
TRAV 19	V $\alpha$ 12	5'- TCG TCG GAA CTC TTT TGA TGA GCA -3'
TRAV 22	V $\alpha$ 13	5'- TTC ATC AAA ACC CTT GGG GAC AGC -3'
TRAV 38	V $\alpha$ 14	5'- CCC AGC AGG CAG ATG ATT CTC GTT -3'
TRAV 5	V $\alpha$ 15	5'- TTG CAG ACA CCG AGA CTG GGG ACT -3'
TRAV 3	V $\alpha$ 16	5'- TCA ACG TTG CTG AAG GGA ATC CTC -3'
TRAV 23	V $\alpha$ 17	5'- TGG GAA AGG CCG TGC ATT ATT GAT -3'
TRAV 24	V $\alpha$ 18	5'- CAG CAC CAA TTT CAC CTG CAG CTT -3'
TRAV 41	V $\alpha$ 19	5'- ACA CTG GCT GCA ACA GCA TCC AGG -3'
TRAV 4	V $\alpha$ 20	5'- TCC CTG TTT ATC CCT GCC GAC AGA -3'
TRAV 29	V $\alpha$ 21	5'- AGC AAA ATT CAC CAT CCC TGA GCG -3'
TRAV 9	V $\alpha$ 22	5'- CCT GAA AGC CAC GAA GGC TGA TGA -3'
TRAV 21	V $\alpha$ 23	5'- TGC CTC GCT GGA TAA ATC ATC AGG -3'
TRAV 10	V $\alpha$ 24	5'- CTG GAT GCA GAC ACA AAG CAG AGC -3'
TRAV 35	V $\alpha$ 25	5'- TGG CTA CCG TAC AAG CCG GAC CCT -3'
TRAV 34	V $\alpha$ 26	5'- AGC GCA GCC ATG CAG GCA TGT ACC -3'
TRAV 39	V $\alpha$ 27	5'- AAG CCC GTC TCA GCA CCC TCC ACA -3'
TRAV 36	V $\alpha$ 28	5'- TGG TTG TGC ACG AGC GAG ACA CTG -3'
TRAV 30	V $\alpha$ 29	5'- GAA GGG TGG AGA ACA GAT GCG TCG -3'
	C $\alpha$	5'- GTT GCT CCA GGC CCG GGC ACT GTT -3'

Taula 1.

Llistat de primers V $\alpha$  utilitzats. S'indica la correlació entre la nomenclatura utilitzada segons Genevée et al. Eur J Immunol. 1992. i l'actual segons la base de dades internacional IMGT. Les bases que apareixen subratllades indiquen *missmatches* induïts a la seqüència per tal de reduir la hibridació creuada entre famílies.

› Electroforesi V $\alpha$  en gel d'agarosa:

Per a la visualització dels productes amplificats, es va fer un gel d'agarosa especial d'alta resolució AG-5 (ECOGEN) al 2%, en tampó TAE a 1X, que es deixà polimeritzar prèviament 20min a 4°C. Es carregà 6 $\mu$ l de cada amplificat amb 1 $\mu$ l de tampó de càrrega estàndard (20% de glicerol, 1% d'SDS, 0.1M d'EDTA i 0.25% de Blau de Bromofenol) per pou. El marcador de pes mol.lecular usat fou GC-015-004 100bp (GENECRAFT) i es feu córrer a 60V (uns 55mA) durant 2h.

<b>Mescles de primers per als MIX A I-XII</b>			
<b>MIX's:</b>	<b>Preparació:</b>		
	<i>Primers</i>	Relació de volums*:	Concentració del primer al MIXA:
<b>MIXA I:</b>	V $\alpha$ 18 + V $\alpha$ 12 + V $\alpha$ 1	1:1:1	1'7 $\mu$ M, 1'7 $\mu$ M i 1'7 $\mu$ M
<b>MIXA II:</b>	V $\alpha$ 8 + V $\alpha$ 24	1:2	1'7 $\mu$ M i 3'3 $\mu$ M
<b>MIXA III:</b>	V $\alpha$ 2+ V $\alpha$ 23 +V $\alpha$ 17	1:1:3/4	1'85 $\mu$ M, 1'85 $\mu$ M i 1'4 $\mu$ M
<b>MIXA IV:</b>	V $\alpha$ 19+ V $\alpha$ 20 + V $\alpha$ 26	1:1:2	1'25 $\mu$ M, 1'25 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXA V:</b>	V $\alpha$ 21 + V $\alpha$ 22 + V $\alpha$ 6	1:1:2	1'25 $\mu$ M, 1'25 $\mu$ M, 2'5 $\mu$ M
<b>MIXA VI:</b>	V $\alpha$ 15 + V $\alpha$ 25 +V $\alpha$ 16	1:1:1'5	1'4 $\mu$ M, 1'4 $\mu$ M i 2'1 $\mu$ M
<b>MIXA VII:</b>	V $\alpha$ 3 + V $\alpha$ 4	1:1	2'5 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXA VIII:</b>	V $\alpha$ 5 + V $\alpha$ 7 + V $\alpha$ 10.	1:1:1	1'7 $\mu$ M, 1'7 $\mu$ M i 1'7 $\mu$ M
<b>MIXA IX:</b>	V $\alpha$ 28 + V $\alpha$ 9 + V $\alpha$ 11	1:1:1	1'7 $\mu$ M, 1'7 $\mu$ M i 1'7 $\mu$ M
<b>MIXA X:</b>	V $\alpha$ 13 + V $\alpha$ 27	1:1	2'5 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXA XI:</b>	V $\alpha$ 14 + H <sub>2</sub> O	1:2	1'7 $\mu$ M
<b>MIXA XII:</b>	V $\alpha$ 29 + H <sub>2</sub> O	1:2	1'7 $\mu$ M

**Taula 2. .Mescles de primers MIXAs I-XII aplicades en aquest treball.**

S'indica les combinacions de primers utilitzades i la concentració de cadascun en  $\mu$ M.

\* Volums adaptats per a compensar diferències d'amplificació segons la "força" del primer (afinitat per la cadena motlle i competència entre ells pels reactius d'amplificació).

## 2.7. PCR multiplex V $\beta$ : Detecció de les famílies gèniques TRBV.

Per l'amplificació de famílies V $\beta$ , es va utilitzar els primers i els grups d'aquests (MIX B) descrits per Chitnis i Pahwa [171] amb alguna modificació.

Els primers i els grups MIXB estan descrits a les **Taules 3 i 4** respectivament. Com en el cas anterior, la nomenclatura fou revisada amb l'eina online FASTA i les bases de dades de seqüències d'EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) i IMGT/LIGM-DB (Université Montpellier 2, Montpellier, France) [1].

TRBV (Nomenclatura actual IMGT)	V $\beta$ (Nomenclatura antiga)	Seqüència (Chitnis & Pahwa, 2002)
TRBV 9	V $\beta$ 1	5'- CAA CAG TTC CCT GAC TTG CAC -3'
TRBV 20	V $\beta$ 2	5'- TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT -3'
TRBV 28	V $\beta$ 3	5'- TCT AGA GAG AAG AAG GAG CGC -3'
TRBV 29	V $\beta$ 4	5'- CAT ATG AGA GTG GAT TTG TCA TT -3'
TRBV 5-1	V $\beta$ 5S1	5'- TTC AGT GAG ACA CAG AGA AAC -3'
TRBV 5-6	V $\beta$ 5S2	5'- CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG -3'
TRBV 7	V $\beta$ 6	5'- AGG CCT GAG GGA TCC GTC TC -3'
TRBV 4	V $\beta$ 7	5'- CTG AAT GCC CCA ACA GCT CTC -3'
TRBV 12	V $\beta$ 8	5'- TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG -3'
TRBV 3	V $\beta$ 9	5'- AAA TCT CCA GAC AAA GCT CAC -3'
TRBV 25	V $\beta$ 11	5'- ACA GTC TCC AGA ATA AGG ACG -3'
TRBV 10	V $\beta$ 12	5'- GAC AAA GGA GAA GTC TCA GAT -3'
TRBV 6-5	V $\beta$ 13S1	5'- GAC CAA GGA GAA GTC CCC AAT -3'
TRBV 6-2/3	V $\beta$ 13S2	5'- GTT GGT GAG GGT ACA ACT GCC -3'
TRBV 27	V $\beta$ 14	5'- TCT CGA AAA GAG AAG AGG AAT -3'
TRBV 24	V $\beta$ 15	5'- GTC TCT CGA CAG GCA CAG GCT -3'
TRBV 14	V $\beta$ 16	5'- GAG TCT AAA CAG GAT GAG TCC -3'
TRBV 19	V $\beta$ 17	5'- CAC AGA TAG TAA ATG ACT TTC AG -3'
TRBV 18	V $\beta$ 18	5'- GAG TCA GGA ATG CCA AAG GAA -3'
TRBV 30	V $\beta$ 20	5'- TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC -3'
TRBV 11	V $\beta$ 21	5'- GAT ATG AGA ATG AGG AAG CAG -3'
TRBV 2	V $\beta$ 22	5'- CAG AGA AGT CTG AAA TAT TCG A -3'
TRBV 13	V $\beta$ 23	5'- TCA TTT CGT TTT ATG AAA AGA TGC -3'
TRBV 15	V $\beta$ 24	5'- AAA GAT TTT AAC AAT GAA GCA GAC -3'
TRBC	C $\beta$ -R	5'- CTT CTG ATG GCT CAA ACA C -3'

**Taula 3. Llistat dels primers V $\beta$  utilitzats.**

S'indica la correlació entre la nomenclatura utilitzada de Chitnis et. al. *Manual of clinical laboratory immunology*. 2002. i l'actual segons la base de dades internacional IMGT ([www.IMGT.org](http://www.IMGT.org))

El protocol aplicat és semblant al de la “PCR *multiplex* V $\alpha$ ” descrita a l'apartat anterior, amb les següents variacions:

La barreja de PCR comú per a cadascun dels tubs es realitzà en aquest cas amb 40ng de cDNA; 0'75 $\mu$ l de primer “V $\beta$  constant *reverse*” (C $\beta$ -R) 5 $\mu$ M i la resta de reactius en la mateixa proporció que per a la PCR *multiplex* V $\alpha$  però amb els volums ajustats per a un volum final de 15 $\mu$ l (13'8 $\mu$ l de barreja + 1'2 $\mu$ l de primers). Els diferents grups d'amplificació s'han anomenat MIXB. S'afegí finalment 1'2 $\mu$ l de cada “MIXB” (on quedaria cada primer entre 0,1 i 0,25mM. El programa d'amplificació fou: pre-desnaturalització 3min a 97°C. 35 cicles de 30s a 94°C, 30s a 55°C i 1min a 72°C; i extensió final de 10min a 72°C al termociclador PERKIN ELMER Geneamp 2400.

Per a cada PCR multiplex  $V\alpha$  i  $V\beta$ , es realitzava un control negatiu per a tots els tubs B en paral·lel i partir de la mateixa barreja de reactius de PCR que per a les mostres problema. Per descartar possibles contaminacions, s'aplicava recurrentment com a control positiu cDNA de PBMC diluït a 1/10 i com a negatiu el cDNA d'una LCL (Línia de cèl·lules B transformada.)

› **Electroforesi  $V\beta$  en gel d'agarosa.**

La visualització de l'amplificat es va fer en un gel d'agarosa d'alta resolució, concentrat al 2,5% ja que les bandes resultants eren de menor mida (200-300pb) que per a les  $V\alpha$ . El marcador de pes molecular escollit fou  $\Phi$ X174 DNA *Hae III* DIGEST (SIGMA). Les condicions d'electroforesi foren 55V (~40mA) durant 2h.

<u>Mescles de primers per als MIX B A-L</u>			
<u>MIX's:</u>	<u>Preparació:</u>		
	<u>Primers</u>	<u>Relació de volums:</u>	<u>Concentració del primer al MIXB:</u>
<b>MIXB A :</b>	<b><math>V\beta 1 + V\beta 18 + V\beta 23</math></b>	1:1:1	2'5 $\mu$ M, 2'5 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXB B:</b>	<b><math>V\beta 2 + V\beta 4 + V\beta 8</math></b>	1:1:1	2'5 $\mu$ M, 2'5 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXB C:</b>	<b><math>V\beta 3 + V\beta 13.1</math></b>	1:1	2'5 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXB D:</b>	<b><math>V\beta 5.1 + V\beta 11</math></b>	1:1	2'5 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXB E:</b>	<b><math>V\beta 6 + V\beta 24</math></b>	1:2	1'7 $\mu$ M, 3'3 $\mu$ M
<b>MIXB F:</b>	<b><math>V\beta 7 + V\beta 21</math></b>	1:2	1'7 $\mu$ M, 3'3 $\mu$ M
<b>MIXB G:</b>	<b><math>V\beta 9 + V\beta 16</math></b>	1:1	2'5 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXB H:</b>	<b><math>V\beta 5.2 + V\beta 12</math></b>	1:1	2'5 $\mu$ M i 2'5 $\mu$ M
<b>MIXB I:</b>	<b><math>V\beta 13.2 + V\beta 15</math></b>	1:2	1'7 $\mu$ M, 3'3 $\mu$ M
<b>MIXB J:</b>	<b><math>V\beta 14 + V\beta 17</math></b>	2:1	3'3 $\mu$ M, 1'7 $\mu$ M
<b>MIXB K:</b>	<b><math>V\beta 20 + H_2O</math></b>	1:2	1'7 $\mu$ M
<b>MIXB L:</b>	<b><math>V\beta 22 + H_2O</math></b>	1:2	1'7 $\mu$ M

**Taula 4. Mescles de primers MIXBs A-L aplicades en aquest treball.**

S'indica les combinacions de primers utilitzades i la concentració de cadascun en uM. Les concentracions estan ajustades per facilitar les co-amplificacions.



**2.8. Spectratyping (Genotipatge):** *Determinació de clonalitat per anàlisi del perfil CDR3 de cada família TRBV amplificada.*

› Per al genotipatge de les bandes V $\beta$  amplificades per cada mostra de línies cel·lulars PB100.X, es va fer una RT-PCR convencional seguint el mateix protocol que s'ha explicat anteriorment, però amb el corresponent *primer reverse* de la regió constant "CB-R" marcat amb el fluorocrom FAM.

› Per al genotipatge de les mostres de pàncrees, melsa i PBMCS (del pacient diabètic i controls corresponents), es va realitzar una reacció de marcatge (*Run-off*) a partir del producte amplificat en les PCR *multiplex* V $\beta$ . S'utilitzà la mateixa mescla de reactius que per a la "PCR *multiplex* V $\beta$ " anterior però substituint el motlle per 2ul de l'amplificat diluït a 1/4 i afegint com a *primers* només el *reverse* de la regió constant "CB-R" marcat amb el fluorocrom FAM.

Per ambdós protocols, un cop obtinguts els amplimers marcats, el genotipatge es va realitzar *Servei de Genòmica i Seqüenciació* (Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Unitat de recerca B, UAB). Es van analitzar en l'aparell seqüenciador ABI 3100 (ABI PRISM) i ABI 3130XL (Applied Biosystems) respectivament, mitjançant l'electroforesi amb matriu de polímer P.O.P en capil·lars de 50cm; l'anàlisi preliminar de les dades es realitzà mitjançant el software *GeneScan* (ABI PRISM) o *Peak Scanner* (Applied Biosystems) en cada cas.

Per a la interpretació de les dades i permetre la comparació dels nivells d'expansió clonal entre mostres, es va normalitzar els valors de fluorescència amb els del marcador intern GS400HD (la mitja dels valors dels pics del marcador entre 200 i 260pb) i es va calcular l'índex relatiu (RI) [172, 173], que permet detectar expansions clonals segons la rellevància de l'àrea d'una mida de reordenament CDR3 concreta sobre la resta de mides d'una mateixa família V $\beta$ .

La formula aplicada fou:

$RI = (\text{\grave{a}rea del pic problema} / \text{\grave{a}rea total dels pics de la fam\grave{il}ia V\beta}) \times 100$ .

RI >50% indica pres\`encia d'una expansi\`o clonal per sobrerrepresentaci\`o d'una mida de reordenament concreta.

## 2.9. Seq\`uenciaci\`o: Identificaci\`o de seq\`u\`encies $\beta$ -CDR3

➤ Per a les mostres clonals PB100.X la seq\`uenciaci\`o fou directa:

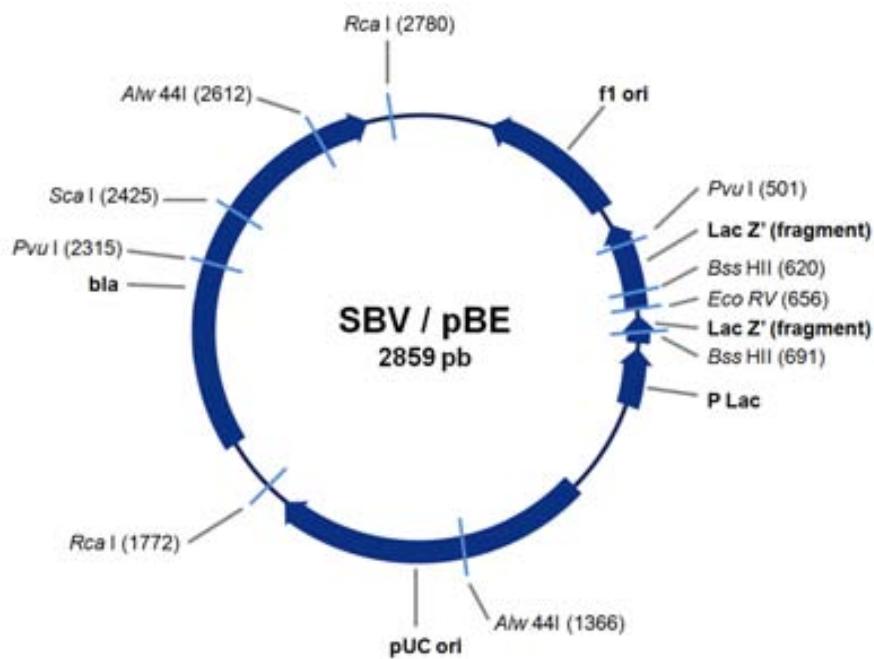
S'amplific\`a per RT-PCR amb el protocol de la PCR multiplex V $\beta$ , sobre les mostres PB100.29 i PB100.22i, per\`o utilitzant sols els *primers* FW V $\beta$ 11 i V $\beta$ 13.1 en combinaci\`o amb el RV com\`u. El DNA obtingut es purific\`a amb una columna *NucleoSpin Extract II (MN)* i es va seq\`uenciar directament al *Servei de Gen\`omica i Seq\`uenciaci\`o* (Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Unitat de recerca B, UAB), mitjan\`ant el kit de marcatge *BigDye (APPLIED BIOSYSTEMS)* i el seq\`uenciador *ABI 3100 (ABI PRISM)*. Cada seq\`u\`encia s'obtingu\`e per duplicat partint de cadascun dels dos *primers*. S'estudi\`a els cromatogrames obtinguts amb el software *Chromas* i s'alinearen online les seq\`u\`encies obtingudes mitjan\`ant l'eina *CLUSTAL W*, comprovant la fiabilitat de cadascuna. Es comprov\`a que totes les seq\`u\`encies no tenien aparentment cap error i es pass\`a a analitzar les identitats.

➤ En les mostres policlonals, s'aplic\`a la t\`ecnica de clonatge pr\`eviament a la seq\`uenciaci\`o per tal d'a\`illar les seq\`u\`encies individuals CDR3 en la barreja que constitueix l'ampl\`imer per cada fam\`ilia TRBV. Es detalla el protocol de clonatge a continuaci\`o.

## 2.10. Clonatge.

### 2.10.1. Vector PBE.

Per a aquest clonatge s'utilitzà el vector PBE, variant del pBSKII amb omissió del polilinker per tal de reduir al màxim la mida i facilitar els processos de lligació i transformació posteriors.



**Figura 13.** Esquema del vector pBE, plàsmid utilitzat per al clonatge dels fragments TRBV co-amplificats en la PCR *multiplex*. Cedit amablement pel Dr. J. Piñol.

8 $\mu$ g del vector PBE van ser digerits utilitzant la diana de clonatge ECORV. Per tal d'aconseguir gran concentració del vector digerit, s'afegí PBE a 1 $\mu$ g/ $\mu$ l amb el buffer B corresponent a ECORV a concentració final 1X i 20U de l'enzim, afegint aigua PCR (miliQ autoclavada 2X) fins a un volum final de 20 $\mu$ l. La barreja es mesclà amb cura mitjançant la pipeta i es deixà 2h 30' a 37°C per assegurar la reacció.

Posteriorment es va aïllar el digerit per electroforesi en gel d'agarosa al 0.8% corregut 45min a 70V (uns 65mA) tallant la banda i passant-la pel kit *Perfectprep Gel Cleanup* (EPPENDORF) seguint les instruccions del fabricant.

### 2.10.2. Preparació de l'insert.

L'amplificat obtingut en la PCR multiplex V $\beta$  va ser necessàriament reamplificat per tal d'obtenir aïllats els productes obtinguts per amplificació amb un determinat primer V $\beta$  i generar-hi extrems roms que permetrien la lligació. S'incubaren 0.5ul de l'amplímer obtingut per un MIXB concret després de diluir 1/5, amb una barreja de reactius conformada per 4ul del tampó *Reaction Buffer HF 5X (NEW ENGLAND BIOLABS)*, 0.4ul de dNTPs a 2.5mM cadascun, 2ul de cada primer a 5uM (el sense corresponent a la família V $\beta$  que es busca i l'*antisense* comú CB-R) i 1U de la polimerasa *Phusion (FINNZYMES)*, es va completar fins al volum final de 20ul amb aigua per a PCR *Ultrapure (BIOTOOLS)*. El programa d'amplificació fou: pre-desnaturalització 30s a 98°C, 35 cicles de 7s a 98°C, 20s a X°C i 10s a 72°C; i extensió final de 7min a 72°C. La temperatura d'annealing fou ajustada en cada cas amb l'eina predictiva *TM-CALCULATOR* de [www.finnzymes.com](http://www.finnzymes.com), tal com indica el fabricant. Per a cada PCR un control negatiu per a tots els tubs va ser realitzat en paral·lel a partir de la mateixa mescla de reactius que per a les mostres problema. El producte fou purificat per electroforesi en gel d'agarosa al 2% corregut 30min a 80V( Uns 60 mA), tallant la banda amb cura i netejant l'amplímer amb el kit *Perfectprep Gel Cleanup (EPPENDORF)* seguint les instruccions del fabricant.

### 2.10.3. Generació de les cèl·lules competents.

Per al procés de preparació de la soca usada per al clonatge, s'utilitzà una alíquota de la soca E.Coli DH5 $\alpha$  i es sembrà en una placa d'LB O/N. L'endemà es va seleccionar una colònia d'entre 2-3mm de diàmetre que es va sembrar en **medi SOB** en un flascó de 250ml i s'incubà a 37°C unes 6-8 hores. Seguidament es dividí l'inocul en 3 erlenmeyers amb 125ml de SOB amb 10ml, 5ml i 2ml de l'inocul respectivament que s'incubaren a 18-22°C o/n amb moderada agitació a 250rpm.

Al dia següent, es valorà la OD600 dels cultius cada 45min fins que s'aconseguí el valor 0,55 en algun dels 3. Aquest cultiu es reposà 10min en gel i s'eliminà el medi per centrifugació a 2500g (3300rpm amb el rotor *Sorvall GSA*) durant 15min a 4°C i decantació. Seguidament es feu un rentat amb 40ml del **buffer de transformació INOUE** i finalment es resuspengué cuidadosament amb 10ml d'INOUE fred, s'afegí 0,75ml de DMSO (*Dimethyl Sulphoxide; SIGMA*) barrejant amb cura i es reposà en gel durant 10min.

Finalment es feu la congelació per submersió en nitrogen líquid d'alíquotes de 100ml que es conservaren a -80°C fins al moment del seu us.

➤ Medi SOB:

Per a 1L de medi SOB s'afegí Tiptona al 2%, 0,5% d'extracte de llevat, 10ml de KCl 250mM a pH7, s'enrasà amb aigua destil.lada i s'esterilitzà per autoclau. Abans d'utilitzar calgué afegir-hi 5ml de MgCl<sub>2</sub> 2M prèviament autoclavat.

➤ Buffer de transformació INOUE:

Per a 500ml de la solució, es dissolgué en aigua Milli-Q 1,1g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 9,3g de KCL, 10ml de **solució PIPES**, s'ajustà el pH a 6,7 i s'afegí finalment 5,44g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. La solució s'esterilitzà per filtració a 0,45um, es dividí en alíquotes i es guardà a -20°C.

➤ Solució PIPES (0,5M, pH 6,7):

Per a 50ml de volum final s'afegí 7,55g de PIPES, s'ajustà el pH a 6,7 amb 5M KOH i s'enrasà amb aigua destil.lada; seguidament es va filtrar amb esterilitat a 0,45um i es conservà la solució a -20°C.

#### 2.10.4. Lligació i Transformació.

El producte VB amb extrems roms va ser clonat al vector PBE mitjançant la lligasa T4 (*NEW ENGLAND BIOLABS*) (4U) i el buffer associat a 1X, 50-75ng de vector i 300-500ng d'insert O/N a 16°C.

El producte lligat de vector + insert, es va transformar en cèl.lules competents *E. Coli DH5α* aplicant 50ul de bacteris amb 5ul de la lligació PBE+insert. La barreja es deixà reposar 30min en gel i se li aplicà un xoc tèrmic de 45s a 42°C i 2 min en gel. Seguidament es permeté la recuperació de les cèl.lules en medi LB durant una hora a 37°C en agitació suau i es plaquejaren sobre agar amb ampicil.lina (com a agent selectiu de colònies transformades), IPTG(com a inductor del color) i X-gal (com a indicador colorimètric de la presència d'insert al vector).

➤ Preparació del medi LB i les plaques AMP + IPTG + Xgal:

Per a la preparació del medi líquid LB s'afegí Triptona al 1%, extracte de llevat al 0.5% i NaCl<sub>2</sub> al 1%; es dissolgué els components per agitació en aigua destil.lada *MiliQ* i s'ajustà el pH a 7,2. El medi s'esterilitzà per autoclau.

Per a les plaques s'afegí 1,5% d'AGAR a la mescla abans d'esterilitzar.

Després de l'esterilització, calgué agregar a l'LB-Agar els components IPTG (*Isopropyl-B-D-Thiogalactoside; ROCHE*) a 0,2mM, filtrat en esterilitat a 0.22um, X-Gal (5-Bromo-4chloro-3indolyl-B-D-Galactopyramoside) a 40ug/ml, prèviament diluït en Dimetilformamida, i Ampicil.lina a 100ug/ml. Posteriorment es va plaquejar la barreja amb cura i conservar les plaques en fosc a 4°C fins al moment del seu us.

#### 2.10.5. Selecció de colònies i extracció plasmídica.

Les colònies positives se seleccionaren mitjançant el color (blanques) que adquirien a la placa, i es varen créixer o/n en medi LB amb Ampicil.lina. El plàsmid va ser purificat mitjançant el kit *Wizard Plus SV Minipreps kit (PROMEGA)*, es va quantificar els eluïts amb l'espectrofotòmetre *EPPENDORF "BioPhotometer"* acceptant una concentració de almenys 100ng/ul i una puresa (A260/280) d' 1.6 i es feu una digestió amb la diana plasmídica ScaI per tal d'identificar les mostres amb pes molecular adequat (entre 3100 i 3400pb).

#### 2.10.6. Seqüenciació i anàlisi del $\beta$ -CDR3.

Les construccions plasmídiques positives es van seqüenciar amb el *primer* pT7 del vector amb el *kit BigDye* i l'analitzador *ABI 3130XL (Applied Biosystems)* al *Servei de seqüenciació d'àcids nucleics de la UAB*.

Les dades de seqüenciació obtingudes es validaren amb el *software Chromas* i s'analitzaren les seqüències per alineació *online* mitjançant l'eina *CLUSTAL W*. Es comprovà que totes les seqüències no tenien aparentment cap error, s'obtingué la identificació de la zona CDR3 amb les eines *online* D'IMGT (*IMGT/LIGM-DB (Université Montpellier 2, Montpellier, France)*) per validació amb les bases de dades associades i es passà a analitzar les identitats entre seqüències trobades.

Per als clons "PB100.X", les seves característiques permeteren seqüenciar directament el producte de la PCR multiplex VB sense ser necessari el clonatge previ.

**2.11. Anàlisi estadístic de les dades de seqüenciació:** *Definició de patrons d'aminoàcids al  $\beta$ -CDR3 dels clons T intra-pancreàtics.*

Les preferències en aminoàcids al CDR3 es van analitzar per l'alineament de les seqüències CDR3 de la mateixa mida en 4 grups (11aa, 12aa, 13aa i 14aa) i la posterior comparació de freqüències amb l'esperat segons marca el proteoma humà.

Es va aplicar un test estadístic Binomial per cada aminoàcid trobat en una posició concreta de la seqüència. La distribució acumulativa Binomial amb paràmetres  $n$  (nombre de seqüències en l'alineament) i  $p$  (probabilitat de l'aminoàcid  $X$  al proteoma), va ser avaluada per obtenir la probabilitat que  $X$  es trobi en la posició  $L$  en  $m - 1$  o menys de les seqüències de  $n$ ,  $P(X \leq m - 1)$ , sent  $m$  el nombre real de seqüències que mostren l'aminoàcid  $X$  en la posició  $L$  de l'alineament i assumint que les posicions en la seqüència són independents.

Així, l'aminoàcid  $X$  era considerat significativament sobrerrepresentat a la posició  $L$  si  $1 - P(X \leq m - 1) < 0.05$ ; que és, l'esperança de trobar aquest aminoàcid  $m$  vegades o més a la mateixa posició en  $n$  seqüències, donat que la seva probabilitat al proteoma sigui  $<5\%$ .

L'anàlisi final es va aplicar amb aquest test prenent dues aproximacions diferents: i) Considerant totes les seqüències identificades com a equiprobables, "Anàlisi qualitatiu" o, ii) Ponderant cada seqüència segons el nombre de vegades havia estat trobada experimentalment, "Anàlisi quantitatiu".

- ❖ *L'anàlisi bioinformàtic va ser realitzat per Pau M. Muñoz, del grup de Biologia Computacional i Proteòmica a l' Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona .*



**2.12. Citometria de flux: Detecció de V $\beta$ 11 i V $\beta$ 13.1**

Es van utilitzar 200.000 cèl.lules de cada mostra. Després de dos rentats amb tampó PBS (PBS 1X, 0'5% FCS), centrifugant 6min a 300g (4°C), es va fer el marcatge doble incubant amb els dos anticossos  $\alpha$ -TCRV $\beta$ 11<sup>FITC</sup> i  $\alpha$ -TCRV $\beta$ 13.1<sup>PE</sup> (IMMUNOTECH, COULTER) seguint les instruccions del fabricant. Després d'incubar 30min a les fosques, les cèl.lules es van rentar dos cops, per retirar l'excés d'anticòs, i resuspendre en 0'5ml de PBS. La detecció i anàlisi es realitzà mitjançant el citòmetre *FACSscan Cell Analyzer* i el software *Cell Quest* de BD BIOSCIENCES.

**2.13. PCR Real-Time de CD3 $\gamma$ , GAPDH i FOXP3: PCR a "temps real", quantificació absoluta dels gens de CD3, GAPDH i FOXP3.**

Per a la tècnica de PCR a "temps real" de la subunitat gamma de CD3, s'utilitzaren els primers FW: 5'CCCAATGACCAGCTCTACCA3' i RV: 5'GGAAGTGAATAGGAGGAGAACAC3' per a CD3 $\gamma$ , FW: 5'CTTCTTTTTCGTCGCCAG3' i RV: 5'AGCCCCAGCCTTCTCCA3' per GAPDH i FW: 5'TCAAGCACTGCCAGGCG3' i RV: 5'CAGGAGCCCTTGTCGGAT3' per FOXP3 [174] i els reactius del kit "Lightcycler - Fast Start DNA Master SYBR Green I" (ROCHE). L'amplificació es realitzà en capil·lars "LightCycler capillaries" (ROCHE) en l'aparell termociclador "Lightcycler 2.0 (ROCHE)" i les dades s'obtingueren i analitzaren mitjançant el programari "Lightcycler Software 4.0 (ROCHE)".

El protocol aplicat fou el següent:

Es preparà una "MIX" dels reactius amb: Cada primer a 0,5µM, 1X del *Mix* per *Real-time* subministrat amb el kit de *ROCHE*, que conté el tampó de reacció i l'agent intercalant "*Syber-Green*", que emet durant l'amplificació la lluminositat que permet la detecció i quantificació, i MgCl<sub>2</sub> a 2.5mM per a CD3γ i 3mM per a GAPDH i FOXP3. Es va repartir un volum de 9'5µl de barreja per mostra (capil·lar) i s'afegí el cDNA corresponent (20ng); es va tancar els capil·lars amb l'aplicador i se centrifugà en fred a poca velocitat abans de posar-los al termociclador "*Lightcycler 2.0 (ROCHE)*"; S'ajustà el canal de lectura a 530nm, corresponent a l'espectre d'emissió del *SYBR-Green* i es carregà a l'aparell els capil·lars de cada mostra i els corresponents 2 controls. El control positiu era un cDNA de PBMCs, diluït 1/10 (5ng/µl), que es mantingué entre diferents experiments i el negatiu era la barreja sense mostra cDNA.

El programa d'amplificació fou:

Un primer pas de desnaturalització de la mostra a 95°C 10min seguit de 40 cicles, en format de quantificació, a 61°C per CD3γ / 63°C per GAPDH / 66°C per FOXP3 de temperatura d'*annealing* i amb una extensió de 10seg per CD3γ i FOXP3/ 15 seg. per GAPDH. Aquí es feu el pas de detecció de la corba de *melting* i, finalment, es va fer un últim pas de refredament de l'aparell a 4°C.

Les dades obtingudes, s'analitzaren segons la opció d'*Absolute Quantification* que permet traçar una recta de quantificació basada en els valors dels *standards* de concentració coneguda. L'anàlisi complementari *Melting Curve Analysis - Genotyping* va permetre avaluar la presència de possibles inespecificitats en l'amplificació i l'electroforesi del producte en gel d'agarosa al 2% confirmà en cada cas la mida de l'amplímer obtingut.

# RESULTATS



## **OBJECTIU I.**

**OPTIMITZAR LA METODOLOGIA EXPERIMENTAL  
PER L'ESTUDI DEL TCR, MITJANÇANT EL DISENY  
D'UNA RT-PCR MULTIPLEX PER A L'ANÀLISI DEL  
REPERTORI TRAV I TRBV.**



## OBJECTIU I.

OPTIMITZAR LA METODOLOGIA EXPERIMENTAL PER L'ESTUDI DEL TCR, MITJANÇANT EL DISSENY D'UNA RT-PCR *MULTIPLEX* PER A L'ANÀLISI DEL REPERTORI TRAV I TRBV.



L'estudi del repertori TCR es realitza en la majoria de treballs publicats per RT-PCR convencional, amplificant cadascuna de les famílies gèniques V $\alpha$  (TRAV) i V $\beta$  (TRBV). En aquest abordatge, la possibilitat de coamplificar vàries famílies gèniques en una mateixa reacció i en un mateix tub significa un avantatge experimental que redueix els costos i la mostra necessària. Per a la realització d'aquest treball va ser necessari dissenyar el protocol experimental adequat, segons:

- 1) La posada en marxa d'una PCR *multiplex* per TRAV i per TRBV amb l'objectiu de reduir el nombre de tubs usats en cada amplificació i disminuir la quantitat de mostra per assaig.
- 2) L'anàlisi per genotipatge de les famílies gèniques amplificades en cada tub de PCR *multiplex*.
- 3) La identificació d'expansions clonals mitjançant el biomarcador CDR3 (regió determinant de complementarietat 3).

## 1.1. PCR *multiplex* per a l'amplificació de les famílies gèniques TRAV i TRBV

### 1.1.1. Anàlisi de les famílies gèniques TRAV

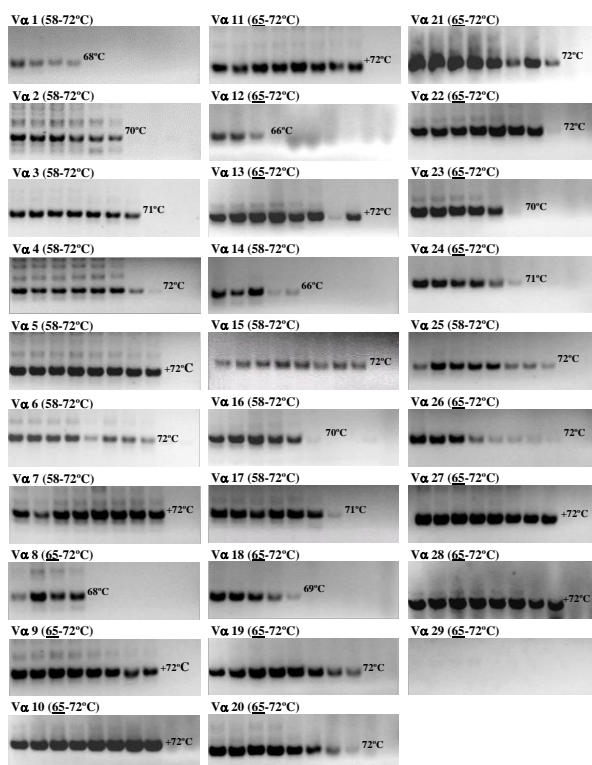
La identificació dels fragments gènics TRAV es realitza, en la majoria dels treballs publicats, a partir de la tècnica convencional de RT-PCR usant una bateria de cebadors per a les 29 famílies gèniques més freqüents [10]. L'amplificació de les 29 famílies es fa individualment (una per tub de reacció) i al mateix temps, usant un programa d'amplificació consens degut a que els cebadors utilitzats tenen característiques d'amplificació semblants. Finalment un gel d'agarosa permet visualitzar quines famílies  $V\alpha$  han estat amplificades i per tant s'expressen dins el repertori de cèl.lules T de la mostra problema.

La tècnica que es va utilitzar per l'estudi fou la RT-PCR *multiplex* basada en el mètode convencional però aplicant grups de cebadors que van permetre coamplificar dues o tres famílies per tub, reduint el nombre de tubs per assaig i la mida del gel i en conseqüència minimitzant el temps experimental i també la quantitat de DNA motlle (cDNA) necessaris. Aquesta aproximació ja estava descrita per a les famílies  $V\beta$  [171], però no per a les  $V\alpha$  en el moment de iniciar l'estudi.

Per posar a punt la tècnica, es va partir d'una bateria de cebadors 5' (*sense*) per a cadascuna de les famílies principals de gens TRAV ( $V\alpha 1$  a  $V\alpha 29$ ) i un sol cebador 3' (*antisense*) de la regió constant (TRAC).  $V\alpha 29$  s'utilitzava com a control ja que correspon a un pseudogen.

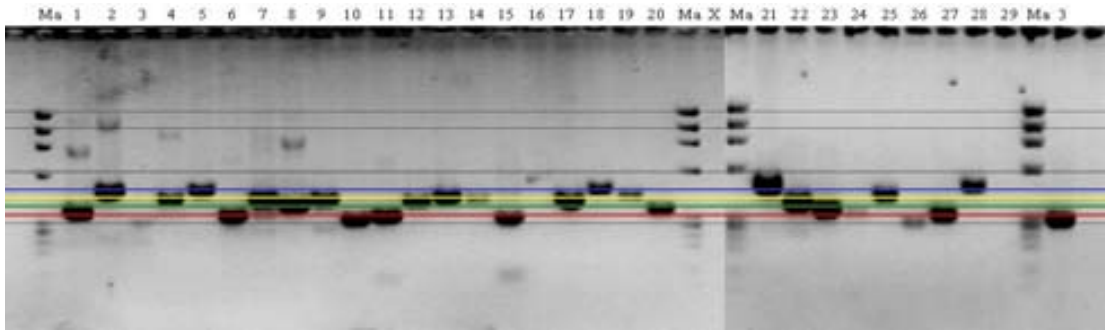


Inicialment, es va fer un assaig de PCR de gradient de temperatura (**Figura 14**), que va permetre determinar la temperatura límit i òptima per als cicles d'amplificació de cada cebador i dissenyar grups de cebadors de baixa competència en l'amplificació.



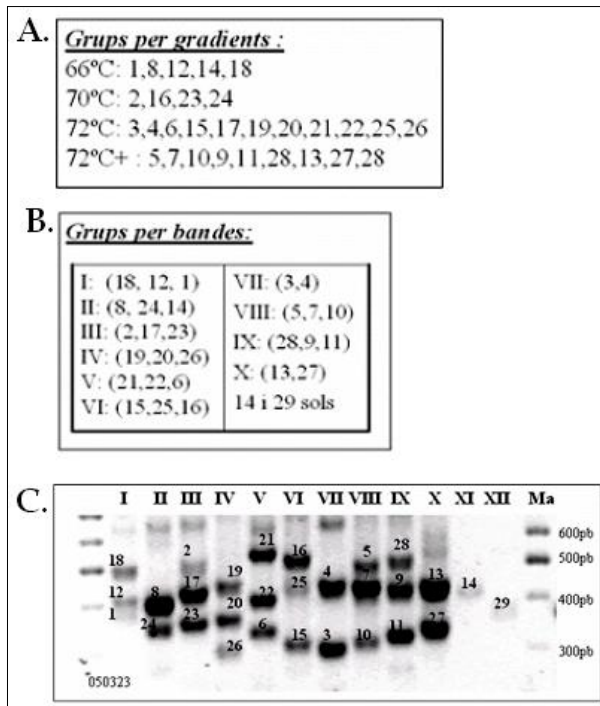
**Figura 14.** PCRs de gradient de temperatura per a cadascun dels cebadors  $V\alpha$ . Sobre cada gel s'indica el cebador analitzat i el rang de temperatura aplicat en cada cas. Sobre la banda límit de cadascun, s'indica la màxima temperatura d'amplificació en les condicions comuns aplicades. Tots superaven els 66°C menys  $V\alpha 29$  que no amplifica ja que correspon, segons s'indica a la l'artcle de referència (*Genevée et. al. Eur J Immunol.(1992)*) a una família  $V\alpha$  molt poc freqüent. La temperatura màxima de cada primer va ser un dels paràmetres per a dissenyar MIXs de coamplificació.

A part de la temperatura límit d'amplificació, un factor decisiu per al disseny dels grups fou la mida d'amplímer, ja que les bandes amplificades en un mateix tub havien de ser diferenciables en un gel d'agarosa per a tots els cebadors. Es va fer una RT-PCR individual a la temperatura d'*annealing* comú de 60°C seguint les condicions descrites a l'article publicat per Genevée et al. [10] i el producte d'amplificació es va visualitzar amb un gel d'agarosa (**Figura 15**).



**Figura 15. Amplificació individual del repertori TRAV.** Els amplímers van resultar ser de mides lleugerament diferents, fet que va permetre l'agrupació en un mateix tub de cebadors d'amplímer de mida diferent, tenint en compte els grups de temperatures establerts.

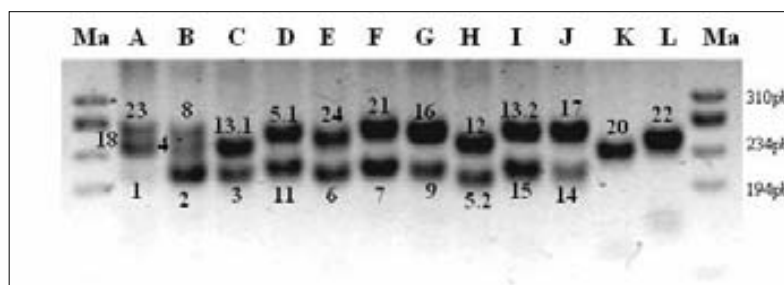
Segons els paràmetres establerts de bandes en gel no solapades (**Figura 15**) i temperatura màxima d'amplificació (**Figura 16A**), els cebadors finalment es varen agrupar en 12 grups o MIX de 1, 2 o 3 cebadors: MIXA-I a MIXA-XII tal com mostra la **Figura 16B i 16C**, cada MIX corresponent-se amb un tub en la reacció de PCR. Les concentracions dels cebadors es van ajustar (**Taula 2** de Materials i mètodes), en els casos en que l'amplificació d'un dels cebadors dominava respecte l'altre present a la barreja degut a l'ús d'una temperatura d'*annealing* consens. Finalment, tal i com es pot veure a la **Figura 16C**, es va obtenir una plantilla de referència a partir del control positiu E-PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* estimulats amb PHA-IL2) en la qual totes les famílies TRAV hi eren representades. Posteriorment, la PCR *multiplex* per les TRAV es va acabar d'ajustar en el treball de màster de Erika Scholz, aportant les modificacions especificades a l'Annex de materials i mètodes. La TRAV-*multiplex* formada per 12 MIXs de cebadors (MIXA d'I a XII) es va aplicar en aquest estudi per a la descripció del repertori de les famílies gèniques TRAV en les mostres del donant diabètic.



**Figura 16.** Grups d'amplificació dissenyats per a la PCR *multiplex* TRAV. A) Grups de cebadors de temperatures màximes semblants. B) Grups de cebadors proposats segons la mida de les bandes. C) Plantilla per a la detecció de les famílies TRAV. Producte de l'amplificació en la mostra E-PBMCs amb grups de cebadors optimitzats. Totes les famílies testades coamplificaven correctament i donaven bandes distingibles sobre aquest tipus de gel. La diferencia d'intensitat de les bandes era deguda a cada cebador. Es va obtenir la plantilla de referència sobre la que identificar les mostres de manera qualitativa.

### 1.1.2. Anàlisi de les famílies gèniques TRBV

Per a la identificació de les famílies **TRBV** en grups de coamplificació es va adaptar la tècnica de multiplex descrita per Chitnis et al. [171]. Usant el mateix joc de cebadors per a 24 famílies TRBV, es van optimitzar les MIXs (veure l'apartat de Materials i mètodes) obtenint la plantilla de referència a partir de la mostra control E-PBMCs (**Figura 17**).

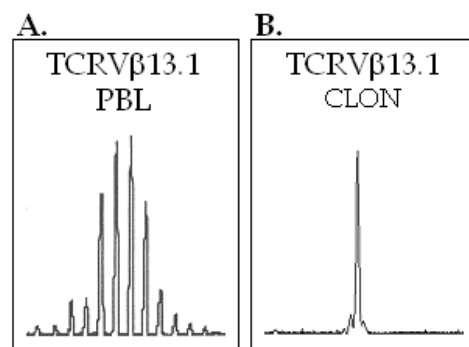


**Figura 17.** PCR *multiplex* per a la detecció de les famílies TRBV. Producte de l'amplificació en la mostra E-PBMCs i visualitzat en gel d'agarosa d'alta resolució. Totes les TRBV coamplificaven correctament, donant bandes distingibles corresponents a cada família, indicada al costat de la banda amb el nombre corresponent.

## 1.2. Genotipatge (*spectrayping*): Obtenció i valoració del perfil clonal de les mostres.

Com s'ha descrit a la introducció, cada cèl.lula T expressa una regió CDR3 de seqüència única per cadascuna de les cadenes  $\alpha$  i  $\beta$  que constitueixen el TCR. La tècnica del genotipatge permet descriure la distribució de mides de reordenament de totes les cèl.lules T que expressen una determinada família TRAV o TRBV. Les diferents longituds de seqüència dels amplimers continguts a la banda de PCR d'una família amplificada identifica de forma indirecta el número de reordenaments presents en aquesta família. Una distribució on cap reordenament predomina sobre els altres és una distribució policlonal tal i com es representa a la **Figura 18A**, on es mostra el genotipatge de l'amplímer obtingut per a la família V $\beta$ 13.1 d'una mostra de PBMCs.

Es pot veure que la banda de PCR corresponent a l'amplímer V $\beta$ 13.1 està formada per 12 mides de reordenament, distribuïdes segons l'abundància en forma de campana de Gauss. L'increment d'una d'aquestes longituds expressades en una família V $\beta$ , tal i com mostra la **Figura 18B**, manifesta la dominància d'una determinada seqüència i és un indicatiu de l'expansió clonal de cèl.lules T que tenen aquesta mida de regió CDR3 a la mostra.



**Figura 18. Genotipatge indicatiu del reordenament, per la família V $\beta$ 13.1, d'una mostra policlonal i d'un clon.**

**A)** Complexitat de la família V $\beta$ 13.1 amplificada d'una mostra de PBMCs, on cada pic representa reordenaments d'una determinada mida. Entre pics hi ha una diferència de 3pb.

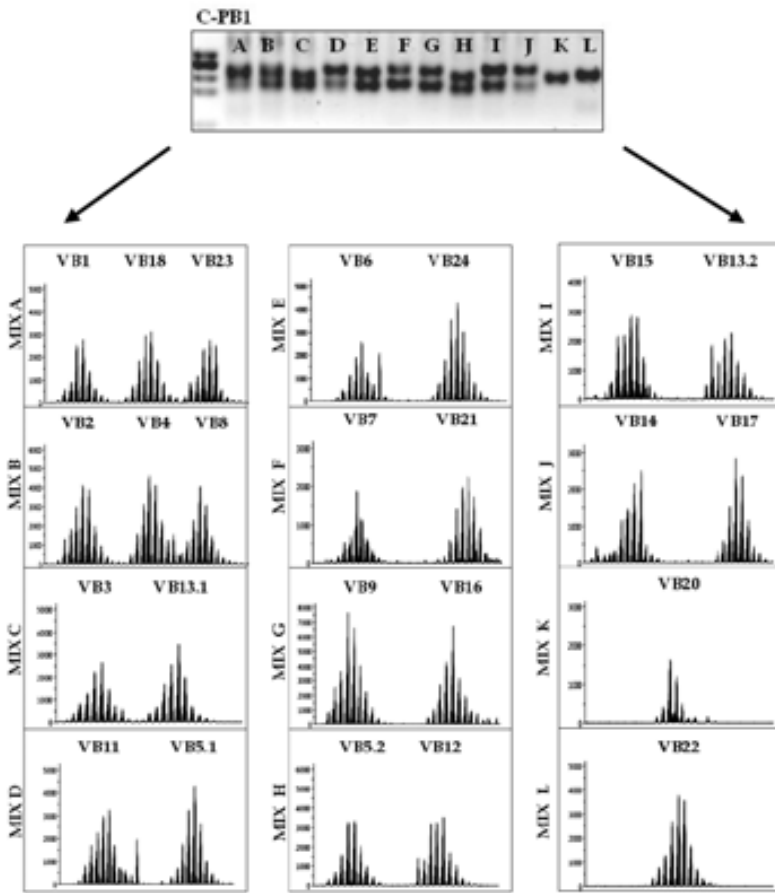
**B)** Amplificació d'un clon de cèl.lula T (línia PB100.29) que expressa V $\beta$ 13.1 amb un únic reordenament.

### 1.3. Identificació de les expansions clonals en les diferents mostres, usant com a biomarcador el CDR3.

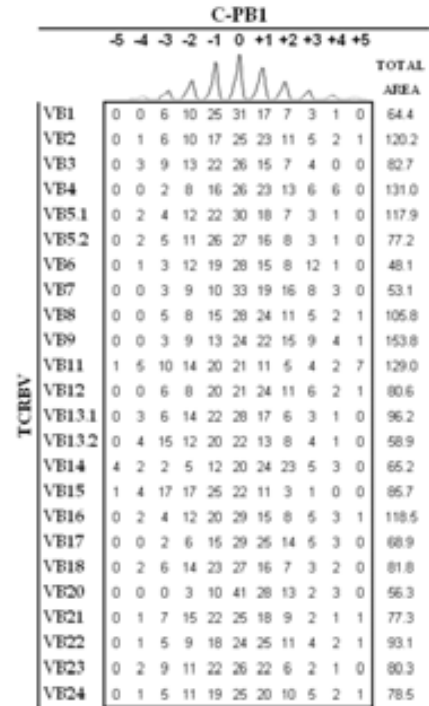
Les àrees del perfil de genotipatge per a cada família TRBV, es van normalitzar respecte a les del marcador intern, carregat conjuntament amb cada mostra, per tal de compensar la diferència inter-experimental i permetre la comparació de valors. A partir de les àrees normalitzades, es va calcular l'**índex de fluorescència relativa (RI)** de cada pic, valor que indica la contribució de cada mida de reordenament CDR3 a l'àrea total de la família gènica corresponent. Si aquest índex supera el 50% suggereix la presència d'una expansió clonal. Per assignar una numeració a cadascun dels pics de genotipatge (mides CDR3), es va analitzar la distribució gaussiana de cada família TRBV en dues mostres de PBMCs de donants control, designant com "p0" el pic central d'àrea màxima en la mitja de les dues mostres, i assignant a la resta de pics del -5 al +5 segons la seva posició en la distribució gaussiana respecte al pic central.

En resum, per a cada mostra es va seguir el protocol experimental esquematitzat a la **Figura 19** on es representen els resultats obtinguts en uns PBMCs control: 1) PCR *multiplex* de les famílies TRBV i genotipatge de cadascuna de les MIXs (**Fig. 19A**); 2) Normalització de les àrees de cada pic (**Fig. 19B**); 3) Càlcul del valor RI de cada pic de genotipatge per cada família i obtenció de la matriu RI (**Fig. 19C**) i 4) Representació dels RI de cada TRBV, per tal de poder comparar la clonalitat de cada família entre diferents mostres. Com exemple la **fig. 19D**, mostra el gràfic de RI de la família de V $\beta$ 1, la qual presenta una distribució en campana de Gauss on cap pic supera el 50% de contribució a l'àrea total.

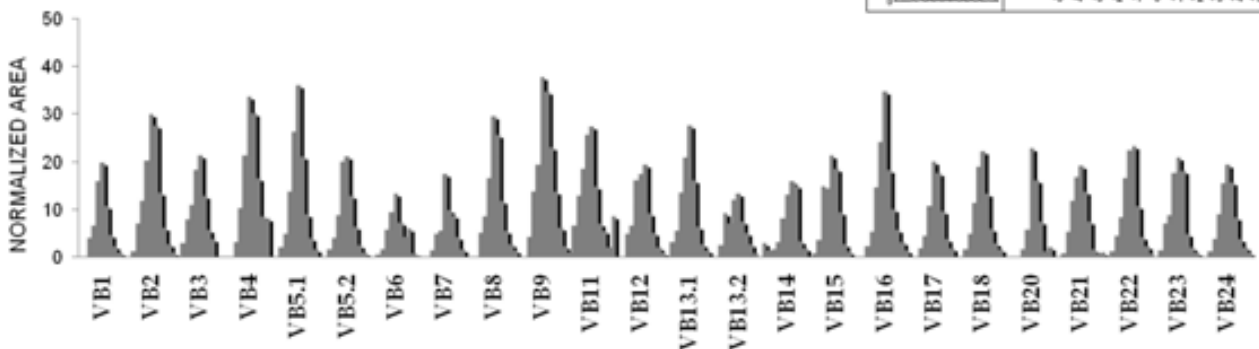
A) PCR MULTIPLEX VB I DADES INICIALS DE GENOTIPATGE



C) MATRIU DE CÀLCULS RI



B) DADES NORMALITZADES DE GENOTIPATGE



D) RI IN EN UNA DISTRIBUCIÓ POLICLONAL (Ex. VB1 en C-PB1)

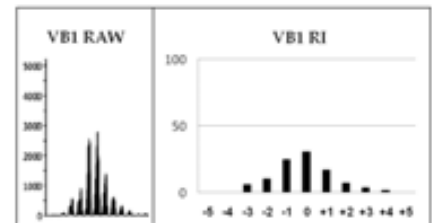


Figura 19. Esquema resum del protocol dissenyat per l'anàlisi de les mostres incloses a l'estudi del pàncrees diabètic. A) Les dades de genotipatge originals s'obtenen del marcatge de la PCR multiplex TRBV. B) Les dades es normalitzen amb el marcador intern. C) Es calcula l'índex d'àrea relativa RI per a tots els pics obtinguts i es genera una matriu de RI per a cada mostra. D) Exemple d'una distribució policlonal on cap pic supera un RI de 50%. Aquest sistema d'anàlisi s'utilitzarà per a valorar la presència d'expansions clonals a cadascuna de les mostres estudiades.

## **OBJECTIU II.**

**ANÀLITZAR EL REPERTORI DE FAMÍLIES GÈNIQUES TRBV I LA PRESENÇA D'EXPANSIONS MONOCLONALS EN EL DIGERIT TOTAL I EN ELS ILLOTS PURIFICATS DEL PÀNCREES D'UN DONANT DIABÈTIC TIPUS 1.**





## OBJECTIU II.

ANÀLITZAR EL REPERTORI DE FAMÍLIES GÈNIQUES TRBV I LA PRESENCIA D'EXPANSIONS MONOCLONALS EN EL DIGERIT TOTAL I EN ELS ILLOTS PURIFICATS DEL PÀNCREES D'UN DONANT DIABÈTIC TIPUS 1.



El nostre grup va tenir la oportunitat d'accedir a les mostres del pàncrees, melsa i sang perifèrica d'un donant diabètic tipus 1 que va morir 5 dies després del debut. Tal i com es detalla a l'apartat de Material i mètodes, es va disposar de les mostres criopreservades del digerit total i dels illots purificats del pàncrees, a més de blocs congelats de la melsa i PBMCs criopreservats. Aquesta mostra correspon al "Case 1" descrit inicialment al treball de Somoza et al. [61]

La nomenclatura usada per a identificar les mostres del pàncrees i les mostres control es detalla a continuació:

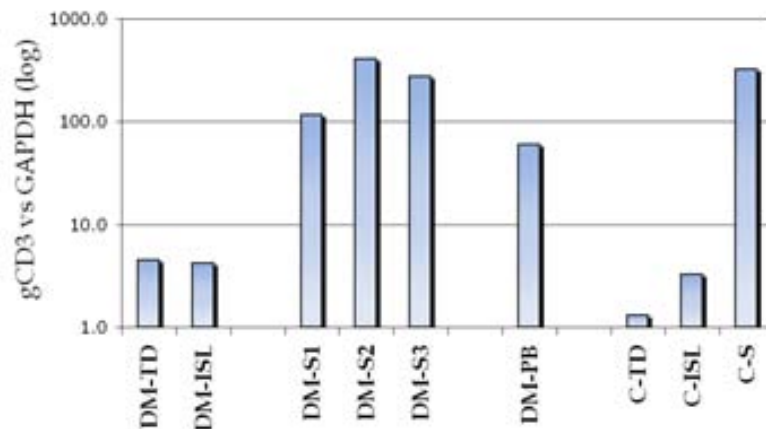
- DM-TD, mostra de digerit total del pàncrees del donant diabètic.
- DM-ISL, mostra dels illots purificats del pàncrees del donant diabètic.
- C-TD, mostra de digerit total del pàncrees d'un donant control.
- C-ISL, mostra dels illots purificats del pàncrees d'un donant control.
- DM-S1, DM-S2 i DM-S3, mostres de tres fragments de melsa del donant diabètic.
- C-S, melsa d'un donant control.
- DM-PB, PBMCs del donant diabètic.
- C-PB1 i C-PB2, PBMCs controls d'individus sans.

## 2.1. Anàlisi de la presència de cèl.lules T a l'infiltrat del pàncrees diabètic i als pàncrees control.

En primer lloc es va determinar la presència de cèl.lules T a l'infiltrat de les mostres de pàncrees del donant diabètic i dels controls corresponents, per PCR quantitativa (qPCR), mesurant els nivells de CD3 $\gamma$  normalitzats amb GAPDH com a gen control endogen.

Els resultats obtinguts van indicar un nivell equiparable de cèl.lules T infiltrants a la mostra d'illots purificats (DM-ISL) i a la de digerit total (DM-TD) del pàncrees del pacient diabètic. En canvi, la presència de cèl.lules T infiltrants a la mostra de digerit total (C-TD) i als illots purificats (C-ISL) de pàncrees procedents de donants sans resultà ser menor, sobretot a la mostra del digerit total, en comparació amb les mostres corresponents del pàncrees diabètic (Figura 20).

Com a control positiu es van incloure una mostra de melsa d'un donant control (C-S) i les tres mostres de melsa (DM-S1, DM-S2 i DM-S3) i els PBMCs (DM-PB) del donant diabètic (Figura 20).

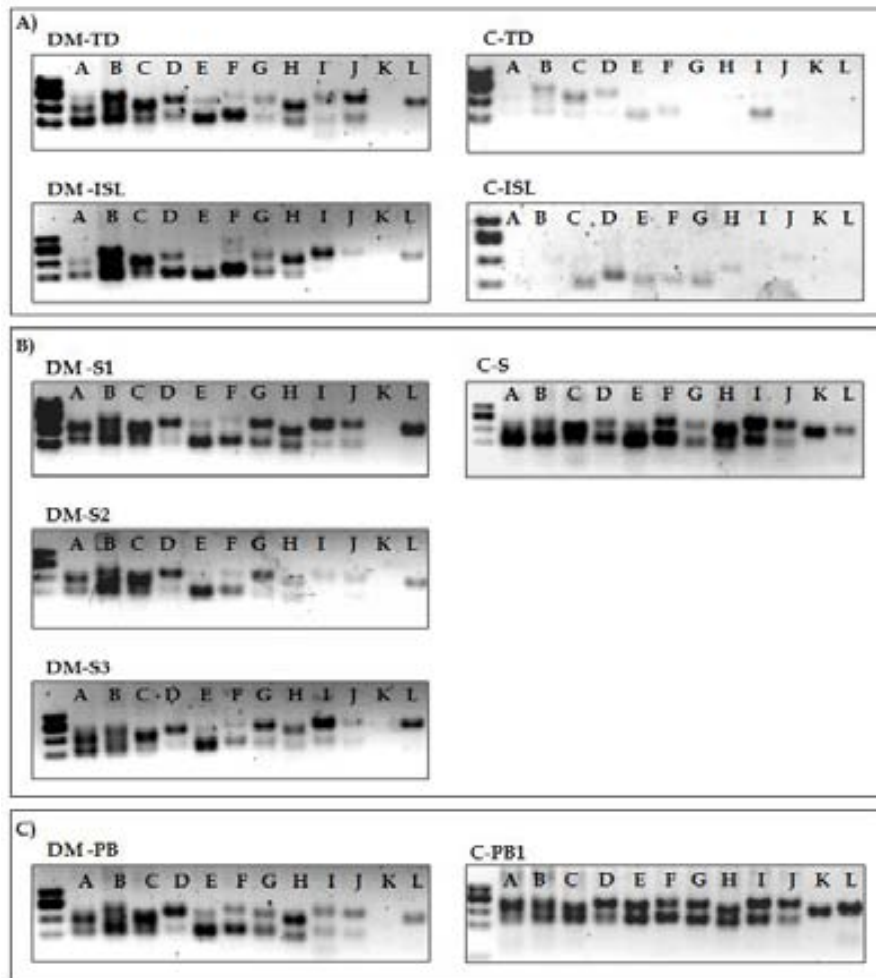


**Figura 20. Determinació de l'expressió de CD3g per qPCR en les mostres incloses a l'estudi del pàncrees diabètic: el pàncrees total (DM-TD), la mostra d'illots aïllats (DM-ISL), les 3 mostres de teixit de melsa (DM-S1-3), la mostra de sang perifèrica (DM-PB) i els controls de pàncrees total (C-TD), illots ( C-ISL) i melsa (C-S). S'observà un nivell equiparable de CD3 a la mostra de pàncrees total (DM-TD) i illots purificats del diabètic T1.**

## 2.2. Caracterització de la diversitat del repertori de les famílies gèniques TRBV a les mostres del donant diabètic.

La diversitat de repertori TRBV de totes les mostres incloses en l'estudi es va analitzar per PCR *multiplex* tal com mostra la figura **Figura 21**. L'elevada diversitat de cèl.lules T al pàncrees del pacient diabètic s'observà en el fet que la majoria de les famílies TRBV analitzades eren presents tant al digerit total (DM-TD) com als illots purificats (DM-ISL), fet que contrasta amb el reduït nombre de famílies amplificades al digerit total de pàncrees (C-TD) i als illots purificats (C-ISL) de donants no diabètics.

En les mostres de melsa, totes les famílies TRBV es van amplificar als tres blocs independents de la melsa (DM-S1, S2 i S3) i els PBMCS (DM-PB) del pacient amb l'excepció de la família V $\beta$ 20, amplificada individualment a la MIX K. Aquest resultat es valorà com a una característica intrínseca del donant ja que aquesta família s'amplificava a totes les mostres de sang perifèrica i melsa de donants control.



**Figura 21. Repertori TRBV per PCR *multiplex* de les mostres incloses a l'estudi del donant diabètic. A) Mostres de pàncrees total (DM-TD) i illots (DM-ISL) del pacient diabètic T1 i els corresponents controls de pàncrees total (C-TD) i illots (C-ISL) d'individus no diabètics. B) Tres mostres independents (DM-S1-3) de melsa del diabètic T1 i mostra de la melsa control d'un individu jove sense patologia diagnosticada (C-S). C) PBMCs de l'individu diabètic (DM-PB) i d'un dels tres individus sans que s'utilitzà com a controls per a aquest estudi (C-PB1). **Sobservà que gairebé tots els fragments gènics TCRBV analitzats apareixien a les mostres de pàncrees del diabètic T1 mentre, que als pàncrees control (tant total com illots), s'observà menys diversitat en el conjunt de famílies TRBV amplificades i molt menor intensitat en les bandes, el que era indicatiu del nivell d'infiltració a les mostres control. Les mostres de melsa i també els PBMC, tant del diabètic com del control, presentaven tal com s'esperava gran diversitat a nivell de TCRBV.****

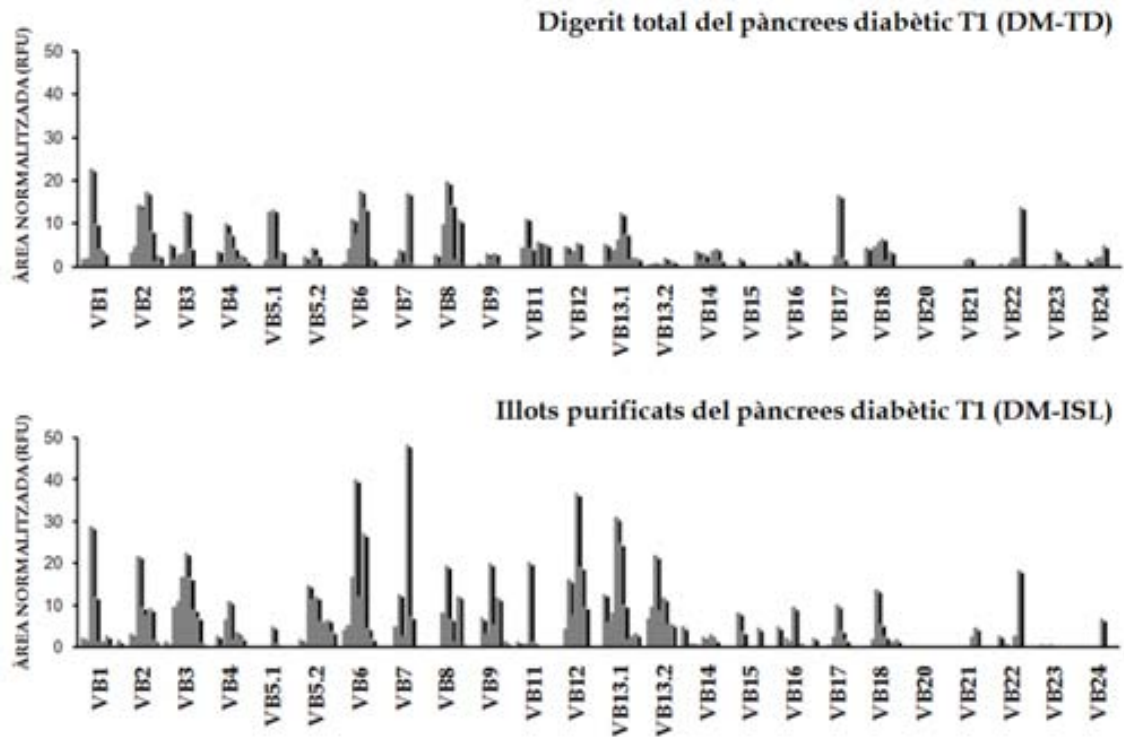
### 2.3. Anàlisi de la distribució de CDR3 en les famílies gèniques TRBV de les cèl.lules T intra-pancreàtiques.

Per a determinar el grau de policlonalitat en les mostres de pàncrees del pacient diabètic, es va fer l'estudi per genotipatge de la distribució de les mides de reordenament per a cadascuna de les famílies TRBV amplificades, és a dir, la mida de les seqüències de CDR3 a cada amplímer.

L'anàlisi de genotipatge de les famílies amplificades a les mostres del pacient diabètic, DM-TD i DM-ISL, va mostrar que no només el nivell d'infiltració T era major que als controls sinó que la distribució de reordenaments en algunes famílies TRBV no era policlonal, presentant alguns pics dominants i suggerint així la presència de possibles expansions clonals d'algunes cèl.lules T presents a l'infiltrat (**Figura 22A**).

En canvi, tal i com es mostra a la **Figura 22B**, poques foren les famílies TRBV presents a l'infiltrat de les mostres de pàncrees control, tal com suggeria la imatge del gel de la PCR *multiplex* (**Figura 21**). A més, els pics de genotipatge a les famílies amplificades eren escassos i d'àrea baixa.

A) Pàncrees diabètic T1



B) Pàncrees controls

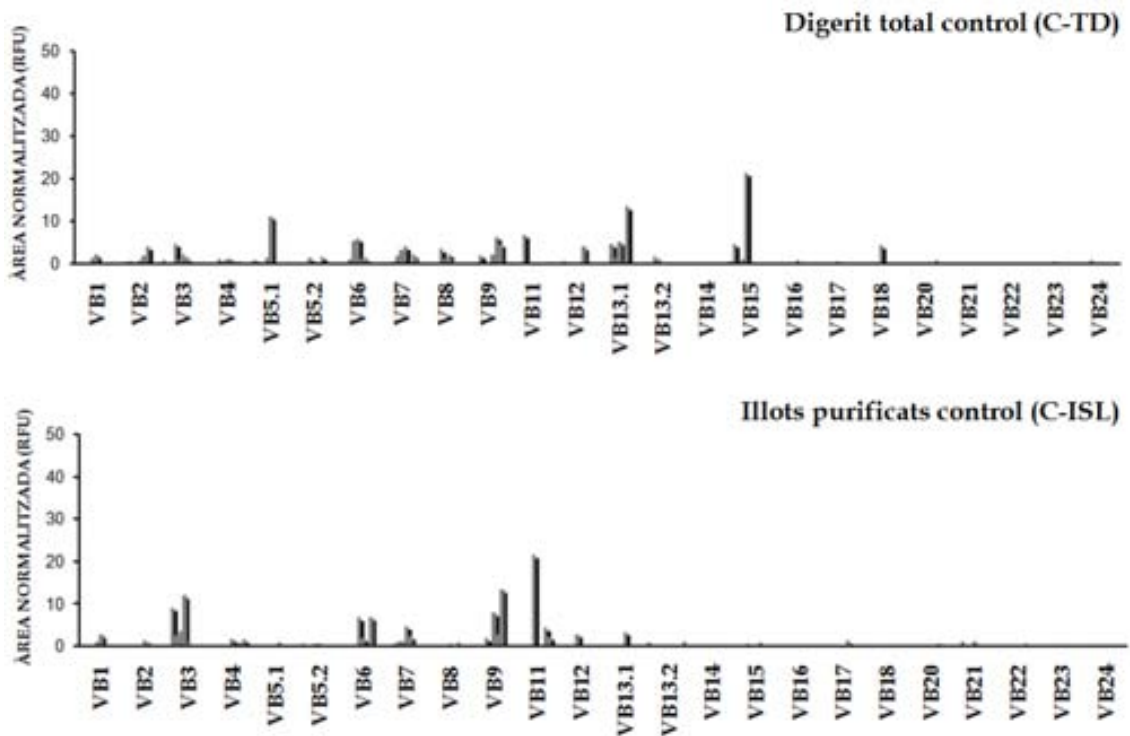


Figura 22. Representació gràfica de les dades de genotipatge normalitzades amb el marcador intern de les mostres de pàncrees total i illots purificats. A) Pàncrees del pacient diabètic T1. B) Pàncrees control de donants d'òrgans. S'observà baixa presència de reordenaments a les mostres control i en canvi gran policlonalitat a les mostres del pàncrees diabètic, amb possibles expansions clonals en algunes famílies V $\beta$ .

#### 2.4. Determinació de les expansions monoclonals presents a les famílies TRBV amplificades.

Per tal d'establir la presència de possibles expansions clonals, per cadascuna de les mostres es va calcular el valor RI dels tots pics de genotipatge (**Figura suplementària 1**).

Tal com es representa a la **Figura 23**, els resultats van revelar l'existència de famílies TRBV que contenen un pic amb un RI superior al 50% de l'àrea total. Seguint aquest criteri, quatre expansions monoclonals van ser detectades a la mostra de l'infiltrat del pàncrees total, DM-TD, corresponents a les famílies V $\beta$ 1 (pic-2), V $\beta$ 7 (p+1), V $\beta$ 17 (p0) i V $\beta$ 22 (p+2). L'anàlisi de l'amplímer TRBV de la mostra d'infiltrat intra-illot, DM-ISL, va revelar 6 expansions monoclonals entre les quals es trobaven les 4 del digerit total i dues expansions monoclonals més que semblaven ser exclusives de l'infiltrat intra-illot, V $\beta$ 11 (p-1) i V $\beta$ 18 (p-1). No obstant, ambdues d'aquestes expansions es detectaven a la mostra DM-TD tot i que amb un valor de RI inferior al 50%, suggerint la seva presència però diluïdes en el teixit total que conté la part exocrina i endocrina del pàncrees.

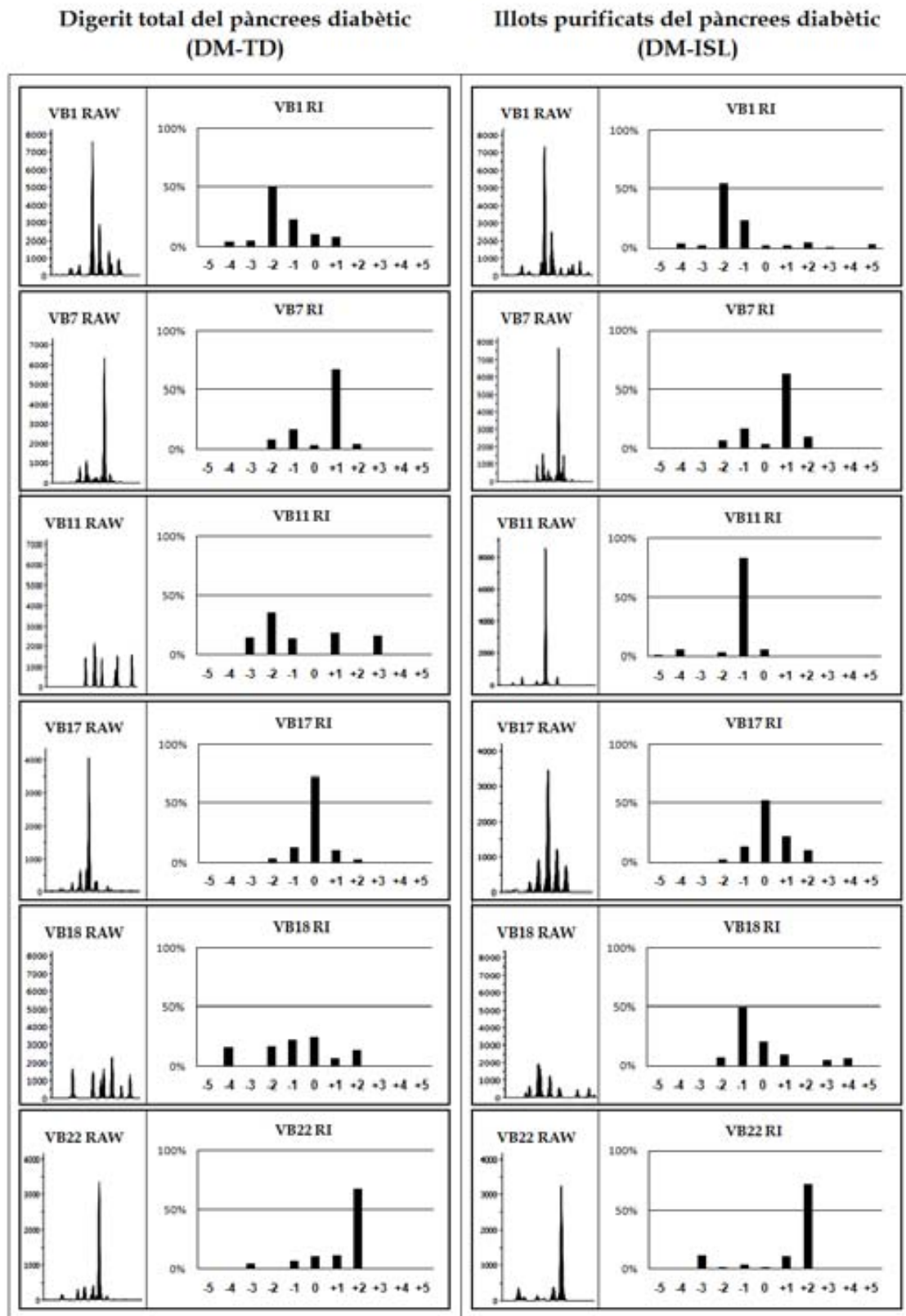


Figura 23. Detecció d'expansions clonals als illots purificats i al pàncrees total del pacient diabètic tipus1. Representació gràfica dels valors d'índex relatiu (RI) per a cadascun dels pics de reordenament a l'amplificat per a les famílies gèniques V $\beta$ 1, V $\beta$ 7, V $\beta$ 11, V $\beta$ 17, V $\beta$ 18 i V $\beta$ 22, les quals presenten algun pic amb valor RI > 50%. S'identificà 6 expansions clonals T a la mostra d'illots, 4 de les quals també foren detectables al digerit total del pàncrees.



**OBJECTIU III.**

**IDENTIFICAR A LA PERIFÈRIA LES EXPANSIONS  
CLONALS DE L'INFILTRAT INTRA-ILLOT.**



### OBJECTIU III

#### IDENTIFICAR A LA PERIFÈRIA LES EXPANSIONS CLONALS DE L'INFILTRAT INTRA-ILLOT.



En el model experimental de NOD, Höglund et al. [162] va demostrar que l'activació de les cèl.lules T específiques s'inicia als limfonodes pancreàtics proximals que drenen al pàncrees. Les cèl.lules T efectores resultants viatgen via limfàtica cap al torrent sanguini des d'on accedeixen al pàncrees. Un cop en sang perifèrica els limfòcits T circulants tenen accés a la melsa.

En un estudi recent, s'ha suggerit que la melsa participa en el manteniment de cèl.lules T de memòria [166] però més enllà d'això és un òrgan poc estudiat a nivell d'autoimmunitat. En el model experimental NOD, la melsa s'ha utilitzat com a font de cèl.lules T per a la detecció i obtenció de clons autorreactius [164]. En canvi, en la T1D humana no hi ha cap estudi en el que s'hagi analitzat si existeix alguna relació funcional entre la melsa i el pàncrees, a part de ser un magatzem dels limfòcits circulants.

La següent qüestió que ens varem plantejar fou determinar si la melsa tenia un paper en la T1D.

*Com era el repertori de la melsa autòloga de semblant amb el de l'òrgan diana?*

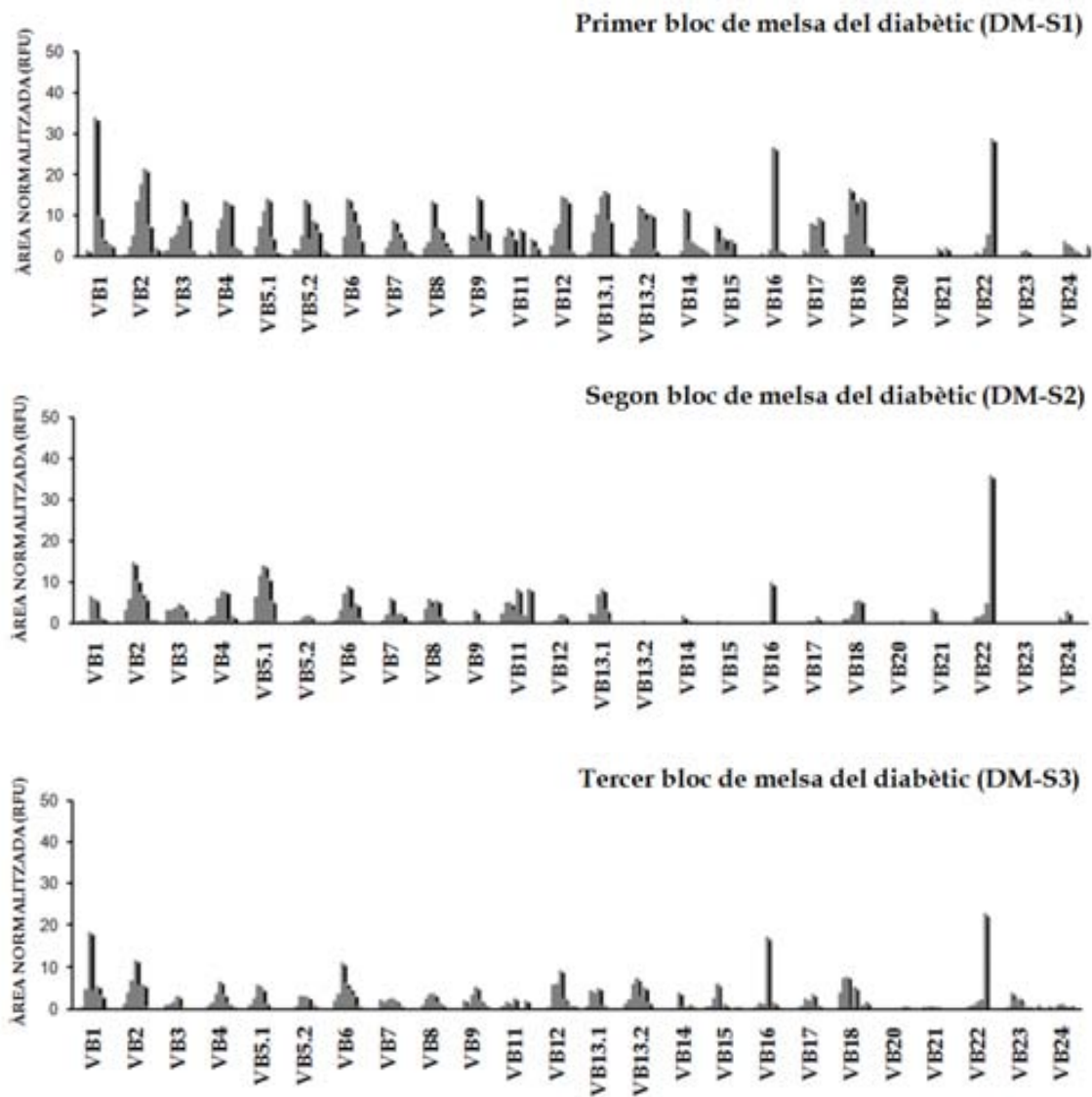
### 3.1. Cerca de les expansions monoclonals intra-illot a la melsa.

En primer lloc es va analitzar el repertori TRBV de la melsa amb l'objectiu de comparar el perfil de reordenaments en cadascuna de les famílies amplificades amb el de les obtingudes a l'òrgan diana.

Es van processar tres blocs independents de teixit de la melsa (DM-S1, DM-S2, and DM-S3) del pacient diabètic. La **Figura 24** mostra els reordenaments TRBV per una mostra de melsa d'un individu control (C-S) i les tres mostres de melsa de l'individu problema (DM-S1, -S2 i -S3). A les mostres de melsa del pacient diabètic, **Figura 24A**, el resultat va ser consistent en els tres casos (DM-S1, DM-S2 i DM-S3) ja que s'observà la presència de 2 (mostres DM-S2 i -S3) i de 3 pics (mostra DM-S1) de reordenaments que sobresortien als perfils policlonals corresponents a les famílies V $\beta$ 1, V $\beta$ 16 i V $\beta$ 22. En el cas de l'individu control, totes les famílies TRBV es van amplificar i mostraren un perfil policlonal, **Figura 24B**.

Els valors RI calculats per aquestes mostres (**Figura suplementària 2**) varen confirmar la presència de dues expansions clonals, V $\beta$ 16(p0) i V $\beta$ 22(p+2), als tres blocs de melsa. Aquest resultat suggereix que les expansions no estan restringides a una àrea anatòmica concreta de la melsa ja que estan presents a tres blocs de teixit independents (**Figura 25**). En canvi l'expansió V $\beta$ 1(p-1) només va aconseguir el criteri d'expansió monoclonal a la mostra DM-S1.

A) Melsa de l'individu diabètic T1



B) Melsa control

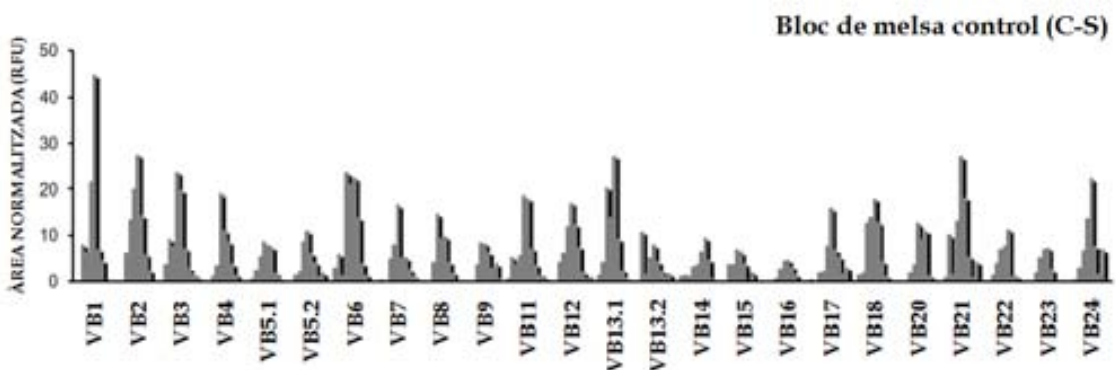


Figura 24. Representació gràfica de les dades de genotipatge normalitzades amb el marcador intern. A) “DM-S1, DM-S2 i DM-S3” mostren el genotipatge per a cadascuna de les 3 mostres de la melsa del pacient diabètic. B) “C-S” mostra el genotipatge per a la melsa d’un donant control. S’observa gran policlonalitat a la melsa control sense expansions aparents, mentre que a la melsa del diabètic hi ha dues expansions clonals, en VB16 i VB22 respectivament, que són consistents a les 3 mostres analitzades.

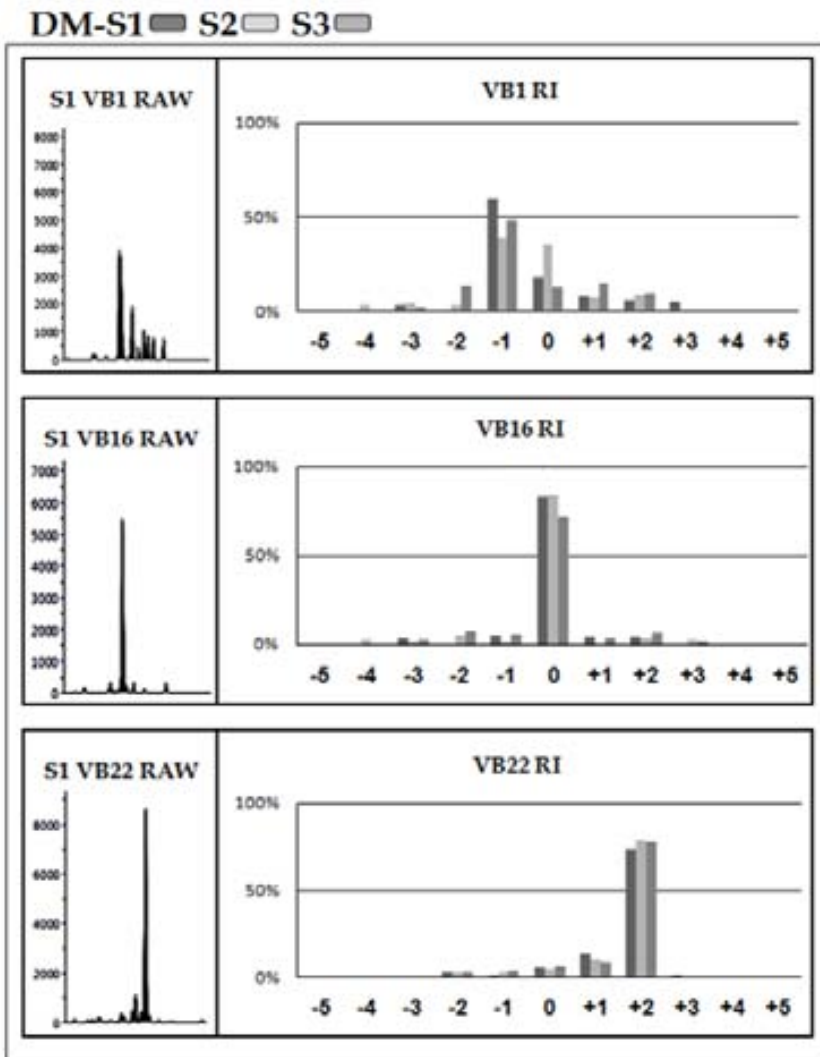


Figura 25. Comparació de les famílies Vβ1, Vβ16 i Vβ22 a les tres mostres de melsa (DM-S1, DM-S2 i DM-S3) del diabètic. Representació gràfica dels valors RI per a cadascun dels pics de reordenament. S'identificaren dues expansions clonals comuns als tres blocs de melsa del donant, per a les famílies Vβ16 i Vβ22.

L'expansió Vβ22(p+2) coincidia amb la detectada a l'anàlisi de les expansions clonals al pàncrees diabètic. En canvi, la corresponent a Vβ16(p0), tot i ser un pic dominant dins de la família, el seu valor de RI fou inferior al 50% tant en la mostra DM-TD com a la DM-ISL (Figura 26).

Aquest resultat mostrava clarament que algunes expansions clonals del pàncrees es trobaven a la melsa del diabètic. El pas següent fou confirmar la seva identitat a partir de la seqüenciació del CDR3.

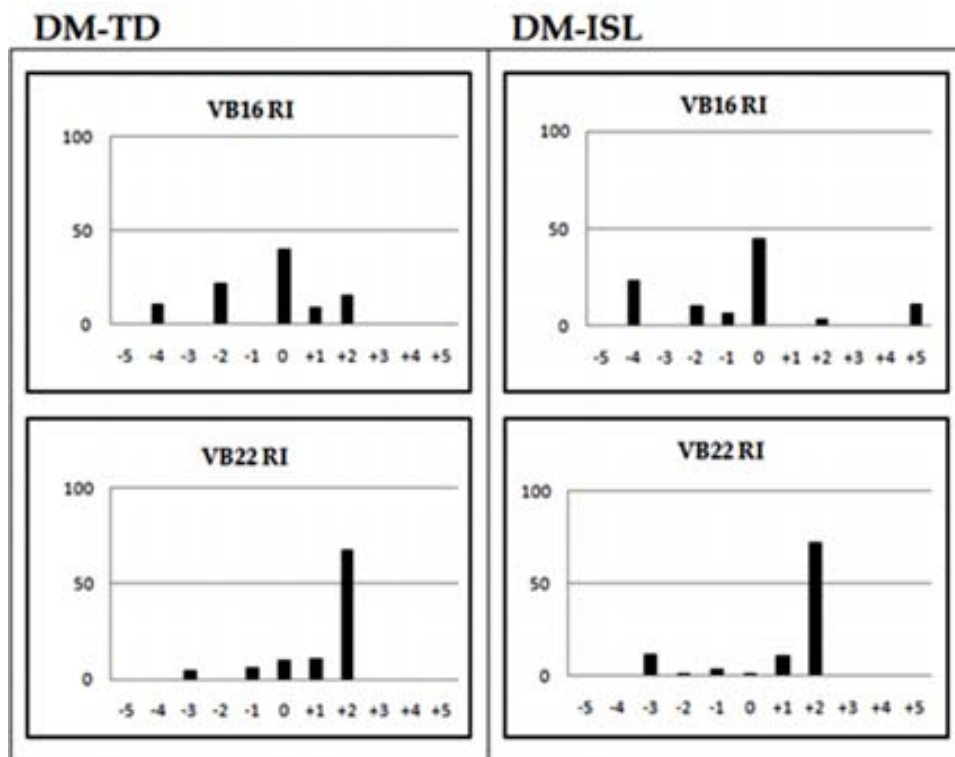


Figura 26. Detecció d'expansions al pàncrees total (DM-TD) i Illots purificats (DM-ISL) del pacient diabètic tipus 1. Representació gràfica dels valors d'índex relatiu (RI) per a cadascun dels pics de reordenament en l' amplificat per a les famílies gèniques Vβ16 i Vβ22. Per a Vβ16 el pic 0, que és expansió a melsa, apareix com a pic dominant a les mostres de pàncrees tot i que amb RI<50%. Per a Vβ22 el pic +2, que es detecta com a expansió clonal a les tres mostres de melsa, apareix també com a clara expansió al pàncrees.

### 3.2. Confirmació de les identitats clonals entre expansions T al pàncrees i a la melsa.

L'anàlisi per genotipatge de les mostres va revelar que hi havia famílies gèniques amb possibles expansions clonals a l'òrgan diana i que algunes d'elles estaven també presents a la melsa del donant diabètic. El següent pas fou demostrar que els pics contenien una seqüència dominant i identificar si era la mateixa en els dos òrgans. La regió CDR3 és única per cada clon de cèl.lula T i permet identificar la seva presència en una determinada mostra.

Amb aquest objectiu es van clonar i seqüenciar els amplimers de les famílies gèniques V $\beta$ 1, V $\beta$ 7, V $\beta$ 11, V $\beta$ 16, V $\beta$ 17, V $\beta$ 18 i V $\beta$ 22 de les mostres DM-TD i DM-ISL i les famílies V $\beta$ 1, V $\beta$ 16 i V $\beta$ 22 de les tres mostres de melsa (**Figures 23, 25 i 26**). La **Taula 2** mostra la seqüència en aminoàcids de les regions CDR3 corresponent al pic de genotipatge amb criteri d'expansió monoclonal per a cadascuna de les famílies. Tal com s'observa a la **Taula 5**, la seqüenciació de la regió de CDR3 va confirmar la identitat clonal de les expansions V $\beta$ 16(0) i V $\beta$ 22(+2) entre la melsa i el pàncrees del donant diabètic. En la última columna de la taula, s'indica el percentatge que representen aquests reordenaments respecte a la resta de seqüències obtingudes del total de clons analitzats. En la majoria de les famílies, la seqüència de major freqüència, superior al 50%, coincidia amb la mida del pic expandit, excepte per l'expansió V $\beta$ 18(-1) per a la que no es va trobar cap seqüència dominant. A les **Taules suplementàries 1, 2 i 3** per a DM-TD, DM-ISL i DM-S respectivament, estan representades totes les seqüències obtingudes en el clonatge d'aquestes famílies en cadascuna de les mostres.



* Família V $\beta$	** TRBV	Pic	Mida (aa)	V	N-D-N	J	TRBJ	Mostra del diabètic T1
V $\beta$ 22	TRBV2	+2	14	<b>C A S S E A</b> tgtgccagcagtgaaagc	<b>Q Q G Y</b> gcaacaggggtact	<b>S G E L F F</b> .....ccggggagctgtttttt	2-2	ISL(50%) TD(71%) S(69%)
V $\beta$ 16	TRBV14	0	13	<b>C A S S H</b> tgtgccagcagcca...	<b>R Q M N</b> tcgacagatgaa	<b>Y N E Q F F</b> ...ctacaatgagcagttcttc	2-1	ISL(38%) TD(56%) S(64%)
V $\beta$ 7	TRBV4-2	+1	14	<b>C A S S Q</b> tgcgccagcagccaag	<b>V A G A G</b> tagcaggggcaggt	<b>T G E L F F</b> ....accggggagcgtttttt	2-2	ISL(50%) TD(62%)
V $\beta$ 1	TRBV9	-2	11	<b>C A S S V</b> tgtgccagcagcgta.	<b>S T</b> tcgac	<b>T D T Q Y F</b> ..cacagatagcagttttt	2-3	ISL(56%) TD(60%)
V $\beta$ 17	TRBV19	0	12	<b>C A</b> tgtgcca.....	<b>T S P L G M</b> cctgccgctaggatga	<b>N N E Q F F</b> ....acaatgagcagttcttc	2-1	ISL(43%) TD(34%)
V $\beta$ 11	TRBV25-1	-1	12	<b>C A S S D</b> tgtgccagcagtgaa...	<b>P G T</b> tcccgggact	<b>Q E T Q Y F</b> ..caagagaccagttcttc	2-5	ISL(89%) TD(4%)
V $\beta$ 18	TRBV12			Cap seqüència de freqüència >10%				

**Taula 5. Seqüències CDR3 corresponents a les expansions clonals detectades al pàncrees i la melsa de l'individu diabètic.** Les dues primeres columnes indiquen: \*) la família V $\beta$  corresponent en la nomenclatura de Chitnis et. al. (*Chitnis et. al. Manual of clinical laboratory immunology. 2002.*) usada en aquest treball, i \*\*) l'actualitzada segons la base de dades IMGT. TRBJ correspon a la identificació del fragment J segons IMGT. L'última columna indica el % de representació de cada seqüència en el total de seqüències obtingudes, on ISL correspon a la mostra d'illots purificats (DM-ISL), TD correspon a la mostra de pàncrees total (DM-TD) i S correspon a la melsa (DM-S1, DM-S2 i DM-S3). **Amb aquests resultats es va demostrar la identitat entre expansions clonals V $\beta$ 16 i V $\beta$ 22 comuns al pàncrees i la melsa del pacient diabètic.**

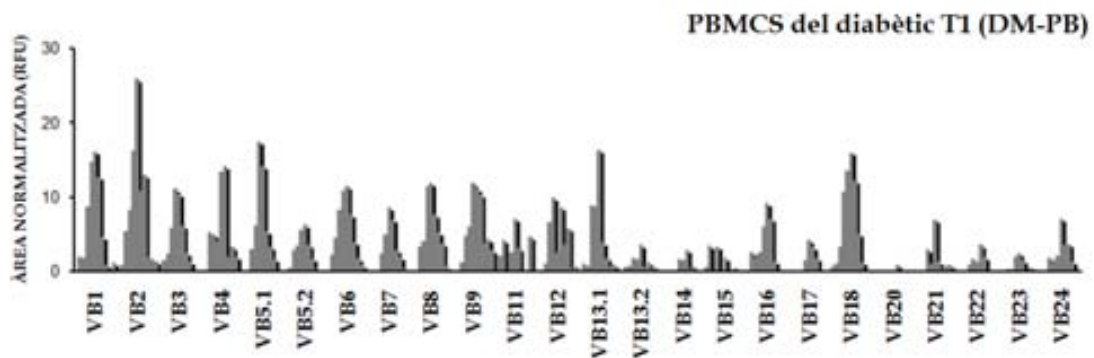
### 3.3) Comparació del repertori de la melsa amb el de sang perifèrica (PBMCS) del donant diabètic.

Tot i que melsa i pàncrees són òrgans que es troben físicament molt aprop, no tenen contacte excepte per la pròpia circulació sanguínia. La disponibilitat de PBMCs del donant diabètic va permetre comparar el repertori TRBV expressat per les cèl.lules T de sang perifèrica i melsa, amb l'objectiu d'establir identitats clonals que demostrassin el tràfic de cèl.lules T entre melsa i pàncrees.

La **Figura 27** mostra les dades de genotipatge obtingudes per a la mostra de PBMCs del donant diabètic (DM-PB) i d'una mostra control de sang perifèrica d'un individu sa (C-PB). Pel que fa a la mostra control s'observà, tal com s'esperava, completa policlonalitat a totes les famílies gèniques TRBV analitzades. De la mateixa manera, la mostra del pacient diabètic presentava policlonalitat a la majoria de les famílies gèniques. De nou es va confirmar l'absència de l'expressió de la família gènica V $\beta$ 20 en el repertori de cèl.lules T del donant diabètic.

Per tal de caracteritzar la distribució dels reordenaments en les famílies TRBV es va generar la matriu de RI per a DM-PB i C-PB. Tal i com s'esperava amb la normalització dels espectres, cap família contenia un pic de genotipatge que s'acollís al criteri d'expansió monoclonal (**Figura suplementària 3**). Tot i no haver-hi cap pic dominant, es va cercar a nivell de seqüència la presència en circulació dels clons corresponents a les expansions locals de la melsa i el pàncrees. Es van escollir tres famílies segons la seva existència com a expansió només a un òrgan o a ambdós: V $\beta$ 7(+1) a pàncrees, V $\beta$ 16(0) a melsa i V $\beta$ 22(+22) en ambdós. Tal com es representa a la **Figura 28**, només els perfils RI dels reordenaments de la família gènica V $\beta$ 22, mostraven un increment al pic corresponent a la expansió clonal de pàncrees i melsa (pic+2) acompanyat també de l'augment en un segon pic (+1).

## A) Individu diabètic.



## B) Individu control sa.

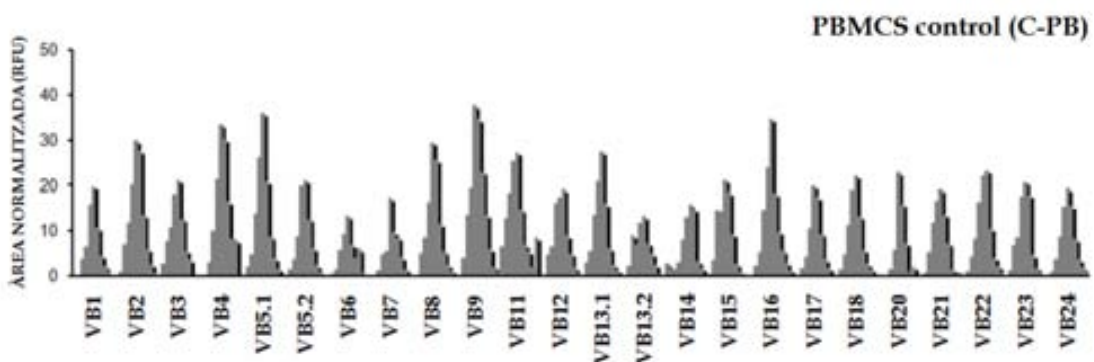
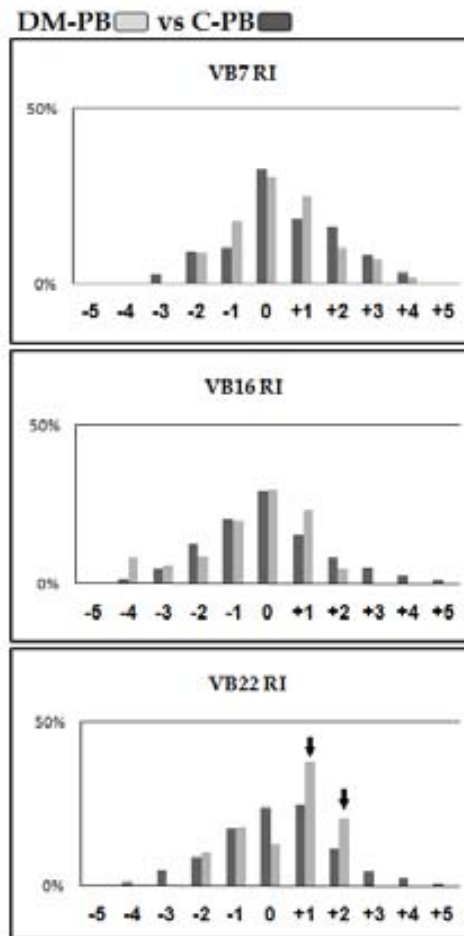


Figura 27. Representació gràfica de les dades de genotipatge normalitzades amb el marcador intern. A) DM-PB, genotipatge per a la mostra de PBMCs procedent del pacient diabètic T1. B) C-PB, genotipatge per a PBMCs d'un individu control sa. S'observà gran policlonalitat a la sang perifèrica control sense expansions aparents mentre que als PBMCS del diabètic, gran part de les famílies TRBV mostraren distribucions alterades en quant a mides de reordenament.

El clonatge i seqüenciació de l'amplímer per a la família V $\beta$ 22 a la mostra DM-PB va identificar en sang perifèrica el clon de cèl.lules T amb la seqüència de CDR3 de 14aa "CASSEAQQGYSGELF", expansió al pàncrees i la melsa. Tanmateix, es va identificar el segon CDR3 de mida corresponent al pic V $\beta$ 22(+1), "CASRTRRTGMNEQFF", seqüenciat a la mostra DM-TD (Figura 28B). En canvi, cap de les expansions del pàncrees i de la melsa, no es van trobar entre les seqüències obtingudes per V $\beta$ 7 i V $\beta$ 16, respectivament. A la Taula 4 suplementària es detallen les seqüències CDR3 obtingudes per a tres famílies gèniques seleccionades de la mostra DM-PB.

**A) Distribució de mides CDR3 en sang perifèrica del diabètic *vs* control sa.**



**B) Clons T del pàncrees diabètic en sang perifèrica.**

VB22 (TRBV2)					
Pic	(aa)	V	N-D-N	J	TRBJ Freq.
+1	13	CASR	TRRTGM	NEQFF	2-1 2/11
+2	14	CASSEA	QQGY	SGELFF	2-2 2/11

**Figura 28. Comparació dels valors RI de les famílies V $\beta$ 7, V $\beta$ 16 i V $\beta$ 22 entre les mostres DM-PB i C-PB. A) Distribució RI, en PBMC del pacient (DM-PB) i control (C-PB), de les famílies gèniques V $\beta$ 7 (amplificat als illots), V $\beta$ 16 (a la melsa) i V $\beta$ 22 (a ambdós). Els valors RI del control (C-PB) representen aquí el promig de dos donants. Els pics (indicats amb fletxes) en V $\beta$ 22 mostraven un augment en la mostra del pacient en comparació amb el control. B) Seqüències de CDR3 obtingudes després de la clonació de l'amplímer per V $\beta$ 22 en PBMCs del diabètic. V $\beta$ 22(+2) s'havia trobat expandida a la melsa del pacient i les mostres dels illots. Una segona amplificació, inclosa al pic +1, corresponia a una seqüència no dominant localitzada a l'extracte d'illots purificats del diabètic i que no es va trobar en la melsa. (Veure la **Taula suplementària 4** per totes les seqüències obtingudes de DM-PB).**

## **OBJECTIU IV.**

**DETERMINAR L'EXISTÈNCIA D'UN BIAIX EN LA DIVERSITAT DEL TCR DE LES CÈL.LULES INFILTRANTS DEL PÀNCREES, A PARTIR DE LA IDENTIFICACIÓ D'ELEMENTS DE RESTRICCIÓ EN LES REGIONS CDR3 DE LA CADENA BETA DEL TCR.**



## OBJECTIU IV.

DETERMINAR L'EXISTÈNCIA D'UN BIAIX EN LA DIVERSITAT DEL TCR DE LES CÈL.LULES INFILTRANTS DEL PÀNCREES, A PARTIR DE LA IDENTIFICACIÓ D'ELEMENTS DE RESTRICCIÓ EN LES REGIONS CDR3 DE LA CADENA BETA DEL TCR.



L'última fase de l'estudi fou definir l'existència de restricció a les seqüències del CDR3 dels clons que formaven part de l'infiltrat intrapancreàtic. L'estudi de restricció al TCR de les cèl.lules infiltrants, partia de dues consideracions: i) que l'expansió d'un determinat TCR és conseqüència del reconeixement específic dels complexos pèptid-MHC (pMHC) presentats *in situ* i, ii) que la combinació d'aminoàcids a la regió CDR3 que reconeix amb més afinitat al pèptid és un dels factors afavoridors de l'expansió d'un determinat clon.

Per poder realitzar un estudi estadístic de l'ús preferent d'alguns aminoàcids al CDR3 de les cèl.lules T infiltrants, a més de les seqüències ja obtingudes per les famílies gèniques V $\beta$ 1, V $\beta$ 7, V $\beta$ 11, V $\beta$ 16, V $\beta$ 17, V $\beta$ 18 i V $\beta$ 22, es van clonar i seqüenciar quatre famílies més que contenien pics de genotipatge amb RI>35%, dels illots i del digerit total del pàncrees diabètic. En total es va obtenir 401 seqüències CDR3, corresponents a les 139 recombinacions diferents que es llisten a la **Taula 6** (les **Taules suplementàries 1 i 2** mostren separades les seqüències que venen dels illots i del digerit total del pàncrees respectivament).

	VB *	TRBV **	Mida (aa)	V	N-D-N	J	TRBJ **	Nx ***	%
1	VB1	TRBV9.01	11	CASSV	AV	NYGYTF	1-2.01	1	2,1
2			11	CASSV	ST	TDTQYF	2-3.01	28	58,3
3			12	CASSV	AWG	QETQYF	2-6.01	8	16,7
4			12	CASS	DEGY	GNTIYF	1-3.01	1	2,1
5			12	CASS	KIRES	DGYTF	1-2.01	2	4,2
6			13	CASSV	GDLP	DYGYTF	1-2.01	1	2,1
7			13	CASSV	GQSPN	YEQYF	2-7.01	3	6,3
8			14	CASS	EGEGGL	QETQYF	2-6.01	2	4,2
9			14	CASSV	EGGNAAW	GYTF	1-2.01	1	2,1
10			15	CASSV	VGTGTRN	GELFF	2-2.01	1	2,1
11	VB4	TRBV29-1	8	CS	ARTT	EAFF	1-1.01	4	9,1
12			8	CSVE	NP	GYTF	1-2.01	3	6,8
13			10	CS	GTTGS	YEQYF	2-7.01	1	2,3
14			10	CS	APRDYR	EQFF	2-1.01	1	2,3
15			10	CSV	GP	LNTEAFF	1-1.01	2	4,5
16			10	CSV	VPG	NTEAFF	1-1.01	1	2,3
17			11	CS	ARTGP	ADTQYF	2-3.01	1	2,3
18			11	CS	ARWAER	NTQYF	2-3.01	1	2,3
19			11	CSV	ETGPG	ETQYF	2-6.01	2	4,5
20			11	CS	FNAEGVS	GYTF	1-2.01	3	6,8
21			11	CS	GGRSLGK	EQFF	2-1.01	1	2,3
22			11	CSV	LGT	TYNEQFF	2-1.01	2	4,5
23			11	CSV	LN	SGANVLT	2-6.01	2	4,5
24			11	CSV	VVRG	NTEAFF	1-1.01	3	6,8
25			12	CS	ARNRDLG	NTIYF	1-3.01	1	2,3
26			12	CSA	HDGGAG	TEAFF	1-1.01	1	2,3
27			12	CSV	TSGN	YNEQFF	2-1.01	2	4,5
28			13	CSVE	ARGAG	DTQYF	2-3.01	3	6,8
29			13	CSVE	LPGH	TDTQYF	2-3.01	1	2,3
30			13	CSV	LSDGEG	YNEQFF	2-1.01	2	4,5
31			14	CSVE	YQRGGR	TDTQYF	2-3.01	3	6,8
32			14	CS	ARGSSGGAG	ETQYF	2-6.01	2	4,5
33			16	CSVE	GQGLSG	TGELFF	2-2.01	2	4,5
34	VB6	TRBV7-8	10	CASS	G	QETQYF	2-6.01	1	5,3
35			11	RASS	PGQ	NYGYTF	1-2.01	3	15,8
36			11	CASS	PPL	SYEQYF	2-7.01	1	5,3
37			12	CASS	EEGT	YEQYF	2-7.01	1	5,3
38			12	CASSL	GYIG	YEQYF	2-7.01	1	5,3
39			12	CASSL	KGLW	ETQYF	2-6.01	1	5,3
40			12	CASS	LIE	GNQPQHF	1-6.01	1	5,3
41			12	CASS	SGTA	SYEQYF	2-7.01	5	26,3
42			13	CASSL	GLAGG	NEQFF	2-1.01	1	5,3
43			13	CASS	SQGS	SYNEQFF	2-1.01	1	5,3
44			14	CASS	DPGQGVV	ETQYF	2-6.01	1	5,3
45			14	CASS	RGGR	ANTGELFF	2-2.01	1	5,3
46			15	CASSL	GQGM	TYNSPLHF	1-6.01	1	5,3
47	VB7	TRBV4-2	11	CASSQ	AAG	YEQYF	2-7.01	2	5,4
48			12	CASSQ	AAGS	TEAFF	1-1.01	5	13,5
49			12	CASSQ	DGGLYE	QYF	2-6.01	1	2,7
50			12	CASSQ	DPA	TDTQYF	2-3.01	1	2,7
51			13	CASS	PTSGEV	KTQYF	2-6.01	1	2,7
52			14	CASSQ	EQGS	SNQPQHF	1-6.01	2	5,4
53			14	CASSQ	IGGL	CTDTQYF	2-3.01	1	2,7
54			14	CASSQ	VAGAG	TGELFF	2-2.01	22	59,5
55			15	CASSQ	SSLAGP	TDTQYF	2-3.01	2	5,4
56	VB8	TRBV12-3	9	CAS	RQ	YGYTF	1-2.01	1	3,4
57			9	CAS	RR	YGYTF	1-2.01	1	3,4
58			10	CASS	TR	GELFF	2-2.01	1	3,4
59			11	CASSL	EVAG	EQYF	2-7.01	1	3,4
60			11	CASSL	LPES	GYTF	1-2.01	1	3,4
61			11	CASSL	PPES	GYTF	1-2.01	1	3,4
62			11	CAS	PTST	YEQYF	2-7.01	1	3,4
63			11	CASS	RPRDG	EAFF	1-1.01	1	3,4
64			12	CASS	PA	STDTQYF	2-3.01	3	10,3
65			12	CASS	SGT	VNTEAFF	1-1.01	1	3,4
66			12	CAS	THRES	NQPQHF	1-6.01	2	6,9
67			13	CASSL	DRV	CTDTQYF	2-3.01	1	3,4
68			13	CASS	GGGAG	SPLHF	1-6.01	1	3,4
69			13	CASSLA	GTSG	ETQYF	2-6.01	1	3,4
70			13	CASSL	RGGRE	ETQYF	2-6.01	1	3,4
71			14	CASSL	GSAGNG	YGYTF	1-2.01	1	3,4
72			14	CASS	LRPGRG	DTEAFF	1-1.01	1	3,4
73			15	CASS	TTSGGT	TYNEQFF	2-1.01	1	3,4
74			15	CASS	LATSGA	STDTQYF	2-3.01	8	27,6

Taula 6. Total de seqüències  $\beta$ -CDR3 en aminoàcids, obtingudes del clonatge de les cèl·lules T infiltrants al pàncrees d'un malalt diabètic T1. Es va clonar i seqüenciar el producte amplificat a les mostres de illots purificats (DM-ISL) i del pàncrees total (endocrí i exocrí) (DM-TD) del donant diabètic T1, per a les famílies gèniques V $\beta$ 1, V $\beta$ 7, V $\beta$ 16, V $\beta$ 17, V $\beta$ 11, V $\beta$ 18 i V $\beta$ 22 (que presentaven expansions clonals de RI>50%) i les famílies V $\beta$ 4, V $\beta$ 6, V $\beta$ 8 i V $\beta$ 9 (que presentaven possibles expansions amb RI>35%-Veure la taula de valors RI per aquestes mostres a la **Figura Suplementària 1**). La identificació de la zona CDR3 i l'assignació d'aminoàcids es feu amb les eines online IMGT-International *ImMunoGeneTics* ([www.imgt.org](http://www.imgt.org), Université Montpellier 2, Montpellier, France).

\* Assignació V $\beta$  segons la nomenclatura de Chitnis et al. en *Man. of clin. Lab. Immunol.* 2002.

\*\* Assignació de la nomenclatura TRBV and TRBJ segons IMGT.

\*\*\* Nx indica el nombre de vegades que cada seqüència va ser clonada, i %, el percentatge que representa en la correspondent família gènica V $\beta$ .



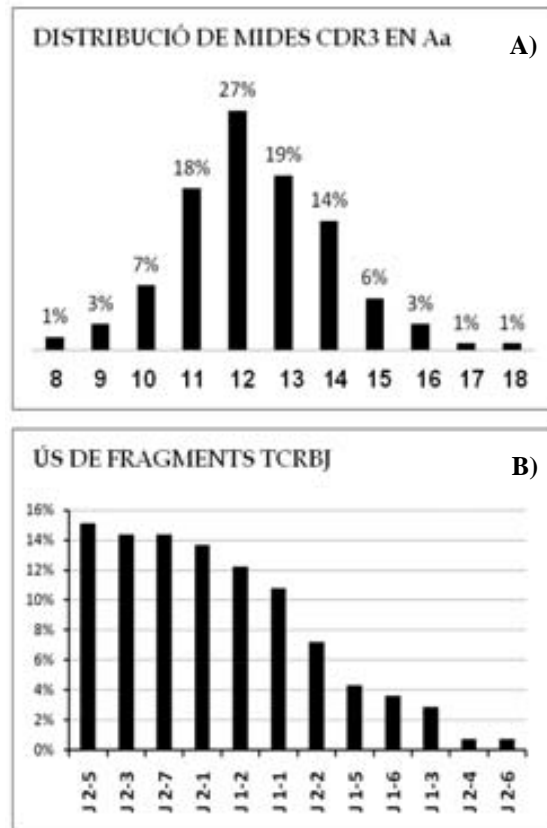
Taula 6 (bis).

75	VB9	TRBV3-1	10	CASS	AS	DYGYTF	1-2.01	6	14,3
76			11	CAS	LSGG	TDTQYF	2-3.01	1	2,4
77			12	CAS	GGQGI	PDTQYF	2-3.01	7	16,7
78			12	CASSQ	GS	TNYGYTF	1-2.01	4	9,5
79			12	CASS	PRGN	NSPLHF	1-6.02	3	7,1
80			13	CASS	DSRAS	YEYF	2-7.01	5	11,9
81			13	CASSQ	VTGVG	ETQYF	2-5.01	2	4,8
82			14	CASSQ	KMSLDGA	TQYF	2-3.01	5	11,9
83			14	CASSQ	LKGPS	SYEQYF	2-7.01	2	4,8
84			14	CASS	RRQTS	STDTQYF	2-3.01	7	16,7
85	VB11	TRBV25-1	9	CASS	QNI	EQFF	2-1.01	4	11,8
86			11	CASSD	-	TNTGELFF	2-2.01	6	17,6
87			12	CASSD	PGT	QETQYF	2-5.01	9	26,5
88			14	CAS	TPNKQGRG	QPQHF	1-5.01	7	20,6
89			15	CASSE	LGGGG	GTDQYF	2-3.01	3	8,8
90			16	CASSE	WGLSGE	YQETQYF	2-5.01	5	14,7
91	VB16	TRBV14	9	CASSQ	GV	EAFF	1-1.01	5	16,1
92			10	CASSQD	V	NEQFF	2-1.01	1	3,2
93			11	CASS	LGDSP	QYF	2-7.01	1	3,2
94			12	CASSQ	LAGGW	EQYV	2-7.02	1	3,2
95			12	CASSQE	VG	YNEQFF	2-1.01	1	3,2
96			13	CASSQ	DTGA	YNEQFF	2-1.01	2	6,5
97			13	CASSQD	EPA	PYEQYF	2-7.01	3	9,7
98			13	CASSH	RQMN	YNEQFF	2-1.01	15	48,4
99			15	CASSQD	RGPWLA	TEAFF	1-1.01	1	3,2
100			16	CASSQD	GGARGDKR	PYEQYF	2-7.01	1	3,2
101	VB17	TRBV19	10	CASSI	GS	YGYTF	1-2.01	1	2,6
102			10	CASS	LP	YQPQHF	1-5.01	1	2,6
103			11	CASS	LRSSG	EQYF	2-7.01	3	7,7
104			11	CASSI	QDG	ETQYF	2-5.01	2	5,1
105			12	CA	GQSTAF	TGELFF	2-2.01	1	2,6
106			12	CA	TSPLGM	HNEQFF	2-1.01	14	35,9
107			12	CASS	TTGVG	TEAFF	1-1.01	1	2,6
108			13	CAS	TPAASGGK	EQFF	2-1.01	1	2,6
109			13	CA	TQWTGAF	NYGYTF	1-2.01	1	2,6
110			13	CASSI	AGGSA	NEQFF	2-1.01	2	5,1
111			13	CASSI	APF	GNQPQHF	1-5.01	4	10,3
112			13	CASR	DERDAKT	EAFF	1-1.01	4	10,3
113			14	CASS	FLGGGR	QETQYF	2-5.01	2	5,1
114			14	CASS	IGTTSL	TDTQYF	2-3.01	1	2,6
115			15	CAS	KESPGQGL	YNEQFF	2-1.01	1	2,6
116	VB18	TRBV18	11	CASSP	QGG	TEAFF	1-1.01	1	2,0
117			12	CASS	AGTV	HNEQFF	2-1.01	1	2,0
118			12	CASSP	GSAR	ETQYF	2-5.01	1	2,0
119			12	CASSP	MAA	EETQYF	2-5.01	1	2,0
120			12	CASS	QRG	VNTEAFF	1-1.01	1	2,0
121			12	CASS	RSRDS	YEYF	2-7.01	2	3,9
122			12	CASSP	TRTAL	EQYF	2-7.01	2	3,9
123			12	CASSP	AGI	QETQYF	2-5.01	8	15,7
124			12	CASSP	KGQ	ADTQYF	2-3.01	3	5,9
125			12	CAS	PTGG	NTGELFF	2-2.01	3	5,9
126			12	CASSP	SGL	YGYTF	1-2.01	3	5,9
127			13	CASSP	DQGGP	YEYF	2-7.01	2	3,9
128			13	CASS	LPGT	DQETQYF	2-5.01	2	3,9
129			13	CASSP	RQDL	NSPLHF	1-6.02	5	9,8
130			14	CASSP	LQGAS	TDTQYF	2-3.01	3	5,9
131			16	CASSP	PSLDRGR	TGELFF	2-2.01	1	2,0
132			16	CASS	GLTAAGDY	DSPPLHF	1-6.02	7	13,7
133			17	CASSP	YAPDRLI	SGNTIYF	1-3.01	5	9,8
134	VB22	TRBV2	11	CASSPR	GAY	EQYV	2-7.02	2	7,4
135			12	CAS	IQDS	SGNTIYF	1-3.01	1	3,7
136			13	CAS	RGTSL	AKNIQYF	2-4.01	1	3,7
137			13	CASR	TRRTGM	NEQFF	2-1.01	4	14,8
138			14	CASSE	GAVPNLG	TQYF	2-5.01	1	3,7
139			14	CASSE	QQGY	SGELFF	2-2.01	18	66,7

#### 4.1 Anàlisi de la distribució de les mides de CDR3 i l'ús de segments TRBJ a l'infiltrat del pàncrees diabètic.

En primer lloc es va avaluar la mida en aminoàcids i la selecció de fragments gènics TRBJ dels 139 CDR3 diferents seqüenciats. La mida en aminoàcids del CDR3 es va considerar tal i com s'atribueix en l'aplicatiu d'IMGT ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)), des de la primera C a la última F de la seqüència CDR3, ambdues no incloses. Tal i com es mostra a la **Figura 29**, la distribució de les mides de les regions CDR3 de les cèl.lules T infiltrants seguia una distribució normal, sent majoritària la mida de 12 aa.

Respecte a l'ús de segments TRBJ, els segments TRBJ2-5, TRBJ2-3, TRBJ2-7 i TRBJ2-1 foren els més representats, seguit de TRBJ1-2, TRBJ1-1 i TRBJ2-2. Aquestes dades concorden amb l'estudi publicat per Freeman et. al. [175] en que s'estudiava el reordenament de cadena beta de 35.000 clons de sang perifèrica d'individus sans. Segons aquest estudi de referència, les nostres seqüències tenien una distribució canònica per ambdós paràmetres.



**Figura 29.** Distribució de llargades i us de fragments TRBJ per a les seqüències CDR3 de les principals cèl.lules T infiltrants al pàncrees del diabètic T1.

A) Es determinà la freqüència (%) de cada mida CDR3 en aminoàcids (desde C inicial a F final, no incloses). Les mides mostren una distribució normal essent la de 12aa la més abundant entre les 139 seqüències diferents obtingudes. B) estudi de l'ús dels fragments TRBJ. **Ambdós paràmetres eren similars als obtinguts amb l'anàlisi de donants sans de Freeman et. al. a *Genome Res.* 2009.**

#### 4.2 Valoració de les propietats dels aminoàcids de la regió CDR3.

Un cop determinats la mida i l'ús dels segments TRBJ, el següent pas fou estudiar la naturalesa dels aminoàcids que formen la regió hipervariable NDN. Les propietats estudiades es van basar en la classificació de l'IMGT ([www.imgt.org/textes/IMGTeducation/Aide-memoire/\\_UK/aminoacids/IMGTclasses.html](http://www.imgt.org/textes/IMGTeducation/Aide-memoire/_UK/aminoacids/IMGTclasses.html)). Segons aquesta classificació, es va determinar en primer lloc el **grau d'hidropatia** dels CDR3 (ús de la nomenclatura d'aminoàcids amb codi d'una lletra): hidrofòbics (I, V, L, F, C, M, A, W), neutres (G, T, S, Y, P, H) i hidrofílics (D, N, E, Q, K, R); i en segon lloc es va valorar les **7 propietats químiques**: alifàtic (A, V, I, L, G, P), aromàtic (F, W, Y), sulfurat (C, M), hidroxilat (S, T), bàsic (H, K, R), àcid (D, E) i amida (N, Q) (**Figura 30**).

Per determinar les propietats dels aminoàcids de cada posició del CDR3, es va distribuir les seqüències en quatre grups segons les quatre mides més abundants (11aa, 12aa, 13aa i 14aa) (**Taula 7**) i es va aplicar dues aproximacions diferents:

- *Qualitativa*, que valorava equiprobablement cadascun dels diferents reordenaments identificats (clonotips). D'aquesta manera el nombre de seqüències incloses en cada grup varen ser: n=26 per 11aa, n=31 per 12aa, n=25 per 13aa i n=20 per 14aa .
- *Quantitativa*, que valorava la contribució de cada reordenament al total de seqüències, incloent-lo tantes vegades com havia aparegut clonat. En aquest cas el nombre de seqüències incloses en cada grup varen ser: n=82 per 11aa, n=96 per 12aa, n=66 per 13aa i n=83 per 14aa.

	Hidrofòbic	Neutre	Hidrofílic
● Alifàtic	A V I L	G P	
● Aromàtic	F W	Y	
● Sulfurat	C M		
● Hidroxilat		S T	
● Bàsic		H	K R
● Àcid			D E
● Amida			N Q

Figura 30. Assignació de propietats fisico-químiques a cadascun dels 20 aminoàcids comuns, adaptada de l'article de Pommie et al. (Mol. Recognit.2004) i les 7 classes estandaritzades utilitzades en les bases de dades i eines online d'IMGT®, definides segons les propietats de les cadenes laterals.

A l'estudi del caràcter hidropàtic de la regió del CDR3, es va observar un perfil semblant en cadascun dels 4 grups de seqüències (11aa, 12aa, 13aa i 14aa). La **Figura 31** mostra els gràfics de l'estudi qualitatiu on es representa el recompte d'aminoàcids hidrofòbics, neutres o hidrofílics en cada posició al CDR3 de cada grup. S'observà que els aminoàcids dels extrems N i C terminal eren hidrofòbics, la part central era majoritàriament neutre, flanquejada per les posicions 4 a 6 on no hi havia predomini definit i les posicions 8 a 10 que mostraven un increment d'aminoàcids hidrofílics a més de neutres. L'estudi quantitatiu no va mostrar diferències rellevants (gràfic afegit com a annex en la **Figura suplementària 4**).

**A) SEQÜENCIES D'11 aa**

Família V $\beta$ (nomenclatura antiga)	MIDA del CDR3	clonotips CDR3 (n=26)	TRBV	TRBD	TRBJ	nº de seqüències (n=82)
Vb1	11	CASSVAVHYGYF	9.01	-	1-2.01	1
Vb1	11	CASSVSTIDTYF	9.01	2.01	2-3.01	20
Vb4	11	CSVVVGHTEAFF	29-1.01	1.01	1-1.01	3
Vb4	11	CSFNAEGVSGYF	29-1.01	1.01	1-2.01	3
Vb4	11	CSGGRLGKEQFF	29-1.01	2.01	2-1.01	1
Vb4	11	CSVLGTTYHEQFF	29-1.01	2.01	2-1.01	2
Vb4	11	CSARIGPADTYF	29-1.01	1.01	2-3.01	1
Vb4	11	CSARMAERTQYF	29-1.01	2.01	2-3.01	1
Vb4	11	CSVETGPGETQYF	29-1.01	1.01	2-5.01	2
Vb4	11	CSVLHSGANVLF	29-1.01	-	2-6.01	2
Vb6	11	RASSPGQHYGYF	7-3.03	1.01	1-2.01	3
Vb6	11	CASSPFLSYEQYF	7-6.01	-	2-7.01	1
Vb7	11	CASSQAAGYEQYF	4-2.01	2.01	2-7.01	2
Vb8	11	CASSRPDGEAFF	12-3.01	1.01	1-1.01	1
Vb8	11	CASSLLPESGYF	12-3.01	-	1-2.01	1
Vb8	11	CASSLPESGYF	12-3.01	-	1-2.01	1
Vb8	11	CASSLEVAGEQYF	12-3.01	2.01	2-7.01	1
Vb8	11	CASRPTSTYEQYF	12-3.01	2.01	2-7.01	1
Vb9	11	CASLSGGTDTQYF	3-1.01	2.01	2-3.01	1
Vb11	11	CASSDTHIGELFF	25-1.01	-	2-2.01	5
Vb16	11	CASSLGDSPFQYF	14.01	2.01	2-7.01	1
Vb17	11	CASSIQDGETQYF	19.01	2.01	2-5.01	2
Vb17	11	CASSLRSSEGEQYF	19.01	2.01	2-7.01	3
Vb18	11	CASSLEITGELFF	11-3.01	-	2-2.01	4
Vb18	11	CASSRVKFTYQYV	11-3.01	2.02	2-7.02	9
Vb22	11	CASSPRGAYEQYV	2.01	1.01	2-7.02	2

Taula 7. Llistats de seqüències CDR3 de cadena beta del TCR incloses en cada alineament.

A) Alineament per a les seqüències de mida 11aa: 82 seqüències corresponents a 26 clonotips diferents.

B) Alineament per a les seqüències de mida 12aa: 96 seqüències corresponents a 31 clonotips diferents.

**B) SEQÜENCIES DE 12 aa**

Família V $\beta$ (nomenclatura antiga)	MIDA del CDR3	clonotips CDR3 (n=31)	TRBV	TRBD	TRBJ	nº de seqüències (n=96)
Vb1	12	CASSKIRESDGYF	9.01	1.01	1-2.01	2
Vb1	12	CASSDEGYGHTIYF	9.01	1.01	1-3.01	1
Vb1	12	CASSVAVGQETQYF	9.01	1.01	2-5.01	0
Vb4	12	CSAHDDGAGTEAFF	29-1.01	1.01	1-1.01	1
Vb4	12	CSARMDLGNHTIYF	29-1.01	1.01	1-3.01	1
Vb4	12	CSVDTSQHYHEQFF	29-1.01	2.01	2-1.01	2
Vb6	12	CASSLIEGHQPQHF	7-8.01	1.01	1-5.01	1
Vb6	12	CASSLKLWETQYF	7-6.01	1.01	2-5.01	1
Vb6	12	CASSSGTASYEQYF	7-6.01	1.01	2-7.01	5
Vb6	12	CASSFEEGYEQYF	7-6.01	2.01	2-7.01	1
Vb6	12	CASSLGYIGYEQYF	7-8.01	2.01	2-7.01	1
Vb7	12	CASSQAAGSTEAF	4-2.01	1.01	1-1.01	5
Vb7	12	CASSQDPATDTQYF	4-2.01	2.01	2-3.01	1
Vb7	12	CASSQDGLYEQYF	4-2.01	2.01	2-5.01	1
Vb8	12	CASSGTVHTEAFF	12-3.01	1.01	1-1.01	1
Vb8	12	CASIHRESHPQHF	12-3.01	1.01	1-5.01	2
Vb8	12	CASSFPASTDTQYF	12-3.01	-	2-3.01	3
Vb9	12	CASSQGSTHYGYF	3-1.01	1.01	1-2.01	4
Vb9	12	CASSPRGNHSLHF	3-1.01	1.01	1-6.02	3
Vb9	12	CASSGQGIPTQYF	3-1.01	1.01	2-3.01	7
Vb11	12	CASSDPGTQETQYF	25-1.01	2.01	2-5.01	9
Vb16	12	CASSQEVGYHEQFF	14.01	2.01	2-1.01	1
Vb16	12	CASSQLAGGWEQYV	14.01	2.01	2-7.02	1
Vb17	12	CASSITGVGTEAFF	19.01	1.01	1-1.01	1
Vb17	12	CATSPIGHNHEQFF	19.01	2.01	2-1.01	14
Vb17	12	CAGQSTAFTEGELFF	19.01	1.01	2-2.01	1
Vb18	12	CASSPSPGLYGYF	18.01	1.01	1-2.01	3
Vb18	12	CASPTGGHTGELFF	18.01	2.01	2-2.01	3
Vb18	12	CASSPKGQADTQYF	18.01	2.02	2-3.01	3
Vb18	12	CASSPAGIQETQYF	18.01	2.01	2-5.01	0
Vb22	12	CASIQDSSGHTIYF	2.01	1.01	1-3.01	1

A l'anàlisi *quantitatiu* s'aplicava cadascuna un sol cop, en el *quantitatiu* tantes vegades com s'indica en la última columna, segons el nombre de clons identificats de cada.

### C) SEQÜÈNCIES DE 13 aa

Família V $\beta$ (nomenclatura antiga)	MIDA del CDR3	clonotips CDR3 (n=25)	TRBV	TRBD	TRBJ	nº de seqüències (n=66)
Vb1	13	CASSVGDLPDYGTYF	9.01	1.01	1-2.01	1
Vb1	13	CASSVQGSPNTEQYF	9.01	1.01	2-7.01	3
Vb4	13	CSVLSDGGEGYNEQFF	29-1.01	2.01	2-1.01	2
Vb4	13	CSVEDARGAGDTQYF	29-1.01	2.01	2-3.01	3
Vb4	13	CSVEDLPGHDTQYF	29-1.01	2.01	2-3.01	1
Vb6	13	CASSLGLAGGNEQFF	7-8.01	2.01	2-1.01	1
Vb6	13	CASSGGSSSYNEQFF	7-7.01	2.01	2-1.01	1
Vb7	13	CASSPTSGEVKTQYF	4-2.01	2.01	2-5.01	1
Vb8	13	CASSFGGGAGSPLMF	12-3.01	1.01	1-6.01	1
Vb8	13	CASSLDRVGTDTQYF	12-3.01	1.01	2-3.01	1
Vb8	13	CASSLAGTSGETQYF	12-3.01	2.01	2-5.01	1
Vb8	13	CASSLRGGRETEQYF	12-3.01	2.01	2-5.01	1
Vb9	13	CASSQVTGVTQYF	3-1.01	1.01	2-5.01	2
Vb9	13	CASSDSRASFTQYF	3-1.01	2.01	2-7.01	5
Vb16	13	CASSQDTGAYNEQFF	14.01	2.01	2-1.01	2
Vb16	13	CASSHRQHYNEQFF	14.01	1.01	2-1.01	15
Vb16	13	CASSQDEPAPYEQYF	14.01	2.01	2-7.01	3
Vb17	13	CASSRDERDAKTEAFF	19.01	1.01	1-1.01	4
Vb17	13	CATQWEGAFNYGYF	19.01	1.01	1-2.01	1
Vb17	13	CASSIAPFGHQPHF	19.01	-	1-5.01	4
Vb17	13	CASIPAAASGGKEQFF	19.01	2.01	2-1.01	1
Vb17	13	CASSIAGGSANEQFF	19.01	2.01	2-1.01	2
Vb18	13	CASSPRQDLNSPLMF	18.01	1.01	1-6.02	5
Vb22	13	CASRRRTGMSNEQFF	2.01	1.01	2-1.01	4
Vb22	13	CASRGTSLAKNIQYF	2.01	2.01	2-4.01	1

Taula 7 (bis).

C) Alineament per a les seqüències de mida 13aa: 66 seqüències corresponents a 25 clonotips diferents

D) Alineament per a les seqüències de mida 14aa: 83 seqüències corresponents a 20 clonotips diferents.

### D) SEQÜÈNCIES DE 14 aa

Família V $\beta$ (nomenclatura antiga)	MIDA del CDR3	clonotips CDR3 (n=20)	TRBV	TRBD	TRBJ	nº de seqüències (n=83)
Vb1	14	CASSVEGGHAAMGYTF	9.01	1.01	1-2.01	1
Vb1	14	CASSEGGGLQETQYF	9.01	2.01	2-5.01	2
Vb4	14	CSVETQRGGRTDTQYF	29-1.01	2.01	2-3.01	3
Vb4	14	CSARGSSGGAGETQYF	29-1.01	2.01	2-5.01	2
Vb6	14	CASSRGGGRANTGELFF	7-8.01	1.01	2-2.01	1
Vb6	14	CASSDPGGQVVETQYF	7-8.01	1.01	2-5.01	1
Vb7	14	CASSQEQGSSNQPHF	4-2.01	1.01	1-5.01	2
Vb7	14	CASSQVAGAGTGELFF	4-2.01	1.01	2-2.01	22
Vb7	14	CASSQIGGLGTDQYF	4-2.01	1.01	2-3.01	1
Vb8	14	CASSLRPGRGDETEAFF	12-3.01	1.01	1-1.01	1
Vb8	14	CASSLGSAGHYGYTF	12-3.01	1.01	1-2.01	1
Vb9	14	CASSQKMSLDGATQYF	3-1.01	2.01	2-3.01	5
Vb9	14	CASSRRQTSSTDTQYF	3-1.01	1.01	2-3.01	7
Vb9	14	CASSQLKGPSSEYQYF	3-1.01	1.01	2-7.01	2
Vb11	14	CASIPKQGRGQPQHF	25-1.01	1.01	1-5.01	7
Vb17	14	CASSIGTSLTDTQYF	19.01	2.01	2-3.01	1
Vb17	14	CASSFLGGGRQETQYF	19.01	2.01	2-5.01	2
Vb18	14	CASSPLQGASTDTQYF	18.01	1.01	2-3.01	3
Vb22	14	CASSEAQGGYSSELFF	2.01	1.01	2-2.01	18
Vb22	14	CASSEGAVPHLGTQYF	2.01	2.01	2-5.01	1

Valoració qualitativa d'hidropatia dels aminoàcids del  $\beta$ -CDR3.

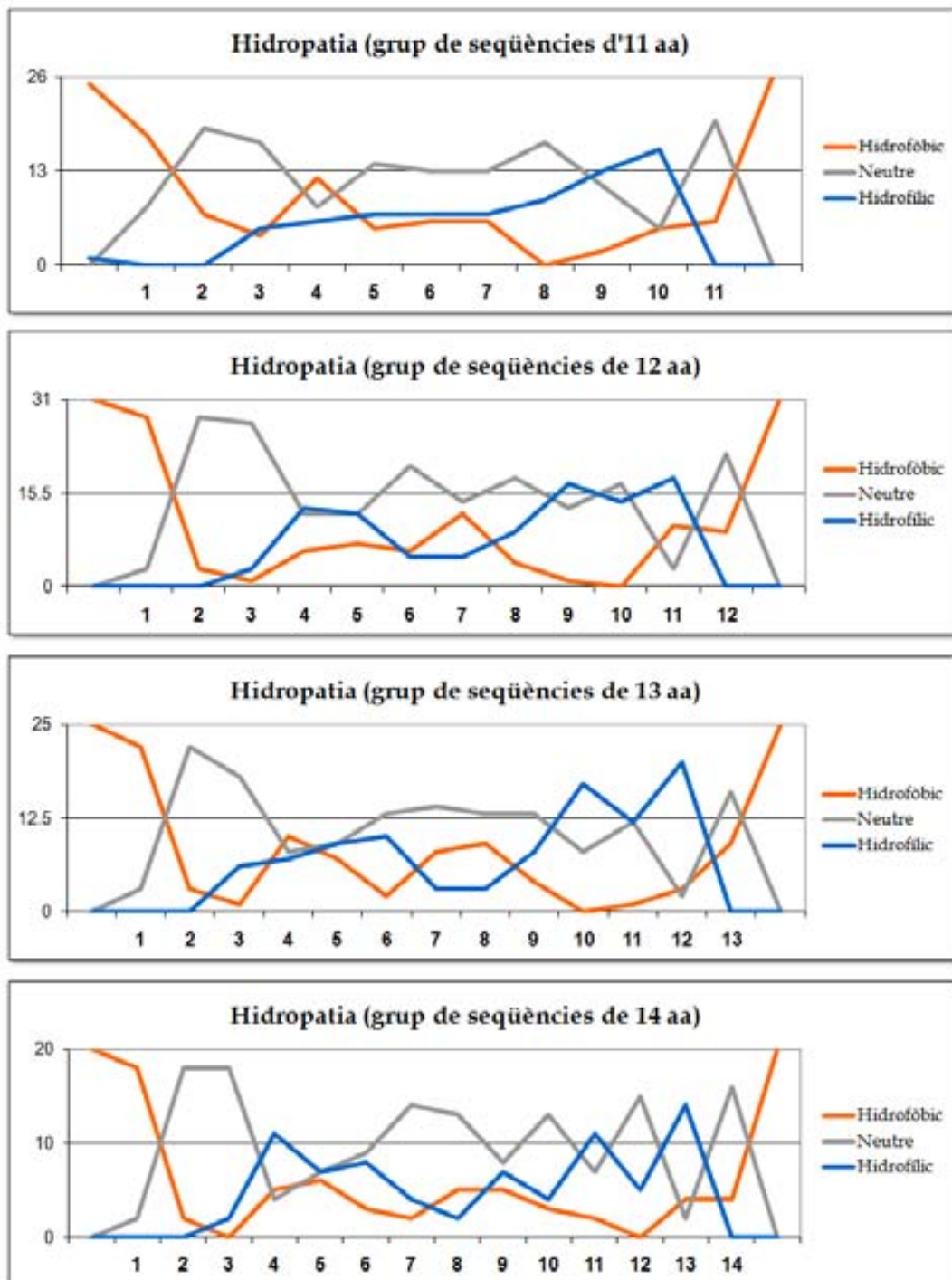


Figura 31. Propietats d'hidropatia dels aminoàcids del  $\beta$ -CDR3- en les cèl.lules T intra-pancreàtiques del donant diabètic, segons l'estudi qualitatiu per cada grup de seqüències. L'eix X indica la posició al CDR3 de N- a C- terminal, desde la C inicial (anterior a 1) a la F final (posterior a la última posició numerada), C i la F són posicions incloses als gràfics però sense numeració. L'eix Y indica el nombre de seqüències.

A l'estudi de les 7 propietats químiques, en canvi, l'anàlisi va revelar certa restricció en la naturalesa dels aminoàcids que ocupaven determinades posicions de l'NDN (**Figura 32**). S'observà una marcada predominança dels aminoàcids alifàtics a la part central del loop de tots els grups (11aa, 12aa, 13aa i 14aa), clarament degut al predomini de G i P codificades al segment gènic TRBD. No obstant, aquest predomini disminuïa en determinades posicions de cada grup, observant-s'hi cert increment en varietat d'altres propietats. Això es veu reflexat sobretot als grups de 13aa i 14aa al voltant de la posició 6 on s'observà una inflexió de la línia corresponent al caràcter alifàtic, característica també de la posició 5 del grup d'11aa. Aquesta tendència no es va observar al grup de 12aa. A la part C-ter del NDN la disminució de la naturalesa alifàtica coincidia amb l'inici dels segments TRBJ.

A l'anàlisi quantitatiu, es van confirmar les tendències observades (**Figura 33**) i va permetre determinar quines propietats químiques eren seleccionades en les seqüències més expandides (veure **Taula 7**), incloses les expansions monoclonals identificades anteriorment (**Taula 5**):

- Al grup de seqüències d'11aa, les posicions 5, 6 i 7 eren preferentment ocupades per aminoàcids hidroxilats, residus que té en aquestes posicions la seqüència expandida "V $\beta$ 1- CASSVSTTDTQYF", la qual és la majoritària en el grup ja que són 28 de 82 seqüències.
- Al grup de seqüències de 12aa, les dues seqüències expandides contenien aminoàcids alifàtics en la part central i no modificaven la tendència observada a l'anàlisi qualitatiu.
- Al grup de seqüències de 13aa, a les posicions 5 i 6 s'observava un increment, respecte a l'anàlisi qualitatiu, de residus bàsics i amida, que podrien ser deguts a R i Q presents a la seqüència majoritària en aquest grup "V $\beta$ 16- CASSHRQMNYNEQFF", ja que són 15 de 66 seqüències.



### Valoració de propietats químiques dels aa al $\beta$ -CDR3 segons l'estudi qualitatiu.

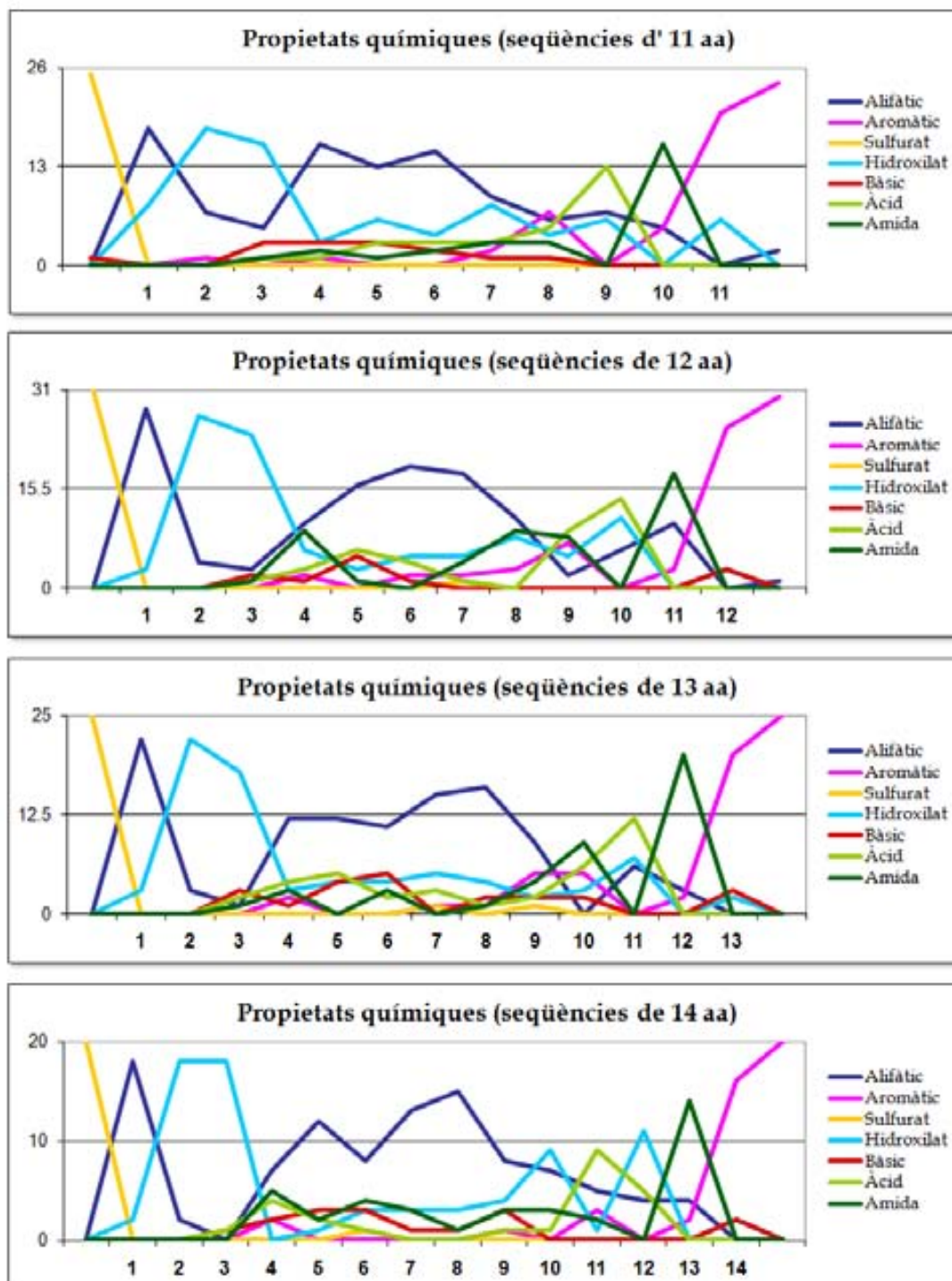


Figura 32. Estudi qualitatiu en cada grup de seqüències , de les propietats químiques dels aminoàcids del  $\beta$ -CDR3 en les cèl.lules T intra-pancreàtiques del donant diabètic. L'eix X indica la posició al CDR3 de -N a C- terminal, desde la C inicial (anterior a 1) a la F final ( posterior a la ultima posició numerada), ambdues posicions són incòlques als gràfics però sense numeració. L'eix Y indica el nombre de seqüències.

### Valoració de propietats químiques dels aa al $\beta$ -CDR3 segons l'estudi quantitatiu

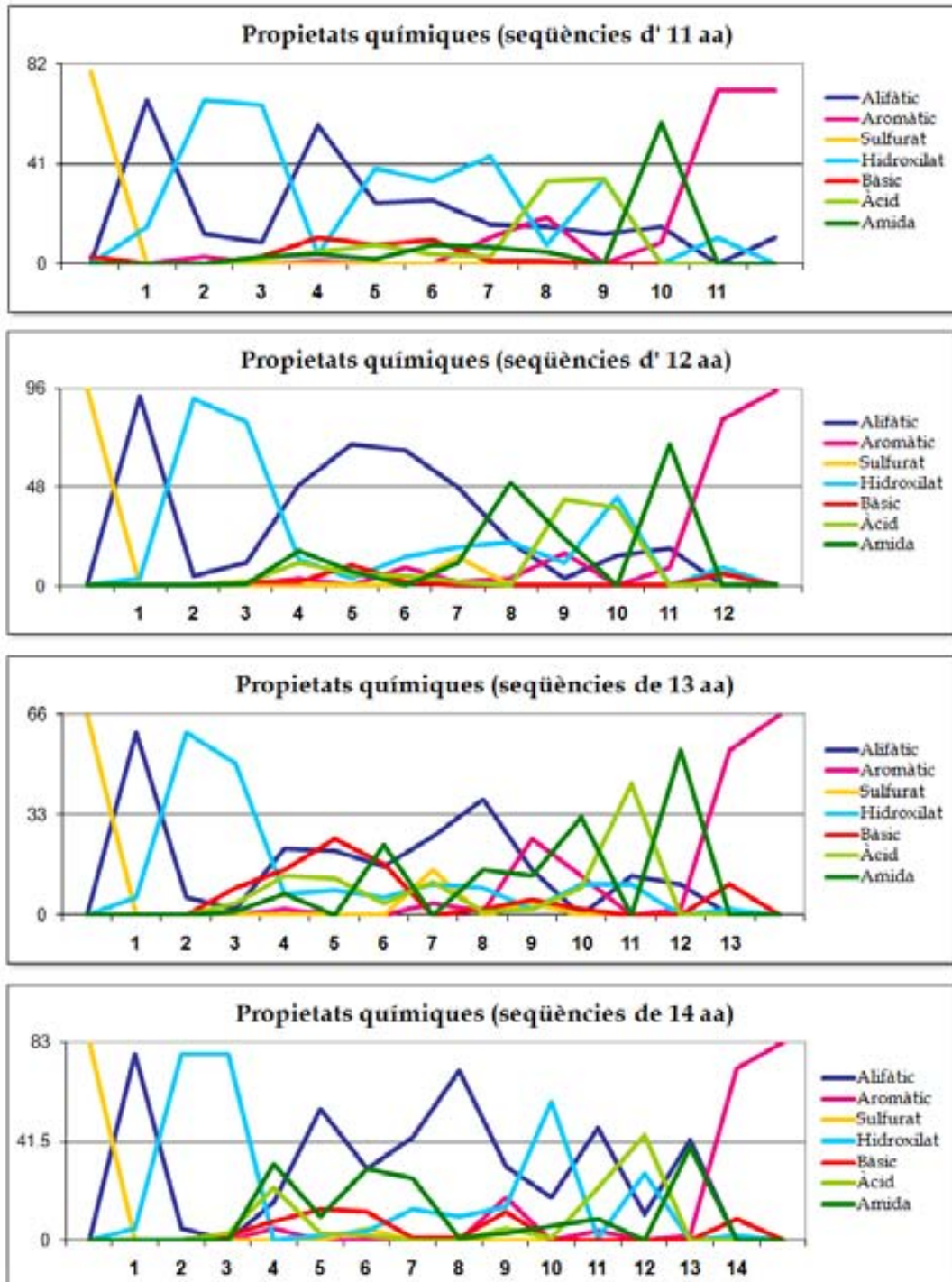


Figura 33. Estudi quantitatiu en cada grup de seqüències , de les propietats químiques dels aminoàcids del  $\beta$ -CDR3 en les cèl.lules T intra-pancreàtiques del donant diabètic. L'eix X indica la posició al CDR3 de -N a C- terminal, desde la C inicial (anterior a 1) a la F final ( posterior a la ultima posició numerada), ambdues posicions són incòltes als gràfics però sense numeració. L'eix Y indica el nombre de seqüències.

- Al grup de seqüències de 14aa, a les posicions 6 i 7 apareixia un increment d'aminoàcids amida que reflexaria la presència de l'expansió “V $\beta$ 22-CASSEAAQQGYSGELFF” que contribueix en 18 de les 83 seqüències. L'altra expansió monoclonal d'aquest grup té en canvi residus alifàtics en aquestes posicions “V $\beta$ 7-CASSQVAGAGTGELFF”.

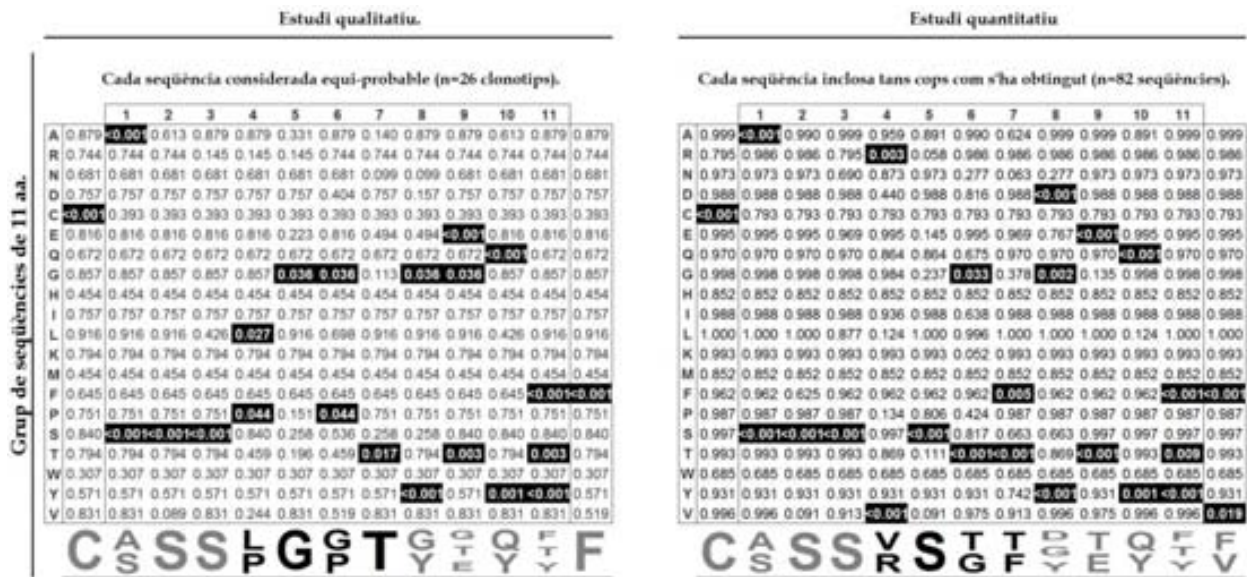
En resum, l'anàlisi de la naturalesa dels aminoàcids als CDR3 de les seqüències de l'infiltrat pancreàtic, va suggerir l'existència d'una major variabilitat al voltant de la posició 6 de la regió CDR3. Aquesta variabilitat no vindria determinada per la dominància de cap expansió als grups ja que, a l'anàlisi qualitatiu, cada clonotip era ponderat un sol cop. Amb el quantitatiu, es confirmava aquesta restricció i mostrava la naturalesa dels aminoàcids que ocupaven aquestes posicions en les seqüències expandides a l'infiltrat.

#### 4.3. Definició de motius de restricció a les regions $\beta$ -CDR3 dels clons infiltrants al pàncrees del donant diabètic.

En una segona fase de l'estudi de les seqüències de CDR3, es va plantejar si als quatre grups establerts (11aa, 12aa, 13aa i 14aa) existien motius de restricció que fossin estadísticament significatius. A partir d'aquests grups, que van ser tractats independentment per alineament (**Taula 7**), es va aplicar la distribució Binomial per tots 20 aminoàcids a cada posició del CDR3, considerant una restricció significativa si  $P > P$  definida segons el proteoma quant  $p < 0.05$ .

Aquest estudi estadístic, va ser aplicat en les dues aproximacions diferents: *qualitativa*, on es considerava cada reordenament equiprobable i *quantitativa* on es valorava la contribució de cada reordenament al total de l'infiltrat. A la **Figura 34** es representa el valor estadístic dels 20 aminoàcids en cadascuna de les posicions del CDR3. Aquest anàlisi va permetre deduir en cada mida de CDR3 una seqüència consens conformada amb els aminoàcids amb valor estadístic. Els aminoàcids marcats en gris són posicions codificades en la línia germinal (segment TRBV i segment TRBJ a cada extrem) i com era d'esperar van resultar estadísticament significatius, confirmant la validesa de l'anàlisi. Per altra banda, els aminoàcids corresponents a la regió hipervariable NDN es van marcar en negre. L'abundància de G en aquesta regió és un tret general en tots els patrons obtinguts ja que està codificada pel segment TRBD i confirmaria el predomini d'aminoàcids de caràcter alifàtic en aquesta regió (**Figura 31**). Juntament amb la G, altres aminoàcids van resultar ser més freqüents de lo esperat després de corregir-los per la seva presència en el proteoma.

A) Grup de seqüències β-CDR3 d’11 aminoàcids



B) Grup de seqüències β-CDR3 de 12 aminoàcids

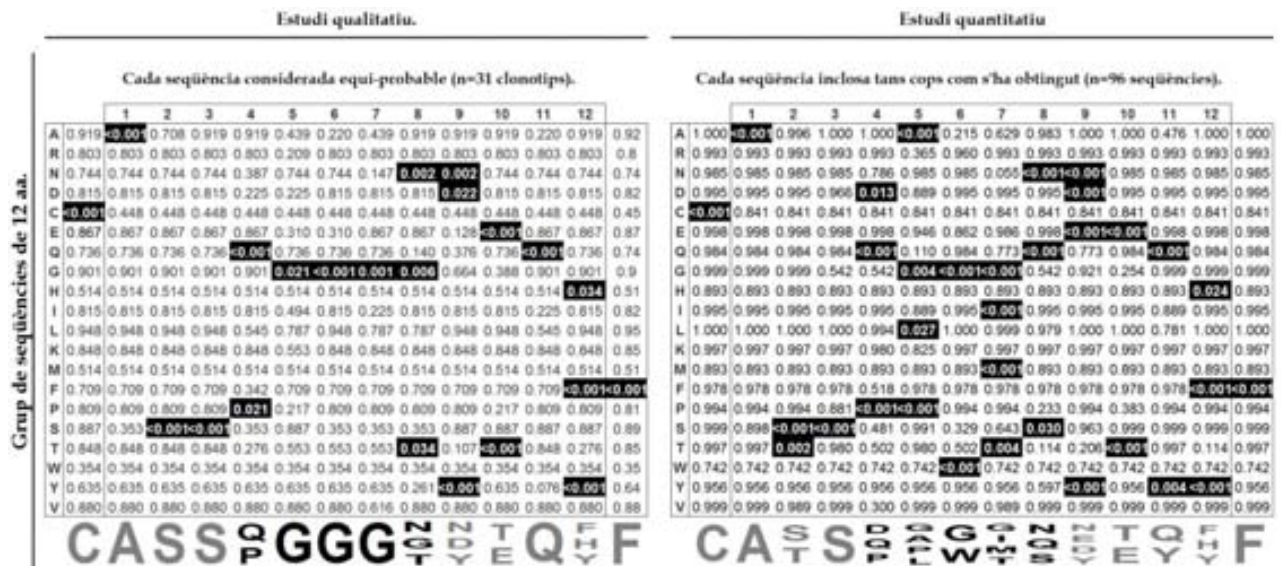
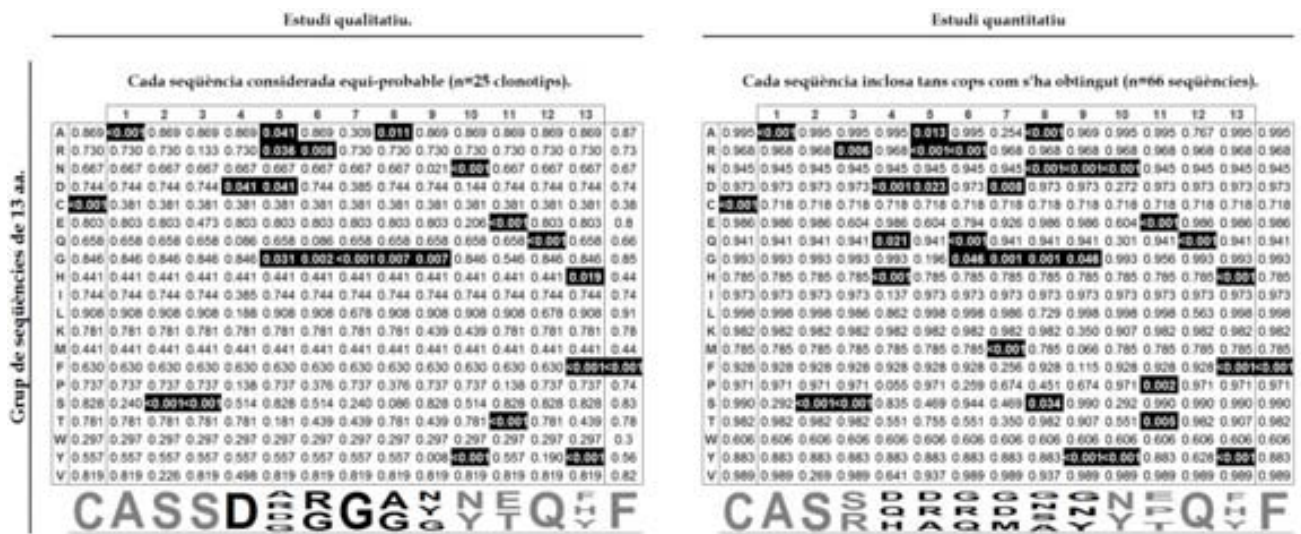


Figura 34. Anàlisi estadístic de la presència d’un aa en cadascuna de les posicions del CDR3 en els alineaments de: 11aa A) i 12aa B). A la columna esquerra es mostren les matrius del càlcul per a l’anàlisi qualitatiu on cada seqüència es considerava equipobable i a la columna dreta l’anàlisi quantitatiu on cada seqüència s’ha inclòs tantes vegades com s’ha identificat. Els aminoàcids que obtingueren una  $P < 0.05$  en una determinada posició del CDR3, són remarcats en negre i seleccionats per determinar els patrons que es mostra a la figura sota cada matriu.

C) Grup de seqüències  $\beta$ -CDR3 de 13 aminoàcids.



D) Grup de seqüències  $\beta$ -CDR3 de 14 aminoàcids.

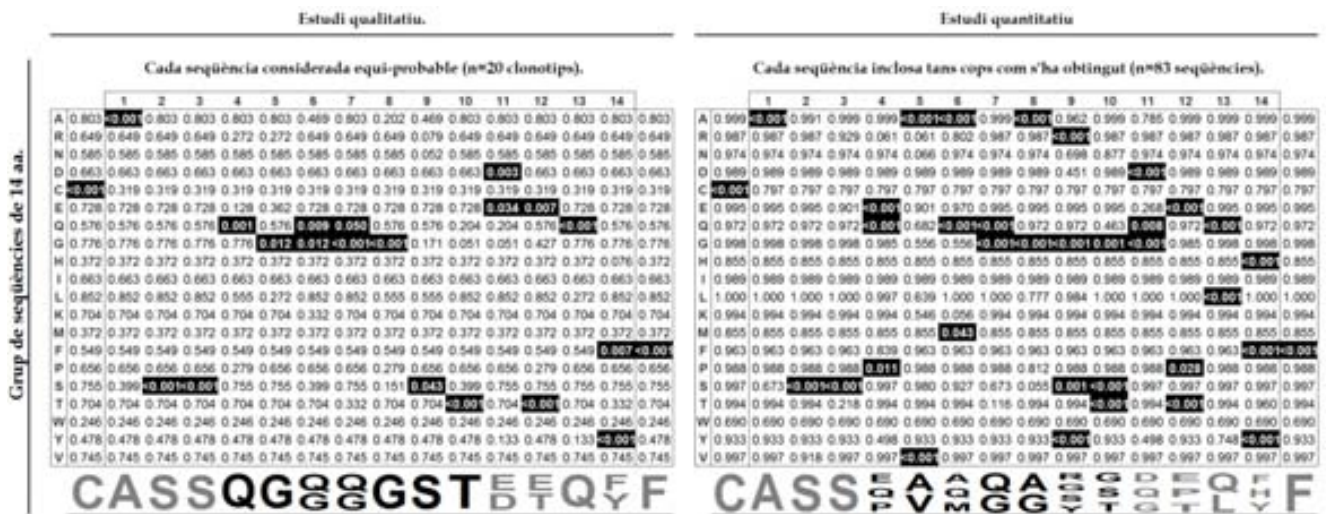


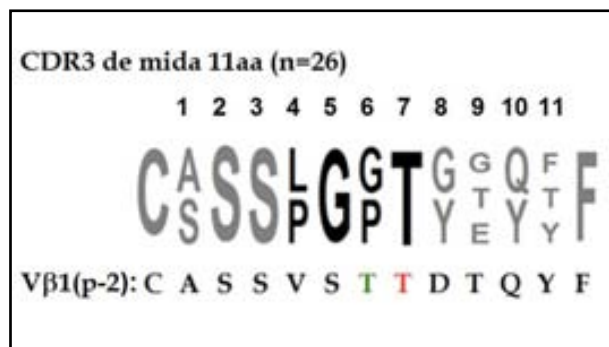
Figura 34. Bis. Anàlisi de la repetició d'aminoàcids a les regions CDR3 per a les seqüències de 13aa C) i 14aa D).

#### 4.3.1. Anàlisi del patró de restricció dels CDR3 d'11aa

##### › Anàlisi qualitatiu de les seqüències d'11aa.

Per a l'agrupació de seqüències CDR3 més curtes, d'11aa (**Taula 7A**), s'observà que en la regió NDN hi havia preferència en l'ús de la prolina (P) i la leucina (L) a la posició 4 i la treonina (T) a la posició 7. **Figura 34A**.

La comparació del patró de restricció obtingut amb l'expansió del pàncrees de la mateixa mida, Vβ1(CASSVSTTDTQYF), (**Figura 35**) confirmà la rellevància de la treonina (T, subratllada) en aquesta posició dins del biaix definit pels CDR3 d'aquesta mida. El fet que la T sigui significativament dominant en aquesta posició concordaria amb la predominància d'aminoàcids hidroxilats observada a la **Figura 32A** (línia blau clar).



**Figura 35.** Comparació del patró per 11aa obtingut de l'anàlisi qualitatiu amb la corresponent expansió clonal de la mateixa mida Vβ1. En vermell quan l'aminoàcid coincideix en posició i en verd quan és en posició contigua.

##### › Anàlisi quantitatiu de les seqüències de 11 aa

L'anàlisi quantitatiu considera totes les seqüències obtingudes i per tant el patró de la regió NDN està format pràcticament per la combinació dels residus de les seqüències més abundants del grup, entre les que es trobarien les expansions monoclonals que són les més representades. Així doncs, s'observà la restricció per valina (V) i arginina (R) en posició 4; serina (S) a la posició 5; treonina (T) a la posició 6; i fenilalanina (F) i treonina (T) a la posició 7. Tal i com era esperat, la seqüència corresponent a l'expansió clonal Vβ1(CASSVSTDTQYF) es va veure reflexada en el patró obtingut ja que és la més nombrosa.

No obstant, la presència d'altres seqüències repetides dins del grup afavoreix que altres aminoàcids siguin significativament predominants en el NDN (**Taula 7A i Figura 34A dreta**).

#### 4.3.2 Anàlisi del patró de restricció dels CDR3 de 12aa

› *Anàlisi qualitatiu de les seqüències de 12aa.*

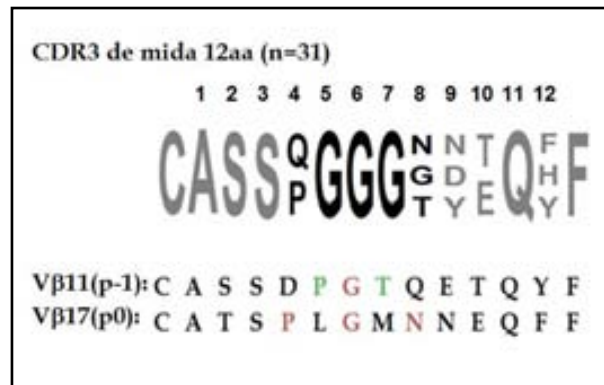
Per l'agrupació de seqüències de mida intermitja, (12 aminoàcids) (**taula 7B**) s'observà preferència en l'ús de Prolina (P) i Glutamina (Q) a l'extrem N-ter i Asparagina (N) i Treonina (T) a l'extrem C-ter de la regió NDN (**Figura 34B esquerra**). A la zona central no es va determinar cap residu dominant excepte la preferència de G en cadascuna de les posicions. Aquestes dades afegeixen informació a les propietats dels aminoàcids observades a la **Figura 32B**, corroboren l'abundància del caràcter alifàtic del NDN i mostren els aminoàcids responsables dels caràcters amida i hidroxilat de les posicions 4 i 8.

Les expansions

V $\beta$ 11(CASSDPGTIQETQYF) i

V $\beta$ 17(CATSPLGMNNEQFF)

d'aquesta mida (**Figura 36**) van coincidir amb la presència de la prolina (P) a ambdues, i de la Treonina (T) i Asparagina (N) en posicions exactes o contigües degut a que la regió de CDR3 és un *loop* que permet la plasticitat en el reconeixement del lligand.



**Figura 36.** Comparació del patró per 12aa obtingut de l'anàlisi qualitatiu amb les corresponents expansions clonals de la mateixa mida V $\beta$ 11(p-1) i V $\beta$ 17(p0), es mostra en vermell quan l'aminoàcid coincideix en posició i en verd quan és en posició contigua a la del patró.



› *Anàlisi quantitativ de les seqüències de 12aa*

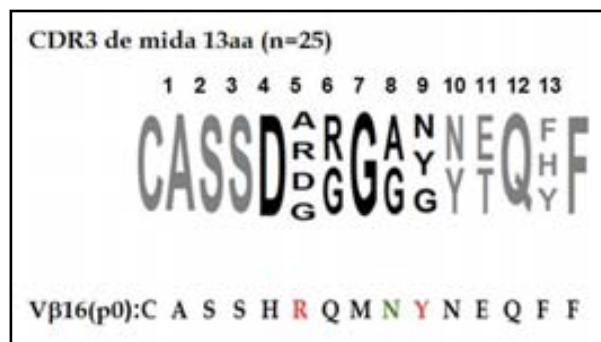
L'anàlisi segons la ponderació de cada seqüència obtinguda, va confirmar la prolina (P) a la part N-terminal de la regió NDN i la treonina (T) i asparagina (N) a la part C-ter, juntament amb altres aminoàcids que adquireixen valor significatiu degut a altres seqüències repetides dins del grup (**Figura 34B dreta**).

#### 4.3.3. Anàlisi del patró de restricció dels CDR3 de 13aa

› *Anàlisi qualitativ de les seqüències de 13aa.*

A l'agrupació de seqüències de 13 aminoàcids (**Taula 7C**), s'observà restricció per l'aspàrtic (D) a les posicions 4 i 5 de l'NDN seguit per arginina (R) a les posicions 5 i 6, mentre que a l'extrem C-terminal (posició 9) es va observar predomini per l'asparagina (N) i tirosina (Y) (**Figura 34C esquerra**). De nou a la part central, va mostrar dominància de glicina (G) acompanyada d'alanina (A) ambdós de naturalesa alifàtica. La disminució del caràcter alifàtic a la regió NDN observada a la **Figura 32C** es correlaciona amb les restriccions abans descrits de les posicions 5 i 6.

L'única seqüència de 13aa caracteritzada com expansió clonal a la melsa i present al pàncrees, V $\beta$ 16(CASSHRQMNYNEQFF), va mostrar concordança amb el patró en la dominància de l'arginina (R) a la posició 5 i asparagina (N) i tirosina (Y) a la posició 9 (**Figura 37**).



**Figura 37.** Comparació del patró per 13aa obtingut de l'anàlisi qualitativ amb la corresponent expansió clonal de la mateixa mida V $\beta$ 16(p0). Es mostra en vermell quan l'aminoàcid coincideix en posició i en verd quan és en posició contigua a la del patró.

•RESULTATS•

› *Anàlisi quantitativ de les seqüències de 13aa.*

L'anàlisi quantitativ de les seqüències de 13aa va confirmar el patró observat a l'anàlisi qualitativ donant rellevància a la presència de l'aspàrtic (D) i l'arginina (R) en la posició N-terminal i asparagina (N) i tirosina (Y) a la C-terminal (**Figura 34C dreta**).

#### 4.3.4 Anàlisi del patró de restricció dels CDR3 de 14aa.

› *Anàlisi qualitativ de les seqüències de 14aa.*

Finalment, l'agrupació de seqüències de mida més llarga (14 aa) (**Taula 7D**), va mostrar un major predomini per la Glutamina (Q) a les posicions centrals 6 i 7 i la serina (S) i la treonina (T) a les posicions 9 i 10, respectivament (**Figura 34D esquerra**).

L'expansió monoclonal que més s'assembla al patró definit per les seqüències del seu grup fou la corresponent a la família V $\beta$ 22 (CASSEAQQGYSGELFF) on els residus de Q coincideixen amb els mostrats en el patró de 14 aa i també per la S situada a la posició 10 posterior a la observada en el patró. En canvi, l'expansió monoclonal V $\beta$ 7(CASSQVAGAGTGELFF) a compleix el patró en les posicions 4 i 10. (**Figura 38**)

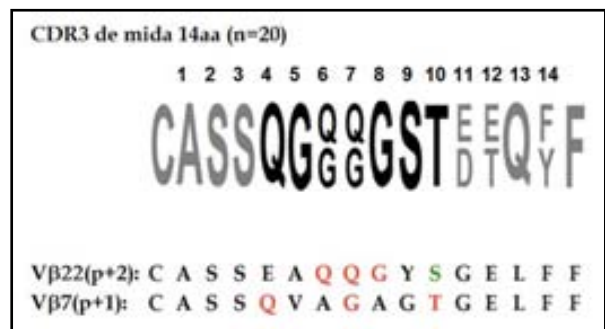


Figura 38. Comparació del patró per 14aa obtingut de l'anàlisi qualitativ amb les corresponents expansions clonal de la mateixa mida V $\beta$ 22(p+2) i V $\beta$ 7(p+1). Es mostra en vermell quan l'aminoàcid coincideix en posició i en verd quan és en posició contigua a la del patró.

De nou, la posició on disminueix el caràcter alifàtic de l'NDN coincideix en les posicions on els aminoàcids amb valor significatiu són diferents a la G (**Figura 32D**).

› Anàlisi quantitativa de les seqüències de 14aa.

El patró obtingut en l'anàlisi quantitativa de les seqüències de 14aa, va confirmar la selecció dels aminoàcids definits a l'anàlisi anterior, glutamina (Q) en N-terminal i serina (S) i treonina (T) en C-terminal, juntament amb els altres aminoàcids determinats per les seqüències més abundants dins del grup (Figura 34D dreta).

#### 4.4. Relació del biaix CDR3 a pàncrees amb les expansions a la melsa del pacient DT1.

Una dada interessant obtinguda amb l'anàlisi dels CDR3 és que les cèl.lules T expandides a la melsa del malalt T1D, V $\beta$ 16 (CASSHRQMNYNEQFF) i V $\beta$ 22 (CASSEAQQGYSGELFF), concorden respectivament amb el patró definit per els CDR3 de 13 i 14aa de les cèl.lules T infiltrants al pàncrees, tal i com s'observava a les Figures 37 i 38 i es resumeix a la Figura 39. Aquesta dada suggeriria que, tot i trobar-se a diferents òrgans, existiria una relació entre el lligand que es reconeix a la melsa i al pàncrees, fet que faria possible que, un cop aquestes cèl.lules T entrassin al pàncrees o a la melsa des de la circulació, poguessin expandir-se perquè hi trobarien el mateix lligand o bé perquè presentarien un cert grau de promiscuïtat en el reconeixement dels complexos pMHC.



Figura 39. Comparació dels patrons qualitius de 13 i 14aa per a les seqüències CDR3-beta de les cèl.lules T intra-pancreàtiques, amb les expansions clonals de la melsa del donant diabètic. Els aminoàcids que amb una  $P < 0.05$  en una determinada posició del CDR3 es mostren en cada patró, valorant en concret la zona central N-D-N que es senyala amb negreta. Les expansions de la melsa concorden en varis aminoàcids de la zona N-D-N central amb el patró CDR3 del pàncrees corresponent per mida.

- ❖ Els resultats presentats fins aquí han estat recollits a la publicació, Codina-Busqueta et. al. "TCR bias of in vivo expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1 diabetes. J. Immunol. 2011, 186:3787-3797." que s'adjuta a l'Annex d'aquest treball.

## OBJECTIU V.

COMPARAR EL TCR DE LÍNIES I CLONS  
GENERATS *IN VITRO* A PARTIR DE L'INFILTRAT  
D'ILLOTS AMB LES DADES DE LES  
EXPANSIONS *IN VIVO* DEL PÀNCREES  
DIABÈTIC.



## OBJECTIU V.

COMPARAR EL TCR DE LÍNIES I CLONS GENERATS *IN VITRO* A PARTIR DE L'INFILTRAT D'ILLOTS AMB LES DADES DE LES EXPANSIONS *IN VIVO* DEL PÀNCREES DIABÈTIC.



A partir de treballs anteriors del nostre grup, disposàvem de línies i clons de cèl.lules T generades a partir de l'infiltrat total del pàncrees del diabètic T1. Es va determinar el repertori TCR de famílies gèniques TRAV i TRBV expressat per aquestes i es va comparar amb l'anàlisi de l'infiltrat detectat *in situ*.

Per a la generació d'aquestes línies, es va recollir el sobrenedant de l' incubació *overnight* dels illots de Langerhans purificats (DM-ISL) (mostra anomenada Lot3 en Somoza et al. [61]). Els limfòcits continguts en el sobrenedant es van anomenar de forma genèrica PB100 i es van expandir *in vitro* seguint dos protocols diferents generant d'aquesta manera dues línies parentals: PB100.L1 (L1 d'aquí a endavant), estimulada amb l'anticòs monoclonal contra CD3 soluble (OKT3), i PB100.L2 (L2 d'aquí a endavant), generada en presència d'extracte cru d'illots pancreàtics procedents de la digestió de teixit de pàncrees de donants sans. L'anticòs anti-CD3 s'usà com a mitògen policlonal esperant activar a totes les cèl.lules T simulant la via de senyalització pel TCR, mentre que l'ús d'extracte d'illots estava dirigit a l'expansió dels clons reactius a proteïnes, alguns d'ells possibles autoantígens. Ambdues línies es van créixer en presència d'interleucina 2 (IL-2). Per tant, amb aquestes dues aproximacions, es pretenia per una part mantenir l'especificitat de les cèl.lules expandides fent-les créixer en presència d'illots i per l'altra, expandint amb anti-CD3, mantenir al màxim la informació en forma de repertori original present a l'infiltrat.

Finalment, seguint el mateix protocol d'expansió es va fer un semiclonatge de cadascuna de les línies i es van obtenir una sèrie de línies oligoclonals i clons. Les línies derivades de L1 es van anomenar amb un nombre (p.ex. PB100.29), mentre les derivades de la línia L2 la numeració estava acompanyada d'una "i" (p.ex. PB100.20i).

Per l'anàlisi del repertori de TCR s'escolliren, a més de les línies parentals L1 i L2, 9 línies oligoclonals expandides amb anti-CD3 i 12 expandides amb illots. Com a control de la retrotranscripció i per valorar la qualitat del cDNA de cada mostra es va fer l'amplificació de la GAPDH (glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase; enzim catalític implicat en la glicòlisi i d'expressió ubíqua). Primer, es va determinar per PCR *multiplex* les famílies TRAV i TRBV expressades i posteriorment es va determinar per genotipatge (*spectratyping*) la clonalitat de cada banda amplificada.

### **5.1. Repertori TRAV i TRBV expressat per les línies parentals L1 i L2**

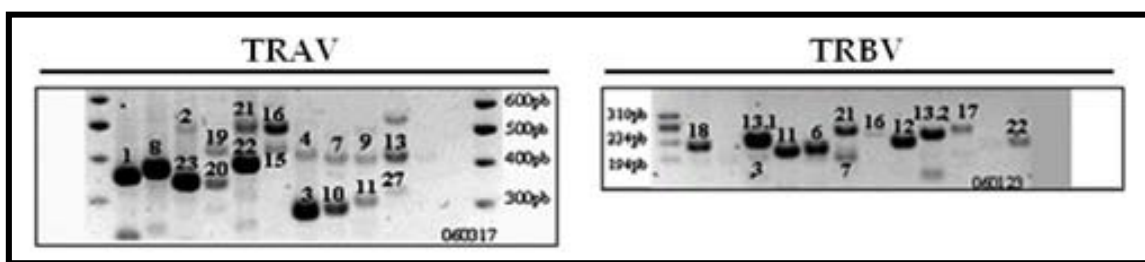
Aquest apartat descriu el repertori de TRAV i TRBV expressat per les línies parentals L1 i L2 que s'expandiren amb anti-CD3 o extracte cru d'illots, respectivament. Després de dues tandes inicials d'estimulació en presència de *feeders* autòlegs irradiats (esplenòcits i la línia LCL obtinguda de la transformació amb el virus d'Epstein-Barr dels esplenòcits del donant), van ser crescudes en presència de *feeders* al·logènics i LCL autòloga irradiats, i sempre amb el medi suplementat amb IL-2 a 20U/ml i el respectiu estímul (anti-CD3 o extracte d'illots).



### 5.1.1. Repertori de famílies TRAV i TRBV i clonalitat de la línia parental L1.

L'anàlisi de les famílies TRAV i TRBV expressades per la línia L1 va mostrar que tal com s'esperava era una línia policlonal, tot i que no hi eren expressades totes les famílies de cada cadena (**Figura 40**).

#### TCR de la línia parental L1

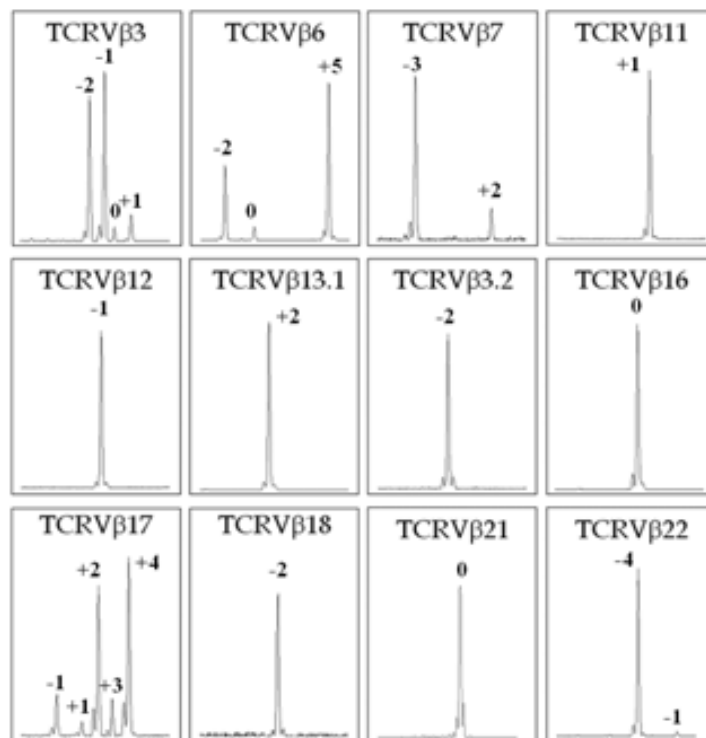


**Figura 40.** Repertoris TRAV i TRBV de l'expansió L1, amb anti-CD3, a partir dels limfòcits intra-pancreàtics obtinguts del cultiu o/n dels illots purificats. Amplímer de RT-PCR en gel d'agarosa d'alta resolució. Sobre cada banda s'indica la família  $V\alpha$  i  $V\beta$  identificada en cada cas segons la nomenclatura de Chitnis et al. en *Manual of Clinical Lab. Immunol.* 2002.

L'elevat nombre de famílies expressades per la línia L1 suggeria una gran variabilitat però no revelava si les bandes amplificades eren producte d'un únic CDR3 o, pel contrari, contenien més d'un reordenament. Per tal de determinar si les bandes d'amplificació obtingudes provenien o no d'expansions monoclonals, es va fer el genotipatge de cadascuna de les bandes de les famílies TRBV amplificades. La **Figura 41** mostra el repertori de polimorfismes de mida de CDR3, corresponent a cadascuna de les famílies TRBV. El 67% (8 sobre 12) de les famílies TRBV amplificades ( $V\beta 11$ ,  $V\beta 12$ ,  $V\beta 13.1$ ,  $V\beta 13.2$ ,  $V\beta 16$ ,  $V\beta 18$ ,  $V\beta 21$  i  $V\beta 22$ ) expressades en la mostra L1 mostraven un patró indicatiu de possible monoclonalitat, mentre que de les 4 restants  $V\beta 3$ ,  $V\beta 6$  i  $V\beta 7$  semblaren oligoclonals i  $V\beta 17$  fou la família que es mostrà més policlonal.

El nombre de clons infiltrants detectats en l'expansió L1 es mostrà reduït a nivell de varietat clonal. A diferència de lo esperat, l'activació via CD3 hauria afavorit el creixement dels clons més dominants i en conseqüència L1 mostraria un repertori limitat. Aquest resultat es va contrastar amb l'estudi realitzat en paral·lel del segon sistema d'expansió, L2 amb extracte d'illots (veure més endavant).

*PB100.L1*



**Figura 41. Anàlisi del nivell de monoclonalitat de les famílies Vβ presents a la línia L1.** Representacions gràfiques del genotipatge de les 12 TRBV expressades per la mostra L1, on s'observà que Vβ11, Vβ12, Vβ13.1, Vβ13.2, Vβ16, Vβ18, Vβ21 i Vβ22 presentaven un sol pic, indicant monoclonalitat, mentre que Vβ3, Vβ6 i Vβ7 eren oligoclonals i Vβ17 policlonal. La numeració dels pics era establerta en comparació respecte al pic 0 central en dos PBMCS de donants sans.

5.1.2. Repertori de famílies TRAV i TRBV i clonalitat de la línia parental L2.

Seguint el mateix protocol, es van amplificar les famílies TRAV i TRBV expressades per la línia L2 (Figura 42).

TCR de la línia parental L2

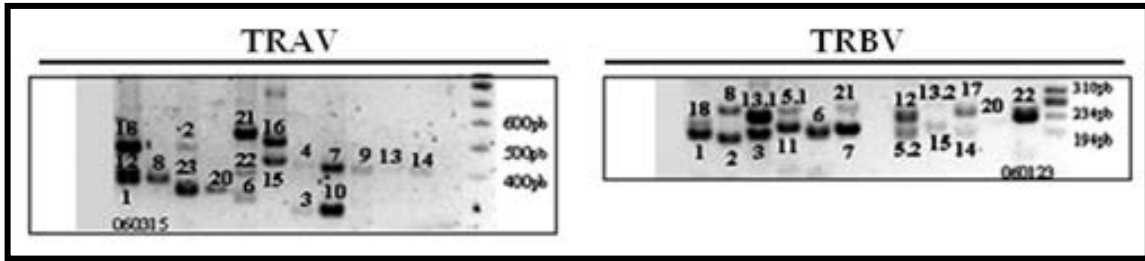


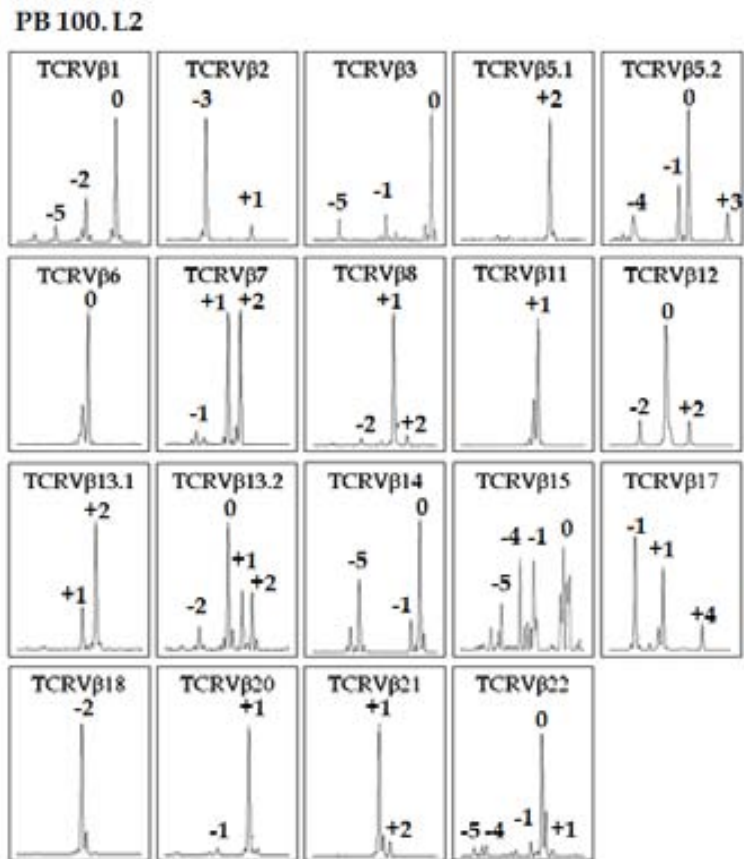
Figura 42. Repertoris TRVA i TRVB de la expansió L2 amb extracte cru d'illots purificats de la digestió de donants sans. Repertori de les famílies amplificades per PCR- multiplex, en gel d'agarosa d'alta resolució. Sobre cada banda s'indica la família V $\alpha$  i V $\beta$  identificada en cada cas, segons la nomenclatura de Chitnis et al. en *Manual of Clinical Lab. Immunol.* 2002.

Al comparar els patrons de famílies expressat per L1 i L2, es va veure que en L2 el repertori de famílies TRBV era més divers (Taula 8), suggerint que la presència d'extracte proteic en les re-estimulacions podria haver afavorit el manteniment d'especificitats no observades en el cultiu amb anti-CD3, com és el cas de les famílies V $\beta$ 1, V $\beta$ 2, V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 5.2, V $\beta$ 8, V $\beta$ 14, V $\beta$ 15, V $\beta$ 20. Només, la família V $\beta$ 16 no es detectava a L2 però sí a L1.

V $\alpha$		V $\beta$	
PB100.L1	PB100.L2	PB100.L1	PB100.L2
1	1	-	1
2	2	-	2
3	3	3	3
4	4	-	5.1
-	6	-	5.2
7	7	6	6
8	8	7	7
9	9	-	8
10	10	11	11
11	-	12	12
-	12	13.1	13.1
13	13	13.2	13.2
-	14	-	14
15	-	-	15
16	16	16	-
-	18	17	17
19	-	18	18
20	20	-	20
21	21	21	21
22	22	22	22
23	23		
-	25		
27	-		
18 bandes	19 bandes	12 bandes	19 bandes

Taula 8. Resum de les famílies V $\alpha$  i V $\beta$  amplificades en les línies L1 i L2.

L'anàlisi del polimorfisme en longitud del CDR3 de les famílies amplificades va mostrar més policlonalitat que la observada per L1. Només 4 de les 19 famílies amplificades (V $\beta$ 5.1, V $\beta$ 6, V $\beta$ 11 i V $\beta$ 18) mostraven un únic pic de genotipatge, mentre que 4/19 (V $\beta$ 2, V $\beta$ 13.1, V $\beta$ 20, V $\beta$ 21) mostraven dos reordenaments i la resta (V $\beta$ 1, V $\beta$ 3, V $\beta$ 5.2, V $\beta$ 7, V $\beta$ 8, V $\beta$ 12, V $\beta$ 13.2, V $\beta$ 14, V $\beta$ 15, V $\beta$ 17 i V $\beta$ 22) tres o més reordenaments per família (**Figura 43**). Aquests resultats van confirmar que el cultiu amb l'extracte d'illots havia mantingut un repertori més divers, que podria ser més representatiu de l'infiltrat intrapancreàtic original.



**Figura 43. Genotipatge de la mostra PB100.L2 expandida amb extracte cru d'illots pancreàtics.**

Cada pic correspon a un amplímer de mida determinada en parells de bases, corresponent a la del mida CDR3. En negreta es numera els pics que podien relacionar-se amb expansions clonals.

## 5.2. Repertori TRAV i TRBV expressat per les línies oligoclonals i clons obtinguts a partir de les línies L1 i L2 .

5.2.1. TCR i genotipatge de les línies oligoclonals obtingudes del clonatge a partir de la expansió parental L1.

La línia L1 es va usar per fer un semiclonatge de 30, 10<sup>5</sup>, i 1 c/w. Només es va obtenir creixement en pouets de les 3 primeres dilucions. Per fer l'estudi del repertori del TCR es van escollir 9 de les línies oligoclonals obtingudes, la seva corresponent identificació dels TCR es mostra a la **Figura suplementària 5** i les dades es resumeixen a la **Taula 9**.

Tot i que les línies provenien de semiclonatges, la majoria d'elles expressen un nombre limitat de famílies TRAV i TRBV. Com s'observa a la **Taula 9** (i la **Figura suplementària 5**), excepte les línies 100.2, i 100.32, les quals amplificaven 4 famílies alfa i 4 beta, la resta estaven formades per una o dues famílies de cada cadena. Totes les línies expressaven famílies presents a la L1, excepte 100.11 i 100.5 que expressaven les famílies V $\beta$ 5.1 i V $\beta$ 2 no detectables a L1.

Seguint el mateix protocol experimental, es va realitzar el genotipatge de les línies oligoclonals per comparar el reordenament de les famílies amb el de la línia L1.

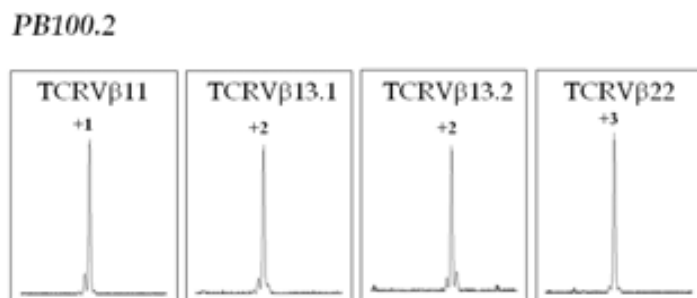
Expansió per sub-clonatge amb  $\alpha$ -CD3 de la línia parental L1.

<u>Mostra</u>	<u>V<math>\beta</math></u>		<u>V<math>\alpha</math></u>
	<u>Família V<math>\beta</math></u>	<u>Pic spectratyping</u>	<u>Família V<math>\alpha</math></u>
<i>Línia parental</i>	VB11	+1	VA1
100. L1	VB12	-1	VA10
	VB13.1	+2	VA11
	VB13.2	-2	VA13
	VB16	0	VA16
	VB17	-1 +1 +2 +3 +4	VA19
	VB18	-2	VA2
	VB21	0	VA20
	VB22	-4 -1	VA21
	VB3	-2 -1 0 +1	VA22
	VB6	-2 0 +5	VA23
	VB7	-3 +2	VA25
			VA27
			VA3
			VA4
			VA7
			VA8
			VA9
100.11	VB18	-2	VA1
	VB5.2	-4 0	VA8
100.2	VB11	+1	VA1
	VB13.1	+2	VA16
	VB13.2	+2	VA21
	VB22	+3	VA22
100.20	VB13.1	+3	VA15
	VB6	+2	VA8
100.29	VB11	+1	VA1
	VB13.1	+2	VA22
100.5-24.12	VB2	-3	VA9
			VA11
100.7	VB13.1	+2	VA1
	VB18	-2	VA8
100.8	VB11	+1	VA1
	VB13.1	+2	VA22
100.32	VB2	+1	VA1
	VB11	+1	VA4
	VB13.1	+2	VA13
	VB18	-2	VA22
100.9-24.12	VB11	+1	VA1
	VB13.1	+2	VA22

Taula 9. Recull de dades de la identificació TRAV, TRBV i mides de reordenament (genotipatge) per a les línies oligoclonals generades *in vitro* amb anti-CD3, a partir de l'extracte original del pàncrees diabètic T1. La identificació de les famílies V $\alpha$  i V $\beta$ , realitzada per PCR multiplex, s'indica en nomenclatura de Chitnis et al. (*Manual of Clinical Lab. Immunol*, 2002). S'indica numèricament (de -5 a +5) la mida del pic de genotipatge per a cada família V $\beta$ . En gris es remarquen els valors corresponents a les expansions originals de la línia cel·lular paterna L1. La resta de dades corresponen a les diferents línies obtingudes de l'oligoclonatge d'L1. S'observà alguns valors especialment repetitius, com serien el pic +1 d'V $\beta$ 11 i el +2 d'V $\beta$ 13.1. A més, aquestes famílies estaven combinades amb V $\alpha$ 1 i V $\alpha$ 22.

Les línies oligoclonals tot i estar formades per dues, la majoria, fins a 4 famílies diferents representaven un repertori clonal molt restringit. Tal com mostra l'exemple de la **Figura 44**, cadascuna de les famílies expressades a la línia PB100.2 estaven constituïdes per un únic reordenament.

A més, la majoria de pics descrits en les línies oligoclonals eren presents a la línia L1. Aquest resultat queda reflexat en el cas del 100.2 on els pics V $\beta$ 11(+1), V $\beta$ 13.1(+2) i V $\beta$ 13.2(-2) es troben a la L1, mentre que V $\beta$ 22(+3) hi és absent. Aquestes dades suggereixen un efecte de dilució de determinats clons a la línia L1 a conseqüència de les repetides restimulacions al clonar i que s'haurien conservat en les línies semiclonaals.



**Figura 44.** Imatge dels pics ontinguts del genotipatge de 100.2, una línia procedent del clonatge d'L1. Cada pic correspon a una mida determinada de reordenament CDR3. Sobre els pics que poden ser considerats expansions clonals s'ha indicat la numeració en relació al pic 0 dels PBMCS control. Veiem que cadascuna de les famílies V $\beta$  presents, era constituïda per un sol clon, tal com s'esperava. Els pics corresponents a les famílies V $\beta$ 11 i V $\beta$ 13.1 coincidien amb els de la línia parental L1. En canvi V $\beta$ 13.2 i V $\beta$ 22 no es trobaven a L1, suggerint un efecte dilució durant el seu creixement.

5.2.2. TCR i genotipatge de les línies oligoclonals obtingudes del clonatge a partir de la expansió parental L2.

La línia L2 es va usar per a fer un semiclonatge amb dilucions de 300, 100, 30 i 10 c/w ja que el cultiu creixia amb menys eficiència en aquestes condicions d'estimulació. Per l'anàlisi del repertori es van escollir 12 línies que estan representades a **la Taula 10 i la Figura suplementària 6**.

L'anàlisi de les 12 línies va mostrar que la majoria eren oligoclonals: 5/12 expressaven 2 famílies alfa i dues beta, mentre que 5/12 expressaven 3 o més famílies per cada cadena. Només 100.3i i 100.48i semblaven ser un clon ja que expressaven un TCR format per  $V\alpha 23-V\beta 14$  i  $V\alpha 17-V\beta 13.1$  respectivament. (**Taula 10 i Fig. suplementària 6**).

Com en l'estudi de l'expansió L1, també en L2 s'analitzà per genotipatge els diferents amplimers de les línies oligoclonals. Paral·lelament als resultats obtinguts amb la línia L1, s'observà que tot i haver-hi més famílies expressades, la majoria tenien 1 o 2 reordenaments i que aquestes estaven presents en les famílies amplificades a la línia parental L2. Tot i així, s'observaren també famílies amb pics de genotipatge absents a L2 que podrien ser deguts al factor dilució en la línia parental.



Expansió per sub-clonatge amb  $\alpha$ -CD3 de la línia parental L2.

Mostra	V $\beta$		V $\alpha$
	Família V $\beta$	Pic spectratyping	Família V $\alpha$
Línia parental	VB1	-5 -2 0	VA1
100.L2	VB11	+1	VA10
	VB12	-2 0 +2	VA12
	VB13.1	+1 +2	VA13
	VB13.2	-2 0 +1 +2	VA14
	VB14	-5 -1 0	VA16
	VB15	-5 -4 -1 0	VA18
	VB17	-1 +1 +4	VA2
	VB18	-2	VA20
	VB2	-3 +1	VA21
	VB20	-1 +1	VA22
	VB21	+1 +2	VA23
	VB22	-5 -4 -1 0 +1	VA25
	VB3	-5 -1 0	VA3
	VB5.1	+2	VA4
	VB5.2	-4 -1 0 +3	VA6
	VB6	0	VA7
	VB7	-1 +1 +2	VA8
	VB8	-2 +1 +2	VA9
100.16i	VB11	+1	VA4
	VB13.1	0 +3	VA10
	VB2	-3	VA22
	VB7	0	
100.20i	VB11	+1	VA1
	VB13.1	+2	VA4
	VB2	-3	VA18
	VB3	-1	VA22
	VB5.2	-1	
	VB6	-3	
	VB9	+1	
100.21i	VB11	-4 +1	VA6
	VB18	-2	VA17
	VB21	+2	VA23
100.22i	VB11	+1	VA1
	VB13.1	+2	VA22
100.2i	VB11	0	VA2
	VB2	+1	VA8
100.30i	VB11	+1	VA23
	VB13.1	+2	
	VB5.1	-1	
	VB7	-2 +1 +2 +4 +5	
100.38i	VB13.1	-1	VA2
	VB13.2	-1	VA18
100.3i	VB14	-5	VA23
100.3i-24.12	VB11	+1	VA18
	VB12	-1 +1 +5	VA8
	VB13.1	+2	VA11
	VB17	0	VA22
	VB2	-3	VA23
	VB22	0 +5	
	VB6	-2	
100.48i	VB13.1	+3	VA17
100.56i	VB11	+1	VA1
	VB13.1	+2	VA22
100.5i	VB11	-1	VA9
	VB3	+2	VA27

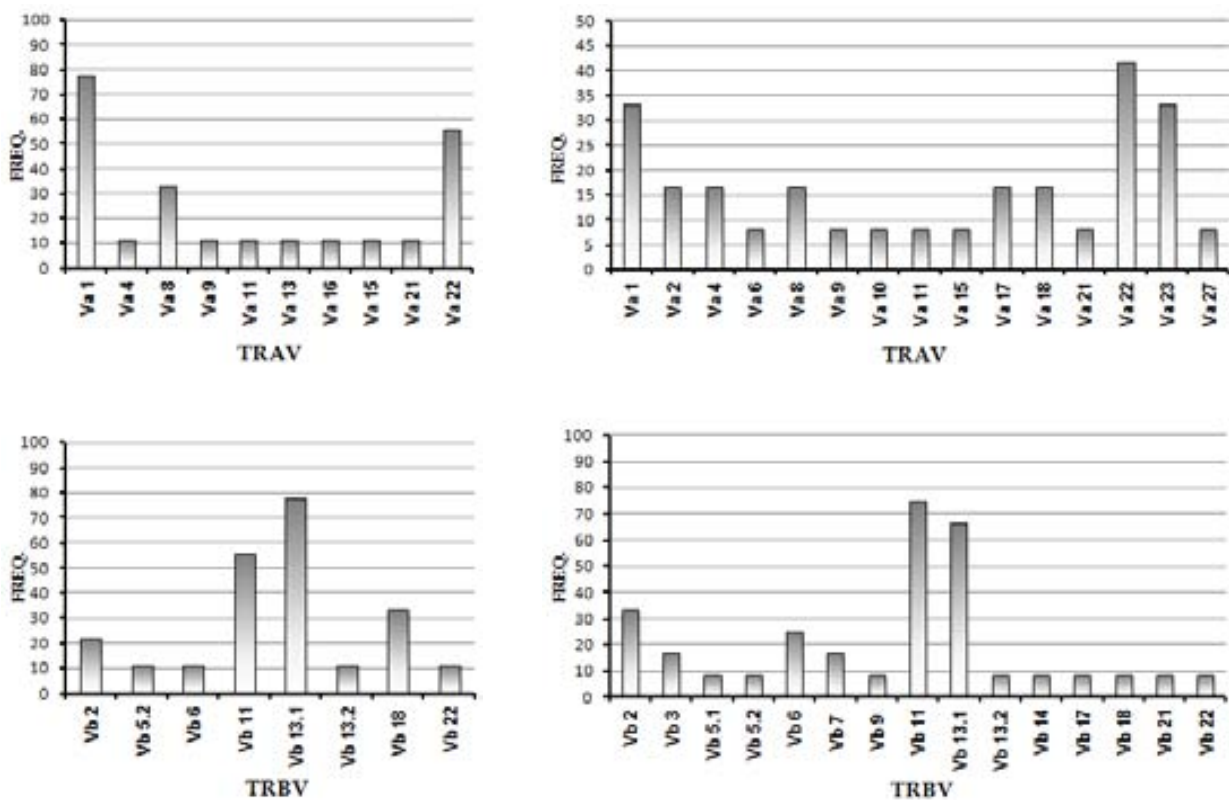
Taula 10. Recull de dades de la identificació TRAV, TRBV i mides de reordenament (genotipatge) per a les línies oligoclonals generades *in vitro* amb extracte d'illots, a partir de l'extracte original del pàncrees diabètic T1. La identificació de les famílies V $\alpha$  i V $\beta$ , realitzada per PCR *multiplex*, s'indica en nomenclatura de Chitnis et al. (*Manual of Clinical Lab. Immunol*, 2002). S'indica numèricament (de -5 a +5) la mida del pic de genotipatge per a cada família V $\beta$ . En gris es remarquen els valors corresponents a les expansions originals de la línia cel.lular paterna L2. La resta de dades corresponen a les diferents línies obtingudes de l'oligoclonatge d'L2. S'observà alguns valors especialment repetitius, com serien el pic +1 d'V $\beta$ 11 i el +2 d'V $\beta$ 13.1. A més, aquestes famílies estaven combinades amb V $\alpha$ 1 i V $\alpha$ 22.

### 5.3. Comparació de les línies oligoclonaals obtingudes de L1 i L2

A nivell de repertori TRAV/TRBV, la expansió amb extracte d'illots (L2) va ser considerada la millor opció ja que va mantenir més la diversitat del cultiu inicial. A nivell de les línies oligoclonaals expandides, aquesta particularitat es mantenia tant per  $V\alpha$  com per  $V\beta$ , com mostra la **Figura 45**. No obstant, quan es va analitzar la freqüència (en %) de les famílies expressades en el total de les línies oligoclonaals procedents de L1 i L2 s'observà una predominança coincident de determinades famílies:  $V\alpha 1$  i  $V\alpha 22$  per la cadena alfa i  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$  per la cadena beta.

#### A) Subclonatge de L1

#### B) Subclonatge de L2



**Figura 45.** Representació gràfica de la freqüència (%) d'aparició de cadascuna de les famílies  $V\alpha$  i  $V\beta$  a les línies oligoclonaals i clons obtinguts a partir d'L1 i L2. A) Repertoris TRAV i TRBV de les mostres procedents d'L1. B) Repertoris TRAV i TRBV de les mostres procedents d'L2. Es va observar major freqüència de les famílies  $V\alpha 1$  i  $22$  i  $V\beta 11$  i  $13.1$  tant a les línies i clons obtinguts del protocol d'expansió amb anti-CD3 com del d'extracte d'illots. De L2 destaca també  $V\alpha 23$ .

5.3.1. Anàlisi de la freqüència d'expressió  $V\alpha 1$ ,  $V\alpha 22$ ,  $V\beta 11$ ,  $V\beta 13.1$

La predominança de les famílies  $V\alpha 1$ ,  $V\alpha 22$ ,  $V\beta 11$ ,  $V\beta 13.1$  a les línies oligoclonals generades tan amb un com altre protocol d'expansió, es va analitzar considerant la coexpressió de famílies gèniques TRBV, **Taula 11**. Sorprenentment, l'associació més freqüent fou  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$ , es a dir, aquestes dues famílies es mostraven coexpressades en molt més alta freqüència (11 de 22 línies oligoclonals) que qualsevol altra correlació.

	2	3	5.1	5.2	6	7	9	11	12	13.1	13.2	16	17	18	20	21	22
VB2																	
VB3	1																
VB5.1																	
VB5.2	1	1															
VB6	2	1		1													
VB7	1		1														
VB9	1	1		1	1												
VB11	5	2	1	1	2	2	1										
VB12	1				1				1								
VB13.1	4	1	1	1	3	2	1	11	1								
VB13.2								1		2							
VB16																	
VB17	1				1			1	1	1							
VB18	1			1				2	2								
VB20																	
VB21								1							1		
VB22	1				1			2	1	2	1			1			

Una alta dada rellevant era que la mida del pic de genotipatge de cadascuna de les famílies TRBV era el mateix en totes les línies analitzades que s'expressaven  $V\alpha 1$ ,  $V\alpha 22$ ): +1 per  $V\beta 11$  i +2 per  $V\beta 13.1$  (**Taules 9 i 10**).

**Taula 11. Coexpressió de famílies  $V\beta$  identificades en les diferents línies oligoclonals d'L1 i L2. S'indica a l'eix de les ordenades i les abscises cadascuna de les famílies TRBV que han tingut representació en les diferents mostres analitzades, la graella mostra el nombre de vegades que apareix una  $V\beta$  en companyia d'altra. S'observà clara correlació entre les famílies  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$ , les quals apareixien juntes més del doble de vegades que qualsevol de les altres.**

Aquesta coexpressió de 4 famílies amb un únic reordenament plantejava dues hipòtesis:

a) Que les línies oligoclonals estiguessin formades per dos clons cadascun amb un reordenament únic per cada cadena, però, és molt improbable que en el 50% de les línies, dues cèl·lules T hagin clonat sempre juntes

b) Que un únic clon que expressés a nivell de missatger, dos reordenaments per cada cadena alfa i beta. Aquesta hipòtesi podria explicar-se pel mecanisme d'exclusió al·lèlica: el reordenament improductiu d'una cadena hauria induït el de l'altra. Per tant, tot i haver-hi missatger per 4 cadenes (dues alfa i dues beta), només una de cada arribaria a sintetitzar-se com a proteïna. Per altra banda, si realment cap d'ells fos un reordenament aberrant, es podria plantejar la possibilitat d'un clon amb més d'un TCR expressat a la membrana.

Un 30% de les cèl·lules en perifèria expressen un doble TCR en humans i ratolins, i aquesta freqüència s'incrementa amb l'edat. Varis treballs han involucrat aquest tipus de cèl·lules amb autoimmunitat (veure l'apartat introducció), ja que la selecció tímica hauria permès la selecció de la cèl·lula per un dels TCRs expressats, mentre que l'altre podria ser autorreactiu i haver escapat de la selecció negativa.

### 5.3.2. Seqüenciació V $\alpha$ 1, V $\alpha$ 22, V $\beta$ 11, V $\beta$ 13.1

Per poder donar resposta a aquestes dues possibilitats, es va seqüenciar els amplimers obtinguts per RT-PCR de les 4 famílies gèniques en dues línies oligoclonals: 100.29 que procedia del sistema d'expansió amb anti-CD3 i que només amplificava aquestes 4 famílies i 100.20i que fou generat en presència d'extractes d'illots i que era més policlonal ja que amplificava altres famílies a més d'aquestes (veure **Taules 9 i 10**). La seqüenciació de la zona V a C per a les famílies V $\beta$ 11, V $\beta$ 13.1, V $\alpha$ 1 i V $\alpha$ 22, ens permetria establir la identitat clonal de les dues línies 100.29 i 100.20i i alhora avaluar la possibilitat de la coexpressió d'aquestes dues cadenes alfa i beta del TCR en una mateixa cèl·lula.

Es va confirmar que en tots els casos que la família amplificada coincidís amb la seqüència publicada en EMBL i es va comprovar l'organització i validesa dels reordenaments de cadascuna de les famílies gèniques.

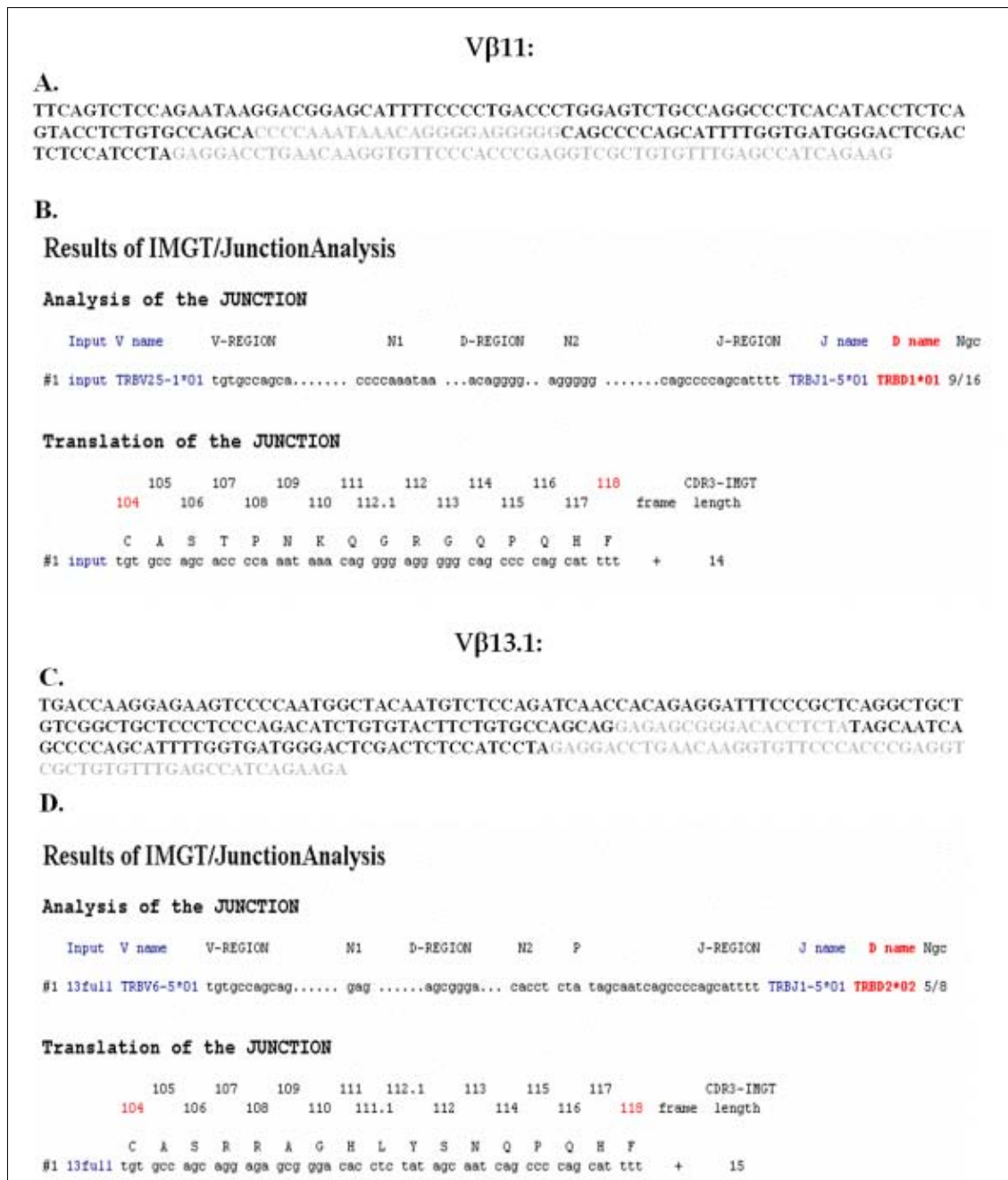
#### 5.3.2.1. Seqüències $V\beta 11$ i $V\beta 13.1$

L'anàlisi de la regió CDR3 dels amplímers  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$  va mostrar que la unió de fragments V-D-J generava un reordenament "productiu" (segons les normes especificades per Lefranc et. al. [1]), ja que les seqüències seguien una pauta de lectura correcta, sense generació de codons d' STOP, ni aparent defecte en els *splicings*, ni la recombinació dels fragments, i per tant, suggerint que hi hauria expressió de la proteïna. A la **Figura 46** es mostren les seqüències obtingudes per  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$  i el resultat de la identificació *online* de cadascuna.

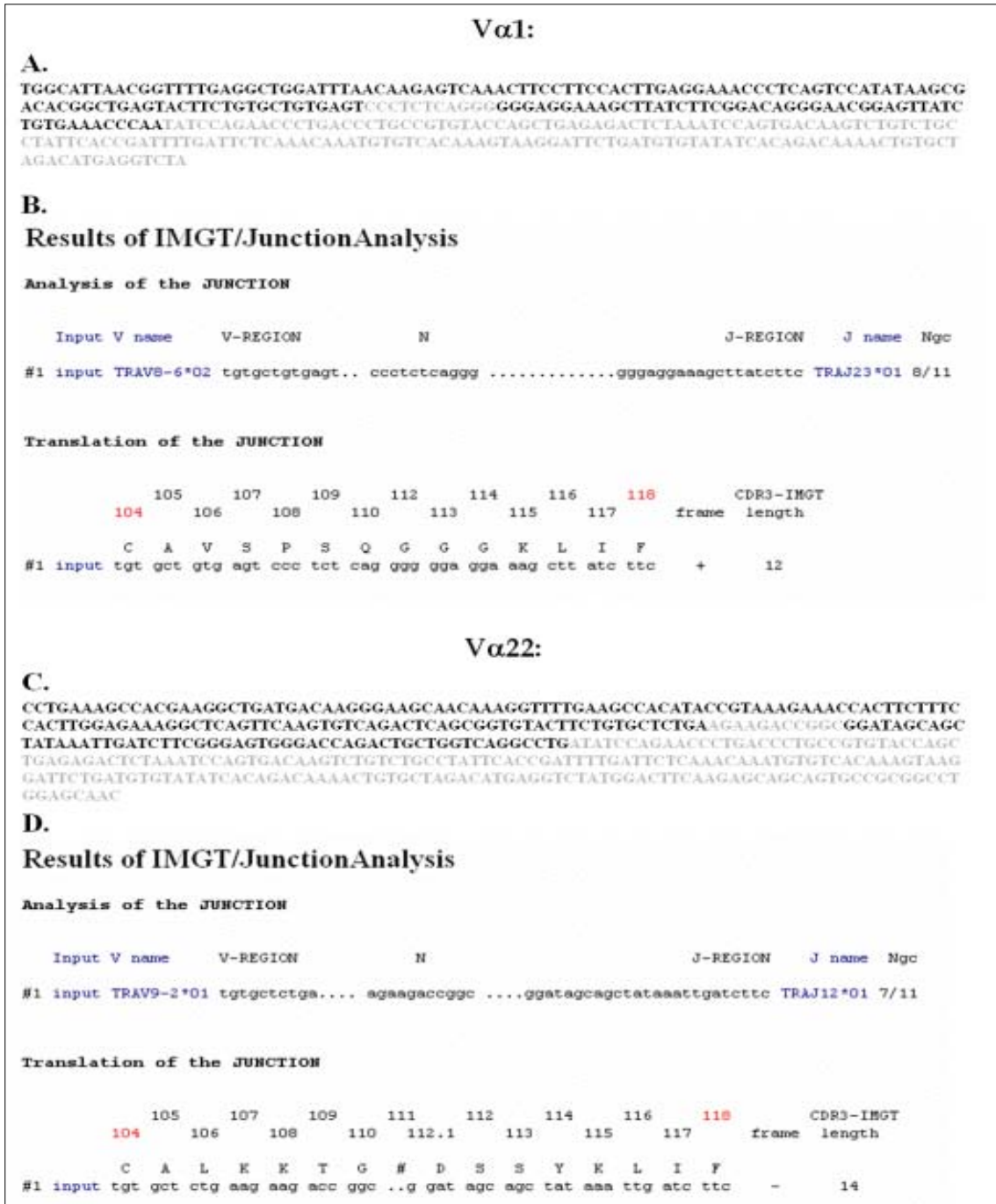
Per tant, l'anàlisi de la seqüència no mostrà cap evidència en contra de la possibilitat que les dues cadenes  $V\beta$  es coexpressin i que, en combinació amb les cadenes  $V\alpha$ , hi pugui haver l'expressió de més d'un TCR en aquestes cèl.lules.

#### 5.3.2.2. Seqüències $V\alpha 1$ i $V\alpha 22$

De la mateixa manera, es van seqüenciar les famílies  $V\alpha 1$  i  $V\alpha 22$  amplificades de les mostres PB100.29 i PB100.20i. L'anàlisi de les seqüències obtingudes va corroborar que els gens  $V\alpha$  identificats corresponien a les famílies descrites a la RT-PCR. L'anàlisi de les unions en CDR3 (**Figura 47C** i **47E**), mostrà un reordenament normal i productiu en la seqüència de  $V\alpha 1$ . Pel contrari, l'anàlisi de la seqüència de  $V\alpha 22$  va mostrar l'existència d'un corriment en la pauta de lectura a la zona del CDR3, que generava l'aparició d'un codó STOP que impediria la traducció d'aquesta cadena.



**Figura 46. Seqüenciació de l'amplímer de Vβ11 i Vβ13.1.** A) Seqüència obtinguda de l'amplímer Vβ11 en les mostres 100.29 i 100.22i. (de seqüència idèntica). S'ha remarcat en negreta les parts corresponents a les zones V i J i en gris el CDR3 i la part corresponent a la regió constant. B) Resultat de l'anàlisi amb l'eina online "V-Query" d'IMGT (<http://imgt.cines.fr>) dut a terme sobre la seqüència Vβ11, que es va identificar com TRBV25-1 amb TRBVJ1-5 en la nomenclatura actual d'IMGT. C) Seqüència obtinguda de l'amplímer Vβ13.1 en les mostres 100.29 i 100.22i. D) Resultat de l'anàlisi "V-Query" sobre la seqüència de Vβ13.1, que es va identificar com TRBV6-5 i TRBJ1-5.



**Figura 47. Seqüenciació de l'amplímer Vα1 i Vα22. A)** Seqüència obtinguda de l'amplímer Vα1 en les mostres 100.29 i 100.22i. (de seqüència idèntica). S'ha remarcat en negreta les parts corresponents a les zones V i J i en gris el CDR3 i la part corresponent a la regió constant. **B)** Resultat de l'anàlisi amb l'eina online "V-Query" d'IMGT (<http://imgt.cines.fr>) dut a terme sobre la seqüència Vα1, que es va identificar com TRAV8-6 amb TRAJ23 en la nomenclatura actual d'IMGT. **C)** Seqüència obtinguda de l'amplímer Vα22 en les mostres 100.29 i 100.22i. **D)** Resultat de l'anàlisi "V-Query" sobre la seqüència Vα22, que es va identificar com TRAV9-2 i TRAJ12.

Així, doncs, en el cas de la cadena alfa s'obtingueren dades que suggerien l'expressió d'una sola de les cadenes. En canvi, la seqüenciació no va aportar evidències clares sobre la possible traducció d'una o de les dues cadenes beta. Per tant, deixava oberta la possibilitat de l'expressió d'un únic receptor  $V\alpha 1-V\beta 11$  o  $V\alpha 1-V\beta 13.1$  per cèl.lula o bé l'expressió dels dos TCRs en una mateixa cèl.lula. La següent aproximació que es va plantejar fou analitzar si aquestes línies expressaven la proteïna mesurant l'expressió de les cadenes  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$  per citometria de flux.

### 5.3.3. Anàlisi per citometria de flux

L'expressió de les famílies  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$  es va determinar per citometria de flux a partir de la tinció doble amb anticossos específics.

A més de les línies 100.20i i 100.29, es va escollir la línia 100.21i que expressava  $V\beta 11$ , però no  $V\beta 13.1$ ,  $V\alpha 1$  ni  $V\alpha 22$  i que el pic representant en *spectratyping* era de mida diferent al de la  $V\beta 11$  de les línies 100.29 i 100.20i, suggerint que provenia d'un reordenament diferent (**Taula 10**).

Les dades obtingudes per citometria es mostren a la **Figura 48**, on s'observa que les línies 100.29 i 100.20i, tot i transcriure l'mRNA de  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$ , només són positives per  $V\beta 13.1$ . Pel contrari, la línia PB100.21, que presentava una mida de reordenament per  $V\beta 11$  diferent a la de 100.29 i 100.20i, resultà positiva per  $V\beta 11$  (**Figura 48**). Aquests resultats suggereixen que el reordenament que comparteixen 100.29 i .20i i no 100.21i, estaria associat amb l'absència de proteïna. La tinció intracitoplasmàtica amb els mateixos anticossos, permeabilitzant les cèl.lules amb saponina, no va mostrar que  $V\beta 11$  s'acumulés en el citoplasma. Tot i així, no es podria excloure que la cadena es sintetitzi i que per problemes de plegament, estabilitat, etc., s'acumuli al citoplasma amb una conformació diferent i s'hagi perdut l'epítop.



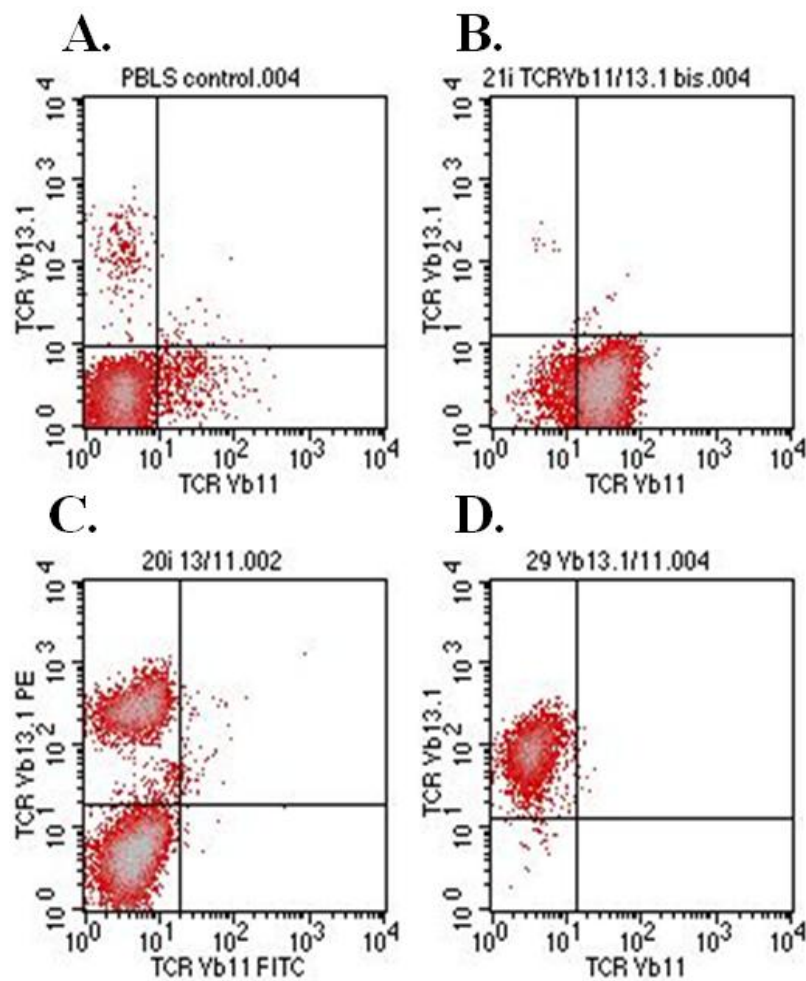


Figura 48. Anàlisi de l'expressió de Vβ11 i Vβ13.1 per citometria de flux. L'eix X representa la tinció amb l'anticòs per Vβ11 i l'eix Y la tinció amb l'anticòs per Vβ13. **A)** Mostra de PBMCs d'un donant sa, on es detecten cèl.lules T Vβ11+ i Vβ13+. **B)** Línia oligoclonal 100.21i amb reordenament (-4) i (+1) per Vβ11 però sense Vβ13.1. **C)** Línia oligoclonal 100.20i amb reordenament per Vβ11(+1) i Vβ13.1(+2). No s'observa tinció específica per Vβ11. **D)** Marcatge de la línia 100.29, presenta els reordenaments Vβ11(+1) i Vβ13.1(+2) i s'observa el mateix resultat que amb la línia PB100.20i, absència de marcatge amb l'anticòs Vβ11.

#### 5.4. Comparació del clon de TCR dual aïllat *in vitro* amb la restricció de regions $\beta$ -CDR3 establerta *in vivo* al pàncrees del diabètic T1.

Els clons expandits *in vitro* de TCR  $V\alpha 1$ ,  $V\beta 11(+1)/V\beta 13.1(+2)$ , que comparteixen les línies 100.29, 100.8, 100.9-2412, 100.56i, també s'identificaven en cultius més policlonals com 100.2, 100.32 i 100.20i on, tot i estar acompanyades d'altres  $V\alpha$  i  $V\beta$ , s'hi trobava aquesta combinació incloent la cadena  $V\alpha 22$  la qual hem vist que no s'expressaria. L'elevada freqüència d'aquest clon entre les cèl.lules expandides a partir de l'infiltrat suggeria que fos un clon originalment majoritari en el material de partida, tot i no ser una expansió monoclonal, o que hagués estat afavorit per la metodologia usada en l'expansió.

Una dada important era que, la seqüència CDR3  $V\beta 11(+1)$  <CASTPNKQGRGQPQHF> d'aquest clon amb TCR dual, es trobava també entre les seqüències *in vivo* obtingudes del digerit total del pàncrees diabètic (veure  $V\beta 11$  en la **Taula suplementària 2**). I el fet que en canvi aquesta seqüència no aparegués a l'extracte dels illots purificats (veure  $V\beta 11$  en la **taula suplementària 1**) suggeria que el clon provingués originalment de l'infiltrat al voltant dels illots.

Finalment, es va comparar la seqüència CDR3 de les cadenes  $V\beta 11$  i  $V\beta 13.1$  del clon *in vitro*, amb els patrons definits al Capítol IV pels residus estadísticament significatius en cadascuna de les posicions de l'NDN de l'infiltrat pancreàtic *in vivo* (veure les **Figures 35-38**) i s'observà les següents coincidències:

› El CDR3 de la seqüència V $\beta$ 11 del clon, de 14aa, mostrava coincidència amb el patró de mida corresponent deduït de l'anàlisi qualitatiu (veure la **Figura 49A**), ja que en la posició 7 conservava la **Q** tant característica de la restricció per a seqüències de 14aa i també mantinguda a la expansió natural *in vivo* V $\beta$ 22 detectada al pàncrees i la melsa del pacient diabètic T1 (**Taula 5**).

› El CDR3 de la seqüència V $\beta$ 13.1 del clon, de 15aa, tot i no tenir un patró definit *in vivo* per aquesta mida, degut a la flexibilitat del *loop* CDR3 es va comparar amb el patró de 13 aminoàcids, amb el qual presentà certa similitud per la presència de R a l'inici N-ter i Y i N a la part final C-ter de l'NDN. (**Figura 49B**).

#### A) Semblança del CDR3 V $\beta$ 11 amb el patró de 14aa de l'infiltrat pancreàtic.

TRBV: **V $\beta$ 11** No reconegut en superfície.

Posició:            1   2   3   4   5   6   7   8   9   10   11   12   13   14   aa

CDR3:            **C A S T P N K Q G R G Q P Q H F**

#### B) Semblança del CDR3 V $\beta$ 13.1 amb el patró de 13aa de l'infiltrat pancreàtic.

TRBV: **V $\beta$ 13.1** Detectat en superfície.

Posició:            1   2   3   4   5   6   7   8   9   10   11   12   13   14   15   aa

CDR3:            **C A S R R A G H L Y S N Q P Q H F**

**Figura 49.** CDR3 de les cadenes beta V $\beta$ 11 i V $\beta$ 13.1 del clon dual aïllat per expansió *in vitro*. S'ha remarcat en vermell la coincidència exacta d'un aminoàcid de la seqüència amb el patró corresponent per als CDR3 deduït del total de seqüències del pàncreas diabètic. En verd s'ha remarcat les coincidències en una posició propera a la del patró indicat. **A)** Per al CDR3 V $\beta$ 11 de 14aa s'observa coincidència de Q amb el patró de 14aa. **B)** Per al CDR3 V $\beta$ 13.1 de 15aa s'observa coincidència de R i A en N-ter i Y i N en C-ter amb el patró de 13aa.

### 5.5. El clon amb TCR dual no expressa Foxp3.

Les cèl.lules T reguladores són anèrgiques, necessiten de l'estimulació via TCR i de la presència d'IL-2 exògena ja que elles no en produeixen. Tots els clons amb aquest el TCR  $V\alpha 1/V\alpha 22 - V\beta 11(+1)/V\beta 13.1(+2)$ , es mostraven molt dependents de la presència d'IL-2 en el cultiu per proliferar (Costa et. al. dades no publicades) i per això es va determinar l'expressió de Foxp3 en els clons aïllats del pàncrees diabètic per determinar si aquesta dependència per la IL-2 era degut a que eren clons amb fenotipus regulador.

El gen Foxp3, és un gen membre de la família *forkhead/winged-helix* (FOX) de reguladors transcripcionals, implicat en la modulació de les respostes del sistema immunitari. Certament el mecanisme específic d'aquest gen no ha pogut encara ser descrit però sembla actuar com a principal regulador del desenvolupament i la funció de les cèl.lules T reguladores.

La tècnica utilitzada fou PCR-quantitativa normalitzada segons la expressió de Gapdh. Els nivells de Foxp3 en els clons i línies oligoclonals del pàncrees diabètic es van comparar amb la seva expressió en les cèl.lules T reguladores de sang perifèrica CD4+CD25++ purificades a partir de sang perifèrica d'individus controls. De la mateixa manera, es va determinar Foxp3 a les fraccions CD4+CD25- i CD4+CD25+ purificades de les mateixes mostres, ja que eren un control de la diferent expressió d'aquest gen en cèl.lules T naïve i efectores, respectivament.

Es van analitzar els clons i línies expandits amb anti-CD3 i amb illots que es detallen a la **Figura 37**. Cap dels clons amb el TCR dual,  $V\beta 11(+1) / V\beta 13.1(+2)$ , expressava Foxp3, indicant que aquest és un clon efector més que regulador.

Les línies més policlonals que contenien aquest TCR acompanyat d'altres, expressaven nivells baixos de Foxp3 degut a l'efecte dilució. Per exemple, la línia 100.16i tot i ser policlonal expressava nivells entremitjos de Foxp3 (29,7 vegades més que Gapdh x1000), mentre que 100.20i, que contenia el TCR dual entre els clons que composaven la línia, mostrà un nivells baixos del factor de transcripció (5,23). Aquests resultats indicaren que, entre les línies expandides del pàncrees diabètic, hi ha cèl.lules T reguladores segons els nivells d'expressió de Foxp3, i també cèl.lules T efectores (Foxp3-) de les quals un dels clons majoritaris expressa un doble TCR.

L'estudi de les línies cel.lulars va permetre detectar que les cèl.lules amb TCR dual no eren minoritàries dins del repertori de cèl.lules T del donant diabètic. Aquesta hipòtesi s'ha proposat com un dels possibles elements que contribuirien al trencament de la tolerància, degut a la implicació que té l'expressió de dos TCRs amb diferent especificitat durant la selecció tímica.

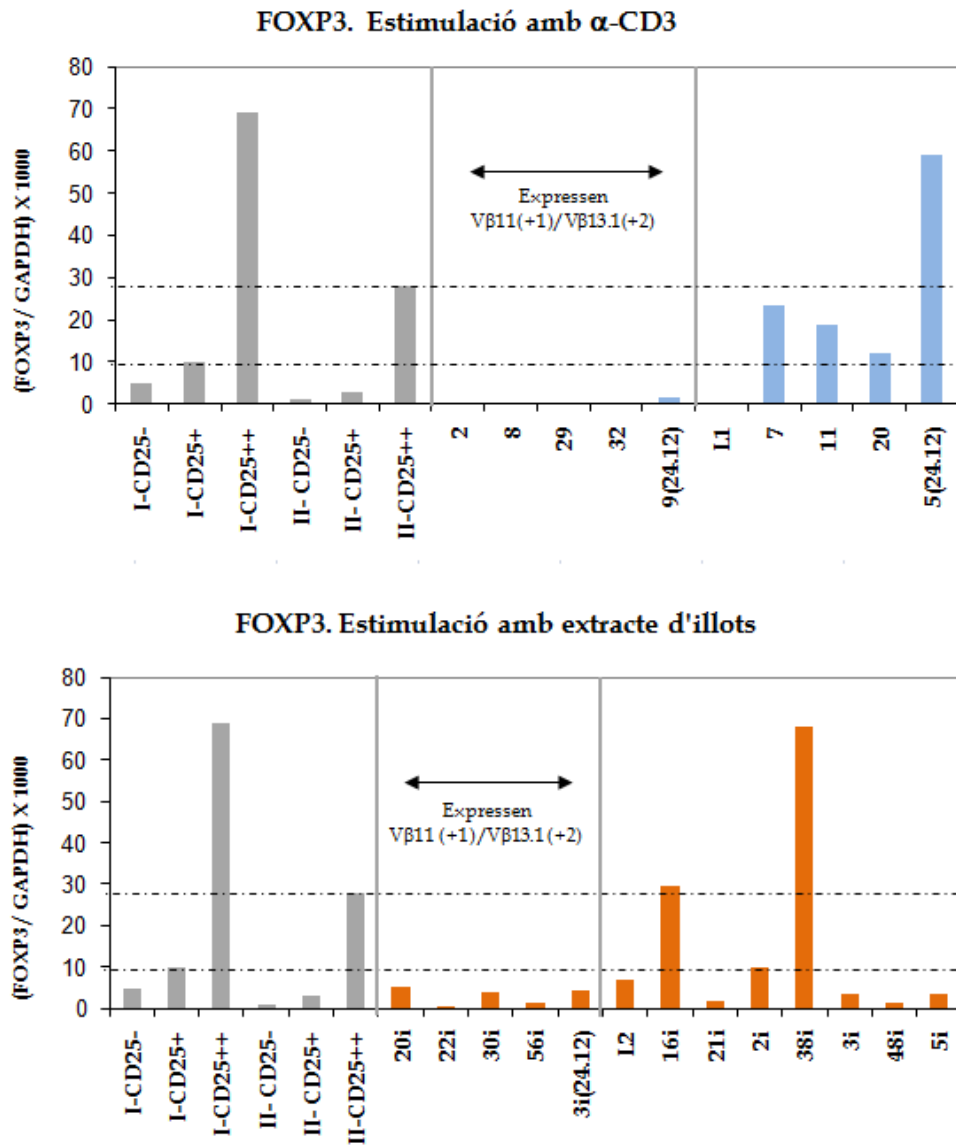


Figura 50. Valors Foxp3 (normalitzat amb Gapdh X1000) dels clons generats en l'expansió de l'infiltrat pancreàtic amb  $\alpha$ -CD3 (blau) i extracte d'illots (taronja). En gris es mostra els valors de referència en cèl.lules T CD4+ separades segons la expressió de CD25 (-, +, ++), de dos PBMCs control. Les línies en puntejat senyalen el valor Foxp3 mínim per a les CD25++ i màxim per a les CD25-. Les línies que contenen els reordenaments V $\beta$ 11(+1)-V $\beta$ 13.1(+2) estan indicades a la part central dels dos gràfics i cap d'aquestes expressà un valor Foxp3 superior al 10, màxim detectat en les CD25+ (efectores activades). Altres línies oligoclonals (com 16i, 38i i 5-2412) mostraven nivells variables de Foxp3, suggerint la presència de reguladores entre les cèl.lules T expandides *in vitro*.

# DISCUSSIÓ





En aquest treball s'ha descrit el repertori TCR del limfòcits infiltrants al pàncrees d'un donant diabètic tipus 1 en el moment del debut, s'ha identificat els clonotips T mitjançant el CDR3 de la cadena  $\beta$  i s'ha estudiat la restricció del repertori present al pàncrees, fent un seguiment dels clons a la melsa i a la sang perifèrica. Per altra banda un dels clonotips V $\beta$ 11 de l'infiltrat original, va ser aïllat *in vitro* per sub-clonatge i expansió, mostrant un TCR dual i una expressió de Foxp3 negativa, fet que suggereix una funció efectora més que reguladora d'aquest clon en el desenvolupament de la malaltia en aquest pacient. Les mostres en la que s'ha basat l'estudi (DM-TD, DM-ISL, DM-S i DM-PB), provenen del donant diabètic "Case 1", referit en les publicacions de Somoza et. al. i Planas et. al. [61, 94] i s'utilitzarà aquesta nomenclatura a la discussió. L'estudi del Case 1 ha estat especialment interessant ja que, tot i que aquests processos han estat ben documentats en models animals, actualment hi ha dades molt limitades sobre la progressió de la diabetis tipus 1 en humà. Això reflecteix la poca disponibilitat de mostres de pàncrees d'individus [57, 65].

La metodologia aplicada per a l'estudi es va basar en l'ús de la tècnica de RT-PCR *multiplex* per a la identificació de les famílies gèniques TRAV ( $V\alpha$ ) i TRBV ( $V\beta$ ) del TCR. Aquesta tècnica ja era descrita per a la detecció de les famílies TRBV [171]. Donat l'alt nombre de grups TRBV existents (Més de 60 segments gènics TRBV identificats per seqüenciació i classificats segons el 75% de similitud de seqüència en 30 famílies, unes 23 de funcionals [16] ([www.IMGT.org](http://www.IMGT.org)), el nombre de reaccions PCR necessàries per a detectar els gens BV era un factor limitant i la utilització de MIXs en que combinaven 2 o més primers específics en una reacció de PCR *multiplex* ja es proposava des dels anys 90 per tal de resoldre el problema, [176]. Basant-nos en aquesta aproximació, es va dissenyar la RT-PCR *multiplex* per a TRAV ja que, fins on ens vam poder documentar, no hi havia cap treball previ on s'utilitzessin grups de co-amplificació per a TRAV.

Les RT-PCR *multiplex* per a TRAV i TRBV presentaven molts avantatges permetent l'amplificació de totes les famílies en un número menor de tubs i la detecció en un gel d'agarosa de petites dimensions, resultant en la optimització de la mostra necessària, el temps i els costos experimentals. La posta a punt d'aquesta metodologia, va permetre l'estudi del repertori TCR en que es basa aquest treball. Aquest mètode s'ha utilitzat sovint, com en el nostre cas, en combinació amb la tècnica d'*spectratyping* que permet obtenir informació del repertori de mides de reordenaments CDR3 [19, 176, 177]. La seqüenciació del CDR3, avalua per altra banda els elements genètics utilitzats en la construcció del TCR, definint les cèl.lules T involucrades en una resposta immunitària.

#### *Repertori de les cèl.lules T infiltrants*

L'estudi del repertori TCR de les cèl.lules infiltrants permet valorar la variabilitat de les cèl.lules que es troben *in situ* en moltes malalties, en particular les autoimmunitàries òrgan-específiques com la DT1. L'estudi de la DT1 en humans té moltes limitacions: es diagnostica temps després de que la resposta auto-reactiva s'hagi iniciat i no és fàcil aconseguir cèl.lules i, menys encara, teixit de pàncrees de pacients, de manera que n'hi ha poques dades i la majoria d'estudis d'aquesta malaltia es realitzen a partir de models animals, principalment el ratolí NOD, ja que la patogènesi s'assembla a la descrita en humans. En els primers estudis de repertori TCR en NOD, s'havia observat que l'infiltrat era molt divers i no presentava cap restricció. E els animals usats en aquests casos tenien però més de 8 setmanes, moment comparable al debut de la malaltia en humans quan la simptomatologia ja ha començat i per tant la destrucció de les cèl.lules ha induït la resposta vers nous autoantígens i s'ha convertit en policlonal [178]. En estudis que comparaven el TCR d'insulitis de ratolins NOD de més de 12 setmanes amb ratolins de 5, s'observà que els primers mostraven un repertori divers i el dels ratolins més joves era en canvi restringit a poques famílies i amb CDR3 dominant, [135, 179, 180].

Aquestes dades indicarien que la DT1, l'activació específica inicial d'un número limitat de clons T induiria un biaix en el repertori de TCR produït per l'expansió d'aquestes cèl.lules.

Les publicacions sobre el repertori de cèl.lules T aïllades de pacients diabètics són escasses i la majoria s'estudien clons aïllats i expandits a partir de mostres de sang perifèrica. Pel contrari, són molt pocs els treballs que descriuen el repertori de cèl.lules T presents a l'infiltrat humà, però els que hi ha suggereixen una certa restricció en les famílies expressades als infiltrats, [63, 66, 133, 140]. En el nostre cas, la descripció del repertori TCR de les cèl.lules T infiltrants als illots pancreàtics del donant diabètic, va mostrar molta diversitat de TCRs però alhora la presència d'unes poques expansions monoclonals que podrien estar dominant la resposta T als illots del diabètic. Alguns d'aquests clonotips van ser també detectats a la melsa i a la sang perifèrica del pacient gràcies a la identificació de la seva regió CDR3.

La majoria de les famílies TRBV estudiades eren ben representades a l'infiltrat pancreàtic del *Case 1*, però, tal com van mostrar els experiments de genotipatge i seqüenciació del CDR3, cinc d'aquestes famílies, V $\beta$ 1, V $\beta$ 7, V $\beta$ 11, V $\beta$ 17 i V $\beta$ 22, resultà que contenien expansions monoclonals. No és possible obtenir conclusions de la comparació de TCRs entre mostres humanes ja que cada repertori és generat a l'atzar en cada individu i condicionat per els particulars polimorfismes d'MHC. No obstant, en altres treballs com el de Luppi et al. [139], s'ha descrit un increment en relació a controls en la freqüència de cèl.lules T V $\beta$ 1, V $\beta$ 7 i V $\beta$ 17 a PBMCs de pacients diabètics T1 recentment diagnosticats. Aquest increment en perifèria no va ser observat al nostre treball on el repertori de famílies TRBV no va mostrar especials alteracions, sent similar al dels PBMCs control (veure les **Figures 27 i 28**). Per altra banda, un increment en la expressió de la V $\beta$ 7 en PBMCs de diabètics T1 ha estat associada a la expansió T mediada per superantigen [133], però en el nostre cas es va desestimar quant les dades de seqüenciació CDR3 varen revelar un clonotip únic per a la família

V $\beta$ 7. Una altra dada interessant va ser la no-expansió de la família V $\beta$ 20 en cap de les mostres del pacient diabètic. En un estudi previ, l'absència d'aquesta família gènica s'havia relacionat amb l'existència de polimorfisme en el gen V $\beta$ 20. Els autors van descriure tres genotips d'aquesta família i en un d'ells el canvi de C a T resultà en la generació d'un codó STOP que creava un al·lel nul [181].

#### *Repertori de les cèl.lules T perifèriques.*

La presència de pics dominants amb possibles expansions clonals al pàncrees va fer que ens preguntéssim si aquestes es podrien determinar a la perifèria. Algunes de les expansions detectades intra-illot, varen poder ser identificades mitjançant l'anàlisi del repertori TRBV en mostres de melsa i la sang perifèrica *ex vivo*. Aquest és un punt molt important a tenir en compte ja que la expansió amb determinats autoantígens o l'anàlisi focalitzat en una determinada família TRBV pot establir un esbiaixament que emmascari els clons T infiltrants més importants. En aquest context, hi ha treballs que han mostrat el repertori humà de les cèl.lules T aïllades de PBMCs de pacients i expandides *in vitro* amb autoantígens coneguts però aquests no mostren la distribució i freqüència *in vivo* d'aquestes cèl.lules [111-114]. Un altre estudi descriu el repertori de cèl.lules T de limfonodes pancreàtics (PLN) de donants diabètics expandides *in vitro* amb insulina, però cap dels clons identificats és trobat a la melsa del mateix individu [63]. Els experiments *ex vivo* publicats per Li et al. [182], usant el model NOD van mostrar que els TCR de cèl.lules T intra-pancreàtiques separades per *sorting* mitjançant un tetràmer amb el mimòtop del clon diabetogènic BDC2.5 eren diversos entre els diferents ratolins analitzats. La mateixa seqüència del CDR3 del clon BDC2.5 no es va poder localitzar en la circulació sanguínia i la melsa en molts dels ratolins, o si hi era, estava molt poc representada.

En un estudi diferent també amb el model de ratolí NOD, els autors es van restringir a l'estudi de V $\beta$ 6 i V $\beta$ 8.2, que eren les dominants intra-illots, i en canvi a la melsa aparegueren com a policlonals [130]. En el nostre treball en canvi, s'ha analitzat el total del repertori de TRBV a la melsa i la sang perifèrica. A la melsa s'ha observat dues expansions monoclonals V $\beta$ 16 i V $\beta$ 22. Aquesta última, V $\beta$ 22- $\ll$ CASSEAQQGYSGELFF $\gg$ , correspon a una de les cinc del pàncrees. La presència de determinades expansions clonals a la melsa es va confirmar en l'estudi realitzat per Erika Scholz, en el seu treball de Màster, de les famílies TRAV en el pàncrees i la melsa del mateix pacient diabètic [183], on es van caracteritzar sis expansions monoclonals a les cèl.lules T intra-illot (V $\alpha$ 6, V $\alpha$ 7, V $\alpha$ 12, V $\alpha$ 14, V $\alpha$ 20, i V $\alpha$ 27), i una d'elles V $\alpha$ 6- $\ll$ CAMRETSDKLIF $\gg$ , era present també a la melsa. L'únic clon expandit al pàncrees, que es va poder identificar en PBMCs, tot i que no com a expansió monoclonal, va ser V $\beta$ 22- $\ll$ CASSEAQQGYSGELFF $\gg$ . D'aquesta manera, els resultats demostraven la presència en baixa freqüència de cèl.lules T expandides als illots, en la circulació sanguínia del pacient, indicant que en el nostre cas d'estudi el repertori perifèric no és representatiu del repertori instal·lat a l'òrgan diana. La detecció de cèl.lules T autorreactives en sang perifèrica ha resultat sempre esquiva, probablement degut a la seva baixa freqüència i la seva reduïda avidesa per els lligands pMHC, que en dificulta l'anàlisi amb tetràmers [184]. Tot i que només és un cas, l'anàlisi exhaustiu de la melsa del diabètic *Case 1* apuntaria cap a un possible paper actiu d'aquest òrgan en l'expansió d'alguns clons autorreactius, on sí es podrien detectar.

La melsa és l'òrgan limfoide secundari intercalat a la circulació sanguínia, utilitzat en models animals per a la obtenció de cèl.lules T perifèriques. S'esperaria que el seu repertori correspongués amb la població de cèl.lules T circulants, no obstant, les dades del donant diabètic *Case 1* suggerien que la melsa autòloga emmagatzemava alguns clons T del pàncrees o inclús que podria permetre la expansió d'alguns d'ells. La rellevància d'aquestes expansions en el progrés de la patologia és desconegut.

Autoantígens expressats als illots com la Periferina es coneix que també s'expressen a la melsa [185] i cèl.lules B anti-Periferina s'han aconseguit aïllar a partir de la melsa en el model NOD [186]. Una altra dada rellevant que involucra a la melsa és l'especificitat del clon BDC2.5, un dels més diabetogènics identificats en NOD. Aquest clon es va generar a partir de cèl.lules disgregades de la melsa i PLN en presència de extracte d'illots, i reconeix un pèptid de la Chromogranina A, una proteïna secretada per cèl.lules beta i per la melsa després d'estimulació nerviosa [104]. Per a aquest tipus d'autoantígens de caràcter més ubic, la melsa podria actuar com a amplificador de la resposta auto-reactiva per determinats clons, en un escenari en que a més de les cèl.lules dendrítiques, els limfòcits B serien bons candidats a APCs.

Varis grups han descrit el paper dels limfòcits B en la progressió de la diabetis i es coneix que la deleció de les cèl.lules B protegeix el ratolí NOD de la malaltia [187, 188]. Les cèl.lules B, són presentadores eficients de pèptids derivats de l'antigen reconegut al BCR, tal com s'ha mostrat per GAD65 en diabetis tipus 1 de ratolí i humà [189, 190]. El grup de Kent et. al., han demostrat la presència de cèl.lules B en els PLN i melsa, secretores d'anticossos contra GAD i insulina i els isotips més abundants són IgM, IgG1 i IgG3 en els donants diabètics comparats amb controls i diabètics de llarga evolució (Torres et. al. dades presentades en nPOD 4th Annual meeting, Miami 2012). El grup de M. Vives-Pi, en un estudi recent del transcriptoma d'illots purificats del diabètic *Case 1*, mostrava un alt nivell de trànscrips d'IgG que es correlacionava amb la presència de cèl.lules B infiltrants [94]. Algunes cèl.lules B autorreactives podrien presentar epítops d'autoantígens co-expressats al pàncrees i a la melsa i d'aquesta manera mediar la interrelació entre ambdós òrgans. Fins on coneixem, no hi ha cap altre estudi que el que aquí presentem on es descriu el paper de la melsa en la diabetis T1 humana.

### *Alineament de seqüències de la regió $\beta$ -CDR3*

En ratolí NOD, s'havia proposat ja un repertori restringit de cèl.lules T anti-illot als estadis inicials d'infiltració al pàncrees [131]. L'anàlisi per alineament de les seqüències de la regió CDR3 del TRB, va permetre valorar la presència d'esbiaixament i/o restricció al repertori dels limfòcits T infiltrants a partir del conjunt de 139 seqüències  $\beta$ -CDR3 obtingudes de l'infiltrat del pàncrees diabètic *Case 1*. Primerament es va valorar la distribució de mides de reordenament del CDR3 i l'ús de fragments TRBJ. Les mides CDR3 més abundants de les cèl.lules T infiltrants (+10%) eren d'11 a 14 aa, sent predominant la de 12 aa (27%). Tot i que s'ha observat que els rangs de mida varien segons la família TRBV [191], els nostres resultats coincidien amb l'extens estudi de Freeman et al. [175] on es descrivia la distribució de mides CDR3 i d'ús de fragments TRBJ de 30.366 clonotips de PBMCs d'individus sans. En ratolí NOD, s'ha observat que els reordenaments principals són de 8-9 aa i que la mida va augmentant en el temps (dels 10 als 22 dies de vida) probablement en relació amb l'evolució de la funció tímica, degut a l'activitat de la TdT que comença la primera setmana de vida, [131, 192]. Les diferències intrínseques en el desenvolupament de la malaltia d'ambdues espècies dificulta la comparació de dades de ratolí i d'humà en els estudis de TCR.

L'alineament de seqüències CDR3 de cadena beta, es va realitzar al nostre treball agrupant les mides principals d' 11aa, 12aa, 13aa i 14aa. De cada grup es va estudiar les propietats dels aminoàcids, mostrant en primer lloc prevalença del caràcter neutre i hidrofílic tal com s'esperava en un *loop* exposat a l'exterior per a la interacció amb pMHC. Respecte a les propietats químiques de les cadenes laterals dels aminoàcids, destacava la prevalença dels alifàtics a la zona central del CDR3, de la posició 4 a l'inici del fragment TRBJ (posició 8-11 segons el grup; veure **Figura 32**), que es corresponia amb l'abundància dels residus G i P codificats pel segment TRBD [191]. Aquestes dades concordaven amb l'estudi

de Naserke et. al. [193] en ratolí NOD i un dels pocs en que s'estudien les propietats dels aminoàcids del CDR3. Tot i així, una observació interessant fou l'existència d'un "punt d'inflexió" en la prevalença del caràcter alifàtic a la part central del *loop*, que senyalava una disminució d'aquesta tendència al voltant de les posicions 5-7, en 3 dels 4 alineaments realitzats, i suggerint possible restricció a nivell d'aminoàcids. En l'anàlisi *quantitatiu* (**Figura 20**) s'observà encara més marcada aquesta disminució del caràcter alifàtic a favor de l'augment d'altres propietats segons les seqüències expandies en cada grup. L'observació de restricció al voltant d'una posició aproximada a les posicions 5-7 del CDR3, podria reflectir l'existència d'una restricció concreta, però mostrar l'adaptació de cada mida CDR3 a aquesta restricció segons la possibilitat de plasticitat que presenta el *loop*. Amstrong et. al. [194] ja plantejava que la característica de plasticitat dels *loops* CDR sigui un factor rellevant, que podria influir en l'especificitat i inclús en la cross-reactivitat dels TCR.

Tenint en compte aquests resultats, es va aplicar a nivell d'aminoàcids el test estadístic de la Binomial, obtenint quatre "patrons" (per a les mides CDR3 de 11aa, 12aa, 13aa i 14aa) que mostraven selecció d'alguns aminoàcids no alifàtics a la regió NDN (**Figura 34**) i que es corresponien amb els "punts d'inflexió" indicats en l'anàlisi de propietats. L'alineament, va mostrar d'aquesta manera un biaix que podria deure's a la immunodominància d'alguns epítops presentats a l'òrgan diana. S'ha estudiat en anteriors treballs l'existència de diferents tipus de biaix dels TCR generats en una resposta [7, 195-202]. El biaix anomenant tipus 2 es dona quan hi ha conservació de seqüències al *loop* CDR3 i es caracteritza per la presència de motius de seqüència, el biaix és típus 3 en cas de que a més s'observi restricció cap a l'ús de certes TRAV i/o TRBV, [8, 201].

La detecció de biaix als  $\beta$ -CDR3 s'ha relacionat en altres treballs amb l'especificitat vers un determinat pMHC. Day et. al. [203], usaven ratolins retrogènics amb la cadena TRA (TRAV21-AJ53) de forma fixe, determinaven la variabilitat de TRB en la resposta vers un pèptid de l'influenza-virus A i



mostraven com existia restricció per la família TRBV29, una mida CDR3 concreta i, tot i la diversitat de seqüències  $\beta$ -CDR3, mostrava una selecció a la posició 108 (posició 4 al *loop*, corresponent a NDN) per un aminoàcid aromàtic no codificat a la línia germinal. L'anàlisi estructural indicava que la cadena lateral d'aquest aminoàcid contactava amb MHC-I mentre que a la resta del *loop* el *backbone* contactava específicament amb el pèptid PA224. En aquest cas semblava que el reconeixement no depenia tant d'una seqüència concreta com de les característiques estructurals adequades de la superfície del TCR que contactava amb el pMHC-I.

Un altre exemple de biaix, en aquest cas relacionat amb la funcionalitat dels clons, es va descriure al treball de Liu et. al. [204]. En el model experimental d'EAE, on la malaltia era induïda amb MOG(35-55), s'observava un biaix en el CDR3 associat més a la funció de les cèl.lules que al reconeixement del pèptid ja que la presència d'un residu àcid a les posicions 5-7 del CDR3 correlacionava amb cèl.lules T Foxp3 negatives, per tant amb un fenotip efector. Aquest residu era absent a les cèl.lules T Foxp3+ específiques pel pèptid, aïllades tant de melsa com de CNS (sistema nerviós central) [204]. Finalment, un estudi realitzat en humans va mostrar que hi havia un biaix en els clons de cèl.lules T que reconeixen un epítip del virus de la hepatitis C. Els CDR3 dels clons específics mostraven restricció no només en la regió CDR3 sinó també a les regions CDR1 i CDR2. A més, entre els clonotips seqüenciats es van identificar TCRs públics, és a dir, seqüenciats en diferents individus, evidenciant que el repertori era entre individus més repetitiu de l'esperat, [205].

En resum, el biaix dels TCRs a nivell de l'aparellament preferent de determinats dominis variables alfa i beta, la seqüència de les regions CDR i en particular la mida i seqüència de CDR3, ens informa dels motius estructurals involucrats en el reconeixement de la topografia molecular dels complexos pMHC que es presenten *in situ*. Aquest abordatge es especialment interessant en l'estudi de les malalties autoimmunitàries, on existeix un infiltrat limfocitari que

freqüentment apareix molt diluït a la perifèria. Per aquestes malalties la definició de les característiques moleculars rellevants per al reconeixement, podria usar-se en el disseny de noves teràpies immunològiques, sobretot quan aquests determinants s'associen amb la funció de les cèl.lules T autorreactives.

La importància del biaix del  $\beta$ -CDR3 observat a l'infiltrat limfocitari del donant diabètic *Case 1* es manifesta amb la coincidència entre els N-D-N de les expansions monoclonals i els diferents patrons definits per cada mida del CDR3. Aquesta dada suggereix que les posicions significatives dels patrons poden ser rellevants en el reconeixement dels complexos pMHC expressats *in situ*. Les preferències per certs aminoàcids podrien ser determinades per la interacció amb el pèptid i/o la molècula de MHC. Per altra part, el fet que les dues expansions monoclonals de la melsa, V $\beta$ 16- $\ll$ CASSHRQMNYNEQFF $\gg$  i V $\beta$ 22- $\ll$ CASSEAQGGYSGELFF $\gg$ , es trobin a l'òrgan diana com clonotips dominants i que s'adaptin al biaix del pàncrees, suggereix que a ambdós òrgans es troben els elements de restricció responsables de la seva expansió.

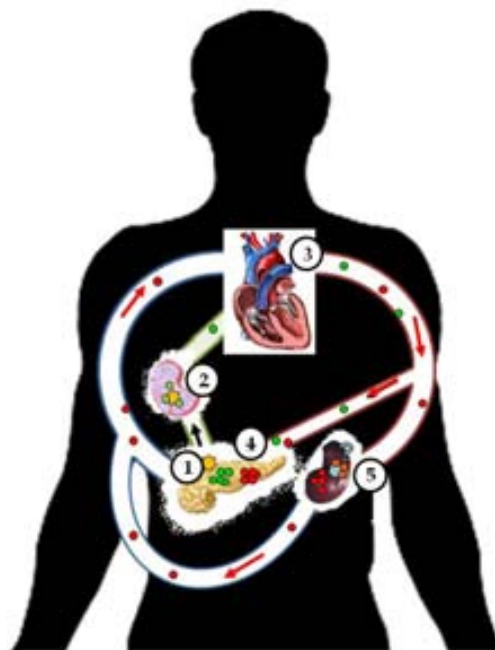
A partir d'aquestes consideracions, postulàriem el model que es descriu a la **Figura 51** on, en el dany tissular inicial hi hauria migració de cèl.lules dendrítiques (DC) carregades de complexos pMHC cap als PLN proximals, on hi hauria reconeixement i activació de les cèl.lules T efectores. La melsa i la part de la "cua" del pàncrees drenen als limfonodes pancreatico-esplènics, els quals podrien afavorir la resposta T contra autoantígens comuns. A través del drenatge limfàtic les cèl.lules T activades serien bolcades al ducte toràcic des d'on passarien a la circulació sanguínia i acabarien retornant al pàncrees a través de l'endotel·li activat, on s'expandirien al trobar de nou l'antigen. La melsa està intercalada a la circulació sanguínia i algunes cèl.lules T hi arribarien també, de les quals, aquelles específiques per autoantígens co-expressats en pàncrees i melsa s'hi podrien expandir. Les nostres dades han demostrat la presència d'expansions clonals a la melsa que també es trobaven al pàncrees però no viceversa.

Per tant, tot i que la resposta immunològica contra epítops T específics de teixit és principalment sostinguda a l'òrgan diana i als PLN, la melsa podria emmagatzemar, i/o també expandir alguns clons T, participant en la inflamació crònica de la T1D.

*Expansió "in vitro" de l'infiltrat del diabètic Case 1.*

L'anàlisi del *Case 1* es complementa amb l'estudi de clons i línies oligoclonals aïllats de l'infiltrat original per expansió *in vitro* amb anti-CD3 o extracte d'illots pancreàtics de donants sans.

A partir del sobrenedant dels cultius en monocapa dels illots pancreàtics purificats, s'havia obtingut els limfòcits més interns i pròxims als illots. De l'infiltrat limfocitari, es van generar dues línies cel.lulars amb dos protocols d'expansió, per tal de no perdre cap informació del cultiu de partida: L1, expandida amb anticòs monoclonal anti-CD3 i L2, amb extracte cru d'illots. El sub-clonatge d'ambdues línies va permetre obtenir clons i línies oligoclonals que



**Figura 51.** Representació gràfica del model proposat sobre la relació entre la melsa i el pàncrees.

- 1-Migració de dendrítiques DC amb complexos MHC-pep als LN pancreàtics proximals.
- 2-Reconeixement i activació de les cèl·lules T efectores al LN.
- 3-Arribada de les cèl·lules T acivades al ducte toràcic i pas a circulació sanguínia.
- 4-Entrada de cèl·lules T efectores al pàncrees. Reconeixement d'Ag i expansió T específica.
- 5-Entrada de les cèl·lules T circulants a la melsa. Emmagatzament i expansió d'aquelles que interaccionin amb complexos pMHC específics.

permetrien la valoració més específica de la relació TRAV/TRBV dels receptors, de la possible funció reguladora/efectora a partir del grau d'expressió de factors de transcripció del llinatge específic i posteriors estudis d'especificitat i funció. En aquest treball es va determinar el repertori TRAV/TRBV de cadascuna i la possible funció reguladora a partir del nivell de FOXP3.

Tot i observar diversitat en el repertori de famílies gèniques TRAV i TRBV, s'hi van identificar línies oligoclones, i en algun cas inclús monoclonals. El manteniment de cèl.lules T en cultiu s'ha descrit com a possible causa de biaix del repertori TCR. La comparació de PBMC estimulats amb fitohemaglutinina (PHA) *versus* no estimulats, havia mostrat que en presència de mitogen s'indueïa predominança de certes famílies respecte a la resta, però no implicava la desaparició de cap de les famílies analitzades [206]. En un estudi posterior [207], s'analitzava com afectava el cultiu *in vitro* a la clonalitat de la mostra, comparant el repertori de mostres de tumor *ex vivo* i els cultius de limfòcits infiltrants en presència de cèl.lules tumorals del propi individu. S'observava com després del cultiu, el repertori del limfòcits infiltrants variava en determinades famílies. Per altra banda, l'anàlisi de sang perifèrica del mateix pacient *ex vivo versus* cultivada en les mateixes condicions, no resultà en les mateixes modificacions del repertori, suggerint que la mostra de partida influïa en el resultat. En aquest cas, el cultiu en presència de cèl.lules tumorals podia afavorir l'expansió d'aquelles cèl.lules T específiques presents en l'infiltrat i absents en perifèria.

Als cultius *in vitro* de l'infiltrat *Case 1*, el patró de monoclonalitat de les famílies TRBV analitzades, era més evident quant s'estimulava amb anti-CD3 (8/12 famílies mostraven un únic reordenament) que quant es feia amb illots. L'estimulació amb anti-CD3 hauria afavorit el creixement de determinats reordenaments, però la majoria d'aquests s'observaven també en el cultiu amb illots, fet indicatiu de que es mantenien en presència d'antígens específics. Per tant, els mitògens com PHA o anti-CD3 podrien activar algunes cèl.lules

irrellevants presents en el cultiu i emmascarar els resultats, però no explicarien les coincidències observades en longitud de CDR3 d'algunes famílies TRBV, en la expansió amb anti-CD3 i la expansió amb extracte d'illots, a no ser que prèviament s'haguessin activat amb el mateix estímul.

A la expansió *in vitro* de l'infiltrat del *Case 1*, s'observà la predominança de les famílies  $V\alpha 1$ ,  $V\alpha 22$ ,  $V\beta 11$ ,  $V\beta 13.1$  en les línies generades tan amb un com altre protocol d'expansió. En 11 de les 22 (52%) línies analitzades es co-expressaven les quatre cadenes i coincidien les mides de l'amplímer de cadascuna: 209pb per  $V\beta 11$  i 239pb per  $V\beta 13.1$ , 225pb per  $V\alpha 1$  i 261pb per  $V\alpha 22$  (dades no mostrades). La seqüenciació de dues d'aquestes línies va confirmar la seva monoclonalitat, mostrar la seva identitat clonal i revelar la presència d'un codó *Stop* a la regió NDN de la cadena  $V\alpha 22$ , suggerint un cas de TCR dual amb  $V\alpha 1$  i  $V\beta 11/V\beta 13.1$ . Aquesta possibilitat no es va confirmar a nivell de proteïna ja que la citometria de flux va permetre detectar  $V\beta 13.1$  però no  $V\beta 11$ . L'absència de marcatge podria deure's a la pèrdua de l'epítot reconegut per l'anticòs anti- $V\beta 11$  usat o per la manca de disponibilitat d'altres anticossos comercials per  $V\beta 11$ . L'absència de detecció semblava relacionada amb el reordenament, ja que la línia 100.21i, amb una mida d'amplímer diferent, sí que va ser detectada.

Per altra part, els reordenaments no productius són molt freqüents als gens del TCR. Gran nombre de cèl.lules B i T funcionals de la perifèria d'individus sans contenen alhora gens correctes (*in-frame*) i incorrectes (contenen algun PTC-*premature termination codon*). Dos de cada 3 processos de reordenament canvien la pauta de lectura del gen, generant PTCs en VDJ o al principi de la zona C. Els reordenaments no-productius no poden codificar receptors funcionals però com que hi ha dues còpies dels locus TCR en cada limfòcit, hi ha almenys dues oportunitats de generar un receptor reordenat funcional. L'mRNA d'un reordenament no funcional pot així coexistir amb el reordenament alternatiu que dona una cadena funcional, [208]. Un 33% de cèl.lules T expressen dues cadenes  $\alpha$  en humà, 2-15% en ratolí, i la freqüència de cèl.lules T amb dues

cadena  $\beta$  s'ha estimat al voltant del 1% en humà i el 3% en ratolí, incrementant-se amb l'edat, [23-25, 209].

L'acumulació d'aquests transcrits amb PTCs pot donar lloc a cadenes truncades o mal plegades que interfereixen amb l'assemblatge del receptor correcte o s'acumulen al citoplasma. Les cèl.lules han desenvolupat mecanismes de regulació d'aquests transcrits incorrectes com la via NMD (*nonsense-mediated decay pathway*) que es basa en el reconeixement dels PTCs i degrada els mRNAs primaris (els disminueix de 10 a 100 vegades). Per altra part, s'ha descrit l'augment d'*splicing* alternatiu, com a mecanisme per eliminar els PTCs, ja que podria escindir la zona que inclou l'*Stop*, que sovint és a l'exó VDJ [208, 210]. La seqüència V $\beta$ 11 dels clons 100.29 i 100.22i, no mostrava cap PTC *in-frame* a la zona del CDR3, ni a l'extrem 5' de la regió C $\beta$  inclosa al fragment amplificat (dades no mostrades). No obstant, no es pot excloure la presència de PTCs en algun altre punt del transcrit, ja que no es disposa de la seqüència sencera de la cadena beta.

Els resultats obtinguts, no permetien descartar la expressió d'aquesta cadena V $\beta$ 11 en superfície i per tant no podem descartar la possibilitat d'un TCR dual. Varis treballs han involucrat aquest tipus de cèl.lules amb aloreactivitat i autoimmunitat, estudiant-les en models d'artritis induïda per col.lagen, EAE i diabetis entre altres [209, 211-214], ja que es seleccionarien al timus per un dels TCRs expressats, sense testar la capacitat auto-reactiva de l'altre combinació que evitaria d'aquesta manera la selecció negativa [212, 215, 216]. Elliot et al. inclús correlacionaven la protecció del NOD amb l'eliminació dels TCRs duals [212], i els estudis de Ji. et. al. [209], han revelat recentment un mecanisme de trencament de la tolerància dependent de la expressió de TCRs duals, on cèl.lules T reconeixen i s'activen per un antigen viral mentre que porten associat un altre TCR que reconeix la *myelin basic protein* (MBP), descrivint un mecanisme en que una infecció viral ubiqua, podria desencadenar l'autoimmunitat en un subgrup d'individus infectats.

La seqüència V $\beta$ 11(+1)-<<CASTPNKQGRGQPQHF>> del possible TCR dual, va ser la única seqüència  $\beta$ -CDR3 que es va trobar les línies *in vitro* i a l'infiltrat intrapancreàtic original. Quan es va comparar la seqüència amb el patró de 14 aa de l'infiltrat, es va observar que presentava la Q central característica d'aquest biaix. La seqüència corresponent a la V $\beta$ 13.1(+2)-<<CASRRAGHLYSNQPQHF>> de 15 aminoàcids, tot i que és més llarga que els patrons identificats, comparteix alguna de les característiques en posicions adjacents amb el patró de 13 aa (veure **Figures 37 i 49**). Amb l'objectiu d'identificar aquesta seqüència de CDR3 dins de l'infiltrat, s'ha clonat la família V $\beta$ 13.1 del digerit total del pàncrees diabètic, obtenint 10 clons, però malauradament no s'hi ha identificat fins ara (M. Costa, resultats no publicats). La possible presència d'aquest clon amb TCR dual a l'infiltrat, ens va portar a la determinació dels nivells de FOXP3, per a poder relacionar-lo amb un mecanisme efector o regulador. L'expressió de FOXP3 era molt baixa a les línies i clons que expressaven la combinació del TCR dual, suggerint que sigui un clon efector. La caracterització exhaustiva d'aquest clon s'està portant a terme al laboratori per M. Costa i els resultats indiquen que expressa el factor de transcripció GATA3, corresponent a cèl.lules CD4+, Th2.





## ❖ CONCLUSIONS PER OBJECTIUS

Objectiu I- Optimitzar la metodologia experimental per l'estudi del TCR, mitjançant el disseny d'una RT-PCR *multiplex* per a l'anàlisi del repertori TRAV i TRBV:

1. **S'ha optimitzat les condicions de la PCR *multiplex* per a les cadenes TRAV i TRBV, i s'ha establert un mètode d'anàlisi que ens permet avaluar la presència d'expansions clonals a les mostres.**

Objectiu II- Analitzar el repertori de famílies gèniques TRBV i la presència d'expansions monoclonals en el digerit total i en els illots purificats del pàncrees d'un donant diabètic tipus 1:

2. **S'han definit cinc expansions monoclonals, en les famílies gèniques V $\beta$ 1, V $\beta$ 7, V $\beta$ 11, V $\beta$ 17 i V $\beta$ 22, al repertori de les cèl.lules T infiltrants als illots pancreàtics d'un pacient de DT1 de debut.**

Objectiu III- Identificar a la perifèria les expansions clonals de l'infiltrat intra-illot:

3. **S'han descrit dues expansions monoclonals a la melsa, de les quals V $\beta$ 22-**<<CASSEAQQGYSGELFF>>** és expansió clonal a la melsa i als illots del diabètic, i V $\beta$ 16-**<<CASSHRQMNYNEQFF>>** no és expandida però sí abundant al pàncrees.**
4. **L'expansió comú V $\beta$ 22-**<<CASSEAQQGYSGELFF>>** també s'ha identificat diluïda en PBMCs del pacient.**

Objectiu IV- Determinar l'existència d'un biaix en la diversitat del TCR de les cèl.lules infiltrants del pàncrees, a partir de la identificació d'elements de restricció en les regions CDR3 de la cadena beta del TCR:

5. **L'anàlisi de 139 seqüències  $\beta$ -CDR3 de l'infiltrat, ha mostrat restricció a nivell de característiques químiques. En tots els grups de seqüències, 11 a 14 aa, el CDR3 mostra a la regió central, o N-D-N, un augment del caràcter alifàtic amb un punt d'inflexió en aquesta tendència entre les posicions 5 a 7, suggerint la existència de restricció a nivell de selecció d'aminoàcids.**
6. **S'han definit, aplicant el test de la Binomial, quatre patrons de restricció per a les mides de 11 fins a 14 aa, que mostren la selecció preferent d'alguns aminoàcids a la regió NDN en posicions coincidents amb el punt d'inflexió definit en l'anàlisi de les propietats.**

Objectiu V- Comparar el TCR de línies i clons generats *in vitro* a partir de l'infiltrat d'illots amb les dades de les expansions *in vivo* del pàncrees diabètic:

7. **L'expansió *in vitro* de l'infiltrat linfoцитari mitjançant dos mètodes diferents, mostra que l'estimulació amb anti-CD3 ha afavorit el creixement dels clons més dominants, mentre que l'extracte d'illots ha mantingut més diversitat de cèl.lules T.**
8. **La majoria dels polimorfismes de mida del CDR3 de les línies oligoclonals, estan presents a les línies parentals L1 i L2, mentre que la detecció d'alguns reordenaments nou s'explicaria pel el factor dilució.**

9. La combinació dels reordenaments V $\alpha$ 1, V $\alpha$ 22, V $\beta$ 11 i V $\beta$ 13.1, és altament representada tant a les línies oligoclonals procedents de L1 com de L2. Aquestes línies provenen de l'expansió clonal d'una cèl.lula amb un únic TCR funcional format per V $\alpha$ 1V $\beta$ 13.1, segons s'ha demostrat per seqüenciació i citometria de flux, de funció efectora més que reguladora donada la seva baixa expressió de Foxp3. Només la seqüència de V $\beta$ 11- <<CASTPNKQGRGQPQHF>> d'aquestes línies s'ha trobat però dins de l'infiltrat intra-illot analitzat *ex vivo*.

• CONCLUSIONS •

# ANNEXOS



## FIGURES SUPPLEMENTÀRIES







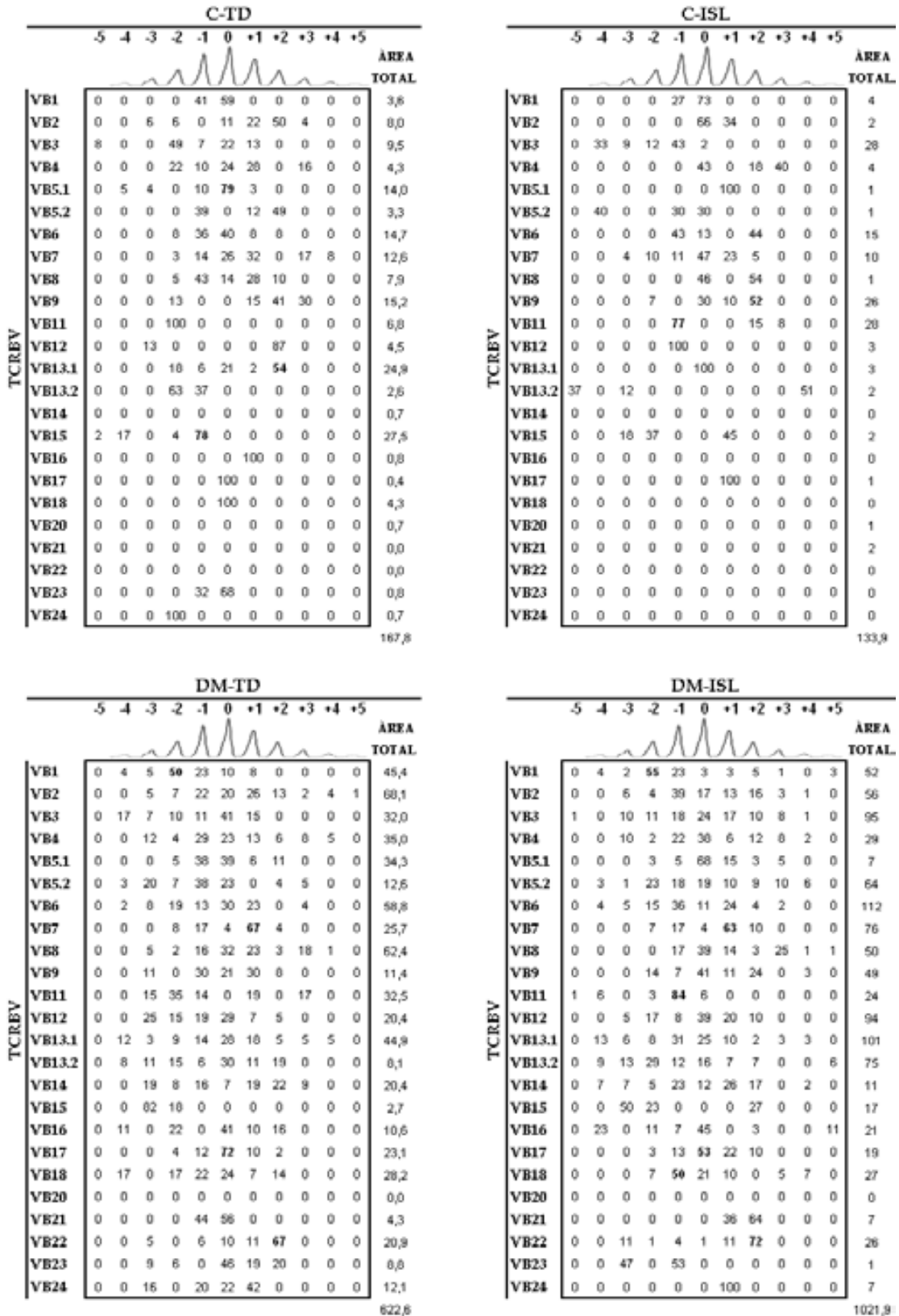


Figura Suplementària 1. Valors d'RI dels pics de genotipatge obtinguts a les famílies gèniques amplificades en les mostres de pàncrees total i illots aïllats per a les mostres control (C-TD i C-ISL respectivament) i les corresponents al donant diabètic (DM-TD i DM-ISL). A la columna de la dreta es mostra l'àrea total de la família, calculada a partir del sumatori de l'àrea dels pics normalitzada amb el marcador intern. Només es van considerar aquelles famílies amb una àrea total superior a 10. En negreta es remarquen els valors d'RI superiors al 50% i per tant indicatius de la presència d'expansions monoclonals.

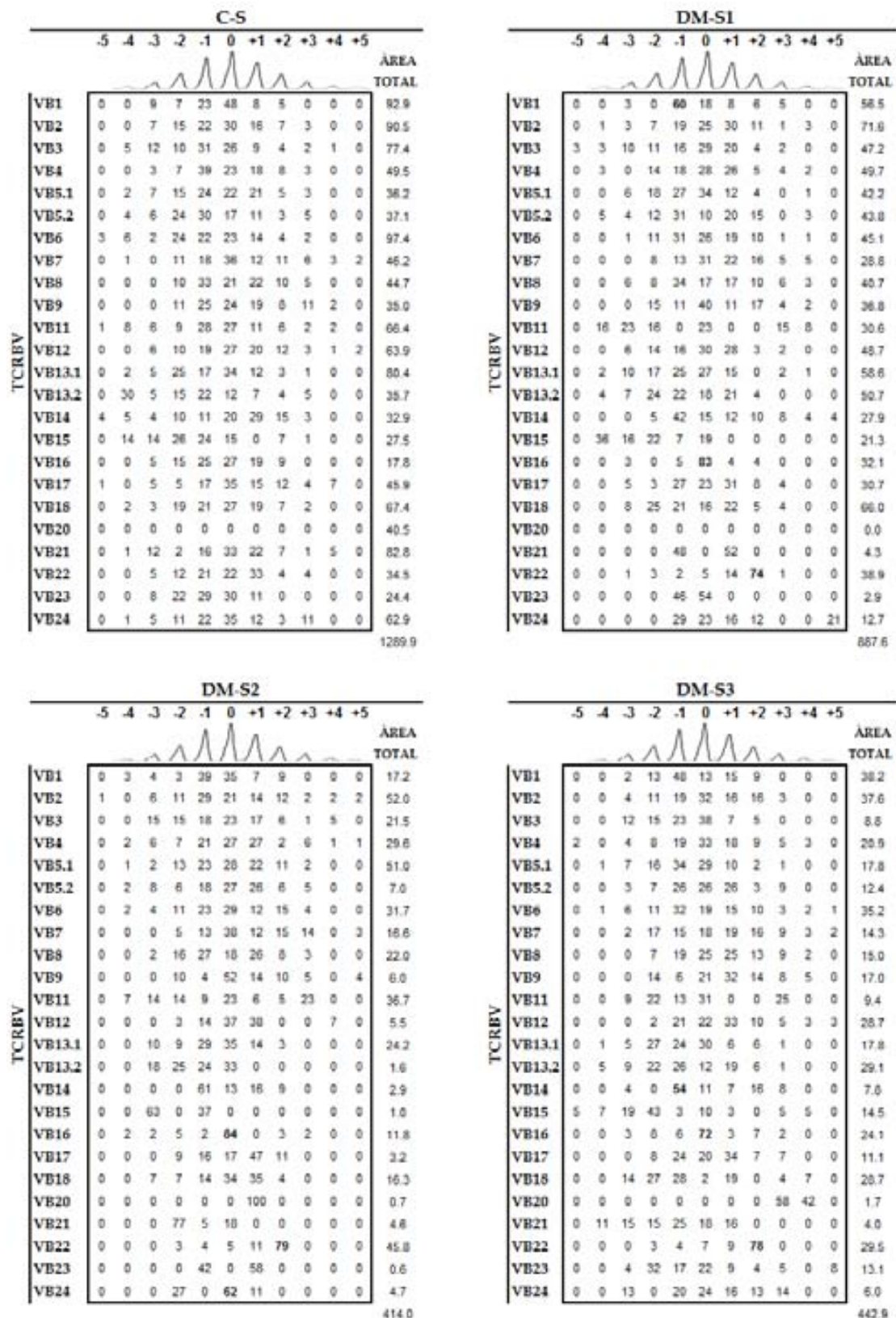


Figura Suplementària 2. Valors d'RI per a tots els pics de genotipatge obtinguts a les famílies gèniques amplificades a les mostres de melsa control (C-S) i blocs de melsa independents del donant diabètic (DM-S1, S2 i S3 respectivament). A la columna de la dreta es mostra l'àrea total de la família, calculada a partir del sumatori de l'àrea dels pics normalitzada amb el marcador intern. Només es van considerar aquelles famílies amb una àrea total superior a 10. En negreta es remarquen els valors d'RI superiors al 50% i per tant 190 indicatius de la presència d'expansions monoclonals.

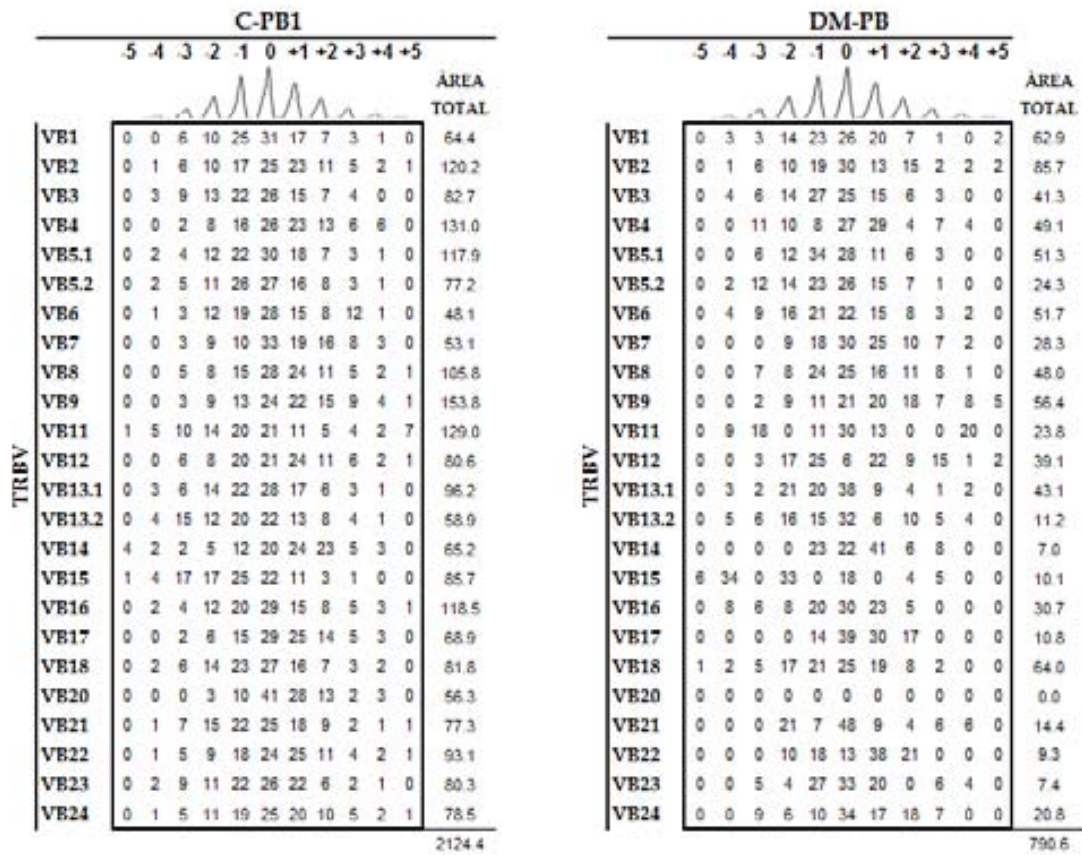


Figura Suplementària 3. Valors d'RI per a tots els pics de genotipatge obtinguts a les famílies gèniques amplificades a les mostres de PBMCS d'un individu control (C-PB1) i PBMCS del donant diabètic (DM-PB). No s'observa cap valor de RI superior a 50 i per tant indicatiu d'una possible expansió clonal.

### Valoració quantitativa d'hidropatia dels aminoàcids del $\beta$ -CDR3

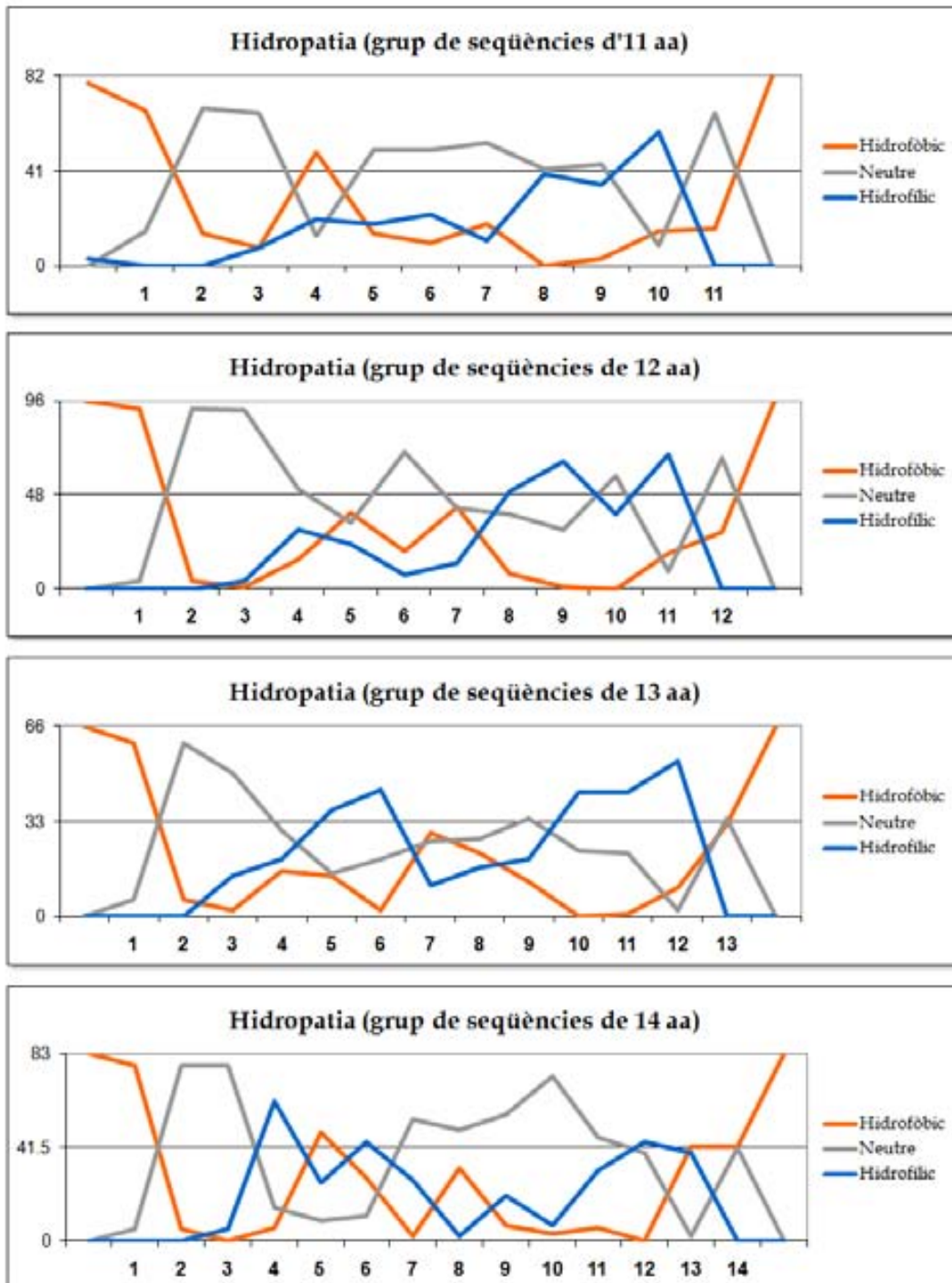


Figura suplementària 4. Propietats d'hidropatia dels aminoàcids del  $\beta$ -CDR3 en les cèl·lules T intra-pancreàtiques del donant diabètic, segons l'estudi quantitatiu per cada grup de seqüències. L'eix X indica la posició al CDR3 de N- a C- terminal, desde la C inicial (anterior a 1) a la F final (posterior a la última posició numerada), C i la F són posicions incòlques als gràfics però sense numeració. L'eix Y indica el nombre de seqüències.

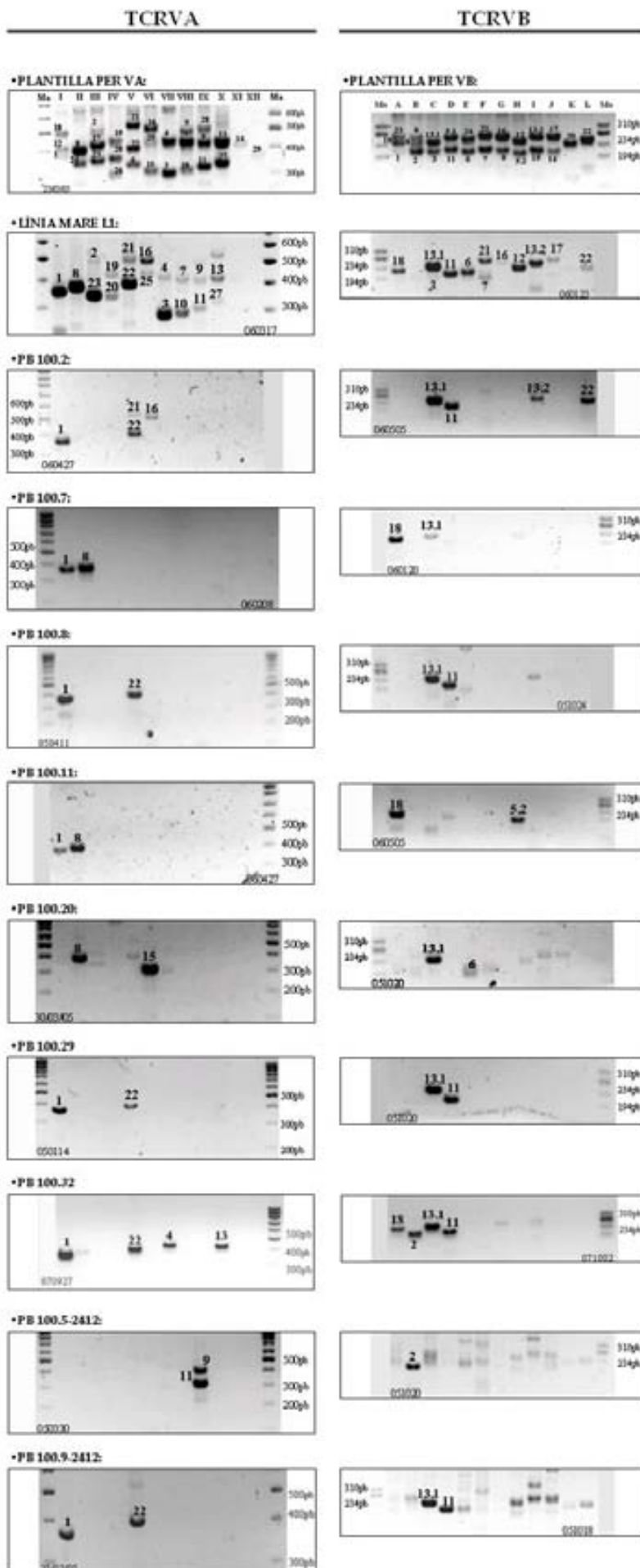
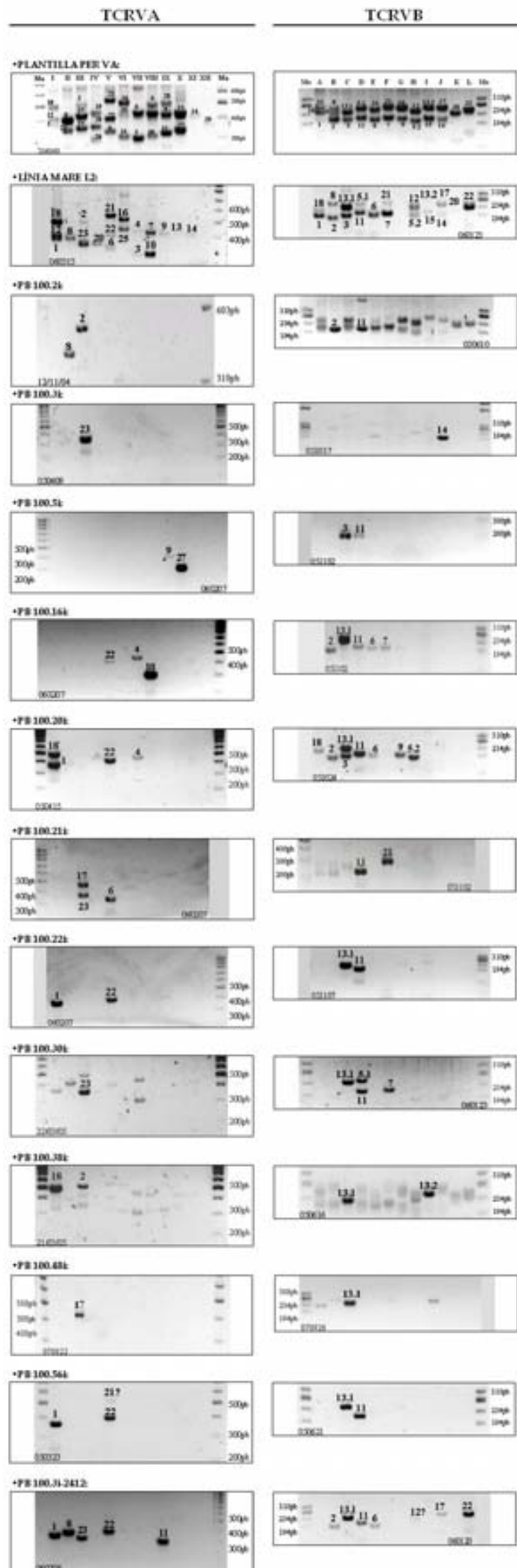


Figura suplementària 5. PCRs TRAV ( $V\alpha$ ) i TRBV ( $V\beta$ ) de les mostres filles del clonatge de la expansió amb anti-CD3, L1. Al capçal de cada fotografia s'indica la nomenclatura corresponent al nom de la mostra i damunt de cada banda apareix el nombre corresponent a la família  $V\alpha$  i  $V\beta$  que representa. Totes les electroforesis van ser fetes en gels d'agarosa d'alta resolució segons el protocol especificat a materials i mètodes. Observàvem, tal com s'esperava, oligoclonalitat en totes les línies. Les bandes tènues, com les que es veuen en el gel de  $V\beta$  per les línies 100.5-2412 i 100.9-2412 eren probablement bandes residuals de les cèl.lules *feeder* (PBMCs irradiats) que s'afegien al cultiu en cada reestimulació (veure Materials i Mètodes). El nombre de bandes  $V\alpha$  coincidia amb el d' $V\beta$  en cada línia.

Figura suplementària 6. PCRs TRAV(V $\alpha$ ) i TRBV(V $\beta$ ) de les mostres filles del clonatge de la expansió amb extracte d'illots, L2. Al capçal de cada fotografia s'indica la nomenclatura corresponent al nom de la mostra i damunt de cada banda apareix el nombre corresponent a la família V $\alpha$  i V $\beta$  que representa. Totes les electroforesis van ser fetes en gels d'agarosa d'alta resolució segons el protocol especificat a materials i mètodes. Observàvem, tal com s'esperava, oligoclonalitat en totes les línies. Les bandes tènues, com les que es veuen en el gel de V $\beta$  per les línies 100.3i eren probablement bandes residuals de les cèl.lules *feeder* (PBMCs irradiats) que s'afegien al cultiu en cada reestimulació (veure Materials i Mètodes). El nombre de bandes V $\alpha$  coincidia amb el d'V $\beta$  en cada línia.



## TAULES SUPLEMENTÀRIES







Seqüències  $\beta$ -CDR3 dels limfòcits T intra-illot.

VB *	TRBV **	Mida (aa)	V	N-D-N	J	TRBJ **	Nx ***	%		
VB1	TRBV9	11	CASSV	ST	TDTQYF	2-3.01	10	55.6		
		12	CASS	DEGY	GNTIYF	1-3.01	1	5.6		
		12	CASSV	AWG	QETQYF	2-5.01	4	22.2		
		13	CASSV	GDLP	DYGYTF	1-2.01	1	5.6		
		14	CASSV	EGGNAAW	GYTF	1-2.01	1	5.6		
15	CASSV	VGTGTRN	GELFF	2-2.01	1	5.6				
VB6	TRBV7	10	CASSF	G	QETQYF	2-5.01	1	5.3		
		11	CASS	PPL	SYEQYF	2-7.01	1	5.3		
		11	RASS	PGQ	NYGYTF	1-2.01	3	15.8		
		12	CASS	LIE	GNOQHF	1-5.01	1	5.3		
		12	CASS	SGTA	SYEQYF	2-7.01	5	26.3		
		12	CASSF	EEGT	YEQYF	2-7.01	1	5.3		
		12	CASSL	KGLW	ETQYF	2-5.01	1	5.3		
		12	CASSL	GVIW	YEQYF	2-7.01	1	5.3		
		13	CASS	SGGS	SYNEQFF	2-1.01	1	5.3		
		13	CASSL	GLAGG	NEQFF	2-1.01	1	5.3		
		14	CASS	RGGR	ANTGELFF	2-2.01	1	5.3		
		14	CASS	DPGGGVV	ETQYF	2-5.01	1	5.3		
		15	CASSL	GQGM	TYNSPLHF	1-6.01	1	5.3		
		VB7	TRBV4-2	11	CASSQ	AAG	YEQYF	2-7.01	2	25.0
				12	CASSQ	DGGLYE	QYF	2-5.01	1	12.5
13	CASS			PTSGEV	KTQYF	2-5.01	1	12.5		
14	CASSQ			VAGAG	TGELFF	2-2.01	4	50.0		
VB8	TRBV12-3	11	CASSR	PTST	YEQYF	2-7.01	1	5.9		
		11	CASSL	PPES	GYTF	1-2.01	1	5.9		
		11	CASSL	LPES	GYTF	1-2.01	1	5.9		
		11	CASSL	EVAG	EQYF	2-7.01	1	5.9		
		12	CAS	TNRES	NQPHF	1-5.01	2	11.8		
		12	CASS	SGT	VNTEAFF	1-1.01	1	5.9		
		12	CASSF	PA	STDQYF	2-3.01	2	11.8		
		13	CASSF	GGGAG	SPLHF	1-6.01	1	5.9		
		14	CASS	LRPGRG	DTEAFF	1-1.01	1	5.9		
		15	CASS	LATSGA	STDQYF	2-3.01	6	35.3		
		VB11	TRBV25-1	11	CASSD	-	TNTGELFF	2-2.01	1	11.1
				12	CASSD	PGT	QETQYF	2-5.01	8	88.9
		VB16	TRBV14	9	CASSQ	GV	EAFV	1-1.01	1	7.7
				11	CASS	LQDSPL	QYF	2-7.01	1	7.7
				12	CASSQE	VG	YNEQFF	2-1.01	1	7.7
13	CASSH			ROMN	YNEQFF	2-1.01	5	38.5		
13	CASSQD			EPA	FYEQYF	2-7.01	3	23.1		
15	CASSQD			RGPWLA	TEAFF	1-1.01	1	7.7		
18	CASSQD			GGARGDKR	FYEQYF	2-7.01	1	7.7		
VB17	TRBV19	10	CASSI	GS	YGYTF	1-2.01	1	14.3		
		11	CASS	LRSSG	EQYF	2-7.01	3	42.9		
		12	CA	TSPLGM	HNEQFF	2-1.01	3	42.9		
VB18	TRBV18	11	CASSP	QGG	TEAFF	1-1.01	1	6.3		
		12	CASS	QRG	VNTEAFF	1-1.01	1	6.3		
		12	CASS	AGTV	HNEQFF	2-1.01	1	6.3		
		12	CASSP	MAA	EETQYF	2-5.01	1	6.3		
		12	CASSP	GSAR	ETQYF	2-5.01	1	6.3		
		12	CASS	RSRDS	YEQYF	2-7.01	2	12.5		
		12	CASSP	TRTAL	EQYF	2-7.01	2	12.5		
		13	CASS	LPGT	DQETQYF	2-5.01	2	12.5		
		13	CASSP	DQGPQ	YEQYF	2-7.01	2	12.5		
		16	CASSP	PSLRGR	TGELFF	2-2.01	1	6.3		
		17	CASSP	YAPRLI	SGNTIYF	1-3.01	2	12.5		
VB22	TRBV2	13	CAS	RGTSL	AKNIQYF	2-4.01	1	16.7		
		13	CASR	TRRTGM	NEQFF	2-1.01	1	16.7		
		14	CASSE	GAVPNLG	TGYF	2-5.01	1	16.7		
		14	CASSEA	QQGY	GELFF	2-2.01	3	50.0		

Taula suplementària 1. Total de seqüències  $\beta$ -CDR3 en aminoàcids, obtingudes del clonatge de les cèl·lules T obtingudes dels illots pancreàtics purificats d'un malalt diabètic T1. Es va clonar i seqüenciar el producte amplificat a les mostres de illots purificats del donant diabètic T1 (DM-ISL), per a les famílies gèniques V $\beta$ 1, V $\beta$ 6, V $\beta$ 7, V $\beta$ 8, V $\beta$ 11, V $\beta$ 16, V $\beta$ 17, V $\beta$ 18 i V $\beta$ 22. La identificació de la zona CDR3 i l'assignació d'aminoàcids es feu amb les eines online de IMGT-International ImMunoGeneTics ([www.imgt.org](http://www.imgt.org), Université Montpellier 2, Montpellier, France).

\* Assignació VB segons la nomenclatura de Chitnis et al. en *Manual of clinical laboratory immunology.2002*

\*\* Assignació de la nomenclatura TRBV and TRBJ segons IMGT.

\*\*\* Nx indica el nombre de vegades que cada seqüència va ser clonada, i %, el percentatge que representa en la correspondent família gènica VB.

Seqüències  $\beta$ -CDR3 dels limfòcits T al teixit total del pàncrees diabètic.

VB	TRBV	Mida (aa)	V	N-D-N	J	TRBJ	Nx	%		
*	**	(aa)				**	***			
VB1	TRBV9	11	CASSV	AV	NYGYTF	1-2:01	1	3.3		
		11	CASSV	ST	TDTQYF	2-3:01	18	60.0		
		12	CASSV	AWG	QETQYF	2-5:01	4	13.3		
		12	CASS	KIRES	QGYTF	1-2:01	2	6.7		
		13	CASSV	GQSPH	YEQYF	2-7:01	3	10.0		
14	CASS	EGEGGL	QETQYF	2-5:01	2	6.7				
VB4	TRBV29-1	8	CS	ARTT	EAFF	1-1:01	4	9.1		
		8	CSVE	NP	GYTF	1-2:01	3	6.8		
		10	CS	GTTGS	YEQYF	2-7:01	1	2.3		
		10	CS	APROYR	EQFF	2-1:01	1	2.3		
		10	CSV	GP	LNTEAFF	1-1:01	2	4.5		
		10	CSV	VPG	NTEAFF	1-1:01	1	2.3		
		11	CS	ARTGP	ADTQYF	2-3:01	1	2.3		
		11	CS	ARWAER	NTQYF	2-3:01	1	2.3		
		11	CSV	ETQPG	ETQYF	2-5:01	2	4.5		
		11	CS	FNAEGVS	GYTF	1-2:01	3	6.8		
		11	CS	GGSLGK	EQFF	2-1:01	1	2.3		
		11	CSV	LGT	YNEQFF	2-1:01	2	4.5		
		11	CSV	LN	SGANLTF	2-6:01	2	4.5		
		11	CSV	VVRG	NTEAFF	1-1:01	3	6.8		
		12	CS	ARNRLG	NTYF	1-3:01	1	2.3		
		12	CS	HGGAG	TEAFF	1-1:01	1	2.3		
12	CSVD	TSQN	YNEQFF	2-1:01	2	4.5				
13	CSVE	ARGAG	DTQYF	2-3:01	3	6.8				
13	CSVE	LPQH	TDTQYF	2-3:01	1	2.3				
13	CSV	LSQEGE	YNEQFF	2-1:01	2	4.5				
14	CSVE	YQRGGR	TDTQYF	2-3:01	3	6.8				
14	CS	ARGSGGAG	ETQYF	2-5:01	2	4.5				
16	CSVE	GGILSG	TGELFF	2-2:01	2	4.5				
VB7	TRBV4-2	12	CASSQ	AAGS	TEAFF	1-1:01	5	17.2		
		12	CASSQ	DPA	TDTQYF	2-3:01	1	3.4		
		14	CASSQ	VAGAG	TGELFF	2-2:01	18	62.1		
		14	CASSQ	EGGS	SNQPHF	1-5:01	2	6.9		
		14	CASSQ	IQGL	QDTQYF	2-3:01	1	3.4		
		15	CASSQ	SSLGAP	TDTQYF	2-3:01	2	6.9		
VB8	TRBV12-3	9	CAS	RQ	YGYTF	1-2:01	1	8.3		
		9	CAS	RR	YGYTF	1-2:01	1	8.3		
		10	CASSP	TR	GELFF	2-2:01	1	8.3		
		11	CASS	RPRQG	EAFF	1-1:01	1	8.3		
		12	CASSP	PA	STDQYF	2-3:01	1	8.3		
		13	CASSL	DRV	QDTQYF	2-3:01	1	8.3		
		13	CASSLA	GTSG	ETQYF	2-5:01	1	8.3		
		13	CASSL	RQRE	ETQYF	2-5:01	1	8.3		
		14	CASSL	GSAGNG	YGYTF	1-2:01	1	8.3		
		15	CASS	TTSGGT	YNEQFF	2-1:01	1	8.3		
15	CASS	LATSGA	STDQYF	2-3:01	2	16.7				
VB9	TRBV3-1	10	CASS	AS	DYGYTF	1-2:01	6	14.3		
		11	CAS	LSGG	TDTQYF	2-3:01	1	2.4		
		12	CAS	GGGGI	FDTQYF	2-3:01	7	16.7		
		12	CASSQ	GS	NYGYTF	1-2:01	4	9.5		
		12	CASS	PRGN	NSPLHF	1-6:02	3	7.1		
		13	CASS	DSRASF	YEQYF	2-7:01	5	11.9		
		13	CASSQ	VTGVG	ETQYF	2-5:01	2	4.8		
		14	CASSQ	KMSLGA	TQYF	2-3:01	5	11.9		
		14	CASSQ	LKGPS	SYEQYF	2-7:01	2	4.8		
14	CASS	RKQTS	STDQYF	2-3:01	7	16.7				
VB11	TRBV25-1	9	CASS	QNI	EQFF	2-1:01	4	16.0		
		11	CASSD	-	TNTGELFF	2-2:01	5	20.0		
		12	CASSD	PGT	QETQYF	2-5:01	1	4.0		
		14	CAS	TPNKGRG	QPQHF	1-5:01	7	28.0		
		15	CASSE	LGGG	QDTQYF	2-3:01	3	12.0		
		16	CASSE	WGLSGE	YQETQYF	2-5:01	5	20.0		
VB16	TRBV14	9	CASSQ	GV	EAFF	1-1:01	4	22.2		
		10	CASSQD	V	NEQFF	2-1:01	1	5.6		
		12	CASSQ	LAGGW	EQYV	2-7:02	1	5.6		
		13	CASSH	RQMN	YNEQFF	2-1:01	10	55.6		
		13	CASSQ	DTGA	YNEQFF	2-1:01	2	11.1		
VB17	TRBV19	10	CASS	LP	YQPQHF	1-5:01	1	3.1		
		11	CASSI	QDG	ETQYF	2-5:01	2	6.3		
		12	CA	QGSTAF	TGELFF	2-2:01	1	3.1		
		12	CA	TSPLGM	HNEQFF	2-1:01	11	34.4		
		12	CASS	TTGVG	TEAFF	1-1:01	1	3.1		
		13	CAS	TPAASGC	EQFF	2-1:01	1	3.1		
		13	CA	TQWTGAF	NYGYTF	1-2:01	1	3.1		
		13	CASSI	AGGSA	NEQFF	2-1:01	2	6.3		
		13	CASSI	APF	QNPQHF	1-5:01	4	12.5		
		13	CASH	DERDAKT	EAFF	1-1:01	4	12.5		
		14	CASS	FLGGR	QETQYF	2-5:01	2	6.3		
		14	CASS	IGTSL	TDTQYF	2-3:01	1	3.1		
		15	CAS	KESPGGL	YNEQFF	2-1:01	1	3.1		
		VB18	TRBV18	12	CASSP	AGI	QETQYF	2-5:01	8	22.9
				12	CASSP	KGG	ADTQYF	2-3:01	3	8.6
12	CAS			FTGG	NTGELFF	2-2:01	3	8.6		
12	CASSP			SGL	YGYTF	1-2:01	3	8.6		
13	CASSP			RQDL	NSPLHF	1-6:02	5	14.3		
14	CASSP			LQAS	TDTQYF	2-3:01	3	8.6		
16	CASS			GLTAAGDY	QSPHF	1-6:02	7	20.0		
17	CASSP			YAPDLI	SGHTYF	1-3:01	3	8.6		
VB22	TRBV2	11	CASSPR	GAY	EQYV	2-7:02	2	9.5		
		12	CAS	IQDS	SONTYF	1-3:01	1	4.8		
		13	CASH	TRRTGM	NEOFF	2-1:01	3	14.3		
		14	CASSE	QGGY	TGELFF	2-2:01	15	71.4		

Taula suplementària 2. Total de seqüències  $\beta$ -CDR3 en aminoàcids, obtingudes del digèrit total del pàncrees (endocrí i exocrí) d'un malalt diabètic T1. Es va clonar i seqüènciar el producte amplificat a la mostra del digèrit total del donant diabètic T1 (DM-TD), per a les famílies gèniques per a les famílies gèniques VB1, VB4, VB7, VB8, VB9, VB11, VB16, VB17, VB18 i VB22. La identificació de la zona CDR3 i l'assignació d'aminoàcids es feu amb les eines online IMGT-International ImMunoGeneTics ([www.imgt.org](http://www.imgt.org), Université Montpellier 2, Montpellier, France). S'indica remarcades en gris les seqüències corresponents a les expansions clonals dominants al teixit.

\* Assignació VB segons la nomenclatura de Chitnis et al. en *Manual of clinical laboratory immunology, 2002*

\*\* Assignació de la nomenclatura TRBV and TRBJ segons IMGT.

\*\*\* Nx indica el nombre de vegades que cada seqüència va ser clonada, i %, el percentatge que representa en la correspondent família gènica VB.

Seqüències  $\beta$ -CDR3 dels limfòcits T en la melsa del diabètic T1.

VB *	TRBV **	Mida (aa)	V	N-D-N	J	TRBJ **	Nx ***	%
VB1	TRBV9	9	CASSV	R	ETQYF	2-5.01	1	5.3
		11	CASSV	GVT	EPQHF	1-5.01	1	5.3
		11	CASSV	TV	TDTQYF	2-3.01	1	5.3
		12	CASS	ATGG	TDTQYF	2-3.01	1	5.3
		12	CASS	DEGY	GNTIYF	1-3.01	3	15.8
		12	CASSV	EPR	NTEAFF	1-1.01	1	5.3
		12	CASSV	GL	AKNIQYF	2-4.01	1	5.3
		12	CASS	LGTGVV	EQYF	2-7.01	1	5.3
		12	CASS	PGSQTG	EQYV	2-7.02	2	10.5
		12	CASS	VN	TGANVLT	2-6.01	1	5.3
		13	CASSV	GAGGA	DTQYF	2-3.01	1	5.3
		13	CASSV	DRGG	QETQYF	2-5.01	1	5.3
		13	CASSV	GEI	PYEQYF	2-7.01	1	5.3
		15	CASSV	GFGQGVG	QPQHF	1-5.01	1	5.3
		15	CASS	KTPTGGLV	GELFF	2-2.01	1	5.3
		15	CASS	PNIGQDV	GNTIYF	1-3.01	1	5.3
VB16	TRBV14	9	CASS	R	HNEQFF	2-1.01	1	4.0
		11	CASSQ	AR	TDTQYF	2-3.01	1	4.0
		11	CASSH	GTGQ	GYTF	1-2.01	1	4.0
		12	CASSQ	GRH	TDTQYF	2-3.01	1	4.0
		12	CASS	PSRY	TDTQYF	2-3.01	1	4.0
		13	CASSH	RQMN	YNEQFF	2-1.01	16	64.0
		15	CASS	RKLTGP	HTGELFF	2-2.01	2	8.0
		17	CASS	PGVLAGGPL	YNEQFF	2-1.01	2	8.0
VB22	TRBV2	10	CASS	LDR	NEQFF	2-1.01	1	3.8
		11	CAS	TAGK	TEAFF	1-1.01	1	3.8
		12	CAS	IQDS	SGNTIYF	1-3.01	1	3.8
		13	CASSE	QGARL	YEQYF	2-7.01	1	3.8
		13	CASS	GTGGH	YNEQFF	2-1.01	1	3.8
		13	CASR	VRQGAR	ETQYF	2-5.01	1	3.8
		14	CASSE	GAVPNLGT	QYF	2-7.01	1	3.8
		14	CAS	GQRRGPD	RELFF	2-2.01	1	3.8
		14	CASSEA	QQGY	GELFF	2-2.01	18	69.2

**Taula suplementària 3. Total de seqüències  $\beta$ -CDR3 en aminoàcids, obtingudes del clonatge de les cèl·lules T en la melsa del donant diabètic T1.** Es va clonar i sequenciar el producte amplificat de tres blocs independents de la melsa, per a les famílies gèniques V $\beta$ 1, V $\beta$ 16 i V $\beta$ 22 (que presenten pics de genotipatge >50%) La identificació de la zona CDR3 i l'assignació d'aminoàcids es feu amb les eines online IMGT-International ImMunoGeneTics ([www.imgt.org](http://www.imgt.org), Université Montpellier 2, Montpellier, France). S'indica remarcades en gris les seqüències d'identitats corresponents a les expansions clonals dominants al pàncrees.

\* Assignació VB segons la nomenclatura de Chitnis et al. en *Manual of clinical laboratory immunology*.2002.

\*\* Assignació de la nomenclatura TRBV and TRBJ segons IMGT.

\*\*\* Nx indica el nombre de vegades que cada seqüència va ser clonada, i %, el percentatge que representa en la correspondent família gènica VB.

### Seqüències $\beta$ -CDR3 dels limfòcits T als PBMCs del diabètic T1

VB7 (TRBV4)					
Mida (aa)	V	N-D-N	J	TRBJ	Freqüència
12	CASS	LAGS	YNEQFF	2-1	1/15
12	CASS	QQGQG	HEQYF	2-7	1/15
12	CASS	LAGS	HNEQFF	2-1	1/15
12	CASSQ	GDT	AYEQYF	2-7	1/15
12	CASS	PGQG	NNEQFF	2-1	1/15
12	CASS	PARR	TGELFF	2-2	1/15
13	CASSQD	PG	GTDTQYF	2-3	1/15
13	CASS	SGTGD	TDTQYF	2-3	1/15
13	CASSQ	VGRVD	ETQYF	2-5	1/15
13	CASSQ	LRGSS	YEQYF	2-7	1/15
13	CASS	LNDDR	DNEQFF	2-1	1/15
14	CASSQD	RAEK	YNEQFF	2-1	1/15
14	CASS	EPTGTKI	AEAFF	1-1	1/15
14	CASSQ	ETGAT	NTEAFF	1-1	1/15
16	CASS	QVSGGAFS	TDTQYF	2-3	1/15

VB16 (TRBV14)					
Mida (aa)	V	N-D-N	J	TRBJ	Freqüència
10	CASS	F	YNSPLHF	1-6	1/18
11	CASS	LFRDI	GYTF	1-2	1/18
11	CASSQ	NPQGP	KYF	2-5	1/18
12	CASS	LWTGG	SEAFF	1-1	1/18
12	CASS	LSNSL	YGTF	1-2	1/18
12	CASSP	LT	GTDTQYF	2-3	1/18
13	CASS	LHGGG	YNEQFF	2-1	2/18
13	CASSH	LTSGVV	EQFF	2-1	2/18
13	CASS	RAGF	AYNEQFF	2-1	3/18
14	CASSQ	VTTGL	YNEQFF	2-1	1/18
14	CASSQE	RV	SGANLTF	2-6	1/18
14	CASSQ	RLTPF	PYEQYF	2-7	2/18
15	CASSQ	PRDSL	NTEAFF	1-1	1/18

VB22 (TRBV2)					
Mida (aa)	V	N-D-N	J	TRBJ	Freqüència
11	CASS	VGR	QETQYF	2-5	1/11
11	CASS	AN	TYNEQFF	2-1	1/11
12	CASS	GLST	TDTQYF	2-3	1/11
13	CASR	TRRTGM	NEQFF	2-1	2/11
13	CASS	DRGL	SNQPQHF	1-5	1/11
13	CASSEA	VGG	PYEQYF	2-7	1/11
14	CASSEA	QQGY	SGELFF	2-2	2/11
14	CASS	FDSGA	SYNEQFF	2-1	1/11
15	CASSEA	PAGGVG	NEQFF	2-1	1/11

Taula Suplementària 4. Total de seqüències  $\beta$ -CDR3 en aminoàcids, obtingudes del clonatge de tres famílies gèniques per a les cèl·lules T de sang perifèrica (PBMCs) del donant diabètic T1. Es va clonar i seqüènciar el producte amplificat a la mostra DM-PB del diabètic, per a les famílies gèniques V $\beta$ 7 (com a control), V $\beta$ 16 i V $\beta$ 22 (que mostraven expansions clonals a la melsa). La identificació de la zona CDR3 i l'assignació d'aminoàcids es feu amb les eines online IMGT-International ImMunoGeneTics ([www.imgt.org](http://www.imgt.org), Université Montpellier 2, Montpellier, France). S'indica com a « freqüència » el nombre de vegades que cada seqüència va ser identificada al total de seqüències clonades.

# MATERIALS I MÈTODES SUPLEMENTARIS





❖ **PCR Multiplex V $\alpha$ : Descripció de les famílies V $\alpha$  presents en cada mostra.**  
**Protocol optimitzat al treball de Màster d'Erika Scholz:**

1. Panell de *primers* utilitzats:

Per a la realització de la PCR Multiplex es va utilitzar el panell de *primers* prèviament descrit per Genevée et al; conformat per un total de 29 oligonucleòtids. La nomenclatura ha estat revisada amb l'eina online FASTA i les bases de dades de seqüències de EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute). Es manté la nomenclatura original, tal i com es descriu en l'article de referència.

2. Barreja de *primers* (MIXs):

El punt de partida van ser els grups (MIXs) de *primers* del total de les 29 famílies V $\alpha$ , que havien estat agrupats segons paràmetres compatibles de temperatura de *annealing* i mida del amplímer. D'aquesta forma es van obtenir 12 MIXs els quals es van nomenar seguint un ordre seqüencial, iniciant en el MIX I fins al MIX XII. A la Taula adjunta es resumeix el disseny final dels grups de MIXs, tal com es van utilitzar:

Mezcla de Primers ( 29 familias V $\alpha$ ) MIX I a MIX XII			
MIX's	Primers (Preparación)	Relación de volúmenes*	Concentración
MIX I	V $\alpha$ 1, V $\alpha$ 12, V $\alpha$ 18	1 : 1 : 1	1,7 $\mu$ M; 1,7 $\mu$ M; 1,7 $\mu$ M
MIX II	V $\alpha$ 8, V $\alpha$ 24	1 : 1	2,5 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M
MIX III	V $\alpha$ 2, V $\alpha$ 17, V $\alpha$ 23	1 : 1 : 1	1,7 $\mu$ M; 1,7 $\mu$ M; 1,7 $\mu$ M
MIX IV	V $\alpha$ 9, V $\alpha$ 20, V $\alpha$ 26	1 : 1 : 2	1,25 $\mu$ M; 1,25 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M
MIX V	V $\alpha$ 21, V $\alpha$ 22	1,5 : 1	4,5 $\mu$ M; 3 $\mu$ M
MIX VI	V $\alpha$ 15, V $\alpha$ 16	1 : 1,5	2 $\mu$ M; 3 $\mu$ M
MIX VII	V $\alpha$ 3, V $\alpha$ 4	1 : 1	2,5 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M
MIX VIII	V $\alpha$ 5, V $\alpha$ 7, V $\alpha$ 10	1 : 1 : 1	1,7 $\mu$ M; 1,7 $\mu$ M; 1,7 $\mu$ M
MIX IX	V $\alpha$ 9, V $\alpha$ 11, V $\alpha$ 28	1 : 1 : 2	1,88 $\mu$ M; 1,88 $\mu$ M; 3,75 $\mu$ M
MIX X	V $\alpha$ 13, V $\alpha$ 27	1 : 1	2,5 $\mu$ M; 2,5 $\mu$ M
MIX XI	V $\alpha$ 14, H <sub>2</sub> O	1 : 2	1,7 $\mu$ M
MIX XII	V $\alpha$ 6, V $\alpha$ 25	1 : 1	3,75 $\mu$ M; 3,75 $\mu$ M

Taula. Barreja de *primers* MIX I a MIX XII, aplicats.

\* Volums adaptats per compensar diferències d'amplificació segons l'afinitat per la cadena motlle i la competència entre ells pels reactius d'amplificació. És necessari per aconseguir que les mostres controls (PBMCs i melses) presentin totes les bandes; les mostres del donant T1D no presentaran inconvenients ja que en ser oligoclonals, els *primers* no competiran.

La tècnica seguida per la PCR-Multiplex va ser la següent: 1  $\mu$ L (30ng) de cDNA es va addicionar a una barreja conformada per: 1,5  $\mu$ L de Reaction Buffer with 2mm MgCl<sub>2</sub> 10X (Biotools ®); 1,5  $\mu$ L de dNTP a 2,5 mM cadascun, 1,5  $\mu$ L de primer constant (C $\alpha$ ) 5mm i 0,45  $\mu$ L Taq Polimerasa (Biotools ®) 1U/ $\mu$ L, completada fins a un volum final de 11,75  $\mu$ L amb aigua de PCR (Biotools ®). Seguidament, a cada tub es van afegir 2,25  $\mu$ L de la barreja de *primers* (MIXs) de la regió variable corresponent (Taula adjunta), obtenint d'aquesta manera un volum final de reacció de 15  $\mu$ L / tub (12,75  $\mu$ L de la barreja de PCR i 2.25  $\mu$ L de cada MIX de *primers* corresponent). Es va aplicar un programa consens per poder amplificar tots els *primers* de cada MIX (MIX I-XII) al mateix temps: 3 'a 97°C de

desnaturalització inicial, seguit de 35 cicles de 1' a 94°C de desnaturalització, 1' a 60 ° C de *annealing* i 1' a 72 ° C d'elongació. Finalment 5' a 72 ° C d'extensió final. Per poder controlar possibles contaminacions, es va realitzar en paral·lel un control negatiu, en qual es substituïa el cDNA per aigua de PCR (Biotools ®).

3. Electroforesi en gel d'agarosa: Visualització de producte amplificat Vα`s.

Es va preparar un gel d'agarosa d'Alta Resolució AG-5 (Ecogen®) al 2% en tampó TAE 1X, el qual es va deixar polimeritzar durant 20' a 4°C. Es van carregar en cada pou del gel 6 µL del producte amplificat en la PCR-Multiplex, amb 1 µL de tampó de càrrega estàndard (20% glicerol, 1% de SDS; 0,1 M d'EDTA i 0,25% de blau de bromofenol). El marcador de pes molecular utilitzat va ser GC-015-004 100 bp (Genecraft ®), la migració electroforètica es va fer a 70 volts (45-65 mA) durant tres hores. Es va verificar la presència de bandes en els pous corresponents a la mostra i l'absència d'aquestes en l'àrea del control negatiu.

4. Genotipatge (Spectratyping)

Per al genotipatge es va realitzar una reacció de marcatge (Run-off) de tres cicles a partir del producte amplificat de la PCR-Multiplex però amb un *primer* de la regió constant (anti-sense 5'GTCACCTGGATTTAGAGTCT3') més intern i marcat amb fluorocrom FAM, el protocol seguit va ser:

Es va preparar una Master Mix a partir de: 1,5 µL de Reaction Buffer (Biotools ®) 10X; 1,5 µL de dNTPs 2,5 mM cada un; 0,75 µL de *primer* constant (Cα) marcat amb FAM 5mM; 0,45 µL de Taq Polimerasa (Biotools ®) 1U / µL i aigua de PCR (Biotools ®) fins completar un volum final de 11,25 µL. Després de barrejar molt bé amb la pipeta s'afegí 3,75 µL del producte amplificat de la PCR-Multiplex a cada tub de reacció. El procés d'amplificació seguit van ser tres cicles de: 3' a 95°C; 2' a 60°C i 20' a 72°C. El producte marcat va ser processat en l'Autoanalitzador ABI 3130XL (Applied Biosystems ®), per electroforesi en matriu POP 7 a capil·lars de 50 cm, (Servei de Àcids Nucleics de la UAB). L'anàlisi dels resultats es va realitzar amb el programari Peak Scanner™. Per l'anàlisi i interpretació de les dades, es va definir com a criteri d'expansió clonal dels pics d'àrea superior a la suma de tres vegades l'àrea dels pics confrontants.



## ARTICLE PULICAT





# BIBLIOGRAFIA

•BIBLIOGRAFIA•

1. Lefranc MP, Lefranc G: **The T cell receptor facts book**: Academic press; 2001.
2. Lefranc MP: **Organization of the human T-cell receptor genes**. *Eur Cytokine Netw* 1990, **1**(3):121-130.
3. Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC: **Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2**. *Nature* 1996, **384**(6605):134-141.
4. Garcia KC, Degano M, Stanfield RL, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA: **An  $\alpha\beta$  T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex**. *Science* 1996, **274**:209-219.
5. Davis MM, Bjorkman PJ: **T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition**. *Nature* 1988, **334**(6181):395-402.
6. Chothia C, Boswell DR, Lesk AM: **The outline structure of the T-cell alpha beta receptor**. *Embo J* 1988, **7**(12):3745-3755.
7. Kedzierska K, La Gruta NL, Stambas J, Turner SJ, Doherty PC: **Tracking phenotypically and functionally distinct T cell subsets via T cell repertoire diversity**. *Molecular immunology* 2008, **45**(3):607-618.
8. Gras S, Kjer-Nielsen L, Burrows SR, McCluskey J, Rossjohn J: **T-cell receptor bias and immunity**. *Current opinion in immunology* 2008, **20**(1):119-125.
9. Krogsgaard M, Davis MM: **How T cells 'see' antigen**. *Nat Immunol* 2005, **6**(3):239-245.
10. Genevee C, Diu A, Nierat J, Caignard A, Dietrich PY, Ferradini L, Roman-Roman S, Triebel F, Hercend T: **An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V alpha 1-w29/V beta 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction**. *Eur J Immunol* 1992, **22**(5):1261-1269.
11. Murphy K, Travers P, Walport M: **Janeway's Immunobiology. Seventh Edition.**: Garland Science; 2008.
12. Scaviner D, Lefranc MP: **The human T cell receptor alpha variable (TRAV) genes**. *Exp Clin Immunogenet* 2000, **17**(2):83-96.
13. Scaviner D, Lefranc MP: **The human T cell receptor alpha joining (TRAJ) genes**. *Exp Clin Immunogenet* 2000, **17**(2):97-106.
14. Wilson RK, Lai E, Concannon P, Barth RK, Hood LE: **Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families**. *Immunol Rev* 1988, **101**:149-172.
15. Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA: **Kuby Immunology 6/e edn**: W.H. Freeman; 2006.
16. Rowen L, Koop BF, Hood L: **The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus**. *Science* 1996, **272**(5269):1755-1762.
17. Toyonaga B, Yoshikai Y, Vadasz V, Chin B, Mak TW: **Organization and sequences of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985, **82**(24):8624-8628.

• BIBLIOGRAFIA •

18. Folch G, Lefranc MP: **The human T cell receptor beta diversity (TRBD) and beta joining (TRBJ) genes.** *Exp Clin Immunogenet* 2000, **17**(2):107-114.
19. Maslanka K, Piatek T, Gorski J, Yassai M, Gorski J: **Molecular analysis of T cell repertoires. Spectratypes generated by multiplex polymerase chain reaction and evaluated by radioactivity or fluorescence.** *Human immunology* 1995, **44**(1):28-34.
20. Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L: **An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH.** *Cell* 1980, **19**(4):981-992.
21. Takihara Y, Champagne E, Ciccone E, Moretta L, Minden M, Mak TW: **Organization and orientation of a human T cell receptor delta chain V gene segment that suggests an inversion mechanism is utilized in its rearrangement.** *Eur J Immunol* 1989, **19**(3):571-574.
22. Fugmann SD, Lee AI, Shockett PE, Villey IJ, Schatz DG: **The RAG proteins and V(D)J recombination: complexes, ends, and transposition.** *Annu Rev Immunol* 2000, **18**:495-527.
23. Padovan E, Casorati G, Dellabona P, Meyer S, Brockhaus M, Lanzavecchia A: **Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells.** *Science* 1993, **262**(5132):422-424.
24. Padovan E, Giachino C, Cella M, Valitutti S, Acuto O, Lanzavecchia A: **Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion.** *The Journal of experimental medicine* 1995, **181**(4):1587-1591.
25. Davodeau F, Peyrat MA, Romagne F, Necker A, Hallet MM, Vie H, Bonneville M: **Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes.** *The Journal of experimental medicine* 1995, **181**(4):1391-1398.
26. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A: **Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes.** *Nature* 1995, **375**(6527):148-151.
27. Matsui K, Boniface JJ, Steffner P, Reay PA, Davis MM: **Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(26):12862-12866.
28. Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, al-Ramadi BK, Kim YS, Maher SE, Bothwell AL, Margulies DH: **T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity.** *Science* 1994, **265**(5174):946-949.
29. Rudolph MG, Stanfield RL, Wilson IA: **How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors.** *Annu Rev Immunol* 2006, **24**:419-466.
30. Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA: **Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb.** *Science (New York, NY)* 1992, **257**(5072):919-927.
31. Madden DR, Garboczi DN, Wiley DC: **The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2.** *Cell* 1993, **75**(4):693-708.

32. Stern LJ, Wiley DC: **Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins.** *Structure (London, England: 1993)* 1994, **2(4)**:245-251.
33. Tynan FE, Borg NA, Miles JJ, Beddoe T, El-Hassen D, Silins SL, van Zuylen WJM, Purcell AW, Kjer-Nielsen L, McCluskey J *et al*: **High resolution structures of highly bulged viral epitopes bound to major histocompatibility complex class I. Implications for T-cell receptor engagement and T-cell immunodominance.** *The Journal of Biological Chemistry* 2005, **280(25)**:23900-23909.
34. Speir JA, Stevens J, Joly E, Butcher GW, Wilson IA: **Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa.** *Immunity* 2001, **14(1)**:81-92.
35. Garcia KC, Adams JJ, Feng D, Ely LK: **The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple.** *Nat Immunol* 2009, **10(2)**:143-147.
36. Reiser J-B, Darnault C, Grégoire C, Mosser T, Mazza G, Kearney A, van der Merwe PA, Fontecilla-Camps JC, Housset D, Malissen B: **CDR3 loop flexibility contributes to the degeneracy of TCR recognition.** *Nature Immunology* 2003, **4(3)**:241-247.
37. Nishio J, Suzuki M, Nanki T, Miyasaka N, Kohsaka H: **Development of TCRB CDR3 length repertoire of human T lymphocytes.** *Int Immunol* 2004, **16(3)**:423-431.
38. Jorgensen JL, Reay PA, Ehrlich EW, Davis MM: **Molecular components of T-cell recognition.** *Annu Rev Immunol* 1992, **10**:835-873.
39. Colf LA, Bankovich AJ, Hanick NA, Bowerman NA, Jones LL, Kranz DM, Garcia KC: **How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC.** *Cell* 2007, **129(1)**:135-146.
40. Garboczi DN, Biddison WE: **Shapes of MHC restriction.** *Immunity* 1999, **10(1)**:1-7.
41. Abbas A, Lichtman, A.H., Pober, J: **Inmunología Celular y Molecular.** McGrawHill.; 1999.
42. Scollay RG, Butcher EC, Weissman IL: **Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice.** *Eur J Immunol* 1980, **10(3)**:210-218.
43. Egerton M, Scollay R, Shortman K: **Kinetics of mature T-cell development in the thymus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87(7)**:2579-2582.
44. Goldrath AW, Bevan MJ: **Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire.** *Nature* 1999, **402(6759)**:255-262.
45. 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.** *Journal of autoimmunity* 2005, **25(4)**:312-318.
46. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW: **Autoreactive T cells in healthy individuals.** *J Immunol* 2004, **172(10)**:5967-5972.
47. Kamradt T, Mitchison NA: **Tolerance and autoimmunity.** *The New England Journal of Medicine* 2001, **344(9)**:655-664.

48. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L *et al*: **X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy.** *Nature Genetics* 2001, **27**(1):18-20.
49. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: **The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.** *Nature Genetics* 2001, **27**(1):20-21.
50. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F: **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** *Nature Genetics* 2001, **27**(1):68-73.
51. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI: **Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes.** *Diabetes* 2005, **54**(1):92-99.
52. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA: **Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.** *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(7):971-979.
53. Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM: **Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II.** *The Journal of experimental medicine* 2004, **199**(9):1285-1291.
54. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA: **Insulitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man--macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells.** *J Pathol* 1991, **165**(2):97-103.
55. Atkinson MA, Maclaren NK: **The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.** *N Engl J Med* 1994, **331**(21):1428-1436.
56. Eisenbarth GS: **Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease.** *N Engl J Med* 1986, **314**(21):1360-1368.
57. Spencer J, Peakman M: **Post-mortem analysis of islet pathology in type 1 diabetes illuminates the life and death of the beta cell.** *Clin Exp Immunol* 2009, **155**(2):125-127.
58. Besser GM, Bodansky HJ, Cudworth AG: **Clinical diabetes**; 1988.
59. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D: **Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies.** *Lancet* 1974, **2**(7892):1279-1283.
60. Lendrum R, Nelson PG, Pyke DA, Walker G, Gamble DR: **Islet-cell, thyroid, and gastric autoantibodies in diabetic identical twins.** *Br Med J* 1976, **1**(6009):553-555.
61. Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C, Vives-Pi M, Fernandez-Figueras MT, Ariza A, Gomis R, Bragado R, Marti M, Jaraquemada D *et al*: **Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile.** *J Immunol* 1994, **153**(3):1360-1377.



62. Knip M, Siljander H: **Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes**. *Autoimmunity reviews* 2008, **7**(7):550-557.
63. Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ, Hafler DA: **Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope**. *Nature* 2005, **435**(7039):224-228.
64. O'Reilly LA, Hutchings PR, Crocker PR, Simpson E, Lund T, Kioussis D, Takei F, Baird J, Cooke A: **Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression**. *Eur J Immunol* 1991, **21**(5):1171-1180.
65. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG: **Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes**. *Clin Exp Immunol* 2009, **155**(2):173-181.
66. Santamaria P, Utsugi T, Park BJ, Averill N, Kawazu S, Yoon JW: **Beta-cell-cytotoxic CD8+ T cells from nonobese diabetic mice use highly homologous T cell receptor alpha-chain CDR3 sequences**. *J Immunol* 1995, **154**(5):2494-2503.
67. Gillespie KM: **Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention**. *Cmaj* 2006, **175**(2):165-170.
68. Notkins AL, Lernmark A: **Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues**. *J Clin Invest* 2001, **108**(9):1247-1252.
69. von Herrath M, Sanda S, Herold K: **Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease?** *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(12):988-994.
70. Hiemstra HS, Schloot NC, van Veelen PA, Willemsen SJ, Franken KL, van Rood JJ, de Vries RR, Chaudhuri A, Behan PO, Drijfhout JW *et al*: **Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(7):3988-3991.
71. Ou D, Mitchell LA, Metzger DL, Gillam S, Tingle AJ: **Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type I diabetes mellitus**. *Diabetologia* 2000, **43**(6):750-762.
72. Rosu V, Ahmed N, Paccagnini D, Gerlach G, Fadda G, Hasnain SE, Zanetti S, Sechi LA: **Specific immunoassays confirm association of Mycobacterium avium Subsp. paratuberculosis with type-1 but not type-2 diabetes mellitus**. *PloS one* 2009, **4**(2):e4386.
73. Akerblom HK, Knip M: **Putative environmental factors in Type 1 diabetes**. *Diabetes/metabolism reviews* 1998, **14**(1):31-67.
74. Lefebvre DE, Powell KL, Strom A, Scott FW: **Dietary proteins as environmental modifiers of type 1 diabetes mellitus**. *Annual review of nutrition* 2006, **26**:175-202.
75. Mathieu C, Badenhoop K: **Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art**. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2005, **16**(6):261-266.
76. Bach JF: **The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases**. *N Engl J Med* 2002, **347**(12):911-920.
77. Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J: **Psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy**. *Diabetes care* 2005, **28**(2):290-295.

78. Polychronakos C, Li Q: **Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**(11):781-792.
79. Jahromi MM, Eisenbarth GS: **Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2007, **64**(7-8):865-872.
80. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvennick N: **Diabetes induced by Coxsackie virus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry.** *Nat Med* 1998, **4**(7):781-785.
81. Drescher KM, Kono K, Bopegamage S, Carson SD, Tracy S: **Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection.** *Virology* 2004, **329**(2):381-394.
82. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK: **Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes.** *The Journal of Clinical Investigation* 1994, **94**(5):2125-2129.
83. Martinic MM, Huber C, Coppieters K, Oldham JE, Gavin AL, von Herrath MG: **Expression level of a pancreatic neo-antigen in beta cells determines degree of diabetes pathogenesis.** *Journal of autoimmunity* 2010, **35**(4):404-413.
84. Wucherpfennig KW, Strominger JL: **Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein.** *Cell* 1995, **80**(5):695-705.
85. Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J, Melief CJ, Cerny A: **Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition.** *The Journal of experimental medicine* 1999, **190**(2):169-176.
86. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A: **The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(7):2334-2339.
87. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB: **Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains.** *Endocrine reviews* 2007, **28**(1):84-116.
88. Sia C: **Autoimmune diabetes: ongoing development of immunological intervention strategies targeted directly against autoreactive T cells.** *Rev Diabet Stud* 2004, **1**(1):9-17.
89. Kelemen K: **The role of T cells in beta cell damage in NOD mice and humans.** *Advances in experimental medicine and biology* 2004, **552**:117-128.
90. Haskins K: **Pathogenic T-cell clones in autoimmune diabetes: more lessons from the NOD mouse.** *Advances in immunology* 2005, **87**:123-162.
91. Hanninen A, Salmi M, Simell O, Jalkanen S: **Endothelial cell-binding properties of lymphocytes infiltrated into human diabetic pancreas. Implications for pathogenesis of IDDM.** *Diabetes* 1993, **42**(11):1656-1662.
92. Santamaria P, Nakhleh RE, Sutherland DE, Barbosa JJ: **Characterization of T lymphocytes infiltrating human pancreas allograft affected by isletitis and recurrent diabetes.** *Diabetes* 1992, **41**(1):53-61.

93. Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M *et al*: **Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients.** *J Clin Invest* 1993, **92**(5):2313-2322.
94. Planas R, Carrillo J, Sanchez A, de Villa MC, Nunez F, Verdaguer J, James RF, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M: **Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes.** *Clin Exp Immunol* 2010, **159**(1):23-44.
95. Mannering SI, Morris JS, Stone NL, Jensen KP, PM VANE, Harrison LC: **CD4+ T cell proliferation in response to GAD and proinsulin in healthy, pre-diabetic, and diabetic donors.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2004, **1037**:16-21.
96. Mannering SI, Pang SH, Williamson NA, Naselli G, Reynolds EC, O'Brien-Simpson NM, Purcell AW, Harrison LC: **The A-chain of insulin is a hot-spot for CD4+ T cell epitopes in human type 1 diabetes.** *Clin Exp Immunol* 2009, **156**(2):226-231.
97. Danke NA, Yang J, Greenbaum C, Kwok WW: **Comparative study of GAD65-specific CD4+ T cells in healthy and type 1 diabetic subjects.** *Journal of autoimmunity* 2005, **25**(4):303-311.
98. Lieberman SM, DiLorenzo TP: **A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes.** *Tissue Antigens* 2003, **62**(5):359-377.
99. Rudy G, Stone N, Harrison LC, Colman PG, McNair P, Brusica V, French MB, Honeyman MC, Tait B, Lew AM: **Similar peptides from two beta cell autoantigens, proinsulin and glutamic acid decarboxylase, stimulate T cells of individuals at risk for insulin-dependent diabetes.** *Molecular Medicine (Cambridge, Mass)* 1995, **1**(6):625-633.
100. Alleva DG, Crowe PD, Jin L, Kwok WW, Ling N, Gottschalk M, Conlon PJ, Gottlieb PA, Putnam AL, Gaur A: **A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin.** *The Journal of Clinical Investigation* 2001, **107**(2):173-180.
101. Durinovic-Bellò I, Hummel M, Ziegler AG: **Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM.** *Diabetes* 1996, **45**(6):795-800.
102. Kelemen K, Gottlieb PA, Putnam AL, Davidson HW, Wegmann DR, Hutton JC: **HLA-DQ8-associated T cell responses to the diabetes autoantigen phogrin (IA-2 beta) in human prediabetes.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2004, **172**(6):3955-3962.
103. Panagiotopoulos C, Qin H, Tan R, Verchere CB: **Identification of a beta-cell-specific HLA class I restricted epitope in type 1 diabetes.** *Diabetes* 2003, **52**(11):2647-2651.
104. Stadinski BD, DeLong T, Reisdorph N, Reisdorph R, Powell RL, Armstrong M, Piganelli JD, Barbour G, Bradley B, Crawford F *et al*: **Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes.** *Nat Immunol* 2010, **11**(3):225-231.
105. Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, Gibbs KA, Shah SC, Bu DF, Erlander MG, Tobin AJ, Maclaren NK: **Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes.** *Lancet* 1992, **339**(8791):458-459.

106. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF *et al*: **Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice.** *Nature* 2005, **435**(7039):220-223.
107. Jasinski JM, Eisenbarth GS: **Insulin as a primary autoantigen for type 1A diabetes.** *Clinical & developmental immunology* 2005, **12**(3):181-186.
108. Zhang L, Nakayama M, Eisenbarth GS: **Insulin as an autoantigen in NOD/human diabetes.** *Current opinion in immunology* 2008, **20**(1):111-118.
109. Panagiotopoulos C, Trudeau JD, Tan R: **T-cell epitopes in type 1 diabetes.** *Current diabetes reports* 2004, **4**(2):87-94.
110. Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO: **Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes.** *Clin Exp Immunol* 2007, **148**(1):1-16.
111. Durinovic-Bello I, Steinle A, Ziegler AG, Schendel DJ: **HLA-DQ-restricted, islet-specific T-cell clones of a type I diabetic patient. T-cell receptor sequence similarities to insulinitis-inducing T-cells of nonobese diabetic mice.** *Diabetes* 1994, **43**(11):1318-1325.
112. Lohmann T, Leslie RD, Hawa M, Geysen M, Rodda S, Londei M: **Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 in insulin-dependent diabetes mellitus.** *Lancet* 1994, **343**(8913):1607-1608.
113. Hawkes CJ, Schloot NC, Marks J, Willemsen SJ, Drijfhout JW, Mayer EK, Christie MR, Roep BO: **T-cell lines reactive to an immunodominant epitope of the tyrosine phosphatase-like autoantigen IA-2 in type 1 diabetes.** *Diabetes* 2000, **49**(3):356-366.
114. Jarchum I, Nichol L, Trucco M, Santamaria P, DiLorenzo TP: **Identification of novel IGRP epitopes targeted in type 1 diabetes patients.** *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2008, **127**(3):359-365.
115. Chen HW, Liu SJ, Chong P, Sia C: **The Development and Application of HLA Tetramers in the Detection, Characterization and Therapy of Type 1 Diabetes Mellitus.** *Rev Diabet Stud* 2007, **4**(1):56-61.
116. Toma A, Laika T, Haddouk S, Luce S, Briand JP, Camoin L, Connan F, Lambert M, Caillat-Zucman S, Carel JC *et al*: **Recognition of human proinsulin leader sequence by class I-restricted T-cells in HLA-A\*0201 transgenic mice and in human type 1 diabetes.** *Diabetes* 2009, **58**(2):394-402.
117. Zamvil SS, Steinman L: **The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis.** *Annu Rev Immunol* 1990, **8**:579-621.
118. Cooper SM, Roessner KD, Naito-Hoopers M, Howard DB, Gaur LK, Budd RC: **Increased usage of V beta 2 and V beta 6 in rheumatoid synovial fluid T cells.** *Arthritis Rheum* 1994, **37**(11):1627-1636.
119. Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA: **T cell receptor V alpha-V beta repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions.** *The Journal of experimental medicine* 1992, **175**(4):993-1002.
120. Bovenschen HJ, Langewouters AMG, van de Kerkhof PCM: **Dimethylfumarate for Psoriasis.** *American Journal of Clinical Dermatology* 2010, **11**:343-350.

121. Balk SP, Ebert EC, Blumenthal RL, McDermott FV, Wucherpfennig KW, Landau SB, Blumberg RS: **Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes.** *Science* 1991, **253**(5026):1411-1415.
122. Abe J, Kotzin BL, Jujo K, Melish ME, Glode MP, Kohsaka T, Leung DY: **Selective expansion of T cells expressing T-cell receptor variable regions V beta 2 and V beta 8 in Kawasaki disease.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(9):4066-4070.
123. Abe J, Kotzin BL, Meissner C, Melish ME, Takahashi M, Fulton D, Romagne F, Malissen B, Leung DY: **Characterization of T cell repertoire changes in acute Kawasaki disease.** *The Journal of experimental medicine* 1993, **177**(3):791-796.
124. Nakano N, Kikutani H, Nishimoto H, Kishimoto T: **T cell receptor V gene usage of islet beta cell-reactive T cells is not restricted in non-obese diabetic mice.** *The Journal of experimental medicine* 1991, **173**(5):1091-1097.
125. Candéias S, Katz J, Benoist C, Mathis D, Haskins K: **Islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice express heterogeneous T-cell receptors.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(14):6167-6170.
126. Drexler K, Burtles S, Hurtenbach U: **Limited heterogeneity of T-cell receptor V beta gene expression in the early stage of insulinitis in NOD mice.** *Immunology Letters* 1993, **37**(2-3):187-196.
127. Galley KA, Danska JS: **Peri-islet infiltrates of young non-obese diabetic mice display restricted TCR beta-chain diversity.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 1995, **154**(6):2969-2982.
128. Komagata Y, Masuko K, Tashiro F, Kato T, Ikuta K, Nishioka K, Ito K, Miyazaki J, Yamamoto K: **Clonal prevalence of T cells infiltrating into the pancreas of prediabetic non-obese diabetic mice.** *International Immunology* 1996, **8**(6):807-814.
129. Yang Y, Charlton B, Shimada A, Dal Canto R, Fathman CG: **Monoclonal T cells identified in early NOD islet infiltrates.** *Immunity* 1996, **4**(2):189-194.
130. Sarukhan A, Bedossa P, Garchon HJ, Bach JF, Carnaud C: **Molecular analysis of TCR junctional variability in individual infiltrated islets of non-obese diabetic mice: evidence for the constitution of largely autonomous T cell foci within the same pancreas.** *Int Immunol* 1995, **7**(1):139-146.
131. Baker FJ, Lee M, Chien YH, Davis MM: **Restricted islet-cell reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(14):9374-9379.
132. Galley KA, Danska JS: **Peri-islet infiltrates of young non-obese diabetic mice display restricted TCR beta-chain diversity.** *J Immunol* 1995, **154**(6):2969-2982.
133. Conrad B, Weidmann E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriguez-Rilo H, Finegold D, Trucco M: **Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology.** *Nature* 1994, **371**(6495):351-355.
134. Santamaria P, Lewis C, Jessurun J, Sutherland DE, Barbosa JJ: **Skewed T-cell receptor usage and junctional heterogeneity among isletitis alpha beta and gamma delta T-cells in human IDDM [corrected].** *Diabetes* 1994, **43**(4):599-606.

135. Yang Y, Charlton B, Shimada A, Dal Canto R, Fathman CG: **Monoclonal T cells identified in early NOD islet infiltrates.** *Immunity* 1996, **4**(2):189-194.
136. Candeias S, Katz J, Benoist C, Mathis D, Haskins K: **Islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice express heterogeneous T-cell receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(14):6167-6170.
137. Kontiainen S, Toomath R, Lowder J, Feldmann M: **Selective activation of T cells in newly diagnosed insulin-dependent diabetic patients: evidence for heterogeneity of T cell receptor usage.** *Clin Exp Immunol* 1991, **83**(3):347-351.
138. Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaros G, Simell O: **Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus.** *J Clin Invest* 1992, **90**(5):1901-1910.
139. Luppi P, Zanone MM, Hyoty H, Rudert WA, Haluszczak C, Alexander AM, Bertera S, Becker D, Trucco M: **Restricted TCR V beta gene expression and enterovirus infection in type I diabetes: a pilot study.** *Diabetologia* 2000, **43**(12):1484-1497.
140. Yamagata K, Nakajima H, Tomita K, Itoh N, Miyagawa J, Hamaguchi T, Namba M, Tamura S, Kawata S, Kono N *et al*: **Dominant TCR alpha-chain clonotypes and interferon-gamma are expressed in the pancreas of patients with recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus.** *Diabetes Res Clin Pract* 1996, **34**(1):37-46.
141. Borrego F, Frias M, Aguado R, Peña J: **Células y órganos del sistema inmune.** [www.inmunologiaenlinea.es](http://www.inmunologiaenlinea.es).
142. Zandvoort A, Timens W: **The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens.** *Clin Exp Immunol* 2002, **130**(1):4-11.
143. Timens W, Boes A, Poppema S: **Human marginal zone B cells are not an activated B cell subset: strong expression of CD21 as a putative mediator for rapid B cell activation.** *European Journal of Immunology* 1989, **19**(11):2163-2166.
144. Harms G, Hardonk MJ, Timens W: **In vitro complement-dependent binding and in vivo kinetics of pneumococcal polysaccharide TI-2 antigens in the rat spleen marginal zone and follicle.** *Infection and Immunity* 1996, **64**(10):4220-4225.
145. Kraal G: **Cells in the marginal zone of the spleen.** *International Review of Cytology* 1992, **132**:31-74.
146. Dammers PM, Visser A, Popa ER, Nieuwenhuis P, Kroese FG: **Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2000, **165**(11):6156-6169.
147. Klein U, Rajewsky K, Küppers R: **Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells.** *The Journal of experimental medicine* 1998, **188**(9):1679-1689.
148. Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE: **Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27.** *The Journal of experimental medicine* 1998, **188**(9):1691-1703.

149. Zhang J, Liu YJ, MacLennan IC, Gray D, Lane PJ: **B cell memory to thymus-independent antigens type 1 and type 2: the role of lipopolysaccharide in B memory induction.** *European Journal of Immunology* 1988, **18**(9):1417-1424.
150. Dunn-Walters DK, Isaacson PG, Spencer J: **Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells.** *The Journal of experimental medicine* 1995, **182**(2):559-566.
151. Tierens A, Delabie J, Michiels L, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C: **Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion.** *Blood* 1999, **93**(1):226-234.
152. Martin F, Oliver AM, Kearney JF: **Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens.** *Immunity* 2001, **14**(5):617-629.
153. Chen X, Martin F, Forbush KA, Perlmutter RM, Kearney JF: **Evidence for selection of a population of multi-reactive B cells into the splenic marginal zone.** *International Immunology* 1997, **9**(1):27-41.
154. Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV: **Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response.** *Nature Immunology* 2000, **1**(1):31-36.
155. Carter RH, Fearon DT: **CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes.** *Science (New York, NY)* 1992, **256**(5053):105-107.
156. Chen C, Stenzel-Poore MP, Rittenberg MB: **Natural auto- and polyreactive antibodies differing from antigen-induced antibodies in the H chain CDR3.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 1991, **147**(7):2359-2367.
157. Kroese FG, de Waard R, Bos NA: **B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora.** *Seminars in Immunology* 1996, **8**(1):11-18.
158. Lipsanen V, Walter B, Emara M, Siminovitch K, Lam J, Kaushik A: **Restricted CDR3 length of the heavy chain is characteristic of six randomly isolated disease-associated VH J558+ IgM autoantibodies in lupus prone motheaten mice.** *International Immunology* 1997, **9**(5):655-664.
159. Schroeder HW, Jr., Mortari F, Shiokawa S, Kirkham PM, Elgavish RA, Bertrand FE, 3rd: **Developmental regulation of the human antibody repertoire.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995, **764**:242-260.
160. Enzler T, Bonizzi G, Silverman GJ, Otero DC, Widhopf GF, Anzelon-Mills A, Rickert RC, Karin M: **Alternative and classical NF-kappa B signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease.** *Immunity* 2006, **25**(3):403-415.
161. Enghard P, Grussie E, Rieder C, Burmester GR, Riemekasten G: **Subset size, activation threshold and distribution of autoreactive MZ and FO B cells do not differ in a sex-specific manner in the NZB/W F1 murine lupus model: an experimental mouse study.** *Lupus* 2011, **20**(12):1240-1249.

162. Hoglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D: **Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes.** *The Journal of experimental medicine* 1999, **189**(2):331-339.
163. Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y: **Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice.** *Diabetes* 1986, **35**(8):855-860.
164. Haskins K, Portas M, Bradley B, Wegmann D, Lafferty K: **T-lymphocyte clone specific for pancreatic islet antigen.** *Diabetes* 1988, **37**(10):1444-1448.
165. Lennon GP, Bettini M, Burton AR, Vincent E, Arnold PY, Santamaria P, Vignali DA: **T cell islet accumulation in type 1 diabetes is a tightly regulated, cell-autonomous event.** *Immunity* 2009, **31**(4):643-653.
166. Bannard O, Kraman M, Fearon DT: **Secondary replicative function of CD8+ T cells that had developed an effector phenotype.** *Science* 2009, **323**(5913):505-509.
167. Munoz A, Gallart T, Usac EF, Fernandez-Alvarez J, Vinas O, Somoza N, Barcelo J, Gomis R: **Anti-islet cell and anti-insulin antibody production by CD5+ and CD5- B lymphocytes in IDDM.** *Diabetologia* 1995, **38**(1):62-72.
168. Bradshaw EM, Kent SC, Tripuraneni V, Orban T, Ploegh HL, Hafler DA, Love JC: **Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: cytokines and antigen-reactive antibodies.** *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2008, **129**(1):10-18.
169. Marino E, Grey ST: **A new role for an old player: do B cells unleash the self-reactive CD8+ T cell storm necessary for the development of type 1 diabetes?** *Journal of autoimmunity* 2008, **31**(3):301-305.
170. Marino E, Batten M, Groom J, Walters S, Liuwantara D, Mackay F, Grey ST: **Marginal-zone B-cells of nonobese diabetic mice expand with diabetes onset, invade the pancreatic lymph nodes, and present autoantigen to diabetogenic T-cells.** *Diabetes* 2008, **57**(2):395-404.
171. Chitnis V, Pahwa S: **Evaluation of the TCR repertoire.** *Manual of clinical laboratory immunology* 2002:244-255.
172. Fozza C, Contini S, Galleu A, Simula MP, Viridis P, Bonfigli S, Longinotti M: **Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions, which are mostly polyclonal in the CD4(+) subset and oligoclonal in the CD8(+) subset.** *Experimental hematology* 2009, **37**(8):947-955.
173. Kou ZC, Puhr JS, Rojas M, McCormack WT, Goodenow MM, Sleasman JW: **T-Cell receptor Vbeta repertoire CDR3 length diversity differs within CD45RA and CD45RO T-cell subsets in healthy and human immunodeficiency virus-infected children.** *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2000, **7**(6):953-959.
174. de Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, de Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G *et al*: **CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2004, **172**(10):6435-6443.
175. Freeman JD, Warren RL, Webb JR, Nelson BH, Holt RA: **Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing.** *Genome research* 2009, **19**(10):1817-1824.



176. Akatsuka Y, Martin EG, Madonik A, Barsoukov AA, Hansen JA: **Rapid screening of T-cell receptor (TCR) variable gene usage by multiplex PCR: application for assessment of clonal composition.** *Tissue Antigens* 1999, **53**(2):122-134.
177. Monteiro J, Hingorani R, Choi IH, Silver J, Pergolizzi R, Gregersen PK: **Oligoclonality in the human CD8+ T cell repertoire in normal subjects and monozygotic twins: implications for studies of infectious and autoimmune diseases.** *Molecular Medicine (Cambridge, Mass)* 1995, **1**(6):614-624.
178. Haskins K: **T cell receptor gene usage in autoimmune diabetes.** *Int Rev Immunol* 1999, **18**(1-2):61-81.
179. Drexler K, Burtles S, Hurtenbach U: **Limited heterogeneity of T-cell receptor V beta gene expression in the early stage of insulinitis in NOD mice.** *Immunol Lett* 1993, **37**(2-3):187-196.
180. Maeda T, Sumida T, Kurasawa K, Tomioka H, Itoh I, Yoshida S, Koike T: **T-lymphocyte-receptor repertoire of infiltrating T lymphocytes into NOD mouse pancreas.** *Diabetes* 1991, **40**(12):1580-1585.
181. Malhotra U, Spielman R, Concannon P: **Variability in T cell receptor V beta gene usage in human peripheral blood lymphocytes. Studies of identical twins, siblings, and insulin-dependent diabetes mellitus patients.** *J Immunol* 1992, **149**(5):1802-1808.
182. Li L, He Q, Garland A, Yi Z, Aybar LT, Kepler TB, Frelinger JA, Wang B, Tisch R: **beta cell-specific CD4+ T cell clonotypes in peripheral blood and the pancreatic islets are distinct.** *J Immunol* 2009, **183**(11):7585-7591.
183. Codina-Busqueta E, Scholz E, Muñoz-Torres PM, Roura-Mir C, Costa M, Xufré C, Planas R, Vives-Pi M, Jaraquemada D, Martí M: **TCR bias of in vivo expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1 diabetes.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2011, **186**(6):3787-3797.
184. Trudeau JD, Kelly-Smith C, Verchere CB, Elliott JF, Dutz JP, Finegood DT, Santamaria P, Tan R: **Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood.** *The Journal of Clinical Investigation* 2003, **111**(2):217-223.
185. Pleau JM, Marche PN, Serrano MP, Boitard C, Bach JF: **Evidence for antigen driven selection in two monoclonal auto-antibodies derived from nonobese diabetic mice.** *Molecular immunology* 1993, **30**(14):1257-1264.
186. Carrillo J, Puertas MC, Planas R, Pastor X, Alba A, Stratmann T, Pujol-Borrell R, Ampudia RM, Vives-Pi M, Verdaguer J: **Anti-peripherin B lymphocytes are positively selected during diabetogenesis.** *Molecular immunology* 2008, **45**(11):3152-3162.
187. Fiorina P, Vergani A, Dada S, Jurewicz M, Wong M, Law K, Wu E, Tian Z, Abdi R, Guleria I *et al*: **Targeting CD22 reprograms B-cells and reverses autoimmune diabetes.** *Diabetes* 2008, **57**(11):3013-3024.
188. Serreze DV, Chapman HD, Varnum DS, Hanson MS, Reifsnnyder PC, Richard SD, Fleming SA, Leiter EH, Shultz LD: **B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice.** *The Journal of experimental medicine* 1996, **184**(5):2049-2053.

189. Banga JP, Moore JK, Duhindan N, Madec AM, van Endert PM, Orgiazzi J, Endl J: **Modulation of antigen presentation by autoreactive B cell clones specific for GAD65 from a type I diabetic patient.** *Clin Exp Immunol* 2004, **135**(1):74-84.
190. Silveira PA, Johnson E, Chapman HD, Bui T, Tisch RM, Serreze DV: **The preferential ability of B lymphocytes to act as diabetogenic APC in NOD mice depends on expression of self-antigen-specific immunoglobulin receptors.** *Eur J Immunol* 2002, **32**(12):3657-3666.
191. Manfras BJ, Terjung D, Boehm BO: **Non-productive human TCR beta chain genes represent V-D-J diversity before selection upon function: insight into biased usage of TCRBD and TCRBJ genes and diversity of CDR3 region length.** *Human immunology* 1999, **60**(11):1090-1100.
192. Petrovic Berglund J, Petrovc Berglund J, Mariotti-Ferrandiz E, Rosmaraki E, Hall H, Cazenave P-A, Six A, Höglund P: **TCR repertoire dynamics in the pancreatic lymph nodes of non-obese diabetic (NOD) mice at the time of disease initiation.** *Molecular immunology* 2008, **45**(11):3059-3064.
193. Naserke HE, Durinovic-Bellò I, Seidel D, Ziegler AG: **The T-cell receptor beta chain CDR3 region of BV8S1/BJ1S5 transcripts in type 1 diabetes.** *Immunogenetics* 1996, **45**(2):87-96.
194. Armstrong KM, Piepenbrink KH, Baker BM: **Conformational changes and flexibility in T-cell receptor recognition of peptide-MHC complexes.** *The Biochemical Journal* 2008, **415**(2):183-196.
195. Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmermann L, Wraith DC, Tausch GS, Waldor MK, Zamvil SS, McDevitt HO, Steinman L: **Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention.** *Cell* 1988, **54**(2):263-273.
196. Davis MM, McHeyzer-Williams M, Chien YH: **T-cell receptor V-region usage and antigen specificity. The cytochrome c model system.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995, **756**:1-11.
197. Deckhut AM, Allan W, McMickle A, Eichelberger M, Blackman MA, Doherty PC, Woodland DL: **Prominent usage of V beta 8.3 T cells in the H-2Db-restricted response to an influenza A virus nucleoprotein epitope.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 1993, **151**(5):2658-2666.
198. Imarai M, Goyarts EC, van Bleek GM, Nathenson SG: **Diversity of T cell receptors specific for the VSV antigenic peptide (N52-59) bound by the H-2Kb class I molecule.** *Cellular Immunology* 1995, **160**(1):33-42.
199. Kjer-Nielsen L, Clements CS, Purcell AW, Brooks AG, Whisstock JC, Burrows SR, McCluskey J, Rossjohn J: **A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity.** *Immunity* 2003, **18**(1):53-64.
200. Stewart-Jones GBE, McMichael AJ, Bell JI, Stuart DI, Jones EY: **A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition.** *Nature Immunology* 2003, **4**(7):657-663.
201. Turner SJ, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J: **Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity.** *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(12):883-894.

202. Yanagi Y, Maekawa R, Cook T, Kanagawa O, Oldstone MB: **Restricted V-segment usage in T-cell receptors from cytotoxic T lymphocytes specific for a major epitope of lymphocytic choriomeningitis virus.** *Journal of Virology* 1990, **64**(12):5919-5926.
203. Day EB, Guillonneau C, Gras S, La Gruta NL, Vignali DAA, Doherty PC, Purcell AW, Rossjohn J, Turner SJ: **Structural basis for enabling T-cell receptor diversity within biased virus-specific CD8+ T-cell responses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, **108**(23):9536-9541.
204. Liu X, Nguyen P, Liu W, Cheng C, Steeves M, Obenauer JC, Ma J, Geiger TL: **T cell receptor CDR3 sequence but not recognition characteristics distinguish autoreactive effector and Foxp3(+) regulatory T cells.** *Immunity* 2009, **31**(6):909-920.
205. Miles JJ, Thammanichanon D, Moneer S, Nivarthi UK, Kjer-Nielsen L, Tracy SL, Aitken CK, Brennan RM, Zeng W, Marquart L *et al*: **Antigen-driven patterns of TCR bias are shared across diverse outcomes of human hepatitis C virus infection.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2011, **186**(2):901-912.
206. Wong FS, Hibberd ML, Wen L, Millward BA, Demaine AG: **The human T cell receptor V beta repertoire of normal peripheral blood lymphocytes before and after mitogen stimulation.** *Clin Exp Immunol* 1993, **92**(2):361-366.
207. Dietrich PY, Walker PR, Schnuriger V, Saas P, Perrin G, Guillard M, Gaudin C, Caignard A: **TCR analysis reveals significant repertoire selection during in vitro lymphocyte culture.** *Int Immunol* 1997, **9**(8):1073-1083.
208. Li S, Wilkinson MF: **Nonsense surveillance in lymphocytes?** *Immunity* 1998, **8**(2):135-141.
209. Ji Q, Perchellet A, Goverman JM: **Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs.** *Nature Immunology* 2010, **11**(7):628-634.
210. Wang J, Hamilton JI, Carter MS, Li S, Wilkinson MF: **Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame.** *Science (New York, NY)* 2002, **297**(5578):108-110.
211. Corthay A, Nandakumar KS, Holmdahl R: **Evaluation of the percentage of peripheral T cells with two different T cell receptor alpha-chains and of their potential role in autoimmunity.** *Journal of autoimmunity* 2001, **16**(4):423-429.
212. Elliott JI, Altmann DM: **Dual T cell receptor alpha chain T cells in autoimmunity.** *The Journal of experimental medicine* 1995, **182**(4):953-959.
213. Morris GP, Allen PM: **Cutting edge: Highly alloreactive dual TCR T cells play a dominant role in graft-versus-host disease.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2009, **182**(11):6639-6643.
214. Padovan E, Casorati G, Dellabona P, Giachino C, Lanzavecchia A: **Dual receptor T-cells. Implications for alloreactivity and autoimmunity.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995, **756**:66-70.
215. Gavin MA, Rudensky AY: **Dual TCR T cells: gaining entry into the periphery.** *Nature Immunology* 2002, **3**(2):109-110.

•BIBLIOGRAFIA•

216. Heath WR, Miller JF: **Expression of two alpha chains on the surface of T cells in T cell receptor transgenic mice.** *The Journal of experimental medicine* 1993, **178**(5):1807-1811.

## ❖ AGRAÏMENTS

Agraeixo la vostra ajuda, la vostra paciència i la vostra amabilitat a tots els que durant aquests anys d'aprenentatge i creixement personal heu estat mestres, companys i amics. Tots junts formeu el record d'una època de la meua vida que conservaré sempre.



-GRÀCIES-

• AGRAÏMENTS •