

Universidad Aut3noma de Barcelona
Facultad de Ciencias
Departamento de Biolog3a Celular, Fisiolog3a e Inmunolog3a

MECANISMOS MOLECULARES DE LA TOLERANCIA CENTRAL

Memoria presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biol3gicas por la
Universidad Aut3noma de Barcelona, 2007

Lidia Sabater Baudet

Director de Tesis: Dr. Ricardo Pujol Borrell

PRÓLOGO

En esta tesis se recoge el trabajo experimental realizado sobre los mecanismos implicados en la tolerancia central.

El objetivo inicial fue la puesta a punto de una nueva tecnología para la identificación de genes de interés inmunológico, basada en la presencia de motivos AU y en el uso de una técnica que nos permitiese comprobar su expresión diferencial en diferentes situaciones. El método, llamado AU-DD (AU-Differential Display), dio como resultado la identificación de un gen regulador de la transcripción, el gen ZNF304, con mayor expresión en tejidos linfoides.

El tema de la regulación de la transcripción se había vuelto importante para la explicación del papel del timo en la tolerancia, al producirse el co-descubrimiento por parte de Hanahan y colaboradores y de nuestro laboratorio del fenómeno de la expresión promiscua de genes correspondientes a antígenos periféricos en el timo.

Aplicamos la experiencia metodológica adquirida en biología molecular para tratar de corroborar los datos de expresión ectópica de insulina en el timo y la influencia sobre ella de los polimorfismos VNTR.

Al descubrirse la función del gen AIRE en el control de la expresión promiscua de muchos autoantígenos en el timo, nos planteamos la cuestión sobre qué nivel de control, el polimorfismo del gen de la insulina o el ejercido por el factor de transcripción AIRE, tenía mayor influencia en la expresión total y por consiguiente en la tolerización de la insulina. Esta cuestión representó el tema del último trabajo presentado en esta tesis aunque debido a la normativa de la UAB no puede considerarse como parte fundamental.

NOTA

Debido a la normativa de la UAB que establece que en las publicaciones presentadas con fecha posterior al 17 de diciembre de 2003 ha de constar la afiliación a la UAB del doctorando, la siguiente publicación debe considerarse como parte no fundamental de la tesis:

Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus.

Sabater L, Ferrer-Francesch X, Sospedra M, Caro P, Juan M, Pujol-Borrell R.

J Autoimmun 2005;25(4) 312-18

y los siguientes artículos se presentan como anexos:

1. AU-Differential Display, Reproducibility of a differential mRNA display targeted to AU motifs.

Dominguez O, Sabater L, Ashhab Y, Belloso E, Pujol-Borrell R.

Methods Mol Biol 2003; 226: 225-36

2. El timo: vieja glándula, nuevas ideas.

Ricardo Pujol Borrell, Lidia Sabater

Medicina Clínica 2003; 120(6) 216-8

La colaboración de la doctoranda en otros trabajos sobre los mecanismos de la tolerancia central ha dado como resultado las siguientes publicaciones:

1. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus.

Bruno R, Sabater L, Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Escudero D, Martínez-Cáceres E, Pujol-Borrell R.

Eur J Immunol. 2002 Oct;32(10):2737-47.

2. Different patterns of nicotinic acetylcholine receptor subunit transcription in human thymus.

Bruno R, Sabater L, Tolosa E, Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Coll J, Foz M, Melms A, Pujol-Borrell R.

J Neuroimmunol. 2004 Apr;149(1-2):147-59.

3. HLA-DRB5*0101 and -DRB1*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype.

Prat E, Tomaru U, Sabater L, Park DM, Granger R, Kruse N, Ohayon JM, Bettinotti MP, Martin R.

J Neuroimmunol. 2005 Oct;167(1-2):108-19.

INDICE

Glosario de Abreviaturas	9-10
--------------------------	------

I. INTRODUCCIÓN I

1. Conceptos generales de la tolerancia inmunológica	
1.1 Concepto de tolerancia y enfermedad autoinmune	13
1.2 Anatomía del timo y ontogenia de los linfocitos	13-16
1.3 Tolerancia Central	17-24
1.3.1 Selección positiva	17
1.3.2 Selección negativa	17
1.3.3 Expresión ectópica o promiscua en el timo	18
1.3.3.1 PAE (Peripheral Antigen Expressing cells)	18-19
1.3.3.2 Genes expresados en el timo promiscuamente	19
1.3.3.3 Polimorfismos	19-20
1.3.3.4 Procesamiento diferencial de los transcritos de los autoantígenos	20-21
1.3.3.5 Regulación de la expresión promiscua	21-24
1.3.3.5.1 Gen AIRE	21-24
1.4 Tolerancia periférica	25-27
1.4.1 Ignorancia inmunológica	25
1.4.2 Anergia clonal	25
1.4.3 Inhibición clonal	25
1.4.4 Células T reguladoras	26
1.4.4.1 Gen FOXP3	27
1.4.5 Regulación periférica del sistema inmune mediante neuropéptidos anti-inflamatorios. Células dendríticas tolerogénicas	27

II. INTRODUCCIÓN II

2. Conceptos generales de la regulación de la Transcripción	
2.1 Control transcripcional	31
2.1.1 Inicio de la transcripción	31-32
2.1.2 Control transcripcional, modificación del estado de la cromatina	32-36
2.1.2.1 Estructura de la cromatina	32
2.1.2.2 Regulación de la transcripción	32-33
2.1.2.3 Proteínas dedos de zinc	33-36
• Represión transcripcional y la caja KRAB.	34-35
• Mecanismo de represión de la caja KRAB.	35-36

III. INTRODUCCIÓN III

3. Regulación post-transcripcional, Conceptos Generales	
3.1 <i>Mecanismos de control post-transcripcional</i>	39
3.1.1 Motivos AU, inestabilidad del transcrito	40-42
• Clases de motivos AU	40
• Proteínas que se unen a los motivos AU	40-42
3.1.2 Otros mecanismos de control	42-43

IV. INTRODUCCIÓN IV

4. Diabetes Mellitus insulino dependiente, Diabetes Tipo I	
4.1 <i>Definición</i>	47
4.2 <i>Genética de la enfermedad</i>	47-50

OBJETIVOS	53-54
-----------	-------

SUBPROYECTO I

1. <i>Cloning of ARE-containing genes by AU-motif-directed display</i>	
2. <i>Resumen de resultados I</i>	57-64
3. <i>Discusión I</i>	65-66

SUBPROYECTO II

1. <i>Identification of a KRAB-containing zinc finger protein, ZNF304, by AU-motif-directed display method and initial characterization in lymphocyte activation</i>	
2. <i>Resumen de resultados II</i>	69-72
3. <i>Discusión II</i>	73-75

SUBPROYECTO III

1. <i>Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus</i>	
2. <i>Resumen de resultados III</i>	79-84
3. <i>Discusión III</i>	85-88

CONCLUSIONES	91-92
--------------	-------

REFERENCIAS	95-103
-------------	--------

ANEXOS

1. <i>El timo: vieja glándula, nuevas ideas</i>	
2. <i>AU-Differential Display, Reproducibility of a Differential mRNA Display Targeted to AU motifs</i>	

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AIRE	Autoimmune Regulator, regulador autoinmune
APECED	Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy.
APS1	Autoimmune Polyendocrine syndrome, typus 1
ARE	AU rich elements
AUF1	AU rich element RNA binding protein 1
cAMP	Adenosínmonofosfato cíclico
CBP	CREB-Binding Protein.
CTLA4	Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein 4
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, encefalomiелitis autoinmune experimental
FOXP3	Forkhead box P3
GAD	Decarboxilasa del ácido glutámico
GITR	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HATs	Histona acetiltransferasa
HEL	Hen egg lysozyme protein
HIF alpha	Hypoxia inducible factor, alpha
hnRNP D	Heterogeneous nuclear ribonuclear protein D
HP1 alpha, beta	Heterochromatin protein alpha, beta
HSR	Homogeneously staining region
IA-2, ICA512	Insulinoma associated tyrosine phosphatase like protein, islet cell antigen 512
IDDM2	Insulin dependent diabetes mellitus 2
IGRP	Islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein.
IL2, IL7	Interleucina 2, 7
IPEX	Immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X
KAP1	KRAB associated protein 1
Kid-1	Kidney, ischemia and developmentally regulated protein 1
KRAB	Kruppel associated box
LTR	Receptor de la linfotoxina

MHC	Major Histocompatibility Complex, complejo mayor de Histocompatibilidad
mTECs	Medullary Thymic epithelial cells, células medulares del timo
NOD	Nonobese diabetic mouse.
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAE	Peripheral antigen expressing cells, células que expresan antígenos periféricos.
PHD	Plant Homeodomain
PKA	Protein Kinase A
PML-NDs	Promyelocytic leukemia nuclear domains
PLP	Proteolipid protein, proteína proteolípida
RAG	Recombination Activating gene
SETDB1	SET domain, bifurcated 1
TCR	T cell Receptor, receptor de células T
TFIID	Transcription initiation factor II D
TGFβ	Transforming Growth Factor beta
TNF alpha	Tumor Necrosis Factor alpha
TSH	Thyroid stimulating hormone, hormona estimulante tiroidea
TSHR	Receptor de la hormona estimulante tiroidea
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin, linfopoyetina del estroma tímico.
TTP	Tristetraprolin
VIP	Vasoactive intestinal peptide
VPAC1	Vasoactive intestinal peptide receptor 1

INTRODUCCIÓN I

INTRODUCCIÓN I

1. CONCEPTOS GENERALES DE LA TOLERANCIA INMUNOLÓGICA

1.1 *Concepto de tolerancia y enfermedad autoinmune*

El sistema inmunológico es el conjunto de tejidos, células y moléculas responsables de proteger al organismo contra bacterias, virus, parásitos e incluso contra el cáncer. Es capaz de elaborar respuestas para su eliminación a la vez que conservar memoria del encuentro. El sistema inmunológico debe ser capaz de detectar y reaccionar contra multitud de agentes externos pero una característica fundamental del sistema inmunológico es la de no reaccionar frente a los componentes propios del individuo. Tolerancia inmunológica se podría definir como la ausencia de reacción contra antígenos propios. El sistema inmunológico se ayuda de una gran diversidad de receptores antigénicos tanto de células B (anticuerpos), como de células T (TCR) para abarcar el amplio espectro de antígenos contra los que debe actuar. La diversidad, sin embargo, ya que se genera al azar por la recombinación de segmentos génicos, implica que el repertorio de especificidades de las poblaciones T y B incluyan un porcentaje de clones con receptores contra componentes propios o clones autoreactivos. Las enfermedades autoinmunes son la manifestación clínica de la reactividad contra moléculas propias.

El sistema inmunológico cuenta con diferentes mecanismos para ejercer tolerancia y diferenciar los componentes propios de los ajenos.

1.2 *Anatomía del timo y ontogenia de los linfocitos*

El timo es el órgano linfoide primario donde los linfocitos T maduran a partir de precursores que provienen de la médula ósea. Es un órgano bilobulado, encapsulado por tejido conectivo y está ubicado en el mediastino anterior y superior.

La zona de la subcápsula se encuentra colonizada por células pre-T procedentes de la médula ósea, linfoblastos de gran tamaño que proliferan activamente.

La corteza es la parte externa donde encontramos gran densidad celular e intensa actividad mitótica. Se divide en lobulillos irregulares separados por septos o tabiques de tejido conjuntivo que penetran hasta la unión cortico-medular. Los

lobulillos se mantienen interconectados y presentan zonas de septos incompletos. Una malla de células epiteliales alberga a los timocitos para su maduración. La mayor parte de los timocitos corticales están en rápida división reordenando activamente los genes del TCR aunque todavía no lo expresen en membrana. Así pues, a nivel celular encontramos en la corteza principalmente timocitos inmaduros, células epiteliales corticales y algún macrófago aislado.

La médula es la zona de menor densidad celular que ocupa el espacio central del órgano y es donde se encuentran los timocitos más maduros. También encontramos células epiteliales medulares (mTECs), dendríticas y macrófagos. Los corpúsculos de Hassall, característicos de la médula, son estructuras epiteliales de capas concéntricas ricas en citoqueratina. Se cree que son la fase final de maduración de las células epiteliales y recientemente se ha demostrado que en los corpúsculos de Hassall existe expresión de TSLP (Thymic stromal lymphopoietin). Se postula que la linfopoyetina estromal tímica podría inducir la expresión de marcadores, como CD80 o CD86 en las células dendríticas CD11c positivas que condicionarían la diferenciación de los linfocitos T CD4 hacia células reguladoras[1].

Esquema de la composición celular del timo

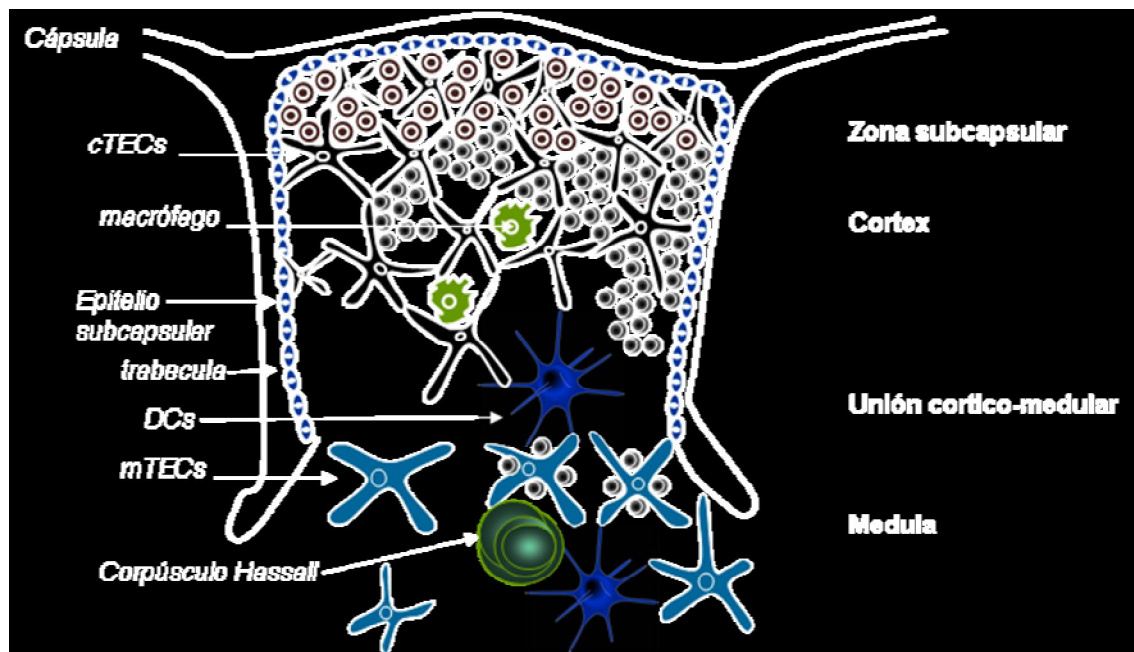


Figura 1: Esquema de la estructura del timo y composición celular

El timo deriva del endodermo y de un pequeño elemento ectodérmico del tercer arco faríngeo. Durante la octava y la novena semana de vida fetal la zona subcapsular tímica es infiltrada por linfoblastos y otras células precursoras de la médula ósea. La migración de las células precursoras no es al azar sino mediada por factores quimotácticos producidos periódicamente por el rudimento tímico.

Los precursores inmaduros linfoides de los linfocitos T se generan en la médula ósea a partir de células madre pluripotenciales (stem cells). Estos progenitores migran hacia el timo penetrando por los vasos de la unión cortico-medular. Precisamente, la irrigación de la corteza se realiza a través de capilares que nacen de arteriolas ubicadas en la zona corticomedular. Cada capilar está recubierto de una capa continua de tipo epitelio-reticular formando parte de la barrera hemato-tímica que restringe el acceso de antígenos sanguíneos hacia el lugar de diferenciación de las células T.

El desarrollo de los timocitos está marcado por el proceso de reordenamiento de las cadenas génicas que darán lugar al receptor de células T (TCR) y por su expresión en membrana y sobretodo por una evolución en la expresión de marcadores de superficie como CD3, CD4 o CD8.

Cuando un precursor T entra en el timo carece de la mayoría de marcadores de superficie que caracterizan a los linfocitos maduros además de no tener reordenados los genes del TCR. El receptor de la IL-7 es esencial para la formación de células T en un estadio temprano de diferenciación. Recientemente, se ha descrito el papel del receptor de la IL7 que actúa de forma sinérgica con el factor de transcripción Notch1 en una población precursora con potencial tanto linfoide como mieloide. La vía de señalización de Notch inhibe la diferenciación de la fracción no-T (dendríticas, macrófagos y células NK) y a la vez promueve la proliferación de células con potencial T en respuesta a señales de la citocina IL7.[2] Sin embargo, es necesaria la interacción con el microambiente del estroma tímico para que estas células en fase de proliferación puedan diferenciarse hacia células T. Las células inmaduras de la corteza además de ser células doble negativas (CD4-CD8-) también se caracterizan por la expresión de CD44 y c-Kit.

Posteriormente expresan CD25 (cadena alpha del receptor de IL2) y reducen la expresión de CD44 y c-kit. En este estadio de CD25+CD44^{low} se empieza a reordenar la cadena beta del TCR.

Los timocitos que completan con éxito el reordenamiento acoplan esta cadena con una cadena pTalpha para formar un receptor pre-TCR que forma un complejo con moléculas CD3, de lo contrario mueren por apoptosis. La célula

prolifera, los reordenamientos de la cadena beta se bloquean por el fenómeno de exclusión alélica y aparecen los marcadores CD4 y CD8. En este estadio son células doble positivas. Cuando dejan de proliferar reducen su tamaño y empiezan a reordenar la cadena alpha hasta que expresan en membrana un TCR completo. Sin embargo, esto no frena necesariamente los reordenamientos del locus alpha [3].

Los timocitos doble positivos CD4+CD8+ interaccionan con el estroma tímico que expresa moléculas MHC de clase I y II presentando péptidos propios. Los clones con alta afinidad para las moléculas MHC propias son delecionados al igual que los clones que no son capaces de reconocer péptidos en el contexto MHC. Los clones que son capaces de reconocer moléculas MHC de clase I pierden la molécula CD4 y pasarán a ser células T CD8+ y del mismo modo los clones que reconocen moléculas MHC de clase II pasarán a ser células T CD4+.

Sólo una pequeña fracción de los timocitos iniciales saldrán a periferia, alrededor del 5%, tras los procesos de selección.

1.3. Tolerancia Central

El mecanismo de tolerancia central se basa en la delección en el timo de clones autoreactivos por la interacción con antígenos propios presentados por moléculas MHC de las células presentadoras de antígeno.

1.3.1 Selección Positiva

La selección positiva se da en la etapa en que las células doble positivas expresan un TCR funcional. Los clones T capaces de reconocer péptidos en el contexto de las moléculas MHC propias reciben una señal de supervivencia y son seleccionadas positivamente. Estos péptidos son procesados y presentados por diferentes células presentadoras de antígenos, tales como dendríticas tímicas, macrófagos, células B y células epiteliales. Tras este proceso se inhibe la expresión de los genes RAG1 (Recombination Activating gene) y RAG2 y se detiene el reordenamiento de la cadena alfa del TCR.

1.3.2 Selección Negativa

La selección negativa es el proceso por el cual se eliminan los timocitos con un TCR capaz de interaccionar con gran afinidad/avidez con antígenos propios.

En la médula tímica encontramos dos tipos de células presentadoras de antígeno importantes para la selección tímica: células dendríticas y células epiteliales medulares.

Se ha demostrado fehacientemente que en las células epiteliales medulares se transcriben genes de forma ectópica o promiscua que normalmente sólo están expresados en tejidos periféricos y que este mecanismo fundamenta la tolerancia central.

1.3.3 Expresión ectópica o promiscua en el timo

El descubrimiento de la expresión intratímica de antígenos específicos de tejidos periféricos ha cambiado algunos de los paradigmas sobre los mecanismos subyacentes a la tolerancia central hacia los antígenos. El fenómeno se ha llamado expresión promiscua o ectópica.

La expresión ectópica de moléculas típicas de otros tejidos en el timo es hoy día un hecho ampliamente demostrado [4, 5] que contribuimos en parte a formular en nuestro laboratorio en sus inicios [6, 7]. Anteriormente se creía que el timo sólo era responsable de promover tolerancia hacia antígenos ubicuos y accesibles mediante el torrente sanguíneo y que la tolerización de los antígenos específicos de tejido o secuestrados inmunológicamente se debía a mecanismos periféricos posteriores a la selección tímica [8, 9], mecanismos de anergia [10] o de regulación y/o polarización de la respuesta inmune.

Las primeras pistas de que el timo era capaz de expresar antígenos específicos de tejido y que ello favorecía la tolerancia se obtuvieron de estudios con transgenes bajo promotores específicos de tejido [11, 12], que curiosamente se expresaban en el timo. Posteriormente se observó que el fenómeno era una función normal de algunas células del timo [6]

1.3.3.1 PAE (Peripheral antigen expressing cells)

Tras la demostración de la expresión de autoantígenos en el timo se inició la búsqueda de las células PAE especializadas en dicha expresión. En una de las primeras demostraciones de la existencia de estas células en el timo se les definía como células raras de la médula tímica que eran capaces de expresar genes exclusivos de páncreas [13].

La búsqueda de las células PAE no ha estado exenta de controversia. Pugliese et al. [14, 15] proponían a las dendríticas y a los macrófagos como células PAE porque mediante inmunofluorescencia encontraban colocalización de los marcadores que definen estas subpoblaciones celulares con la tinción para GAD y para IA-2 y no observaban colocalización con células epiteliales citoqueratina positivas. Este estudio coincide con resultados anteriores de Throsby [16]. Aunque es una evidencia que las células corticales epiteliales y las dendríticas tienen la capacidad de expresar y presentar antígenos periféricos, el enriquecimiento de las diferentes fracciones tímicas permitió definir las células

epiteliales medulares como las células PAE más probables [17]. La adquisición de nueva tecnología para la separación de una forma casi pura de los diferentes tipos celulares que componen el timo capaces de presentar antígenos (dendríticas, epiteliales medulares y epiteliales corticales) permite analizar por separado el nivel de la expresión promiscua.

La expresión de autoantígenos en las células estromales tímicas parece seguir una gradación en cuanto a abundancia y diversidad. Las células más maduras expresan cada vez más variedad y abundancia de autoantígenos. El gradiente va desde las células epiteliales corticales, epiteliales medulares inmaduras, hasta las epiteliales medulares maduras. En los corpúsculos de Hassall de timo humano y ratón también se ha detectado expresión promiscua. Están considerados el último estadio de diferenciación de las epiteliales medulares [18, 19].

1.3.3.2 Genes expresados en el timo promiscuamente

Los genes que están expresados en el timo de una forma ectópica constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a función y por supuesto no se limita a los antígenos propensos a ser diana de la respuesta inmune como insulina, o proteína básica de la mielina [4, 17, 20]. Se calcula que en el timo de ratón podrían estar expresados alrededor de 3000 genes de forma promiscua, según estudios con microarrays [21]. Curiosamente entre ellos, y también en humanos, encontramos antígenos fetales expresados en edad adulta, antígenos ligados al desarrollo, e incluso antígenos relacionados con el embarazo de una forma poco restrictiva. En estos estudios las células epiteliales medulares son las células estromales tímicas con mayor nivel de expresión de autoantígenos, de hecho algunos genes sólo están expresados en las epiteliales medulares, incluso algunos genes sólo se expresan en un subtipo de mTECs con fenotipo maduro (MHC clase II high, CD80 high). Otros genes, sin embargo, se encuentran expresados por igual en epiteliales medulares y en epiteliales corticales.

Dentro de la red europea Eurothymaide que se encarga de coordinar los esfuerzos europeos sobre el estudio del timo y a la que pertenece nuestro laboratorio, se ha elaborado una base de datos (www.edtsa.org) donde es posible consultar los autoantígenos expresados en el timo y la bibliografía al respecto.

1.3.3.3 Polimorfismos

De acuerdo con la hipótesis que sostiene que la expresión promiscua de antígenos juega un papel crucial en la tolerancia a antígenos periféricos, pequeñas

variaciones en el nivel de la expresión ectópica de autoantígenos en el timo son suficientes para condicionar el establecimiento de la tolerancia.

El locus IDDM2, que fue el segundo locus ligado a la predisposición a la diabetes tipo 1 identificado, consiste en un minisatélite situado en la región del promotor de gen de la insulina. Es un locus polimórfico y los alelos consisten en un número variable de repeticiones en tandem. Este polimorfismo está claramente asociado con la expresión promiscua del gen de la insulina en el timo. Se ha visto que los alelos con mayor número de repeticiones o de clase III producen mayor expresión de insulina, hasta 3 veces más que los alelos de clase I. Esto provoca una protección dominante de los alelos clase III contra la diabetes tipo 1 que favorecería la selección negativa de los clones autoreactivos por una mayor abundancia de expresión ectópica de insulina en el timo.

La enfermedad de Graves es una enfermedad autoinmune del tiroides caracterizada por la presencia de autoanticuerpos contra el receptor de la hormona TSH (Thyroid stimulating hormone) lo que provoca una hiperfunción de la glándula. Mediante estudios de mapeo genético de la susceptibilidad se ha podido determinar que en el TSHR existe un locus de susceptibilidad aunque no se haya podido acotar los polimorfismos asociados a la enfermedad [22]. Podría representar otro ejemplo de cómo un polimorfismo afecta a la tolerancia.

1.3.3.4 Procesamiento diferencial de los transcritos de los autoantígenos

Alteraciones o fallos en la fase de presentación de autoantígenos a los precursores tímicos para su delección por disminución o ausencia de la molécula en cuestión puede comprometer la tolerancia.

La proteína PLP (myelin proteolipid protein) es un componente de la vaina de mielina de los oligodendrocitos y autoantígeno en la EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis), modelo murino de la esclerosis múltiple. Su expresión en el timo está restringida a una variante generada mediante procesamiento alternativo del transcrito. La forma DM20 es la predominante en el timo pero carece de un exón (aminoácidos 116-150) que está presente en la isoforma expresada en el sistema nervioso central. Esto conlleva que la porción de proteína no expresada en el timo no puede ser tolerizada y por lo tanto los clones T que escapan a periferia pueden ser los responsables del inicio de la EAE [5, 23]. Dado que el mismo tipo de expresión diferencial se da en el timo humano y el sistema nervioso, estos datos son extrapolables a la esclerosis múltiple.

El gen IA-2 (Insulinoma associated tyrosine phosphatase-like protein) también llamado ICA512 (islet cell antigen 512) constituye otro ejemplo de procesamiento alternativo del transcrito en una molécula susceptible de ser autoantígeno de una enfermedad autoinmune como la diabetes tipo 1. IA-2 es una proteína transmembrana con dominio extracelular e intracelular que se encuentra enriquecida en gránulos de secreción de los islotes pancreáticos y de las células neuroendocrinas. En el timo y en el bazo sólo se expresa la forma alternativa, donde falta uno de los exones del transcrito mientras que en los islotes podemos encontrar el transcrito entero [24]. Además, la región del transcrito donde se realiza el procesamiento alternativo codifica para una zona de la proteína donde se han descrito epítomos diana para la reactividad en la diabetes tipo 1 [25].

El estudio publicado recientemente [26] sobre el gen de la proteína específica de células beta del páncreas, IGRP (islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein), constituye otro ejemplo de como el mecanismo del procesamiento alternativo de los mensajeros influye en la tolerancia central. IGRP es un autoantígeno en el modelo murino NOD (Nonobese diabetic Mouse) [27] [28] y es frecuente que humanos y ratones compartan dianas de la respuesta inmune (como por ejemplo insulina, GAD, IA-2), y rasgos de susceptibilidad genética. En humanos el gen se encuentra en el cromosoma 2, cerca del locus de susceptibilidad *IDDM7* [29]. El transcrito entero sólo se expresa en páncreas y no en timo o en bazo, donde se expresan formas alternativas, por lo que algunos epítomos no pueden ser tolerizados en los tejidos linfoides.

1.3.3.5 Regulación de la expresión promiscua

1.3.3.5.1 Gen AIRE

El control de la expresión promiscua de muchos antígenos en el timo está sujeto a un regulador transcripcional, el gen AIRE (autoimmune regulator) [17].

La expresión del gen AIRE está restringida al epitelio tímico donde alcanza su máximo nivel, estando también expresado en células del linaje dendrítico y en el testículo [30, 31]

Mutaciones en el gen AIRE están relacionadas con el síndrome autoinmune poliglandular, APS1 también llamado APECED (Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy) [32, 33], un síndrome que se hereda con carácter autosómico recesivo siguiendo un patrón claramente mendeliano y monogénico. Se han descrito hasta 50 mutaciones en el gen AIRE de todo tipo,

inserciones, deleciones, cambios en la pauta de lectura y mutaciones en lugares de splicing. La clínica de la enfermedad incluye numerosas enfermedades autoinmunes específicas de órgano. En ratones, las mutaciones en el gen ortólogo, *Aire* producen un síndrome paralelo al humano con infiltración linfocítica en múltiples órganos. En el timo de estos ratones se pierde en gran parte la expresión promiscua de antígenos periféricos.

El gen AIRE está codificado en la posición cromosómica 21q22.3 y su proteína de 545 aminoácidos tiene aproximadamente 58KDa.

- Motivos conservados de la proteína AIRE

El análisis de la secuencia del gen AIRE y su localización nuclear sugieren que se trata de un factor de transcripción con una serie de motivos conservados:

a) PHD zinc fingers

AIRE contiene dos motivos zinc finger PHD (plant homeodomain), es decir, del tipo C4HC3 que frecuentemente se encuentran en proteínas que regulan la transcripción modificando el estado de la cromatina [34]. Esta estructura terciaria coordina la unión de dos átomos de zinc. Además, el motivo PHD tiene homología con el dominio RING finger que se sabe que tiene capacidad E3 ligasa. Se ha demostrado que el primer PHD de AIRE tiene actividad enzimática E3 ubiquitin-ligasa, que implica la adición de moléculas de ubiquitina a otras proteínas como marca para su degradación [35]. Se han encontrado mutaciones en esta zona en pacientes con APECED que bloquean la función enzimática [36]. De esta manera, el complejo multienzimático del proteasoma, que colabora en los procesos de degradación de proteínas y la generación de péptidos que se incorporan a las moléculas HLA de clase I, estaría relacionado con autoinmunidad.

b) SAND

SAND es otro dominio conservado y recibe el nombre por las proteínas que lo contienen (Sp100, AIRE, NucP41/75 y DEAF-1). Este dominio se ha relacionado con unión a DNA [37] pero AIRE carece de los aminoácidos del dominio necesarios para ello.

c) HSR

HSR (Homogeneously staining region) es un dominio de unos 100 aminoácidos en la región aminoterminal de AIRE con estructura de hélice alpha [38] que comparte con otras proteínas con función de factor de transcripción, como Sp100. En Sp100, este dominio permitiría la dimerización de la proteína y su localización en zonas PML-NDs [39] (promyelocytic leukemia nuclear domains) que se han relacionado con control del crecimiento celular y con apoptosis [40]

- Proteínas que interaccionan con AIRE

CBP (CREB-Binding Protein) es un cofactor transcripcional relacionado con muchos factores de transcripción como Jun, Fos, NF-KB y proteínas STAT [41]. CBP tiene actividad intrínseca histona acetiltransferasa [42, 43]. Se asocia con HIF alpha (Hypoxia inducible factor) y se ha visto que relaciona la maquinaria basal de transcripción con otros factores de transcripción más específicos [44]. AIRE se une de forma directa a CBP [45] y podría potenciar su capacidad de activación transcripcional.

El receptor de la linfotoxina beta LTR se requiere para la formación de los órganos linfoides secundarios durante la organogénesis [46]. Este receptor, que se encuentra expresado en las células estromales del timo, y sus ligandos son indispensables para formar un microambiente favorable para los timocitos en formación a la vez que son necesarios para mantener la homeostasis de los linfocitos ya que la deficiencia en la vía de señalización del receptor de la linfotoxina beta hace que las células epiteliales medulares se desorganicen. Los linfocitos maduros quedarían retenidos y no saldrían a periferia [47].

La vía de señalización de la linfotoxina alpha y el receptor de la linfotoxina beta se han visto asociados con la expresión del gen Aire. El fenotipo del ratón Aire deficiente es muy parecido al fenotipo del ratón deficiente en linfotoxina alpha o en LTR beta. En ambos modelos existe infiltración de linfocitos en órganos periféricos. Los niveles de mRNA de Aire y de insulina en el timo de ratones deficientes en el receptor de la linfotoxina beta se ven muy reducidos, aunque este escenario revierte con la incorporación de un anticuerpo agonista del receptor de linfotoxina beta. Esto demuestra que AIRE está controlado por este receptor y por *ende* también lo está la expresión promiscua de autoantígenos en el timo.[48]

- El nivel de expresión de AIRE influye en el nivel de expresión promiscua o ectópica

El análisis del ratón deficiente en Aire ha demostrado que el gen AIRE controla la expresión de muchos antígenos específicos de tejido en el timo, aunque otros antígenos, como la Proteína C reactiva del hígado, no se regulan por esta vía ya que se su expresión se sigue detectando en ratones Aire deficientes. [49]

Pequeñas variaciones en el nivel de expresión autoantígenos en el timo de forma ectópica puede tener consecuencias en la tolerancia. Se han descrito variaciones interindividuales en la expresión de varios antígenos como por ejemplo la insulina que han sido atribuidas, en parte, a polimorfismos en regiones reguladoras. En el modelo animal el gen AIRE parece actuar de una forma dosis dependiente en inducción de la expresión promiscua de genes correspondientes a antígenos periféricos en el timo y pequeñas variaciones de expresión pueden modificar la eficiencia del sistema de selección tímica. En un sistema experimental transgénico en el que la proteína HEL está bajo el control del promotor de insulina de rata (RIP) el ratón AIRE -/- no produce ni insulina endógena ni HEL, mientras en el ratón AIRE -/+ produce niveles intermedios, aproximadamente la mitad de los presente en ratones con dos copias funcionales del gen AIRE. [50]

Hoy día, el mecanismo por el que AIRE actúa como regulador de la expresión promiscua no se conoce totalmente. Se postula que AIRE recluta varios componentes de la maquinaria transcripcional y los dirige mediante su unión a la matriz nuclear hacia regiones genómicas específicas donde estarían agrupados los genes que regula.[51]

1.4 TOLERANCIA PERIFÉRICA

La delección de los clones autorreactivos en el timo aunque exhaustiva también deja escapar a la periferia un porcentaje de clones capaces de reaccionar contra moléculas propias. Se ha demostrado la existencia de clones capaces de reconocer proteína básica de la mielina [52], pro-insulina [53] y GAD65 [54] en individuos normales. Diferentes mecanismos periféricos permiten que estos clones autorreactivos no desencadenen una reacción específica. Los conceptos básicos son: ignorancia, anergia, delección, inhibición y supresión.

1.4.1 Ignorancia inmunológica

La ignorancia inmunológica se basa en que los linfocitos “naive” autorreactivos presentes en la periferia no encuentran las moléculas propias de una forma adecuada, ya sea por la presencia de barreras anatómicas o por falta de un ambiente propicio. Células neuronales o musculares no expresan moléculas MHC de clase II, rasgo esencial para el reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T CD4+, ni tampoco normalmente moléculas de adhesión que faciliten el contacto con los linfocitos. Por lo tanto, aunque existen clones autorreactivos contra antígenos en periferia, la diana no se encuentra accesible inmunológicamente.

1.4.2 Anergia

El estado de anergia de los linfocitos autorreactivos circulantes hace referencia a la no proliferación a pesar de producirse el encuentro con el antígeno para el que son específicos. Se produce por la inducción incompleta del linfocito ya que para que se de una respuesta inmunológica es necesario además del reconocimiento antígeno-anticuerpo una segunda señal de coestimulación proporcionada por las células presentadoras de antígeno, normalmente macrófagos y células dendríticas

1.4.3 Inhibición clonal

El inicio de la proliferación implica también activar los mecanismos de regulación que llevarán a la supresión de la respuesta. La molécula CTLA-4 forma parte de un mecanismo de inhibición necesario para este control.

1.4.4 Células T reguladoras

El sistema inmunológico ha generado mecanismos para la supresión activa de las células T autoreactivas que escapan al control de la selección clonal en el timo y salen a la periferia.

Las células T reguladoras o también llamadas T supresoras actúan suprimiendo la activación del sistema inmune. Son capaces de inhibir la respuesta autoinmune por lo que funcionan como mecanismo complementario de la tolerancia central. Las células reguladoras no proliferan por interacción de su TCR con un agonista pero son capaces de expandirse rápidamente en un ambiente linfopénico por lo que regulan en cierto modo la homeostasis del compartimento T.

La caracterización de las células reguladoras a nivel de marcadores de superficie específicos ha sido históricamente controvertida. El primer marcador de superficie que fue propuesto para definir esta población de linfocitos supresores fue CD25 (la cadena alpha del receptor de IL2) aunque también está expresado en células T activadas, por lo que necesariamente se debe completar el fenotipo regulador con otras moléculas. Otros marcadores propuestos fueron: CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)[55, 56] y GITR (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) o la liberación de citocinas como IL10 o TGF-beta, pero todas estas características también son compartidas por linfocitos activados.

El factor de transcripción FOXP3 es el rasgo que mejor define a las células con capacidad reguladora, tanto CD25+ como negativas. [57-59]

Las células CD4+CD25+ representan una fracción de un 5-10% del total de células CD4+[60] y su selección provoca enfermedades autoinmunes espontáneas [61].

Hoy día se distinguen las siguientes clases fenotípicamente diferentes de células T reguladoras [62, 63]:

1. Reguladoras naturales (nTregs) producidas en el timo con fenotipo FOXP3+CD4+CD25+. Su mecanismo supresor se basa en el contacto celular directo dependiente de la interacción con CTLA4
2. Células reguladoras inducidas periféricamente mediante dendríticas tolerogénicas. La acción supresora se debe a la expresión de IL-10 y TGFβ.
3. Células reguladoras con alta expresión de TGFβ, T helper 3 que también son inducidas periféricamente.

1.4.4.1 Gen FOXP3

El gen FOXP3 es un regulador transcripcional que posee dos motivos conservados: zinc finger y forkhead/winged helix.

Mutaciones en el gen FOXP3 lleva en humanos a desarrollar un síndrome autoinmune multisistémico llamado IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) ligado al cromosoma X, caracterizado por poliendocrinopatía, enteropatía y alteraciones inmunológicas.[64, 65]. El gen ortólogo murino Foxp3 produce un síndrome llamado scurfy que fenotípicamente copia el IPEX humano[66]. Ratones deficientes en Foxp3 no son capaces de generar células reguladoras CD4+CD25+ y sucumben frente al síndrome inflamatorio. La expresión ectópica de Foxp3 confiere función supresora en células CD4+CD25- [57]. De igual manera, la autoinmunidad de un ratón deficiente en Foxp3 puede evitarse por administración de células supresoras CD4+CD25+[59]

1.4.5 *Regulación periférica del sistema inmune mediante neuropéptidos anti-inflamatorios. Células dendríticas tolerogénicas.*

Los primeros neuropéptidos que se han relacionado con la regulación del sistema inmune han sido VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) y PACAP (Pituitary Adenylate cyclase-activating polypeptide), potentes agentes inmunosupresores que afectan tanto a la inmunidad innata como a la adaptativa [67-69].

En cuanto a la acción de VIP en la inmunidad adaptativa podemos destacar su capacidad anti-inflamatoria, actuando sobre macrófagos e inhibiendo la fagocitosis, la producción de radicales libres y la migración [70, 71]. Además, es capaz de inhibir la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas, así como promover la producción de IL-10 (citocina anti-inflamatoria). VIP es capaz de variar el balance de citocinas Th1/Th2 a favor de la inmunidad tipo Th2.

La acción de VIP sobre la respuesta adaptativa se basa en favorecer la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas cargadas con péptidos propios que activan o inducen la acción de células T reguladoras como mecanismo de tolerancia periférica.

La administración de VIP retrasa el debut, baja la frecuencia y la severidad en modelos experimentales de autoinmunidad [72-74].

La inducción de las dendríticas tolerogénicas está mediada a través del receptor VPAC1 y la vía de señalización de cAMP/PKA. [75]

INTRODUCCIÓN II

II. INTRODUCCIÓN

2. CONCEPTOS GENERALES DE REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

2.1 *Control Transcripcional*

En eucariotas, el DNA genómico está empaquetado en cromatina, que condensa el DNA y hace posible que el núcleo de la célula contenga gran cantidad de material genético. El consorcio público para la secuenciación del genoma humano [76] y el sector privado, Celera Genomics [77] presentaron el primer borrador del genoma humano en febrero del año 2001, sin embargo, no estaba exento de errores y faltaba por confirmar aproximadamente el 10% de la secuencia de la eucromatina, zona del genoma donde se localizan la mayoría de los genes y casi el 30% de las zonas heterocromatínicas. Actualmente se calcula que el número de genes que codifican para proteínas es de unos 20.000-25.000 [78], aunque todavía queda determinar un listado final de genes.

El genoma humano y el de organismos inferiores no difieren significativamente en cuanto al número de genes. Los fenómenos de presión evolutiva han llevado al genoma humano a aumentar la complejidad adoptando como estrategia la duplicación de porciones de DNA ya existentes y la elaboración de mecanismos de regulación más sofisticados de expresión génica en vez de incrementar el número de genes.

Las diferencias fenotípicas y la miríada de funciones diferentes que desempeñan las células eucariotas se deben a los genes que se transcriben diferencialmente en cada una de ellas y por consiguiente, las acciones y las propiedades de cada tipo celular se deben a las proteínas que contienen. La regulación de la expresión génica determina la concentración de los diferentes mRNAs, modulando la tasa y la periodicidad de la transcripción.

Podemos distinguir varios puntos de control sobre la regulación de la expresión génica:

2.1.1 *Inicio de la transcripción*

En eucariotas, la RNA polimerasa II es la encargada de transcribir todos los genes que codifican para proteínas. El proceso de transcripción requiere la formación de un complejo de factores de transcripción, que junto con la RNA polimerasa se une a las regiones promotoras de los genes a transcribir, por

ejemplo, TFIID que se une a la TATA box mediante el dominio TBP (TATA-Binding Protein). Constituyen los factores de transcripción de la maquinaria general o basal.

Por otro lado, el inicio de la transcripción se modula mediante proteínas reguladoras que activan o reprimen la síntesis de los genes uniéndose a su región promotora, o a los denominados enhancers (zonas reguladoras del genoma que pueden modular la transcripción de genes que no se encuentran necesariamente próximos).

Los factores de transcripción son proteínas estructuradas en dominios diferenciados, por un lado poseen dominios de unión al DNA y por el otro, dominios con capacidad reguladora de activación o de represión. Su concentración y su actividad controlan la expresión de la mayoría de los genes que codifican para proteínas mediante la unión al DNA y actuando sobre la maquinaria general de transcripción. Son elementos que ejercen su función en trans-.

Por otro lado, los factores de transcripción pueden modificar el estado de la cromatina como mecanismo de control de la expresión.

2.1.2 Control transcripcional, modificación del estado de la cromatina

2.1.2.1 Estructura de la cromatina

La cromatina es el conjunto de ADN y proteínas histónicas del núcleo de las células eucariotas. La regulación del inicio de transcripción se puede ejercer modificando el estado de condensación de la cromatina entre eucromatina y heterocromatina. La heterocromatina representa una región densa, hipoacetilada e inaccesible para los factores de transcripción y por lo tanto los genes que contiene estarían silenciados. Por el contrario la eucromatina sería un estado más laxo de unión del DNA a las histonas que permitiría el acceso de la maquinaria transcripcional.

La unidad estructural de la cromatina es el nucleosoma que se forma con dos subunidades de cada clase de histonas (H2A, H2B, H3 Y H4), o sea, estructura de octámeros empaquetada por aproximadamente 150 pb de DNA. Los nucleosomas están unidos entre sí por tramos cortos de DNA y por las histonas de unión tipo H1 que a su vez se empaquetan en unidades superiores. La estructura de la cromatina es altamente dinámica, con lo que puede pasar de su forma activa a la inactiva para silenciar o permitir la transcripción de los genes de una zona concreta.

2.1.2.2 Regulación de la transcripción

Las regiones N-terminal del núcleo de las histonas se ven modificadas frecuentemente por acetilación/metilación o fosforilación. La acetilación de las

histonas mediante enzimas llamadas histona acetiltransferasas (HATs) requiere la transferencia de un grupo acetilo del acetil-coenzima A al grupo amino del residuo lisina. Este proceso implica la modificación y reducción de la carga neta del núcleo de las histonas que conlleva un descenso de la afinidad por el DNA, el nucleosoma se desenrolla y esto permite el acceso a los factores de transcripción. Por el contrario la substracción de este grupo acetilo por parte de las histonas deacetilasas (HDACs) provoca la compactación de la cromatina haciendo inaccesible la zona para los factores que activarían la transcripción.

2.1.2.3 Proteínas dedos de zinc

Las proteínas dedos de zinc son la familia con mayor representación en el genoma eucariota, alrededor del 1% [79]. El motivo dedo de zinc es la unidad estructural de estas proteínas y tiene la capacidad de reconocer secuencias específicas y unirse al DNA [80], por ello las proteínas que lo contienen frecuentemente actúan como factores de transcripción. El motivo dedo de zinc se caracteriza por la presencia de 28 aminoácidos conservados. Existen diferentes tipos de proteínas dedos de zinc atendiendo a la estructura y composición de aminoácidos, el más común es el representado por dos residuos de cisteína y dos de histidina (C2-H2), que coordinan la unión de un átomo de zinc y forman una estructura terciaria de dos láminas beta antiparalelas y una hélice alpha. Este subgrupo de proteínas recibe el nombre de kruppel por su homología con el motivo encontrado en *Drosophila*. La primera proteína descrita con dedos de zinc de este tipo fue TFIIIA en *Xenopus laevis* que regula la expresión de los genes ribosomales 5S [80].

Las proteínas dedos de zinc suelen tener varias copias de este motivo, consecutivas y codificadas en el mismo exon, ubicadas en la región carboxilo terminal. La frecuencia de unidades estructurales repetidas del motivo zinc finger en un mismo gen se incrementa en organismos superiores, de esta manera, existen genes zinc finger con hasta 37 zinc fingers concatenados en humanos.

Las funciones que desempeñan las proteínas dedos de zinc son diversas. La primera función que se les atribuyó fue la de factores de transcripción debido a su capacidad de unirse al DNA. Posteriormente, por estudios cristalográficos de proteínas se descubrió que también eran capaces de interactuar con RNA [81].

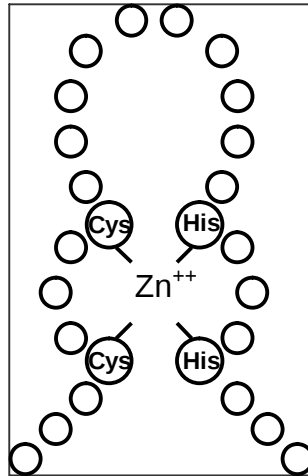


Figura 2: Estructura terciaria de un motivo dedo de zinc.

Existen aproximadamente 700 proteínas de este tipo C2-H2 en el genoma.

- Represión transcripcional y la caja KRAB

La caja KRAB (Krüppel associated box) es un dominio proteico conservado que se encuentra en el extremo amino-terminal de aproximadamente un tercio de las proteínas con dedos de zinc. Las proteínas con el dominio KRAB fueron inicialmente descritas en el año 1991 por Bellefroid et al [82]. La caja KRAB es un módulo de represión transcripcional específico de vertebrados de unos 75 aminoácidos organizada en dos exones diferentes, caja A y B separados por un intron de tamaño variable. La caja A es suficiente y necesaria para mediar la represión [83], por lo que frecuentemente el subdominio B no está presente. Al encontrarse en otro exon puede ser delecionado mediante procesamiento alternativo del mensajero. La estructura terciaria del dominio KRAB la conforman dos hélices anfipáticas.



Figura 3: Esquema de la estructura de una proteína dedos de zinc con caja KRAB.

Muchos genes que codifican para proteínas con cajas KRAB se encuentran organizados en “clusters” o grupos dentro de los cromosomas. El cluster más conocido y que engloba el 51% de los genes con cajas KRAB está en el cromosoma 19, en la región 19q13. [84] Otros clusters están localizados en las

zonas centroméricas y teloméricas de otros cromosomas. La agrupación de estos genes en los cromosomas parece indicar un efecto de duplicación posiblemente por presión evolutiva [85].

- Mecanismo de represión de la caja KRAB

Las proteínas con caja KRAB para desempeñar su función de represión se asocia con co-represores. La proteína KAP1 (KRAB associated protein 1), también llamada TIF1beta (transcriptional intermediary factor 1) o KRIP1 (KRAB interacting protein) es el corepresor mejor estudiado que interactúa con la caja KRAB. Fue identificada por tres grupos diferentes [86-88]. Se une al dominio KRAB como oligómero y recluta otros integrantes del complejo represor como Heterocromatina protein 1 (HP1alpha, HP1beta), histona deacetilasas y setdb1 una nueva proteína con motivo SET que metila la lisina 9 de la histona H3. Las proteínas HP1 tienen la capacidad de unirse a esta lisina metilada para condensar la cromatina [89-91].

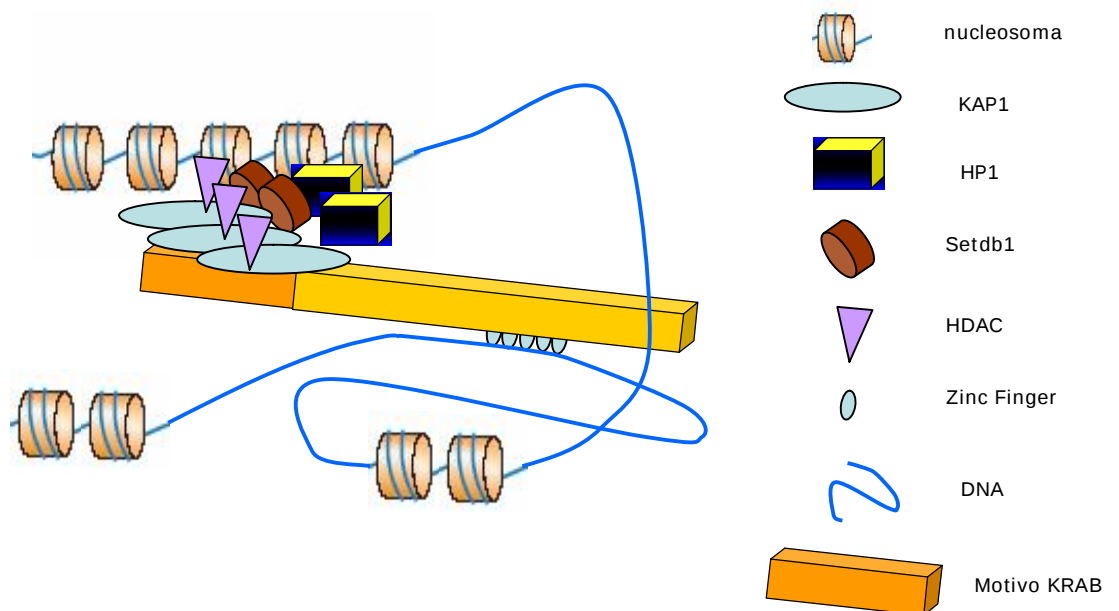


Figura 4: Modelo del complejo formado por una proteína con caja KRAB para mediar la represión

La función principal de la caja KRAB es la de represión transcripcional de la RNA polimerasa I, II y III [92, 93]. Otras funciones propuestas son, por ejemplo, la que desempeña Kid-1 que se une al heteroduplex de DNA en el nucleolo y lo desintegra. Esto provoca una disminución de síntesis de RNA ribosómico y de RNA

polimerasa I, ya que son funciones que se llevan a cabo en este compartimento celular. También se ha visto que el dominio KRAB de Kid1 puede unirse y posiblemente actuar vía RNA polimerasa I [94].

Znf74 es una proteína nuclear que se puede unir a RNA y que interactúa con la forma hiperfosforilada de RNA polimerasa II en presencia de factores de splicing, uniendo de esta manera la regulación transcripcional y la post-transcripcional. Este factor de transcripción se ha relacionado con el Síndrome de DiGeorge, síndrome caracterizado por hipoplasia de timo y paratiroides. Znf74 se encuentra deletado de forma hemicigota en la mayoría de los casos sugiriendo que el nivel de expresión de este gen podría influir en las anomalías del síndrome [95].

ZNF91 es una importante y numerosa subfamilia dentro del grupo de KRAB zinc fingers. Se encuentra situada en la región cromosómica 19p12-p13.1, donde se localiza un importante cluster de proteínas zinc finger. Sus integrantes aunque ubicuos están más expresados en células T[96] .

INTRODUCCIÓN III

III. INTRODUCCIÓN

3. REGULACIÓN POST-TRANSCRIPCIONAL, CONCEPTOS GENERALES

3.1 *Mecanismos de control post-transcripcional*

La mayoría de genes regulan su expresión al inicio de la transcripción, aunque en eucariotas los transcritos primarios no son funcionales y deben ser trasladados y procesados en el citoplasma.

Un punto importante de control de la síntesis de proteínas se realiza a nivel post-transcripcional. Se han identificado gran cantidad de elementos en las secuencias no traducidas del RNA mensajero que ejercen una regulación post-transcripcional en la expresión génica, actuando a nivel de la estabilidad del transcrito, modificando su localización subcelular o variando la eficiencia de la traducción [97].

Por lo general, en los transcritos eucariotas encontramos la señal de poliadenilación a 10-35 nucleótidos antes de la cola de adeninas.

La vida media de los transcritos (turnover o recambio) representa un aspecto clave para el control de la expresión génica, puede oscilar entre unos pocos minutos y unos días. Los mRNA de vida media más corta pertenecen a genes fuertemente regulados y que frecuentemente codifican para proteínas que son necesarias únicamente de forma puntual.

Motivos específicos estructurales que actúan en cis- sobre el RNA pueden ser una marca de inestabilidad de los mRNA bajo determinadas condiciones. Una de las clases más importantes de estos elementos en cis- son las zonas ricas en adeninas-uracilos, los llamados motivos AU o regiones ARE (AU-Rich Elements).

Shaw y Kamen observaron que las regiones ARE de la zona 3' no traducida del mRNA del gen GM-CSF introducidas en el gen de la beta-globina promovía su degradación, reduciendo su vida media de más de 10 horas a tan sólo unos 30 minutos.

Las regiones AREs controlan la degradación del mRNA del gen que las contiene mediante interacciones con proteínas que se unen específicamente a estas zonas.

3.1.1 Motivos AU, inestabilidad del transcrito

Los motivos AU actúan sobre la estabilidad y por consiguiente ejercen su regulación a nivel post-transcripcional. Están localizados en las regiones 3' no traducidas de los RNA mensajeros en genes de vida media corta como citocinas, factores de transcripción y protooncogenes [98]. Se caracterizan por mediar la deadenilación y la degradación del transcrito. Típicamente estas regiones contienen pentámeros de adeninas-uracilos, con el pentámero consenso AUUUA repetido dentro de una región rica en uracilos.

La traducción aberrante de algunos genes controlados por este mecanismo se ha visto implicada en procesos inflamatorios, cáncer y autoinmunidad. Mutaciones que estabilizan c-fos o c-myc pueden llevar a una transformación oncogénica .

Se calcula que alrededor de un 8% de genes contienen motivos AU en su zona 3' no traducida [99]

Clases de motivos AU

Se han definido tres clases de motivos AU en función de su secuencia y de sus propiedades funcionales.

- Clase I

Contienen copias dispersas del motivo AUUUA embebidos en regiones ricas en uracilos. Factores de transcripción y proto-oncogenes (c-myc, c-fos)

- Clase II

Contienen el motivo básico AUUUA en tandem n veces. Típico de citocinas IL2, IL3, TNF alpha, GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor)

- Clase III

No poseen el motivo consenso pero contienen regiones ricas en uracilo como es el caso de c-jun

Proteínas que se unen a los motivos AU (AUBPs, AU binding proteins)

El mecanismo que produce inestabilidad a los transcritos que poseen motivos AU en su cola 3' no traducida incluye la participación de proteínas capaces de unirse al mRNA y producir la deadenilación de la cola polyA y la posterior degradación.

AUF1/hnRNP D, tristetraprolin TTP, BRF1, KSRP, TIA-1 y TIAR son ejemplos de proteínas con capacidad de unirse al RNA y producir su desestabilización.

El mecanismo concreto que usan para mediar la degradación está siendo estudiado actualmente. Algunas de estas proteínas reclutan el exosoma, un complejo multicatalítico con capacidad exo-ribonucleolítica 3'-5' [100, 101]

AUF1/hnRNP

AUF1 también llamada hnRNP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein D) es una proteína con capacidad desestabilizadora que se une directamente a los motivos AU pero que no posee capacidad ribonucleolítica propiamente.

Se ha asociado la interacción de AUF1 con la desestabilización de numerosos genes: TNF alpha, IL-1b, GM-CSF, *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, EGR-1, p21, MnSOD, catalasa, varias ciclinas, GROa/CXCL1, cdc25, Bcl-2 y otros genes [102-104]

La degradación de los transcritos con AREs es también dependiente del proteasoma y de ubiquitinación. AUF1 forma un complejo con proteínas de stress como: heat shock proteins hsc70-hsp70, el factor de inicio de la traducción eIFG - 4 y la proteína de unión a la cola polyA (PABP). Cuando AUF1 se desplaza de este complejo es accesible a la ubiquitinación. La degradación de AUF1 por parte del proteasoma comporta el bloqueo de la rápida desestabilización de los transcritos con motivos AU. [105]

HuR/HuA

Las proteínas HuR también llamadas HuA son proteínas ubicuas de la familia ELAV (embryonic lethal abnormal vision) [106]. Otras proteínas de la misma familia son específicas de neurona (HuB, HuC, HuD) [107].

Son proteínas que se unen al RNAm y ejercen un efecto estabilizador postranscripcional sobre: ciclinas A y B1, *c-fos*, β -catenina, COX-2, miogenina, MyoD, GM-CSF, VEGF (vascular endotelial growth factor), TNF alpha, *c-Myc*, interleucinas, Hsp70, p21, p27, y p53 [108].

TTP

Tristetraprolin, también llamada Nup475, TIS11 o GOS24 es una proteína dedos de zinc con el inusual motivo CCCH. Tiene capacidad de unión al RNA, en concreto a los motivos AU, y promueve su deadenilación y degradación. Se ha demostrado su acción sobre GM-CSF y sobre TNF alpha. Ambos transcritos poseen motivos AU de clase II. [109, 110]

La vía de señalización de las MAPK puede modular la acción de la proteína TTP ya que posee una serina fosforilable por parte de p38MAPK. Los mismos estímulos que provocan el incremento de su transcripción a su vez favorecen la

fosforilación en las serinas y la translocación de núcleo a citoplasma. Estudios recientes han demostrado que la expresión de TTP estaría regulada por STAT1, un factor de transcripción controlado por interferon gamma. En macrófagos la estimulación con LPS implicaría la expresión de TTP inducida por interferón gamma con el fin de controlar y limitar la expresión de varios genes proinflamatorios CCL2, CCL3, IL6, TNFalpha mediante su desestabilización. [111]

Modelos animales deficientes en proteína TTP desarrollan un complejo síndrome que incluye artritis inflamatoria, dermatitis, caquexia, autoinmunidad e hiperplasia mieloide y que puede ser prácticamente subsanado con anticuerpos anti-TNFα

TIA-1

TIA-1 (T-cell-restricted intracellular antigen 1) y TIAR (TIA-1- related) interaccionan con RNA mensajeros en regiones ricas en uracilo, en concreto regiones ARE de TNFalpha y COX-2

3.1.2 Otros mecanismos de control

Micro RNAs

Los microRNAs (miRNAs) son RNA de corta longitud y de cadena sencilla que se unen a los mRNA reprimiendo su traducción. Se descubrieron en el transcurso del análisis de las mutaciones de los genes lin-4 y let-7 en C.Elegans que causan defectos en el desarrollo larvario [112, 113]. Se demostró que estos genes no codifican para proteínas sino que su transcripción produce RNAs de cadena muy corta (21-22 nucleótidos) que se unen específicamente a la región 3' no traducida de ciertos genes diana para reprimir su traducción [114]. Están evolutivamente conservados y representan una de las clases de genes reguladores más abundante del genoma, entre 0.5-1% [115]. La mayoría de los miRNA en genomas animales sólo poseen cierto grado de complementaridad [116] y es posible que se necesite la unión de varios miRNAs en una misma región no traducida para producir represión [117]. Los miRNA primarios son procesados por una Ribonucleasa III (Drosha) en el núcleo que produce un bucle o "hairpin" de unos 70 nucleótidos [118]. Estas estructuras (pre-miRNAs) son exportadas al citoplasma donde la proteína Dicer con capacidad ribonucleasa es capaz de cortar el hairpin y una de las dos cadenas de la estructura intermediaria se incorpora al complejo RISC (RNA-induced-silencing complex)

Se ha demostrado en células S2 de *Drosophila* que proteínas implicadas en el procesamiento de los microRNAs, Argonauta 1, argonauta 2 y DICER están asociadas con el mecanismo de regulación de inestabilidad del transcrito de TNF α . En el caso de DICER1 se ha demostrado también en células HeLa.[119] miR16 es un microRNA que posee una secuencia complementaria a los motivos AU y que es capaz de interactuar con los motivos AU de COX2 y TNF α en un sistema de RNA reportero modulando la estabilidad del transcrito.

La hipótesis más plausible que se debate en la actualidad implica la acción orquestada de todos los mecanismos apuntados anteriormente.

TTP se puede unir a motivos AU mediante su zinc finger característico [120] pero también se ha visto asociada al complejo eIF2C/Ago, que a su vez interactúa con miR16. Cuando este complejo encuentra un Mrna con motivos AU en virtud de la complementariedad de secuencia con miR16 se unirían y transitoriamente podría interactuar con RISCs (RNA induced silencing complex)

Las proteínas de unión a los motivos AU, los miRNAs y el exosoma podrían cooperar para favorecer la degradación de los transcritos diana.

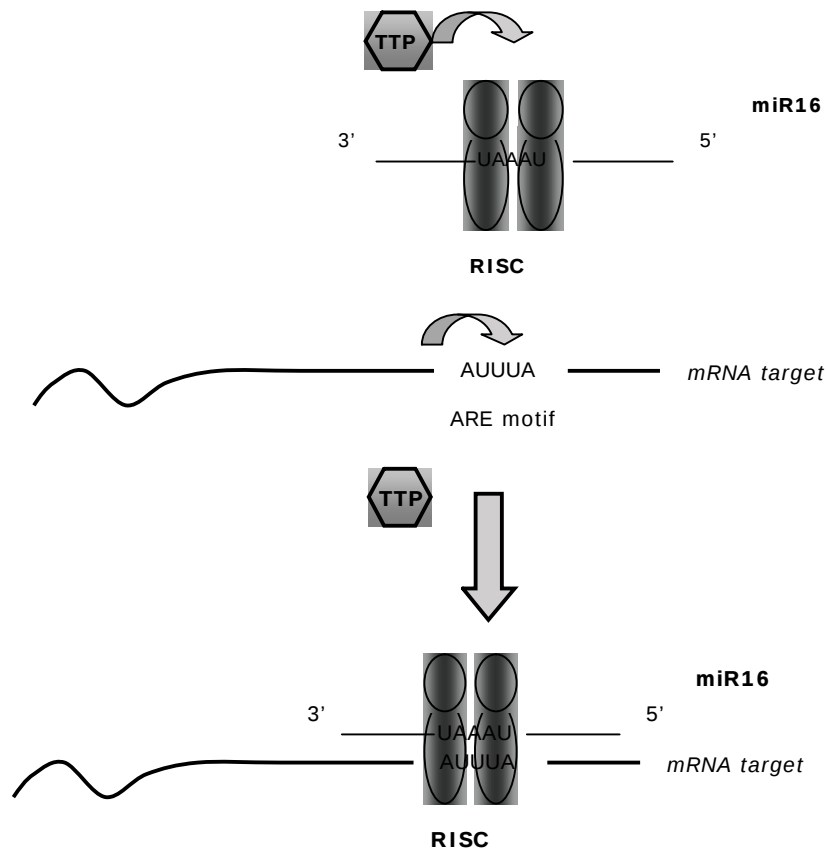


Figura 5: Modelo de degradación de los transcritos con motivos AU

IV. INTRODUCCIÓN

4. Diabetes Mellitus insulino dependiente, Diabetes Tipo I

4.1 Definición

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune órgano-específica que se caracteriza por la destrucción progresiva de las células beta del páncreas productoras de insulina hasta que la homeostasis de la glucosa queda comprometida.

4.2 Genética de la enfermedad

Aunque la etiología de la diabetes tipo 1 es desconocida se sabe que es una enfermedad con clara predisposición genética. Se han encontrado hasta 18 regiones cromosómicas asociadas con la enfermedad y se ha adoptado la nomenclatura de IDDM1-IDDM18.

- IDDM1

La región cromosómica mejor estudiada con relación a la susceptibilidad respecto las enfermedades autoinmunes corresponde a la zona de los alelos HLA, locus designado como IDDM1 en el caso de la diabetes tipo 1.

Las moléculas HLA participan en los procesos de reconocimiento antigénico, procesamiento y presentación que dan lugar a la activación y al desencadenamiento de una respuesta inmune.

Se ha descrito la región MHC de clase II como la que contribuye más a la susceptibilidad a la diabetes tipo I, en especial los genes DR y DQ. Se sabe que individuos con el haplotipo DR3/DR4 son susceptibles a desarrollar la enfermedad.

- IDDM2

El locus IDDM2 contiene un polimorfismo de repeticiones en tandem de número variable (VNTR) donde se calcula que reside el 10% del riesgo genético de la enfermedad [121].

La secuencia consenso repetitiva es de unos 14-15 nucleótidos y puede contener ligeras variaciones [122]. Se han establecido tres clases arbitrarias de alelos VNTR en función del número de repeticiones [123]:

Clase I: 26-63 repeticiones. Es el alelo más abundante en población caucasiana.

Clase II número intermedio de repeticiones. Muy poco representada.

Clase III 141-209 repeticiones.

Se sabe que los alelos de clase I están asociados con riesgo a sufrir la enfermedad, a pesar de ser los más frecuentes en la población y los de clase III asociados con una protección dominante. Poseer una sola copia del alelo con más repeticiones implica una reducción del riesgo de 3-5 veces de sufrir la enfermedad comparado con un haplotipo homocigoto clase I/I [124, 125]

Estudios concluyentes afirman que los alelos de clase III implican una mayor expresión de insulina en el timo y menor en el páncreas [126, 127].

El locus IDDM2 afecta el nivel de transcripción de insulina en el timo y por lo tanto modularía la tolerancia central induciendo selección negativa y la deleción clonal del clon autoreactivo en función de su abundancia de una manera dosis dependiente. Este hecho se confirmó con un modelo murino de niveles de insulina controlados y graduados [128] con relación al número de copias del gen de la insulina. Los ratones con menor expresión de insulina en el timo presentaban en periferia linfocitos reactivos contra este autoantígeno mientras que los ratones que mantenían con niveles normales de insulina no presentaban esta reactividad.

- CTLA-4

CTLA4 (Cytotoxic T Lymphocyte-associated 4) también llamada CD152 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en los linfocitos T activados y que actúa como molécula coestimuladora. Se une a B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) de las células presentadoras de antígenos para transmitir una señal inhibitoria en las células T que lleva a la apoptosis.

El locus IDDM12 de susceptibilidad de la diabetes incluye el gen CTLA4. Numerosos estudios han confirmado la asociación de polimorfismos de este gen con enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus [129-131], el hipotiroidismo autoinmune o la enfermedad de Graves [130].

En el mismo cromosoma también se encuentran dos genes candidatos importantes por su función en el sistema inmune, ICOS (Inducible –Cell T Co-stimulator) y CD28.

Se ha descrito un SNP (single Nucleotide Polymorphism) en la zona 3' no traducida del gen CTLA4, A6230G fuertemente asociado con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Se propuso un mecanismo de acción de los alelos sobre el nivel de mRNA de la forma soluble de la proteína que carece del dominio transmembrana [132] pero continúa controvertido.

- PTPN22

El gen PTPN22 está expresado en células T y codifica para una proteína llamada LYP (Lymphoid tyrosine phosphatase). Esta proteína coopera con la kinasa Csk (C terminal Src Tyrosine Kinase), un regulador negativo de la cascada de señalización del TCR, para detener la activación T. También se asocia con Grb2.

Se ha descrito un polimorfismo del tipo SNP en el gen PTPN22. La sustitución C1858T implica un cambio a nivel de proteína de una arginina (620R) por un triptófano (620W). Este polimorfismo se encuentra en la zona de unión de la proteína LYP con el dominio SH3 de Csk y se ha demostrado in vitro que el alelo con arginina en la posición 620 confiere 3 veces más afinidad en esta unión. Como consecuencia, la proteína LYP con triptófano en esta posición se une ineficientemente a Csk lo que implica una mayor activación T.

Al igual que CTLA4, PTPN22 representa un locus de susceptibilidad para varias enfermedades autoinmunes y así además de la diabetes mellitus se ha descrito para la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto.

La mayoría de las variaciones genéticas pueden ser asociadas a un polimorfismo del tipo SNP (Single Nucleotide Polimorphism) y se cree que dichas variaciones pueden provocar cambios a nivel de fenotipo. Hoy día los esfuerzos realizados para obtener un mapa de polimorfismos del genoma humano han dado como resultado una herramienta para los estudios de asociación con diferentes enfermedades que permite acotar de una forma más precisa los locus de susceptibilidad.

Para gestionar y explorar las posibilidades de los estudios de asociación basados en los SNPs, estudios GWA (Genome-wide Association) se creó un consorcio llamado Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC).

Recientemente, este consorcio, utilizando los GeneChip arrays de Affymetrix de 500K ha publicado estudios sobre locus asociados a diferentes enfermedades, entre ellas la diabetes tipo 1 [133].

De esta manera, además de los anteriores locus de susceptibilidad descritos anteriormente se han ido añadiendo nuevos locus como por ejemplo:

- La región IFIH1 (interferon-induced helicase region)

El gen IFIH1 tiene como función contribuir en la apoptosis de células infectadas con virus por lo que actuaría como un sensor de infección viral. La relación con la diabetes tipo 1 podría radicar en las causas ambientales descritas en el desencadenamiento de la enfermedad como la infección viral por Coxsackievirus [134]. La asociación de este locus con la diabetes tipo 1 se llevó a cabo con el análisis de los nSNPs (nonsynonymous SNPs), variaciones localizadas en las regiones codificantes que pueden dar lugar a variaciones en los aminoácidos de la proteína.[135]

OBJETIVOS

OBJETIVOS

SUBPROYECTO 1

Objetivo 1

Encontrar un método para identificar genes de interés en el sistema inmune, potencialmente dianas terapéuticas, genes de activación temprana, genes fuertemente regulados con motivos AU.

- 1.1** Diseñar y validar un método eficaz para la identificación de genes con motivos AU
- 1.2** Aplicar el método para identificar genes con motivos AU con expresión diferencial en activación

SUBPROYECTO 2

Objetivo 2

Comprobar que un gen identificado mediante la metodología establecida en el objetivo 1 cumple las características de estar implicado en la respuesta inmune, ser de activación temprana y regulación de la transcripción muy estricta

- 2.1** Caracterizar el gen ZNF304 identificado mediante el método AU-DD: analizando la secuencia nucleotídica del gen y la putativa traducción describiendo sus características y motivos conservados.
- 2.2** Determinar el patrón de expresión de ZNF304 en tejidos mediante PCR cuantitativa y convencional
- 2.3** Caracterización funcional inicial del gen, analizar el nivel de expresión en activación.

SUBPROYECTO 3**Objetivo 3**

Con la experiencia adquirida durante el desarrollo de los objetivos 1 y 2 pudimos desarrollar un proyecto cuyo objetivo principal es avanzar en el conocimiento de la tolerancia central y concretamente en el papel de la variabilidad interindividual de la expresión de autoantígenos en la predisposición a autoinmunidad.

- 3.1** Analizar la frecuencia alélica del locus de susceptibilidad para la diabetes mellitus insulino-dependiente, IDDM2, en una población normal en función del polimorfismo PstI presente en la región 3'UTR del gen de la insulina.
- 3.2** Estudiar la expresión de insulina en el timo humano normal y correlacionar el nivel de expresión de insulina con el genotipo del locus IDDM2
- 3.3** Estudiar la expresión de AIRE en el timo humano, gen regulador de la transcripción promiscua de autoantígenos y correlacionar el nivel de expresión del gen AIRE en el timo con la expresión de insulina como ejemplo de gen regulado por este factor de transcripción

SUBPROYECTO I

Cloning of ARE-containing genes by AU-motif-directed display

Dominguez O, Asshab Y, Sabater L, Belloso E, Caro P, Pujol-Borrell R

Genomics, 1998 Dec 1;54(2): 278-86

RESUMEN DE RESULTADOS I

57-64

DISCUSIÓN I

65-66

RESUMEN DE RESULTADOS I

Cebadores de retrotranscripción

Para poner a punto el método AU-DD, diseñamos varios cebadores de retrotranscripción que contenían, además de un trecho de Timinas, secuencias diversas para usar como molde en la PCR posterior en combinación con un cebador 'sense' dirigido a los motivos AU. Las secuencias incluidas en el cebador de retrotranscripción debían de estar lo más equilibradas posibles con los cebadores de PCR dirigidos a los motivos AU. Una temperatura de fusión (T_m) lo más parecida entre los dos cebadores de la PCR es un factor muy importante para una buena amplificación y para evitar posibles amplificaciones artefactuales o inespecíficas debidas a la amplificación a partir de un solo primer. Por ello, posteriormente se decidió introducir un motivo AU2 (motivo AU doble) añadido en el cebador de retrotranscripción ya que de este modo se podría usar un cebador único que funcionase a la vez como 'sense' y 'antisense'. Además para evitar el inicio inespecífico de la transcripción se incluyó una base degenerada "B" (significa no A, no adenina) en el cebador de retrotranscripción, como primera letra de la cola 3' no traducida, o sea, anterior al trecho de Adeninas de la cola polyA del transcrito.

Diseño de cebadores dirigidos a los motivos AU

Los primeros cebadores que se diseñaron contenían un único motivo AU (ATTTA) pero debido a su inespecificidad se pasó a un modelo de cebador con un motivo AU doble, como es usual encontrar de forma natural en muchos de los genes con motivos AU.

Para aumentar la T_m del cebador con motivos AU fue necesario incluir una parte 5' que actuase como ancla con guaninas (G7AU2) o una combinación de guaninas y timinas (GTGAU2). Las dos opciones resultaron válidas ya que cada diseño era eficiente para un grupo de genes diferentes, abarcando así un grupo más grande y variado de especies diferentes.

Para validar el funcionamiento de los cebadores con motivos AU2 amplificamos como control positivo un fragmento de la zona 3' no traducida de la IL2, que contiene motivos AU. En este caso resultó más eficiente el primer G7AU2.

Para ganar afinidad con la secuencia natural que rodea el motivo AU se probó una modificación en los cebadores incluyendo inosinas en la parte 5', ya que las inosinas son complementarias a cualquier base nitrogenada (A,T,C,G). La eficiencia de amplificación del control de IL2 no se incrementó cuando se usó el primer con inosinas

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN I

en combinación con otros primers AU2, aunque el número de especies diferentes aumentó sensiblemente.

Tabla de primers del método AU-DD y de genes control

RT	G7AU2dt	GGGGGGGTATTTATTTA(ACGT)TTTTTTTTTTTTTT(ACG)		
PCR	G7AU2	GGGGGGGTATTTATTTA	G7AU2A	GGGGGGGTATTTATTTAA
	GIAU2	GGGIIIIITATTTATTTA	G7AU2C	GGGGGGGTATTTATTTAC
			G7AU2G	GGGGGGGTATTTATTTAG
			G7AU2T	GGGGGGGTATTTATTTAT
RT	G7GAU2DT	GGTGGGTGGTATTTATTTA(ACGT)TTTTTTTTTTTTTT(ACG)		
PCR	GTGAU2	GGTGGGTGGTATTTATTTA	GTGAU2A	GGTGGGTGGTATTTATTTAA
	GTIAU2	GGTIIIIITATTTATTTA	GTGAU2C	GGTGGGTGGTATTTATTTAC
			GTGAU2G	GGTGGGTGGTATTTATTTAG
			GTGAU2T	GGTGGGTGGTATTTATTTAT
IFN α	J00207	IFNa513s	GGCCTTGACCTTTGCTTTA	
		IFNa915as	CTTCATCAGGGGAGTCTCTGT	
	GAPDH M33197	GAPDH19s	TCTTCTTTTGCCTCGCCAG	
		GAPDH390as	AGCCCCAGCCTTCTCCA	

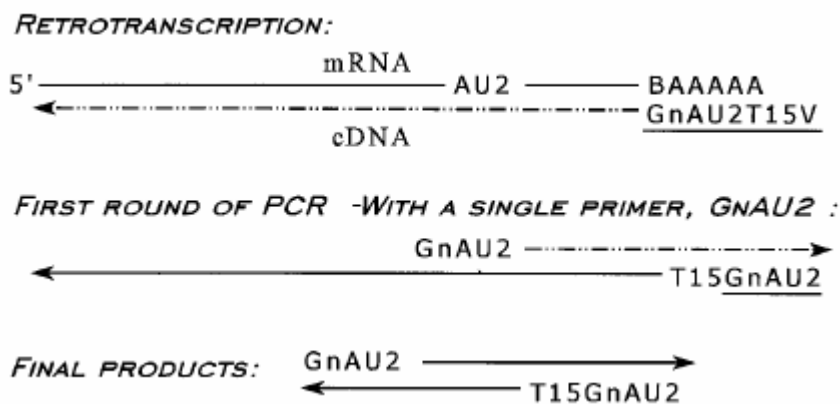
Esquema del método AU-DD

Figura 6: Esquema del método AU-DD

Las líneas punteadas corresponden a las cadenas de DNA sintetizadas a partir del molde correspondiente.

1. B significa no Adenina y G no timina. Las cadenas monohebra de cDNA se sintetizan a partir del mRNA con el cebador de retrotranscripción que incluye un motivo AU2 artificial
2. Se sintetiza la cadena complementaria copia de los fragmentos de cDNA mediante PCR con un primer único.

El producto final son fragmentos de DNA de doble cadena con el motivo AU2 natural y el artificial introducido en el cebador de retrotranscripción.

Análisis de los fragmentos AU-DD

El método nos permite identificar fragmentos de genes con motivos AU expresados diferencialmente, esto es, que han modificado su tasa de transcripción ante diferentes estímulos aplicados o en diferentes estadios de desarrollo.

El resultado del AU-DD recuerda a la imagen del típico RNA fingerprinting [136, 137].

Clonamos y secuenciamos 73 fragmentos de genes activados que correspondieron a 59 genes diferentes, ya que varios genes fueron clonados en diferentes experimentos. Sólo el 14% (8 genes) eran genes conocidos previamente: 2 citocinas (TNF α y IL-8), 2 transductores de señales (CL100 y p167), 2 factores de transcripción (HIF-1 y G0S24), 1 gen de acción inmediata (DIF-2), y 1 gen asociado con morfogénesis (CAZ-1). El resto de genes (51 fragmentos, 86%) no estaban previamente caracterizados, aunque 19 fragmentos (37%) se podían encontrar en forma de ESTs en las bases de datos. 15 cDNAs contenían homologías con elementos repetitivos y 2 de ellos (3% del total clonado) tuvieron que excluirse de

posteriores estudios al no encontrarse una zona diferencial específica de cada gen para diseñar cebadores y proceder al screening de genotecas.

A continuación detallamos en forma de tabla los genes aislados mediante el método AU-DD que eran conocidos en las bases de datos.

Tabla de genes previamente conocidos e identificados por el método AU-DD

<i>Gen</i>	<i>clon AU-DD</i>	<i>Sustrato</i>	<i>pb del clon</i>	<i>cola polyA</i>
TNF α	YG39-2	T α β 122.12	300	+
(X02910)	EE2-16F2	Adh	298	
CL100	YG39-3	T α β 122.12	565	+
(X68277)	ED166-8C	Adh		
IL-8	ED166-8B	id	662	+
(M28130)	EE2-8C			
DIF-2	YG440-2	T α β 122.12	343	+
(Y14551)	ED166-12D	Adh	403	
P167	LG43-4A2	T α β 122.12	450	+
(U58046)	LG141-7B1	Adh		
HIF-1	LG141-7A	id	542	+
(U22431)	ED128-7A	id	483	
GOS24	EED2-12C	id	200	+
(M63625)				
CAZ1	EE2-16F1	id	357	-
(U56637)				

Las secuencias de los clones aislados mediante AU-DD que no eran conocidas previamente en las bases de datos fueron introducidas en el GenBank. En la tabla 3 del trabajo se muestran los números de accesos asignados y las características del clon.

Autoradiografía: resultado del método AU-DD

Ejemplo de un gel del método AU-DD. En este caso se muestra el resultado utilizando el cDNA de monocitos adherentes y el cebador AU2A con una ronda de PCR (protocolo 1).

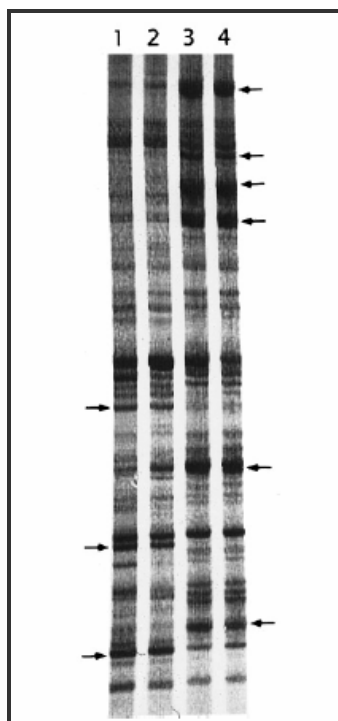


Figura 7: Autoradiografía, resultado del método AU-DD.

Las flechas indican los fragmentos de genes que están diferentemente expresados.

En el carril 1 y 3 se usó cDNA sin diluir y en el 2 y 4 diluido a 1/5.

1 y 2 corresponden a células activadas y 3 y 4 corresponden a células en reposo.

Los genes desconocidos identificados por el método AU-DD en la actualidad.

Las bases de datos actuales, gracias a la finalización de los proyectos de secuenciación masiva del genoma humano, nos permiten analizar los fragmentos de secuencia obtenidos en el proyecto AU-DD y valorar el resultado de la búsqueda de nuevos genes con motivos AU con interés biológico. A continuación presentamos la tabla de genes con los resultados de este análisis

TABLA DE GENES

Num. Acc	Símbolo	Nombre del gen	Unigene	Clones
AJ227854	IL12RB2	Interleukin 12 receptor, beta 2	Hs.479347	YG31-1 YG81-3B LG43-4B2
AJ227855	CKAP2	Cytoskeleton associated protein 2	Hs.444028	YG31-2 YG36-2
AJ227856	GOLTIB	Golgi transport 1 homolog B	Hs.62275	YG31-3 YG81-4
AJ227857	GOLTIB	Golgi transport 1 homolog B	Hs.62275	YG31-3 YG81-4
AJ227858	GOLTIB	Golgi transport 1 homolog B	Hs.62275	YG31-4
AJ227859	EGLN1	Egl nine homolog 1	Hs.444450	YG36-1
AJ227860	COTL1	Coactosin like 1	Hs.289092	YG39-1A
AJ227861	ANK3	Ankyrin 3, node of Ranvier (Ankyrin G)	Hs.499725	YG39-1B
AJ227862	PAM	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	Hs.369430	YG39-1C
AJ227863	MBNL1	Muscle blind like	Hs.478000	YG39-2B
AJ227864	PLS3	Plastin 3(T isoform)	Hs.496622	YG40-1A
AJ227865	ACSL4	Acyl-CoA synthetase long chain family member 4	Hs.268785	YG40-1B
AJ227866	UBAP2L	Ubiquitin associated protein 2-like	Hs.490551	YG40-3A
AJ227867		HSA227867 Homo sapiens partial Mrna		YG40-3B
AJ227868	PFKFB3	6-Phosphofructo-2 kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	Hs.195471	YG40-4 ED166-8F EE2-12B
AJ227869	ZXDB	Zinc finger X-linked, duplicated B	Hs.156257	YG40-5
AJ227870	DIP2B	Disco interacting protein 2 homolog B	Hs.505516	YG81-1
AJ227871	SFXN1	Sideroflexin 1	Hs.369440	YG81-2A
AJ227872	GIMAP4	GTPase, IMAP family member 4	Hs.647101	YG81-2B
AJ227873		HSA227873		YG81-3A
AJ227874		FLJ39051 Hypothetical gene supported by AK09370		YG81-5A
AJ227875	C1orf71	Chr 1 open reading frame 71, similar to PPAP(human prostatic and phosphatase p	Hs.368353	YG81-5B
AJ227876	C21orf91	Chr 21 open reading frame 91, similar to EURL protein homolog	Hs.293811	YG81-6
AJ227877		Homo sapiens partial Mrna LG43-4A1		LG43-4A1
AJ227878	ZNF395	Zinc finger protein 395	Hs.435535	LG43-4B1
AJ227879	NFAT5	Nuclear factor of activated T cells.5, tonicity responsive	Hs.371987	LG141-7B2
AJ227880		partial Mrna LG141-7C	Hs.500203	LG141-7C
AJ227881		partial Mrna LG141-8A	Hs.500203	LG141-8A
AJ227882	2'-PDE	2'-phosphodiesterase	Hs.572993	ED82-4A1
AJ227883	HIVPE2	Human immunodeficiency virus type 1enhancer binding protein	Hs.510172	ED82-4A2 ED82-7A
AJ227884	PITPNC1	Phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic1	Hs.591185	ED82-7B
AJ227885	BECL1	Beclin 1 (coiled-coil myosin-like BCL2 interacting protein	Hs.12272	ED82-7C
AJ227886	TNFAIP6	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	Hs.437322	ED84-3A EE2-8D
AJ227887	GNAL	Guanine nucleotide binding protein (G protein)alpha activating activity polypeptide	Hs.136295	ED106-4B
AJ227888	RFTN1	Raftlin, lipid raft linker 1	Hs.98910	ED109-4A ED166-8E
AJ227889		partial mRNA ID ED109-8A	Hs.650505	ED109-8A
AJ227890	AGPAT4	1-Acylglycerol-3-phosphate o-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase)	Hs.353175	ED166-4A1
AJ227891	AGPAT4	1-Acylglycerol-3-phosphate o-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase)	Hs.353175	ED166-4A2
AJ227892		HSA227892 partial clone		ED166-8A
AJ227893	GBF1	Golgi-specific brefeldin A resistance factor 1	Hs.290243	ED166-8D
AJ227894	RAP1B	Member of RAS oncogene family RAP1B	Hs.369920	ED166-12B
AJ227895		Partial Mrna	Hs.594961	ED66-5A
AJ227896	MET	Met protooncogene (hepatocyte growth factor receptor)	Hs.132966	ED166-12F
AJ227897		HSA227897 partial Mrna		EE2-4B
AJ227898	B4GALT5	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	Hs.370487	EE2-8E
AJ227899	GRASP	GRP1(general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	Hs.407202	EE2-12A
AJ227900	APOL6	Apolipoproteina 6	Hs.257352	EE2-16B
AJ227901	HUS1	HUS1 Checkpoint homolog S. pombe	Hs.152983	EE2-16C
AJ227902		Partial Mrna		EE2-16D
AJ227903	ZFP36	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog mouse	Hs.534052	EE2-16E1
AJ227904	FMN1	Formin 1	Hs.276009	EE2-16E2
AJ227905	CXCL12	Chemokine C-X-C motif ligand 12	Hs.522891	ED66-5A
AJ227906	GATAD2A	GATA zinc finger domain containing 2A	Hs.118964	ED66-6A
AJ227907	INALD	InaD-like (Drosophila)	Hs.478125	ED66-6B
AJ227908		NM_004772.1		ED70-2A
AJ227909	ZNF395	Zinc finger protein 395	Hs.435535	ED70-2B
AJ227910	HUS1	HUS1 Checkpoint homolog S. pombe	Hs.152983	ED70-2C
AJ227911	TNF alpha	tumor necrosis factor, TNF superfamily member 2	Hs.241570	YG39-2 YG53 EE2-16F2
AJ227912	DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	Hs.171695	YG39-3 YG81-1A ED166-8C
AJ227913	IL8	Interleukin 8	Hs.624	ED166-8B EE2-8C
AJ227914	IER3	Immediate early response 3	Hs.591785	YG40-2
AJ227915	SFXN4	Sideroflexin 4	Hs.523299	LG43-4A2 LG141-
AJ227916	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1.alpha subunit	Hs.509554	LG141-7A
AJ227917	ZFP36	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog mouse	Hs.534052	EE2-12C
AJ227918	CAPZA1	Capping protein (actin filament) muscle Z-line alpha 1	Hs.514934	EE2-16F1

A continuación comentamos las características de algunos de estos genes:

Proteínas Zinc finger

Además de la proteína ZNF304 que caracterizamos en un trabajo posterior identificamos otras proteínas dedos de zinc.

1. ZXDB (zinc finger X-linked duplicated B)
2. ZNF395. Aunque su expresión es ubicua recientemente se ha definido como marcador de artritis psoriática por estar diferentemente expresado en sangre de estos pacientes.[138]
3. GATA zinc finger domain containing 2A, también llamado p66alpha, es un potente represor que se une a las colas de las histonas.[139]
4. ZFP36 (Zinc finger protein 36) o TTP es una proteína dedos de zinc del tipo CCCH que se une a los motivos AU y que provoca la desestabilización del transcrito. Los ratones deficientes en TTP sufren un síndrome inflamatorio autoinmune, artritis y hiperplasia mieloide [140]. Se ha comprobado que su expresión se induce en fibroblastos con esteroides de forbol, insulina y suero [141]. TTP es un regulador de citocinas como TNF alpha y GM-CSF. A diferencia de su mRNA, muy lábil al poseer motivos AU, la proteína es muy estable una vez sintetizada [142]

Oncogenes

1. RAP1B es un miembro de la familia del oncogen RAS que se puede unir a GTP.
2. Met es un protooncogen también llamado receptor del factor de crecimiento de hepatocitos. Tiene actividad tirosín-kinasa y está relacionado con carcinoma.

Citoesqueleto

1. CKAP2 es una proteína asociada a microtúbulos con capacidad estabilizadora que se encuentra sobreexpresada en algunos cánceres gástricos.
2. COTL1 se une y regula la actina del citoesqueleto

Proteínas de stress

1. DUSP1 es un regulador negativo de HIF mediante la inhibición de la actividad kinasa de Erk

2. HIF es una proteína importante en la homeostasis del oxígeno en mamíferos e interviene en la adaptación al ambiente hipóxico de las células tumorales.
3. EGLN1 es una proteína que regula a HIF ya que provoca una modificación post-traducciona que permite su ubiquitinación.
4. HUS1 forma parte de un complejo de proteínas que actúan deteniendo el ciclo celular en presencia de DNA dañado.

Citocinas, genes relacionados

1. TNFAIP6 (Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6) es un gen de activación temprana en respuesta a estimulación con TNF, IL-1 y LPS en células mononucleares de sangre periférica que se ha relacionado con artritis reumatoide.
2. Receptor beta 2 de la Interleukin 12. Este gen codifica una proteína transmembrana que forma parte del complejo receptor de la interleucina IL12. La expresión del gen está up-regulada por interferon gamma en células Th1 y juega un papel en su diferenciación. El incremento de su expresión se ha visto asociado con enfermedades como el Crohn o como la lepra y se cree que contribuye a la respuesta inflamatoria.
3. NFAT5 pertenece a una familia de factores de transcripción cuya activación depende de calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio. Se identificó en células T como inductor de la expresión de citocinas.
4. TNFAIP6, su expresión está inducida por TNF alpha y Interleukina 1. Correlaciona con la síntesis de proteoglicanos y agregación. Activa un agente anti-inflamatorio llamado inter-alpha inhibitor.
5. IER3 es un gen de activación temprana. Su expresión se activa con TPA y con TNF alpha, con activadores de la vía de la Proteína Kinasa C[143]. Su expresión disminuye durante la diferenciación de los macrófagos y aumenta en monocitos estimulando con LPS[144]

DISCUSIÓN I

La estabilidad de los transcritos constituye un mecanismo de control post-transcripcional que regula la concentración y la función de muchos genes con alto interés biológico y farmacológico, como por ejemplo proto-oncogenes, factores de transcripción y citocinas.

La presencia de motivos AU en la cola 3' no traducida de los genes, frecuentemente, representa una marca de vida media corta del transcrito. El método AU-DD, diseñado por nosotros, contribuye al estudio y a la identificación de genes con motivos AU.

El método se ha demostrado eficaz para la clonación e identificación de genes con motivos AU desconocidos en las bases de datos (año 1998). El 86% de los clones aislados correspondieron a genes desconocidos, aunque el 37% eran secuencias coincidentes con ESTs ya introducidos en las bases de datos.

Los clones de genes ya conocidos (14%) que se pudieron aislar mediante el método confirman su validez para identificar genes con motivos AU con función de factores de transcripción y citocinas.

La optimización de la extracción de RNA es un punto crítico del método ya que los RNA a identificar tienen como característica la labilidad. Por otra parte, ya que nuestro método permite comparar la expresión diferencial de los genes con motivos AU bajo diferentes condiciones es importante la sistematización del proceso de extracción del RNA.

Otro aspecto muy importante del método fue el diseño de la RT-PCR para amplificar fragmentos con motivos AU. El diseño del cebador de retrotranscripción introduce un motivo AU artificial unido a una región arbitraria rica en C y Gs que actúa como ancla en el cebador de PCR. La secuencia de los motivos AU aporta una temperatura de fusión muy baja al conjunto del cebador por lo que el ancla fue imprescindible para poder aumentar la temperatura de annealing y estabilizar la unión con el molde. La ventaja que aporta la presencia de un motivo AU artificial en el cebador de retrotranscripción es poder utilizar un solo primer en la PCR, por lo que se evita la producción de artefactos generados por la extensión a partir de un solo cebador.

El diseño final del método incluye en los cebadores dos motivos AU en tándem. Esto no condicionó la amplificación de genes con un motivo AU único.

Se ensayaron dos protocolos diferentes de amplificación, con una ronda de PCR y con dos rondas que se mostraron complementarios ya que se obtuvieron resultados mediante ambos sistemas.

Varios genes fueron amplificados más de una vez, con diferentes sustratos y bajo diferentes protocolos, por lo que podemos deducir, como es lógico, que los transcritos más abundantes son detectados con mayor probabilidad.

El método AU-DD nos permite identificar genes con motivos AU diferentemente expresados en estado basal y en activación por comparación en la autoradiografía. Estudiamos la expresión diferencial aplicando diferentes estímulos de la fracción adherente de células mononucleares de sangre periférica y de una línea de células T CD4+ obtenida de linfocitos infiltrantes de un tiroides con Graves-Basedow. Posteriormente, pudimos confirmar mediante PCR que los genes seleccionados estaban diferentemente expresados en un 90% de los casos, para ello, utilizamos líneas celulares similares al sustrato original cuando la disponibilidad de éste era limitada.

Los transcritos que se reprimen en estado de activación representan un aspecto no explorado en este estudio.

En el contexto actual y gracias a la secuenciación completa del genoma humano podemos evaluar con precisión los resultados obtenidos de la aplicación del método AU-DD. Los fragmentos de genes con motivos AU que secuenciamos y que eran desconocidos al finalizar el proyecto son hoy día fácilmente identificables. Este análisis nos ha permitido comprobar que entre los genes con motivos AU desconocidos en 1998 que propusimos como diferentemente expresados se encuentran genes relacionados con citocinas, factores de transcripción, oncogenes, etc.

Actualmente la tecnología molecular ha evolucionado enormemente y contamos con técnicas como las de microarrays que nos permiten, de una manera más automatizada, el análisis diferencial de la expresión génica entre diferentes estadios de diferenciación o bajo diferentes estímulos. El estudio del cáncer ha utilizado esta técnica para acumular datos sobre los genes expresados relacionados con la patología.

Sin embargo, un método de expresión diferencial como el propuesto estaría todavía vigente y sería aplicable en determinadas situaciones. Con una tecnología básica es posible comparar muestras y elaborar perfiles de expresión con resultados óptimos de reproducibilidad y de especificidad.

Los resultados obtenidos con el método AU-DD son de gran interés ya que entre otros, identificamos factores de transcripción como las proteínas zinc finger ZNF304, genes relacionados con citocinas y genes de activación temprana.

SUBPROYECTO 2

Identification of a KRAB-containing zinc finger protein, ZNF304, by AU-motif-directed display method and initial characterization in lymphocyte activation.

Sabater L., Ashhab Y., Caro P., Kolkowski EC., Pujol R., Domínguez O.

Biochem Biophys Res Commun 2002, May 10; 293 (3): 1066-72

RESUMEN DE RESULTADOS II	69-72
---------------------------------	--------------

DISCUSIÓN II	73-75
---------------------	--------------

RESUMEN DE RESULTADOS II

Identificación y análisis de la secuencia del gen ZNF304

Identificamos el gen ZNF304 mediante el método AU-DD (AU-Motif directed display), que fue diseñado por nosotros. Nuestro método es útil para identificar genes con motivos AU y en el caso del gen ZNF304 fue aplicado en tejido tímico humano. La zona 3' no traducida del gen contenía motivos AU (ATTTATTTA) idénticos a los introducidos en el primer de retrotranscripción y en los primers de amplificación.

Tras secuenciar el gen entero y mediante búsquedas de homología con el programa BLASTn del NCBI (National Center Biotechnology Information) pudimos comprobar que correspondía a un gen previamente desconocido en las bases de datos. Las únicas homologías encontradas fueron con clones genómicos que contenían la secuencia de ZNF304 pero sólo como predicciones de exones del programa GRAIL (AC003002 y AC005261). La estructura del gen, según estos clones genómicos, se divide en tres exones. Estos clones genómicos estaban contenidos en la región cromosómica 19q13.43, lo que nos permitió mapar "in silico" el gen que estábamos caracterizando.

El clon secuenciado contenía una pauta de lectura abierta de 1977 pares de bases, lo que daría lugar a una hipotética proteína de 659 aminoácidos y 75 KDa. de peso molecular. El análisis de la traducción predicha daba como resultado una proteína con motivos conservados. En el extremo amino terminal, en el segundo exon, se encuentra una caja KRAB subdomino A y en el tercer exon, en el extremo carboxilo terminal hay 13 motivos zinc finger del tipo C2-H2 seguidos de una larga cola 3' no traducida.

La región promotora carecía de una caja TATA típica pero contenía varios sitios de unión para el factor de transcripción Sp-1, un rasgo frecuente en los promotores sin caja TATA. También se encontró secuencias de unión para otros factores de transcripción como: c-myb, Pit-1a, NF-1, y GATA-1

Patrón de expresión en tejido de ZNF304

Se hibridaron dos membranas de Northern Blot para comprobar la presencia de expresión de ZNF304 a nivel de mRNA. Detectamos una banda de 4.3 kb en todos

los tejidos testados: ganglio linfático, timo, PBLs, médula ósea, hígado fetal, corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas.

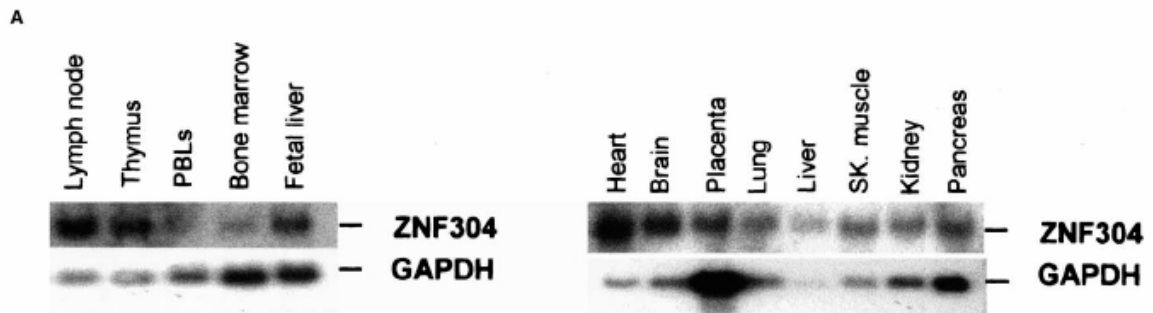


Figura 8: Expresión de ZNF304 en tejidos analizada mediante Northern Blot

Para precisar el nivel de expresión con un método cuantitativo usamos la PCR a tiempo real. Si dividimos en grupos los tejidos según la expresión detectada de ZNF304 podemos atribuir una expresión abundante a ganglio linfático, línea celular T Jurkat, y a amígdala; una expresión moderada a tiroides, timo, glándulas adrenales, próstata, páncreas y músculo esquelético y no encontramos expresión en esófago, hígado, pulmón y riñón.

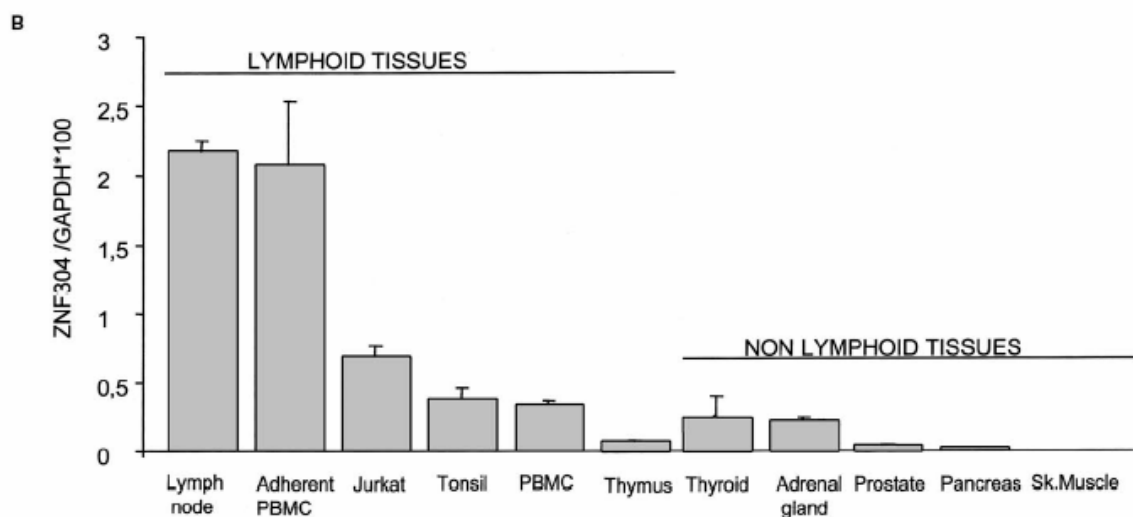


Figura 9: Representación gráfica de la expresión de ZNF304 en diferentes tejidos cuantificada mediante PCR a tiempo real

Expresión de ZNF304 en células linfoides

Procedimos a estudiar el comportamiento de la expresión de ZNF304 durante la activación con diferentes estímulos (LPS, PHA, PMA e ionomicina) en células mononucleares de sangre periférica diferenciando entre la fracción adherente (monocitos-macrófagos) y la no adherente (linfocitos).

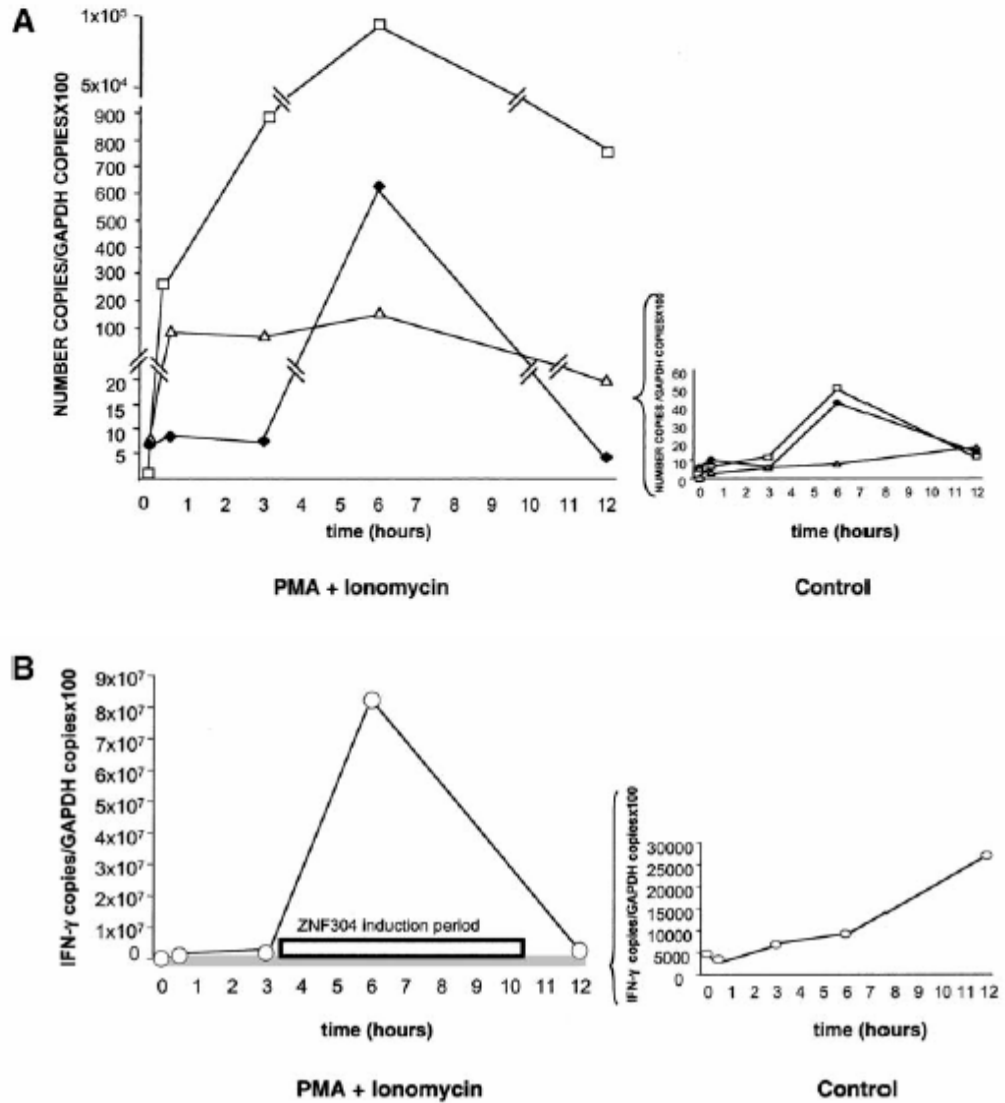
El basal de expresión de ZNF304 tanto en células adherentes como en no adherentes fue relativamente bajo. Tras activación con PMA e ionomicina o con PHA la expresión de ZNF304 siguió un patrón de inducción bifásica con un pico menor a los 30 minutos (x10-20 veces sobre el basal) y otro mayor a las 6 horas (x1000 sobre la línea basal). En líneas celulares (Jurkat, U937, THP-1) aplicando los mismos estímulos el patrón de expresión de inducción fue similar pero no conseguimos un aumento de la expresión comparable a los niveles conseguidos con PBMCs.

Comparamos el patrón de expresión de ZNF304 con el patrón de expresión de IL4, IFN-gamma e IL10 en linfocitos a diferentes tiempos y aplicando diferentes estímulos.

Utilizando PMA e ionomicina encontramos que la primera fase de inducción de ZNF304 coincide con la inducción inmediata a los 30 minutos de IL4 y de IL10 mientras que la segunda fase con un fuerte incremento y rápido descenso de la expresión serían más coincidentes con el patrón de IFN-gamma.

Los cultivos control sin estímulos mostraron una inducción espontánea pero a muy inferior nivel.

Figura 10: Representación gráfica de la expresión de ZNF304 cuantificada mediante PCR a tiempo real analizando su activación con PMA más ionomicina a diferentes tiempos. Comparativa con el comportamiento de las citocinas.



DISCUSIÓN II

ZNF304

Los motivos AU son elementos importantes de regulación a nivel post-transcripcional que influyen en la estabilidad del transcrito [98] y que están presentes en muchas citocinas y factores de transcripción [145]. Aplicamos el método AU-DD desarrollado para la identificación de genes con motivos AU para intentar clonar nuevos genes con este rasgo en el timo. Como resultado de estos experimentos clonamos el gen ZNF304 que tenía un motivo AU en tándem en la región 3' no traducida, idéntico al utilizado en el primer de retrotranscripción y en el de PCR. Obtuvimos diversos clones de este gen mediante RACE 5' (Rapid amplification of cDNA Ends) sobre una genoteca de cDNA de timo humano. La putativa traducción del gen desvelaba la existencia de motivos conservados a nivel proteico mediante el programa Prodom, una caja KRAB subdominio A en la región amino terminal y 13 zinc fingers en la región carboxilo Terminal. Según el programa GRAIL (Gene Recognition and Assembly Internet Link) el gen se estructuraría en tres exones, el primero muy corto, el segundo contendría la caja KRAB y el tercero los zinc fingers dejando una cola 3' no traducida muy larga.

Las secuencias obtenidas se compararon con las conocidas en las bases de datos de la época. La búsqueda de homologías en las bases de datos nos permitió mapar in silico el gen en el cromosoma 19q13.43 ya que nuestra secuencia era 100% homóloga a un segmento de los clones genómicos (AC005261, AC003002). Esta región cromosómica contiene un cluster muy importante de proteínas zinc finger que engloba aproximadamente al 51% de miembros de la familia.[84] Se ha propuesto que los genes agrupados en clusters seguirían una regulación común expresándose de una forma coordinada y que este fenómeno puede ser un mecanismo común de regulación en el genoma eucariota [146]. La duplicación génica ha podido generar mediante presión evolutiva la creación de estos clusters de proteínas con estructura similar. La proteína de ZNF304 es homóloga a otras proteínas vecinas en el cluster de la localización 19q13.4 como ZNF132 con un 53% de homología a nivel de aminoácidos. La delección de esta zona se ha asociado a tumores sólidos como adenoma de tiroides. [147]

La secuencia era desconocida como gen individual por lo que procedimos a introducirla en la base de datos GenBank que nos asignó el número de acceso AJ276316. Los estudios se iniciaron en el contexto histórico de la era pre-genómica cuando el genoma humano todavía no había sido secuenciado totalmente y por lo tanto era posible descubrir nuevos genes, no secuenciados previamente. El nombre

asignado a la proteína, ZNF304, por HUGO (Human Genome Organization) se ajusta a la familia de proteínas a la que pertenece.

Analizamos el patrón de expresión de ZNF304 mediante Northern Blot, y mediante PCR a tiempo real. La técnica de Northern Blot nos permitió confirmar el tamaño del transcrito, 4.3 Kb que correspondía con la secuenciación de los clones. Ambas técnicas nos indicaron que existe una expresión más abundante de ZNF304 en tejidos linfoides. La expresión mayor correspondió a ganglio linfático, células Jurkat, tonsila y células mononucleares de sangre periférica adherentes por lo que deducimos que el gen se expresaba más en contexto de proliferación celular. Ello nos llevó a comprobar el comportamiento del gen ZNF304 tras ser sometido a diferentes estímulos de activación. Realizamos diferentes experimentos preliminares con diferentes estímulos: PHA, PMA más ionomicina y LPS (lipopolisacárido). También usamos diferentes sustratos, incluyendo cultivos de células mononucleares adherentes al plástico, mononucleares no adherentes y líneas celulares como Jurkat, U937 y THP1 (monocítica). Realizamos un estudio de la expresión de ZNF304 a diferentes tiempos de activación y aunque la expresión basal en células adherentes era mayor que en PBMCs tras inducción el incremento fue mayor en la fracción no adherente por lo que procedimos a hacer todos los estudios con este sustrato. En células Jurkat, U937 y THP1 obtuvimos resultados similares. Tras estimulación la expresión de ZNF304 sufre un rápido incremento a los 30 minutos y luego un pico mayor a las 6 horas volviendo al estado basal en 12 horas, perfilando un patrón de activación bifásico. Este patrón de rápida respuesta a la estimulación y vuelta al basal concuerda con el rasgo de gen de acción temprana (immediate early gene) o de gen de expresión regulada que podría sugerir los motivos AU de su larga cola 3' no traducida.

Nuestro estudio aporta datos de que la expresión de ZNF304 sigue una cinética de inducción que está relacionada con la expresión de citocinas, al menos coincidiendo con los picos de expresión. Estimulamos PBLs con PMA más ionomicina como modelo de activación y como inductores de citocinas [148, 149] encontramos que IL-10 y IL-4 muestran una rápida inducción a los 30 minutos que se mantiene en aumento hasta el pico de las 6 horas. La inducción de IFN-gamma fue extremadamente alta con pico también a las 6 horas volviendo al basal a las 12 horas post-inducción. Es sabido que la inducción con PMA más ionomicina produce una gran síntesis de interferón gamma. La cinética de activación de las citocinas con máximos a las 6 horas post-estimulación con PMA más ionomicina descritas en nuestro estudio concuerda con la bibliografía sobre el tema[150]

En nuestro caso, la estructura del gen y los motivos conservados a nivel proteico que posee, nos ayudan a inferir la función de la proteína ZNF304. Las proteínas con motivos zinc finger son capaces de unirse al DNA y la función que ejercen es la de regular la transcripción, además se ha descrito la caja KRAB como

un dominio implicado en fuerte represión de la transcripción [151] mediante la modificación del estado de la cromatina. [90] Existen varios ejemplos de proteínas zinc finger con una expresión transitoria y fuertemente regulada que están relacionadas con la regulación normal de la activación y desarrollo del linfocito. NGFI-B, también llamada Nur77, es una proteína zinc finger con rápido recambio, posee motivos AU y que su expresión está inducida en PBLs tras estimulación con PMA más ionomicina como en el caso de ZNF304. [152]. Perteneciente a la familia de receptores esteroides nucleares huérfanos y varios estudios han relacionado a Nur77 con la delección clonal de los timocitos autoreactivos promoviendo la apoptosis [153, 154]. NGFI-B necesitaría la acción coordinada de otras dos moléculas: HDAC7 y MEF2D. La histona deacetilasa 7 modifica el estado de la cromatina empaquetando el DNA e inhibiendo la transcripción de los genes de la región. Por otro lado la interacción de HDAC7 con MEF2D (myocyte enhancer factor 2D) en el promotor de Nur77 provoca su represión y ello conlleva una disminución de la apoptosis.

ROG (represor of GATA) es otro ejemplo de proteína zinc finger de expresión inmediata y fuertemente regulada (immediate early gene) importante para los linfocitos. Es un represor de GATA-3, otra proteína zinc finger que actúa como factor de transcripción permitiendo la expresión de las citocinas Th2 [155], por lo que la sobreexpresión de ROG implica una represión de la expresión de citocinas del tipo Th2 [156]

En este estudio hemos podido validar el método AU-DD, previamente desarrollado en nuestro laboratorio, para la identificación de genes con motivos AU susceptibles de estar fuertemente regulados y de pertenecer a la clase de genes de expresión inmediata. La caracterización inicial del gen ZNF304 nos ha permitido conocer su secuencia, estructura gracias a los motivos conservados a nivel de proteína y su expresión preferente en tejidos linfoides. La expresión de ZNF304 en linfocitos estimulados con PMA e ionomicina sigue el patrón de gen con expresión inmediata y fuertemente regulado y además coincide con el patrón de expresión de las citocinas. La función que ejerce ZNF304 de represión transcripcional en este escenario necesitará de nuevos experimentos para ser precisada.

SUBPROYECTO III

Insulin alleles and autoimmune regulator (AIRE) gene expression both influence insulin expression in the thymus.

Lidia Sabater, Xavier Ferrer-Francesc, Mireia Sospedra, Pepi Caro,
Manel Juan, Ricardo Pujol Borrell

Journal of Autoimmunity 25 (2005) 312-318

RESUMEN DE RESULTADOS III	79-84
DISCUSIÓN III	85-88

RESUMEN DE RESULTADOS III

Tipaje de los alelos del locus IDDM2 mediante el RFLP Pst I del gen de la insulina en el timo humano

Existe un fuerte desequilibrio de unión entre el locus IDDM2 de la zona promotora y el RFLP Pst I de la zona 3' no traducida del gen de la insulina, esto nos permite asegurar el genotipo del VNTR de las muestras en función de si el alelo contiene la diana para Pst I o no; si se produce el corte con Pst I corresponde a un alelo VNTR de clase III y si no tiene la diana de corte para Pst I corresponde a un alelo VNTR de clase I.

Obtuvimos DNA genómico de 45 individuos a partir de tejido tímico y procedimos a tipar las muestras en función del RFLP Pst I.

El 33% de la población que estudiamos, o sea 15 individuos, resultaron ser heterocigotos clase III/clase I, el 62% homocigotos clase I (28 individuos) y sólo el 4% (2 individuos) resultaron ser homocigotos clase III. La frecuencia del alelo de clase I fue del 79% frente al 21% del alelo de clase III.

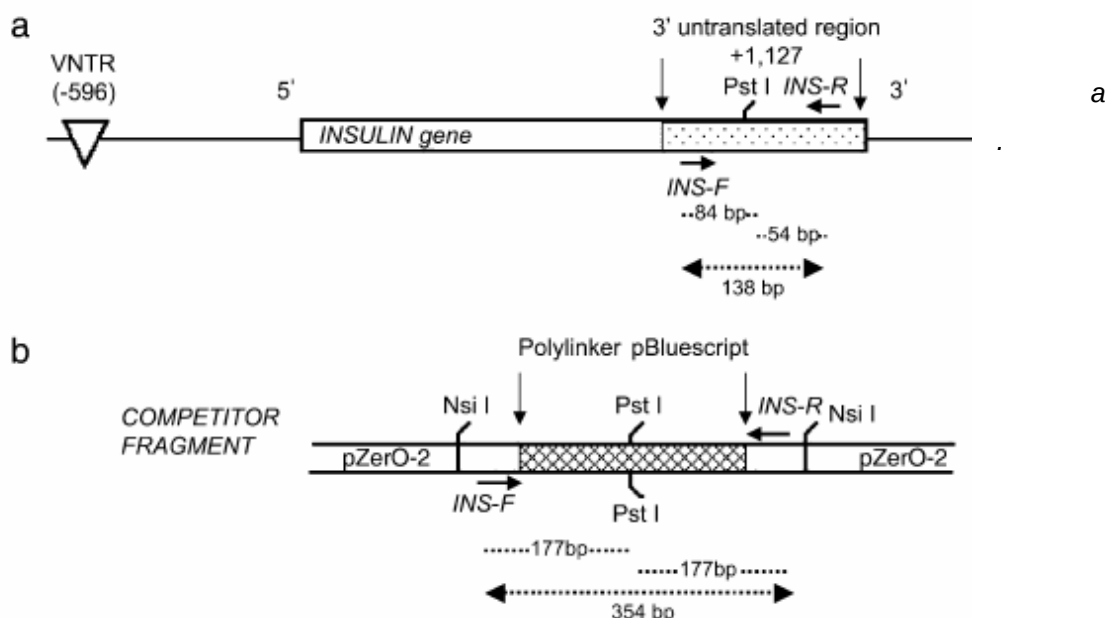


Figura 11: Esquema de la región promotora y del gen de la insulina, esquema del fragmento competidor diseñado.

- Esquema de los polimorfismos del gen de la insulina PstI en la región 3' UTR, VNTR en la región promotora y localización de los cebadores utilizados
- Esquema del fragmento competidor, al que se le introducen secuencias de insulina artificialmente y un fragmento del polylinker del plásmido pBluescript que contiene la diana para PstI que nos permite monitorizar la eficiencia de la reacción de restricción.

Expresión de insulina en el timo humano

Mediante RT-PCR convencional pudimos detectar mensaje de insulina en las 15 muestras heterocigotas de la población estudiada.

Determinamos la proporción de transcripción de los alelos de clase III frente a la de los alelos de clase I mediante PCR radioactiva y restricción del amplímero de insulina resultante con la enzima Pst I.

La proporción entre la transcripción de los alelos de clase III y los alelos de clase I fue siempre superior a 1 indicando que los alelos de clase III estuvieron siempre asociados a una mayor transcripción de insulina que los alelos de clase I. Esta proporción de transcripción de alelos de clase III frente a alelos de clase I fue variable entre glándulas y osciló entre 1,5 y 4,4.

La muestra de timo de un paciente con síndrome de Down de 6 años resultó dar una ratio opuesta al resto, ya que la transcripción de insulina del alelo de clase I

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN III

contribuía en mayor medida a la transcripción total de insulina que la producida por el alelo de clase III, que es el asociado con una mayor transcripción en la literatura. En el timo de un paciente de 34 años con miastenia gravis se encontró una proporción de transcripción entre alelos de clase III y clase I de 1,3; sensiblemente inferior a la de un timo normal.

1. QC-PCR (Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction)

Para precisar el número de copias de mRNA de insulina en nuestras muestras heterocigotas utilizamos una PCR radioactiva que incluía un competidor interno de número de copias conocidas que se coamplificaba con el amplímero de insulina. La restricción de estas muestras con Pst I pone de manifiesto la contribución relativa de los diferentes alelos al mensaje de insulina total de las muestras.

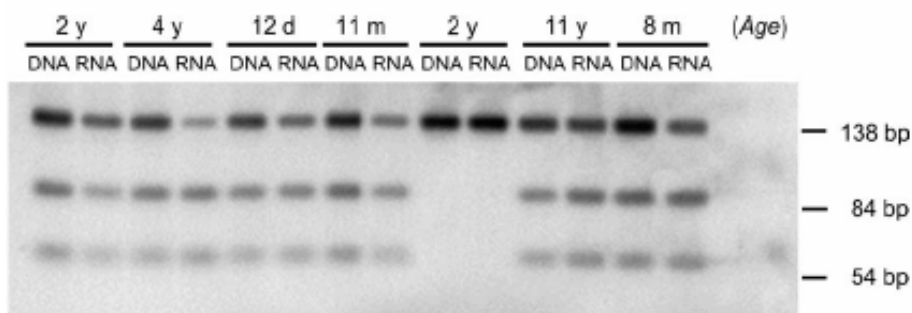
El número de copias de insulina de los alelos de clase III se mantuvo entre 51 y 154 copias y de los alelos de clase I entre 35 y 75 copias.

Esta serie de experimentos también confirmó que en el timo del paciente con síndrome de Down las proporciones de transcripción de los alelos no seguían la norma general y el alelo de clase I aportaba mayor transcripción.

Figura 12:

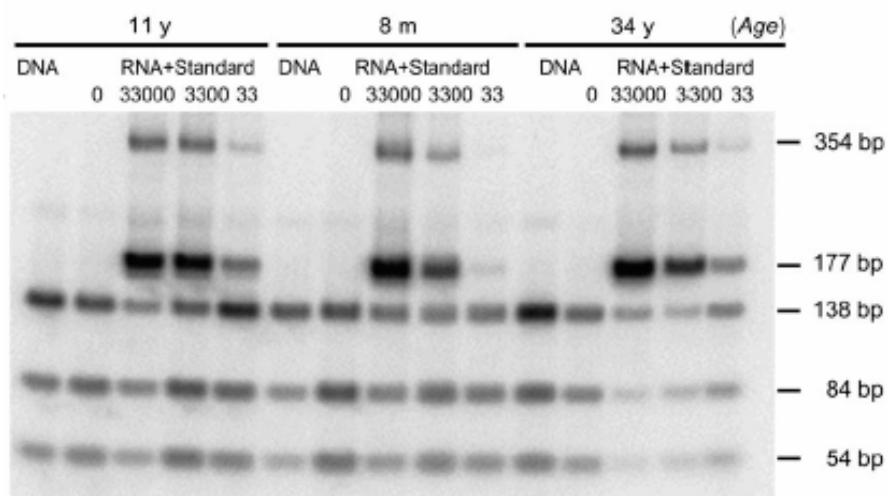
a) Expresión de insulina en timos humanos de diferentes edades.

Gel de acrilamida resultado de PCR radioactiva con primers de insulina y restricción con enzima Pst I. El control de DNA amplificado de cada muestra nos permite corregir los resultados de expresión de cada alelo



RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN III

b) Cuantificación mediante QC-PCR de la expresión de insulina.



El fragmento competidor que contiene la secuencia de los primers de insulina se co-amplifica con cada muestra de RNA añadiendo diferente número de copias. El fragmento competidor no cortado mide 354 bp y nos sirve como control de la eficiencia de restricción. El control de DNA de cada muestra también se amplificó en cada muestra para corregir los resultados.

Tabla resumen de resultados

	Diagnóstico	ClaseIII/ Clase I	Copias Insulina alelos clase III (QC- PCR)	Copias Insulina alelos clase I (QC-PCR)	Clase III/clase I copias QC- PCR	Total copias QC-PCR
12 d	normal	2.6	75	50	1.5	125
26 d	normal	1.9	141	75	1.8	216
8 m	normal	2.4	154	51	3.0	205
11 m	normal	1.8	79	37	2.1	116
11 m	normal	2.3	57	55	1.0	112
3 a	Normal	4.4	108	89	1.2	197
4 a	Normal	3.6	51	35	1.4	86
6 a	Down	0.7	26	186	0.1	212
11 a	Normal	2.8	89	49	1.8	138
34 a	MG	1.3	76	36	2.1	112

2. PCR a tiempo real

Utilizamos la PCR a tiempo real con el fin de corroborar los resultados anteriores y cuantificar la transcripción de insulina en el timo mediante otro método más preciso.

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN III

El factor de transcripción AIRE en el timo controla la expresión ectópica de algunos autoantígenos periféricos, entre ellos la insulina, por ello, comprobamos también los niveles de expresión de este gen en el timo.

Incluimos en el estudio 9 muestras heterocigotas, y una muestra homocigota de cada genotipo.

La expresión de insulina fue variable entre las diferentes glándulas incluso dentro del mismo genotipo. La expresión de AIRE fue siempre superior a la expresión de insulina (2.5 veces de promedio ± 1.6). Los niveles de expresión del gen AIRE correlacionaban estadísticamente en la misma glándula con los niveles de expresión de insulina ($r=0.4969$, $p=0.0154$) siguiendo un test de regresión lineal (GraphPad Prism Software).

La mayor expresión de insulina fue detectada en el timo del paciente con síndrome de Down y coincidió con una de las mayores expresiones del gen AIRE.

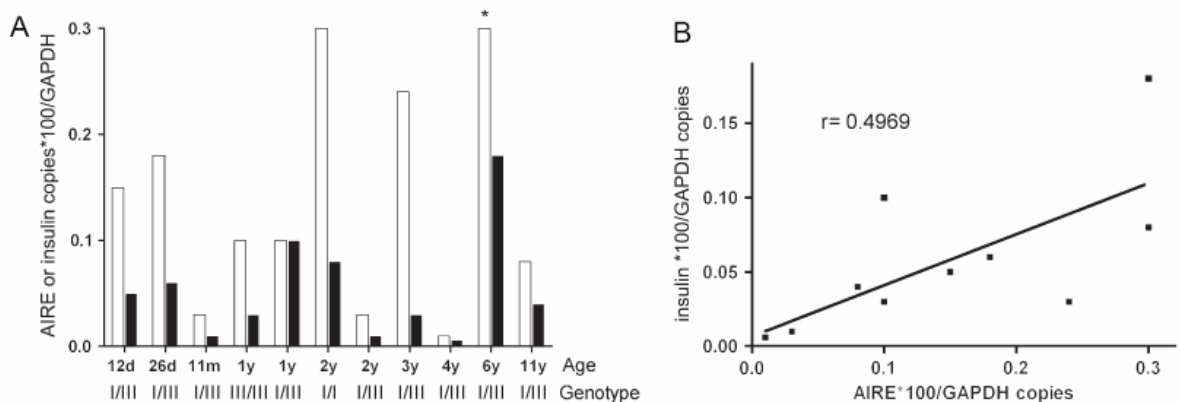


Figura 13:

A. Gráfica de la expresión de insulina en el timo determinada mediante PCR a tiempo real comparada con la expresión de AIRE. En el eje horizontal indicado el genotipo VNTR de las glándulas tímicas así como la edad del paciente en el momento de la cirugía. El asterisco significa que el paciente estaba afectado por un síndrome de Down. Las barras blancas representan a AIRE mientras que las negras representan la expresión de insulina.

B. Gráfica de correlación entre el número de copias de AIRE en el timo con respecto a las de insulina

Corrección de los valores para la expresión del gen constitutivo GAPDH

DISCUSIÓN III

INSULINA Y AIRE

La importancia del papel del timo en el establecimiento del equilibrio entre la respuesta inmune y el reconocimiento de lo propio suscita intensas investigaciones para esclarecer los mecanismos subyacentes de la tolerancia central.

Históricamente se consideraba que la tolerización de los antígenos propios de tejido, secuestrados (expresados específicamente en tejidos inmunoprivilegiados como cerebro, testículo) o expresados de una forma regulada/temporal debía obedecer a mecanismos periféricos [157] y que sólo los antígenos abundantes y que eran accesibles a la circulación sistémica podían ser tolerizados en el timo. El descubrimiento de que células especializadas en el timo son capaces de expresar autoantígenos [7, 158] de forma ectópica o promiscua constituyó un punto de partida para esclarecer los mecanismos moleculares de la tolerancia central.

La posible contribución del gen de la insulina a la predisposición genética de la diabetes tipo 1 fue descubierta en 1984 por Bell et al [159] y posteriormente se confirmó en estudios de análisis de ligamiento [160]. El locus IDDM2 contiene un minisatélite de repeticiones en tándem de número variable VNTR que afecta la transcripción del gen de la insulina en el timo [126, 127] y por tanto regula la disponibilidad del autoantígeno para ser tolerizado. La importancia de la expresión promiscua de autoantígenos junto con la modulación por parte de polimorfismos de la expresión interindividual nos llevó a recomprobar en este trabajo el nivel de expresión de insulina en el timo normal relacionándolo con los alelos VNTR.

En nuestro estudio comprobamos que éramos capaces de detectar mensajero de insulina mediante RT-PCR en todas nuestras muestras, corroborando estudios anteriores [126]. Debido al desequilibrio de unión que existe entre los alelos VNTR y el polimorfismo PstI de la zona 3' no traducida del gen de la insulina se establece una forma indirecta de tipificación las clases de estos minisatélites atendiendo a la restricción con la enzima Pst I. Tras tipificar 45 individuos por este procedimiento indirecto comprobamos que las frecuencias alélicas en nuestra población concordaban con las publicadas anteriormente [124, 161] y que el genotipo más abundante es el homocigoto clase I/I, el que predispone a la enfermedad.

Cuantificamos la aportación de cada alelo VNTR (clase III vs clase I) a la expresión total de insulina en los timos heterocigotos clase III/clase I de nuestra población. Se realizó mediante dos técnicas diferentes (QC-PCR y PCR cuantitativa a tiempo real), y confirmamos que la expresión de insulina en el caso de un

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN III

cromosoma con alelo clase III es superior al que produce un alelo clase I. En el estudio incluimos el timo de un individuo con síndrome de Down donde es el alelo de clase III el que aporta menor transcripción de insulina. En el síndrome de Down la arquitectura del timo está alterada y el microambiente cortical y medular está comprometido a nivel histológico y funcional [162], por lo que no es extraño encontrar anomalías en la expresión de autoantígenos en el timo. Se requeriría un estudio sistemático con un número importante de timos de pacientes con síndrome de Down para llevar a cabo una relación entre la elevada incidencia de autoinmunidad en este síndrome con el nivel de expresión de antígenos en el timo.

En nuestro estudio encontramos variaciones interindividuales en la expresión de insulina en el timo. Este hecho ya había sido anteriormente documentado para el gen de insulina y muchos otros genes relacionados con autoinmunidad. [7, 163]. Dentro del mismo genotipo heterocigoto clase III/clase I de alelos VNTR existen variaciones en el nivel de expresión de insulina. Aunque sólo hemos incluido un ejemplo de cada genotipo homocigoto, podemos ver que la muestra homocigota clase III no es donde encontramos mayor expresión de insulina y en el caso del homocigoto clase I tampoco es donde detectamos menor cantidad de insulina. Esto nos lleva a pensar que existen otros factores además de los alelos VNTR los que afectan a la tasa de transcripción de insulina en el timo.

Los mecanismos por los que el minisatélite del locus IDDM2 afecta la expresión del gen de la insulina están todavía por definir. Se trata de un polimorfismo en la región promotora del gen pero no dentro de la región codificante por lo que la proteína no sufre variaciones en cuanto a composición pero sí en abundancia. Se han descrito factores de transcripción capaces de reconocer las repeticiones en tándem del VNTR. Pur-1 también llamada MAZ (myc-associated protein) y ZF87 es una proteína zinc finger que es capaz de unirse al promotor de los genes de rata insulina I, insulina II y al minisatélite VNTR del gen de la insulina. [164, 165]. La secuencia de las repeticiones en tandem del minisatélite tiene un alto contenido en Guaninas, lo que posibilita la formación de unas estructuras cuaternarias del DNA, o sea, cuatro cadenas de DNA interaccionando. Se ha postulado que las pequeñas modificaciones a nivel de secuencia del minisatélite podrían afectar a la eficiencia de unión del factor de transcripción Pur-1 y que éste modularía la transcripción de insulina mediante el reconocimiento de las estructuras cuaternarias de la región. [166]

Otra proteína zinc finger importante en el timo es el regulador transcripcional AIRE (Autoimmune regulator). El gen AIRE es fundamental en el establecimiento de tolerancia hacia diversos autoantígenos en el timo sobretodo los específicos de tejido [167] ya que se ha visto que su transcripción controla la expresión de un grupo de genes expresados promiscuamente en las células epiteliales tímicas.

Mutaciones en el gen AIRE conducen al síndrome APS1 (autoinmune poliglandular tipo 1) también llamado APECED (Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy). El 18% de los afectados por este síndrome incluyen diabetes tipo 1 en su manifestación. [168]

En nuestro estudio nos propusimos encontrar una relación entre la transcripción del gen AIRE y la expresión de insulina en el timo humano normal. Los valores de transcripción del gen AIRE fueron siempre superiores que los valores de insulina correspondientes para cada individuo. Curiosamente, los niveles de insulina y AIRE guardan una correlación estadísticamente significativa ($r=0.49$ $p=0.0154$) en cuanto a número de copias de mensajero, esto es, a más expresión de AIRE mayor expresión de Insulina en una manera dosis dependiente. Una crítica posible estaría derivada de la utilización de RNA procedente de tejido total para la cuantificación de la expresión en el timo dada la heterogeneidad de su composición y a que la expresión promiscua de antígenos en el timo está a cargo de una subpoblación especializada [169]. La expresión del gen AIRE en el timo está prácticamente restringida a las células epiteliales medulares y (en menor medida) a las dendríticas [30]. La correlación de expresión de insulina y AIRE se ha visto en todas las glándulas estudiadas. Los experimentos han sido reproducibles por diferentes métodos de cuantificación (QC-PCR y PCR tiempo real) y con diferentes extracciones de RNA para cada muestra. La integridad del RNA y la normalización de las muestras fueron cuidadosamente monitorizadas. Se usaron diferentes bloques de cada timo y el estudio está hecho con glándulas de diferentes edades que en teoría tienen diferente proporción de corteza y médula. Aún así la correlación sigue manteniéndose. Todos estos hechos respaldan nuestros resultados. Un estudio que apoya nuestros hallazgos es el realizado con el modelo murino de diabetes RIP-mHELx3A TCR donde se demuestra un efecto dosis dependiente de la expresión de AIRE sobre el transgen HEL (hen egg lysozyme) y también el mismo efecto cuantificando insulina y AIRE en el estroma tímico [50]. Así pues el mecanismo de AIRE se basa en su participación en la selección negativa de los precursores autoreactivos de los genes que se sabe que controla la expresión. Sin embargo, no todos los genes están bajo el control del gen AIRE. Las células epiteliales medulares de un ratón K.O. para AIRE siguen expresando Proteína C reactiva y la decarboxilasa del ácido glutámico 67 [167].

Desconocemos el mecanismo concreto de acción que ejerce para modular la transcripción de otros genes. Es improbable una unión directa de AIRE a los promotores de cada gen a regular mediante reconocimiento de una secuencia común, aunque se sabe que AIRE es capaz de unirse al DNA [170]. Se ha descrito que AIRE interactúa con el cofactor transcripcional CBP (CREB Binding Protein) [45].

CBP es el coactivador de numerosos factores de transcripción como NFkappaB, Jun, Fos etc. y posee actividad HAT, histona acetiltransferasa. Recientemente se ha demostrado que los genes que son expresados ectópicamente en las células epiteliales medulares del timo se distribuyen agrupados en los cromosomas (forman clusters) [20]. De una forma aún más precisa se ha llegado a concretar que los genes que están influenciados por AIRE se encuentran asociados en estos clusters cromosómicos [51]. Todo ello nos lleva a la hipótesis de que AIRE es reclutado a zonas concretas y que allí ejerce su función mediante la modificación de la cromatina asociado con diferentes proteínas en un complejo.

Nuestro estudio apunta hacia una relación dosis dependiente de AIRE con respecto a la expresión de insulina pero quedaría por resolver entre otros muchos interrogantes si esta relación es extensible a otros autoantígenos o moléculas controladas por AIRE. Aunque se está avanzando mucho en el descubrimiento de los mecanismos moleculares que rigen el destino de la tolerización de los componentes propios del organismo, todavía queda por esclarecer el escenario concreto de acción del gen AIRE.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

SUBPROYECTO I

- 1.1 Hemos diseñado un procedimiento, que hemos denominado AU-DD (AU-Differential Display), y que permite identificar genes con motivos AU. Mediante este método hemos identificado genes desconocidos previamente en las bases de datos.

La validez del método para identificar y aislar genes con motivos AU con valor biológico ha quedado demostrada mediante la clonación de genes como interleucina 2 y TNF alpha.

Más del 90% de los genes seleccionados mediante el método resultaron estar diferentemente expresados en estado de activación.

- 1.2 Actualmente, hemos podido comprobar la identidad de los fragmentos obtenidos de genes desconocidos analizándolos en las bases de datos. Varios genes coinciden con el patrón buscado de genes con valor biológico, genes relacionados con citocinas, factores de transcripción, oncogenes, etc.

SUBPROYECTO II

- 2.1 Hemos secuenciado el gen ZNF304, un gen con rasgos de factor de transcripción previamente desconocido en las bases de datos que fue identificado mediante el método AU-DD.

ZNF304 pertenece a la familia de proteínas dedos de zinc con caja KRAB subdominio A. El gen ZNF304 está ubicado en el importante cluster de genes de proteínas zinc finger del cromosoma 19

- 2.2 El gen ZNF304 se expresa sobretodo en tejidos linfoides, aunque su expresión es ubicua.
- 2.3 La cinética de expresión de ZNF304 observada en células mononucleares de sangre periférica aplicando estímulos de activación sigue un perfil bifásico con una rápida inducción a los 30 minutos y un pico de máxima expresión a las 6 horas. El pico de máxima expresión

a las 6 horas coincide con el pico de expresión de las citocinas estudiadas.

SUBPROYECTO III

Se ha comprobado que los polimorfismos del promotor del gen de la insulina podrían influir en el nivel de tolerancia central a través de su influencia en el nivel de expresión en el timo

- 3.1 Las frecuencias alélicas del polimorfismo VNTR del gen de la insulina en nuestra población concuerdan con las publicadas anteriormente. El genotipo más abundante es el homocigoto clase I/I, el que predispone a la enfermedad.
- 3.2 Detectamos expresión de insulina en todas las muestras tímicas estudiadas, aunque existen variaciones interindividuales.

La expresión de insulina de un cromosoma con alelo clase III es superior al que produce un alelo clase I. Incluso pequeñas variaciones en el nivel de expresión de los autoantígenos en el timo influyen en la eficacia de la delección de precursores autoreactivos, por lo que la descripción de un mecanismo de control como el de los alelos VNTR es importante para el entendimiento de la susceptibilidad provocada por el segundo locus más importante a efectos de predisposición genética.

- 3.3 Los niveles de insulina y AIRE están relacionados en cuanto a número de copias de mensajero. Hemos demostrado que los niveles de expresión del gen AIRE influyen de forma directa y cuantitativa en los niveles de expresión del gen de la insulina en el timo. La influencia cuantitativa del gen AIRE sobre la expresión de autoantígenos en el timo puede ser un fenómeno general del cual la tolerancia central podría servirse.

Las variaciones interindividuales en la expresión de insulina no se explican únicamente por la influencia de los alelos VNTR de la región promotora del gen de la insulina. El control de la expresión de autoantígenos en el timo que ejerce el gen AIRE podría modificarse mediante la influencia de los alelos del locus de susceptibilidad IDDM2.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Watanabe, N., et al., *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1181-5.
2. Garcia-Peydro, M., V.G. de Yébenes, and M.L. Toribio, *Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates*. J Immunol, 2006. **177**(6): p. 3711-20.
3. Borgulya, P., et al., *Exclusion and inclusion of alpha and beta T cell receptor alleles*. Cell, 1992. **69**(3): p. 529-37.
4. Kyewski, B., et al., *Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye*. Trends Immunol, 2002. **23**(7): p. 364-71.
5. Klein, L., et al., *Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells*. Nat Med, 2000. **6**(1): p. 56-61.
6. Jolicoeur, C., D. Hanahan, and K.M. Smith, *T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6707-11.
7. Sospedra, M., et al., *Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 5918-29.
8. Hammerling, G.J., et al., *Peripheral tolerance as a multi-step mechanism*. Immunol Rev, 1993. **133**: p. 93-104.
9. Stockinger, B., *T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms*. Adv Immunol, 1999. **71**: p. 229-65.
10. Miller, J.F., *Self-nonsel self discrimination and tolerance in T and B lymphocytes*. Immunol Res, 1993. **12**(2): p. 115-30.
11. Antonia, S.J., et al., *Mechanisms of immune tolerance induction through the thymic expression of a peripheral tissue-specific protein*. Int Immunol, 1995. **7**(5): p. 715-25.
12. von Herrath, M.G., J. Dockter, and M.B. Oldstone, *How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model*. Immunity, 1994. **1**(3): p. 231-42.
13. Smith, K.M., et al., *Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance*. Int Immunol, 1997. **9**(9): p. 1355-65.
14. Pugliese, A., et al., *Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 555-64.
15. Pugliese, A., *Central and peripheral autoantigen presentation in immune tolerance*. Immunology, 2004. **111**(2): p. 138-46.
16. Throsby, M., et al., *Pancreatic hormone expression in the murine thymus: localization in dendritic cells and macrophages*. Endocrinology, 1998. **139**(5): p. 2399-406.
17. Derbinski, J., et al., *Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1032-9.
18. Langbein, L., et al., *Tight junction-related structures in the absence of a lumen: occludin, claudins and tight junction plaque proteins in densely packed cell formations of stratified epithelia and squamous cell carcinomas*. Eur J Cell Biol, 2003. **82**(8): p. 385-400.

19. Chentoufi, A.A., M. Palumbo, and C. Polychronakos, *Proinsulin expression by Hassall's corpuscles in the mouse thymus*. Diabetes, 2004. **53**(2): p. 354-9.
20. Gotter, J., et al., *Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters*. J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 155-66.
21. Derbinski, J., et al., *Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels*. J Exp Med, 2005. **202**(1): p. 33-45.
22. Dechairo, B.M., et al., *Association of the TSHR gene with Graves' disease: the first disease specific locus*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(11): p. 1223-30.
23. Anderson, A.C., et al., *High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire*. J Exp Med, 2000. **191**(5): p. 761-70.
24. Diez, J., et al., *Differential splicing of the IA-2 mRNA in pancreas and lymphoid organs as a permissive genetic mechanism for autoimmunity against the IA-2 type 1 diabetes autoantigen*. Diabetes, 2001. **50**(4): p. 895-900.
25. Park, Y.S., et al., *Humoral autoreactivity to an alternatively spliced variant of ICA512/IA-2 in Type I diabetes*. Diabetologia, 2000. **43**(10): p. 1293-301.
26. Dogra, R.S., et al., *Alternative splicing of G6PC2, the gene coding for the islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein (IGRP), results in differential expression in human thymus and spleen compared with pancreas*. Diabetologia, 2006. **49**(5): p. 953-7.
27. Lieberman, S.M., et al., *Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8384-8.
28. Mukherjee, R., et al., *Identification of CD4+ T cell-specific epitopes of islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein: a novel beta cell autoantigen in type 1 diabetes*. J Immunol, 2005. **174**(9): p. 5306-15.
29. Hutton, J.C. and G.S. Eisenbarth, *A pancreatic beta-cell-specific homolog of glucose-6-phosphatase emerges as a major target of cell-mediated autoimmunity in diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(15): p. 8626-8.
30. Heino, M., et al., *Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(3): p. 821-5.
31. Kogawa, K., et al., *Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage*. Immunol Lett, 2002. **80**(3): p. 195-8.
32. Aaltonen, J. and P. Bjorses, *Cloning of the APECED gene provides new insight into human autoimmunity*. Ann Med, 1999. **31**(2): p. 111-6.
33. Nagamine, K., et al., *Positional cloning of the APECED gene*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 393-8.
34. Aasland, R., T.J. Gibson, and A.F. Stewart, *The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(2): p. 56-9.
35. Liu, Y.C., *Ubiquitin ligases and the immune response*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 81-127.
36. Uchida, D., et al., *AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase*. J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 167-72.
37. Bottomley, M.J., et al., *The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(7): p. 626-33.
38. Mittaz, L., et al., *Isolation and characterization of the mouse Aire gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **255**(2): p. 483-90.

39. Sternsdorf, T., et al., *The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers*. J Biol Chem, 1999. **274**(18): p. 12555-66.
40. Borden, K.L., *Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(15): p. 5259-69.
41. Goldman, P.S., V.K. Tran, and R.H. Goodman, *The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation*. Recent Prog Horm Res, 1997. **52**: p. 103-19; discussion 119-20.
42. Ogryzko, V.V., et al., *The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases*. Cell, 1996. **87**(5): p. 953-9.
43. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase*. Nature, 1996. **384**(6610): p. 641-3.
44. Arany, Z., et al., *An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 12969-73.
45. Pitkanen, J., et al., *The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16802-9.
46. Futterer, A., et al., *The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 59-70.
47. Boehm, T., et al., *Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 757-69.
48. Chin, R.K., et al., *Lymphotoxin pathway directs thymic Aire expression*. Nat Immunol, 2003. **4**(11): p. 1121-7.
49. Liston, A., et al., *Aire regulates negative selection of organ-specific T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 350-4.
50. Liston, A., et al., *Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity*. J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 1015-26.
51. Tao, Y., et al., *AIRE recruits multiple transcriptional components to specific genomic regions through tethering to nuclear matrix*. Mol Immunol, 2006. **43**(4): p. 335-45.
52. Martin, R., et al., *Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals*. J Immunol, 1990. **145**(2): p. 540-8.
53. Semana, G., et al., *T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects*. J Autoimmun, 1999. **12**(4): p. 259-67.
54. Lohmann, T., R.D. Leslie, and M. Londei, *T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes*. J Autoimmun, 1996. **9**(3): p. 385-9.
55. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
56. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 303-10.
57. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
58. Khattry, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.

59. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
60. Itoh, M., et al., *Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5317-26.
61. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
62. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach, *Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance*. Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 81-8.
63. Thompson, C. and F. Powrie, *Regulatory T cells*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 408-14.
64. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
65. Chatila, T.A., et al., *JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. R75-81.
66. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.
67. Delgado, M., D. Pozo, and D. Ganea, *The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation*. Pharmacol Rev, 2004. **56**(2): p. 249-90.
68. Voice, J.K., et al., *Immunoefector and immunoregulatory activities of vasoactive intestinal peptide*. Regul Pept, 2002. **109**(1-3): p. 199-208.
69. Ganea, D. and M. Delgado, *The neuropeptides VIP/PACAP and T cells: inhibitors or activators?* Curr Pharm Des, 2003. **9**(12): p. 997-1004.
70. Said, S.I. and V. Mutt, *Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine*. Science, 1970. **169**(951): p. 1217-8.
71. Tuncel, N., et al., *Vasoactive intestinal peptide inhibits degranulation and changes granular content of mast cells: a potential therapeutic strategy in controlling septic shock*. Peptides, 2000. **21**(1): p. 81-9.
72. Herrera, J.L., et al., *Protective role for plasmid DNA-mediated VIP gene transfer in non-obese diabetic mice*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1070**: p. 337-41.
73. Rosignoli, F., et al., *VIP and tolerance induction in autoimmunity*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1070**: p. 525-30.
74. Gonzalez-Rey, E., et al., *Therapeutic effect of vasoactive intestinal peptide on experimental autoimmune encephalomyelitis: down-regulation of inflammatory and autoimmune responses*. Am J Pathol, 2006. **168**(4): p. 1179-88.
75. Delgado, M., E. Gonzalez-Rey, and D. Ganea, *The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7311-24.
76. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
77. Venter, J.C., et al., *The sequence of the human genome*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
78. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. **431**(7011): p. 931-45.

79. Mackay, J.P. and M. Crossley, *Zinc fingers are sticking together*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(1): p. 1-4.
80. Miller, J., A.D. McLachlan, and A. Klug, *Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes*. Embo J, 1985. **4**(6): p. 1609-14.
81. Lu, D., M.A. Searles, and A. Klug, *Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition*. Nature, 2003. **426**(6962): p. 96-100.
82. Bellefroid, E.J., et al., *The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3608-12.
83. Witzgall, R., et al., *The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4514-8.
84. Rousseau-Merck, M.F., et al., *The KOX zinc finger genes: genome wide mapping of 368 ZNF PAC clones with zinc finger gene clusters predominantly in 23 chromosomal loci are confirmed by human sequences annotated in Ensembl*. Cytogenet Genome Res, 2002. **98**(2-3): p. 147-53.
85. Dehal, P., et al., *Human chromosome 19 and related regions in mouse: conservative and lineage-specific evolution*. Science, 2001. **293**(5527): p. 104-11.
86. Friedman, J.R., et al., *KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain*. Genes Dev, 1996. **10**(16): p. 2067-78.
87. Kim, S.S., et al., *A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15299-304.
88. Moosmann, P., et al., *Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 beta that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(24): p. 4859-67.
89. Nielsen, A.L., et al., *Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family*. Embo J, 1999. **18**(22): p. 6385-95.
90. Ryan, R.F., et al., *KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4366-78.
91. Schultz, D.C., et al., *SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins*. Genes Dev, 2002. **16**(8): p. 919-32.
92. Moosmann, P., et al., *Silencing of RNA polymerases II and III-dependent transcription by the KRAB protein domain of KOX1, a Kruppel-type zinc finger factor*. Biol Chem, 1997. **378**(7): p. 669-77.
93. Senatore, B., et al., *A variety of RNA polymerases II and III-dependent promoter classes is repressed by factors containing the Kruppel-associated/finger preceding box of zinc finger proteins*. Gene, 1999. **234**(2): p. 381-94.
94. Huang, Z., et al., *Expression of the transcriptional repressor protein Kid-1 leads to the disintegration of the nucleolus*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7640-8.
95. Aubry, M., et al., *Isolation of a zinc finger gene consistently deleted in DiGeorge syndrome*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(10): p. 1583-7.
96. Bellefroid, E.J., et al., *Clustered organization of homologous KRAB zinc-finger genes with enhanced expression in human T lymphoid cells*. Embo J, 1993. **12**(4): p. 1363-74.

97. Pesole, G., et al., *Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions*. Gene, 2001. **276**(1-2): p. 73-81.
98. Shaw, G. and R. Kamen, *A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation*. Cell, 1986. **46**(5): p. 659-67.
99. Bakheet, T., et al., *ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(1): p. 246-54.
100. Chen, C.Y., et al., *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs*. Cell, 2001. **107**(4): p. 451-64.
101. Mukherjee, D., et al., *The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements*. Embo J, 2002. **21**(1-2): p. 165-74.
102. Ross, J., *mRNA stability in mammalian cells*. Microbiol Rev, 1995. **59**(3): p. 423-50.
103. Lal, A., et al., *Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs*. Embo J, 2004. **23**(15): p. 3092-102.
104. Lapucci, A., et al., *AUF1 Is a bcl-2 A + U-rich element-binding protein involved in bcl-2 mRNA destabilization during apoptosis*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 16139-46.
105. Larota, G., et al., *Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway*. Science, 1999. **284**(5413): p. 499-502.
106. Ma, W.J., et al., *Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein*. J Biol Chem, 1996. **271**(14): p. 8144-51.
107. Antic, D. and J.D. Keene, *Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression*. Am J Hum Genet, 1997. **61**(2): p. 273-8.
108. Brennan, C.M. and J.A. Steitz, *HuR and mRNA stability*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(2): p. 266-77.
109. Carballo, E., et al., *Decreased sensitivity of tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of tristetraprolin in the p38 signaling pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42580-7.
110. Carballo, E., W.S. Lai, and P.J. Blakeshear, *Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin*. Science, 1998. **281**(5379): p. 1001-5.
111. Sauer, I., et al., *Interferons limit inflammatory responses by induction of tristetraprolin*. Blood, 2006.
112. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
113. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
114. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
115. Lim, L.P., et al., *Vertebrate microRNA genes*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1540.
116. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-98.
117. Doench, J.G. and P.A. Sharp, *Specificity of microRNA target selection in translational repression*. Genes Dev, 2004. **18**(5): p. 504-11.
118. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
119. Jing, Q., et al., *Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability*. Cell, 2005. **120**(5): p. 623-34.

120. Michel, S.L., A.L. Guerrierio, and J.M. Berg, *Selective RNA binding by a single CCH zinc-binding domain from Nup475 (Tristetraprolin)*. *Biochemistry*, 2003. **42**(16): p. 4626-30.
121. Bennett, S.T., et al., *Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus*. *Nat Genet*, 1995. **9**(3): p. 284-92.
122. Rotwein, P., et al., *Genetic analysis of the hypervariable region flanking the human insulin gene*. *Am J Hum Genet*, 1986. **39**(3): p. 291-9.
123. Bell, G.I., M.J. Selby, and W.J. Rutter, *The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences*. *Nature*, 1982. **295**(5844): p. 31-5.
124. Bennett, S.T., et al., *IDDM2-VNTR-encoded susceptibility to type 1 diabetes: dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus*. *J Autoimmun*, 1996. **9**(3): p. 415-21.
125. Pugliese, A., et al., *The paternally inherited insulin gene B allele (1,428 FokI site) confers protection from insulin-dependent diabetes in families*. *J Autoimmun*, 1994. **7**(5): p. 687-94.
126. Pugliese, A., et al., *The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes*. *Nat Genet*, 1997. **15**(3): p. 293-7.
127. Vafiadis, P., et al., *Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus*. *Nat Genet*, 1997. **15**(3): p. 289-92.
128. Chentoufi, A.A. and C. Polychronakos, *Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes*. *Diabetes*, 2002. **51**(5): p. 1383-90.
129. Marron, M.P., et al., *Genetic and physical mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM12) to a 100-kb phagemid artificial chromosome clone containing D2S72-CTLA4-D2S105 on chromosome 2q33*. *Diabetes*, 2000. **49**(3): p. 492-9.
130. Ueda, H., et al., *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. *Nature*, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
131. Anjos, S.M., M.C. Tessier, and C. Polychronakos, *Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(12): p. 6257-65.
132. Anjos, S.M., et al., *Allelic effects on gene regulation at the autoimmunity-predisposing CTLA4 locus: a re-evaluation of the 3' +6230G>A polymorphism*. *Genes Immun*, 2005. **6**(4): p. 305-11.
133. *Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls*. *Nature*, 2007. **447**(7145): p. 661-78.
134. Serreze, D.V., et al., *Acceleration of type 1 diabetes by a coxsackievirus infection requires a preexisting critical mass of autoreactive T-cells in pancreatic islets*. *Diabetes*, 2000. **49**(5): p. 708-11.
135. Smyth, D.J., et al., *A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region*. *Nat Genet*, 2006. **38**(6): p. 617-9.
136. Liang, P. and A.B. Pardee, *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction*. *Science*, 1992. **257**(5072): p. 967-71.
137. Welsh, J., et al., *Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA*. *Nucleic Acids Res*, 1992. **20**(19): p. 4965-70.
138. Stoeckman, A.K., et al., *A distinct inflammatory gene expression profile in patients with psoriatic arthritis*. *Genes Immun*, 2006. **7**(7): p. 583-91.

139. Brackertz, M., et al., *p66alpha and p66beta of the Mi-2/NuRD complex mediate MBD2 and histone interaction*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(2): p. 397-406.
140. Taylor, G.A., et al., *A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency*. Immunity, 1996. **4**(5): p. 445-54.
141. Lai, W.S., D.J. Stumpo, and P.J. Blakeshear, *Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein*. J Biol Chem, 1990. **265**(27): p. 16556-63.
142. Cao, H., J.S. Tuttle, and P.J. Blakeshear, *Immunological characterization of tristetraprolin as a low abundance, inducible, stable cytosolic protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 21489-99.
143. Kondratyev, A.D., K.N. Chung, and M.O. Jung, *Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene*. Cancer Res, 1996. **56**(7): p. 1498-502.
144. Pietzsch, A., et al., *Identification and characterization of a novel monocyte/macrophage differentiation-dependent gene that is responsive to lipopolysaccharide, ceramide, and lysophosphatidylcholine*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **235**(1): p. 4-9.
145. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 465-70.
146. Caron, H., et al., *The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1289-92.
147. Tommerup, N. and H. Vissing, *Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders*. Genomics, 1995. **27**(2): p. 259-64.
148. Prussin, C., *Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level*. J Clin Immunol, 1997. **17**(3): p. 195-204.
149. Rostaing, L., et al., *Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells*. Cytometry, 1999. **35**(4): p. 318-28.
150. Baran, J., et al., *Three-color flow cytometry detection of intracellular cytokines in peripheral blood mononuclear cells: comparative analysis of phorbol myristate acetate-ionomycin and phytohemagglutinin stimulation*. Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**(2): p. 303-13.
151. Margolin, J.F., et al., *Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4509-13.
152. Nakai, A., et al., *A human early response gene homologous to murine nur77 and rat NGFI-B, and related to the nuclear receptor superfamily*. Mol Endocrinol, 1990. **4**(10): p. 1438-43.
153. Winoto, A. and D.R. Littman, *Nuclear hormone receptors in T lymphocytes*. Cell, 2002. **109 Suppl**: p. S57-66.
154. Sohn, S.J., A. Rajpal, and A. Winoto, *Apoptosis during lymphoid development*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(2): p. 209-16.
155. Zhou, M. and W. Ouyang, *The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation*. Immunol Res, 2003. **28**(1): p. 25-37.
156. Miaw, S.C., et al., *ROG, repressor of GATA, regulates the expression of cytokine genes*. Immunity, 2000. **12**(3): p. 323-33.
157. Mason, D. and F. Powrie, *Control of immune pathology by regulatory T cells*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(6): p. 649-55.
158. Hanahan, D., *Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity*. Curr Opin Immunol, 1998. **10**(6): p. 656-62.

159. Bell, G.I., S. Horita, and J.H. Karam, *A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes, 1984. **33**(2): p. 176-83.
160. Davies, J.L., et al., *A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes*. Nature, 1994. **371**(6493): p. 130-6.
161. Kennedy, G.C., M.S. German, and W.J. Rutter, *The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription*. Nat Genet, 1995. **9**(3): p. 293-8.
162. Larocca, L.M., et al., *Morphological and immunohistochemical study of Down syndrome thymus*. Am J Med Genet Suppl, 1990. **7**: p. 225-30.
163. Bruno, R., et al., *Different patterns of nicotinic acetylcholine receptor subunit transcription in human thymus*. J Neuroimmunol, 2004. **149**(1-2): p. 147-59.
164. Kennedy, G.C. and W.J. Rutter, *Pur-1, a zinc-finger protein that binds to purine-rich sequences, transactivates an insulin promoter in heterologous cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(23): p. 11498-502.
165. Bossone, S.A., et al., *Cloning and characterization of DNA binding factors which bind sequences required for proper c-myc initiation*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **182**: p. 425-33.
166. Lew, A., W.J. Rutter, and G.C. Kennedy, *Unusual DNA structure of the diabetes susceptibility locus IDDM2 and its effect on transcription by the insulin promoter factor Pur-1/MAZ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(23): p. 12508-12.
167. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein*. Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
168. Eisenbarth, G.S. and P.A. Gottlieb, *Autoimmune polyendocrine syndromes*. N Engl J Med, 2004. **350**(20): p. 2068-79.
169. Klein, L., B. Roettinger, and B. Kyewski, *Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance*. Eur J Immunol, 2001. **31**(8): p. 2476-86.
170. Kumar, P.G., et al., *The autoimmune regulator (AIRE) is a DNA-binding protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(44): p. 41357-64.

ANEXOS

ANEXO I

AU-Differential Display, Reproducibility of a differential mRNA display targeted to AU motifs.

Dominguez O, Sabater L, Ashhab Y, Belloso E, Pujol-Borrell R.

Methods Mol Biol 2003; 226: 225-36

AU-Differential Display, Reproducibility of a Differential mRNA Display Targeted to AU Motifs

Orlando Dominguez, Lidia Sabater, Yaqoub Ashhab,
Eva Beloso, and Ricardo Pujol-Borrell

1. Introduction

AU-rich elements (AREs) are found in 3' untranslated regions (3' UTR) of many highly unstable mRNAs for mammalian early-response genes. The minimal AU sequence core within the ARE is the heptamer WAUUUAW, although from a functional point of view, several pentanucleotides clustered in close proximity are the key sequence motif that mediates mRNA degradation (*1*).

Genes containing AREs are of potential biological and pharmacological interest because they often code for inflammatory mediators, cytokines, proto-oncoproteins, and transcription factors (*2–5*).

A targeted differential display named AU-motif directed display (AU-DD) is described here. It allows the isolation of cDNA fragments from ARE-containing mRNAs with minimal sequence information. AU-DD combines a high specificity gained at the polymerase chain reaction (PCR) level with the advantages of direct comparison between samples at different stages of activation to detect differentially expressed genes (*6,7*).

Previous examples of targeted differential display have used longer and well-conserved motifs from multigene families. These include zinc finger motifs (*8,9*), plant MADS boxes (*10*), and motifs specific for heat shock proteins (*11*). They employ longer conserved sequences (from 6 to 8 codons) to design primers that can predictably work well on PCR.

The PCR step of AU-DD uses primers which contain two distinctive domains, a double AU motif at the 3' end (AU2 in short) and a guanosine rich 5' (**Table 1**). This primer core sequence is previously incorporated as a 5' tag in the retrotranscription primer (*see below*). The 5' domain configures a sticky anchor that increases T_m and stabilizes primer annealing whereas the 3' confers motif specificity. Both 5' and 3' domains contribute in a cooperative way to primer annealing. When the natural primer-binding site was identified on cloned products, it was always found to be a true AU-rich site. The use of the AU2 domain-based primers does not restrict; however, the spectrum of amplified mRNAs to clustered AU-pentamer containing genes. In fact, cDNAs

Table 1
Primer Sequences for Both AU-DD and Control Genes

Protocol	Primer Designation	Sequence
(A) Retrotranscription (RT) and PCR Primers Used in AU-DD		
1	G7AU2dT (RT)	GGGGGGGTATTATTTA(ACGT)TTTTTTTTT TTTTTT(ACG)
2	G7AU2	GGGGGGGTATTATTTA
	G7AU2A	GGGGGGGTATTATTAA
	G7AU2C	GGGGGGGTATTATTAC
	G7AU2G	GGGGGGGTATTATTAG
	G7AU2T	GGGGGGGTATTATTAT
3	GTGAU2dT (RT)	GGTGGGTGGTATTATTTA(ACGT)TTTTTTTTT TTTTTTTT(ACG)
4	GTGAU2	GGTGGGTGGTATTATTTA
	GTGAU2A	GGTGGGTGGTATTATTAA
	GTGAU2C	GGTGGGTGGTATTATTAC
	GTGAU2G	GGTGGGTGGTATTATTAG
	GTGAU2T	GGTGGGTGGTATTATTAT
(B) Primers Used in Control PCR Experiments		
IFN α (J00207)	IFN α 513s	GGCCTTGACCTTTGCTTTA
	IFN α 915as	CTTCATCAGGGGAGTCTCTGT
GAPDH (M33197)	GAPDH19s	TCTTCTTTTGCCTCGCCAG
	GAPDH390as	AGCCCCAGCCTTCTCCA

(A) 1 and 3 are alternative retrotranscription (RT) primers; 2 and 4 list two series of PCR primers compatible with RT primers 1 and 3, respectively. (B) Specific primers for IFN α and GAPD, respectively.

carrying single AU motifs were often amplified, and only 15% of cloned cDNAs contained a complete double AU element (*12*).

On its part, the reverse transcriptase primer incorporates a significant feature by including the PCR primer as a 5' tag. This allows the use of a single primer in the PCR, providing the possibility of a fine titration of the annealing temperature to avoid primer artifacts generated when two oligonucleotides are used in low stringency conditions.

The cDNA is synthesized from total RNA trying to ensure initiation from true poly-A tails of mRNA, which is not always easy. With our protocol, only 8% of cloned products lacked the poly-A tail (*12*).

For two mRNA species to be effectively sampled by DD, the following two conditions are critical: (1) comparable amounts of template must be used and (2) cDNA concentration must be above a threshold to obtain reproducible results. During all the initial processes, RNA concentration and integrity and the absence of contaminating DNA has to be monitored carefully. Even trace amounts of genomic DNA can significantly alter the final profile, yielding fake products and turning the technique unreliable. RNA should be checked for quantity and integrity both after purification and after DNase treatment. The use of good-quality DNase does not guarantee the removal of all DNA, and this process requires also monitoring. The assessment of

DNase treatment efficiency and titration and normalization of cDNA samples were performed by PCR as described (12).

In general, it is always easy to get amplification products. However, this does not guarantee that those products are specific and reproducible. When the cDNA concentration is below a minimal threshold, the final products belong to nonspecific templates that were selected and amplified. This is why both minimal amounts of RNA to be retrotranscribed and cDNA normalization are fundamental. The minimal amount ensures that specific targets can be easily found and selected during the first cycles of PCR, and the normalization ensures that DD profiles between samples activated and resting can be compared.

The major procedures described in the protocol refer to RNA preparation and DNase treatment, cDNA synthesis, AU-DD, and confirmation of differential expression.

2. Materials

In general, any reagent of analytical grade was considered of sufficient purity for general procedures, such as electrophoresis or initial stages of RNA purification. Otherwise, reagents added to enzymatic reactions or intended to dissolve RNA were of molecular biology or ultrapure grades.

2.1. RNA Preparation

1. Lysis solution: GCS (Guanidinium thiocyanate (GuTh), Citric acid, Sarkosyl) is a modification of Sacchi and Chomczynski solution D (14), that is, 4 M GuTh, 50 mM sodium citrate (citric acid adjusted to pH 3.8 with NaOH), and 0.5% Sarkosyl. The solution can be stored for up to no more than 1 mo at 4°C.
2. Double-distilled phenol (Sigma). Phenol was saturated and equilibrated in ultrapure water and treated with 8-hydroxyquinoline (Sigma) (13) yielding unbuffered acidic phenol (pH 4 to 5). Aliquots containing a water overlay were dispensed in sterile polypropylene tubes and stored frozen at -20°C. After thawing, they were kept at 4°C and discarded after 2 wk.
3. Complete Lysis solution (GCSMP): Mix GCS containing beta-2 mercaptoethanol up to 2% with 1 volume of acidic phenol to give GCSMP immediately before use.
4. Phase lock heavy gel (PLG, Eppendorf) stored at room temperature.
5. Glycogen as coprecipitant (Roche Molecular Biochemicals) stored at -20°C.
6. Chloroform:isoamyl alcohol: Chloroform should be mixed with isoamyl alcohol in a proportion of 98:2 v/v (CI), respectively, in a Pyrex bottle with minimal air volume and kept at 4°C.
7. DNase I RQ1 from Promega at 0.2 U/μL in a solution containing 10 mM Bis-Tris-HCl, pH 6.5, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT, and 1 U/μL RNasin.
8. RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/μL) from Promega stored at -20°C.
9. Ethanol 96% and 75%.
10. 3 M Potassium Acetate pH 5.0 (KAc).
11. Isopropanol.
12. Guanidinium thiocyanate (4 M) in water.

2.2. cDNA Synthesis and Further Treatment

1. Reverse transcriptase: SuperScript II RNase H- (Gibco-BRL). Store at -20°C.
2. dNTPs (Amersham Biosciences) at 10 mM each.
3. RNasin Ribonuclease Inhibitor 40 U/μL from Promega (Madison, WI) stored at -20°C.

4. Oligonucleotides used as reverse transcription primers (HPLC purified; Genset, Paris, France) are listed in **Table 1**. There are two variants used in independent but complementary experiments, G7AU2dT and GTGAU2dT.
5. RNase H (Gibco BRL) stored at -20°C .
6. Qiaquick PCR purification kit columns (Qiagen).
7. EE (10 mM EPPS), 0.1 mM EDTA, pH 8.2 adjusted with 0.1 N NaOH was used throughout as a general elution/dilution solution.
8. Reagents for agarose gel electrophoresis.
9. GAPDH primers (*see Table 1*).

2.3. AU-DD

1. $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dATP at 3000 Ci/mmol/DuPont NEN.
2. Platinum *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL).
3. PCR buffer 1 $\times$: 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100.
4. dNTPs at 2 mM.
5. AU-DD primers are listed in **Table 1**.
6. For confirmation of differential expression by standard PCR, specific primers were derived from sequences of cloned AU-DD products with the program Oligo v5.0 (National Biosciences Inc.) to have a T_m of 63 to 65° .

2.4. Gel Electrophoresis

1. S2 GibcoBRL electrophoresis apparatus for 0.8-mm thick gels.
2. 40% (38:2) Polyacrylamide-bispolyacrylamide (Serva, Germany).
3. TEMED (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine).
4. 10% Ammonium persulfate.
5. Whatman 3 MM paper (gel blotting paper).
6. TBE buffer (89 mM Tris Base, 89 mM boric acid, 1 mM EDTA).
7. 20% methanol-10% acetic acid.

3. Method

A schematic representation of AU-DD method is shown in **Fig. 1**.

3.1. RNA preparation (*see Note 1*)

- 1a. Solid tissue is pulverized in liquid nitrogen with mortar and pestle (*see Note 2*).
- 1b. Cultured cells are pelleted at 800g for 5 min at 4°C , and put on ice as dry pellets.
- 1c. For culture flasks with adherent cells, decant, rinse with ice-cold phosphate-buffered saline and decant by aspiration.
2. Add GCSMP in a proportion of 2 mL per 50 mg of tissue or 10^7 cells.
3. Homogenize lysates at 25,000 rpm for 30 s with a mechanical homogenizer (Ultraturrax T25, Ika) to ensure both lysis and a complete DNA shearing. Stand for 2 min at room temperature (*see Note 3*).
4. Add 0.4 volumes of CI (chloroform:isoamyl alcohol) with respect to the complete lysis solution—including phenol volume—and shake energetically for 10 s.
5. Pour on a prepacked PLG tube. Empty prepacked PLG tubes are 14-mL PPN round-bottom centrifuge tubes containing 1.5 mL of PLG-heavy and centrifuged 2 min at 1500g; it should then be left for 10 min on ice.
6. Spin 10 min at 2000g on bench-top centrifuge with swinging bucket rotor. Save upper aqueous phase to high speed tubes and discard PLG interphase and bottom phase.

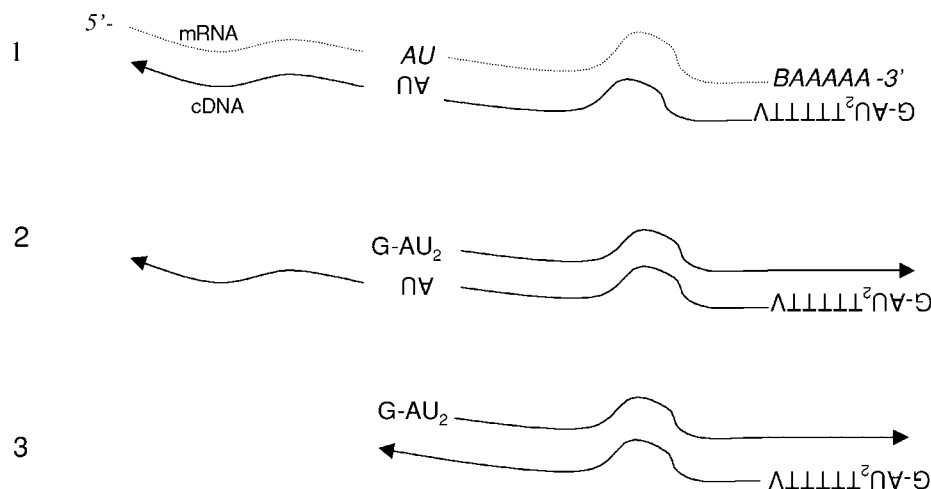


Fig. 1. Schematic representation of AU-DD. **(1)** Retrotranscription. Dotted line represents mRNA template. The RNA molecule at the top contains an AU-rich sequence (AU) and a poly-A tail. G-AU2TTTTTV represents a generic RT primer, with a 5' anchor of rich on Guanosines, an AU2 sequence and an oligo(dT). **(2)** First round of PCR with a single primer G-AU2. **(3)** Final products of AU-DD amplification.

7. Precipitate by mixing with 1 volume of isopropanol. Incubate 1 h at -20°C and centrifuge 30 min at 10,000g. Wash with 75% ethanol.
8. Dissolve pellets in 4 M guanidinium thiocyanate. Use at least 0.2 volumes of the lysis solution used initially. Heat if necessary (pulses of 5 min at 60°C) until there are not pellet particles left in solution. Be careful because the pellet particles become transparent and it is difficult to see them. Coprecipitant may be incorporated here adding 1 μL of glycogen (20 mg/mL) and mix.
9. Repeat the precipitation step with isopropanol (9).
10. Wash with 75% ethanol. Dissolve in ultrapure water. The volume of water depends on the RNA concentration desired. Typically, 50 μL is appropriate to run out all the following experiments.
11. Total RNA concentration is measured by spectrophotometry and gel electrophoresis. Not less than 3 μg (see Note 4) or up to 50% of RNA prep is DNase I treated (next step) in a separate tube, storing the other half as backup or for other purposes at -80°C after mixing with 3 volumes of 95% ethanol (see Note 5).
12. RNA integrity and concentration is assessed by titration using *Escherichia coli* rRNAs (Sigma) as standard in 1% TBE agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining (13). Different concentrations of commercial *E. coli* rRNAs (800, 400, 200 ng) are compared in intensity with different dilutions of the RNA sample.
13. Typically, 5 to 10 μg of total RNA (see Note 6) is incubated at 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ with DNase I for 30 min at 37°C . One microliter is then taken to check the absence of DNA (see Note 7).
14. RNA is precipitated by adding 0.1 volumes of 3 M KAc, pH 5.0; 1 μL of glycogen; and 3 volumes of 95% ethanol (see Note 8). After standing for 5 min at room temperature, the pellet is recovered by 10 min of centrifugation in a microcentrifuge at 10,000g and washed in 75% ethanol (see Note 9).

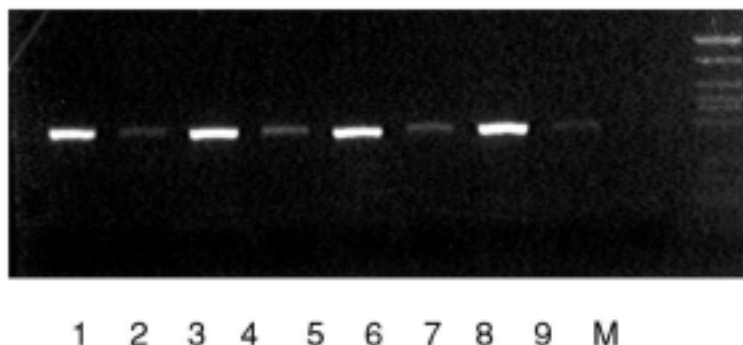


Fig. 2. cDNA normalization for their concentration in GAPDH gene. Lanes 1, 3, 5, and 7 cDNA diluted 1:5 are different samples and. Lanes 2, 4, 6, and 8 are the respective cDNA diluted 1:50. Lane 9 is a PCR-negative control.

3.2. cDNA Synthesis and Further Treatment

1. A single reverse transcription with any of the two RT primers shown in **Table 1** (G7AU2dT and GTGAU2dT) produced cDNA for a complete set of AU-DD reactions with matching PCR primers. These two different RT primers are anchored oligo(dT)₁₅ primers with a 5' tag that accommodates the sequence of any of the AU-DD primers that will be used at the PCR step. The tag defines the particular RT primer and the set of AU-DD primers to be used. The 15 T stretch was found to anneal more specifically on poly-A tails at the conditions used than others of 25 or longer. The tag was designed with the intention of generating the weaker secondary structure as possible. Standard oligo(dT)₁₅ was used to retrotranscribe control RNA samples (Jurkat and U937). First-stranded cDNA was prepared with Superscript II (Gibco-BRL) following manufacturer instructions with minor modifications indicated below.
2. DNase treated total RNA (2–3 µg) in water and 10 pmoles of the chosen RT primer (**Table 1**) for a reaction volume of 20 µL were denatured at 72°C for 3 min on a PCR machine and chilled on ice for 1 min (*see Note 10*).
3. The other reagents for a reaction volume of 20 µL except the enzyme are supplemented at room temperature (*see Note 11*). Annealing was allowed to proceed for 10 min at room temperature.
4. 200 U SuperScript II (Gibco-BRL) were then added and the mixture was incubated for 1 h at 42°C.
5. Reverse transcription was stopped by heating at 90°C for 2 min and RNase H was used as recommended by its supplier (Gibco-BRL). 1.8 U RNase H, 20 min at 37°C.
6. To validate cDNA synthesis, normalization was performed by amplifying 1:10 and 1:500 cDNA dilutions for GAPDH in a 25-cycle PCR adjusted to an annealing temperature of 60°C (primers in **Table 1B**). Product concentration was estimated by visual inspection of ethidium bromide stained gels, and cDNAs were normalized by dilution according to their GAPDH equivalents if required. Typically no adjustment was needed (**Fig. 2**, *see Note 12*).
7. Free nucleotides and primer were washed out in Qiaquick columns (Qiagen). cDNA was eluted in 50 µL of EE. The eluates were used directly in AU-DD.

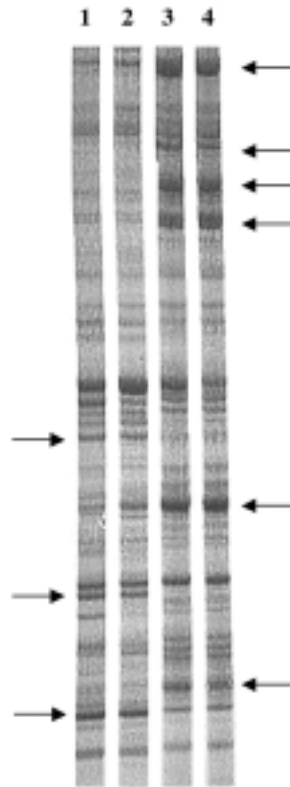


Fig. 3. Typical AU-DD gel. Results from adherent monocytes by using a single PCR (not nested) are shown. Lanes 1 and 2 show fingerprints from activated cells. Lanes 3 and 4 show resting cells. Net cDNA was used for lanes 1 and 3 and diluted (1:5) for 2 and 4. Arrows signal fragments from differentially expressed genes.

3.3. AU-DD

At this stage, there are two desalted cDNA samples ready to be compared, the experimental and the control. Every reaction on a template is made in duplicate to detect variability caused by the sample concentration only. In this way, two cDNA concentrations, net and 1:5, are used in independent PCR tubes with otherwise identical primer and conditions (*see Note 13*). Reactions are prepared for 10- μ L volumes and contain 2 μ L of cDNA, primer at 3 μ M (1.5 μ M in nested reactions as proposed in **Note 13**), 10 mM Tris-HCl, pH 8.8; 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, dNTPs each at 0.2 mM (*see Note 14*), 0.25 μ L of α - ^{32}P -dATP and 50 mU/ μ L Platinum DNA polymerase (*see Note 15*). Reactions are run in a PTC-100 thermocycler (MJ Research) for 40 cycles with the following profile: 94°C for 40 s; 42°C for 1 min, 20 s; and 70°C for 40 s.

3.4. Gel Electrophoresis

1. AU-DD products (2 μ L) are mixed with nondenaturing DNA loading buffer and separated in native 0.8-mm thick, 6% TBE polyacrylamide gels at 12 V/cm. Voltage was chosen such that it did not generate higher temperature than 45°C during the run to avoid heat denaturation. Every set of four reactions coming from the same cell line, both resting and activated, and at each of the two cDNA concentrations are run in adjacent lanes.
2. Gels are fixed in 20% methanol:10% acetic acid for 30 min before drying under vacuum at 80°C about 1 h with a Whatman 3 MM as support and autoradiographed as for standard sequencing gels (13, *see Note 16*).
3. Individual bands (**Fig. 3**) are selected when unique or more intense in activated cells (*see Note 17*).
4. The autorad is clamped against the dried gel by superimposing background signals with corresponding well line and gel edges. Edges of selected bands are punctured through the autorad with a hypodermic needle, leaving a mark in the dried gel. Gel slices containing those bands are cut out of the dried gel with a sterile scalpel knife.
5. Dried gel pieces are rehydrated in 0.2 mL of EE for 3 h at 50°C. A further 1:20 dilution in EE was used as template for reamplification by 40 cycles of PCR and subsequent cloning.

3.5. Confirmation of Differential Expression

To confirm the differential expression, a semiquantitative RT-PCR was performed (**Fig. 4**, *see Subheading 2.3., step 6*). Specific PCR primers to the selected fragments were derived from the fragment sequences and were used in 40 cycles of PCR with paired resting and stimulated cDNAs. These cDNAs are normalized as described above, under **Subheading 2.2., step 5**.

4. Designing a Primer Directed to AU Motifs

A variety of AU-DD primers directed to single AU motifs were tested in preliminary experiments (not reported here). Their poor specificity and performance led us to design oligos with double AU pentamer motifs, which are often found in rich AU containing 3'UTR of tightly controlled genes.

AU-DD features reside in those specially designed primers that were used from reverse transcription to PCR. Results from experiments using two primers which differ in their 5' anchors are presented: GTGAU2 and G7AU2 (**Table 1**). The 5' anchors influence the annealing to natural AU containing sites and, therefore, the array of cDNAs that are selected and amplified during the PCR. In this way AU2 primers with different 5' anchors sample distinct subsets of genes.

The correctness of the rationale on the primer design was demonstrated in experiments which used an interleukin (IL)-2 gene fragment containing the AU2 sequence as template. In otherwise similar conditions the GTGAU2 primer allowed the detection of 10^3 times less molecules of IL-2 cDNA than G7AU2 (not shown). A better anchoring of GTGAU2 on IL-2 does not necessarily imply that it also anneals better on other cDNAs. Therefore, both primers were used in parallel experiments, as other anchors can be tested, to increase the number of genes sampled.

To keep structural simplicity, anchor domains containing only G or G and T were used, but variations can be expected to work as well as long as primer T_m is maintained.

In an attempt to increase the affinity of the anchor, we tested inosine containing primers in different sequence configurations. When used alone, these primers reduced

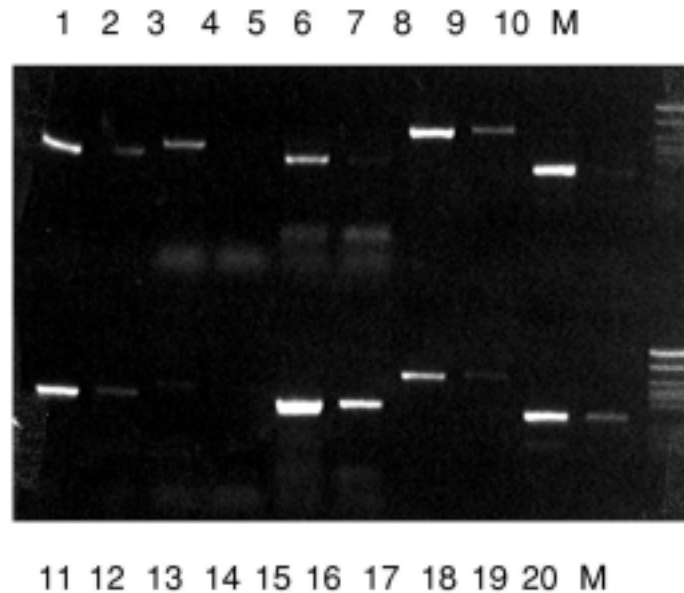


Fig. 4. Confirmation of the differential expression by specific RT-PCR (primers derived from sequences of cloned AU-DD products) in agarose gels of a few AU-DD fragments taken as examples. Odd lanes are from activated cells and even lanes are the counterpart resting cells.

the system sensitivity and reproducibility on the IL-2 cDNA. However, when used to supplement standard primers, a small but consistent gain in the number of products obtained from total cDNA was noticed, even when sensitivity to the IL-2 standard was not improved (not shown). Profile reproducibility among replicas was excellent for the primers and conditions described.

5. Notes

1. Different RNA preparation methods were examined in function of copurifying RNase activities, contaminating DNA, and yield. Ultracentrifugation in Cs salts (CsCl, CsTFA) gave an acceptable low level of DNA, but it was discarded because of its relatively poor yield. Phase lock heavy gel was found to improve both the yield in RNA and the partitioning of the genomic DNA to the lower phenolic phase. The single step acid-phenol method (**14**) was used with minor modifications intended to ensure RNA integrity and an efficient removal of both RNase activities and of contaminating genomic DNA. The procedure is described since this latter factor is considered relevant to the main method.
2. Fresh tissue is snap frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C or lower until needed. Ceramic mortar is precooled by pouring on it liquid nitrogen where pestle is submerged; it is advised to wear gloves during this procedure. Initial bubbling will cease when the tool is cool enough. Then, the tissue is submerged and ground till reduced to a powdered state. The remaining liquid nitrogen is left to evaporate until the tissue is just wet, like a paste. Then, it is poured to a polypropylene 50-mL conical centrifuge tube. As soon as the tissue starts looking dry, add the lysis solution, mix by vortexing and homogenize.

3. If the container is not a polypropylene (PPN) tube, transfer lysates to a PPN centrifuge tube. Choose the tube so that the lysate volume is not larger than one third of its capacity.
4. Because lower RNA amounts negatively affect the reliability of DD techniques, not less than 3 μg are processed.
5. The RNA concentration in the storage ethanol solution is one fourth of the original concentration before adding the alcohol. In absence of salts, this solution forms a relatively uniform suspension of RNA, which is easy to pipet. To recover an aliquot, transfer the volume that contains the desired amount to a fresh tube. Supplement and mix with both coprecipitant (glycogen) and 0.1 vol of KAc, pH 5.0. Store an additional hour at -80°C and gather the sediment by centrifugation at 12,000g. After a single wash in 75% ethanol, the pellet is ready for any downstream application.
6. To assure a complete removal of contaminating DNA, trial tests were performed. RNA from human thymus, which copurifies with relatively high content of DNA, was used for these assays. The best conditions were found when RNA (substrate) and DNase (enzyme) were kept as described.
7. The absence of residual contaminating DNA was demonstrated by the failure to amplify the genomic locus of interferon- α , a multicopy gene, by PCR. A program of 40 cycles with an annealing temperature of 60°C was performed, with primers at 1 μM and reaction in 10 μL (primers in **Table 1**). The inclusion of negative controls to test for PCR contamination is advisable. If DNA is detected, the DNase-treated RNA sample is discarded.
8. After DNase treatment, ethanol precipitation is apparently enough to inactivate any significant DNase activity without the need of any further treatment such as phenol.
9. The RNA pellet can be stored indefinitely in this wash solution of 75% ethanol. It is left there before reverse transcription until it is confirmed by PCR that no residual DNA contamination has survived (*see Note 7*).
10. Total RNA was always used because poly A selection from low amounts (tens of micrograms) of RNA was found inappropriate. The overall losses were significant, and an unquantifiable amount made the DD unreproducible and difficult to normalize.
11. Given the 3' location of the AU motifs there was a special interest in retrotranscribing true 3' ends. The separate step of annealing at room temperature was found to reduce primer extensions from false poly A tails.
12. In this setting, the 1:500 dilution always gives comparable results among samples; 4 μL checked by electrophoresis usually contains 5 to 10 ng of GAPDH amplicon.
13. Because it is of interest to sample as many genes as possible different conditions are used side by side to increase throughput. Limited sample availability can also benefit from these variations. Primers of the series G7AU2 (**Table 1**) are used on cDNAs initiated from G7AU2dT. Similarly, GTGAU2 primers are *more efficient* on cDNA primed from GTGAU2dT. Both types of primers give different profiles, and different designs of the nonspecific 5' domain also give different patterns. Proposed variations of conditions for a given cDNA to yield different profiles are as follows: (1) use the five primers of any series in 40 cycles of a single round of PCR; (2) run first a nonradioactive PCR of 30 cycles with either G7AU2 or GTGAU2, then dilute products 1:50 and run a series of nested PCR of 30 cycles with the remaining four inner primers (G7AU2N or GTGAU2N) in four separate radioactive reactions; (3) reduce the concentration of cold dNTPs; (4) change the reaction buffer (different profiles can be achieved just by changing the Mg concentration in 1 mM differences); (5) combine any of these conditions.
14. A cold dNTP concentration of 0.2 mM on radioactive reactions gives stronger signals and lower background than lower concentrations.

15. To reduce artifacts, it is important to use some hot start techniques or a preblocked polymerase. Some brands offer this kind of product. Those products that require extra PCR cycles for activation have been avoided. Note that different polymerases can also give different band patterns and sensitivity.
16. Although even when fixed and washed radioactive gels still tend to give background signals on the autorad that assists the orientation, it may be preferred to use luminescent labels (such as the Glogos labels from Stratagene) for this purpose.
17. According to the scientist's interests, genes that are downregulated in experimental samples might also be of major interest. They would be isolated from the control sample since its concentration there would be higher.

Acknowledgments

Pepi Caro is warmly thanked for her expert technical support and patience during the development of this work.

This work has been supported in part by the CDTI as Concerted Projects 95/0184 and 97/0313.

References

1. Xu, N., Chen, C. Y., and Shyu, A. B. (1997) Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4611–4621.
2. Shaw, G. and Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**, 659–667.
3. Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., and Cerami, A. (1986) Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1670–1674.
4. Balmer, L. A., Beveridge, D. J., Jazayeri, J. A., Thomson, A. M., Walker, C. E., and Leedman, P. J. (2001) Identification of a novel AU-Rich element in the 3' untranslated region of epidermal growth factor receptor mRNA that is the target for regulated RNA-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2070–2084.
5. King, L. M. and Francomano, C. A. (2001) Characterization of a human gene encoding nucleosomal binding protein nsbp1. *Genomics* **71**, 163–173.
6. Liang, P. and Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**, 967–971.
7. Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D., and McClelland, M. (1992) Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4965–4970.
8. Stone, B. and Wharton, W. (1994) Targeted RNA fingerprinting: the cloning of differentially-expressed cDNA fragments enriched for members of the zinc finger gene family. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2612–2618.
9. Donohue, P. J., Alberts, G. F., Guo, Y., and Winkles, J. A. (1995) Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative Serine/Threonine kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 10,351–10,357.
10. Fischer, A., Saedler, H., and Theissen, G. (1995) Restriction fragment length polymorphism-coupled domain directed differential display: a highly efficient technique for expression analysis of multigene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5331–5335.

11. Joshi, C. P., Kumar, S., and Nguyen, H. T. (1996) Application of modified differential display technique for cloning and sequencing of the 3' region from three putative members of wheat HSP70 gene family. *Plant Mol. Biol.* **30**, 641–646.
12. Dominguez, O., Ashhab, Y., Sabater, L., Belloso, E., Caro, P., and Pujol-Borrell, R. (1998) Cloning of ARE-containing genes by AU-motif-directed display. *Genomics* **54**, 278–286.
13. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.
14. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.

ANEXO II

El timo: vieja glándula, nuevas ideas.

Ricardo Pujol Borrell, Lidia Sabater

Medicina Clínica 2003; 120(6) 216-8

El timo: vieja glándula, nuevas ideas



Ricardo Pujol Borrell^{a,b} y Lidia Sabater Baudet^a

^aLaboratorio de Inmunobiología para la Investigación y las Aplicaciones Diagnósticas (LIRAD).

Servicios Sanitarios de Referencia-Centro de Transfusiones y Banco de Tejidos.

Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona.

^bUnidad Departamental de Inmunología. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España.

El timo es una glándula conocida de antiguo, ya figuraba en las descripciones clásicas de Galeno (siglo II d.C.) y posteriormente en las de Vesalio (siglo XV), donde se la consideraba una estructura destinada a proteger los vasos, en especial la vena cava superior. A pesar de ser anatómicamente fácil de reconocer, su función ha sido un misterio hasta tiempos recientes. No fue hasta 1961 cuando el inmunólogo australiano Miller, al demostrar el efecto devastador de la timectomía sobre el sistema inmunitario, aportó la primera noción de cuál es su función¹. En los años siguientes se aclaró el papel del timo como órgano esencial para la maduración de los linfocitos y se constató que éste es un proceso curiosamente ineficiente, ya que menos del 5% de los timocitos (nombre que se aplica a los linfocitos del timo) acaba siendo linfocitos T circulantes. Poco después su compatriota Burnet, el autor de la teoría de la selección clonal, propuso que el timo es donde se eliminan los linfocitos no útiles o peligrosos antes de pasar a la circulación², y esto explica en parte la mortandad celular. Más de 20 años fueron necesarios para que resultara técnicamente posible demostrar la eliminación de linfocitos autorreactivos en el timo, demostración que corrió a cargo de Kappler y Marrack en 1987³. Los experimentos de estos autores fueron ampliados por el grupo de Von Boehmer y por otros muchos investigadores que utilizando ratones transgénicos pusieron de manifiesto la implicación de las moléculas de histocompatibilidad (HLA en el ser humano) en la maduración y selección de los timocitos⁴.

Al conjunto de procesos de maduración que sufren los linfocitos se le denomina «educación tímica», pues no se trata meramente de eliminar las células potencialmente peligrosas por su autorreactividad, sino de una auténtica «programación» del conjunto funcional formado por los linfocitos T para que reconozcan y se activen cuando entren en contacto con agentes infecciosos, pero no cuando encuentren antígenos propios. Actualmente se admite que los timocitos sufren un proceso de doble selección que se podría esquematizar del siguiente modo: protimocito → selección positiva (de las células capaces de interaccionar con HLA propio) → timocito maduro → selección negativa (de las células que reconocen antígenos propios con alta afinidad) → salida a periferia.

Una observación clínica singular ha confirmado el papel crucial del timo en el desarrollo del sistema inmunitario humano: el llamado síndrome de DiGeorge, una entidad clínica en que la agenesia del timo da lugar a una forma selectiva de inmunodeficiencia con ausencia de células T que se puede subsanar mediante el trasplante de timo⁵.

Curiosamente, los posibles fallos de esta función fundamental del timo, el establecimiento de tolerancia a los antígenos propios, sólo se han relacionado directamente con la autoinmunidad (fallo de la tolerancia) en el caso de la miastenia gravis, una enfermedad autoinmune poco frecuente. El dato que más ha contribuido durante muchos años a pasar por alto el importante papel del timo en las enfermedades autoinmunes es la detección de linfocitos autorreactivos en individuos normales⁶⁻⁸, de lo que se deducía que no podía ser la eliminación de linfocitos T autorreactivos el mecanismo normal de protección contra el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Este razonamiento no se sostiene porque las técnicas disponibles cuando se realizaron las observaciones que lo sustentan no permiten valorar la afinidad ni la capacidad efectora de las clonas autorreactivas. Sólo en los últimos años se ha podido constatar que existen diferentes características funcionales dentro de los linfocitos T autorreactivos que determinan su capacidad patogénica. A pesar de ello, el concepto de que existe una capacidad uniforme de desarrollar autoinmunidad no ha desaparecido del pensamiento inmunológico.

Por otra parte, durante los últimos 15 años se ha progresado mucho en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria en cuanto al perfil de citocinas (Th1 frente a Th2), de control de su expansión (muerte inducida por activación) o de compartimentalización (migración y recirculación), y se han estudiado numerosas líneas de ratones mutantes (transgénicos y espontáneos) en los que la anulación de genes que intervienen en estos procesos conduce al desarrollo de enfermedades autoinmunes¹⁰. Algunas de estas observaciones se han podido validar en el ser humano; por ejemplo, se ha demostrado que un defecto en el gen *fas*, que normalmente previene la expansión continuada de la respuesta inmunitaria, conduce a una enfermedad autoinmune, el síndrome autoinmune linfoproliferativo o síndrome de Canale-Smith⁹. Esta enfermedad se ha constituido en paradigma de los procesos autoinmunes tipo lupus que se presume son consecuencia de fallos en los mecanismos de regulación de la respuesta inmunitaria después del contacto con el antígeno rev¹¹. Sin duda todo ello ha contribuido a excluir el posible papel que desempeña el timo en la patogenia de las enfermedades autoinmunes.

Sin embargo, muy recientemente una serie de observaciones ha situado de nuevo al timo en el centro de atención en la investigación en autoinmunidad.

Estudios sistemáticos han refutado la creencia de que el timo se atrofia rápidamente después del nacimiento y carece de función a partir de la primera infancia. De hecho el tejido timopoyético se reduce de forma muy paulatina, a razón de un 3% por año hasta la edad media de la vida y luego a menos del 1% anual, de lo que se deduce que la pérdida total se produciría a los 105 años¹². La capacidad del timo de reactivarse se pone de manifiesto a veces en el tras-

Correspondencia: Dr. R. Pujol Borrell.
Laboratorio de Inmunología. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol.
Ctra. del Canyet, s/n. 08916 Badalona. Barcelona. España.
Correo electrónico: ricardo.pujol@uab.es.

Recibido el 25-9-2002; aceptado para su publicación el 26-9-2002.

plante de médula ósea con inmunoblación¹³ y en los pacientes con sida que inician un tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), situaciones ambas en las que incluso se puede apreciar un aumento de tamaño radiológico que se correlaciona con una evolución favorable¹⁴. Estas observaciones han podido ser corroboradas de forma más precisa mediante una nueva técnica que permite valorar la funcionalidad del timo: la determinación de TREC (*T cell receptor excision circles*). Son moléculas circulares de ADN genómico que se generan en los linfocitos T durante su maduración en el timo como consecuencia de un proceso exclusivo de estas células, el reordenamiento de los segmentos génicos que codifican el receptor de antígeno (TCR). Los TREC permanecen en el núcleo como episomas sin posibilidad de duplicarse y se pueden cuantificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹⁵. Si se mantienen estables otros parámetros como la vida media y el tiempo de división celular, la proporción de células T que contienen TREC refleja la fracción que ha salido recientemente del timo, los llamados *recent thymic emigrants*. Así se ha podido demostrar la relación entre la función tímica, la edad del individuo¹⁵ y el grado de reconstitución inmunológica tras trasplante de médula ósea o TARGA.

Otro concepto que ha cambiado es el de que la función tímica es sólo importante para mantener un grado básico de tolerancia central a antígenos hemopoyéticos y ubicuos. En modelos murinos se ha visto que a partir de cierta proporción de células autorreactivas se desarrolla un cuadro autoinmune, aunque las células vayan dirigidas contra un antígeno periférico confinado, por ejemplo, a los islotes de Langerhans y no haya un proceso inflamatorio concomitante¹⁶. Por tanto, la proporción y calidad de las células autorreactivas sí son un factor importante en las enfermedades autoinmunes y un factor que depende básicamente de la función tímica. Ello lleva a una propuesta muy simple acerca de cuándo se producen las respuestas autoinmunes: cuando en un determinado lugar concurre un número suficiente de células autorreactivas con una afinidad suficiente y en un micromedio en el que se estimulan las células accesorias: dendríticas y macrófagos. Probablemente las contribuciones de estos tres factores pueden compensarse entre sí. Se trata, pues, de una reformulación de la máxima detectivesca de que para que el delito se produzca deben concurrir el móvil, la oportunidad y los medios.

Para poder mantener un grado apropiado de tolerancia a los antígenos periféricos, el timo precisa una representación interna muy completa de los antígenos propios, algo que hasta recientemente se consideraba muy improbable. Varios laboratorios¹⁷⁻¹⁹, entre ellos el nuestro, han demostrado que el timo sintetiza una amplia variedad de antígenos del cuerpo humano, incluyendo algunos clásicamente considerados como secuestrados. Sería una versión inmunológica intratímica del homúnculo de Broca, y ha sido denominado expresión «promiscua» de genes²⁰ y considerado una propiedad de ciertas poblaciones de células tímicas. El análisis de la expresión de autoantígenos periféricos, especialmente endocrinos y neurales, en el timo ha desvelado además un nivel de complejidad considerable que puede explicar por qué en ciertas situaciones la respuesta inmunitaria va dirigida selectivamente contra epítomos muy seleccionados de un antígeno complejo. Aunque se exprese, un antígeno puede sufrir en el timo un procesamiento de su ARNm diferente del que sufre en periferia, dejando excluido del proceso de inducción de tolerancia a algunos epítomos. Éste es el caso de la proteína proteolípida (PLP), principal componente de la mielina y un antígeno importante en la esclerosis múltiple. En la encefalomielitis autoinmune experimental (modelo

de la esclerosis múltiple) se ha observado cómo la respuesta autoinmune va dirigida únicamente a los epítomos no expresados en el timo. En el caso de IA-2 (ICA-512 o antígeno del islote pancreático 512) varios epítomos diana para la diabetes tipo 1 no se han encontrado expresados en el timo y sí en islotes pancreáticos. Este «escape» selectivo de ciertos epítomos de los autoantígenos podría ayudar a comprender la asociación de las enfermedades autoinmunes con ciertos alelos del sistema HLA; serían los alelos que presentarían más eficientemente los péptidos no tolerizados²¹.

Otro aspecto complejo, pero de sumo interés, es la variación interindividual en los valores de expresión de los autoantígenos en el timo y su posible relación con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. El ejemplo mejor documentado es el del gen de la insulina y la predisposición a presentar diabetes tipo 1. A mediados de la década de 1980²² se detectó una asociación significativa entre la región cromosómica del gen de la insulina y la diabetes, pero no se pudo explicar por anomalías estructurales en el gen (primero se asoció erróneamente con la diabetes tipo 2 y sólo posteriormente con la tipo 1). Años después se localizó el alelo predisponente en la región del promotor del gen, concretamente en una zona altamente polimórfica que contiene un número variable de secuencias repetitivas. La posible influencia de esta zona sobre la transcripción fue una opción repetidamente valorada, pero no fue hasta que se demostró que una categoría de alelos determina un nivel elevado de transcripción de insulina en el timo cuando se pudo aventurar una hipótesis patogénica: la protección se debería a una más eficaz inducción de tolerancia a la insulina en el timo²³. En nuestro laboratorio hemos confirmado el efecto de los polimorfismos del gen de la insulina sobre su nivel de expresión tímica (Sabater et al, datos no publicados) pero, más importante aún, hemos constatado que la variabilidad del nivel de expresión se produce en otros genes de autoantígenos^{20,24}. De hecho hemos podido definir tres patrones de expresión de autoantígenos en el timo: constitutiva, ligada al desarrollo (caso de la cadena γ del receptor de acetilcolina) y variable, que sería el caso de la peroxidasa tiroidea, GAD 67 y la cadena α del receptor de la acetilcolina.

Todo este conjunto de observaciones se puede interpretar mejor si se tiene en cuenta estudios efectuados en el ratón, en el que el papel del timo en cuanto a la tolerancia y la autoinmunidad está más claramente establecido. En ciertas cepas de ratones la timectomía neonatal va seguida de la aparición de enfermedades autoinmunes órgano-específicas, tales como la tiroiditis, gastritis y ooforitis autoinmune²⁵, lo que demuestra de forma inequívoca el papel del timo en la tolerancia a los antígenos periféricos. Curiosamente estas enfermedades autoinmunes se controlan mediante la transferencia de linfocitos que provienen de ratones normales de la misma cepa, lo que apunta a un mecanismo dominante de tolerancia mediado por linfocitos T reguladores originados en el timo^{26,27}. De hecho, la posibilidad de que el timo humano también mantenga la tolerancia a los antígenos propios mediante dos mecanismos complementarios: selección negativa y generación de células reguladoras, que requieren la existencia del citado homúnculo inmunológico intratímico, se considera hoy muy probable.

En conclusión, si aceptamos la ahora en boga hipótesis de que las enfermedades autoinmunes son el resultado de un largo proceso en el que se ha tenido que eludir una serie de puestos de control (*multiple checkpoints hypothesis*)²⁸, el establecimiento de un nivel de tolerancia central suficiente podría constituir el primer puesto de control que la respuesta inmunitaria tiene que evitar para llegar a generar enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miller JF. Discovering the origins of immunological competence. *Annu Rev Immunol* 1999;17:1-17.
2. Burnet FM. The role of the thymus and related organs in immunity. *BMJ* 1962;2:807-11.
3. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49:273-80.
4. Kisielow P, Teh HS, Bluthmann H, Von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988;335:730-3.
5. Markert ML, Boeck A, Hale LP, Kloster AL, McLaughlin TM, Batchvarova MN, et al. Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *N Engl J Med* 1999;341:1180-9.
6. Martin R, Jaraquemada D, Flerlage M, Richter J, Whitaker J, Long EO, et al. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 1990;145:540-8.
7. Semana G, Gausling R, Jackson RA, Hafner DA. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J Autoimmun* 1999;12:259-67.
8. Lohmann T, Leslie RD, Londei M. T cell clones to epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 raised from normal subjects and patients with insulin-dependent diabetes. *J Autoimmun* 1996;9:385-9.
9. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, et al. Dominant interfering *Fas* gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995;81:935-46.
10. Huseby ES, Sather B, Huseby PG, Goverman J. Age-dependent T cell tolerance and autoimmunity to myelin basic protein. *Immunity* 2001;14:471-81.
11. Walker LS, Abbas AK. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2002;2:11-9.
12. George AJ, Ritter MA. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today* 1996;17:267-72.
13. Weinberg K, Blazer BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, et al. Factores affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:1458-66.
14. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes JM, et al. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998;396:690-5.
15. Storek J, Joseph A, Espino G, Dawson MA, Douek DC, Sullivan KM, et al. Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2001;98:3505-12.
16. Von Herrath MG, Dockter J, Oldstone MB. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in transgenic model. *Immunity* 1994;1:231-42.
17. Smith KM, Olson DC, Hirose R, Hanahan D. Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol* 1997;9:1355-65.
18. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2001;2:1032-9.
19. Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Domínguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol* 1998;161:5918-29.
20. Kyewski B, Derbinski J, Gotter J, Klein L. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol* 2002;23:364-71.
21. Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med* 2000;6:56-61.
22. Owerbach D, Johansen K, Billesbolle P, Poulsen S, Schroll M, Nerup J. Possible association between DNA sequences flanking the insuline gene and atherosclerosis. *Lancet* 1982;2:1291-3.
23. Publiese A, Zeller M, Fernández A Jr, Zalcberg LJ, Barlett RJ, Ricordi C, et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDMS2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* 1997;15:293-7.
24. Bruno R, Sabater L, Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Escudero D, Martínez-Cáceres E, et al. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur J Immunol* 2002;32:2737-47.
25. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune disease. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
26. Taguchi O, Nishizuka Y. Self tolerance and localized autoimmunity. Mouse models of autoimmune disease that suggest tissue-specific suppressor T cells are involved in self tolerance. *J Exp Med* 1987;165:146-56.
27. Shevach EM. CD4+CD25+suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400.
28. González A, Katz JD, Mattei MG, Kikutania H, Benoist C, Mathis D. Genetic control of diabetes progression. *Immunity* 1997;7:873-8.