

## Tesis de Posgrado

# Diabetes Mellitus insulino-dependiente : identificación y utilización en el tratamiento de la enfermedad de ligandos peptídicos específicos de un clon diabetogénico proveniente de ratones no obesos y diabéticos

Judkowski, Valeria A.

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Judkowski, Valeria A.. (2002). Diabetes Mellitus insulino-dependiente : identificación y utilización en el tratamiento de la enfermedad de ligandos peptídicos específicos de un clon diabetogénico proveniente de ratones no obesos y diabéticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3459\\_Judkowski.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3459_Judkowski.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Judkowski, Valeria A.. "Diabetes Mellitus insulino-dependiente : identificación y utilización en el tratamiento de la enfermedad de ligandos peptídicos específicos de un clon diabetogénico proveniente de ratones no obesos y diabéticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3459\\_Judkowski.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3459_Judkowski.pdf)

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Universidad de Buenos Aires**

**TESIS DE DOCTORADO**

*“Diabetes Mellitus Insulino-Dependiente”*

*Identificación y utilización en el tratamiento de la enfermedad de ligandos peptídicos específicos de un clon diabetogénico proveniente de ratones no obesos y diabéticos.*

Valeria A. Judkowski

Director: Darcy B. Wilson

45 ~

Año: 2002

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a Wilson...(Darcy!, of course) por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por haber confiado en mí en todo momento. Por haberme presentado gente maravillosa y siempre abriéndome más y más puertas. Por celebrar con tanta alegría mi casamiento, por dejarme viajar a Argentina y a Francia por muchos días y en el mismo año!...Por seguir teniendo confianza en mí...

Quiero agradecerle a Nora Sarvetnick el increíble apoyo que recibí de ella durante todo el trabajo de mi Tesis. Todas nuestras charlas de la vida, de los hijos, de embarazos, de ciencia claro!!! Nora fue una parte fundamental de todo este proceso, no sólo por el invaluable aporte científico sino porque además es una persona maravillosa. Fue un verdadero placer haber colaborado con Nora en este proyecto y es genial poder estar ahora trabajando en su laboratorio.

Por último y con una emoción indescriptible quiero agradecerle a Chacha (Clemencia Pinilla en los papers). No tengo palabras para agradecerle Cha. Lo que yo aprendí trabajando con vos es impresionante. No hay dudas que sin vos este trabajo no se hubiera podido realizar. Tus conocimientos, tu entusiasmo. Trato de imitarlo mucho...en serio!!! Tu manera de trabajar con la gente!!! Tu manera de analizar los resultados...es genial. Quiero trabajar con vos por mucho tiempo más, sos una genia extraterrestre como decimos nosotras.

Valeria

*Mientras hacía los experimentos de esta Tesis viví en San Diego; extrañe infinito a mis amigos y a mi familia pero, valió la pena! conocí a Pascal, nos enamoramos y nos casamos. Mientras escribía esta Tesis nació nuestra hermosa hija Lena.*

*Quiero dedicar esta Tesis a todos ellos, porque son todo para mí en esta vida....*

*Mayo, 2002*

## TABLA DE CONTENIDOS

### ABREVIATURAS

### INTRODUCCIÓN

1.	DIABETES MELLITUS	1
1.1	DIABETES MELLITUS DE TIPO 1	2
1.1.1	LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR DIABETES MELLITUS DEL TIPO 1 ESTÁ ASOCIADA TANTO A FACTORES GENÉTICOS COMO AMBIENTALES	3
1.1.2	RESPUESTA DE LAS CÉLULAS T Y SU PAPEL EN LA ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	4
1.2	ANTÍGENOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD	8
1.2.1	GAD 65 COMO AUTOANTÍGENO	8
1.2.2	INSULINA COMO AUTOANTÍGENO	9
1.3	MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE DIABETES MELLITUS DE TIPO 1	10
1.3.1	EL RATÓN NO OBESO Y DIABÉTICO (NOD)	10
1.3.2	EL RATÓN TRANSGÉNICO BDC2.5	11
1.4	TERAPÉUTICA DE LA ENFERMEDAD	13
1.4.1	USO DE ANTICUERPOS PARA ALIVIAR Y SUPRIMIR DIABETES AUTOINMUNE	13
1.4.2	MODULACIÓN DEL PERFIL DE CITOQUINAS EXPRESADO POR LAS CÉLULAS T PATOGÉNICAS COMO ESTRATEGIA PARA SUPRIMIR DIABETES AUTOINMUNE	14
1.4.3	EL SUMINISTRO CONTROLADO DE LOS ANTÍGENOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD COMO ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO DE DIABETES AUTOINMUNE	14
1.5	IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS AUTOANTÍGENOS	16
1.5.1	SISTEMAS EXPERIMENTALES	16

### OBJETIVOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES .....	1
2. BIBLIOTECAS PEPTÍDICAS Y PÉPTIDOS .....	1
3. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.....	1
4. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC <sub>50</sub> DE LAS MEZCLAS Y LOS PÉPTIDOS .....	2
5. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS .....	2
6. INMUNIZACIONES .....	3
7. MODELO DE TRANSFERENCIA DE DIABETES .....	3
8. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	3
8.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN IN VIVO DE LOS LINFOCITOS T CD4(+) DE RATONES BDC2.5 .....	3
8.2 ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS EN LINFOCITOS T CD4(+) LUEGO DE LA INMUNIZACIÓN IN VIVO CON LIGANDOS DE DIFERENTE AFINIDAD .....	4
8.3 DETECCIÓN DE CÉLULAS T CD4(+)Vβ4(+) Y CD4(+) (DIMER P63- 1040)(+) EN RATONES NOD USADOS EN EL MODELO DE TRANSFERENCIA DE DIABETES .....	4
9. HISTOLOGÍA E INMUNO-HISTOQUÍMICA .....	5

## ANEXO

## RESULTADOS

## ANEXO

1. DESCONVOLUCIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LAS CÉLULAS T CD4+ BDC2.5 .....	1
1.1 APROXIMACIÓN COMBINATORIAL .....	1
1.2 PROCESO EXPERIMENTAL DE DESCONVOLUCIÓN .....	3
1.2.1 ESCRUTINIO DE CÉLULAS BDC2.5 CON LA BIBLIOTECA PS-SCL 97-4 .....	3
1.2.2 SÍNTESIS Y ESCRUTINIO DE MEZCLAS EN BASE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON PS-SCL 97-4 .....	6
1.2.3 AVANCE EN LA DETERMINACIÓN DE ESPECIFICIDAD. SÍNTESIS Y ESCRUTINIO DE UNA NUEVA BIBLIOTECA ORGANIZADA EN FORMATO POSICIONAL .....	9

1.3	SÍNTESIS, ACTIVIDAD Y ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS INDIVIDUALES	12
2.	IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS PRESENTES EN PROTEÍNAS NATURALES CAPACES DE ESTIMULAR CÉLULAS BDC2.5	14
2.1	HOMOLOGÍA CON LA PROTEÍNA PANCREÁTICA GAD 65	14
3.	ESTUDIOS IN VITRO CON LOS PÉPTIDOS ENCONTRADOS ESPECÍFICOS DE LAS CÉLULAS DIABETOGÉNICAS BDC2.5	19
3.1	PATOGENICIDAD	19
3.2	RESPUESTA DE CÉLULAS T DEL RATÓN NOD A LOS ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE LAS CÉLULAS T BDC2.5	20
3.3	PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS DE LAS CÉLULAS BDC2.5 ESTIMULADAS CON LOS LIGANDOS DEFINIDOS EN ESTE TRABAJO	21
4.	ESTUDIOS IN VIVO CON LOS PÉPTIDOS ENCONTRADOS ESPECÍFICOS DE LAS CÉLULAS DIABETOGÉNICAS BDC2.5	23
4.1	PÉPTIDOS CON ALTA CAPACIDAD DE ESTIMULAR CÉLULAS DIABETOGÉNICAS IN VITRO, NO CAUSAN DIABETES CUANDO SON PRESENTADOS IN VIVO	23
4.2	PÉPTIDOS CON ALTA CAPACIDAD DE ESTIMULAR CÉLULAS DIABETOGÉNICAS IN VITRO CAUSAN MUERTE POR APOPTOSIS CUANDO SON PRESENTADOS IN VIVO	25
4.3	PÉPTIDOS CON ALTA CAPACIDAD DE ESTIMULAR CÉLULAS DIABETOGÉNICAS IN VITRO, PREVIENEN EL DESENCADENAMIENTO DE DIABETES IN VIVO	27
4.3.1	LA INMUNIZACIÓN IN VIVO CON UN PÉPTIDO DE ALTA AFINIDAD PREVIENE ENFERMEDAD EN EL "MODELO DE TRANSFERENCIA DE DIABETES" MEDIANTE LA DELECCIÓN DIRECTA DE LAS CÉLULAS PATOGÉNICAS	30

## DISCUSIÓN

## ABREVIATURAS

Aa	aminoácido	IEs	índice de estimulación
ADN	ácido desoxi-ribonucleico	IFA	adyuvante incompleto de Freund
APC	célula presentadora de antígeno	IFN- $\gamma$	interferón-gamma
ARN	ácido ribonucleico	IL	interleuquina
BB	biológicamente generada (del inglés bio-breeding)	IV	intravenosa
Boc	tert-butoxicarbonilo	LPS	lipopolisacáridos
Bzl	benzilo	MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
CFA	adyuvante completo de Freund	NOD	no obeso y diabético
CPM	cuentas por minuto	ODNs	oligos de deoxi-nucleótidos
DM	diabetes mellitus de tipo 1	OPD	o-fenilendiamina
EC50	concentración estimuladora media	PBS	tampón fosfato salino
ELISA	ensayo inmunoenzimático (del inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	PE	ficoeritrina
FITC	isotiocianal-fluoresceina	PS-SCL	biblioteca de péptidos sintéticos organizada en formato posicional (del inglés : Positional Scanning - Synthetic Combinatorial Libraries)
Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo	TCR	receptor de la células T
GAD	glutamato decarboxilasa	TdR	timidina radiactiva
H&E	tinción con hematoxilina y eosina	Th	célula T (del inglés helper, colaboradora)



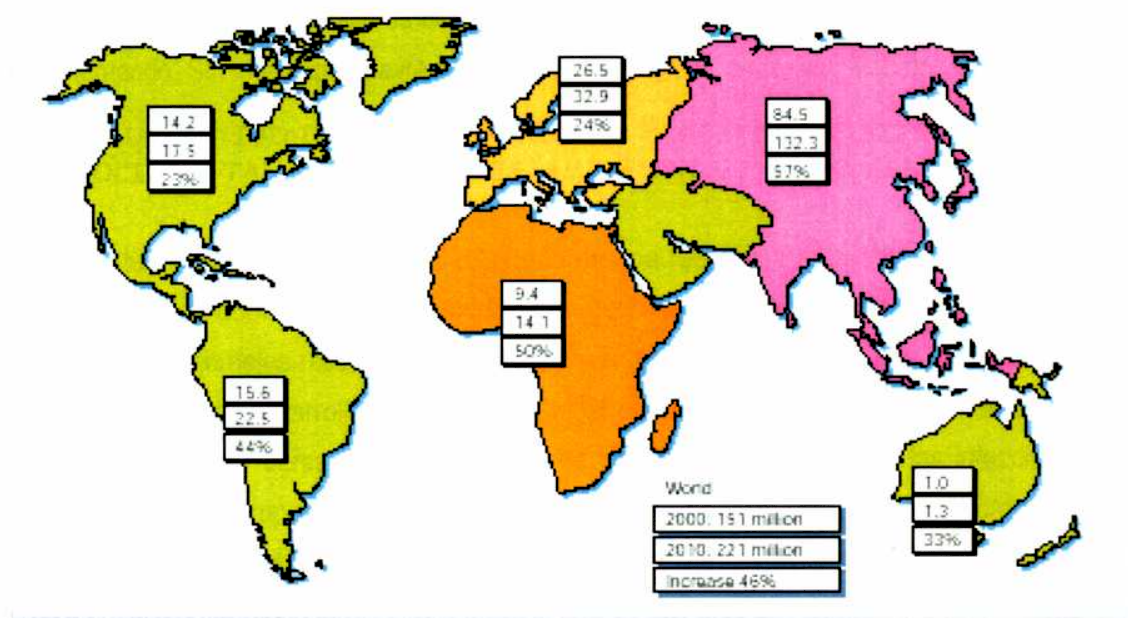
## INTRODUCCIÓN

## 1. DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus es la más común entre las enfermedades del sistema endócrino. Está caracterizada por una rápida aparición de anormalidades a nivel metabólico y por complicaciones a largo plazo en los ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos provocados por el aumento del nivel de glucosa en sangre. Esta enfermedad se clasifica en dos grandes grupos en base a las causas que la provocan, diabetes mellitus de tipo 1 y diabetes mellitus de tipo 2. El término "de tipo 1" refiere a mecanismos de origen inmunológico, mientras que el término "de tipo 2" refiere a mecanismos diferentes a los de origen inmunológico. Diabetes mellitus de tipo 1 es conocida también como diabetes mellitus insulino dependiente, mientras que diabetes mellitus de tipo 2 es conocida como diabetes mellitus no-insulino dependiente. Esta clasificación no resulta del todo adecuada, ya que pacientes en los cuales la enfermedad resulta de problemas no inmunológicos muchas veces necesitan ser asistidos mediante el tratamiento con insulina.

En Estados Unidos la prevalencia de diabetes fue estimada en un 6,6% , con 10 veces mas casos de diabetes mellitus de tipo 2 que de tipo 1 [1]. En la década de los '90 la prevalencia en Argentina de diabetes en la población general ( personas entre 20 y 74 años) fue del 6% [2] y resultó la tercer causa más común de retiro prematuro entre los empleados públicos de la Provincia de Buenos Aires [2] (Figura 1). Argentina tiene además una larga historia dedicada a la investigación de esta enfermedad comenzando por el Profesor Bernardo A. Hussay quien obtuvo el Premio Nobel en Ciencias Médicas por su estudio en la relación entre diabetes y la función pituitaria y el Profesor Luis F. Leloir al cual también se le otorgó el Premio Nobel por su trabajo sobre el metabolismo de carbohidratos.

Si bien ha habido un extenso progreso en el entendimiento de la patología de diabetes mellitus de tipo 1, no ocurrió lo mismo con diabetes de tipo 2. En resumen, hoy en día se cree que las características fundamentales de la diabetes de tipo 2 son resistencia a la insulina y un defecto en la secreción de dicha hormona. Es altamente probable que las dos condiciones sean requeridas para que se manifieste la enfermedad, ya que hay una gran proporción de personas muy obesas con marcada resistencia a la insulina que presentan niveles normales de glucosa en sangre. Otra característica en los pacientes con diabetes mellitus de tipo 2 es que las células  $\beta$  del páncreas productoras de insulina se encuentran intactas, lo cual marca una diferencia fundamental con la patología de la diabetes de tipo 1, la que se manifiesta cuando la mayoría de estas células han sido destruidas.



**Figura 1.** Número de personas con diabetes (en millones) en el año 2000 y la proyección para el año 2010 (valores en el cuadrado de arriba y en el del medio, respectivamente) y el porcentaje de aumento que significa (cuadrado de más abajo). Datos tomados de la revista *Nature*, volumen 414, página 782.

## 1.1 DIABETES MELLITUS DE TIPO 1

Diabetes Mellitus de tipo 1 (DM) es una enfermedad autoinmune que resulta de la específica destrucción de las células  $\beta$  de Langerhans de los islotes pancreáticos productoras de insulina [3]. Consta de dos fases diferentes: insulitis, en la cual una población variada de leucocitos invade los islotes; y, diabetes, fase en la cual la mayoría de las células  $\beta$  ha sido eliminada y por lo tanto no hay más suficientes niveles de insulina para regular la glucosa sanguínea resultando así en un estado de hiperglucemia. Se ha observado tanto en humanos como en modelos animales que se puede tener insulitis encubierta por largo tiempo (años en humanos, meses en roedores) antes de que finalmente se desarrolle diabetes, y en muchos casos, la progresión a diabetes no ocurre jamás. DM no es una nueva patología, existen documentos desde los griegos y los egipcios reportando la existencia de esta enfermedad. Existe también evidencia que entre un 5-15 % de personas que originalmente desarrollan diabetes de tipo 2 pueden lentamente progresar a una forma no muy severa de diabetes de tipo 1. Es

además muy común, afectando acerca del 0,5% de la población en países desarrollados y su incidencia sigue aumentando. Sin embargo todavía no se sabe cómo revertir o prevenir diabetes de tipo 1.

### **1.1.1 LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR DIABETES MELLITUS DE TIPO 1 ESTÁ ASOCIADA TANTO A FACTORES AMBIENTALES COMO GENÉTICOS**

Diabetes Mellitus de tipo 1 es el resultado de una respuesta autoinmune que involucra tanto factores ambientales como genéticos. Estudios con gemelos idénticos en los cuales la incidencia de diabetes en ambos gemelos resultó cercana al 20% son una fuerte evidencia que muestra que factores ambientales influyen el desarrollo de diabetes. Si DM fuera una enfermedad puramente genética, el porcentaje debería estar cerca del 100%. Dentro de los factores ambientales, las infecciones virales demostraron tener gran importancia [4]. El aislamiento del virus Coxsackie B4 del páncreas de un niño que murió luego de un episodio de ketoacidosis y la inducción de diabetes con este aislamiento en modelos animales sugirió que ciertos virus pueden causar diabetes en humanos. Otra evidencia es que alrededor del 20% de individuos en los Estados Unidos que padecieron rubeola congénita desarrollan DM [5].

Se han propuesto dos principales hipótesis para explicar cómo las infecciones pueden causar autoinmunidad. La primera propone que la infección con virus u otros patógenos origina en el hospedador una serie de eventos que finalmente llevan al desencadenamiento del proceso de enfermedad. Estos eventos son: 1- Mediante la invasión y daño de los tejidos, los patógenos producen la liberación de autoantígenos que anteriormente permanecían secuestrados, 2- Se produce un proceso de inflamación que da lugar no sólo a la activación de células T reactivas contra estos antígenos específicos sino que además produce un aumento en la concentración local de citoquinas y quemoquinas atrayendo más células del sistema inmune al tejido atacado. Por último, una vez que la infección pudo ser neutralizada, los linfocitos autoreactivos pueden permanecer en forma crónica dando lugar a nuevos episodios de autoinmunidad [6]. La segunda hipótesis sugiere que la respuesta inmune montada en diabetes es originada contra un antígeno "no propio" y que, mediante el fenómeno de "mimética molecular" reacciona también contra un antígeno pancreático. La mayor evidencia en favor de esta hipótesis proviene del estudio con el virus Coxsackie B. Dicho virus posee una proteína denominada P2-C la cual tiene gran homología con el péptido 247-279 de la proteína pancreática glutamato-ácido decarboxilasa (GAD; ver sección 1.2.1 de la Introducción). Se han demostrado varios casos en los cuales sangre periférica de pacientes con diabetes reaccionó de manera similar contra el péptido de GAD 247-279 y la proteína P2-C del virus Coxsackie B [7, 8]. De esta hipótesis se desprende entonces la

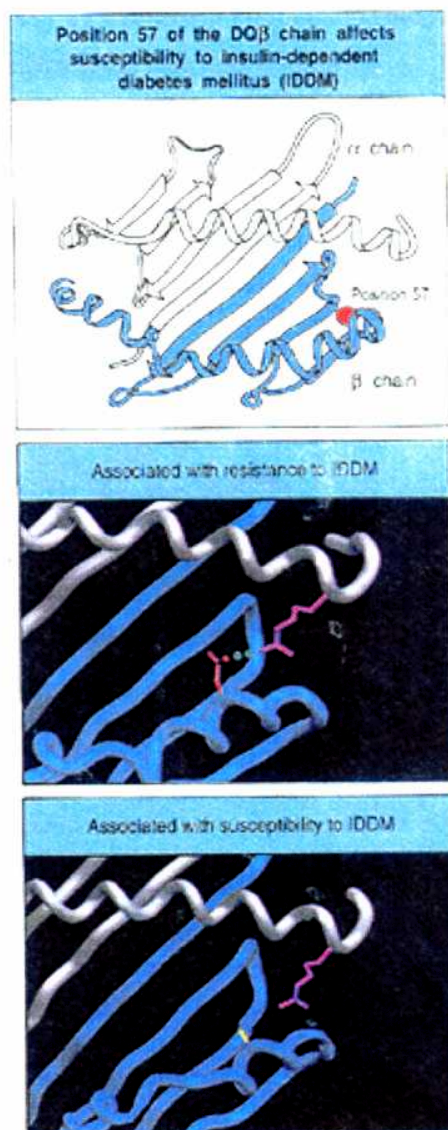
posibilidad de que mediante un proceso de mimética molecular se alteraría la respuesta inmune de tal manera que se monta una respuesta inmune contra antígenos propios.

Dentro de los factores genéticos el más importante radica en la región del cromosoma 6 que codifica para el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Con el avance en el desarrollo de técnicas que permitieron secuenciar los diferentes genes del MHC pudo determinarse que en humanos el genotipo DQ8 es el que determina susceptibilidad a la enfermedad. La secuencia aminoacídica normal del DQ8 posee ácido aspártico en la posición 57, mientras que en las poblaciones Caucásicas, los pacientes con diabetes tienen en general valina, serina ó alanina en dicha posición [9, 10]. Resulta interesante que la molécula de clase II denominada I-Ag7, expresada en el modelo animal de diabetes, el ratón no obeso y diabético (NOD; ver sección 1.3.1 de la Introducción), también posee un aminoácido distinto al ácido aspártico en la posición  $\beta$ 57. Las estructuras cristalinas de las moléculas DQ8 y I-Ag7 muestran importantes similitudes y sugieren que DM es consecuencia de la manera particular en que estas moléculas presentan antígeno [11]. Tanto DQ8 como I-Ag7 unen péptidos similares y que resultan diferentes de los péptidos que unen otras moléculas de clase II. Por ejemplo, se ha comprobado que I-Ag7 une epitopes que son inmuno-dominantes en el proceso de la enfermedad [12] (Figura 3).

Al mismo tiempo que el estudio comparativo de la frecuencia de ciertos alelos del MHC entre pacientes con DM y la población normal llevó a encontrar una asociación entre la presencia de DQ8 y la susceptibilidad a la enfermedad, sirvió también para determinar que la presencia del alelo DR2 disminuye significativamente la probabilidad de desarrollar DM.

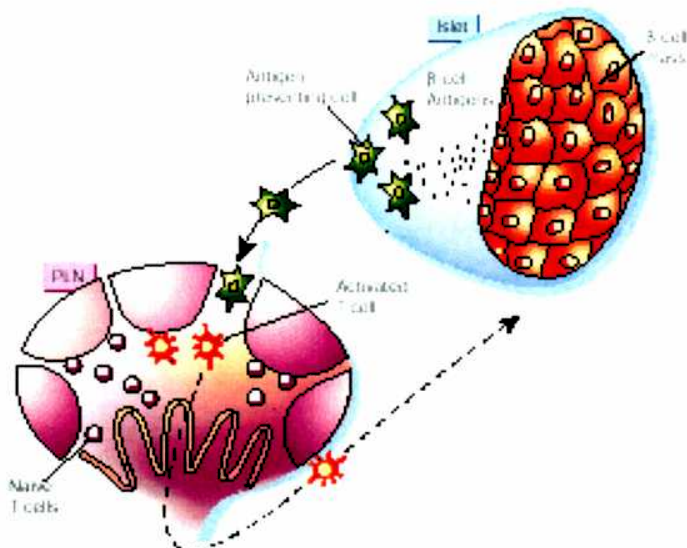
La asociación entre el genotipo del MHC y la susceptibilidad a desarrollar diabetes no es tan sorprendente si se piensa que la respuesta autoinmune observada en esta enfermedad se encuentra asociada a una activación específica de los linfocitos T y, para que ocurra dicha activación las moléculas MHC deben poder presentar específicamente ciertos antígenos. Así, la susceptibilidad a ciertas enfermedades autoinmunes, incluyendo diabetes, estaría en parte dada por las diferencias en la habilidad de ciertos genotipos del MHC de presentar péptidos/autoantígenos capaces de activar linfocitos T autoreactivos.

### **1.1.2 RESPUESTA DE LAS CÉLULAS T Y SU PAPEL EN LA ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD**



**Figura 3.** Cambios en la secuencia aminoacídica del MHC de clase II correlaciona con la susceptibilidad o la protección a desarrollar diabetes del tipo 1. El haplotipo DQ8 contiene ácido aspártico (Asp) en la posición 57 en la mayoría de la gente; en las poblaciones Caucásicas, pacientes con diabetes del tipo 1 tienen en general valina, serina o alanina en esta posición. En la figura se muestra en rojo la asparragina 57 formando un puente (color verde) con el residuo arginina (color rosa). El cambio de este residuo por un residuo no cargado (por ejemplo alanina mostrado en amarillo en el último panel) no permite la formación del puente salino alterando la estabilidad de la molécula. El ratón NOD posee un reemplazo similar del residuo serina por ácido aspártico en el residuo 57.

Diabetes mellitus de tipo 1 se manifiesta en humanos luego que un proceso autoinmunológico produce la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema propuesto para explicar la iniciación del proceso patológico que lleva al desarrollo de diabetes de tipo 1. Las células T circulan por la sangre y los nódulos linfáticos, incluyendo los nódulos pancreáticos. En los nódulos encuentran células presentadoras de antígeno (probablemente células dendríticas maduras) que expresan en la superficie moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad cargadas con antígeno. Los antígenos derivan de proteínas sintetizadas por las células  $\beta$  de los islotes. Una pequeñísima fracción de las células T reconoce específicamente a estos antígenos y resulta entonces activada. Una vez activadas ganan acceso a los tejidos. Cuando llegan al páncreas se encuentran con el antígeno y se inicia el proceso de autoinmunidad. *Figura modificada del artículo de la revista Nature, volumen 414, página 792.*

Este proceso puede durar varios años y tiene como consecuencia final la intolerancia a la glucosa. La destrucción de las células  $\beta$  es caracterizada por la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos pancreáticos y por una masiva infiltración de linfocitos mononucleares dentro de los islotes de Langerhans donde se encuentran las células  $\beta$  [13, 14]. Varios estudios han demostrado, tanto en humanos como en ratones, que esencialmente DM es una enfermedad mediada por linfocitos T [15-20]. Sin embargo, resulta considerablemente más difícil realizar estudios en humanos y en general

se han reportado resultados poco claros [21]. Por el contrario, el rol de las células T ha sido extensamente estudiado en modelos animales como el ratón NOD (ver sección 1.3.1 de la Introducción). Tanto los linfocitos T CD4+ como los T CD8+ están involucrados en el desarrollo espontáneo de DM en ratones NOD. Sin embargo, en ciertas circunstancias, incluyendo trabajos con líneas celulares T, se ha podido demostrar que un sólo grupo de estos linfocitos T (CD4+ ó CD8+) es suficiente para transferir insulinitis y enfermedad en ratones jóvenes asintomáticos NOD ó en ratones deficientes de células T, los denominados ratones NOD.*scid* [22-28]. En el caso de los linfocitos T CD8+ la mejor evidencia del rol que cumplen en la patología de la enfermedad proviene de estudios en los que se demostró que células T de ratones jóvenes prediabéticos NOD son capaces de transferir enfermedad en ratones NOD.*scid* que poseen la capacidad de presentar antígenos mediante el complejo MHC de clase I y que, sin embargo, cuando se usaron ratones recipientes transgénicos que no expresan la molécula MHC de clase I se perdió la capacidad de transferir enfermedad [29-32]. Otro estudio demostró que el clon CD8+ denominado G9C8 y que reconoce específicamente un péptido de la cadena B de la insulina ha sido capaz de transferir diabetes en ausencia de células T CD4+ [33, 34].

Como se ha mencionado anteriormente, aunque varios tipos celulares participan en el desarrollo de la enfermedad, solamente la presencia de células T CD4+ es suficiente para causar diabetes cuando se encuentran en suficiente número [35]. Acorde al predominio de citoquinas secretado por las células T CD4+ estas pueden dividirse en Th1 (T Helper tipo1) ó Th2 (T Helper tipo 2). En particular, los linfocitos T CD4+ de tipo Th1 secretan IFN- $\gamma$  y IL-2 mientras que los linfocitos CD4+ de tipoTh2 secretan IL-6, IL-4, IL-5 y IL-10. Para investigar el papel de los linfocitos CD4+ en la patología de la enfermedad se generaron varios clones a partir de células del bazo de ratones NOD específicamente reactivos contra antígenos pancreáticos. Tanto Haskins como Wegmann generaron un gran número de estos clones los cuales demostraron ser capaces de destruir las células  $\beta$  del páncreas luego de ser transferidos en ratones sanos NOD [36-39]. Los clones diabetogénicos T CD4+ generados por Haskins generaron un perfil de citoquinas de tipo 1 cuando fueron estimulados con islotes pancreáticos [36].

Basado en la observación de que el daño autoinmunológico del páncreas está caracterizado por la presencia de altos niveles de células T CD4+ de tipo Th1 [37, 40, 41] se ha sugerido que las células Th1 están asociadas a la patología de la enfermedad. Así mismo varios laboratorios han sugerido un papel "protectivo" de las células Th2. Por ejemplo, ha sido demostrado que el tratamiento de ratones NOD con IL-4 retrasó la iniciación de diabetes y ratones NOD transgénicos que expresan localmente IL-4 en los islotes pancreáticos resultaron totalmente protegidos de enfermedad [42]. Sin embargo es



importante aclarar que todavía hay un alto grado de discrepancia con respecto al rol de los linfocitos Th1 vs. Th2 en la etiología de diabetes autoinmune. Por ejemplo, dos trabajos reportados recientemente presentan resultados opuestos con respecto a la función de los linfocitos T CD4+ de tipo Th2 en la etiología de la enfermedad [43, 44].

## **1.2 ANTÍGENOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD**

Aunque los anticuerpos no están involucrados directamente en la patogénesis de la enfermedad, la presentación de antígenos por los linfocitos B es esencial para el desarrollo de diabetes en el ratón NOD [45]. En la última década se ha realizado un significativo progreso en la identificación de los principales antígenos que son reconocidos por los anticuerpos específicos asociados a diabetes en el humano. Desde entonces varias proteínas han sido consideradas como potenciales autoantígenos en la etiología de DM tanto en humanos como en el ratón NOD. Entre ellos se encuentran la proteína granulosa de los islotes [46,47], la proteína glutamato ácido decarboxilasa (GAD) [48] y la proteína "heat shock" [49]. Sin embargo, mucha de la evidencia que existe hasta ahora sobre estos posibles antígenos es bastante indirecta, es decir, está basada en datos que surgen a partir de ensayos en donde se mide la respuesta proliferativa y de expresión de citoquinas de clones celulares aislados de animales prediabéticos a determinados fragmentos de estas proteínas, o proviene de experimentos mostrando que determinados tratamientos en ratones NOD con estos mismos fragmentos reducen la severidad de la enfermedad [47-54]. Recientemente, se ha reportado por primera vez que la directa supresión de la expresión de la proteína GAD en las células  $\beta$  del páncreas en una cepa de ratones NOD transgénicos en la que se insertó un gen que expresa la molécula de ARN (ácido desoxi-ribonucleico) mensajero antisentido de GAD reduce significativamente el proceso de insulitis y bloquea completamente el desarrollo espontáneo de la enfermedad [54]. Sin embargo, sólo en raras excepciones se logró causar enfermedad por ejemplo mediante la inmunización de ratones sanos con GAD [48, 53].

### **1.2.1 GAD 65 COMO AUTOANTÍGENO**

La identificación de GAD como autoantígeno de la enfermedad DM proviene de un reporte publicado en 1982 en el cual un antígeno de 64,000 Mr fue inmunoprecipitado de los islotes del páncreas con suero de un niño recientemente diagnosticado con la enfermedad [55]. La posterior caracterización bioquímica llevó a caracterizar este fragmento como la isoforma más pequeña de GAD, GAD65 [56].

Los epitopes dentro de la secuencia de GAD65 que son reconocidos por suero de pacientes con DM mapean en la región C-terminal ( aminoácidos 450-585) y en el dominio medio ( aminoácidos 245-

449). A pesar de algunas observaciones en las que se ha sugerido que anticuerpos contra GAD67 están presentes en 10-20% de los pacientes, esta molécula no parece representar un autoantígeno independiente en la etiología de la diabetes, lo que parece ocurrir es que los anticuerpos específicos anti-GAD65 reaccionan también con esta isoforma [57, 58].

En contraste con la gran cantidad de estudios sobre la respuesta de anticuerpos contra GAD65 en pacientes diabéticos, hay relativamente pocos trabajos que analicen la respuesta celular. Linfocitos de sangre periférica de pacientes con DM reaccionan espontáneamente con GAD65 y con péptidos de GAD65; sin embargo, la magnitud de dicha respuesta es bastante baja [7, 59-62]. En general la respuesta es generada contra la región 473-555 de GAD65 ó, preferentemente, la región 247-279 [7, 59]. Los epitopes de GAD65 identificados en estudios sobre la respuesta celular en el ratón NOD y otros modelos animales de DM son similares a aquellos descritos en humanos [63-66]. Estudios en el ratón NOD han demostrado que clones celulares T CD4+ que reconocen GAD65 son capaces de transferir insulinitis y diabetes en receptores sanos [48]. Además es de destacar que uno de esos clones reconoce el péptido de GAD65 desde el aminoácido 524 al 543 (péptido 524-543), el cual pertenece a la región de GAD65 sugerida como inmunodominante en la respuesta observada en humanos [59].

A pesar de que existe un cierto grado de controversia sobre el papel central de GAD65 en la patogénesis de DM, cada vez mas resultados muestran que GAD65 juega un rol central en el desarrollo de esta enfermedad. La respuesta inmunológica montada contra GAD65 podría observarse desde dos puntos de vista: 1) Es causa directa del proceso destructivo del páncreas ó, 2) Está "presente en la escena del accidente" y es consecuencia de la estimulación originada por los antígenos que han sido liberados de las células pancreáticas. Estudios en el ratón NOD validan el punto de vista número 1, es decir, existe un rol directo de la respuesta anti-GAD en la predisposición a desarrollar enfermedad. Estos ratones desarrollan una muy temprana respuesta anti-GAD y la modulación de dicha respuesta atenúa la severidad de la enfermedad [50, 51]. Mediante la inyección, ya sea intratímica, intraperitoneal, oral o intranasal de la proteína completa ó de algunos de sus péptidos derivados se ha logrado prevenir enfermedad en estos ratones [50, 51, 67-72].

### **1.2.2 INSULINA COMO AUTOANTÍGENO**

La insulina es una hormona abundantemente expresada en los islotes pancreáticos. Dentro de los islotes del ratón NOD se han identificado células T CD4+ que reconocen insulina, específicamente el péptido 9-23 de la cadena  $\beta$ . Dichas células son capaces de transferir diabetes en recipientes sanos [47]. Recientemente se ha demostrado que un clon celular T CD8+ altamente diabetogénico reconoce el

péptido 15-23 dentro de la cadena B de la insulina [33]. Es claro que la insulina es un autoantígeno en diabetes y es blanco de ataque tanto de células CD4+ como CD8+ en el modelo NOD. Similar a lo observado con GAD, varios estudios han mostrado que si se administra el péptido 9-23 de la cadena B de la insulina [47, 73] en ratones NOD se protege de diabetes. Otra evidencia que muestra la importancia de la insulina como antígeno en la etiología de la diabetes proviene de estudios en los que se ha demostrado que si se inactiva metabólicamente la insulina mediante el cambio de un aminoácido en la cadena  $\beta$  también se puede prevenir diabetes [74].

### **1.3 MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE DIABETES MELLITUS DE TIPO 1.**

Debido a las dificultades que presenta investigar directamente en humanos, la mayoría de los investigadores en el campo de la diabetes enfocó los estudios en modelos animales, especialmente en el ratón no obeso y diabético (NOD) y en los ratones transgénicos derivados de él. El estudio en el ratón NOD ha permitido la experimentación directa de importantes interrogantes de la patología de la enfermedad. Sin embargo, debido a la complejidad de este modelo se usaron varias estrategias para simplificar la enfermedad en este ratón mediante la delección o exageración de algunas de sus funciones. Por ejemplo, una estrategia ha sido la generación de ratones transgénicos para focalizar el estudio en el papel de los linfocitos T en la enfermedad. Estos ratones han permitido el estudio específico del comportamiento de las células T patogénicas [35, 87].

#### **1.3.1 EL RATÓN NO OBESO Y DIABÉTICO (NOD)**

Dos modelos en animales roedores desarrollan espontáneamente diabetes mellitus de tipo uno, el ratón no obeso y diabético (NOD) y la rata BB (Biobreeding, del inglés biológicamente generada). Ambos modelos han permitido una detallada exploración del proceso inmunológico involucrado en el desarrollo de diabetes.

Desde el primer trabajo en el que se reportó la existencia del ratón NOD, este modelo ha sido el favorito de los investigadores de la patogénesis de la enfermedad. Entre las razones de esta popularidad se incluyen: un definido genoma, anticuerpos monoclonales que permiten un extenso análisis de los componentes del sistema inmune y una considerable diferencia en el costo del mantenimiento de estos ratones en comparación con las ratas BB. De todas maneras, la observación que proporcionó más apoyo a este modelo animal fue, que al igual que en humanos, el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de estos ratones no sólo es el principal componente que otorga

susceptibilidad a desarrollar diabetes sino que además, se encontró la misma substitución que existe en humanos en la cadena  $\beta$  de dicha molécula: el residuo 57 se encuentra reemplazado por un residuo que no es ácido aspártico.

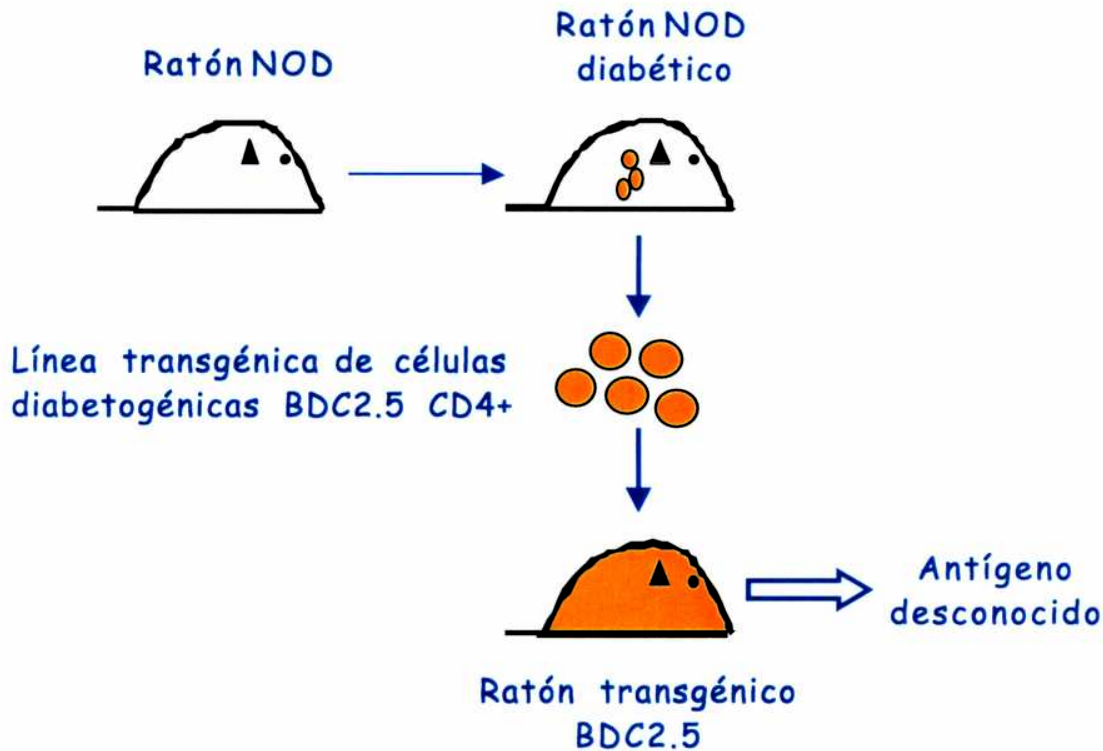
El ratón NOD surgió del cruce entre ratones "Swiss" durante el curso de un experimento en Japón en el cual ratones hermanos eran cruzados para producir una cepa en la cual todos los ratones desarrollaran cataratas en los ojos. Apenas empezaron a cruzar estos ratones, los investigadores se dieron cuenta que, si bien los ratones no mostraban ningún signo de cataratas, desarrollaban un rápido aumento en los niveles de glucosa en sangre, un típico signo de diabetes. Estos ratones fueron seleccionados y cruzados entre ellos con el objetivo de crear un modelo animal para el estudio del desarrollo espontáneo de diabetes. Sin embargo, estos cruces dieron lugar a la cepa denominada NON que es modelo animal para el estudio de la diabetes tipo 2. La cepa NOD surgió inesperadamente en la generación número 20 dentro de los grupos controles. Cuando se cruzaron estas dos líneas para estudiar las regiones cromosomales implicadas en la susceptibilidad a desarrollar espontáneamente diabetes se demostró que la presencia del alelo del MHC del ratón NOD en homocigosis es esencial para el desarrollo de enfermedad. Esto es contrario a lo que ocurre en humanos ya que en muchos pacientes se encontró que el alelo del MHC que confiere susceptibilidad está en heterocigosis.

La etiología de la diabetes en este modelo animal es compleja y multifactorial. Tanto los linfocitos T CD4+ como los CD8+ constituyen el "brazo efector" del proceso de destrucción de las células  $\beta$  del páncreas junto con la importante participación de macrófagos, células dendríticas y linfocitos B.

### 1.3.2 EL RATÓN TRANSGÉNICO BDC2.5

En el año 1988 Haskins y sus colaboradores aislaron una línea CD4+ de los órganos periféricos de ratones diabéticos NOD. Dicha línea reconoce específicamente un antígeno pancreático presentado en el contexto de I-Ag7 [37, 38]. Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor celular T de este clon fueron luego aisladas para generar un ratón transgénico que exprese en todas sus células CD4+ dichos rearrreglos específicos. Dicho ratón fue denominado también BDC2.5.

Debido al fenómeno de exclusión alélica esencialmente todos los linfocitos T CD4+ de este ratón transgénico expresan el gen específico V $\beta$ 4 para la cadena  $\beta$  del TCR pero varios diferentes genes para la cadena  $\alpha$ . A pesar de que estos ratones poseen el mismo "background" genético que los ratones NOD, y por lo tanto tienen la capacidad de presentar el antígeno pancreático en la superficie del MHC de clase II no se observó ni delección ni tolerancia de las células transgénicas en dichos animales.



**Figura 4.** Representación esquemática del origen del ratón BDC2.5.

Por el contrario, dichas células transgénicas son eficientemente activadas, migran rápidamente a los nódulos linfáticos que drenan el páncreas y causan insulinitis infiltrando masivamente los islotes [35, 88]. Sin embargo no necesariamente se produce la destrucción de las células  $\beta$  y por lo tanto no se observan signos de diabetes. El desarrollo espontáneo de diabetes en ratones BDC2.5 depende de factores ambientales, por ejemplo se ha demostrado que en colonias mantenidas en condiciones libres de patógenos no se observa diabetes, mientras que en colonias mantenidas en condiciones regulares los ratones desarrollan enfermedad [89].

El ratón BDC2.5 representa una simplificación y una exageración del ratón NOD ya que expresa un reducido repertorio de células T CD4+ pero a la vez dichas células son específicas de un antígeno pancreático que hasta el presente permanece desconocido (Figura 3). El ratón BDC2.5 ha sido extensamente usado en el estudio de diabetes y hasta el presente diferentes grupos han intentado identificar el o los antígeno/s reconocido/s por las células T CD4+ ya que no solo podría relevarse un nuevo autoantígeno en la patología de diabetes sino que además permitiría el estudio *in vivo* de los mecanismos involucrados en el desencadenamiento y control de la enfermedad.

## **1.4 TERAPÉUTICA DE LA ENFERMEDAD**

Una característica fundamental del sistema inmunitario es la habilidad de discriminar entre los antígenos propios y ajenos. Sin esta habilidad, los tejidos son atacados y se inicia un proceso de autoinmunidad. La incidencia de diabetes mellitus de tipo 1 está aumentando en los países desarrollados y, aunque los pacientes pueden vivir mediante el suministro de insulina exógena, este tratamiento da lugar a nefro-, neuro- y retino-patologías en estos individuos. En este sentido, nuevos estudios en ratones NOD y ratas BB demostraron la eficacia de drogas antiinflamatorias ó agentes inmunosupresivos para el tratamiento de la enfermedad. Sin embargo, estas drogas poseen varios efectos secundarios y al no ser específicas comprometen la habilidad del paciente de resistir infecciones oportunistas. El tratamiento ideal de esta enfermedad consistiría en eliminar sólo las células patogénicas manteniendo la integridad del resto del sistema inmune y fisiológico del organismo.

### **1.4.1 USO DE ANTICUERPOS PARA ALIVIAR Y SUPRIMIR DIABETES AUTOINMUNE**

El principal objetivo de una terapia con anticuerpos en el tratamiento de diabetes mellitus sería restaurar tolerancia a los autoantígenos involucrados en la activación de la respuesta autoinmune. Un paso fundamental en este objetivo es la identificación de los clones celulares T que causan la enfermedad. De esta manera se podrían diseñar anticuerpos específicamente dirigidos contra los receptores T de los linfocitos involucrados. Alternativamente, los anticuerpos podrían ser dirigidos contra las moléculas MHC de clase I o II responsables de la presentación de los autoantígenos.

Se ha reportado en varios trabajos que el tratamiento temprano de ratones NOD recién nacidos o pre-diabéticos con anticuerpos monoclonales previene el desencadenamiento espontáneo de la enfermedad [20, 90, 91]. En algunos de los casos la terapia con anticuerpos también fue eficaz para tratar formas muy dañinas de la enfermedad como por ejemplo las causadas mediante la transferencia de células patogénicas en recipientes sanos [92] ó mediante el tratamiento con ciclofosfamida [93].

Los anticuerpos más eficaces resultan aquellos que reconocen los receptores involucrados en el reconocimiento de los autoantígenos. Por ejemplo, anticuerpos anti-MHC y anti-TCR ó anticuerpos específicos contra los receptores que participan en la transducción de moléculas coestimuladoras. En resumen los anticuerpos reportados hasta ahora con mejores efectos en la terapia de DM son: anti-MHC clase II [94], anti-TCR $\alpha\beta$  [95], anti-CD3 [90], anti-CD4 y anti-CD8 [20, 92, 93] y anti-CD40L [96].

#### **1.4.2 MODULACIÓN DEL PERFIL DE CITOQUINAS EXPRESADO POR LAS CÉLULAS T PATOGENICAS COMO ESTRATEGIA PARA SUPRIMIR DIABETES AUTOINMUNE.**

Como se ha mencionado anteriormente (sección 1.1.2), si bien todavía existe cierta controversia sobre el tema, se ha acumulado importante evidencia que sugiere que las células T CD4+ de tipo 1 están asociadas a la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas. El objetivo fundamental del uso de la modulación del perfil de citoquinas expresado por las células T patogénicas como tratamiento de la enfermedad diabetes mellitus radica en desviar una respuesta autoinmune patogénica en una respuesta inocua para el organismo. Esta estrategia esta basada en la observación experimental que muestra que la tolerancia a los antígenos involucrados en el proceso de autoinmunidad no siempre depende de la completa ausencia de respuesta celular sino que se puede alcanzar mediante la presencia de células T que expresan un determinado perfil de citoquinas capaz de suprimir la respuesta patogénica de las células involucradas en el proceso de enfermedad [97].

Existen dos maneras principales de desviar la expresión de citoquinas de las células T. La primera es alterar el conjunto de citoquinas presentes en el sitio específico donde ocurre la respuesta autoinmune, o sea el páncreas. La segunda es modular la respuesta mediante el uso de determinados péptidos específicos capaces de producir un cambio en el perfil de citoquinas expresado por las células T patogénicas involucradas.

Si bien este método de tratamiento tiene varias ventajas como por ejemplo no tener la necesidad de conocer necesariamente la identidad del autoantígeno, su aplicación en diabetes mellitus tiene resultados discordantes. El descubrimiento de nuevos antígenos y ligandos específicos, junto con la aplicación de diferentes clones involucrados en la enfermedad son necesarios para poder ayudar a clarificar este paradigma.

#### **1.4.3 EL SUMINISTRO CONTROLADO DE LOS ANTÍGENOS INVOLUCRADOS EN LA PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD COMO ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO DE DIABETES AUTOINMUNE.**

El estado de " tolerancia fisiológica" en el organismo se refiere al estado que se encuentra en individuos sanos en el cual el sistema inmune no aumenta respuestas destructivas contra antígenos propios. Por mucho tiempo se creyó que los individuos sanos no desarrollaban enfermedades autoinmunes debido a la eliminación completa de todos los linfocitos B y T en el momento de su diferenciación en los órganos linfoides centrales, es decir, la médula osea y el timo (delección clonal

central) [97]. Existe ahora prueba consistente, especialmente a través de estudios con animales transgénicos, que el proceso de deleción clonal central de linfocitos B y T es uno de los principales mecanismos de eliminación de células autorreactivas que poseen alta afinidad por el antígeno. Sin embargo, resulta también evidente que dicho proceso esta lejos de ser completamente efectivo ya que sólo elimina células de alta afinidad antigénica y que por lo tanto, células de generalmente baja afinidad, que reconocen antígenos "propios", podrían escapar dicha selección y circular en la periferia. Por ejemplo, en el caso de diabetes mellitus de tipo 1, pacientes que sufren esta enfermedad poseen células T específicas reactivas contra antígenos pancreáticos. La eliminación de estas células autorreactivas constituye un objetivo obvio para controlar la enfermedad.

Una manera de eliminar la función de las células involucradas en la patología de DM es llevarlas a un estado de "tolerancia" mediante la selectiva presentación del antígeno. Esto se debe a que las células T que circulan en la periferia y no han visto antígeno durante el desarrollo, pueden responder de diferentes maneras: pueden ser activadas y ejercer eficientemente su función ó, por el contrario, pueden ser llevadas a un estado de tolerancia en el cual su función es selectivamente eliminada. Los mecanismos precisos por los cuales la función de las células es eliminada todavía no están claramente entendidos pero varios estudios han demostrado que estos incluyen depleción [98, 99] y anergia [100-102]. Otro mecanismo propuesto fue la inducción de células denominadas "regulatorias" las cuales pueden interferir específicamente con la función de las células efectoras [103-107].

Varios estudios han demostrado que el tratamiento de ratones jóvenes NOD con islotes pancreáticos, así como con los antígenos GAD65, insulina o péptidos derivados de estos puede tolerizar las células T específicas contra estos antígenos y prevenir el desarrollo espontáneo de diabetes [47, 65, 108-110]. Los protocolos que han sido exitosamente usados incluyen la inyección intratímica, intravenosa, oral o subcutánea del antígeno disuelto en la forma incompleta del ayuvante de Freund (IFA) del antígeno elegido.

Basado en el éxito de estos experimentos realizados en modelos animales se iniciaron pruebas piloto en humanos para prevenir DM. La fase inicial de la prueba piloto denominada "Diabetes Prevention Trial-1 (DPT-1)" se basó en el uso de insulina como agente tolerogénico. Los resultados de este protocolo mostraron que la aplicación de insulina intravenosa en los individuos ni retardó ni previno el desarrollo de diabetes mellitus de tipo 1 (ver [http://www.childrenwithdiabetes.com/d\\_Oj\\_11b.htm](http://www.childrenwithdiabetes.com/d_Oj_11b.htm)). Es posible que la falla de este protocolo en prevenir diabetes se deba a que no se haya elegido la dosis



óptima de insulina. Actualmente se encuentran en desarrollo las otras dos partes del protocolo en la cual los individuos reciben insulina en forma oral ó GAD65 como antígeno.

Sin embargo, en general, DM es una enfermedad que se detecta una vez que el páncreas se encuentra considerablemente dañado ó ciertas funciones normales del organismo se ven afectadas. Por lo tanto si bien resulta claramente importante la prevención de la enfermedad, hoy en día resulta primordial poder encontrar un tratamiento para controlar a los pacientes en los cuales la enfermedad ya se ha manifestado. En este sentido se ha puesto mucho interés en el desarrollo de un tratamiento basado en la inducción de tolerancia de las células activas patogénicas mediante la presentación controlada de antígeno. Varios estudios han demostrado que la tolerancia de las células patogénicas específicas puede ser alcanzada por ejemplo mediante la inyección en ratones con altas o bajas dosis del antígeno específico en forma soluble [111-113]. En otros estudios se ha demostrado que un rápido estado de tolerancia puede ser alcanzado mediante la administración del antígeno en forma oral [114-116]. En conjunto, todos estos estudios determinan una fuerte base racional para la aplicación del uso de antígenos en el tratamiento de pacientes que sufren diabetes mellitus de tipo 1.

## **1.5 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS AUTOANTÍGENOS**

Uno de los principales focos de investigación de varios grupos en el campo de DM ha sido el descubrimiento de los antígenos implicados en la patología de la enfermedad, los denominados autoantígenos. Los más estudiados han sido dos antígenos pancreáticos, GAD65 e insulina. Tanto en humanos como en ratones NOD se encuentran durante el proceso de enfermedad respuestas tempranas a estos antígenos.

El descubrimiento de nuevos autoantígenos resulta un paso imprescindible para entender el proceso de entendimiento de las causas que dan lugar al desencadenamiento de la enfermedad. Además, como se ha explicado en la sección anterior, los antígenos son excelentes candidatos para modular el curso de la enfermedad en patologías mediadas por células T, como diabetes mellitus de tipo 1.

### **1.5.1 SISTEMAS EXPERIMENTALES**

Con el avance en el estudio de la unión de péptidos al MHC fue posible definir los requerimientos de un determinado péptido para unirse a dicho complejo [74]. Así mismo, con la aparición de nuevas técnicas en el campo de la inmunología celular se hizo posible el crecimiento y el estudio *in vitro* de clones de células T que poseen un determinado TCR y por lo tanto un específico reconocimiento

antigénico. La estrategia más comúnmente usada en el estudio del reconocimiento antigénico ha sido el reemplazo sistemático de diferentes residuos aminoacídicos en la secuencia peptídica y el posterior estudio de cómo estos cambios influyen en la capacidad de dicho péptido de causar eficiente activación de las células T. Los resultados obtenidos con estos estudios, más el conocimiento de los requerimientos necesarios para que el péptido se una al complejo MHC, permiten elucidar los residuos involucrados en el reconocimiento del TCR. La clave en estos estudios es que debe conocerse previamente un antígeno específico para el clon en estudio para luego poder diseñar los péptidos análogos. Otra estrategia también muy usada se basa en la elución y posterior secuenciación de péptidos unidos al complejo MHC. Brevemente, se eluyen los péptidos de las moléculas de MHC, se fraccionan, se definen las fracciones activas y se secuencian para identificar los péptidos reconocidos por las células T. Por último la estrategia más recientemente desarrollada ha sido el uso de bibliotecas combinatoriales de péptidos sintéticos (BCPS). Los péptidos sintéticos han sido una herramienta esencial en la biomedicina y en la química farmacéutica de las últimas décadas. La creciente demanda y los progresos realizados en química sintética han impulsado el desarrollo de métodos que permiten generar millones de péptidos de manera rápida y sencilla, para su posterior evaluación biológica. BCPS están compuestas de mezclas complejas de péptidos que poseen determinadas posiciones definidas y otras variables. Una de las bibliotecas más usadas en la búsqueda de antígenos específicos para un determinado clon celular es aquella que posee mezclas en las que los péptidos sólo tienen una posición definida y las otras todas variables. Dichas bibliotecas son denominadas BCPS-FP, bibliotecas combinatoriales de péptidos sintéticos organizadas en formato posicional. El uso de dichas bibliotecas ha permitido por ejemplo la identificación de compuestos activos para el receptor de opiodes [75, 76] así como también encontrar inhibidores de la actividad en determinadas enzimas [77, 78]. En el campo de la inmunología, la técnica fue usada por primera vez para la identificación de epitopes provenientes de proteínas naturales que sean capaces de unirse a dos diferentes anticuerpos monoclonales [79] y, ha sido extensamente usada para la identificación de ligandos específicos de clones celulares T [80-86].

Dado que esta técnica fue extensamente usada en nuestro trabajo, en la sección Materiales y Métodos se describe detalladamente la síntesis e interpretación del uso de estas complejas bibliotecas peptídicas.

1. Harris, M.I., Flegal, K.M., Cowie, C.C., Eberhardt, M.S., Goldstein, D.E., Little, R.R., Wiedmeyer, H.M., and Byrd-Holt, D.D. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 1998; 21:518-24.
2. Olivera, E.M., Duhalde, E.P., and Gagliardino, J.J. Costs of temporary and permanent disability induced by diabetes. *Diabetes Care* 1991; 14:593-6.
3. Mathis, D., Vence, L., and Benoist, C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001; 414:792-8.
4. Notkins, A.L.a.J.W.Y. Virus-induced diabetes mellitus. *A.L Notkins and M.B.A Oldstone (ed.), Concepts in Viral Pathogenesis. Springer-Verlag, New York, N.Y. 1984.*
5. Rose, N.R. and Mackay, I.R. Molecular mimicry: a critical look at exemplary instances in human diseases. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:542-51.
6. Horwitz, M.S. and Sarvetnick, N. Viruses, host responses, and autoimmunity. *Immunol Rev* 1999; 169:241-53.
7. Atkinson, M.A., Bowman, M.A., Campbell, L., Darrow, B.L., Kaufman, D.L., and Maclaren, N.K. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1994; 94:2125-9.
8. Zimmet, P.Z., Tuomi, T., Mackay, I.R., Rowley, M.J., Knowles, W., Cohen, M., and Lang, D.A. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med* 1994; 11:299-303.
9. Nepom, G.T. and Erlich, H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:493-525.
10. Todd, J.A. From genome to aetiology in a multifactorial disease, type 1 diabetes. *Bioessays* 1999; 21:164-74.
11. Lee, K.H., Wucherpfennig, K.W., and Wiley, D.C. Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2001; 2:501-7.

12. Yu, B., Gauthier, L., Hausmann, D.H., and Wucherpfennig, K.W. Binding of conserved islet peptides by human and murine MHC class II molecules associated with susceptibility to type I diabetes. *Eur J Immunol* 2000; 30:2497-506.
13. Foulis, A.K. and Stewart, J.A. The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. *Diabetologia* 1984; 26:456-61.
14. Gepts, W. and Lecompte, P.M. The pancreatic islets in diabetes. *Am J Med* 1981; 70:105-15.
15. Tisch, R. and McDevitt, H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996; 85:291-7.
16. Makino, S., Harada, M., Kishimoto, Y., and Hayashi, Y. Absence of insulinitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background. *Jikken Dobutsu* 1986; 35:495-8.
17. Dardenne, M., Lepault, F., Bendelac, A., and Bach, J.F. Acceleration of the onset of diabetes in NOD mice by thymectomy at weaning. *Eur J Immunol* 1989; 19:889-95.
18. Harada, M. and Makino, S. Suppression of overt diabetes in NOD mice by anti-thymocyte serum or anti-Thy 1, 2 antibody. *Jikken Dobutsu* 1986; 35:501-4.
19. Koike, T., Itoh, Y., Ishii, T., Ito, I., Takabayashi, K., Maruyama, N., Tomioka, H., and Yoshida, S. Preventive effect of monoclonal anti-L3T4 antibody on development of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1987; 36:539-41.
20. Shizuru, J.A., Taylor-Edwards, C., Banks, B.A., Gregory, A.K., and Fathman, C.G. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science* 1988; 240:659-62.
21. Roep, B.O. Standardization of T-cell assays in type 1 diabetes. Immunology of Diabetes society T-cell Committee [letter]. *Diabetologia* 1999; 42:636-637.
22. Bendelac, A., Carnaud, C., Boitard, C., and Bach, J.F. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med* 1987; 166:823-32.

23. Miller, B.J., Appel, M.C., O'Neil, J.J., and Wicker, L.S. Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1988; 140:52-8.
24. Haskins, K., Portas, M., Bergman, B., Lafferty, K., and Bradley, B. Pancreatic islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:8000-4.
25. Nakano, N., Kikutani, H., Nishimoto, H., and Kishimoto, T. T cell receptor V gene usage of islet beta cell-reactive T cells is not restricted in non-obese diabetic mice. *J Exp Med* 1991; 173:1091-7.
26. Pankewycz, O., Strom, T.B., and Rubin-Kelley, V.E. Islet-infiltrating T cell clones from non-obese diabetic mice that promote or prevent accelerated onset diabetes. *Eur J Immunol* 1991; 21:873-9.
27. Yagi, H., Matsumoto, M., Kunimoto, K., Kawaguchi, J., Makino, S., and Harada, M. Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *Eur J Immunol* 1992; 22:2387-93.
28. Bradley, B.J., Haskins, K., La Rosa, F.G., and Lafferty, K.J. CD8 T cells are not required for islet destruction induced by a CD4+ islet-specific T-cell clone. *Diabetes* 1992; 41:1603-8.
29. Prange, S., Zucker, P., Jevnikar, A.M., and Singh, B. Transplanted MHC class I-deficient nonobese diabetic mouse islets are protected from autoimmune injury in diabetic nonobese recipients. *Transplantation* 2001; 71:982-5.
30. Graser, R.T., DiLorenzo, T.P., Wang, F., Christianson, G.J., Chapman, H.D., Roopenian, D.C., Nathanson, S.G., and Serreze, D.V. Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. *J Immunol* 2000; 164:3913-8.
31. Serreze, D.V., Chapman, H.D., Varnum, D.S., Gerling, I., Leiter, E.H., and Shultz, L.D. Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I- dependent. *J Immunol* 1997; 158:3978-86.
32. Wicker, L.S., Leiter, E.H., Todd, J.A., Renjilian, R.J., Peterson, E., Fischer, P.A., Podolin, P.L., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Peterson, L.B. Beta 2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes* 1994; 43:500-4.

33. Wong, F.S., Karttunen, J., Dumont, C., Wen, L., Visintin, I., Pilip, I.M., Shastri, N., Pamer, E.G., and Janeway, C.A., Jr. Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med* 1999; 5:1026-31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531111>
34. Wong, F.S., Visintin, I., Wen, L., Flavell, R.A., and Janeway, C.A., Jr. CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. *J Exp Med* 1996; 183:67-76.
35. Katz, J.D., Wang, B., Haskins, K., Benoist, C., and Mathis, D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993; 74:1089-100.
36. Haskins, K. and Wegmann, D. Diabetogenic T-cell clones. *Diabetes* 1996; 45:1299-305.
37. Haskins, K. and McDuffie, M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 1990; 249:1433-6.
38. Haskins, K., Portas, M., Bradley, B., Wegmann, D., and Lafferty, K. T-lymphocyte clone specific for pancreatic islet antigen. *Diabetes* 1988; 37:1444-8.
39. Bradley, B.J., Wang, Y.Y., Lafferty, K.J., and Haskins, K. In vivo activity of an islet-reactive T-cell clone. *J Autoimmun* 1990; 3:449-56.
40. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Sorensen, O., Bleackley, R.C., and Power, R.F. IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1995; 154:4874-82.
41. Calcinaro F., S.N., Bradley B.J., Lafferty K.J. The role of Th1 and Th2 cells in type 1 diabetes. *diabetes Prevention and Therapy* 1994; 8:1-2.
42. Mueller, R., Krahl, T., and Sarvetnick, N. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 1996; 184:1093-9.
43. Poulin, M. and Haskins, K. Induction of diabetes in nonobese diabetic mice by Th2 T cell clones from a TCR transgenic mouse. *J Immunol* 2000; 164:3072-8.

44. Bradley, L.M., Asensio, V.C., Schioetz, L.K., Harbertson, J., Krahl, T., Patstone, G., Woolf, N., Campbell, I.L., and Sarvetnick, N. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* 1999; 162:2511-20.
45. Serreze, D.V., Fleming, S.A., Chapman, H.D., Richard, S.D., Leiter, E.H., and Tisch, R.M. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1998; 161:3912-8.
46. Bergman, B. and Haskins, K. Islet-specific T-cell clones from the NOD mouse respond to beta-granule antigen. *Diabetes* 1994; 43:197-203.
47. Daniel, D. and Wegmann, D.R. Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:956-60.
48. Zekzer, D., Wong, F.S., Ayalon, O., Millet, I., Altieri, M., Shintani, S., Solimera, M., and Sherwin, R.S. GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J Clin Invest* 1998; 101:68-73.
49. Elias, D., Markovits, D., Reshef, T., van der Zee, R., and Cohen, I.R. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:1576-80.
50. Kaufman, D.L., Clare-Salzler, M., Tian, J., Forsthuber, T., Ting, G.S., Robinson, P., Atkinson, M.A., Sercarz, E.E., Tobin, A.J., and Lehmann, P.V. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 1993; 366:69-72.
51. Tisch, R., Yang, X.D., Singer, S.M., Liblau, R.S., Fugger, L., and McDevitt, H.O. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 1993; 366:72-5.
52. Tian, J., Atkinson, M.A., Clare-Salzler, M., Herschenfeld, A., Forsthuber, T., Lehmann, P.V., and Kaufman, D.L. Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996; 183:1561-7.

53. Cetkovic-Cvrlje, M., Gerling, I.C., Muir, A., Atkinson, M.A., Elliot, J.F., and Leiter, E.H. Retardation or acceleration of diabetes in NOD/Lt mice mediated by intrathymic administration of candidate beta-cell antigens. *Diabetes* 1997; 46:1975-82.
54. Yoon, J.W., Yoon, C.S., Lim, H.W., Huang, Q.Q., Kang, Y., Pyun, K.H., Hirasawa, K., Sherwin, R.S., and Jun, H.S. Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science* 1999; 284:1183-7.
55. Baekkeskov, S., Nielsen, J.H., Marnier, B., Bilde, T., Ludvigsson, J., and Lernmark, A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature* 1982; 298:167-9.
56. Baekkeskov, S., Aanstoot, H.J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H., DeCamilli, P., and Camilli, P.D. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature* 1990; 347:151-6.
57. Velloso, L.A., Kampe, O., Hallberg, A., Christmanson, L., Betsholtz, C., and Karlsson, F.A. Demonstration of GAD-65 as the main immunogenic isoform of glutamate decarboxylase in type 1 diabetes and determination of autoantibodies using a radioligand produced by eukaryotic expression. *J Clin Invest* 1993; 91:2084-90.
58. Hagopian, W.A., Michelsen, B., Karlsen, A.E., Larsen, F., Moody, A., Grubin, C.E., Rowe, R., Petersen, J., McEvoy, R., and Lernmark, A. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65,000-M(r) rather than the 67,000-M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. *Diabetes* 1993; 42:631-6.
59. Lohmann, T., Leslie, R.D., Hawa, M., Geysen, M., Rodda, S., and Londei, M. Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1994; 343:1607-8.
60. Atkinson, M.A., Kaufman, D.L., Campbell, L., Gibbs, K.A., Shah, S.C., Bu, D.F., Erlander, M.G., Tobin, A.J., and Maclaren, N.K. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1992; 339:458-9.



61. Honeyman, M.C., Cram, D.S., and Harrison, L.C. Glutamic acid decarboxylase 67-reactive T cells: a marker of insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1993; 177:535-40.
62. Durinovic-Bello, I., Hummel, M., and Ziegler, A.G. Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes* 1996; 45:795-800.
63. Wicker, L.S., Chen, S.L., Nepom, G.T., Elliott, J.F., Freed, D.C., Bansal, A., Zheng, S., Herman, A., Lernmark, A., Zaller, D.M., Peterson, L.B., Rothbard, J.B., Cummings, R., and Whiteley, P.J. Naturally processed T cell epitopes from human glutamic acid decarboxylase identified using mice transgenic for the type 1 diabetes-associated human MHC class II allele, DRB1\*0401. *J Clin Invest* 1996; 98:2597-603.
64. Patel, S.D., Cope, A.P., Congia, M., Chen, T.T., Kim, E., Fugger, L., Wherrett, D., and Sonderstrup-McDevitt, G. Identification of immunodominant T cell epitopes of human glutamic acid decarboxylase 65 by using HLA-DR(alpha1\*0101,beta1\*0401) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:8082-7.
65. Tian, J., Clare-Salzler, M., Herschenfeld, A., Middleton, B., Newman, D., Mueller, R., Arita, S., Evans, C., Atkinson, M.A., Mullen, Y., Sarvetnick, N., Tobin, A.J., Lehmann, P.V., and Kaufman, D.L. Modulating autoimmune responses to GAD inhibits disease progression and prolongs islet graft survival in diabetes-prone mice. *Nat Med* 1996; 2:1348-53.
66. Endl, J., Otto, H., Jung, G., Dreisbusch, B., Donie, F., Stahl, P., Elbracht, R., Schmitz, G., Meinel, E., Hummel, M., Ziegler, A.G., Wank, R., and Schendel, D.J. Identification of naturally processed T cell epitopes from glutamic acid decarboxylase presented in the context of HLA-DR alleles by T lymphocytes of recent onset IDDM patients. *J Clin Invest* 1997; 99:2405-15.
67. Bellmann, K., Kolb, H., Rastegar, S., Jee, P., and Scott, F.W. Potential risk of oral insulin with adjuvant for the prevention of Type I diabetes: a protocol effective in NOD mice may exacerbate disease in BB rats. *Diabetologia* 1998; 41:844-7.
68. McFarland, H.F. Complexities in the treatment of autoimmune disease. *Science* 1996; 274:2037-8.

69. Blanas, E., Carbone, F.R., Allison, J., Miller, J.F., and Heath, W.R. Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen. *Science* 1996; 274:1707-9.
70. Petersen, J.S., Karlsen, A.E., Markholst, H., Worsaae, A., Dyrberg, T., and Michelsen, B. Neonatal tolerization with glutamic acid decarboxylase but not with bovine serum albumin delays the onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1994; 43:1478-84.
71. Elliott, J.F., Qin, H.Y., Bhatti, S., Smith, D.K., Singh, R.K., Dillon, T., Lauzon, J., and Singh, B. Immunization with the larger isoform of mouse glutamic acid decarboxylase (GAD67) prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1994; 43:1494-9.
72. Ma, S.W., Zhao, D.L., Yin, Z.Q., Mukherjee, R., Singh, B., Qin, H.Y., Stiller, C.R., and Jevnikar, A.M. Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat Med* 1997; 3:793-6.
73. Zhang, Z.J., Davidson, L., Eisenbarth, G., and Weiner, H.L. Suppression of diabetes in nonobese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:10252-6.
74. Karounos, D.G., Bryson, J.S., and Cohen, D.A. Metabolically inactive insulin analog prevents type I diabetes in prediabetic NOD mice. *J Clin Invest* 1997; 100:1344-8.
75. Dooley, C.T., Chung, N.N., Schiller, P.W., and Houghten, R.A. Acetalins: opioid receptor antagonists determined through the use of synthetic peptide combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:10811-5.
76. Dooley, C.T. and Houghten, R.A. The use of positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries for the rapid determination of opioid receptor ligands. *Life Sci* 1993; 52:1509-17.
77. Wallace, A., Koblan, K.S., Hamilton, K., Marquis-Omer, D.J., Miller, P.J., Mosser, S.D., Omer, C.A., Schaber, M.D., Cortese, R., Oliff, A., Gibbs, J.B., and Pessi, A. Selection of potent inhibitors of farnesyl-protein transferase from a synthetic tetrapeptide combinatorial library. *J Biol Chem* 1996; 271:31306-11.
78. Eichler, J. and Houghten, R.A. Identification of substrate-analog trypsin inhibitors through the screening of synthetic peptide combinatorial libraries. *Biochemistry* 1993; 32:11035-41.

79. Pinilla, C., Appel, J.R., Blanc, P., and Houghten, R.A. Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *Biotechniques* 1992; 13:901-5.
80. Hemmer, B., Vergelli, M., Pinilla, C., Houghten, R., and Martin, R. Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. *Immunol Today* 1998; 19:163-8.
81. Hemmer, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., Martin, R., and Wiesmuller, K.H. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med* 1997; 185:1651-9.
82. Hemmer, B., Pinilla, C., Appel, J., Pascal, J., Houghten, R., and Martin, R. The use of soluble synthetic peptide combinatorial libraries to determine antigen recognition of T cells. *J Pept Res* 1998; 52:338-45.
83. Hemmer, B., Gran, B., Zhao, Y., Marques, A., Pascal, J., Tzou, A., Kondo, T., Cortese, I., Bielekova, B., Straus, S.E., McFarland, H.F., Houghten, R., Simon, R., Pinilla, C., and Martin, R. Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat Med* 1999; 5:1375-82.
84. Gundlach, B.R., Wiesmuller, K.H., Junt, T., Kienle, S., Jung, G., and Walden, P. Specificity and degeneracy of minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CTL. *J Immunol* 1996; 156:3645-51.
85. Udaka, K., Wiesmuller, K.H., Kienle, S., Jung, G., and Walden, P. Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. *J Immunol* 1996; 157:670-8.
86. Wilson, D.B., Pinilla, C., Wilson, D.H., Schroder, K., Boggiano, C., Judkowski, V., Kaye, J., Hemmer, B., Martin, R., and Houghten, R.A. Immunogenicity. I. Use of peptide libraries to identify epitopes that activate clonotypic CD4+ T cells and induce T cell responses to native peptide ligands. *J Immunol* 1999; 163:6424-34.
87. Ohashi, P.S., Oehen, S., Buerki, K., Pircher, H., Ohashi, C.T., Odermatt, B., Malissen, B., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991; 65:305-17.

88. Hoglund, P., Mintern, J., Waltzinger, C., Heath, W., Benoist, C., and Mathis, D. Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J Exp Med* 1999; 189:331-9.
89. Kurrer, M.O., Pakala, S.V., Hanson, H.L., and Katz, J.D. Beta cell apoptosis in T cell-mediated autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:213-8.
90. Hayward, A.R. and Shreiber, M. Neonatal injection of CD3 antibody into nonobese diabetic mice reduces the incidence of insulinitis and diabetes. *J Immunol* 1989; 143:1555-9.
91. Boitard, C., Bendelac, A., Richard, M.F., Carnaud, C., and Bach, J.F. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by anti-I-A monoclonal antibodies: transfer of protection by splenic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:9719-23.
92. Hutchings, P., O'Reilly, L., Parish, N.M., Waldmann, H., and Cooke, A. The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to beta cells in NOD mice. *Eur J Immunol* 1992; 22:1913-8.
93. Charlton, B., Bacelj, A., and Mandel, T.E. Administration of silica particles or anti-Lyt2 antibody prevents beta- cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. *Diabetes* 1988; 37:930-5.
94. Boitard, C., Yasunami, R., Dardenne, M., and Bach, J.F. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med* 1989; 169:1669-80.
95. Sempe, P., Bedossa, P., Richard, M.F., Villa, M.C., Bach, J.F., and Boitard, C. Anti-alpha/beta T cell receptor monoclonal antibody provides an efficient therapy for autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur J Immunol* 1991; 21:1163-9.
96. Balasa, B., Krahl, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H.O., and Sarvetnick, N. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 1997; 159:4620-7.
97. Schwartz, R. Immunological Tolerance. Paul WE (eds) *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York 1993:677-731.

98. Webb, S., Morris, C., and Sprent, J. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell* 1990; 63:1249-56.
99. Rocha, B. and von Boehmer, H. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science* 1991; 251:1225-8.
100. Rammensee, H.G., Kroschewski, R., and Frangoulis, B. Clonal anergy induced in mature V beta 6+ T lymphocytes on immunizing Mls-1b mice with Mls-1a expressing cells. *Nature* 1989; 339:541-4.
101. Kawabe, Y. and Ochi, A. Selective anergy of V beta 8+,CD4+ T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *J Exp Med* 1990; 172:1065-70.
102. Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A.M., Malissen, B., Hammerling, G.J., and Arnold, B. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 1991; 65:293-304.
103. Waldmann, H. and Cobbold, S. Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells? *Immunity* 2001; 14:399-406.
104. Roncarolo, M.G. and Levings, M.K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:676-83.
105. Godfrey, D.I., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J., and Baxter, A.G. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; 21:573-83.
106. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* 2000; 101:455-8.
107. Groux, H. and Powrie, F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol Today* 1999; 20:442-5. 00001510 00001510.
108. Atkinson, M.A., Maclaren, N.K., and Luchetta, R. Insulinitis and diabetes in NOD mice reduced by prophylactic insulin therapy. *Diabetes* 1990; 39:933-7.

109. Tisch, R., Wang, B., and Serreze, D.V. Induction of glutamic acid decarboxylase 65-specific Th2 cells and suppression of autoimmune diabetes at late stages of disease is epitope dependent. *J Immunol* 1999; 163:1178-87.
110. Hutchings, P. and Cooke, A. Protection from insulin dependent diabetes mellitus afforded by insulin antigens in incomplete Freund's adjuvant depends on route of administration. *J Autoimmun* 1998; 11:127-30.
111. Mondino, A., Khoruts, A., and Jenkins, M.K. The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:2245-52.
112. Critchfield, J.M., Racke, M.K., Zuniga-Pflucker, J.C., Cannella, B., Raine, C.S., Goverman, J., and Lenardo, M.J. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 263:1139-43.
113. Romball, C.G. and Weigle, W.O. In vivo induction of tolerance in murine CD4+ cell subsets. *J Exp Med* 1993; 178:1637-44.
114. Weiner, H.L., Friedman, A., Miller, A., Khoury, S.J., al-Sabbagh, A., Santos, L., Sayegh, M., Nussenblatt, R.B., Trentham, D.E., and Hafler, D.A. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:809-37.
115. Weiner, H.L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 1997; 18:335-43.
116. Gutgemann, I., Fahrner, A.M., Altman, J.D., Davis, M.M., and Chien, Y.H. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity* 1998; 8:667-73.

## **OBJETIVOS**

## 1. OBJETIVOS

El objetivo de la presente Tesis ha consistido en la identificación de ligandos específicos de las células diabetogénicas del ratón transgénico BDC2.5. La identificación de los autoantígenos asociados al proceso autoinmune característico de diabetes mellitus del tipo 1 tiene marcada importancia. Por un lado, una determinación temprana de la presencia de anticuerpos dirigidos contra estos epitopes podría ser usada como marcador predictivo del proceso de enfermedad. Por otro lado, el posible uso de estos péptidos en modelos animales permitiría un mayor entendimiento de los mecanismos involucrados en la específica activación de las células patogénicas y, por último, una vez la enfermedad se ha establecido, dichos péptidos constituyen potenciales inmuno-moduladores del curso de la enfermedad. En el presente estudio se ha priorizado analizar la posible aplicación de los péptidos encontrados en el tratamiento de la enfermedad. Así pues, el objetivo principal de la presente tesis puede desglosarse en los dos siguientes:

- 1 Identificación de ligandos específicos capaces de estimular células diabetogénicas del ratón transgénico BDC2.5 mediante el uso de librerías peptídicas combinatoriales.
- 2 Evaluación *in vivo* en ratones NOD y ratones transgénicos BDC2.5 del posible uso de los ligandos identificados como moduladores del proceso patogénico desencadenado durante el curso de diabetes mellitus del tipo 1.



## MATERIALES Y MÉTODOS

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. ANIMALES**

Los ratones NOD, NOD.scid y los transgénicos NOD.BDC2.5 fueron obtenidos de la colonia de ratones situada en "The Scripps Research Institute", San Diego, California. La generación de los ratones transgénicos NOD.BDC2.5 fue descrita por Katz et al [1]. Los ratones NOD.BDC2.5 fueron donados generosamente por la Dra. Diane Mathis y el Dr. Christopher Benoist (ISERM, Francia). Estos ratones fueron cruzados por varias generaciones con ratones NOD. Así mismo, estos ratones fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos previo y durante el desarrollo de los experimentos. Los ratones NOD.BDC2.5 provenientes de nuestra colonia no desarrollan diabetes mellitus de tipo 1 pero desarrollan insulinitis acompañada por la presencia de células T específicas contra los islotes del páncreas [2].

### **2. BIBLIOTECAS PEPTÍDICAS Y PÉPTIDOS**

Las librerías PS-SCL 97-4, N66 y N37 fueron preparadas en "Mixture Sciences, Inc.", San Diego, California y los péptidos fueron sintetizados en el "Torrey Pines Institute for Molecular Studies", San Diego, California. Tanto los péptidos como las mezclas fueron sintetizadas mediante la aplicación del método de "síntesis en bolsa de té" descrito por Houghten et al (ver Anexo).

### **3. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN**

Células del bazo de ratones NOD.BDC2.5 ( 6-8 semanas de edad) ó ratones NOD ( 9-11 semanas de edad) fueron depletadas de glóbulos rojos y cultivadas (200-300  $10^3$  células por pocillo), en placas de Elisa de 96 pocillos, con medio normalmente usado para células T\*. Las mezclas de la librería PS-PCL 97-4 se agregaron a una concentración final de 100 ug/ml. Las mezclas de las librerías N66 y N37 y, los péptidos individuales, fueron ensayados en curvas de diluciones consecutivas 1/2. Luego de 48 horas en incubador se agregaron 0.5uCi [H3]Tdr (6.7 Ci mM) en todos los pocillos. Luego de una noche y sin dejar los cultivos más de 18 horas con el [H3]Tdr se midió la radioactividad incorporada mediante conteo de centelleo.

\* Medio para células T: RPMI 1640 (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA) suplementado con 8% FCS (J.R. Scientific, Woodland, CA), HEPES (10 mM; Sigma, St. Louis, MO), 2-Mercapto-etanol (50 uM 2-M; Bio-Rad, Richmond, CA), penicilina-streptomina (5 U/ml y 50 ug/ml respectivamente; BioWhittaker, Walkersville, MD), y glutamina (2 mM; Sigma).

#### **4. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE EC<sub>50</sub> DE LAS MEZCLAS Y LOS PÉPTIDOS**

Las mezclas de las librerías N66 y N37, y los péptidos individuales, fueron ensayados en curvas de diluciones consecutivas 1/2 en las condiciones descritas anteriormente. La concentración que causa la mitad de la máxima respuesta proliferativa (EC<sub>50</sub>) fue calculada para cada mezcla o péptido en cada experimento mediante el programa GraphPad Prism (Graph Pad software, San Diego, CA). La máxima respuesta proliferativa de cada experimento fue calculada como la media de los valores más altos obtenidos en dicho experimento.

#### **5. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS**

Células del bazo de ratones NOD.BDC2.5 ( 6-8 semanas de edad) fueron depletadas de glóbulos rojos y cultivadas (200-300 10<sup>3</sup> células por pocillo), en placas de Elisa de 96 pocillos, con el medio normalmente usado para células T descrito anteriormente. Luego de 24 ó 48 horas se recogieron los sobrenadantes y se ensayó la presencia de las diferentes citoquinas mediante la aplicación exacta del método propuesto por O'Connor et al [3]. Brevemente, se incubaron placas de ELISA de 96 pocillos (Nunc ELISA MaxiSorp microwell plates, Fisher Scientific, Santa Clara, CA, USA) con los anticuerpos anti-interleuquina 2 (IL-2), anti-interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ó anti-interleuquina 4 (IL-4) (PharMingen, La Jolla, CA, USA) por una noche. Se lavaron las placas tres veces con solución de lavado (0.05% polyoxyetileno-sorbitan monolaurato (Tween 20, Sigma) en solución salina). Se bloquearon las placas por 4 horas a temperatura ambiente con solución de bloqueo (1% Albúmina de suero de bovino (Grade V, Sigma), 0,05% Tween 20 y 10% suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) en solución salina. Se lavaron las placas tres veces con solución de lavado. Se colocaron las diluciones seriales controles de cada una de las citoquinas disueltas en una solución 10% suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) en RPMI 1640 (Gibco BRL) y los sobrenadantes de las muestras correspondientes. Se cubrieron las placas y se las dejó incubando a 4°C por una noche. Se lavaron las placas tres veces con solución de lavado. Se agregaron 50 $\mu$ l del anticuerpo biotinilado correspondiente para cada una de las citoquinas y se incubaron las placas por dos horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces con solución de lavado. Se agregaron 50 $\mu$ l del anticuerpo específico biotin-avidin y se incubaron las placas por una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces con solución de lavado. Se agregaron 75 $\mu$ l extravidin-peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO, USA) en cada pocillo y se incubaron las placas por una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las placas tres veces con solución de lavado. Se agregaron 100 ul de los sustratos OPD (Sigma, St. Louis, MO, USA) y UPO

(Sigma, St. Louis, MO, USA). Se incubaron las placas por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se leyeron en un lector de placas a 490nm (Sunnyvale, CA, USA).

## 6. INMUNIZACIONES

En las inmunizaciones por vía intravenosa se usó el péptido (200µg) disuelto en solución salina con ó sin el agregado de ODNs (30 µg) (Operon Technologies, Alameda, CA, USA) disuelto en solución salina. El volumen final inyectado fue de 300µl / ratón. En las inmunizaciones por vía subcutánea se usó el péptido (50ug) disuelto en solución salina combinado con ODNs (30 µg) ó LPS (20 µg) (Difco, Detroit, MI, USA) ambos disueltos en solución salina. El péptido junto con el adyuvante se mezclaron 1:1 con IFA (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Los ratones recibieron dos inmunizaciones en la planta del pie de un volumen de 50 µl/ inmunización. En estos experimentos se usaron grupos de tres ratones por grupo. Los ratones fueron elegidos siempre dentro de la misma edad y sexo.

## 7. MODELO DE TRANSFERENCIA DE DIABETES

Células del bazo de ratones machos NOD.BDC2.5 ( 6-8 semanas de edad) fueron cultivadas ( $6 \times 10^6$  células por pocillo) con el péptido p63-1040 (0,5 µg/ml) en placas de cultivo de 6 pocillos, con 3 ml del medio normalmente usado para células T descrito anteriormente por pocillo. Luego de 72 horas las células fueron lavadas dos veces en solución HANKS (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA ) y puestas a una concentración de 30 millones de células por 300 ul de PBS para ser inyectadas intravenosamente en ratones machos NOD recipientes (6-8 semanas de edad). Luego de una semana se midió el valor de glucosa en la sangre de la cola de los ratones NOD recipientes. Un valor igual o mayor a 300mg/dl se tomó como indicativo de diabetes.

## 8. CITOMETRÍA DE FLUJO

En todos los experimentos analizados por citometría de flujo las células a analizar (eventos dentro de rectángulos) fueron seleccionadas de la siguiente manera: primero, en función de sus propiedades de tamaño y granularidad (gráficos mostrados ocasionalmente en el trabajo) y luego en función de area de fluorescencia (gráficos presentados en el trabajo). Todos las muestras de todos los experimentos fueron realizados en un citómetro de flujo de 4 colores (Becton Dickinson).

### 8.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN *IN VIVO* DE LOS LINFOCITOS T CD4(+) DE RATONES BDC2.5

Ratones BDC2.5 fueron inmunizados en la planta del pie, un día más tarde fueron sacrificados y los nódulos linfáticos que drenan el área de inmunización fueron procesados para analizar la presencia

de células T activadas. Dado que en estos ratones todos los linfocitos T CD4 expresan el haplotipo V $\beta$ 4 de la cadena  $\beta$  del receptor celular T, fue posible usar indistintamente un anticuerpo anti-CD4 o un anticuerpo anti-V $\beta$ 4 para analizar la población de células T CD4(+). Las células fueron lavadas una vez en solución salina y luego lavadas en solución de tinte 0,02% azida/ 0,1 % BSA (Sigma, St. Louis, MO, USA) disuelto en PBS (pH=7.4). Se tiñeron 0,5 millones de células de cada muestra con el anticuerpo anti-V $\beta$ 4 conjugado con isotiocianal-fluoresceína (FITC) y el anticuerpo anti-CD25 conjugado con ficoeritrina (PE) durante media hora a 4°C. Se lavaron las muestras con 3 ml de solución de tinte y se fijaron en una solución 1% paraformaldehído disuelto en PBS para su posterior análisis.

## **8.2 ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS APOPTÓTICAS EN LINFOCITOS T CD4(+) LUEGO DE LA INMUNIZACIÓN IN VIVO CON LIGANDOS DE DIFERENTE AFINIDAD**

Ratones BDC2.5 fueron inmunizados en la planta del pie, un día más tarde fueron sacrificados y los nódulos linfáticos que drenan el área de inmunización fueron procesados para estudiar el porcentaje de células T BDC2.5 apoptóticas. Las células fueron lavadas una vez en solución salina y luego lavadas en solución de tinte. Se tiñeron 1 millón de células de cada muestra con el anticuerpo anti-V $\beta$ 4 conjugado con FITC y el anticuerpo anti-CD25 conjugado con alofocianina (APC) durante media hora a 4°C. Se lavaron las muestras en solución de tinte y se procedió al tinte con Annexin-V conjugado con PE (PharMingen, La Jolla, CA, USA) y 7-AAD (PharMingen, La Jolla, CA, USA) siguiendo exactamente las instrucciones propuestas por el fabricante. Las mezclas se analizaron de la siguiente manera: primero, se seleccionaron por la presencia del marcador V $\beta$ 4 y ausencia de 7-AAD, es decir células vivas T CD4(+). Con esta selección de células se procedió a graficar un histograma para representar el porcentaje de Annexin-V. Para determinar la presencia del marcador CD25 en las células apoptóticas se realizó un gráfico CD25 vs. Annexin-V de la selección de células recién mencionada.

## **8.3 DETECCIÓN DE CÉLULAS T CD4(+)V $\beta$ 4(+) Y CD4(+) (DIMER P63-1040)(+) EN RATONES NOD USADOS EN EL MODELO DE TRANSFERENCIA DE DIABETES**

Se sacrificaron los ratones NOD entre 7 y 10 días luego de recibir las células patogénicas BDC2.5. Se procesaron los nódulos pancreáticos hasta tener la células en una suspensión homogénea. Las células fueron lavadas una vez en PBS y luego lavadas en solución de tinte. Se separaron dos muestras por ratón cada una de las cuales con 0.5 millones de células. Se tiñó una de las muestras con el anticuerpo anti-V $\beta$ 4 conjugado con FITC y el anticuerpo anti-CD4 conjugado con phycoerytrina (PE) durante media hora a 4°C. Se lavaron las muestras con 3 ml de solución de tinte y se fijaron en una solución 1% paraformaldehído disuelto en PBS para su posterior análisis. La segunda muestra se tiñó

con el dimer p63-1040 conjugado con FITC por una hora a 4°C. En los últimos 20 minutos de incubación con el dimer se agregó el anticuerpo anti-CD4 conjugado con phycoerytrina (PE). Se lavaron las muestras con 3 ml de solución de tinte y se fijaron en una solución 1% paraformaldehído disuelto en PBS para su posterior análisis. Las dos series de mezclas se analizaron de la siguiente manera: primero, se seleccionaron por la presencia del marcador CD4. Con esta selección de células se procedió a graficar un histograma para representar la presencia en éstas células del marcador V $\beta$ 4 ó dimer p63-1040 depende el caso.

## **9. HISTOLOGÍA E INMUNO-HISTOQUÍMICA**

Se sacrificaron los ratones NOD entre 7 y 10 días luego de recibir las células patogénicas BDC2.5. Se extrajeron los páncreas y se los fijó una noche en solución 10% paraformaldehído disuelto en PBS y fueron embebidos en parafina. Se cortaron secciones de 5 $\mu$ m y fueron teñidas con hematoxilina-eosina mediante el método convencional [2] ó teñidas para evaluar la presencia de células productoras de insulina [4]. Brevemente, se quitó la parafina de las secciones y se las bloqueó con 2% suero normal de cabra antes de aplicar el anticuerpo primario anti-insulina (DAKO, Carpintería, CA). La unión del anticuerpo primario fue detectada mediante el uso de un anticuerpo específico secundario (Vector Laboratories, Burlingame, VT) y el complejo avidina-biotina (ABC kit, Vector Laboratories, CA).

1. Katz, J.D., Wang, B., Haskins, K., Benoist, C., and Mathis, D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993; 74:1089-100.
2. Mueller, R., Bradley, L.M., Krahl, T., and Sarvetnick, N. Mechanism underlying counterregulation of autoimmune diabetes by IL-4. *Immunity* 1997; 7:411-8.
3. O'Connor, E., Roberts, E.M., and Davies, J.D. Amplification of cytokine-specific ELISAs increases the sensitivity of detection to 5-20 picograms per milliliter. *J Immunol Methods* 1999; 229:155-60.
4. Gu, D. and Sarvetnick, N. Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN- $\gamma$  transgenic mice. *Development* 1993; 118:33-46.

En el presente anexo se dará una explicación detallada y general del método de trabajo con bibliotecas peptídicas para un mayor entendimiento del trabajo realizado con bibliotecas peptídicas durante el desarrollo de esta Tesis.

## **1. SOBRE LAS BIBLIOTECAS PEPTÍDICAS**

Los péptidos sintéticos han sido una herramienta esencial en la biomedicina y en la química farmacéutica de las últimas décadas. La creciente demanda y los progresos realizados en química sintética han impulsado el desarrollo de métodos que permiten generar millones de péptidos de manera rápida y sencilla, para su posterior evaluación biológica.

El objetivo de la síntesis y escrutinio de todas las combinaciones de secuencia posibles para un péptido de longitud modesta supera con creces la capacidad de estos métodos (por ejemplo, el conjunto de hexapéptidos formados por los 20 aminoácidos naturales lo componen 64.000.000 secuencias diferentes). Es por ello que el salto cualitativamente más importante lo constituyó la introducción del componente combinatorio en la síntesis, que daba así pie a la generación de niveles muy elevados de diversidad. Estas colecciones de péptidos, denominadas bibliotecas peptídicas (o peptidotecas), a pesar del enorme desafío que plantea la identificación de una secuencia activa entre tal elevado número de análogos, han proporcionado un nuevo instrumento en la constante búsqueda de secuencias de interés biológico o terapéutico [1]. Todo ello ha abierto una nueva dimensión en la investigación químico-farmacéutica, dando lugar a lo que actualmente se conoce como química combinatoria, inicialmente restringida a estructuras peptídicas pero actualmente generalizada a amplias áreas de la química orgánica [1-5].

### **1.1 OBTENCIÓN DE BIBLIOTECAS PEPTÍDICAS**

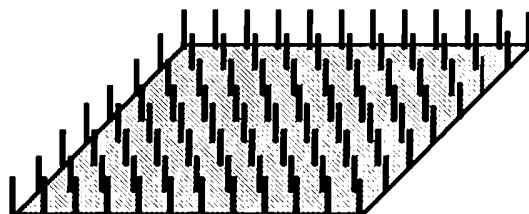
#### **1.1.1 SÍNTESIS MÚLTIPLE PARALELA**

La manera más simple de obtener un elevado número de péptidos es sintetizar las distintas secuencias simultáneamente y en paralelo, haciendo crecer cada cadena en su propio soporte sólido y en un recipiente individual, de manera que cada péptido está físicamente localizado a lo largo de la síntesis. Así es como funcionan los sintetizadores automáticos destinados a la síntesis múltiple, donde cada péptido en su porción de resina se encuentra en un reactor diferente, controlando desde un ordenador la adición de reactivos y disolventes.



### 1.1.2 SÍNTESIS EN VARILLAS DE POLIETILENO

El grupo de Geysen y col. [6, 7] fue el primero en utilizar el concepto de síntesis paralela aplicándolo al mapeo de epítomos. Diseñaron un sistema para sintetizar simultáneamente 96 péptidos, que consiste en otras tantas varillas de polietileno (de 40 x 4 mm) dispuestas en un bloque de manera que encajan en una placa de ELISA estándar (Figura 1). En este sistema, cada pocillo de la placa sirve de reactor en las etapas de acoplamiento (que se realizan siguiendo el procedimiento habitual de síntesis en fase sólida con química Boc), y los lavados y desprotecciones tienen lugar en un baño común. Cuando la síntesis ha finalizado, las cadenas laterales de los aminoácidos se desprotegen y los péptidos anclados al soporte sólido se ensayan por ELISA. Este método, denominado PEPSCAN, ha sido utilizado ampliamente y con éxito en la identificación de determinantes antigénicos [8-10]. Posteriormente, el mismo grupo propuso una metodología para obtener péptidos en forma libre, siguiendo un esquema de

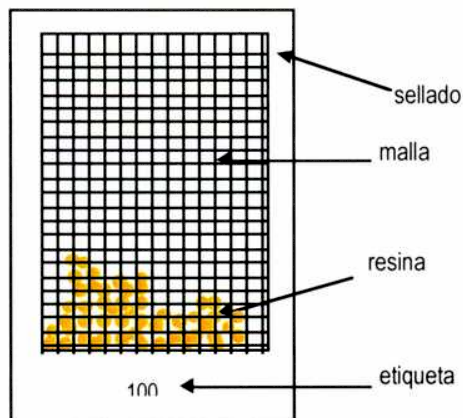


**Figura 1.** Representación esquemática de un bloque con 96 varillas de polietileno, diseñado por Geysen y col., sobre las que se sintetizan simultáneamente los péptidos.

protección Fmoc/tBu y con un espaciador bifuncional que permitía liberar los péptidos del soporte sólido por formación de dicetopiperacinas en un tampón a pH 7. Esta modificación permite realizar los ensayos biológicos en solución, quedando así superado uno de los mayores inconvenientes del método.

### 1.1.3 SÍNTESIS EN BOLSAS DE TÉ

El método de síntesis de péptidos en bolsa de té fue desarrollado por Houghten [11] para obtener manualmente y de una manera muy sencilla un gran número de péptidos. La resina se introduce en una bolsa de polipropileno (donde la síntesis tendrá lugar), cuyo tamaño de malla (74  $\mu\text{m}$ ) permite la entrada y salida de los reactivos y disolventes utilizados en la síntesis sin pérdidas mecánicas de polímero. Después de haber marcado con un rotulador (o impresora) la bolsa, cuyo tamaño depende de la cantidad de resina que requiera la síntesis, ésta se sella de modo que la etiqueta puede leerse fácilmente en cualquier momento de la síntesis. Así pues, estas bolsas, denominadas bolsas de té (de las que se muestra un esquema en la Figura 2) son los reactores de este sistema de síntesis múltiple.



**Figura 2.** Esquema de una bolsa de té (con resina en su interior) utilizada en la síntesis múltiple en fase sólida.

El procedimiento de síntesis consiste en realizar las etapas comunes de lavado y desprotección del grupo  $\alpha$ -amino en un mismo reactor, que no es más que una botella de polipropileno, y para las etapas de acoplamiento agrupar las bolsas en tantas botellas como número de aminoácidos diferentes se hayan de incorporar. Dichas botellas contienen una disolución del aminoácido a acoplar, junto al correspondiente agente de acoplamiento. Todas las etapas se realizan de forma manual, aunque la agitación se lleva a cabo de modo automático. Al final de la síntesis cada bolsa contiene un único péptido de secuencia conocida que se puede desanclar de la resina utilizando un sistema múltiple de escisión con HF anhidro (para una síntesis con esquema de protección Boc/Bzl) a fin de obtener los péptidos libres.

Una de las principales ventajas de este método es su flexibilidad química ya que, en principio, se pueden utilizar todas las resinas, espaciadores bifuncionales y esquemas de protección habituales en síntesis peptídica en fase sólida, así como el hecho de que permite obtener los péptidos libres en lugar de anclados al soporte sólido, lo que hace posible su ensayo en solución. Además, esta estrategia posibilita la obtención de péptidos en cantidades suficientes para, si conviene, ser posteriormente purificados y caracterizados.

Además de los métodos de síntesis múltiple en paralelo previamente detallados, existen otras aproximaciones en que la síntesis se lleva a cabo sobre soportes sólidos no tradicionales, como por ejemplo algodón o láminas de celulosa funcionalizadas. En estas metodologías se utiliza un esquema de protección Fmoc/tBu y, si se desea, los péptidos pueden liberarse del soporte al final de la síntesis. Otra

alternativa más sofisticada consiste en el empleo de láminas de cristal como soporte sólido. En esta aproximación, el grupo fotolábil nitroveratrilo carbonilo (Nvoc) actúa como protector del grupo  $\alpha$ -amino de cada aminoácido. De esta manera, haciendo incidir luz selectivamente sobre los residuos que se desea desproteger y posteriormente incorporando el aminoácido que corresponda, se van elongando las diferentes cadenas peptídicas sobre la lámina de cristal.

## 1.2 ACOPLAMIENTO DE MEZCLAS

Siguiendo con la metodología de síntesis en paralelo que utiliza reactores localizables, la introducción en cada etapa de acoplamiento de mezclas de aminoácidos activados sobre una misma peptidil-resina permite combinar una síntesis determinada, y de este modo obtener mezclas compuestas por un gran número de péptidos. Este método eleva sustancialmente la cantidad de compuestos que se pueden obtener, reduciendo a un tiempo el número de recipientes requeridos en una síntesis paralela clásica. Por su sencillez metodológica, la síntesis se puede realizar manualmente (en bolsas de té, jeringas, etc.) o bien en un sintetizador automático.

Esta aproximación se basa en la incorporación, en cada posición, de una mezcla equimolar de los residuos deseados. Sin embargo, los distintos aminoácidos se acoplan a velocidades diferentes sobre la resina. Así, por ejemplo, los aminoácidos  $\alpha$ -ramificados como Ile, Thr o Val se acoplan más lentamente que los no ramificados Ala o Gly. Para solucionar este problema se deben ajustar las proporciones relativas de los aminoácidos activados a incorporar, añadiendo cantidades mayores de aquéllos que se acoplan más lentamente, con el fin de lograr una incorporación equimolar. Una alternativa consiste en añadir un solo equivalente (como máximo) de una mezcla equimolar de compuestos, de modo que si la reacción de acoplamiento se deja suficiente tiempo, la velocidad de incorporación de los distintos componentes no afecta a la composición final.

Con este método se obtienen millones o incluso billones de péptidos en una única síntesis. A modo de ejemplo, el compuesto con sólo 6 posiciones combinatorializadas XXXXXX, donde X es una mezcla de los 20 aminoácidos naturales, está formado por un conjunto de 64 millones ( $20^6$ ) de péptidos. Si en lugar de un hexámero se trata de un decámero, la mezcla XXXXXXXXXX contiene más de 10 mil millones ( $20^{10}$ ) de péptidos. La contrapartida, sin embargo, es que la detección de tamaña cifra de compuestos y la realización de los correspondientes ensayos biológicos resulta bastante laboriosa. Los ensayos de escrutinio en busca del péptido biológicamente activo se realizan con mezclas de compuestos. Una vez hallada una mezcla que muestra cierta actividad biológica, se emprende un

proceso de desconvolución que consiste en la síntesis y sucesivo escrutinio de mezclas más definidas, es decir, con menor número de componentes, hasta hallar la secuencia activa dentro de la mezcla. Este proceso de desconvolución, que ya aplicaron Geysen y col. [12], con mezclas peptídicas ancladas a varillas de polietileno, puede resultar muy tedioso. Actualmente las estrategias seguidas para la identificación sistemática de la secuencia activa en una mezcla son el proceso iterativo de selección y síntesis o bien el escrutinio posicional, que se explican a continuación.

### 1.2.1 PROCESO ITERATIVO

La desconvolución de una biblioteca siguiendo un proceso iterativo se detalla seguidamente, a partir del ejemplo de la primera biblioteca preparada en solución (Tabla 1). Ésta consiste en secuencias de hexapéptidos acetilados, donde los dos primeros residuos (desde el extremo amino) están individualmente definidos y los cuatro siguientes se componen de una mezcla de 18 aa (los 20 naturales excepto Cys y Trp). Dicha biblioteca se representa como Ac-O1O2XXXX-NH<sub>2</sub> siendo O1O2: AA, AC, AD, etc hasta YV, YW, YY, es decir, un total de 400 mezclas.

Etapa	Proceso	secuencia	núm. mezclas	péptidos/mezcla	núm. total péptidos
1	escrutinio	OOXXXX	400	160.000	64.000.000
	selección	RRXXXX	1	160.000	160.000
2	síntesis	RROXXX	20	8.000	160.000
3	escrutinio	RROXXX	20	8.000	160.000
	selección	RRWXXX	1	8.000	8000
4	síntesis	RRWOXX	20	400	8000
5	escrutinio	RRWOXX	20	400	8000
	selección	RRWCXX	1	400	400
6	síntesis	RRWCOX	20	20	400
7	escrutinio	RRWCOX	20	20	400
	selección	RRWCKX	1	20	20
8	síntesis	RRWCKO	20	1	20
9	escrutinio	RRWCKO	20	1	20
	selección	RRWCKR	1	1	1

**Tabla 1.** Proceso iterativo para la desconvolución de la biblioteca peptídica Ac-OOXXXX-NH<sub>2</sub>.

De estas mezclas peptídicas independientes que componen la biblioteca, se selecciona en un primer ensayo la más activa (en este caso, la que posee la pareja RR en posición N-terminal). A

continuación, en un proceso iterativo, las siguientes posiciones (X) se van definiendo sintéticamente con cada uno de los 20 aminoácidos naturales. En cada paso del proceso, nuevas mezclas peptídicas con una posición adicional definida se ensayan para identificar el nuevo aminoácido definido más activo, disminuyendo cada vez el número de secuencias que componen las mezclas (Tabla 1). Tras 9 etapas se logra determinar el péptido activo.

A pesar de que el proceso iterativo para la desconvolución de una biblioteca peptídica puede resultar tedioso, este método se considera muy seguro en la determinación de la especie activa.

### 1.2.2 ESCRUTINIO POSICIONAL

Este método de escrutinio consiste en la utilización de un conjunto de bibliotecas individuales, denominadas posicionales, cada una con una única posición de la secuencia definida (O) y el resto formado por mezclas aminoácidas (X). El número de estas subbibliotecas es igual al de residuos que componen la secuencia peptídica. Cada biblioteca posicional proporciona información sobre los residuos más relevantes de la posición que tiene definida. Esta información se puede utilizar posteriormente para sintetizar compuestos individuales que representen todas las combinaciones posibles de los residuos más activos en cada posición. La síntesis y evaluación de estas secuencias resultantes confirma la información obtenida en el escrutinio de las bibliotecas.

Para discutir esta aproximación se ha seguido con el ejemplo del apartado anterior. Se necesitan 6 bibliotecas posicionales en solución, cada una formada por 20 mezclas peptídicas, con una posición definida por uno de los 20 L-aa y las 5 restantes compuestas por mezclas de éstos. Estas bibliotecas, que sólo difieren en la localización de la posición definida, contienen un total de 120 mezclas y se representan como Ac-O1XXXXX-NH<sub>2</sub>, Ac-XO2XXXX-NH<sub>2</sub>, Ac-XXO3XXX-NH<sub>2</sub>, Ac-XXXO4XX-NH<sub>2</sub>, Ac-XXXXO5X-NH<sub>2</sub> y Ac-XXXXXO6-NH<sub>2</sub> (Tabla 2). En una sola etapa de escrutinio se ensayan las 120 mezclas, seleccionándose un residuo para cada posición (es decir, una de las 20 mezclas ensayadas para cada posición), lo que da lugar a una única secuencia peptídica que debe sintetizarse para posteriormente confirmar su actividad. En el caso de seleccionar más de una mezcla en alguna posición (por ejemplo, O1 = A, R, O2 = G, R, O3 = M, W, O4 = C, O5 = K y O6 = R, S), entonces el número de secuencias a sintetizar aumenta ( $2 \times 2 \times 2 \times 1 \times 1 \times 2 = 16$  péptidos).

De manera equivalente, el escrutinio posicional puede realizarse con una biblioteca con dos posiciones definidas: O1O2XXXX, XXO3O4XX, XXXXO5O6. Esta biblioteca, que presenta la misma diversidad que la de una sola posición definida, está formada por 1200 mezclas ( $3 \times 400$ ) y cada una se

Etapa	Proceso	secuencia	núm. mezclas	péptidos/mezcla	núm. total péptidos
1	escrutinio	OXXXXX	20	3.200.000	64.000.000
	escrutinio	XOXXXX	20	3.200.000	64.000.000
	escrutinio	XXOXXX	20	3.200.000	64.000.000
	escrutinio	XXXOXX	20	3.200.000	64.000.000
	escrutinio	XXXXOX	20	3.200.000	64.000.000
	escrutinio	XXXXXO	20	3.200.000	64.000.000
	selección	RXXXXX	1	3.200.000	3.200.000
	selección	XRXXXX	1	3.200.000	3.200.000
	selección	XXWXXX	1	3.200.000	3.200.000
	selección	XXXCXX	1	3.200.000	3.200.000
	selección	XXXXKX	1	3.200.000	3.200.000
	selección	XXXXXR	1	3.200.000	3.200.000
	2	síntesis	RRWCKR	1	1

**Tabla 2.** Escrutinio posicional en la desconvolución de una librería de hexapéptidos acetilados.

compone de  $19^4$  hexapéptidos. La síntesis de la misma, así como su escrutinio, es en este caso más laboriosa debido al elevado número de mezclas que la componen. Sin embargo, los resultados que proporciona son más fiables ya que se definen dos posiciones adyacentes simultáneamente y, además, la concentración de una determinada secuencia dentro de cada mezcla peptídica es mucho mayor que para la biblioteca con una sola posición definida. Este método agiliza mucho el proceso desconvolutivo, lo que hace que sea muy atractivo y muy utilizado en la búsqueda de péptidos (y otros compuestos orgánicos) activos [13-15]. Cabe destacar, por último, que en un escrutinio posicional siempre puede iniciarse un proceso iterativo a partir de cualquiera de las posiciones de la secuencia.

1. Pinilla, C., Appel, J., Blondelle, S., Dooley, C., Dorner, B., Eichler, J., Ostresh, J., and Houghten, R.A. A review of the utility of soluble peptide combinatorial libraries. *Biopolymers* 1995; 37:221-40.
2. Houghten, R.A., Pinilla, C., Appel, J.R., Blondelle, S.E., Dooley, C.T., Eichler, J., Nefzi, A., and Ostresh, J.M. Mixture-based synthetic combinatorial libraries. *J Med Chem* 1999; 42:3743-78.
3. Zuckermann, R.N., Martin, E.J., Spellmeyer, D.C., Stauber, G.B., Shoemaker, K.R., Kerr, J.M., Figliozzi, G.M., Goff, D.A., Siani, M.A., Simon, R.J., and et al. Discovery of nanomolar ligands for 7-transmembrane G-protein-coupled receptors from a diverse N-(substituted)glycine peptoid library. *J Med Chem* 1994; 37:2678-85.
4. Bhalay, G., Cowell, D., Hone, N.D., Scobie, M., and Baxter, A.D. Multiple solid-phase synthesis of hydantoins and thiohydantoins. *Mol Divers* 1998; 3:195-8.
5. Ostresh, J.M., Husar, G.M., Blondelle, S.E., Dorner, B., Weber, P.A., and Houghten, R.A. "Libraries from libraries": chemical transformation of combinatorial libraries to extend the range and repertoire of chemical diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:11138-42.
6. Geysen, H.M., Barteling, S.J., and Meloen, R.H. Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:178-82.
7. Geysen, H.M., Meloen, R.H., and Barteling, S.J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81:3998-4002.
8. van Amerongen, A., Plasman, H.H., Kuperus, D., Kremer, L., Rodriguez-Frade, J.M., Albar, J.P., Llopis, R., Schaaper, W.M., and Meloen, R.H. Design of peptides with improved affinities for anti-human chorionic gonadotropin monoclonal antibodies. *Pept Res* 1994; 7:83-90.
9. van Amerongen, A., Beckers, P.J., Plasman, H.H., Schaaper, W.M., Sauerwein, R.W., Meuwissen, J.H., and Meloen, R.H. Peptides reactive with a transmission-blocking monoclonal antibody against *Plasmodium falciparum* Pfs25: 2000-fold affinity increase by PEPSCAN-based amino acid substitutions. *Pept Res* 1992; 5:269-74.

10. Geysen, H.M., Rodda, S.J., Mason, T.J., Tribbick, G., and Schoofs, P.G. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Methods* 1987; 102:259-74.
11. Houghten, R.A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:5131-5.
12. Geysen, H.M., Rodda, S.J., and Mason, T.J. A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant. *Mol Immunol* 1986; 23:709-15.
13. Backes, B.J., Harris, J.L., Leonetti, F., Craik, C.S., and Ellman, J.A. Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin. *Nat Biotechnol* 2000; 18:187-93. [java/Propub/biotech/nbt0200\\_187.fulltext](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11111111)  
[java/Propub/biotech/nbt0200\\_187.abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11111111).
14. Pinilla, C., Appel, J.R., Campbell, G.D., Buencamino, J., Benkirane, N., Muller, S., and Greenspan, N.S. All-D peptides recognized by an anti-carbohydrate antibody identified from a positional scanning library. *J Mol Biol* 1998; 283:1013-25.
15. Appel, J.R., Muller, S., Benkirane, N., Houghten, R.A., and Pinilla, C. Highly specific, cross-reactive sequences recognized by an anti-HBsAg antibody identified from a positional scanning synthetic combinatorial library. *Pept Res* 1996; 9:174-82.



## RESULTADOS

# ANEXO

## Aminoácidos proteínogénicos empleados en el presente estudio: estructura, código de tres letras y código de una letra\*

AMINOÁCIDO			ESTRUCTURA	AMINOÁCIDO			ESTRUCTURA
Ala	alanina	A		Leu	leucina	L	
Arg	arginina	R		Lys	lisina	K	
Asn	asparagina	N		Met	metionina	M	
Asp	ácido aspártico	D		Phe	fenilalanina	F	
Cys	cisteína	C		Pro	prolina	P	
Gln	glutamina	Q		Ser	serina	S	
Glu	ácido glutámico	E		Thr	treonina	T	
Gly	glicina	G		Trp	triptófano	W	
His	histidina	H		Tyr	tirosina	Y	
Ile	isoleucina	I		Val	valina	V	

\*Las abreviaturas de los aminoácidos siguen las reglas de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB especificadas en *Eur. J. Biochem.*, 138, 9-37 (1984) y en *J. Biol. Chem.*, 264, 633-637 (1989).

# 1. DESCONVOLUCIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LAS CÉLULAS T CD4+ BDC2.5

## 1.1 APROXIMACIÓN COMBINATORIAL

La búsqueda de ligandos específicos para las células BDC2.5 se realizó mediante el uso de bibliotecas peptídicas. Diferentes trabajos anteriores han demostrado la efectividad de este método en la identificación de ligandos tanto para clones de células T para los cuales ya se conocía la especificidad antigénica o para los cuales, como en el caso de BDC2.5, la especificidad era desconocida [1-7].

El primer paso en este proceso de búsqueda se llevó a cabo mediante el escrutinio posicional de la biblioteca de decapeptidos denominada PS-SCL 97-4 (del inglés Positional Scanning – Synthetic Combinatorial Library) sintetizada en Torrey Pines Institute for Molecular Studies mediante el método desarrollado por Houghten et al [8](ver Anexo, Materiales y Métodos). La decisión de usar una biblioteca compuesta de péptidos de 10 aminoácidos de largo fue basada en experiencias anteriores donde pudo demostrarse exitosamente la identificación de antígenos específicos para un clon celular T CD4+ [1, 6].

PS-SCL 97-4 es una biblioteca sintética hecha a partir de L- aminoácidos y en la cual todos los péptidos poseen el extremo amino acetilado y el extremo carboxilo amidado. Esta biblioteca está compuesta de 200 mezclas. Las primeras 20 mezclas se representan como Ac-O<sub>1</sub>XXXXXXXXXX-NH<sub>2</sub> donde O representa cada uno de los posibles 20 L-aminoácidos naturales (ver anexo 1) y X representa todos los L-aminoácidos naturales, con la excepción de cisteína, en cada una de las posiciones restantes. De la misma manera, las siguientes 20 mezclas se representan Ac-XO<sub>2</sub>XXXXXXXXXX-NH<sub>2</sub> y difieren de las primeras en la localización de la posición definida (Tabla 1). Cada mezcla en esta biblioteca contiene  $3.2 \times 10^{11}$  ( $19^9$ ) péptidos individuales presentes en aproximadamente concentraciones equimolares. Asumiendo un peso molecular promedio por aminoácido de 120, cada decapeptido tiene un peso molecular de 1200. Dado que en general las mezclas se ensayan a una concentración de 100ug/ml (83uM), la concentración de cada péptido en cada mezcla es de  $2.5 \times 10^{-16}$  M.

Qué información se obtiene a partir del escrutinio de esta biblioteca? Cada una de las mezclas que componen esta biblioteca proporciona información específica y única acerca de la actividad de los péptidos que la conforman. Así por ejemplo, si de las 20 mezclas que tienen definida la posición 1 sólo resulta activa la mezcla Ac-AXXXXXXXXXXX-NH<sub>2</sub> significa que uno o más péptidos que contienen alanina

	Mezclas Posición 1	Mezclas Posición 2	...	Mezclas Posición 10
	Ac- O <sub>1</sub> X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X O <sub>2</sub> X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X O <sub>10</sub> -NH <sub>2</sub>
1	Ac- A X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X A X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X A -NH <sub>2</sub>
2	Ac- C X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X C X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X C -NH <sub>2</sub>
3	Ac- D X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X D X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X D -NH <sub>2</sub>
4	Ac- E X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X E X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X E -NH <sub>2</sub>
5	Ac- F X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X F X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X F -NH <sub>2</sub>
6	Ac- G X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X G X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X G -NH <sub>2</sub>
7	Ac- H X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X H X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X H -NH <sub>2</sub>
8	Ac- I X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X I X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X I -NH <sub>2</sub>
9	Ac- K X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X K X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X K -NH <sub>2</sub>
10	Ac- L X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X L X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X L -NH <sub>2</sub>
11	Ac- M X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X M X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X M -NH <sub>2</sub>
12	Ac- N X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X N X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X N -NH <sub>2</sub>
13	Ac- P X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X P X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X P -NH <sub>2</sub>
14	Ac- Q X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X Q X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X Q -NH <sub>2</sub>
15	Ac- R X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X R X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X R -NH <sub>2</sub>
16	Ac- S X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X S X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X S -NH <sub>2</sub>
17	Ac- T X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X T X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X T -NH <sub>2</sub>
18	Ac- V X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X V X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X V -NH <sub>2</sub>
19	Ac- W X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X W X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X W -NH <sub>2</sub>
20	Ac- Y X X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>	Ac- X Y X X X X X X X X -NH <sub>2</sub>		Ac- X X X X X X X X X Y -NH <sub>2</sub>

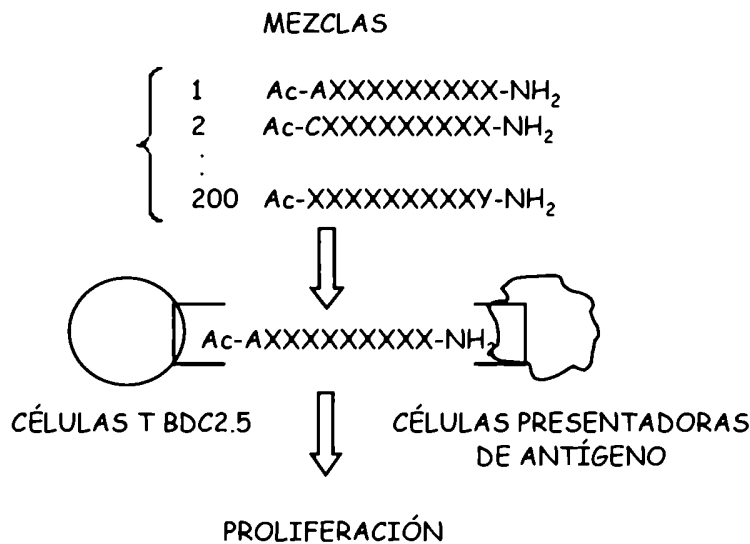
**Tabla 1.** Biblioteca PS-SCL 97-4 compuesta por un total de 200 mezclas de decapeptidos. Los decapeptidos contienen L-aminoácidos y están acetilados en el extremo N-terminal.

en la posición 1 son capaces de activar el sistema. Si de las 20 mezclas que tienen definida la posición 2 sólo resulta activa la mezcla Ac-XYXXXXXXXXX-NH<sub>2</sub> significa que uno o más péptidos que contienen tirosina en la posición 2 son capaces también de activar el sistema. Del mismo modo, para poder obtener información sobre las preferencias en el resto de las posiciones es necesario ensayar todas las mezclas de la biblioteca. Sin embargo, es importante entender que luego de que se ensayaron todas las mezclas y se hizo una selección de aminoácidos, el diseño de péptidos individuales mediante la combinación de dichos aminoácidos en general resultan activos no necesariamente siempre resulta así. Esto se debe a que cuando se diseñan los péptidos individuales en base a la combinación de residuos definidos en cada una de las mezclas activas, se está asumiendo que son los mismos péptidos los que dan actividad en las diferentes mezclas. En otras palabras, y siguiendo el ejemplo anterior, los péptidos activos en la mezcla con alanina en posición 1 no son necesariamente los mismos que resultaron activos en la mezcla con tirosina en la posición 2 por lo tanto, si se sintetizan decapeptidos individuales con alanina en posición 1, tirosina en posición 2 y una cierta combinación de aminoácidos en las otras posiciones dichos péptidos no necesariamente serán activos.

## 1.2 PROCESO EXPERIMENTAL DE DECONVOLUCIÓN

### 1.2.1 ESCRUTINIO DE CÉLULAS BDC2.5 CON LA BIBLIOTECA PS-SCL 97-4

Cada una de las 200 mezclas de esta biblioteca fue ensayada en un ensayo de proliferación con células aisladas directamente del bazo de ratones BDC2.5 (Figura 1). La gran ventaja de este sistema es que estas células se pueden cultivar directamente en presencia de cada una de las mezclas ya que en dicha mezcla celular se encuentran tanto las células T BDC2.5 como las células presentadoras de antígeno.

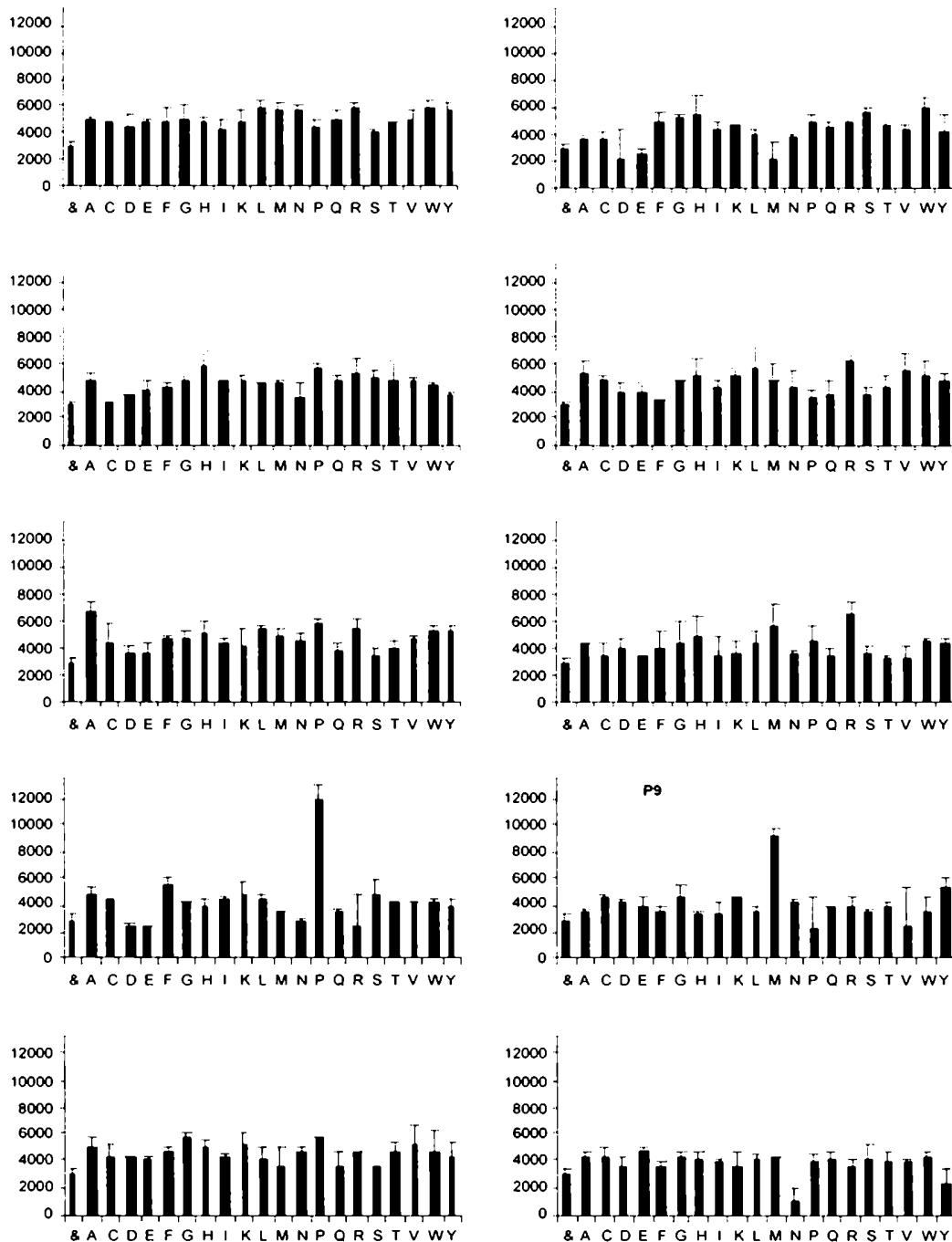


**Figura 1.** Representación del ensayo realizado para estudiar la actividad de la biblioteca PS-SCL 97-4 en células BDC2.5.

El ensayo de proliferación se llevó a cabo en placas de ELISA de 96 pocillos y cada una de las 200 mezclas fue probada en duplicado. En cada placa se dejaron 6 pocillos con células sin estimular que fueron luego usados para calcular el nivel basal de proliferación de las células en ausencia de estimulante. Los cultivos se mantuvieron durante 3 días en un incubador a 37°C bajo una presión de 5% de  $CO_2$ . La noche previa a retirar los cultivos se agregan 0.5uCi de timidina radiactiva ( $^3H$  TdR) para cuantificar la incorporación de  $^3H$  TdR en cada pocillo. El  $^3H$  TdR es incorporado en el ADN de las células, por lo tanto a mayor división celular, mayor  $^3H$  TdR incorporado. Dicho en otras palabras, si la mezcla presente en el pocillo contiene uno o más péptidos capaces de formar un complejo MHC-péptido en las células presentadoras de antígeno y dicho complejo es capaz de activar las células T BDC2.5 a través su TCR, estas células proliferarán y dicha proliferación es cuantificada mediante la incorporación

de  $^3\text{H}$  TdR. Este experimento fue realizado cuatro veces en diferentes días con resultados similares. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos en uno de los cuatro experimentos. Los resultados están esquematizados mediante gráficos de barras, donde cada barra corresponde a las cuentas de radioactividad obtenidas en promedio para una determinada una mezcla (recordar que cada mezcla es ensayada por duplicado) y cada gráfico muestra la estimulación con cada una de las 20 mezclas de la posición definida indicada. Para mayor simplicidad y un análisis más exacto de los resultados se expresará de ahora en más la capacidad estimuladora de una mezcla con el Índice de Estimulación (IEs). Dicho índice se calcula con el número promedio de las cuentas radioactivas obtenidas con los duplicados de dicha mezcla dividido las cuentas obtenidas en promedio entre los pocillos control. El IEs permite comparar mejor los resultados entre diferentes experimentos ya que relaciona las cuentas obtenidas con cada una de las mezclas con el nivel de proliferación control de cada experimento. Pueden extraerse de la Figura 2 dos observaciones claras. Las mezcla que contiene péptidos con prolina en posición 4 y la mezcla que contiene péptidos con metionina en posición 9 presentan IEs entre tres y cuatro veces mayores que el nivel de proliferación control. En el resto de las posiciones no se observaron mezclas que presenten una clara diferencia en actividad con respecto al resto, sin embargo sería posible definir un grupo de mezclas más activas que otras. De estos resultados se desprenden 3 diferentes conclusiones: 1- Basado en el IEs obtenido con la mezcla que tiene definida la posición 4 con prolina se deduce que uno o más péptidos de dicha mezcla son capaces de estimular células T CD4+ BDC2.5. Siguiendo el mismo razonamiento, existen uno o más péptidos con metionina en posición 9 con capacidad de estimular células T CD4+ BDC2.5. 2- Basado sólo en estos resultados no puede inferirse que los péptidos activos con prolina en posición 4 son los mismos péptidos que contienen metionina en posición 9. 3- En el resto de las posiciones (1,2,3,5,6,7,8 y 10) se definió un criterio en base al cual se procedió a la selección de las mezclas más activas. Dicho criterio consistió en la inclusión de las mezclas que resultaron más activas en al menos 2 de los 4 experimentos. Se fijó arbitrariamente un valor de IEs > 1.5 para considerar a una mezcla activa. La selección de un número mayor de IEs hubiera ocasionado el riesgo de que un residuo importante en la actividad final de los péptidos quede excluido de los pasos siguientes del proceso de desconvolución.

Basado entonces en las tres conclusiones anteriores se seleccionaron los correspondientes residuos en cada una de las posiciones (Tabla 2). Como puede observarse, para aplicar el mismo criterio, en las posiciones 4 y 9, no sólo se seleccionaron prolina y metionina respectivamente sino que se incluyeron las mejores mezclas que mostraron un IEs mayor que 1.5 en al menos 2 de los 4 experimentos.



**Figura 2.** Proliferación de células BDC2.5 en respuesta a cada una de las mezclas que componen la biblioteca PS-SCL 97-4. Estos son los resultados representativos de uno de 4 experimentos. El eje X indica células cultivadas sin mezclas (&) o células cultivadas con las mezclas compuestas de péptidos que tienen uno de los 20 aminoácidos naturales (código de una letra A, C, D, etc.) en la posición indicada. El eje Y indica la proliferación medida en cuentas por minuto alcanzada luego de 3 días de cultivo (ver Materiales y Métodos).

Idealmente, en este punto del proceso, se podría proceder a la síntesis y ensayo de péptidos individuales diseñados en base a la combinación de los aminoácidos seleccionados luego del escrutinio de la biblioteca (Tabla 2). En caso de las células BDC2.5, dado el alto número de mezclas seleccionadas en cada posición esto implicaba la síntesis de más de 40 millones de péptidos ( $8 \times 6 \times 5 \times 6 \times 6 \times 6 \times 6 \times 4 \times 5 \times 6$ ). Se trata de un número demasiado elevado, no sólo por el tiempo y esfuerzo que se debería invertir en la síntesis sino también por su altísimo costo económico. Por estos motivos no se estimó esta opción como la más factible.

Posicion									
X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>
W	P	A	P	P	W	V	R	M	M
Y	R	L	I	G	S	R	M	Y	T
L	H	M	L	V	Q	M	S	C	G
M	V	P	G	L	H	G	I	T	A
N	G	R	A	T	R	L		K	W
A	S		S	H	A	F			E
Q	T								
R									

**Tabla 2.** En cada una de las posiciones se muestran en orden decreciente de actividad los aminoácidos definidos en cada una de las mezclas que resultaron mas activas en al menos dos de los cuatro experimentos realizados durante el escrutinio con la biblioteca PS-SCL 97-4. Los aminoácidos están simbolizados en base al código de una letra (ver anexo).

### 1.2.2 SÍNTESIS Y ESCRUTINIO DE MEZCLAS EN BASE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON PS-SCL 97-4

Como estrategia alternativa y con el objetivo de estudiar si la presencia de los residuos seleccionados da origen a péptidos activos, se sintetizaron dos nuevas series diferentes de mezclas (Tabla 3). Con el diseño de la primera serie (mezclas N37-74 y N37-75) se intentó confirmar que los péptidos activos con prolina en la posición 4 son los mismos péptidos que tienen metionina o tirosina en la posición 9. Si bien la inclusión de la mezcla que contiene prolina en la posición 4 y metionina en la posición 9 resulta obvia, la mezcla con prolina en la posición 4 y tirosina en la posición 9 también fue



incluida dado que en el escrutinio con la biblioteca PS-SCL 97-4 la mezcla con tirosina en posición 9 fue la segunda mezcla mas activa después de la mezcla con metionina. Esto nos sugirió que deberíamos probar la posibilidad de que existe un número significativo de péptidos activos que tienen prolina en posición 4 y tirosina en posición 9. Las mezclas N37-74 y N37-75 se representan como Ac-XXXPXXXXMX-NH2 y Ac-XXXPXXXXYX-NH2 respectivamente.

Con la síntesis de la segunda serie (N37-103) se intentó probar que: 1- Mediante la combinación de los residuos seleccionados a partir del escrutinio con la biblioteca PS-SCL 97-4 (Tabla II) es posible

Mezcla	Posicion										IEs	EC <sub>50</sub> mg/ml	No.peptidos/ mezcla
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
PCL 97-4/73	X	X	X	P	X	X	X	X	X	X	4.4	>100	3.2 × 10 <sup>11</sup>
PCL 97-4/171	X	X	X	X	X	X	X	X	M	X	3.1	>100	3.2 × 10 <sup>11</sup>
PCL 97-4/180	X	X	X	X	X	X	X	X	Y	X	2.1	>100	3.2 × 10 <sup>11</sup>
N37-74	X	X	X	P	X	X	X	X	M	X	21.9	43	1.7 × 10 <sup>10</sup>
N37-75	X	X	X	P	X	X	X	X	Y	X	1	>100	1.7 × 10 <sup>10</sup>
N37-103	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	16.1	35	43.6 × 10 <sup>6</sup>
N37-103P4	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	P	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	20.0	7	7.3 × 10 <sup>6</sup>
N37-103M9	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	M	X <sub>10</sub>	19.6	7	8.7 × 10 <sup>6</sup>
N37-103Y9	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	Y	X <sub>10</sub>	1.2	>100	8.7 × 10 <sup>6</sup>
N37-103P4M9	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	P	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	M	X <sub>10</sub>	21.0	1	1.5 × 10 <sup>6</sup>
N37-103P4Y9	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	P	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	Y	X <sub>10</sub>	1.6	>100	1.5 × 10 <sup>6</sup>

**Tabla 3.** Mezclas sintetizadas y sus respectivos IEs diseñadas en base a los resultados obtenidos con el escrutinio de la biblioteca PS-SCL 97-4 en células T BDC2.5. La X en las indicadas posiciones representa todos los aminoácidos naturales excepto cisteína. La mezclas en donde se indica X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>,.....refieren a la selección de aminoácidos para la posición 1, 2, 3 ..... indicada en la Tabla 2. Así por ejemplo la mezcla N37-103 contiene A, L, M, N, Q, R, W y Y en posición 1. IEs= índice de estimulación con las mezclas usadas a 100µg/ml. Las respuestas control resultaron con un valor entre 3500-4000 cpm.

obtener péptidos activos, 2- Con la inclusión sólo de prolina en posición 4 y sólo de metionina o tirosina en la posición 9 en conjunto con los otros residuos en las restantes posiciones se originan mezclas más activas ya que se concentra en péptidos más activos. Esta serie está constituida por 6 diferentes

mezclas. La mezcla N37-103 incluye todos los residuos seleccionados en cada una de las posiciones (Tabla II y Tabla III) y se representa  $Ac-X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9 X_{10}-NH_2$ , donde  $X_1$  simboliza todos los residuos seleccionados en la posición 1,  $X_2$  simboliza todos los residuos seleccionados en la posición 2 y así sucesivamente. La mezcla N37-103P4 difiere con la mezcla N37-103 sólo en la posición 4, ya que como su nombre lo indica, sólo contiene prolina en dicha posición. La mezcla N37-103M9 contiene sólo metionina en la posición 9, la mezcla N37-103Y9, contiene sólo tirosina en la posición 9, la mezcla N37-103P4M9 contiene sólo prolina en posición 4 y sólo metionina en posición 9, la mezcla N37-103P4Y9 contiene sólo prolina en posición 4 y sólo metionina en posición 9.

Una vez sintetizadas estas 2 nuevas series de mezclas se procedió a ensayar su actividad en células BDC2.5 en el mismo tipo de ensayo de proliferación que se realizó para el escrutinio de PS-SCL 97-4 (Figura 1). Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 3. El valor  $EC_{50}$  representa la concentración de la mezcla necesaria para causar la mitad de la máxima proliferación del cultivo. Así, cuanto más activa es la mezcla menor será su valor  $EC_{50}$ . En la primera parte de la Tabla 3 se comparan los resultados de la primera serie de mezclas con las mezclas indicadas de la biblioteca PS-SCL 97-4. Como puede observarse la mezcla N37-74 resultó prácticamente 7 veces más activa que las mezclas PS-SCL 97-4/73 ó PS-SCL 97-4/171. Si se tiene en cuenta que dicha mezcla contiene 19 veces menos péptidos y que por lo tanto, la cantidad relativa de los péptidos presentes en el conjunto de la mezcla es mayor, se puede concluir que al seleccionar prolina en posición 4 y metionina en posición 9 se concentró en péptidos activos. Dicho en otras palabras, existe un conjunto significativo de péptidos activos que contienen prolina en posición 4 y metionina en posición 9 ó, existe un pequeño grupo de péptidos con prolina en posición 4 y metionina en posición 9 que son altamente activos. El caso contrario ocurrió con la mezcla N37-75. Dicha mezcla resultó ser inactiva con un IEs de 1 y un  $EC_{50} > 100mg/ml$ . De esta observación se desprende que los péptidos que tienen prolina en posición 4 y tirosina en posición 9 no son suficientemente activos como para generar proliferación de las células BDC2.5 en la concentración que se encuentran en la mezcla.

La Tabla 3 también muestra los resultados obtenidos con la serie N37-103. La mezcla N37-103 resultó ser activa con un IEs de 16.1 y un  $EC_{50}$  de 35mg/ml lo que sugiere que, coincidente con el objetivo, la mezcla diseñada a partir de los residuos seleccionados con el escrutinio de la biblioteca PS-SCL 97-4 contiene péptidos activos. Con esta serie de mezclas también pudo detectarse la significativa mejoría en actividad con la mezcla que contiene péptidos con prolina en posición 4 y metionina en posición 9 (N37-103P4M9) en comparación con las mezclas N37-103P4 ó N37-103M9. De la misma

manera, también se observó que la mezcla que sólo contiene péptidos con tirosina en posición 9 no es capaz de activar células T BDC2.5.

Estos resultados sugieren: 1- Péptidos que tienen prolina en posición 4 y metionina en posición 9 son capaces de estimular células BDC2.5, 2- Todos, o algunos de los péptidos cuyas secuencias resultan de la combinación de los aminoácidos seleccionados a partir del escrutinio con la biblioteca PS-SCL 97-4 (mezcla N37-103, Tabla 3) son capaces de activar células BDC2.5, 3- Los péptidos cuyas secuencias resultan de la combinación de los aminoácidos seleccionados a partir del escrutinio con la biblioteca PS-SCL 97-4 y que tienen sólo prolina en posición 4 y metionina en posición 9 (mezcla N37-103P4M9, Tabla 3) resultan altamente capaces de activar células BDC2.5.

### **1.2.3 AVANCE EN LA DETERMINACIÓN DE ESPECIFICIDAD. SÍNTESIS Y ESCRUTINIO DE UNA NUEVA BIBLIOTECA ORGANIZADA EN FORMATO POSICIONAL.**

Habiendo establecido que la mezcla N37-103 contiene muchos o algunos péptidos capaces de estimular células BDC2.5 y que la inclusión en esta mezcla sólo de los péptidos con prolina en posición 4 y metionina en posición 9 resulta en un aumento de la actividad, el siguiente paso sería determinar cuales son los péptidos individuales incluidos en esta mezcla capaces de activar células BDC2.5. La estrategia a seguir fue el diseño y ensayo de una biblioteca organizada en formato posicional basada en la mezcla N37-103P4M9. Así, las mezclas de esta nueva biblioteca denominada N66, están conformadas por decapeptidos que tienen una posición definida a la vez. El escrutinio de esta biblioteca (N66) fue realizado en las condiciones habituales. Las mezclas y sus correspondientes  $EC_{50}$ s pueden observarse en la Tabla 4.

Es importante notar nuevamente el concepto de escrutinio posicional para analizar correctamente los resultados obtenidos. Por ejemplo, las mezclas N66-62, N66-63, N66-64, N66-65, N66-66, N66-67, N66-68 y N66-69 contienen péptidos que sólo difieren en el aminoácido usado en la primera posición. Por lo tanto, ya que todas estas mezclas resultaron ser activas con actividades dentro del mismo rango ( $0.8 < EC_{50} < 3$ ) se concluye que la presencia de cualquiera de los residuos usados para definir esta posición (Q, Y, R, A, M, L, N, W) va a dar como resultado péptidos activos. Un ejemplo diferente es lo que ocurrió con la posición 6 ó con la posición 8. En estas posiciones sólo una mezcla resultó ser activa, la mezcla que contiene sólo péptidos con W en posición 6 y la mezcla que contiene sólo péptidos con R en posición 8.

Mezcla	Posición										EC50 $\mu\text{g}/\text{m}$	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	P	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	M	X <sub>10</sub>		
N37-103P4M9												0.7
N66-66	Q			P						M		0.8
69	Y			P						M		0.8
67	R			P						M		1.1
62	A			P						M		1.3
64	M			P						M		1.3
63	L			P						M		2.3
65	N			P						M		2.4
68	W			P						M		3.0
76	V			P						M		0.3
75	T			P						M		1.3
71	H			P						M		1.7
74	S			P						M		2.2
73	R			P						M		2.4
72	P			P						M		2.7
70	G			P						M		3.0
78	L			P						M		0.6
79	M			P						M		0.7
81	R			P						M		1
77	A			P						M		6.7
80	P			P						M		>100
84				P	L					M		1.3
87				P	V					M		2.3
86				P	T					M		7.6
83				P	H					M		37
82				P	G					M		50
85				P	P					M		146.1
93				P		W				M		2.9
88				P		A				M		>100
89				P		H				M		>100
90				P		Q				M		>100
91				P		R				M		>100
92				P		S				M		>100
95				P			G			M		3.8
99				P			V			M		4.1
96				P			L			M		20.4
94				P			F			M		38.5
97				P			M			M		54.2
98				P			R			M		>100
102				P				R		M		5.4
100				P				I		M		>100
101				P				M		M		>100
103				P				S		M		>100
105				P						M	E	0.04
106				P						M	G	2.3
108				P						M	T	4.0
104				P						M	A	4.3
107				P						M	M	7.8
109				P						M	W	18.2

**Tabla 4.** Serie de mezclas N66 con sus respectivos EC50s en células BDC2.5. Sombra violeta denota la selección de la respectiva mezcla basado en su EC50. La mezclas en donde se indica X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>.....refieren a la selección de aminoácidos para la posición 1, 2, 3 ..... indicada en la Tabla 2.

Esto quiere decir que la presencia de dichos residuos en la secuencia peptídica es importante para activar células BDC2.5. En la posición 10 también ocurrió algo diferente. Si bien todas las mezclas resultaron ser activas en células BDC2.5, la mezcla con E definida en esta posición resultó significativamente más activa que el resto, es más fue la mezcla más activa de toda la biblioteca. Esto sugiere que la presencia de E en la posición 10 de los péptidos confiere una gran ventaja para conseguir activación de las células BDC2.5.

Por lo tanto, considerando los EC50s de las mezclas, y procurando incluir aminoácidos con diferente carácter químico con el fin de proporcionar mayor diversidad en aquellas posiciones que

Posicion									
X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>
Q	V	L	P	L	W	G	R	M	E
Y	T	R				V			G
R	H								
A									
M									

$5 \times 3 \times 2 \times 1 \times 1 \times 1 \times 2 \times 1 \times 1 \times 2 = 120$  peptidos

**Tabla 5.** Péptidos a sintetizar a partir de las mezclas peptídicas que presentaron los mejores resultados durante el proceso de desconvolución de las células BDC2.5. La secuencia de los péptidos resulta de la combinación de todos los residuos seleccionados en las diferentes posiciones.

presentaron más de una mezcla activa ( posiciones 1, 2, 3, 5, 10), se seleccionaron las mezclas que se muestran en las Tablas 4 y 5. En las posiciones 1,2,3 y 5 donde la mayoría de las mezclas resultaron activas se seleccionaron aquellas con valores de EC50s < 2.1mg/ml ( un valor 3 veces más grande que el EC50 de la mezcla control N37103-P4M9). En la posición 3, metionina fue excluida dado el similar carácter químico con L; en la posición 10 tanto E como G fueron incluidos debido a su diferente carácter químico.

En resumen, la acumulación y el procesamiento de todos los datos obtenidos durante el proceso de desconvolución dio lugar a la elección final de las mezclas más activas, a partir de las cuales, y

procurando incorporar la máxima diversidad, se seleccionaron las secuencias peptídicas a sintetizar (Tabla 5).

### **1.3 SÍNTESIS, ACTIVIDAD Y ANÁLISIS DE LOS PÉPTIDOS INDIVIDUALES**

Los 120 péptidos se obtuvieron por síntesis múltiple simultánea en fase sólida por el método de la bolsa de té ( ver Anexo, sección Materiales y Métodos). La capacidad de los péptidos encontrados de estimular células BDC2.5 fue evaluada en un ensayo de proliferación siguiendo el mismo tipo de protocolo que para las bibliotecas peptídicas (ver materiales y métodos). En un primer experimento cada péptido fue probado por duplicado a 100, 10, 1 y 0.1  $\mu\text{g/ml}$ . Dada la alta capacidad proliferativa de la mayoría de estos péptidos dichas concentraciones resultaron demasiado altas y por lo tanto no pudo determinarse para muchos de ellos el valor del EC50 (resultados no mostrados). En un segundo experimento se procedió a ensayar los péptidos a una concentración inicial de 1,25  $\mu\text{g/ml}$  y consecutivas diluciones de 1/6 hasta una concentración final de 0,0045  $\mu\text{g/ml}$  . Se usaron platos de 96 pocillos y cada péptido fue ensayado por duplicado. Los 120 péptidos con sus respectivos EC50 se muestran en la Tabla 6. Como puede observarse, más de la mitad de los péptidos son altamente activos con valores de EC50 en un rango de 700pg/ml a 10ng/ml.

Teniendo la disponibilidad de 120 secuencias peptídicas específicas para las células BDC2.5 y, conociendo su capacidad estimuladora, decidimos analizar la relativa contribución de los diferentes aminoácidos en la habilidad de activar dichas células. Si se observa en la Tabla 6, puede determinarse que los péptidos más activos todos llevan E en posición 10, la mayoría usa V en posición 7 y, todos usan L o R en la posición 3. En el resto de las posiciones no se observó una clara preferencia por algún determinado residuo.

En base a estas observaciones decidimos agrupar los 120 péptidos según las posiciones 3, 7 y 10. Como puede observarse en la Tabla 7 existe una obvia correlación entre la presencia de una determinada combinación de aminoácidos y la capacidad del péptido de activar las células. Las combinaciones más "activas" son R3V7E10, L3V7E10 y L3G7E10 ya que 42 de los 62 péptidos con valores de  $\text{EC}_{50} < 10\text{ng/ml}$  usan dichas combinaciones. Por el contrario, la presencia de la combinación R3G7E10 en la secuencia peptídica da como resultado péptidos con menor capacidad estimuladora, 10 de los 13 péptidos con valores de  $\text{EC}_{50} > 100\text{ng/ml}$  usan dicha combinación.

Peptido	Secuencia										EG <sub>50</sub> ng/ml	Peptido	Secuencia										EG <sub>50</sub> ng/ml		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1040-1	Ac-Q	V	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	5.4	1040-61	Ac-R	T	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	9.1
1040-2	Ac-Q	V	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	6.0	1040-62	Ac-R	T	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	769.7
1040-3	Ac-Q	V	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.8	1040-63	Ac-R	T	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	0.8
1040-4	Ac-Q	V	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	6.3	1040-64	Ac-R	T	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	4.2
1040-5	Ac-Q	V	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.9	1040-65	Ac-R	H	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	7.9
1040-6	Ac-Q	V	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	5.2	1040-66	Ac-R	H	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	72.7
1040-7	Ac-Q	V	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	8.6	1040-67	Ac-R	H	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	6.1
1040-8	Ac-Q	V	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	3.4	1040-68	Ac-R	H	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	40.9
1040-9	Ac-Q	T	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	7.9	1040-69	Ac-R	H	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	26.0
1040-10	Ac-Q	T	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	23.8	1040-70	Ac-R	H	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	997.3
1040-11	Ac-Q	T	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	5.0	1040-71	Ac-R	H	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	4.9
1040-12	Ac-Q	T	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	11.6	1040-72	Ac-R	H	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	50.0
1040-13	Ac-Q	T	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.3	1040-73	Ac-A	V	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	6.0
1040-14	Ac-Q	T	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	46.7	1040-74	Ac-A	V	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	60.2
1040-15	Ac-Q	T	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.4	1040-75	Ac-A	V	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	3.6
1040-16	Ac-Q	T	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	7.5	1040-76	Ac-A	V	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	5.1
1040-17	Ac-Q	H	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.9	1040-77	Ac-A	V	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.7
1040-18	Ac-Q	H	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	15.9	1040-78	Ac-A	V	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	120.1
1040-19	Ac-Q	H	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.7	1040-79	Ac-A	V	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	0.7
1040-20	Ac-Q	H	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	9.3	1040-80	Ac-A	V	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	4.7
1040-21	Ac-Q	H	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	13.4	1040-81	Ac-A	T	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.8
1040-22	Ac-Q	H	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	76.7	1040-82	Ac-A	T	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	77.2
1040-23	Ac-Q	H	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.0	1040-83	Ac-A	T	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.5
1040-24	Ac-Q	H	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	18.1	1040-84	Ac-A	T	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	50.7
1040-25	Ac-Y	V	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.2	1040-85	Ac-A	T	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	14.2
1040-26	Ac-Y	V	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	26.2	1040-86	Ac-A	T	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	260.8
1040-27	Ac-Y	V	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	15.7	1040-87	Ac-A	T	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	7.5
1040-28	Ac-Y	V	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	64.4	1040-88	Ac-A	T	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	476.1
1040-29	Ac-Y	V	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	7.5	1040-89	Ac-A	H	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	9.0
1040-30	Ac-Y	V	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	250.4	1040-90	Ac-A	H	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	36.3
1040-31	Ac-Y	V	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	0.7	1040-91	Ac-A	H	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.5
1040-32	Ac-Y	V	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	15.6	1040-92	Ac-A	H	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	27.5
1040-33	Ac-Y	T	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	17.6	1040-93	Ac-A	H	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	10.5
1040-34	Ac-Y	T	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	111.1	1040-94	Ac-A	H	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	124.1
1040-35	Ac-Y	T	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	0.9	1040-95	Ac-A	H	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.5
1040-36	Ac-Y	T	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	23.5	1040-96	Ac-A	H	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	10.9
1040-37	Ac-Y	T	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	26.4	1040-97	Ac-M	V	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.2
1040-38	Ac-Y	T	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	621.4	1040-98	Ac-M	V	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	43.5
1040-39	Ac-Y	T	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.2	1040-99	Ac-M	V	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.1
1040-40	Ac-Y	T	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	0.2	1040-100	Ac-M	V	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	9.6
1040-41	Ac-Y	H	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	0.3	1040-101	Ac-M	V	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	9.7
1040-42	Ac-Y	H	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	3.1	1040-102	Ac-M	V	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	68.4
1040-43	Ac-Y	H	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	0.01	1040-103	Ac-M	V	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.64
1040-44	Ac-Y	H	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	36.4	1040-104	Ac-M	V	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	7.4
1040-45	Ac-Y	H	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	19.1	1040-105	Ac-M	T	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	6.4
1040-46	Ac-Y	H	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	693.4	1040-106	Ac-M	T	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	96.1
1040-47	Ac-Y	H	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	4.0	1040-107	Ac-M	T	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.4
1040-48	Ac-Y	H	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	28.6	1040-108	Ac-M	T	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	19.2
1040-49	Ac-R	V	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	6.8	1040-109	Ac-M	T	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	16.6
1040-50	Ac-R	V	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	32.7	1040-110	Ac-M	T	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	57.7
1040-51	Ac-R	V	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	0.8	1040-111	Ac-M	T	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.4
1040-52	Ac-R	V	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	5.3	1040-112	Ac-M	T	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	13.0
1040-53	Ac-R	V	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	10.6	1040-113	Ac-M	H	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.4
1040-54	Ac-R	V	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	170.0	1040-114	Ac-M	H	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	32.3
1040-55	Ac-R	V	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.2	1040-115	Ac-M	H	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.3
1040-56	Ac-R	V	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	16.8	1040-116	Ac-M	H	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	7.5
1040-57	Ac-R	T	L	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	9.6	1040-117	Ac-M	H	R	P	L	W	G	R	M	E	NH <sub>2</sub>	10.2
1040-58	Ac-R	T	L	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	89.0	1040-118	Ac-M	H	R	P	L	W	G	R	M	G	NH <sub>2</sub>	157.7
1040-59	Ac-R	T	L	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	1.9	1040-119	Ac-M	H	R	P	L	W	V	R	M	E	NH <sub>2</sub>	2.1
1040-60	Ac-R	T	L	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	6.5	1040-120	Ac-M	H	R	P	L	W	V	R	M	G	NH <sub>2</sub>	24.3

Tabla 6. Secuencias peptidicas sintetizadas y ensayadas en células BDC2.5.

Combinacion			Numero de peptidos en cada rango de EC <sub>50</sub>			
			<10 nM	10-100 nM	>100 nM	
R3	V7	E10	15	0	0	
L3	V7	E10	14	1	0	
L3	G7	E10	13	2	0	
R3	G7	E10	6	9	0	
L3	V7	G10	7	8	0	
R3	V7	G10	5	9	1	
L3	G7	G10	1	12	2	
R3	G7	G10	1	4	10	
Peptidos totales:			62	45	13	= 120

**TABLA 7.** Correlación entre las combinaciones específicas de aminoácidos presentes en los 120 péptidos seleccionados y sintetizados luego del proceso de desconvolución y su capacidad estimuladora en células BDC2.5. Los 120 péptidos fueron agrupados según los aminoácidos usados en las posiciones 3, 7 y 10 (15 péptidos/grupo) y su rango de actividad.

## 2. IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS PRESENTES EN PROTEÍNAS NATURALES CAPACES DE ESTIMULAR CÉLULAS BDC2.5

### 2.1 HOMOLOGÍA CON LA PROTEÍNA PANCREÁTICA GAD65

En este punto del proceso no sólo habíamos identificado un conjunto significativo de péptidos capaces de estimular células diabetogénicas BDC2.5 sino que además poseíamos un gran conocimiento sobre la especificidad del reconocimiento de ligandos por parte de estas células basado en los resultados que obtuvimos en cada uno de los pasos del proceso de desconvolución. Nuestro objetivo consistía ahora en determinar si alguna de estas secuencias identificadas ó alguno de los péptidos incluidos en las mezclas activas formaba parte de alguna proteína presente en ratones ó, de alguna proteína que por evidencia acumulada se encontrara relacionada con diabetes. Para realizar este objetivo usamos un programa de búsqueda disponible en Internet (<http://www.expasy.ch/tools/scnpsit2.html>). Dicho programa compara la secuencia o secuencias de interés con todas las proteínas presentes en dos completos banco de datos: SWISS-PROT y TRMBL. Por lo tanto, y haciendo uso de esta tecnología entramos en el programa todos los péptidos de la mezcla activa N37-103P4M9, entre los cuales están incluidos los 120 péptidos individuales identificados (Tablas 3 y 6). Esta búsqueda no dió como resultado ningún péptido relevante. Sin embargo cuando nos concentramos sólo en el conjunto de los antígenos



asociados hasta el momento con diabetes notamos que existe un fragmento de la proteína GAD65 que posee alta homología con uno de los péptidos incluidos en la mezcla N37-103P4M9 (Tabla 3). Dicho fragmento posee la siguiente secuencia aminoacídica: 524-SRLSKVAPVIKARMMEYGTT-543 y ha sido largamente involucrado en la patogénesis con diabetes (ver introducción). La Tabla 8 muestra la homología observada.

Dos observaciones surgen de esta comparación: 1- Dado que en la posición 1 no se especifica ningún aminoácido (Tabla 8) son ocho los péptidos incluidos en la mezcla N37-103P4M9 que poseen homología con el fragmento de GAD65, 2- Si bien 9 de los 10 residuos de los decapeptidos son homólogos con GAD65, esta homología no es perfecta ya que los residuos comunes no están 100%

Mezcla N37-103P4M9										
X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	
W	P	A	P	P	W	V	M	M	M	
Y	R	L		G	S	R		Y	T	
L	H	M		V	Q	M		C	G	
M	V	P		L	H	G		T	A	
N	G	R		T	R	L		K	W	
A	S			H	A	F			E	
Q	T									
R										
GAD65 524-543 S R L S K V A P V I K A R M M E Y G T T										

**Tabla 8.** Homología encontrada entre la mezcla N37-103P4M9 y el fragmento 524-543 de la proteína GAD65. En azul se muestran los residuos aminoacídicos en común. Los aminoácidos se simbolizan según el código de una letra (ver anexo).

alineados.

En base a lo mencionado anteriormente y con el objetivo de determinar la importancia de la homología encontrada en relación al estudio de GAD65 como posible autoantígeno de las células T diabetogénicas BDC2.5 se procedió al diseño, síntesis y ensayo en células BDC2.5 de los posibles péptidos individuales relacionados con GAD65. Dichos péptidos con sus respectivos EC<sub>50</sub> se muestran en la Tabla 9.

El primer grupo de ligandos que se sintetizó constituye el de los decapeptidos contenidos en la secuencia 524-543 de la proteína GAD65 (serie N65, Tabla 9). De esta manera se pensó estudiar la

posibilidad que dentro de dicho fragmento existe un epítipo específico que es capaz de activar las células BDC2.5. Dichos péptidos se solapan secuencialmente en 8 aminoácidos de manera que la mayoría de los epítipos del fragmento quedan incluidos. Todos los péptidos de esta serie resultaron no capaces de activar células BDC2.5. Con la intención de mantener la homología con GAD65 y a la vez

Peptido o Mezcla	Secuencia										EC <sub>50</sub> µg/ml	IE <sub>5</sub> a 1µg/ml								
GAD65 524-541	S	R	L	S	K	V	A	P	V	I	K	A	R	M	M	E	Y	G		
N65-15	S	R	L	S	K	V	A	P	V	I									No activo	
N65-16			L	S	K	V	A	P	V	I	K	A							No activo	
N65-17					K	V	A	P	V	I	K	A	R	M					No activo	
N65-18						V	A	P	V	I	K	A	R	M	M				No activo	
N65-19							A	P	V	I	K	A	R	M	M	E			No activo	
N65-20								P	V	I	K	A	R	M	M	E	Y		No activo	
N65-21									V	I	K	A	R	M	M	E	Y	G	No activo	
N37-103P4M9					X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>					1	
					A	G	A	P	G	A	F	I	M	A						
					L	H	L		H	H	G	M		E						
					M	P	M		L	Q	L	R		G						
					N	R	P		P	R	M	S		M						
					Q	S	R		T	S	R			T						
					R	T			V	W	V			W						
					W	V														
					Y															
1047-1					A	V	A	P	V	W	V	R	M	M					1	35
2					Y	V	A	P	V	W	V	R	M	M					0.9	34
3					R	V	A	P	V	W	V	R	M	M					0.5	38
4					Q	V	A	P	V	W	V	R	M	M					0.03	59
5					K	V	A	P	V	W	V	R	M	M					0.3	42
6					A	V	A	P	V	W	V	R	M	E					0.006	122
7					Y	V	A	P	V	W	V	R	M	E					0.002	148
8					R	V	A	P	V	W	V	R	M	E					0.004	135
9					Q	V	A	P	V	W	V	R	M	E					0.002	138
10					K	V	A	P	V	W	V	R	M	E					0.004	125
1040-133					K	V	A	P	V	I	K	A	R	M	M	E			>100	10
1068-55					K	V	A	P	V	W	V	A	R	M	M	E			>100	11
56					K	V	A	P	V	W	V	R	M	M	E				0.1	148
1098-11			L	S	K	V	A	P	V	I	K	A	R	M	M	E	Y	G	4.3	17

**Tabla 9.** Actividad de la mezcla N37-103P4M9 y de los péptidos diseñados en relación al estudio de GAD65 como posible autoantígeno de las células diabetogénicas BDC2.5. La serie de péptidos N65 incluye todos los decapeptidos solapados de a ocho aminoácidos incluidos en el fragmento 523-543 de GAD65. La serie 1047 incluye decapeptidos diseñados a partir de la mezcla N37-103P4M9. Se muestran también péptidos de 11, 12 y 16 aminoácidos de longitud que fueron incluidos en el estudio (ver texto sección 2). Los péptidos y la mezcla fueron ensayados en células BDC2.5. Los pocillos control mostraron estimulación en el rango 1500-3500 cpm. Los aminoácidos se simbolizan en base al código de una letra ( ver anexo).

encontrar ligandos activos se sintetizó una segunda serie de péptidos (serie 1047, Tabla 9). Dicha serie incluye los péptidos de la mezcla N37-103P4M9 que poseen mayor homología con el fragmento 524-543 de GAD65. Para aumentar la homología con GAD65 en estos ligandos se incluyeron los péptidos 1047-5 y 1047-10 los cuales usan lisina (K) en posición 1. Dichos péptidos fueron incluidos en base a los resultados obtenidos con la biblioteca N66 (Tabla 4) en los cuales se observó que en la posición 1 no se requería especialmente de la presencia de ningún residuo con características químicas determinadas para conseguir actividad.

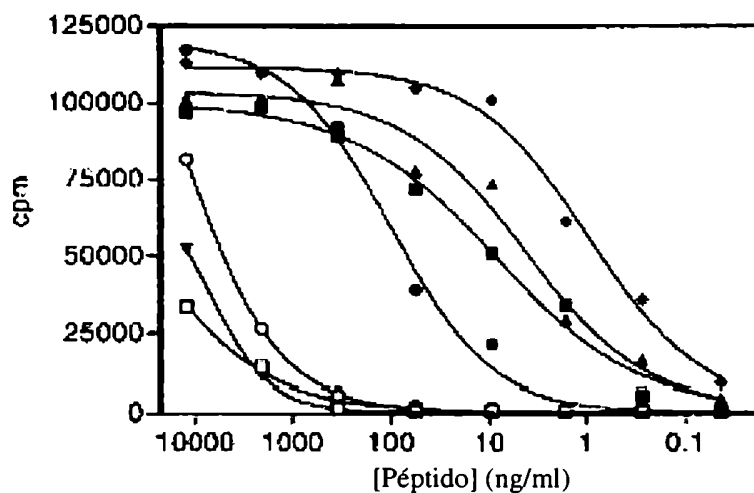
El siguiente paso se realizó con la intención de encontrar los péptidos más similares a GAD65 que sean capaces de activar células BDC2.5. Se sintetizaron secuencialmente 3 péptidos relacionados entre sí y con características particulares. El primero es el péptido 1040-133. Dicho péptido es un fragmento exacto de GAD65 (Tabla 9). La selección particular de este fragmento de 12 residuos se hizo con la intención de incluir todos los residuos que, según lo aprendido durante el proceso de desconvolución, resultaban importante para obtener actividad. Así en el extremo amino se incluyeron los residuos K-V-A-P-V y en el extremo carboxilo se incluyeron los residuos R-M-M-E. Dado que este péptido resultó inactivo se sintetizó un nuevo péptido (1068-55) que posee los mismos aminoácidos de GAD65 en los extremos terminales pero, dado que la presencia de W en posición 6 y V en posición 7 resultó ser importante para la actividad final del péptido se modificaron los residuos I de la posición 6 y K de posición 7 por W y V respectivamente. Este péptido, denominado 1068-55, resultó prácticamente inactivo (IEs = 11, EC<sub>50</sub> > 100 mg/ml). Sin embargo, el péptido 1068-56, en el cual se quitó el residuo A de la posición 8, resultó activo con un EC<sub>50</sub> de 0,1 mg/ml y un IEs de 148.

Finalmente, para explorar la posibilidad que un fragmento más largo de GAD65 sea capaz de activar células BDC2.5, decidimos agregar dos residuos en ambos extremos del fragmento 528-539 de GAD65. De esta manera sintetizamos el fragmento de GAD65 526-541, de 16 aminoácidos de largo. Dicho péptido resultó activo con un EC<sub>50</sub> de 4,3 g/ml y un IEs de 17 (péptido 1098-11, Tabla 9).

La Figura 3 muestra un resumen de la similitud con GAD65 y la actividad de los péptidos sintetizados en este trabajo. Los principales hallazgos son: 1- El fragmento de 12 aminoácidos de largo de GAD65 528-539 (1040-133) es mínimamente activo en células BDC2.5 (EC<sub>50</sub> > 100 mg/ml); 2- La sustitución con W y V en las posiciones 6 y 7 respectivamente (péptido 1068-55) no resultan en un aumento de la actividad; 3- El péptido de 11 aminoácidos de largo, con las mismas sustituciones más la deleción de A en la posición 8 es capaz de activar células BDC2.5 (péptido 1068-56, EC<sub>50</sub> = 1 mg/ml,

Tabla 9); 4- El decapeptido 1047-10 con las sustituciones W y V en las posiciones 6 y 7, la delección de A en la posición 8 y de M en la posición 9 y con el aminoácido E en el extremo carboxilo muestra un gran mejoramiento en actividad ( $EC_{50} = 4.2$  ng/ml). Por último, la secuencia natural de GAD65 526-541 resultó activa aunque con un  $EC_{50} = 4.3$  mg/ml.

La secuencia aminoacídica de la proteína GAD65 deriva de estudios hechos con la cepa de ratón C57BL/6 [9]. Dado que varios de los ligandos altamente efectivos en estimular células BDC2.5 (valores de  $EC_{50}$ s entre 1 y 10 ng/ml) presentan una gran similitud con GAD65 y, que la presencia de W y V en las posiciones 6 y 7 de estos péptidos son imprescindibles para alcanzar dicha actividad, decidimos estudiar la posibilidad que en los ratones NOD, la proteína GAD65 muestre un polimorfismo diferente al nivel de la región estudiada: 526-541. Para realizar este estudio, amplificamos mediante la técnica de PCR el fragmento 524-541 de la proteína GAD65. La secuencia de este fragmento en ratones NOD



Péptido	Símbolo	Secuencia	$EC_{50}$
1040-133	□	K V A P V I K A R M M E	>100000
1098-11	○	L S K V A P V I K A R M M E Y G	2335
1068-55	▽	K V A P V W V A R M M E	>100000
1068-56	●	K V A P V W V R M M E	75
1047-10	■	K V A P V W V R M E	3.3
1040-55	▲	R V R P L W V R M E	0.9
1040-79	◆	A V R P L W V R M E	0.5

Figura 3. Comparación de las curvas de proliferación de los péptidos con secuencias similares a GAD65. Células BDC2.5 fueron estimuladas con los péptidos de GAD65 528-539 y 526-541 (1040-133 y 1098-11), con los péptidos similares a GAD65 (1068-55, 1068-56 y 1047-10) y con los péptidos altamente activos 1040-55 y 1040-79.

resultó ser idéntica a la publicada anteriormente.

### **3. ESTUDIOS *IN VITRO* CON LOS PÉPTIDOS ENCONTRADOS ESPECÍFICOS DE LAS CÉLULAS DIABETOGÉNICAS BDC2.5**

#### **3.1 PATOGENICIDAD**

Habiendo identificado una larga serie de ligandos específicos para las células BDC2.5 nos preguntamos cual sería el potencial patogénico de dichas células activadas en cultivo con estos ligandos. Para esto utilizamos un modelo de transferencia de células BDC2.5 en ratones NOD.scid. En estos ratones, una mutación recesiva llamada scid previene la diferenciación de las células linfocitarias. Sin embargo, si bien dichos ratones no poseen sistema inmunológico, tienen un ambiente adecuado de supervivencia tanto para las células B como para las T y por lo tanto células transferidas dentro de estos animales sobreviven sanas dentro del hospedador.

En nuestro experimento, células BDC2.5 fueron activadas con distintos ligandos incluyendo el péptido de GAD 526-541 de 16 amino ácidos (1098-11), el péptido de GAD 528-539 de 12 amino ácidos (1040-133), el péptido p63-1040 por ser uno de los ligandos más activos *in vitro* (EC50=0.8 ng/ml) y la mezcla de péptidos N37-103P4M9. Células BDC2.5 no estimuladas fueron utilizadas como control negativo, mientras que células estimuladas con el anticuerpo monoclonal anti-TCR/CD3 fueron utilizadas como el control positivo del ensayo. La activación con anti-TCR/CD3 no necesita del complejo antígeno-MHC ya que el anticuerpo se une de manera tal al receptor CD3 produciendo la señal suficiente para desencadenar la cascada de señales de activación de la célula T.

Los resultados pueden observarse en la Tabla 10. Existe una clara correlación entre la capacidad del péptido(s) en estimular las células BDC2.5 y la capacidad de estas células de transferir enfermedad en recipientes NOD./scid. Si bien GAD 528-539 fue capaz de estimular patogenicidad, dicha estimulación requirió 100 ug/ml del péptido y aun así las células transfirieron enfermedad en todos los animales pasadas las dos semanas. Sin embargo, cuando p63-1040 fue usado como estimulante, dichas células transfirieron enfermedad en todos los animales después de 6 días y usando el péptido a una concentración de 0.05 ug/ml. Un caso intermedio serían las células estimuladas con GAD 526-541 a una concentración de 5 ug/ml que causaron enfermedad en todos los ratones a los 15 días post-transferencia. El hecho de que GAD 526-541 activa células BDC2.5 y estas son capaces de causar

enfermedad en ratones NOD/scid abre nuevamente el punto de discusión sobre la posibilidad de que GAD sea el autoantígeno de las células BDC2.5.

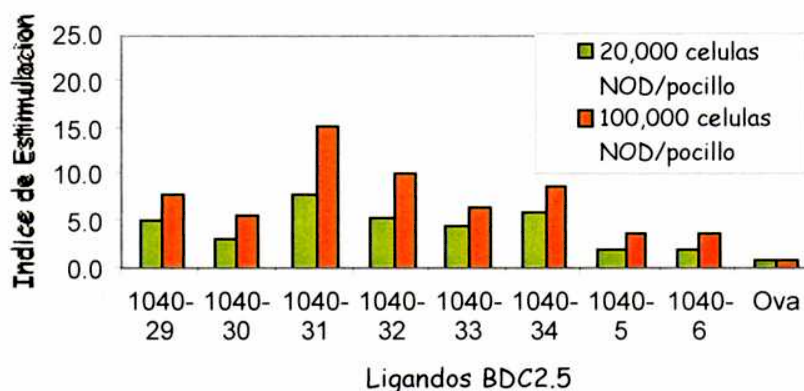
Estimulante	Concentracion (µg/ml)	EC50 (µg/ml)	Incidencia de diabetes			Secuencia
			d 6	d 15	d 30	
Ninguno			0/5	0/5	0/5	
anti-TCR/CD3	10		0/5	2/5	5/5	
N37-103P4M9	10	1	4/5	5/5		X1 X2 X3 P X5 X6 X7 X8 M X10
1040-63	0.05	0.0008	5/5			R T R P L W V R M E
1040-133	100	>100	3/5	5/5		K V A P V I K A R M M E
1098-11	50	4.8				L S K V A P V I K A R M M E Y G

**Tabla 10.** Células del bazo de ratones transgénicos BDC2.5 fueron estimuladas en presencia del anticuerpo anti-CD3, de la mezcla N37-103P4M9, del péptido 1040-63 y de los péptidos de GAD65, 1040-133 y 1098-11. 4 días mas tarde,  $5 \times 10^6$  de células de cada cultivo fueron inyectadas intravenosamente en grupos de 5 ratones NOD/scid. Los controles recibieron células sin estimular. En los días 6, 15 y 30 luego de la transferencia de las células, se midió la concentración de glucosa en sangre en ls ratones NOD/scid. Dos lecturas consecutivas con niveles de glucosa mayores a 300mg/dl fueron considerados indicativos de diabetes.

### 3.2 RESPUESTA DE CÉLULAS T DEL RATÓN NOD A LOS ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE LAS CÉLULAS T BDC2.5

Dado que las células BDC2.5 fueron aisladas originalmente de ratones NOD, nos propusimos estudiar la posibilidad de que células activadas espontáneamente provenientes de ratones hembras pre-diabéticas NOD son capaces de reconocer uno o más de uno de los ligandos identificados en este estudio. Dicho en otras palabras, si las células de ratones NOD responden a dichos antígenos indicaría que al menos uno de los eventos involucrados en el desencadenamiento espontáneo de diabetes autoinmune en los ratones NOD involucra a una significativa fracción de células T que tienen especificidad por el/los ligando/s que hemos identificado en este estudio. Ensayamos la respuesta de células NOD a más de 100 de los péptidos identificados en este trabajo. La Figura 3 resume los resultados obtenidos en esta serie de experimentos. La mayoría de los péptidos causaron una estimulación entre 1.5-2.5 sobre el nivel control. Algunos de los péptidos, incluyendo los péptidos provenientes del fragmento 425-543 de GAD65, no mostraron ninguna actividad significativa sobre el nivel de proliferación control. Sin embargo, fue posible determinar que los péptidos 1040-31 y 1040-32 fueron altamente reconocidos por células NOD, aún cuando sólo se usaron 20,000 células NOD en cada pocillo del ensayo de proliferación (ver materiales y métodos). Por lo tanto, es posible pensar que el hecho de que una gran fracción de células NOD responde a dichos péptidos sugiere que el/los

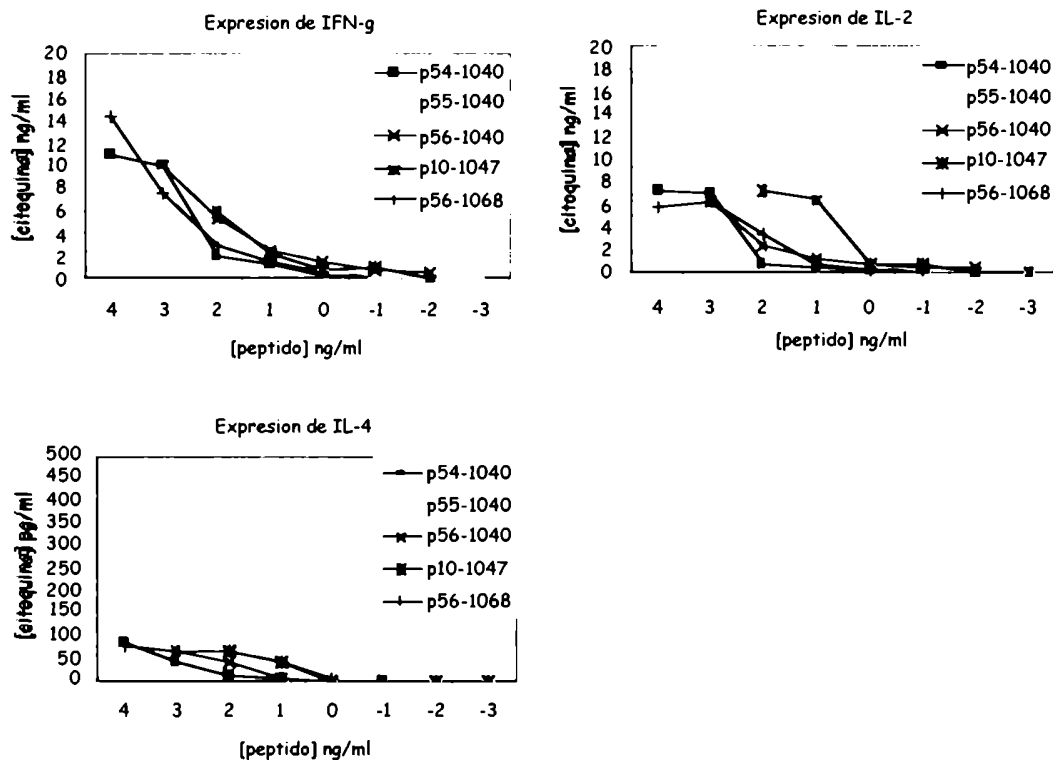
autoantígeno/s involucrados en el desencadenamiento de diabetes autoinmune están estructuralmente relacionados a estos ligandos.



**Figura 4.** Resumen de la capacidad estimuladora en células NOD de los ligandos específicos definidos en este trabajo. Un número de 20,000 (barras verdes) ó 100,000 (barras naranjas) células del bazo de ratones pre-diabéticos NOD fueron cultivadas por 4 días con los antígenos indicados en presencia de 250,000 células NOD irradiadas que cumplieron la función de células presentadoras de antígeno. Cada péptido fue ensayado en 6 pocillos en platos de elisa de 96 pocillos (ver Materiales y Métodos). El experimento mostrado es representativo de 3 experimentos realizados en las mismas condiciones. El Índice de Estimulación indica cuantas veces el cultivo proliferó con respecto a los pocillos control (péptido OVA).

### 3.3 PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS DE LAS CÉLULAS BDC2.5 ESTIMULADAS CON LOS LIGANDOS DEFINIDOS EN ESTE TRABAJO

A pesar que varios tipos celulares intervienen en el desencadenamiento de diabetes tanto en ratones como en humanos, las células CD4<sup>+</sup> son suficientes para transferir enfermedad cuando se encuentran presentes en suficiente frecuencia [10] (ver Introducción). En particular las células T CD4<sup>+</sup> del tipo 1 que secretan IFN- $\gamma$  y IL-2 son las responsables de la transferencia de diabetes en ratones NOD y en ratones NOD/scid [11] mayormente debido a los efectos mediados por estas citoquinas [12-15]. En cambio, las células T CD4<sup>+</sup> del tipo 2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10 y no sólo no son capaces de



**Figura 5.** Ligandos con diferentes actividades proliferativas en células BDC2.5 desencadenan un perfil de citoquinas del tipo 1. Células BDC2.5 fueron cultivadas durante 48 horas con los péptidos indicados. A las 24 horas de cultivo se recogieron los sobrenadantes para cuantificar la presencia de IL-2 e IFN- $\gamma$  y a las 48 horas se recogieron los sobrenadantes para cuantificar la presencia de IL-4. La cuantificación se realizó mediante un ensayo de Elisa (ver materiales y métodos).

transferir diabetes sino que además se ha sugerido que poseen un efecto protector [16]. Por otra parte se ha propuesto que es posible inmuno-modular la respuesta de las células T hacia un perfil del tipo 1 o del tipo 2 dependiendo por ejemplo del tipo de antígeno que se use, la vía de administración del antígeno ó mediante la inyección directa de citoquinas del tipo 2. En este trabajo, dado el extenso número de antígenos identificados y aprovechando las diferentes características que cada uno de ellos presenta, nos propusimos evaluar el perfil de citoquinas expresado por las células T BDC2.5 luego de la estimulación con estos ligandos. Si encontráramos un péptido capaz de desencadenar la activación de células con un perfil de citoquinas del tipo 2, podríamos entonces evaluar este antígeno como posible modulador del desencadenamiento de enfermedad. Para ensayar la expresión de citoquinas luego de la estimulación con varios de los ligandos definidos en este trabajo se usó la técnica de Elisa (ver Materiales y Métodos). Las citoquinas cuantificadas fueron IL-2, IFN- $\gamma$  y IL-4. Los resultados se muestran



en la Figura 5. Como puede observarse todos los péptidos incluidos en este experimento desencadenaron una respuesta de citoquinas del tipo 1, y la cantidad de citoquinas expresada fue directamente proporcional a la cantidad de antígeno usado para estimular las células. Por lo tanto de estos experimentos concluimos que ninguno de los péptidos, independientemente de la cantidad en la que sean ensayados, son capaces de desencadenar una respuesta del tipo 2.

#### 4. ESTUDIOS *IN VIVO* CON LOS PÉPTIDOS ENCONTRADOS ESPECÍFICOS DE LAS CÉLULAS DIABETOGÉNICAS BDC2.5

##### 4.1 PÉPTIDOS CON ALTA CAPACIDAD DE ESTIMULAR CÉLULAS DIABETOGÉNICAS *IN VITRO*, NO CAUSAN DIABETES CUANDO SON PRESENTADOS *IN VIVO*.

Basado en la alta capacidad estimuladora de los superagonistas identificados en este estudio cuando fueron presentados *in vitro* a células BDC2.5 y que dichas células activadas causaron enfermedad cuando fueron transferidas a ratones NOD.*scid*, es posible predecir que dichos péptidos podrían ser potentes inductores de diabetes cuando fueran presentados a ratones BDC2.5 *in vivo*. Sin embargo no resultó ser así. Los diferentes protocolos de inmunizaciones usados en estos estudios se muestran en la Tabla 11. El péptido 1040-55 fue seleccionado por ser uno de los diez péptidos con mejor actividad estimuladora *in vitro*.

Peptido	S E C U E N C I A	EC <sub>50</sub> μg/ml	Adyuvante	Via de inmunizacion
1040-55	R V L P V W V R M E	0.0012	ODNs	2 SC
1040-55	R V L P V W V R M E	0.0012	LPS	2 SC
1040-55	R V L P V W V R M E	0.0012	CFA	2 SC
1040-55	R V L P V W V R M E	0.0012	ODNs	2 IV

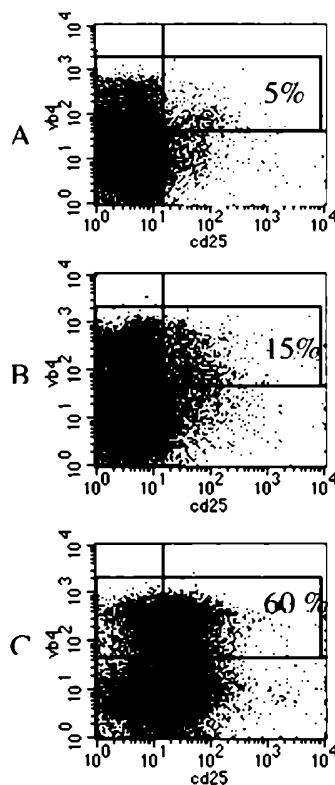
**Tabla 11.** Protocolos usados para la inmunización *in vivo* de ratones BDC2.5 con el péptido 1040-55. El péptido fue inyectado subcutáneamente (SC) ó intravenosamente (IV), disuelto en oligodeoxiribonucleotidos (ODNs), lipopolisacáridos (LPS) ó en adyuvante completo de Freund (CFA).

Se usaron tres diferentes tipos de adyuvantes: ODNs, LPS y CFA y se probaron dos vías de inmunización: intravenosa y subcutánea. La elección de los adyuvantes y de las vías de inmunización fue

basada en diferentes estudios [17-20]. Luego de recibir las inmunizaciones se procedió a monitorear semanalmente el nivel de glucosa en sangre en todos los ratones (ver materiales y métodos). Pasado un período de 12 semanas ninguno de los ratones inmunizados mostró un aumento significativo en los niveles de glucosa sanguínea.

Basado en recientes trabajos que proponen que péptidos de alta afinidad causan delección de las células en vez de eficiente activación y expansión [21-23] decidimos estudiar los péptidos 1068-56 y 1098-11 (secuencia de GAD65) dado que mostraron una actividad *in vitro* entre 100 y 1000 veces más baja que el superagonista 1040-55. Dichos péptidos tampoco causaron enfermedad siguiendo los mismos protocolos que con el péptido 1040-55.

El hecho que ninguno de los péptidos fue capaz de causar enfermedad nos hizo pensar que quizás dichos péptidos no son capaces de causar activación de las células BDC2.5 cuando son presentados *in vivo*. Para testear esta hipótesis 3 grupos de ratones BDC2.5 fueron inmunizados en



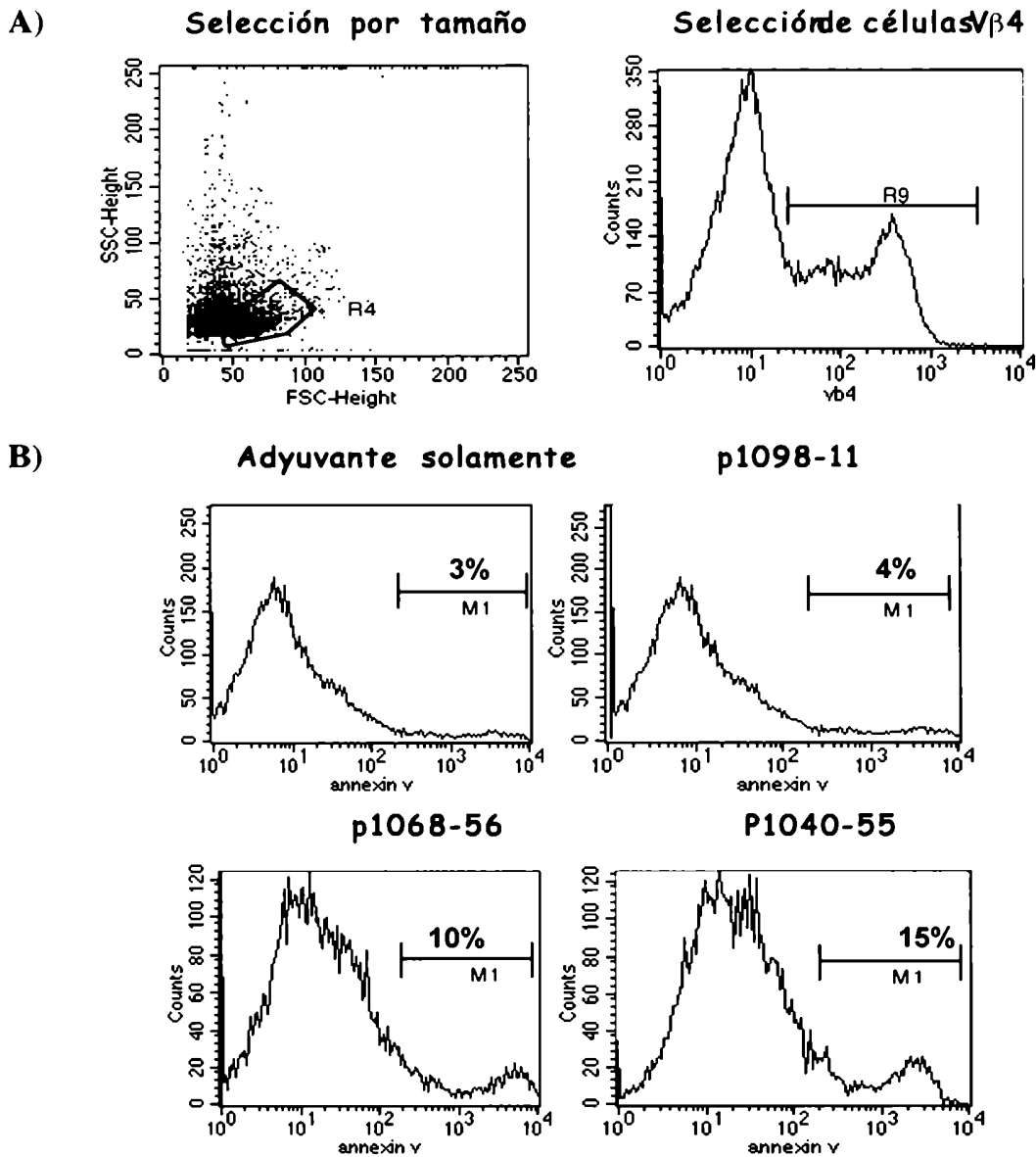
**Figura 6.** Porcentaje de células activadas Vb4+CD25+ en nódulos pancreáticos de ratones BDC2.5 tres días luego de ser inmunizados subcutáneamente con adyuvante solamente (A) ó con los péptidos 1068-56 (B) ó 1040-55 (C). La figura muestra los resultados obtenidos en un experimento representativo de tres.

forma subcutánea con el péptido 1040-55, 1068-56 ó 1098-11 disuelto en ODNs y IFA. Tres días mas tarde los ratones fueron sacrificados para estudiar la presencia de células activadas en los nódulos linfáticos que drenan el área de la inmunización. La medición de la activación de las células se llevó a cabo mediante la cuantificación de la expresión del receptor de interleuquina -2 (IL-2). Dicho receptor se denomina CD25 y se ha demostrado que su expresión se ve aumentada en linfocitos T CD4+ activados [24, 25]. Para la marcación de las células T CD4+ se usó el anticuerpo anti-V $\beta$ 4 ya que V $\beta$ 4 es el haplotipo de la cadena  $\beta$  del receptor celular T de las células transgénicas BDC2.5 (ver Materiales y Métodos). El experimento se realizó tres veces consecutivas obteniendo los mismos resultados. Como puede observarse en la Figura 6, los péptidos 1040-55 (EC50=1.2 ng/ml) y 1068-56 (EC50=100 ng/ml) no sólo fueron capaces de activar las células *in vivo* si se compara con el control, sino que el porcentaje de células T activadas (V $\beta$ 4+ CD25+) resultó directamente proporcional al EC50 del péptido medido *in vitro*. El porcentaje de células activadas en los ratones inmunizados con el péptido 1098-11 (EC50=4300 ng/ml) resultó idéntico al de los ratones control (Figura 6, cuadro A).

El hecho de que el péptido 1040-55 fue altamente capaz de activar células BDC2.5 pero no de causar diabetes mediante la directa inmunización *in vivo* en ratones BDC2.5 nos sugirió que algún mecanismo de tolerancia podría estar funcionando en estos ratones, controlando la viabilidad de las células activadas previniéndose así el desencadenamiento de enfermedad.

#### **4.2 PÉPTIDOS CON ALTA CAPACIDAD DE ESTIMULAR CÉLULAS DIABETOGÉNICAS IN VITRO CAUSAN MUERTE POR APOPTOSIS CUANDO SON PRESENTADOS IN VIVO.**

Con el objetivo de estudiar la posibilidad de que las células específicas T BDC2.5 son eliminadas mediante muerte por apoptosis luego de ser estimuladas *in vivo* con un superagonista como el péptido 1040-55, nódulos linfáticos de ratones BDC2.5 inmunizados fueron procesados y analizados por Citometría de Flujo de cuatro colores (ver Materiales y Métodos). Para identificar las células activadas presentes en los nódulos linfáticos analizados se usaron los anticuerpos anti-V $\beta$ 4 y anti-CD25 (ver sección anterior). Para estudiar el grado apoptótico de las células se usaron los marcadores, Annexin-V y 7AAD. La unión de Annexin-V a las células indica que hay un cambio en la conformación de los fosfolípidos de la membrana celular, lo cual es observado cuando las células están muertas ó desencadenando un proceso apoptótico. Como las células que ya están muertas y unen Annexin-V pueden haber muerto por otro proceso diferente al de apoptosis es necesario identificarlas para así



**Figura 7.** Análisis en citometría de flujo del porcentaje de apoptosis en células de ratones inmunizados con péptidos de variada afinidad. (A) Células de ratones inmunizados con adyuvante solamente o con los péptidos descritos fueron primero seleccionadas por tamaño y luego por la expresión del marcador V $\beta$ 4 (células BDC2.5). (B) Los diagramas muestran el porcentaje de expresión del marcador de apoptosis annexin-V.

excluir las del análisis. Para esto se usó 7AAD fluorescente que se incorpora sólo a las células muertas permitiendo así su identificación y posterior exclusión del análisis final.

La Figura 7 muestra los resultados obtenidos en esta serie de experimentos. Como puede observarse, el porcentaje de células BDC2.5 (V $\beta$ 4+) apoptóticas en cada grupo resultó directamente proporcional a la afinidad del antígeno usado en la inmunización. Así, el péptido 1040-55 provocó un 15% de apoptosis, el péptido 1068-56 un 10% y el péptido 1098-11 un 4%. Los ratones control (adyuvante solamente) mostraron un nivel de apoptosis del 3 %.

Los resultados obtenidos en esta serie de experimentos sugieren fuertemente que la inmunización con un péptido de gran afinidad como 1040-55 puede causar la muerte por apoptosis de las células diabetogénicas BDC2.5 cuando es presentado *in vivo* y que por lo tanto podría ser utilizado para eliminar selectivamente las células patogénicas durante el desarrollo de enfermedad.

### **4.3 PÉPTIDOS CON ALTA CAPACIDAD DE ESTIMULAR CÉLULAS DIABETOGÉNICAS *IN VITRO*, PREVIENEN EL DESENCADENAMIENTO DE DIABETES *IN VIVO***

Para ensayar si péptidos superagonistas podrían ser usados para eliminar selectivamente las células BDC2.5 y prevenir el desencadenamiento de diabetes necesitamos diseñar un modelo *in vivo* que nos permitiera estudiar específicamente las células patogénicas en un sistema de enfermedad lo más real posible. El problema que presentaba el ratón BDC2.5 radica en que la mayoría de células T CD4+ en este ratón resultan patogénicas y por lo tanto resultaba un grupo demasiado grande como para poder estudiar la eficiente eliminación de todas las células. Por el contrario, el problema de trabajar con el ratón NOD era que si bien posee células que responden específicamente a este antígeno, la frecuencia de este grupo de células es demasiado baja como para poder estudiarlas. Por lo tanto, elegimos trabajar con un modelo denominado "Modelo de transferencia adoptiva de diabetes". Este modelo se basa en la capacidad que tienen las células activadas BDC2.5 de causar diabetes cuando son transferidas en recipientes sanos NOD. La ventaja de este modelo es que se trabaja con ratones NOD (no transgénicos) en los cuales la frecuencia de las células patogénicas es artificialmente aumentado para facilitar su estudio detallado.

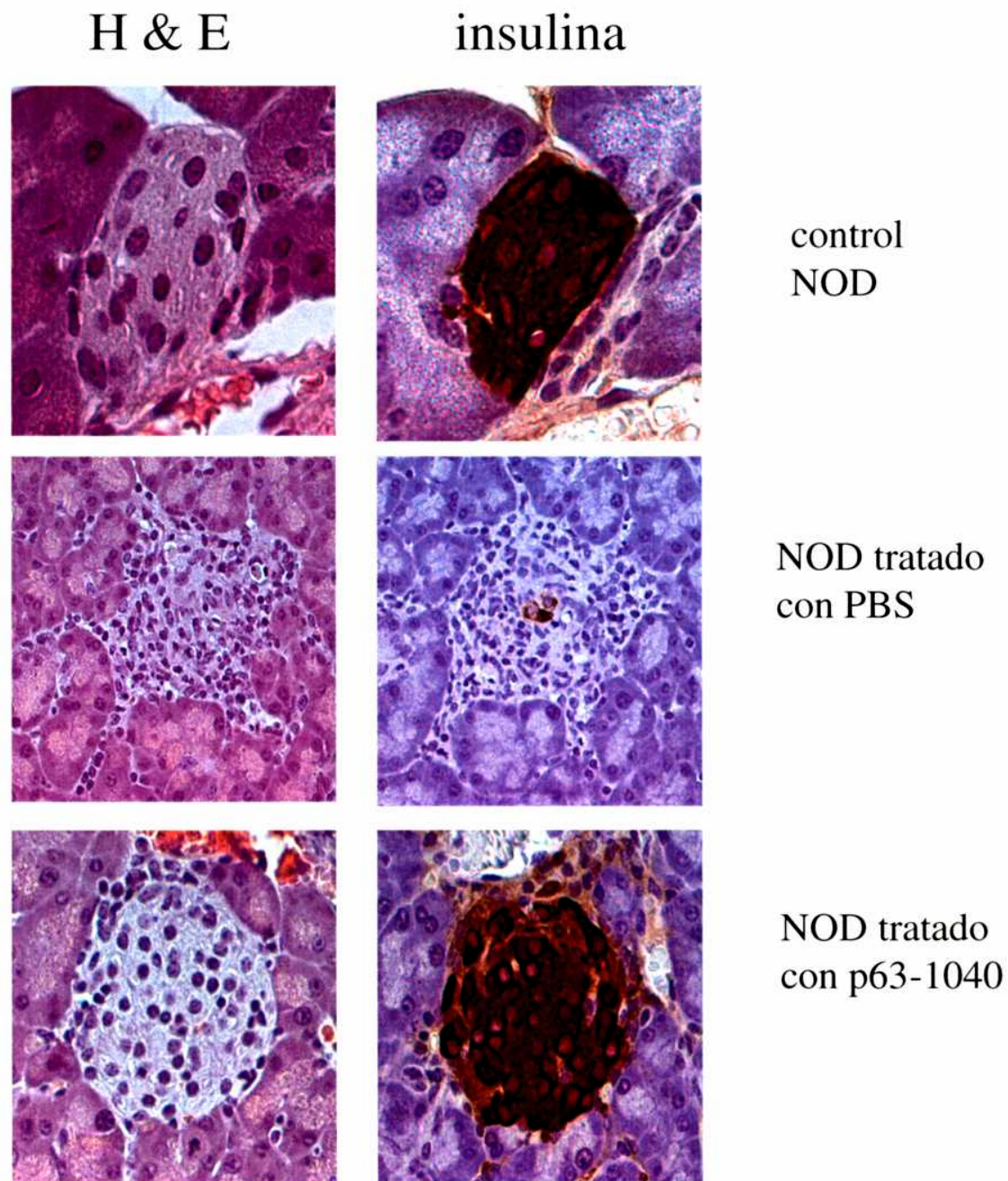
Debido a que el objetivo de esta serie de experimentos era estudiar la posibilidad de que un péptido de alta afinidad pueda ser usado para controlar el curso de diabetes, las células BDC2.5 fueron activadas *in vitro* durante tres días con el péptido 1040-63 antes de ser transferidas en ratones NOD (ver Materiales y Métodos) para simular la misma situación que se observa en pacientes enfermos en los cuales células reactivas contra antígenos pancreáticos circulan en la periferia (ver Introducción). La

Recipiente	Número de células BDC2.5 transferidas (en millones)	Tratamiento	Incidencia de diabetes día 7	Incidencia de diabetes día 10
NOD	25	ninguno	4/5	5/5
NOD	5	ninguno	0/5	0/5
NOD	25	PBS IV	5/5	5/5
NOD	25	p63-1040 IV	0/5	0/5

**Tabla 12.** Prevención de diabetes en el modelo de transferencia de diabetes mediante la inmunización *in vivo* del péptido de alta afinidad p1040-63. Células del bazo de ratones BDC2.5 fueron activadas *in vitro* durante tres días y luego transferidas en la cantidad indicada (en millones) en ratones receptores NOD. Un día después los ratones fueron no tratados ó inmunizados intravenosamente (IV) con solución salina (PBS) ó con el péptido 1040-63 disuelto en PBS. En los días 7 y 10 luego de la transferencia de las células se midió la concentración de glucosa en la sangre de los ratones NOD. Dos lecturas consecutivas con niveles de glucosa mayores a 300 mg/dl fueron considerados indicativos de diabetes.

elección de usar el péptido superagonista p1040-63 en esta serie de experimentos fue basada en su alta capacidad estimuladora ( $EC_{50}=1.2$  nM). Como puede observarse en la Tabla 12, ratones NOD que reciben células activadas BDC2.5 desarrollaron diabetes en un término entre siete y diez días post-transferencia. En base a trabajos que reportaron que el tratamiento con antígeno en forma intravenosa causa tolerancia de las células reactivas, el primer paso fue inmunizar ratones NOD con el péptido 1040-63 en forma intravenosa un día después de recibir las células activadas BDC2.5. Ninguno de los ratones desarrolló diabetes en dos experimentos realizados en las mismas condiciones. Por el contrario, el 100% de los ratones que sólo recibieron solución salina en forma intravenosa desarrollaron diabetes al cabo de siete días (Tabla 12). Aún más, cuando los animales fueron sacrificados y los páncreas analizados por histología, los ratones que recibieron solución salina presentaron extensa infiltración de linfocitos de forma contraria a los animales que recibieron inmunización con 1040-63 en los cuales se observó baja o nula infiltración (Figura 8).

Es importante notar que la transferencia de diabetes a ratones NOD no se logró con 5 millones de células BDC2.5 T lo cual sugiere que la inmunización con péptido podría causar algún mecanismo de tolerancia de las células patógenas llevándolas a un número no suficiente para causar enfermedad.

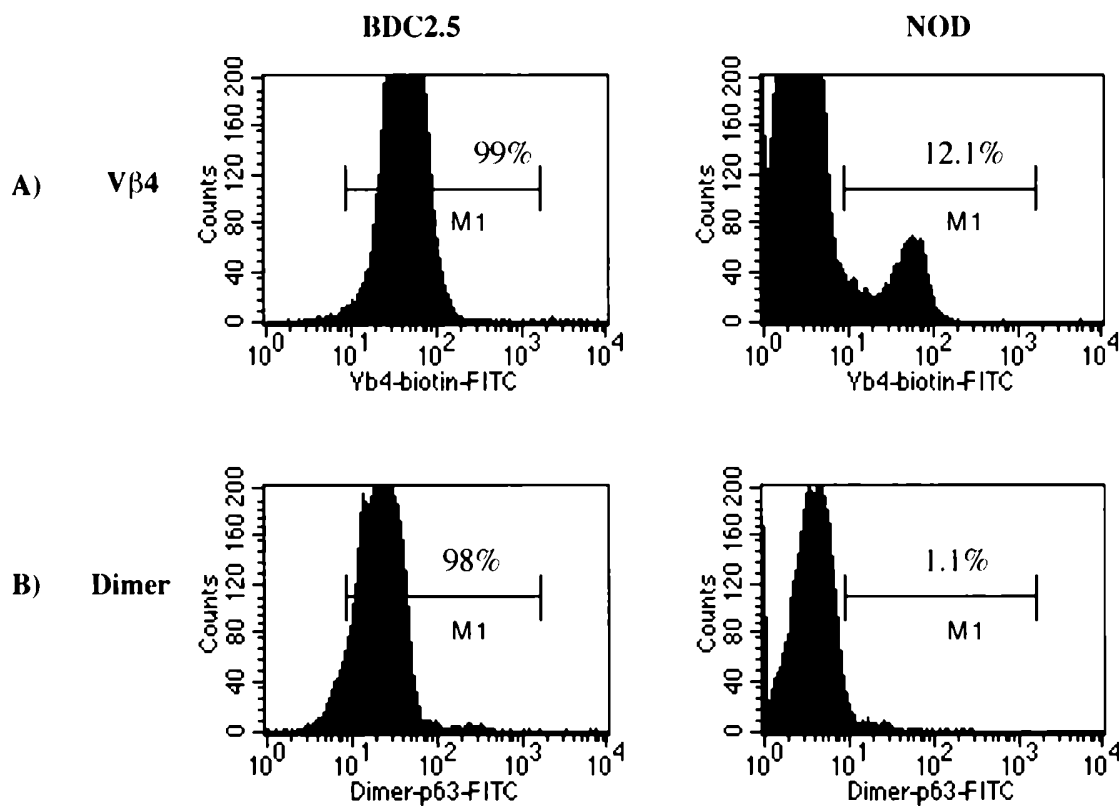


**Figura 8.** Análisis histológico del páncreas de ratones NOD que fueron transferidos con células patogénicas BDC2.5 e inmunizados intravenosamente con pbs ó con el péptido p63-1040 un día mas tarde. Las fotos de la izquierda (tinción con H&E, ver Materiales y Métodos) permiten ver el grado de infiltración de los linfocitos en los islotes del páncreas mientras que los paneles de la derecha muestran las mismas secciones teñidas con un anticuerpo específico anti-insulina. Como puedo observarse, los tejidos de ratones NOD que recibieron tratamiento con el péptido p63-1040 poseen baja infiltración de linfocitos y muestran una capacidad de producción de insulina comparable a la de los ratones NOD que no recibieron células patogénicas (ratones control).

Los resultados presentados en esta sección demuestran claramente y en forma directa que la terapia con el antígeno de alta afinidad 1040-63 ( $EC_{50}=1.2$  ng/ml) resultó efectiva para controlar el desarrollo de diabetes en ratones NOD que recibieron células patogénicas BDC2.5.

#### 4.3.1 LA INMUNIZACIÓN *IN VIVO* CON UN PÉPTIDO DE ALTA AFINIDAD PREVIENE ENFERMEDAD EN EL "MODELO DE TRANSFERENCIA DE DIABETES" MEDIANTE LA DELECCIÓN DIRECTA DE LAS CÉLULAS PATOGENICAS

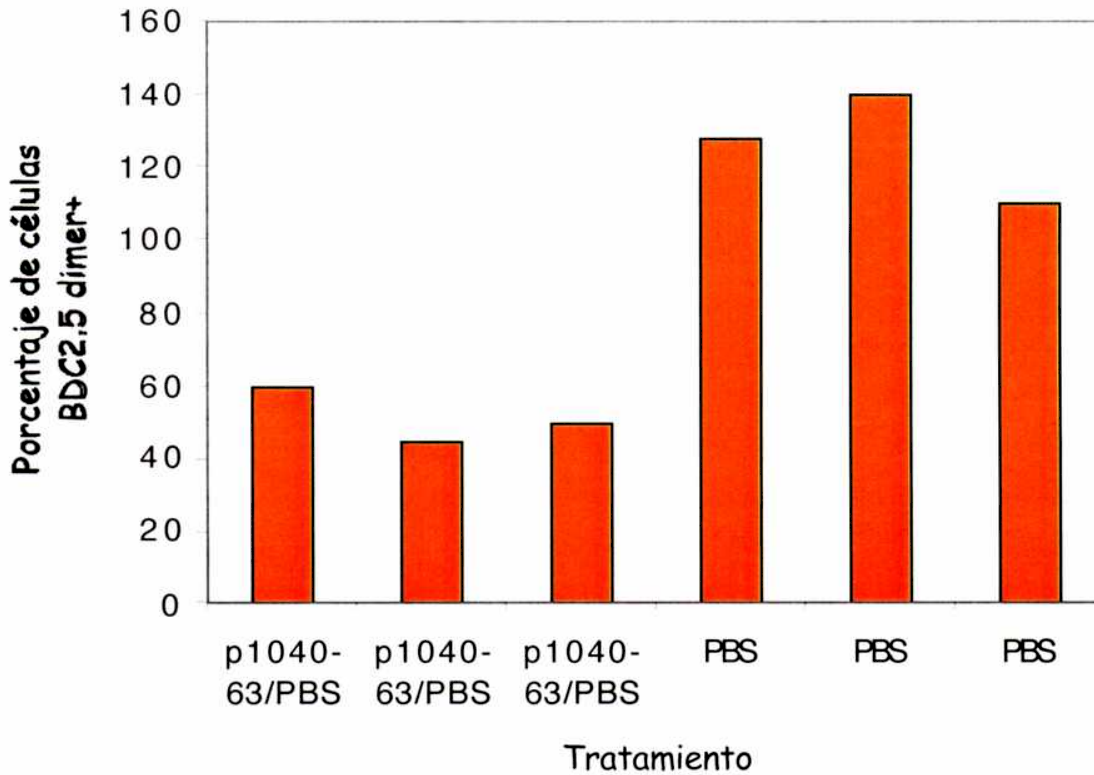
En la sección anterior demostramos que la inmunización *in vivo* con el péptido 1040-55 previene diabetes. Sin embargo, el mecanismo no estaba dilucidado. En base a los experimentos realizados en ratones BDC2.5 (sección 4.2) sabemos que la inmunización *in vivo* con 1040-63 causaba la delección por apoptosis de las células que reconocen al antígeno. Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la presencia de 5 millones de células patogénicas no fue suficiente para causar enfermedad. Por lo tanto,



**Figura 9.** Marcación específica de células BDC2.5 con el "dimer p1040-63". Células del vaso de ratones BDC2.5 ó NOD fueron teñidas con V $\beta$ 4 (A) ó con el "dimer p1040-63" (B) (ver materiales y métodos). Los histogramas muestran el porcentaje de células que resultó positivo (M1) en cada caso.



decidimos evaluar si en el modelo de transferencia de diabetes, el mecanismo por el cual se previene enfermedad mediante la inmunización con 1040-55 estaba dada por la delección específica de las células patogénicas llevándolas a un número no suficiente para desencadenar diabetes.



**Figura 10.** La inmunización *in vivo* con el péptido de alta afinidad p1040-63 causa una disminución significativa de las células activadas BDC2.5 en el modelo de transferencia de diabetes. Cada barra representa el aumento en porcentaje de células que tiñieron positivamente con el dimer (células BDC2.5) en cada ratón individual con respecto al nivel basal encontrado en ratones NOD no tratados. El análisis se realizó en citometría de flujo (ver materiales y métodos). Ratones NOD (3 ratones por grupo) fueron inmunizados intravenosamente con el péptido p1040-63 ó con solución salina (PBS) un día después de recibir la transferencia de células activas BDC2.5.

Una manera directa de ensayar si la delección específica de las células patogénicas es el mecanismo por el cual se previene diabetes sería cuantificar las células transferidas BDC2.5 en ratones NOD luego de recibir tratamiento con o sin el péptido 1040-63. Pero cómo cuantificar específicamente las células BDC2.5 en todo el conjunto de células T del ratón NOD? Dado que V $\beta$ 4 es el haplotipo de la cadena  $\beta$  del receptor celular T de las células transgénicas BDC2.5 una posibilidad consistía en analizar

mediante citometría de flujo (ver Materiales y Métodos) la presencia de células V $\beta$ 4+ en nódulos pancreáticos de los ratones NOD siete a diez días post-transferencia de las células BDC2.5, es decir cuando los ratones control desarrollan enfermedad. Así, la presencia de un número significativamente menor de células V $\beta$ 4+ en nódulos pancreáticos de ratones sanos (tratados con el péptido) significaría que las células V $\beta$ 4+ BDC2.5 patogénicas han sido en parte o totalmente eliminadas razón por la cual estos animales no desarrollan enfermedad. Sin embargo este método no permitió observar diferencias entre los ratones tratados con el péptido y los ratones control (solución salina). Como puede observarse en la Figura 9, el porcentaje de células V $\beta$ 4+ presente en ratones NOD que no recibieron ningún tratamiento (nivel basal) es demasiado alto como para que un pequeño aumento en dichas células pueda ser significativamente distinguido. Dicho en otras palabras, un aumento en la población de células V $\beta$ 4+ dado por la transferencia de células V $\beta$ 4+ BDC2.5 en ratones NOD se ve oscurecido por el nivel basal de células V $\beta$ 4+ en el ratón NOD. Por este motivo debimos buscar una manera más específica de distinguir la presencia de las células BDC2.5 en los recipientes NOD. En colaboración con el laboratorio del Dr. Bluestone en la Universidad de San Francisco, California, desarrollamos un compuesto marcado fluorescentemente que se une única y específicamente a las células BDC2.5. Dicho compuesto fue denominado "Dimer p1040-63". Este compuesto está formado por el complejo del MHC del ratón NOD, I-g7, unido covalentemente al péptido 1040-63. El péptido 1040-63 es específico de las células BDC2.5 y fue identificado en este trabajo (ver sección 1.3). Debido a que el receptor celular T de las células BDC2.5 reconoce al péptido 1040-63 en el contexto del complejo MHC el "dimer" se une a las células BDC2.5. Como puede observarse en la Figura 9, la mayoría de las células T CD4+ del bazo de ratones BDC2.5 se unen con el "dimer p1040-63" mientras que sólo alrededor del 1% de las células T CD4+ se unen al "dimer" en ratones NOD. Mediante ese método pudimos cuantificar la presencia de células BDC2.5 en nódulos linfáticos de ratones NOD tratados con ó sin el péptido. Siete a diez días luego de la transferencia de células BDC2.5 ratones NOD que fueron inmunizados con el péptido presentaron bajos niveles de células patogénicas (Figura 10) con valores de glucosa sanguínea normales. Animales que fueron tratados sólo con solución salina presentaron niveles más altos de células BDC2.5 y todos resultaron diabéticos con valores de glucosa > 300mg/dl.

Sin embargo es importante aclarar que si bien el experimento se repitió varias veces obteniendo resultados similares y si bien los ratones tratados con el péptido p1040-63 resultaron cada vez protegidos de diabetes, los niveles de células patogénicas observados en estos ratones mostraron más variación que los tratados con PBS. Esta observación sugiere que si bien la delección de las células es un

mecanismo involucrado en el desencadenamiento de diabetes, no se puede descartar que no haya otros mecanismos involucrados como por ejemplo anergia de las células patogénicas o la existencia de un grupo de células regulatorias que también jueguen un papel importante en el control de enfermedad en este modelo.

En resumen, los estudios *in vivo* realizados en este trabajo muestran que antígenos de alta afinidad específicos de células diabetogénicas previenen el desencadenamiento de enfermedad y sugieren que la delección específica de dichas células está dentro de los mecanismos ( o es "el" mecanismo) involucrado en dicha prevención.

1. Hemmer, B., Gran, B., Zhao, Y., Marques, A., Pascal, J., Tzou, A., Kondo, T., Cortese, I., Bielekova, B., Straus, S.E., McFarland, H.F., Houghten, R., Simon, R., Pinilla, C., and Martin, R. Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat Med* 1999; 5:1375-82.
2. Hemmer, B., Pinilla, C., Appel, J., Pascal, J., Houghten, R., and Martin, R. The use of soluble synthetic peptide combinatorial libraries to determine antigen recognition of T cells. *J Pept Res* 1998; 52:338-45.
3. Hemmer, B., Vergelli, M., Pinilla, C., Houghten, R., and Martin, R. Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. *Immunol Today* 1998; 19:163-8.
4. Gundlach, B.R., Wiesmuller, K.H., Junt, T., Kienle, S., Jung, G., and Walden, P. Specificity and degeneracy of minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CTL. *J Immunol* 1996; 156:3645-51.
5. Udaka, K., Wiesmuller, K.H., Kienle, S., Jung, G., and Walden, P. Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. *J Immunol* 1996; 157:670-8.
6. Wilson, D.B., Pinilla, C., Wilson, D.H., Schroder, K., Boggiano, C., Judkowski, V., Kaye, J., Hemmer, B., Martin, R., and Houghten, R.A. Immunogenicity. I. Use of peptide libraries to identify epitopes that activate clonotypic CD4+ T cells and induce T cell responses to native peptide ligands. *J Immunol* 1999; 163:6424-34.
7. Hemmer, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., Martin, R., and Wiesmuller, K.H. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med* 1997; 185:1651-9.
8. Houghten, R.A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:5131-5.
9. Lee, D.S., Tian, J., Phan, T., and Kaufman, D.L. Cloning and sequence analysis of a murine cDNA encoding glutamate decarboxylase (GAD65). *Biochim Biophys Acta* 1993; 1216:157-60.

10. Katz, J.D., Wang, B., Haskins, K., Benoist, C., and Mathis, D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 1993; 74:1089-100.
11. Katz, J.D., Benoist, C., and Mathis, D. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science* 1995; 268:1185-8.
12. Sarvetnick, N., Shizuru, J., Liggitt, D., Martin, L., McIntyre, B., Gregory, A., Parslow, T., and Stewart, T. Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature* 1990; 346:844-7.
13. von Herrath, M.G. and Oldstone, M.B. Interferon-gamma is essential for destruction of beta cells and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997; 185:531-9.
14. Hultgren, B., Huang, X., Dybdal, N., and Stewart, T.A. Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1996; 45:812-7.
15. Trembleau, S., Penna, G., Bosi, E., Mortara, A., Gately, M.K., and Adorini, L. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J Exp Med* 1995; 181:817-21.
16. Mueller, R., Krahl, T., and Sarvetnick, N. Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 1996; 184:1093-9.
17. Panitch, H. and Ciccone, C. Induction of recurrent experimental allergic encephalomyelitis with myelin basic protein. *Ann Neurol* 1981; 9:433-8.
18. Kearney, E.R., Pape, K.A., Loh, D.Y., and Jenkins, M.K. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1994; 1:327-39.
19. Sun, S., Kishimoto, H., and Sprent, J. DNA as an adjuvant: capacity of insect DNA and synthetic oligodeoxynucleotides to augment T cell responses to specific antigen. *J Exp Med* 1998; 187:1145-50.
20. Khoruts, A., Mondino, A., Pape, K.A., Reiner, S.L., and Jenkins, M.K. A natural immunological adjuvant enhances T cell clonal expansion through a CD28-dependent, interleukin (IL)-2-independent mechanism. *J Exp Med* 1998; 187:225-36.

21. Anderton, S.M., Radu, C.G., Lowrey, P.A., Ward, E.S., and Wraith, D.C. Negative selection during the peripheral immune response to antigen. *J Exp Med* 2001; 193:1-11.
22. Viret, C., Wong, F.S., and Janeway, C.A., Jr. Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* 1999; 10:559-68.
23. Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J., and Surh, C.D. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 1999; 11:173-81.
24. Lowenthal, J.W., Corthesy, P., Tougne, C., Lees, R., MacDonald, H.R., and Nabholz, M. High and low affinity IL 2 receptors: analysis by IL 2 dissociation rate and reactivity with monoclonal anti-receptor antibody PC61. *J Immunol* 1985; 135:3988-94.
25. Lowenthal, J.W., Tougne, C., MacDonald, H.R., Smith, K.A., and Nabholz, M. Antigenic stimulation regulates the expression of IL 2 receptors in a cytolytic T lymphocyte clone. *J Immunol* 1985; 134:931-9.

## DISCUSIÓN

## 1. DISCUSIÓN

El ratón BDC2.5 representa una exageración del modelo NOD, sus células son altamente diabetogénicas cuando son transferidas a ratones sanos NOD y son reactivas contra un antígeno desconocido pancreático en asociación al complejo mayor de histocompatibilidad, I-Ag7 [1]. Diferentes estrategias han sido usadas para la identificación de los antígenos reconocidos por las células T involucradas en el desencadenamiento de diabetes mellitus del tipo 1. Nosotros elegimos buscar el antígeno reconocido por la población de células diabetogénicas T CD4+ provenientes del ratón transgénico BDC2.5 mediante el uso de bibliotecas peptídicas combinatoriales.

La búsqueda del antígeno reconocido por las células BDC2.5 fue iniciada mediante el uso de una biblioteca de decapeptidos organizada en formato posicional, estrategia varias veces usada para la identificación de ligandos específicos de clones celulares T reactivos contra antígenos de especificidad conocida o desconocida [2-8]. El primer escrutinio realizado con la biblioteca PS-SCL 94-7 (Tabla 1, Resultados) indicó que las mezclas más activas en estimular células BDC2.5 fueron las que contenían péptidos con prolina en posición 4 y metionina en posición 9. En las otras posiciones debido a que ninguna mezcla de péptidos resultó claramente más activa que las otras debimos seleccionar varios aminoácidos para cada posición. La combinación de todos los posibles residuos seleccionados en este punto del proceso de desconvolución implicaba el diseño y síntesis de millones de péptidos lo cual resulta prácticamente imposible. Por lo tanto, para obtener información más específica en las posiciones 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, y 10 de los decapeptidos capaces de estimular las células BDC2.5, debimos adoptar una estrategia diferente que consistió en el diseño de una biblioteca acotada basada en la información obtenida con la biblioteca PS-SCL 94-7. Si bien, bibliotecas acotadas que poseen un número determinado de aminoácidos por posición en vez de todos los 20 aminoácidos (biblioteca no acotada) se han usado eficientemente en otros trabajos para la identificación de antígenos reconocidos por células T [9, 10] por primera vez, en nuestro trabajo, se reporta la síntesis de una biblioteca acotada basada exclusivamente en la información obtenida con el escrutinio de una biblioteca no acotada. El hecho de que algunas de las mezclas acotadas de las series N37 y N66 (Tablas 3 y 4, Resultados) hayan activado células BDC2.5 mucho más eficientemente que las mezclas de la biblioteca PS-SCL 94-7 nos permite concluir que, en los diferentes pasos del proceso desconvolutivo, fuimos seleccionando exitosamente especificidad mediante la selección de péptidos activos.



Durante los diferentes pasos del proceso de desconvolución en los cuales varias mezclas y más de 100 péptidos individuales fueron ensayados en células T BDC2.5, fue posible determinar que la presencia en los péptidos de prolina en posición 4, leucina en posición 5, triptofano en posición 6, arginina en posición 8 y metionina en posición 9 es importante para obtener péptidos capaces de estimular células BDC2.5. Además, al tener un número tan grande de secuencias y su capacidad estimuladora pudimos determinar que en las otras posiciones, existen combinaciones óptimas que permiten obtener mejor actividad. Así, las combinaciones R3 V7 E10, L3 V7 E10 y L3 G7 E10 resultaron las más favorables (Tabla 7, Resultados).

Paralelamente a la realización de nuestro trabajo, el grupo del Dr. Luc Teyton en el "Scripps Research Institute" de San Diego, California, publicó en la revista *Science* la estructura en rayos x del MHC del ratón NOD y BDC2.5, la molécula I-g7 [11]. Sorprendentemente, los aminoácidos descritos en nuestro trabajo en las posiciones 5, 7 y 10 de los decapeptidos corresponden perfectamente a los aminoácidos de anclaje a la molécula I-g7 propuestos por el grupo de Teyton. Dado que se ha encontrado en nuestro trabajo que la presencia de los residuos prolina en posición 4, triptofano en posición 6, arginina en posición 8 y metionina en posición 9 son importantes para la actividad de los péptidos, y dado además que estos residuos no parecen estar involucrados en el anclaje al complejo Ig-7, es posible sugerir que dichos residuos están posiblemente involucrados en el contacto del péptido con el receptor celular T (TCR) de las células BDC2.5. Sin embargo, es importante destacar que para comprobar estrictamente qué residuos están involucrados particularmente en la unión del péptido al MHC ó al TCR es necesario descifrar directamente la estructura en rayos x del complejo MHC-péptido-TCR y realizar paralelamente estudios de competencia denominados de "Unión al MHC" ( del inglés: MHC Binding Studies) en los cuales se diseñan péptidos análogos en los cuales se substituye sistemáticamente un residuo a la vez para entender qué residuo debe estar presente para causar actividad. Si bien los resultados no se han presentado en este trabajo, tenemos ahora información con péptidos análogos que sugieren que los residuos involucrados en el anclaje al MHC son los propuestos anteriormente.

La mayoría de los antígenos definidos en nuestro trabajo son altamente efectivos en estimular células T BDC2.5 (Tabla 6, Resultados), estas células activadas causan rápidamente diabetes cuando son transferidas a ratones NOD-scid (Tabla 10, Resultados) y más importante aún, son capaces de estimular respuestas proliferativas en el conjunto de células T de ratones NOD que han sido espontáneamente activadas *in vivo* (Figura 4, Resultados). Esta última observación implica que los

péptidos definidos en este trabajo están relacionados a un autoantígeno involucrado en el proceso de enfermedad en estos animales. Es más, si tenemos en cuenta el alto índice de estimulación provocado por algunos de los péptidos cuando fueron ensayados con células T de ratones NOD es posible sugerir que existe más de un clon de células T que responden a estos antígenos. Estos clones comparten especificidad por estos péptidos y pueden o no estar todos involucrados en el proceso de enfermedad. Alternativamente, el alto índice de proliferación observado en los ratones pre-diabéticos NOD podría ser explicado por la existencia de un gran número de células únicamente del clon BDC2.5 y que sería necesaria la acumulación de este alto número de células patogénicas para que posteriormente se desencadene el proceso de enfermedad.

Las células BDC2.5 son reactivas contra un antígeno pancreático. Sin embargo, de las más de 100 secuencias identificadas en este trabajo capaces de activar las células T BDC2.5 ninguna resultó idéntica a alguna secuencia proteica del páncreas publicada hasta la fecha. Recientes estudios con otros clones y usando péptidos análogos en los cuales se substituye sistemáticamente un aminoácido, han demostrado que la capacidad de un determinado péptido en estimular respuestas proliferativas no se vió alterada a pesar de presentar una o más substituciones en su secuencia original [12-15]. Es más, cuando se ensayaron clones autoreactivos, algunas de las modificaciones hechas en los péptidos nativos daban como resultado péptidos denominados superagonistas, por ser aún mas potentes que el nativo en causar proliferación [12-15]. Estas observaciones sugieren que en nuestro caso, las secuencias encontradas capaces de activar las células BDC2.5 en concentraciones del rango de los nanomoles podrían de hecho constituir modificaciones del "autoantígeno nativo" que causó originalmente la activación del clon patogénico BDC2.5. En otras palabras, no hemos encontrado la secuencia proteica del páncreas contra la cual el clon BDC2.5 es reactivo sino modificaciones de esta secuencia original que también activan el clon pero de una manera mucho más potente. Esta posible interpretación no resulta muy sorprendente si se analiza como se ha desarrollado el proceso desconvolutivo de búsqueda de los antígenos encontrados en este trabajo mediante el uso de bibliotecas peptídicas combinatoriales. En cada paso del proceso fuimos seleccionando para cada posición los residuos de las posiciones definidas de las mezclas que resultaban más activas cuando se las ensayaba en células BDC2.5. Así, los ligandos que encontramos resultan de la combinación de los residuos "óptimos" para cada posición. De esta manera, no resulta tan sorprendente que los péptidos encontrados sean secuencias óptimas ó superagonistas. Sin embargo, como se ha demostrado en otros trabajos, es importante aclarar que no siempre que se trabaja con bibliotecas peptídicas combinatoriales las secuencias encontradas resultan necesariamente superagonistas [3, 7]. Un método desarrollado recientemente [3] permite analizar los datos obtenidos en

el escrutinio de las bibliotecas peptídicas combinatoriales mediante un análisis computacional. Brevemente, lo que hace dicho método es calcular un valor relativo para cada aminoácido en cada una de las posiciones basado en los resultados obtenidos con el escrutinio de la biblioteca posicional. Por ejemplo, en nuestro caso, prolina en posición 4 tendría un valor comparativamente más alto que otro aminoácido en dicha posición. Con dichos valores se construye una matriz. Una vez construida la matriz, el programa toma todos los fragmentos peptídicos de todas las proteínas reportadas en los bancos de datos y usa la matriz para calcular un valor predictivo del potencial estimulador de cada fragmento. De esta manera se pueden identificar secuencias sin que resulten necesariamente de la selección de los residuos más activos en cada posición, sino ponderando todos los residuos en todas las posiciones. En este momento y en colaboración con la co-creadora de este método, la Dr. Clemencia Pinilla del Torrey Pines Institute for Molecular Studies ubicado en San Diego, California estamos usando toda la información obtenida con el escrutinio de las bibliotecas para buscar mediante este método secuencias murinas que podrían ser los potenciales autoantígenos del clon BDC2.5.

Una segunda posible explicación de por qué no hemos encontrado ninguna secuencia en proteínas pancreáticas que coincidan 100% con alguna de nuestras secuencias radica en la posibilidad de que la proteína que causa la activación inicial del clon BDC2.5 *in vivo* pertenezca a un organismo infeccioso, y que, por el fenómeno de mimesis molecular, reaccione con baja afinidad contra un antígeno pancreático. En apoyo de esta hipótesis hemos encontrado mediante el uso del método computacional mencionado anteriormente, secuencias virales y bacteriales capaces de estimular células BDC2.5. Sin embargo la significancia biológica de estos hallazgos todavía queda por estudiarse.

Varios trabajos han demostrado el alto grado de promiscuidad del receptor celular T de los linfocitos CD4+ [8, 16]. Así, no resulta sorprendente que hayamos encontrado tantas secuencias peptídicas capaces de estimular un único clon celular T. Sorpresivamente para nosotros, la secuencia de uno de los péptidos descritos en este trabajo que resultó más efectivo en estimular células patogénicas BDC2.5 (p1047-10, EC<sub>50</sub>= 4nM, **KVAPVWVRME**) es notablemente similar a la secuencia del fragmento 528-539 de GAD65 (**KVAPVIKARMME**). Entre los autoantígenos descritos hasta ahora, GAD65 es uno de los más involucrados en la etiología de la enfermedad. Sin embargo cuando sintetizamos dicho fragmento de GAD65 mostró un nivel de estimulación prácticamente nulo (EC<sub>50</sub> > 10,000 nM). Con el objetivo de explorar la posibilidad de que un fragmento más largo de GAD65 sea efectivo en activar las células BDC2.5, sintetizamos el péptido 1098-11 (**LSKVAPVIKARMMEYG**). Dicho péptido fue activo con un EC<sub>50</sub> = 2335 nM. Este último resultado sugiere que un epítopo dentro de GAD65 podría ser el

autoantígeno natural involucrado en la activación espontánea de las células BDC2.5 *in vivo*. Si así fuere, el clon BDC2.5 tendría baja afinidad por su antígeno aunque suficiente para causar activación y espontánea diabetes autoinmune.

Sin embargo, dos problemas surgen cuando se propone relacionar a GAD65 como el autoantígeno reconocido por las células BDC2.5. El primero radica en que raramente la inmunización de ratones pre-diabéticos NOD con GAD65 ó con uno de sus fragmentos ha provocado la aceleración del desencadenamiento de diabetes en estos ratones. El segundo problema radica en los resultados obtenidos en nuestro trabajo en los cuales mostramos que la directa inmunización *in vivo* con los péptidos identificados (aún con aquellos péptidos similares a GAD65) no provocan enfermedad en ratones BDC2.5. Si GAD65 fuera el autoantígeno, ambas observaciones parecen indicar que las circunstancias involucradas en la presentación natural de péptidos autoantígenos durante el proceso espontáneo de enfermedad *in vivo* y la presentación de péptidos provocada mediante una inmunización conducen a diferentes situaciones. Un trabajo reportado recientemente en Journal of Immunology [REF quinn) provee datos que apoyan la hipótesis recién mencionada. En este trabajo se muestra que el fragmento de GAD65 524-543 contiene dos epitopes solapados que estimulan dos grupos diferentes de células T. Células T provenientes de ratones NOD inmunizados con el fragmento 524-543 responden *in vitro* al epitope 527-538, usan el haplotipo V $\beta$ 12 del receptor celular T y, cuando son transferidas junto con células patogénicas en recipientes sanos NOD, inhiben el desencadenamiento de diabetes. En cambio, células T activadas espontáneamente durante el proceso natural de enfermedad provenientes de ratones NOD pre-diabéticos responden al epitope 530-543, usan V $\beta$ 4 y no muestran tal actividad regulatoria cuando son transferidas junto con células patogénicas en recipientes NOD. Estos resultados sugieren que la inmunización de ratones BDC2.5 con los péptidos de GAD65 definidos en nuestro trabajo podrían dar origen a células regulatorias que previenen el desencadenamiento de enfermedad mediante la directa inmunización *in vivo*. Actualmente se están desarrollando estudios en el laboratorio del Dr. Darcy Wilson con el objetivo de responder estos interrogantes.

Varios trabajos han asociado las células patogénicas involucradas en el proceso de diabetes con un patrón de expresión de citoquinas del tipo 1 [1, 17-21]. Así mismo, la inmuno-desviación de este patrón a uno del tipo 2 se ha asociado a la prevención de la enfermedad [22]. A partir de esta observación, razonamos que dada la diversidad de antígenos definidos en este trabajo, era posible encontrar alguno que causara un perfil de citoquinas del tipo 2 en las células BDC2.5 activadas y así dar lugar a células no patogénicas. Nuestros resultados muestran que esto no fue posible. Ensayos con diferentes antígenos y

usados a varias concentraciones provocaron la secreción de citoquinas típicas de un perfil del tipo 1. Estos resultados sugieren que el perfil de expresión de citoquinas de un determinado clon celular T CD4+ es una característica intrínseca del clon independiente de la afinidad y de la concentración del antígeno usado para su estimulación. Alternativamente, existirían antígenos con capacidad de inducir un perfil de citoquinas del tipo 2 pero estos son diferentes a los antígenos encontrados en este trabajo.

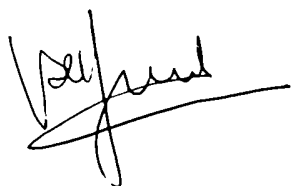
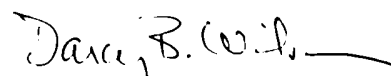
Si bien muchos de los péptidos resultaron altamente efectivos en desencadenar respuestas proliferativas *in vitro*, la directa inmunización *in vivo* de ratones BDC2.5 no fue efectiva para causar diabetes en estos ratones. Esta observación nos hizo pensar que la inmunización *in vivo* con un péptido de alta afinidad podría: 1- Resultar inefectiva en activar las células ó 2- Dar lugar a un cierto mecanismo de tolerancia mediante el cual se previniera el desencadenamiento de la enfermedad. Si la segunda hipótesis resultara cierta, la inmunización *in vivo* con este péptido podría usarse como terapia para controlar el curso de la enfermedad.

Por mucho tiempo se ha sabido que el desencadenamiento de una respuesta inmune está influenciada por la dosis, la forma y la vía en que se administra el antígeno y, por la presencia de moléculas co-estimuladoras. Muchas de las estrategias usadas para causar tolerancia, las cuales pueden prevenir enfermedades autoinmunes y restablecer la tolerancia periférica a determinados autoantígenos se basan en esta información. Se ha demostrado por ejemplo en la mayoría de los modelos experimentales de enfermedades autoinmunes, que la inmunización con los autoantígenos en forma intravenosa, oral ó subcutánea en altas dosis previene el desencadenamiento de la patología [23-26]. Así mismo se ha demostrado que péptidos de alta afinidad por el receptor celular T de los linfocitos CD4+ patogénicos son eficientes también en mediar un proceso de tolerancia [27]. Los resultados de nuestro trabajo muestran que la inmunización *in vivo* con un péptido de alta afinidad previene el desencadenamiento de diabetes en ratones NOD que fueron transferidos con un número suficiente de células patogénicas. Nuestros resultados además sugieren que la delección de las células patogénicas es al menos uno de los mecanismos de tolerancia involucrados en la prevención de enfermedad. Sin embargo, dado que en algunos de los ratones que recibieron el péptido superagonista el número de células patogénicas no resultó significativamente menor que los controles, dicha observación sugiere que otros mecanismos de tolerancia podrían también estar involucrados en la prevención de diabetes en este modelo. Actualmente y en colaboración con el laboratorio de Nora Sarvetnick ubicado en el "Scripps Research Institute" estamos tratando de dilucidar dichos mecanismos.

En nuestro modelo de estudio las células autoreactivas fueron transferidas activadas en receptores sanos con el objetivo de simular la situación en la cual la progresión de la enfermedad se encuentra suficientemente avanzada. Esta observación sugiere que la inmunoterapia basada en el uso de péptidos de alta afinidad por el receptor de las células patogénicas podría aplicarse en casos en los cuales la enfermedad ha avanzado y por lo tanto manifestado algunos de sus síntomas. Sin embargo, en la gran proporción de pacientes en los cuales ya se ha manifestado la enfermedad la mayoría de las células del páncreas productoras de insulina se encuentran mayormente destruidas. Por lo tanto, en estos casos, la cura de diabetes mellitus del tipo 1 requeriría además del tratamiento mediante inmunoterapia peptídica un reemplazo de las células dañadas. Por este motivo, resulta interesante diseñar experimentos en los cuales se analice la posible aplicación de este tipo de terapia en la *prevención* de diabetes. Para esto, el modelo NOD representa un modelo ideal ya que se podría inmunizar a los ratones desde edades muy tempranas y evaluar la efectividad de estas inmunizaciones en prevenir el desencadenamiento espontáneo de la enfermedad. Hay que tener en cuenta también otras consideraciones antes de diseñar un protocolo de tratamiento mediante el uso de péptidos y su aplicación en el tratamiento de diabetes en humanos. Un problema se basa en la posible activación de clones celulares T de diferentes especificidades luego de que se ha inmunizado con un determinado péptido. Así como una misma célula T puede responder a varios antígenos (fenómeno conocido como promiscuidad o degeneratividad de las células T), un mismo antígeno puede activar diferentes clones de células T. De esta manera, el tratamiento con un péptido X específico de un clon patogénico X podría ocasionar la activación de otras células T que puedan ser por algún motivo patogénicas para el organismo. El segundo problema radica en que si bien varios trabajos han reportado que la inmunización *in vivo* con péptidos/autoantígenos conduce a un estado de tolerancia de las células patogénicas, en varios casos se reportó que dependiendo del protocolo usado y de las condiciones del organismo, la inmunización *in vivo* ocasionó la activación y posterior exacerbadón de la enfermedad [28-30].

En resumen, en este trabajo de Tesis se reportan por primera vez más de cien secuencias peptídicas altamente específicas, con valores de EC50 en el rango de los nanomoles, en estimular células T patogénicas BDC2.5. Muchos de estos péptidos son estructuralmente similar al fragmento 524-543 de la proteína pancreática GAD65. Es más, un fragmento de 16 aminoácidos de esta proteína es capaz de estimular estas células aunque a una concentración en el rango de los microgramos. Estos resultados sugieren que GAD65 podría ser un factor esencial iniciador del proceso de diabetes autoinmune. Estos ligandos también estimulan respuestas proliferativas de linfocitos T espontáneamente activados en el ratón NOD. Esta observación indica que al menos uno de los eventos involucrados en el

desencadenamiento espontáneo de diabetes en este animal es la activación de una significativa fracción del repertorio de linfocitos T que tienen especificidad por un péptido estructuralmente similar a los péptidos descritos en este trabajo. Las células BDC2.5 resultan altamente patogénicas *in vivo* cuando son estimuladas *in vitro* con estos ligandos. Por el contrario, cuando son presentados mediante la inmunización *in vivo*, péptidos altamente específicos causan la delección de las células patogénicas. Esta observación valida el uso de estos péptidos como inmuno-moduladores del curso de la enfermedad y sugiere que la futura caracterización de los eventos involucrados en dicho proceso de tolerancia es importante para diseñar un tratamiento definitivo de la enfermedad diabetes mellitus del tipo 1.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'W. J. ...', with a long horizontal stroke extending to the right.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Darcy B. ...', with a long horizontal stroke extending to the right.

1. Haskins, K. and McDuffie, M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science* 1990; 249:1433-6.
2. Hemmer, B., Pinilla, C., Appel, J., Pascal, J., Houghten, R., and Martin, R. The use of soluble synthetic peptide combinatorial libraries to determine antigen recognition of T cells. *J Pept Res* 1998; 52:338-45.
3. Hemmer, B., Gran, B., Zhao, Y., Marques, A., Pascal, J., Tzou, A., Kondo, T., Cortese, I., Bielekova, B., Straus, S.E., McFarland, H.F., Houghten, R., Simon, R., Pinilla, C., and Martin, R. Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat Med* 1999; 5:1375-82.
4. Hemmer, B., Vergelli, M., Pinilla, C., Houghten, R., and Martin, R. Probing degeneracy in T-cell recognition using peptide combinatorial libraries. *Immunol Today* 1998; 19:163-8.
5. Gundlach, B.R., Wiesmuller, K.H., Junt, T., Kienle, S., Jung, G., and Walden, P. Specificity and degeneracy of minor histocompatibility antigen-specific MHC-restricted CTL. *J Immunol* 1996; 156:3645-51.
6. Udaka, K., Wiesmuller, K.H., Kienle, S., Jung, G., and Walden, P. Self-MHC-restricted peptides recognized by an alloreactive T lymphocyte clone. *J Immunol* 1996; 157:670-8.
7. Wilson, D.B., Pinilla, C., Wilson, D.H., Schroder, K., Boggiano, C., Judkowski, V., Kaye, J., Hemmer, B., Martin, R., and Houghten, R.A. Immunogenicity. I. Use of peptide libraries to identify epitopes that activate clonotypic CD4+ T cells and induce T cell responses to native peptide ligands. *J Immunol* 1999; 163:6424-34.
8. Hemmer, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., Martin, R., and Wiesmuller, K.H. Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med* 1997; 185:1651-9.
9. de Koster, H.S., Vermeulen, C.J., Hiemstra, H.S., Amons, R., Drijfhout, J.W., and Koning, F. Definition of agonists and design of antagonists for alloreactive T cell clones using synthetic peptide libraries. *Int Immunol* 1999; 11:585-91.



10. Daniel, C., Horvath, S., and Allen, P.M. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity* 1998; 8:543-52.
11. Corper, A.L., Stratmann, T., Apostolopoulos, V., Scott, C.A., Garcia, K.C., Kang, A.S., Wilson, I.A., and Teyton, L. A structural framework for deciphering the link between I-Ag7 and autoimmune diabetes. *Science* 2000; 288:505-11.
12. Vergelli, M., Hemmer, B., Kalbus, M., Vogt, A.B., Ling, N., Conlon, P., Coligan, J.E., McFarland, H., and Martin, R. Modifications of peptide ligands enhancing T cell responsiveness imply large numbers of stimulatory ligands for autoreactive T cells. *J Immunol* 1997; 158:3746-52.
13. Chen, Y.Z., Matsushita, S., and Nishimura, Y. Response of a human T cell clone to a large panel of altered peptide ligands carrying single residue substitutions in an antigenic peptide: characterization and frequencies of TCR agonism and TCR antagonism with or without partial activation. *J Immunol* 1996; 157:3783-90.
14. Evavold, B.D., Sloan-Lancaster, J., Wilson, K.J., Rothbard, J.B., and Allen, P.M. Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity* 1995; 2:655-63.
15. Wucherpfennig, K.W., Sette, A., Southwood, S., Oseroff, C., Matsui, M., Strominger, J.L., and Hafler, D.A. Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J Exp Med* 1994; 179:279-90.
16. Wucherpfennig, K.W. and Strominger, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80:695-705.
17. Bergman, B. and Haskins, K. Autoreactive T-cell clones from the nonobese diabetic mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214:41-8.
18. Daniel, D., Gill, R.G., Schloot, N., and Wegmann, D. Epitope specificity, cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from NOD mice. *Eur J Immunol* 1995; 25:1056-62.

19. Peterson, J.D., Pike, B., McDuffie, M., and Haskins, K. Islet-specific T cell clones transfer diabetes to nonobese diabetic (NOD) F1 mice. *J Immunol* 1994; 153:2800-6.
20. Shimizu, J., Kanagawa, O., and Unanue, E.R. Presentation of beta-cell antigens to CD4+ and CD8+ T cells of non-obese diabetic mice. *J Immunol* 1993; 151:1723-30.
21. Pankewycz, O., Strom, T.B., and Rubin-Kelley, V.E. Islet-infiltrating T cell clones from non-obese diabetic mice that promote or prevent accelerated onset diabetes. *Eur J Immunol* 1991; 21:873-9.
22. Bradley, L.M., Asensio, V.C., Schioetz, L.K., Harbertson, J., Krahl, T., Patstone, G., Woolf, N., Campbell, I.L., and Sarvetnick, N. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* 1999; 162:2511-20.
23. al-Sabbagh, A., Miller, A., Santos, L.M., and Weiner, H.L. Antigen-driven tissue-specific suppression following oral tolerance: orally administered myelin basic protein suppresses proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL mouse. *Eur J Immunol* 1994; 24:2104-9.
24. Heeger, P.S., Forsthuber, T., Shive, C., Biekert, E., Genain, C., Hofstetter, H.H., Karulin, A., and Lehmann, P.V. Revisiting tolerance induced by autoantigen in incomplete Freund's adjuvant. *J Immunol* 2000; 164:5771-81.
25. Bitar, D.M. and Whitacre, C.C. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein. *Cell Immunol* 1988; 112:364-70.
26. Parish, N.M., Rayner, D., Cooke, A., and Roitt, I.M. An investigation of the nature of induced suppression to experimental autoimmune thyroiditis. *Immunology* 1988; 63:199-203.
27. Burrows, G.G., Adlard, K.L., Bebo, B.F., Jr., Chang, J.W., Tenditnyy, K., Vandenbark, A.A., and Offner, H. Regulation of encephalitogenic T cells with recombinant TCR ligands. *J Immunol* 2000; 164:6366-71.
28. Ehl, S., Hombach, J., Aichele, P., Rulicke, T., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R., and Pircher, H. Viral and bacterial infections interfere with peripheral tolerance induction and activate CD8+ T cells to cause immunopathology. *J Exp Med* 1998; 187:763-74.

- 
29. Kearney, E.R., Pape, K.A., Loh, D.Y., and Jenkins, M.K. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1994; 1:327-39.
  30. Aichele, P., Kyburz, D., Ohashi, P.S., Odermatt, B., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H., and Pircher, H. Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:444-8.