

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE C.C. QUÍMICAS

USO DEL RECEPTOR DE ANTÍGENO DE LA
CÉLULA T (TCR) EN PROCESOS
PATOLÓGICOS. ESTUDIOS EN LA
ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA
HUESPED AGUDA (aEICH) Y EN
ESPONDILOARTROPATÍAS

TESIS DOCTORAL
Miguel Ángel Treviño Avellaneda
Madrid, 1999



Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)

28040 - MADRID

Rafael Bragado Herrero, con D.N.I. 276530, como director del trabajo y Resurrección García Gutiérrez, con D.N.I. 1360099, como tutora hacemos constar que:

El presente trabajo, titulado *Uso del receptor de antígeno de la célula T (TCR) en procesos patológicos. Estudios en la enfermedad de injerto contra huésped aguda (aEICH) y en espondiloartropatías* constituye la memoria de investigación que presenta Miguel Ángel Treviño Avellaneda, con D.N.I. 7490880, y que su contenido, duración y extensión satisfacen los requisitos necesarios para poder optar al título de Doctor.

Para que conste, firmamos el presente informe:

Dr. Rafael Bragado Herrero
(Director)

Jefe Asociado.
Dpto. de Inmunología.
Fundación Jiménez Díaz.

Dra. Resurrección García Gutiérrez
(Tutora)

Profesora titular de Bioquímica.
Dpto. de Bioquímica y Biología
molecular.
Facultad de C.C. Químicas.
Universidad Complutense de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE C.C. QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



X-53-394203-8

**USO DEL RECEPTOR DE ANTÍGENO DE LA
CÉLULA T (TCR) EN PROCESOS
PATOLÓGICOS. ESTUDIOS EN LA
ENFERMEDAD DE INJERTO CONTRA
HUESPED AGUDA (aEICH) Y EN
ESPONDILOARTROPATÍAS**

**Memoria de investigación presentada para optar al título
de doctor por: Miguel Ángel Treviño**

Director: Rafael Bragado Herrero



A la memoria de mi padre.

A mi madre y a Laura. Ambas me dais la vida día a día.

En realidad, sólo existen dos cosas importantes: el amor, en todas sus formas, con mujeres hermosas, y la música de Nueva Orleans o de Duke Ellington.

Prefacio a La espuma de los días. Boris Vian.

Pero esa era la labor de la memoria, y el recuerdo, él lo sabía, tenía tendencia a trastocar lo recordado.

La trilogía de Nueva York. Paul Auster.

Había cientos de millones de concienzudas células corporales oxidándose día y noche como animales en su complicado trabajo de mantenerle vivo y saludable, y cada una de ellas era un enemigo potencial y un traidor.

Catch-22. Joseph Heller.

Agradecimientos.

Ante todo he de agradecer a Rafael Bragado, mi director, la confianza que depositó en mí y que nunca llegara a tirar la toalla. Su visión crítica y su capacidad para detectar qué control faltaba en cada experimento han sido fundamentales para que finalmente esta tesis tomara forma.

Esta tesis no hubiera sido posible sin la amabilidad y disponibilidad para la toma de muestras de los enfermos. Muchas gracias a todos.

Debo agradecer la colaboración de Joelle Gaschet y del Dr. Henri Vié, del INSERM de Nantes y del Dr. Antonio Bañares del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, que han sido fundamentales para la realización de esta tesis.

Gracias a todos los curritos del departamento de inmunología de la FJD por interesarse por la gestación y el desarrollo de la criatura. En especial quiero agradecer a Aurora el tipaje de los enfermos y a Sole su ayuda con los aspectos estadísticos de la tesis.

La gente del lab.5 ha tenido que aguantarme día tras día durante un largo periodo de tiempo. Realmente ha sido un placer que trabajáramos juntas (siempre habéis sido mayoría). Gracias a Almudena, Emma, Patricia, Begoña y Rafita por las conversaciones sobre los temas más peregrinos que, probablemente, me hayan aportado más que cientos de artículos sobre el TCR. En este pequeño rincón quiero nombrar también a Ana, a Edu y a los chicos de lab.4 que también tienen su miga.

Gracias a todos los amigos con los que he compartido el tiempo libre. Espero que Alberto, Yolanda, Fernando, Carmen, Julio, Bego (otra vez), Espe, Raul y Guillermo sepan perdonar mis descontroles, pero la tesis es muy dura y con alguien había que desahogarse. Gracias también a *los de la Tertulia*, que día a día me han mostrado los mundos detrás de la realidad y que, al mismo tiempo, me han acompañado en diversiones más mundanas.

Gracias a mi familia, en especial a mi madre que tanto ha tenido que hacer por sacarnos a todos adelante, sobre todo desde la muerte de mi padre. No existe suficiente espacio en el mundo ni en la memoria del ordenador para que pueda decirte todo lo que te debo.

Gracias a Laura. Mi soporte. Ni yo sin ti, ni tú sin mí.

Abreviaturas.

Ac	anticuerpo
AcM	anticuerpo monoclonal
DNA	ácido desoxirribonucleico
aEICH	enfermedad de injerto contra huésped aguda
Ag	antígeno
AINE	anti-inflamatorio no esteroideo
ALL	leucemia linfoblástica aguda
APC	célula presentadora de antígeno
RNA	ácido ribonucleico
B-LCL	línea linfoblastoide B
β2m	β2-microglobulina
bSAg	superantígeno de origen bacteriano
cDNA	ADN complementario
CDR	región determinante de complementariedad
cEICH	enfermedad de injerto contra huésped crónica
CsA	ciclosporina A
CTL	linfocito T citotóxico
EBV	virus de Epstein-Barr
EICH	enfermedad de injerto contra huésped
HLA	antígeno leucocitario humano
HV4	región hipervariable 4
HVS	herpes virus saimiri
ICAM	molécula de adhesión intercelular
ICL	injerto contra leucemia
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina
IL	interleuquina
ITAM	motivo de activación de inmunorreceptores basados en tirosina
i.v.	intravenoso
mRNA	ARN mensajero
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MTX	metotrexato
NK	asesina natural
PBL	linfocito de sangre periférica
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
SAg	superantígeno
SEB	enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SF	líquido sinovial
TCR	receptor de antígeno de la célula T
TMO	transplante de médula ósea
TNF	factor de necrosis tumoral
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana
vSAg	superantígeno de origen viral

ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- El receptor de antígeno de la célula T.	1
<i>1.1.- Nomenclatura, organización, reordenamiento y diversidad de los genes TCRA y TCRB.</i>	<i>2</i>
2.- Antígenos y su reconocimiento.	4
<i>2.1.- HLA, péptidos y estructuras del TCR implicadas en su reconocimiento.</i>	<i>4</i>
<i>2.2.- Superantígenos y su reconocimiento por el TCR.</i>	<i>5</i>
3.- Activación de la célula T.	6
4.- Tolerancia.	7
5.- Respuestas alorreactivas.	8
6.- Enfermedades autoinmunes.	9
7.- Enfermedad de injerto contra huésped (EICH).	11
8.- Espondiloartropatías.	13
<i>8.1.- Espondiloartropatías y HLA.</i>	<i>14</i>
<i>8.2.- El péptido artritogénico y las células T implicadas en su reconocimiento.</i>	<i>14</i>
<i>8.3.- Problemática del estudio de espondiloartropatías. Posibles soluciones.</i>	<i>16</i>
9.- Aproximaciones metodológicas para el estudio de repertorio de TCRs.	17
OBJETIVOS.....	19
A.- Estudio de células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.	19
B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y en PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
A.- Estudio de células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.	21
<i>A.1.- Obtención de clones de células T.</i>	<i>21</i>
<i>A.1.1.- PACIENTES.</i>	<i>21</i>
<i>A.1.2.- CLONAJE DE CÉLULAS T DE LAS BIOPSIAS DE PIEL.</i>	<i>22</i>
<i>A.1.3.- ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD CLONAL Y CONFIRMACIÓN DE LA CLONALIDAD.</i>	<i>22</i>
<i>A.2.- Estudios de especificidad de los clones.</i>	<i>23</i>
<i>A.3.- Determinación del uso de segmentos TCR.</i>	<i>24</i>
B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y en PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.	27
<i>B.1.- Obtención de linfocitos T y manipulación de células.</i>	<i>27</i>
<i>B.1.1.- PACIENTES.</i>	<i>27</i>

B.1.2.- AISLAMIENTO, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE MUESTRAS Y LÍNEAS CELULARES.	27
B.1.3.- CITOMETRÍA DE FLUJO.	28
B.1.4.- SEPARACIÓN DE SUBPOBLACIONES.	28
<i>B.2.- Determinación de uso de TCR en células T expandidas específicamente en líquido sinovial.</i>	28
B.2.1.- TIPAJE ESPECTRAL.	28
B.2.2.- OBTENCIÓN DE COLONIAS Y SECUENCIACIÓN.	29
<i>B.3.- Cuantificación de transcritos con una determinada región N+D.</i>	30
<i>B.4.- Estudio de la capacidad autorreactiva de las células T que expresan determinada cadena β.</i>	30
B.4.1.- TRANSFORMACIÓN DE LINFOCITOS Y MANTENIMIENTO EN CULTIVO.	30
B.4.2.- COCULTIVO DE CÉLULAS T TRANSFORMADAS CON LÍNEAS B LINFOBLASTOIDES.	31

RESULTADOS.....33

A.- Estudio de células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.	33
<i>A.1.- Obtención de clones T, confirmación de la clonalidad y análisis de la diversidad clonal.</i>	33
<i>A.2.- Análisis de la especificidad de los clones obtenidos. Diversidad clonal de la respuesta.</i>	34
<i>A.3.- Diversidad de TCRs empleados por los clones.</i>	35
<i>A.4.- Motivos estructurales en los TCRs de los clones aislados a partir de las biopsias de piel de afectados por aEICH.</i>	37
A.4.1.- USO PREFERENTE Y MOTIVOS ESTRUCTURALES EN LOS TCRS DE LOS CLONES AISLADOS DEL PACIENTE HER.	38
A.4.2.- USO PREFERENTE Y MOTIVOS ESTRUCTURALES EN LOS TCRS DE LOS CLONES AISLADOS DEL PACIENTE P.	38
A.4.3.- USO PREFERENTE Y MOTIVOS ESTRUCTURALES EN LOS TCRS DE LOS CLONES ESPECÍFICOS DE HLA-DQ8.	39
B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmne local.	41
<i>B.1.- Tipaje espectral de las muestras recolectadas de la paciente MTSM.</i>	41
<i>B.2.- Tipaje espectral de las muestras recolectadas del paciente DMG.</i>	43
B.2.1.- SEPARACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DEL PACIENTE DMG.	43
B.2.2.- ANÁLISIS POR TIPAJE ESPECTRAL DE LAS SUBPOBLACIONES CD4 ⁺ DEL PACIENTE DMG.	44
B.2.3.- ANÁLISIS POR TIPAJE ESPECTRAL DE LAS SUBPOBLACIONES CD8 ⁺ DEL PACIENTE DMG.	44
<i>B.3.- Análisis de las secuencias de cadenas β expandidas en DMG(1)SF-CD8⁺.</i>	45
B.3.1.- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS TRÁNSCRITOS PERTENECIENTES A LAS SUBFAMILIAS TCRBV12, TCRBV15 Y TCRBV20 DE DMG(1)SF-CD8 ⁺ .	46
B.3.2.- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS TRÁNSCRITOS PERTENECIENTES	

A LA SUBFAMILIA TCRBV17 DE DMG(1)SF·CD8 ⁺	47
B.3.3.- COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LAS SUPUESTAS EXPANSIONES OLIGOCLONALES: MOTIVOS COMUNES ENTRE DISTINTAS SUBFAMILIAS.....	47
B.4.- <i>Estudio de los niveles de expresión del transcrito TEV17. Especificidad de las células TEV17⁺</i>	48
B.4.1.- CUANTIFICACIÓN DEL TRÁNSCRITO MAYORITARIO EN LA SUBFAMILIA TCRBV17. COMPARACIÓN ENTRE LA MUESTRA LOCAL Y LOS PBLs.....	48
B.4.2.- ESTIMACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RESPUESTA CONTRA AGS DE LAS CÉLULAS T TEV17 ⁺	49
B.4.2.1.- Obtención y caracterización fenotípica de líneas T transformadas con HVS.....	50
B.4.2.2.- Cuantificación de transcritos TEV17 tras el cocultivo de células T transformadas con líneas B linfoblastoides.....	50
DISCUSIÓN.	53
A.- Estudio de las células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.	53
B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y en PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.	59
CONCLUSIONES.	67
A.- Estudio de las células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.	67
B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y en PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.	67
BIBLIOGRAFÍA.	69
APÉNDICE.	91

INTRODUCCIÓN.

1.- El receptor de antígeno de la célula T.

El sistema inmunológico, potencialmente capaz de neutralizar la entrada de un elemento extraño en el organismo, se divide en sistema inmunológico adaptativo, que discrimina entre los distintos elementos extraños o antígenos (Ags) y potencia la respuesta frente a éstos en función del número de exposiciones, y sistema inmunológico no adaptativo, independiente del número de exposiciones al Ag (1).

La respuesta inmunológica adaptativa está mediada por los linfocitos B y T, los cuales inician su participación en la respuesta tras el reconocimiento del Ag a través de sus receptores específicos. El 30% de las células que componen el sistema inmunológico son linfocitos y de ellos el 70% son células T (1). Los receptores de la célula T implicados en el reconocimiento antigénico se denominan Receptores de Antígeno de la Célula T (TCR) (2).

El TCR está formado por dos glicoproteínas altamente polimórficas clonalmente distribuidas, heterodímeros $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$, asociadas a un complejo de cadenas invariables denominado CD3 (3) (Fig. 1). El 95% de las células T de sangre periférica expresan TCRs formados por dímeros $\alpha\beta$. Ambas cadenas están codificadas por distintos segmentos génicos denominados regiones variables (V), de diversidad (D) (únicamente en cadenas β), de unión (J) y constantes (C) que se recombinan durante la ontogenia de los linfocitos T y que generan la diversidad de receptores necesaria para el reconocimiento específico de los Ags (4).

Los aminoácidos codificados por las regiones génicas V, D y J definen en cada cadena un dominio denominado V. Los dominios V son extracelulares y su variabilidad de secuencia es muy elevada. Cada uno está estabilizado por un puente disulfuro intracatenario y, en el caso de la cadena α , presenta un sitio de glicosilación. Los dominios V de ambas cadenas son los responsables del reconocimiento antigénico.

La región génica C de cada cadena codifica un dominio C, una zona bisagra, una porción transmembrana y una cola intracitoplásmica. Las regiones C, como su nombre indica son prácticamente constantes. Cada uno de los dominios C presenta un puente disulfuro intracatenario. El dominio C de la cadena α presenta un sitio de glicosilación y dos el de la cadena β . Los dominios C de ambas cadenas interaccionan con los componentes del complejo CD3 (3).

Cada una de las cadenas presenta una pequeña zona bisagra comprendida entre el dominio C y el dominio transmembrana. Ambas están unidas a través de un puente disulfuro intercatenario y presentan un sitio de glicosilación. Recientemente se ha demostrado que incluyen motivos de secuencia que controlan la eficiencia de la señalización inducida por el reconocimiento del Ag. Así, se ha comprobado que la secreción de IL-2 tras la activación es menor si se mutan residuos conservados en los dominios bisagra de las cadenas α y β de varias especies y se sustituyen por los de sus respectivas cadenas homólogas, δ y γ (5, 6).

Cada cadena atraviesa la membrana citoplasmática con un único dominio transmembrana y termina en su extremo carboxi-terminal (Ct) con una pequeña cola citoplasmática de 5 aminoácidos en el caso de la cadena α y de 9 aminoácidos en el de la cadena β . La región transmembrana de la cadena β se ha implicado en la asociación del heterodímero $\alpha\beta$ con determinados componentes del CD3 (7). Se ha comprobado que células T cuyos TCRs carecen de la cola intracitoplasmática de la cadena α no son capaces de internalizar el TCR tras la activación con un mitógeno (8).

Los heterodímeros $\alpha\beta$ aparecen en la superficie celular unidos al complejo CD3 con el que forman el TCR. CD3 está compuesto por tres cadenas polipeptídicas asociadas en forma de

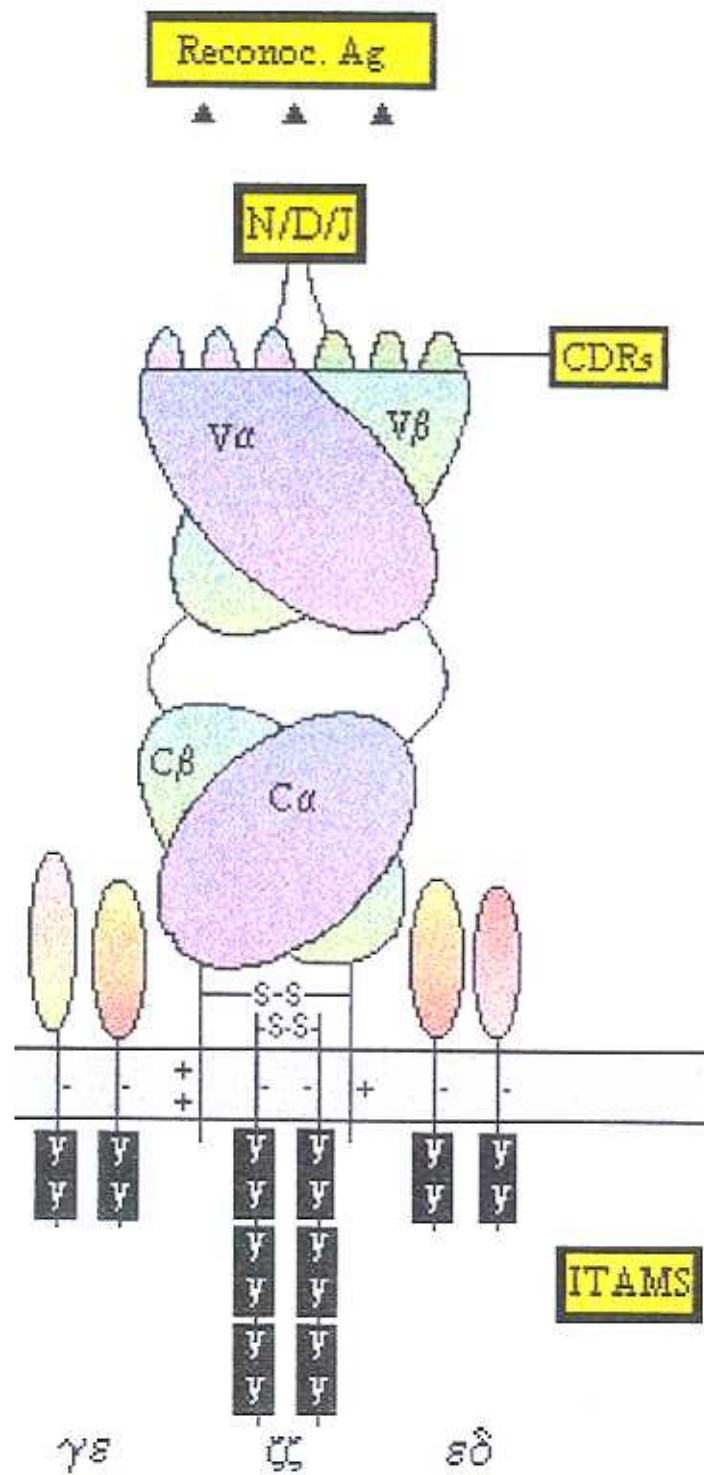
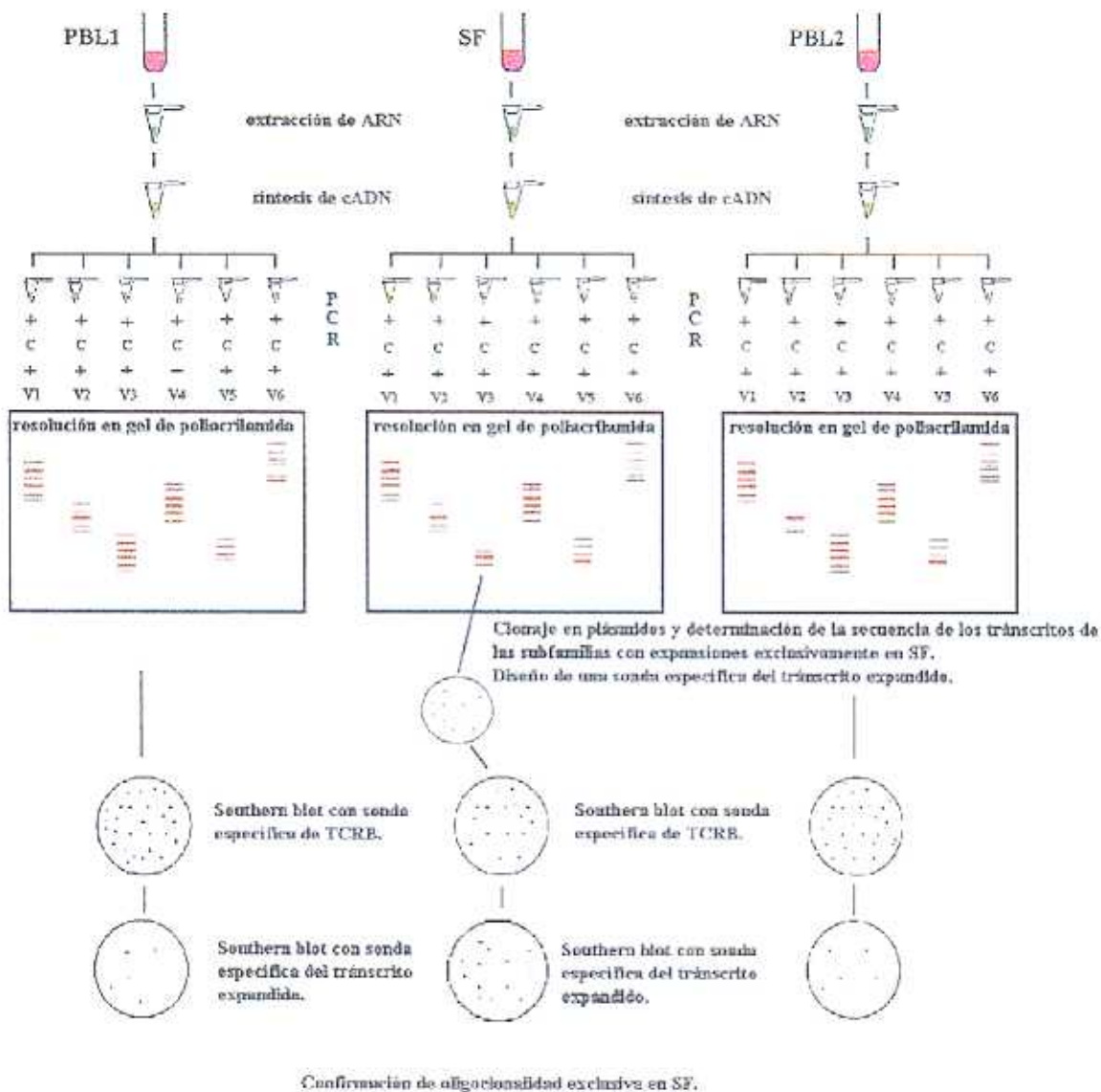


Figura 1: Modelo "mínimo" de la estructura del TCR. El modelo dimérico supondría la existencia de dos dímeros $\alpha\beta$ asociados a un dímero $\epsilon\delta$, un $\epsilon\gamma$ y un $\zeta\zeta$.



Determinación de la capacidad de respuesta de las células T portadoras del transcrito expandido frente a distintas líneas B linfoblásticas.

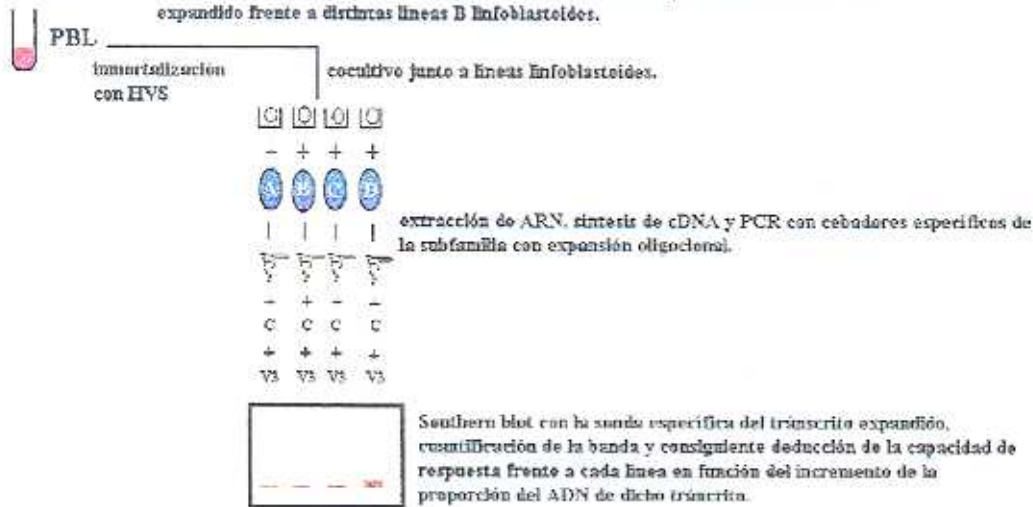


Figura 12: Procedimiento metodológico empleado para el estudio de las muestras derivadas de enfermos afectados por espondiloartropatías.

dímeros $\gamma\epsilon$ y $\delta\epsilon$ y un homodímero $\zeta\zeta$. Los últimos estudios indican que la estructura del TCR es $(\alpha\beta)_2(\gamma\epsilon)(\delta\epsilon)(\zeta\zeta)$ (9). Cada una de las cadenas del complejo contiene en la región citoplásmica secuencias denominadas Motivos de Activación de Inmunorreceptores basados en Tirosina (ITAM) que son dianas de tirosin-quinasa y cuya fosforilación es el primer evento detectado en la señalización tras el reconocimiento de Ag a través del dímero $\alpha\beta$ (10).

1.1.- Nomenclatura, organización, reordenamiento y diversidad de los genes TCRA y TCRB.

La nomenclatura de los segmentos génicos que forman cada cadena del dímero $\alpha\beta$ fue definida por el subcomité de nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS). Las regiones génicas de las cadenas α y β del TCR se denominan TCRA y TCRB, respectivamente. Cada elemento génico se designa V, D, J o C indicando con un número la subfamilia (en segmentos V) o la agrupación génica (en el resto de segmentos). La letra S seguida de otro número señala a qué miembro nos referimos. Se define subfamilia como el conjunto de segmentos TCRV que poseen una homología de secuencia de nucleótidos superior al 75% (11). La homología entre las distintas subfamilias varía entre el 16% y el 58% (11). De esta manera las 81 secuencias distintas obtenidas de segmentos V de cadenas α definen 32 subfamilias y las 138 secuencias distintas de segmentos V de cadenas β definen 34 subfamilias (11). En función del tipo de estudio, puede ser conveniente agrupar los segmentos V en función de su homología en la secuencia de nucleótidos (12) o en función de los aminoácidos que aparecen en las posiciones 61 y 62 (13) (Tabla 1).

Los genes TCRAV se localizan en el cromosoma 14 (14q11) en humanos (14). La secuencia parcial del locus indica que en la línea germinal y de posición 5' a 3' existe una agrupación génica formada por los 70-80 segmentos TCRAV, los segmentos génicos de la cadena δ del TCR, los 63 segmentos TCRAJ y, en el extremo 3' del gen, el único segmento TCRAJ (Fig. 2).

El locus TCRB, situado en el cromosoma 7 en humanos, se ha secuenciado completamente (15). Los genes de la línea germinal están separados en 3 agrupaciones génicas: En la posición 5' del locus, se encuentra una agrupación que contiene 64 segmentos TCRBV. A continuación de ésta, se sitúa una agrupación que contiene el segmento TCRBD1, 6 segmentos TCRBJ1 y el segmento TCRBC1. Tras ésta existe una tercera agrupación que contiene el segmento TCRBD2, 7 segmentos TCRBJ2 y el segmento TCRBC2. Por último, en el extremo 3' de la región, se encuentra el segmento TCRBV30S1, cuya lectura está invertida respecto al resto de los segmentos del locus TCRBV (Fig. 2).

Los segmentos TCRA y TCRB se reordenan en un estadio temprano de la maduración de los timocitos, precursores de las células T. El reordenamiento se produce secuencialmente (Fig. 3) de forma que en primer lugar se recombina uno de los alelos TCRB, mientras el otro permanece bloqueado (16). TCRA no se reordena hasta que existe una recombinación correcta de TCRB.

El reordenamiento de TCRB comienza con la unión de un segmento TCRBD a uno TCRBJ. A continuación, un segmento TCRBV se recombina con el TCRBD-J (17). Entre las zonas de unión de los segmentos V y D y los D y J, la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) introduce aleatoriamente nucleótidos no codificados en la línea germinal que conforman la región N. Se ha descrito la translocación de las últimas bases de la región V (región P) pero prácticamente no se produce en TCRA ni TCRB. Los segmentos génicos comprendidos entre los recombinados se eliminan, por lo que el gen TCRB de las células T maduras es de menor tamaño y carece de parte de los segmentos. La unión de uno de los segmentos TCRBC se produce durante la maduración del mRNA y, además, se eliminan los intrones internos de la región V, el comprendido

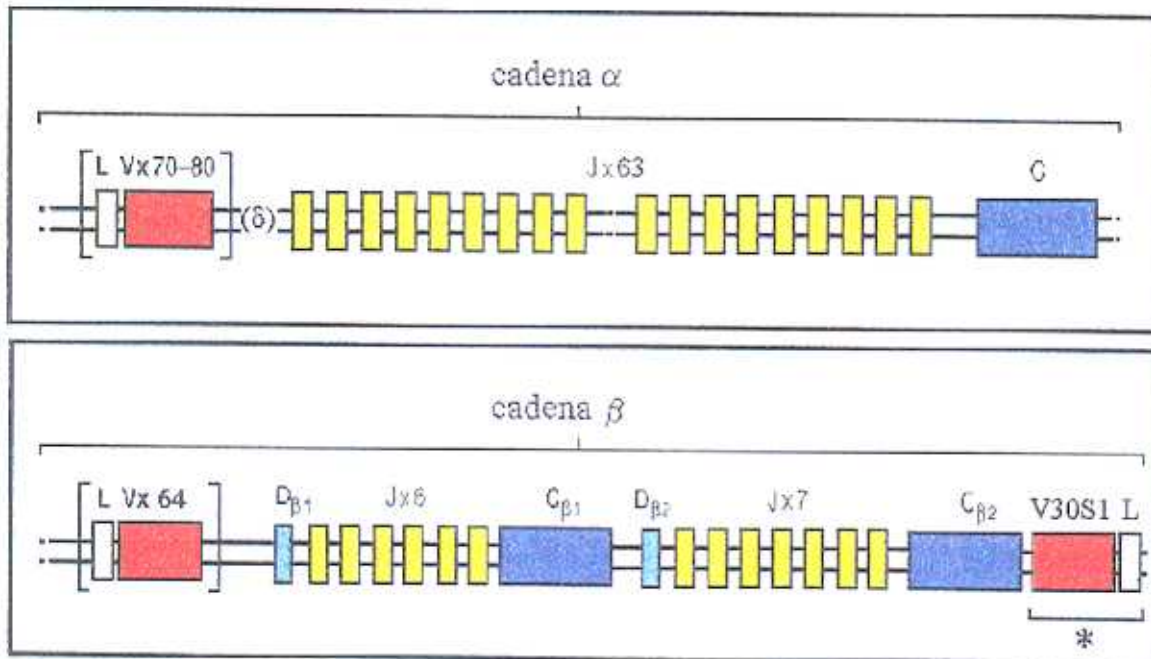


Figura 2: Organización de los genes TCRA y TCRB humanos. L: región líder, V segmento variable, J segmento de unión, C segmento constante. El gen TCRA contiene ante los segmentos J, los segmentos correspondientes a TCRD. Los segmentos señalados con el asterisco indican el segmento V30S1 y su región líder, codificados en sentido inverso al resto de los segmentos del gen TCRB.

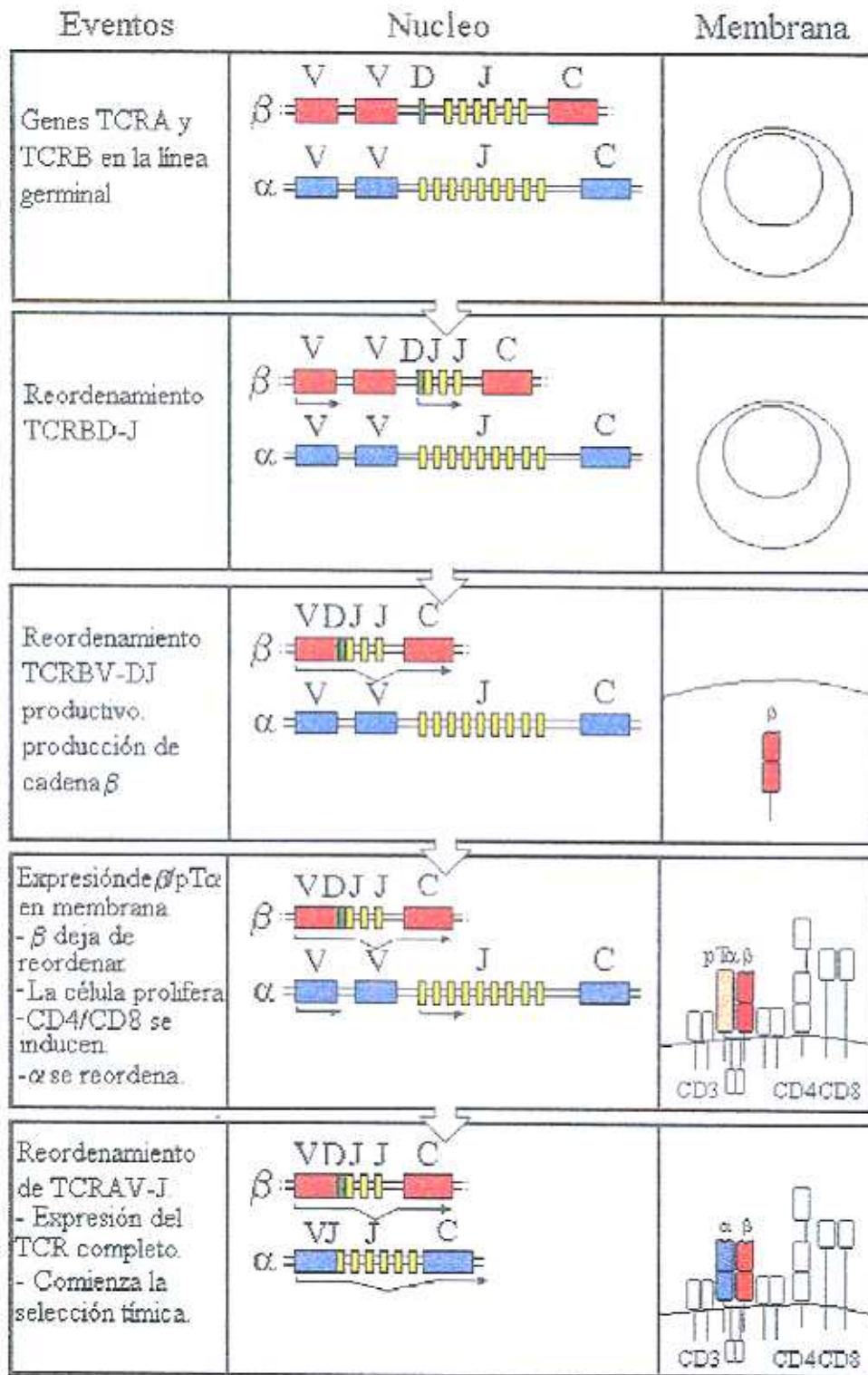


Figura 3: Estado de reordenamiento génico en timocitos. Se indica el estado de reordenamiento de los genes, así como los eventos que tienen lugar en la superficie de la célula en cada estadio. Los genes TCRB reordenan en primer lugar y hasta que no se produce un reordenamiento productivo capaz de generar una cadena β , que se exprese en membrana junto a la cadena β pTcr, no comienza el reordenamiento de TCRA. Una vez finalizados los eventos de reordenamiento comienza la selección tímica.

SUBGRUPO TCRAV (Chothia)	SUBFAMILIA TCRAV	SUBGRUPO TCRBV (Chothia)	SUBFAMILIA TCRBV
1	2, 8, 15, 17, 21	1a	6, 8, 16, 21, 22, 26
2	3, 5, 10, 13, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32	1b	10, 18, 19, 25
3	6, 12, 14	1c	1, 5, 23
4	1, 9, 16, 22, 31	2	7, 9, 24
5	4, 20	3	2, 4
6	7	4	3, 11, 12, 13, 14, 15, 17
Otros	11	5	20
SUBGRUPO TCRAV (Schiffer)	SUBFAMILIA	SUBGRUPO TCRBV (Schiffer)	SUBFAMILIA
I	1, 9, 16, 22	I	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26
II	2, 7, 14, 17, 21	II	3, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20
III	3, 5, 10, 13, 15, 19, 23, 25, 27, 28, 30, 32	---	---
MISCELANEA	4, 6, 8, 11, 12, 18, 20, 24, 26, 29, 31	---	---

Tabla 1: Clasificación de las subfamilias de TCRAV y TCRBV en subgrupos de homología según las definiciones de Chothia y col. (12) y Schiffer y col. (13).

entre la región J y la C y los de la región C, tanto los que separan los exones correspondientes al dominio C como los comprendidos entre la región bisagra, la transmembrana y la cola citoplasmática. Se han descrito mecanismos de empalme o "splicing" alternativo durante la maduración del mRNA que pueden aumentar la diversidad debida al reordenamiento de los segmentos (18). La proteína codificada por el producto del reordenamiento se expresa en la membrana del timocito asociada a una cadena denominada pT- α y a parte del complejo CD3 (19). Si se produce este paso, comienza el reordenamiento de los segmentos TCRA. Si por el contrario, la cadena β no puede expresarse en la superficie del timocito, se continúa reordenando TCRB hasta lograr un reordenamiento productivo. El reordenamiento productivo de uno de los alelos de TCRB implica un mecanismo de exclusión alélica que bloquea el reordenamiento y transcripción del otro, por lo que en general cada célula T madura sólo transcribe el mRNA que codifica una cadena β (16), aunque aproximadamente el 1% de las células T obvian la exclusión alélica y expresan dos TCRs funcionales con distintas cadenas β (20, 21).

El reordenamiento de TCRA se produce de forma análoga al de TCRB. A diferencia de éste, ambos alelos TCRA reordenan simultáneamente y siguen reordenando hasta que un dímero $\alpha\beta$ se expresa en la membrana del timocito. Al igual que en el caso de TCRB, el segmento TCRA se une al V-J durante la maduración del mRNA y también en este caso se han descrito empalmes alternativos (18). El reordenamiento simultáneo de los dos alelos TCRA implica que se pueden transcribir dos mRNA y por ello hasta un tercio de las células T maduras pueden expresar dos TCRs funcionales con distintas cadenas α (22). Se han realizado estudios con anticuerpos anti-TCRV α que sugieren que en humanos el número de células T con dos TCRs funcionales es cercano al teórico (21) y que los fenómenos de transcripción preferente y emparejamiento mayoritario de una cadena son minoritarios, al contrario de lo observado en ratones (23, 24).

No se ha detectado hipermutación somática en los TCRs, pero existen múltiples mecanismos y elementos cuya combinación es capaz de generar 10^{11} - 10^{16} heterodímeros $\alpha\beta$ distintos (2, 25, 26), como por ejemplo: la existencia de distintos alelos de los segmentos TCRBV y TCRAV, las múltiples combinaciones entre segmentos TCRV, TCRD y TCRJ, los distintos inicios de lectura de las regiones D, la adición de nucleótidos no codificados en la línea germinal a las regiones N, los distintos ensamblajes entre los exones durante la maduración del mRNA y las posibles combinaciones entre cadenas α y β .

La totalidad de TCRs expresados clonalmente por las células T de un individuo se denomina repertorio de TCRs. Los estudios del repertorio en sujetos sanos indican que existen usos sesgados de los distintos elementos generadores de diversidad (Fig. 4 y 5 y Tablas 2 y 3). Estos sesgos se deben a la influencia de distintos factores que son capaces de modificar el repertorio. Se ha descrito que el repertorio está limitado por factores genéticos (31, 32), por reordenamientos preferentes de determinados segmentos TCRV (27) y TCRJ (30, 33), por la dependencia de tamaños de las regiones N y N+D en función de los segmentos TCRJ empleados (30) y por la mayor utilización de determinados aminoácidos en las regiones N y N+D en función de su posición (29) o del segmento TCRV empleado (30). El repertorio también está modificado y limitado por factores ambientales, la exposición a distintos Ags a lo largo de la vida del individuo y por los procesos que conducen a la tolerancia. A pesar de ello, el repertorio de TCRs es lo suficientemente amplio como para cubrir las necesidades de reconocimiento antigénico del individuo.

TCRB	Gly	Ala	Ser	Thr	Leu	Val	Met	Phe	Tyr	Trp	His	Arg	Lys	Asp	Glu	Gln	Asn	Cys	Pro
TOTAL	23.1	6.3	8.5	7.7	7.3	3.9	1.1	2.0	2.0	1.6	1.4	8.4	1.7	6.0	4.5	3.7	2.4	<u>0.3</u>	5.0
VB3	22.7	5.4	9.7	8.8	10.1	2.5	0.9	2.8	1.4	2.5	0.9	7.9	1.4	5.8	2.0	3.0	3.9	<u>0.1</u>	5.7
VB4	25.0	6.0	7.8	8.2	6.5	4.5	0.9	1.3	1.6	1.1	2.0	10.1	3.0	6.5	3.0	3.7	1.6	<u>0.5</u>	3.9
VB5S1	30.1	8.2	9.5	9.4	14.1	3.8	1.2	4.4	1.4	1.6	0.9	7.3	2.3	5.7	5.5	4.4	1.6	<u>0.4</u>	5.9
VB12	23.2	6.2	10.5	7.0	3.5	4.2	1.1	0.8	2.1	0.4	1.4	8.0	1.1	7.9	9.3	4.3	1.5	<u>0.1</u>	4.2
VB13S2	19.5	4.2	8.7	7.4	5.8	2.6	0.9	0.9	8.1	2.6	0.9	10.3	2.6	4.2	3.2	2.6	4.2	<u>0.3</u>	8.1
VB17	22.3	6.2	8.1	8.9	5.8	2.9	1.7	1.9	1.3	1.9	1.9	8.3	2.3	6.2	2.5	3.3	2.9	<u>0.3</u>	4.8
VB20	21.7	7.5	8.6	4.4	6.5	8.2	2.4	2.7	1.0	1.3	2.4	10.3	<u>0.3</u>	2.7	3.1	5.1	2.0	1.3	4.8
VB22	21.4	8.7	10.2	6.5	5.0	5.6	<u>0.3</u>	1.5	1.8	2.8	0.9	7.7	0.9	7.1	8.0	4.0	1.8	<u>0.3</u>	4.3

Tabla 2: Frecuencia de aminoácidos en la región N+D en función del segmento TCRBV. Porcentaje total en función de la subfamilia TCRBV. Los aminoácidos más usados tras Gly aparecen en negrita y los menos empleados, subrayados. Tomado de Quiros y col (30).

TCRAJ	%	TCRAJ	%
1	0	32	0.3
2	0	33	2.3
3	2.1	34	1.0
4	4.8	35	0
5	4.1	36	0.7
6	2.8	37	3.8
7	1.3	38	2.1
8	2.1	39	3.1
9	3.8	40	2.8
10	3.1	41	0.3
11	0.7	42	1.3
12	0.7	43	2.1
13	1.3	44	2.1
14	0	45	3.1
15	3.1	46	0
16	1.0	47	2.3
17	1.3	48	2.8
18	1.0	49	3.1
19	0	50	0.7
20	3.4	51	0
21	0.7	52	4.1
22	2.1	53	1.3
23	3.1	54	2.1
24	2.1	55	0
25	0	56	1.0
26	1.3	57	2.3
27	0.7	58	1.7
28	1.0	59	0
29	2.3	60	0
30	2.3	61	0
31	2.1	-	-

TCRBJ	%
1S1	14.0
1S2	9.6
1S3	1.7
1S4	3.5
1S5	7.4
1S6	2.6
2S1	19.2
2S2	6.1
2S3	7.9
2S4	2.2
2S5	7.4
2S6	1.3
2S7	17.0

Tabla 3: Frecuencia de uso de segmentos TCRJ. Media obtenida de 300 transcritos procedentes de PBLs de 3 individuos sanos no relacionados. Tomado de Moss y cols. (29) y de Quiros-Roldan y cols. (30).

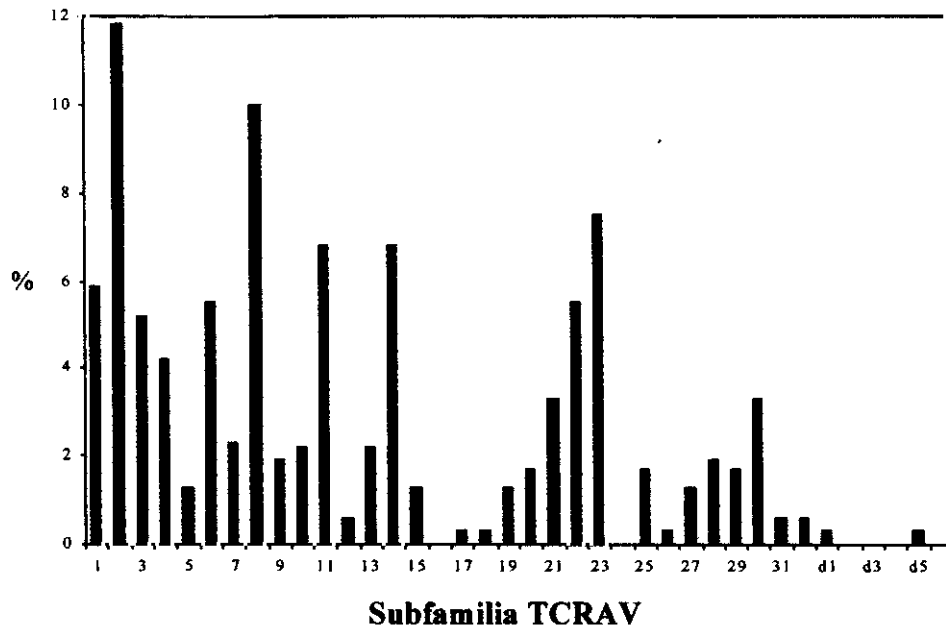
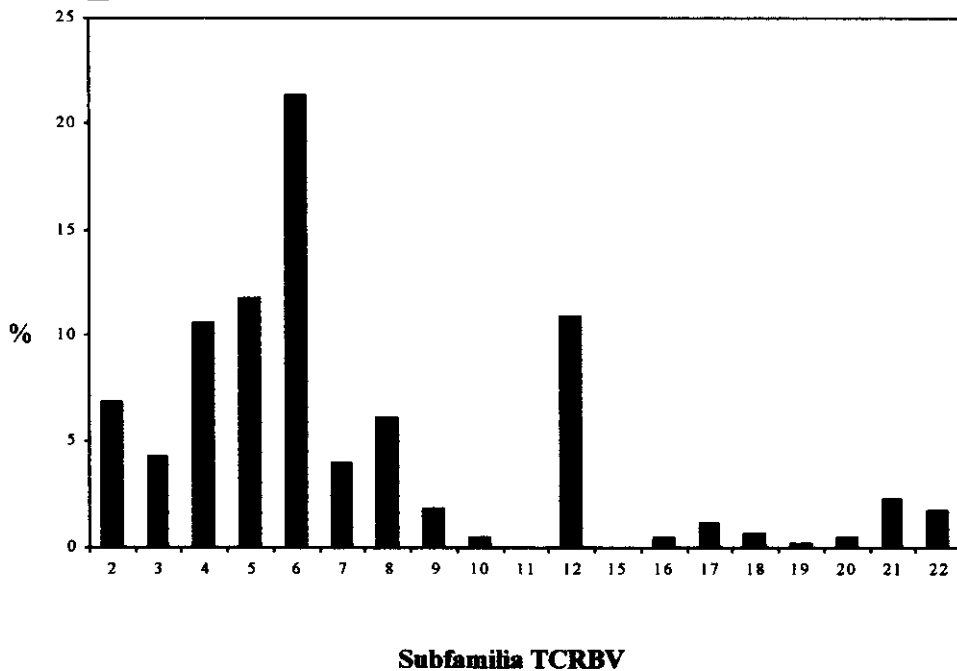
A**B**

Figura 4: Frecuencia de uso de segmentos TCRV. A: Uso de segmentos TCRAV. Frecuencias calculadas a partir de las secuencias de 300 transcritos procedentes de 3 individuos sanos no relacionados. Tomado de Moss y col. (27). B: Uso de segmentos TCRBV. Frecuencias calculadas a partir de las secuencias de 300 transcritos procedentes de 5 individuos sanos no relacionados. Tomado de Rosenberg y col (28).

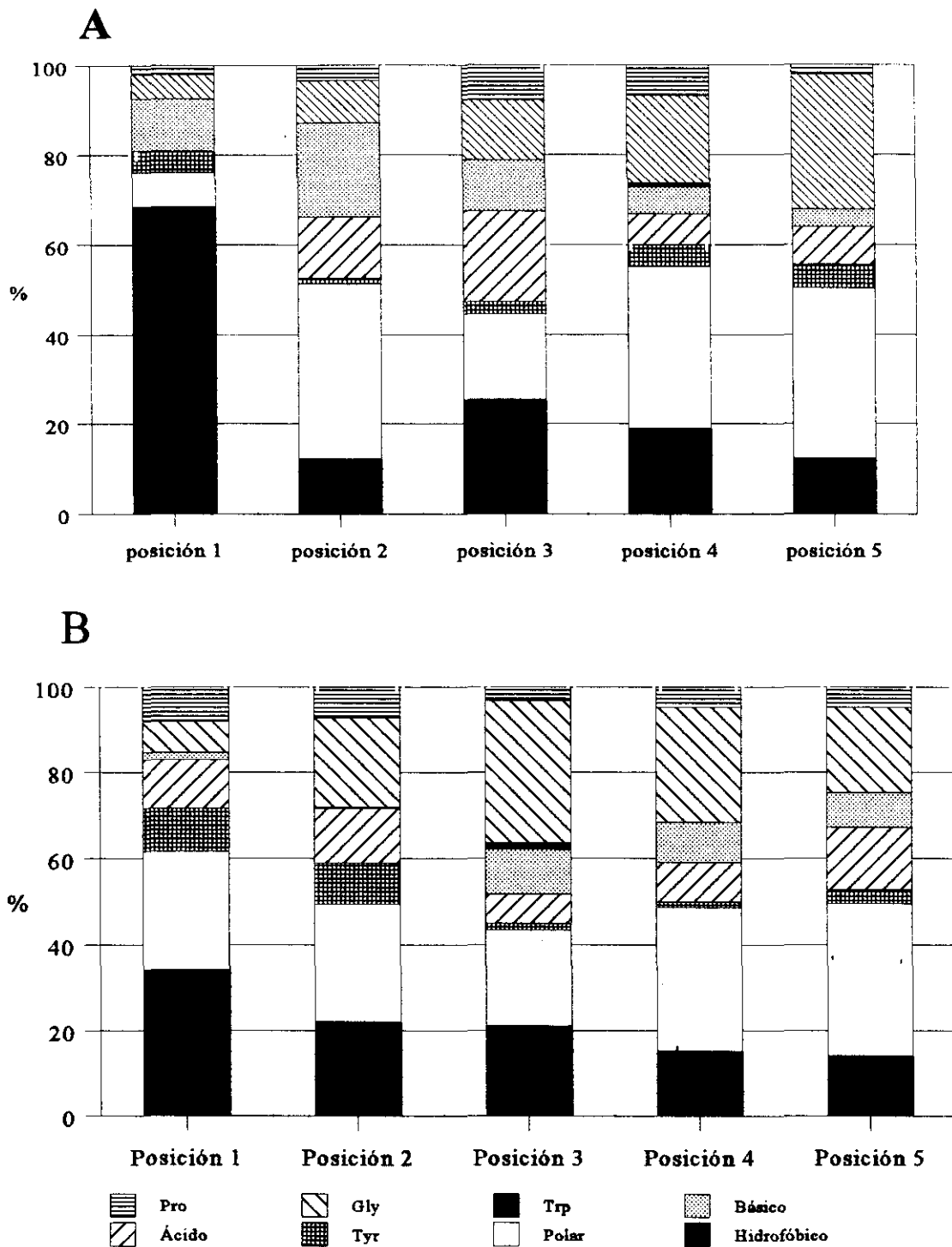


Figura 5: Composición de aminoácidos de la región CDR3 α (A) y CDR3 β (B) de transcritos humanos. Las posiciones se definen según Chothia y col. : Cys-Ala-...(X)_n...Phe-Gly-X-Gly para CDR3 α y Cys-Ala-Ser-Ser...(X)_n...Phe-Gly-X-Gly. Los aminoácidos se agrupan de la siguiente manera: Hidrofóbico: Leu, Ile, Phe, Met, Val, Ala. Polar: Gln, Asn, Thr, Ser. Ácido: Glu, Asp. Básico: Arg, Lys, His. Tabla tomada de Moss y col. (29).

2.- Antígenos y su reconocimiento.

Los TCRs reconocen básicamente dos tipos de Ags: péptidos presentados por moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) (34, 35) y superantígenos (SAg). El epítipo, o porción del Ag reconocida por el TCR de un linfocito individual, está formado por residuos tanto del péptido como de la molécula del MHC. El reconocimiento de los SAg se lleva a cabo independientemente de la especificidad antigénica del TCR y depende de qué región V expresa su cadena β , por lo que no se define epítipo en el reconocimiento de SAg. No existen diferencias entre la activación de las células T por un complejo péptido/molécula del MHC y un SAg, como demuestran distintos estudios que cuantifican la internalización del TCR (36), la movilización de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), la respuesta proliferativa y la secreción de citoquinas (36, 37).

2.1.- HLA, péptidos y estructuras del TCR implicadas en su reconocimiento.

El MHC es un sistema de genes altamente polimórfico y poligénico que en humanos se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 (38). Gran parte de los genes del MHC codifican proteínas relacionadas con el procesamiento y presentación de péptidos en la superficie de las células. En humanos, las moléculas del MHC encargadas de la presentación de péptidos a las células T se denominan Antígenos Leucocitarios Humanos (HLA) y están codificadas en la región de clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y en la región de clase II (HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP) del MHC (38). El MHC codifica, además, otras proteínas relacionadas con el procesamiento y presentación de péptidos (HLA-E, -G, -DM, etc.).

La expresión de los alelos del HLA es codominante, por lo que cada individuo puede expresar 6 moléculas de clase I distintas y 6 de clase II. Las moléculas presentadoras de clase I y clase II no sólo se diferencian por su localización en el MHC, sino por su estructura (Fig. 6): las de clase I están formadas por una glicoproteína de membrana asociada a una cadena extracelular denominada $\beta 2$ microglobulina ($\beta 2m$) y presentan un sitio de unión para CD8, correceptor de una subpoblación de células T (39); las de clase II están formadas por dos glicoproteínas de membrana de aproximadamente el mismo tamaño y tienen un sitio de unión para CD4, correceptor expresado por otra población de células T.

A pesar de estas diferencias, los dominios que incluyen son homólogos: Los dos dominios más distales respecto a la membrana forman, en ambos casos, una hendidura consistente en una lámina β de 8 cadenas antiparalelas flanqueada por dos hélices α (Fig. 6C y 6D) (40). Tanto las moléculas de clase I como las de clase II pueden alojar péptidos en la hendidura: las primeras alojan preferentemente péptidos de 8 a 9 aminoácidos, aunque se han llegado a aislar péptidos de 13-14 aminoácidos (41-43); la hendidura de las segundas es más abierta por los extremos y permite alojar péptidos de hasta 25 aminoácidos, aunque la mayoría oscila entre 11 y 13 aminoácidos.

Los péptidos unidos a las moléculas del MHC de clase I proceden mayoritariamente de la digestión parcial de proteínas citoplasmáticas, tanto propias como de virus o de bacterias intracelulares. Se ha descrito que también se pueden presentar péptidos de origen extracelular por lisis de endosomas (44), regurgitación de los productos de degradación de lisosomas (45), etc. Los péptidos unidos a moléculas de clase II en general derivan de la degradación de partículas fagocitadas, por lo que pueden proceder de restos de otras células del organismo, de bacterias o de parásitos extracelulares. A pesar de ello, se han encontrado péptidos derivados de proteínas citosólicas unidos a moléculas de clase II (46), probablemente procedentes de los restos de otras células.

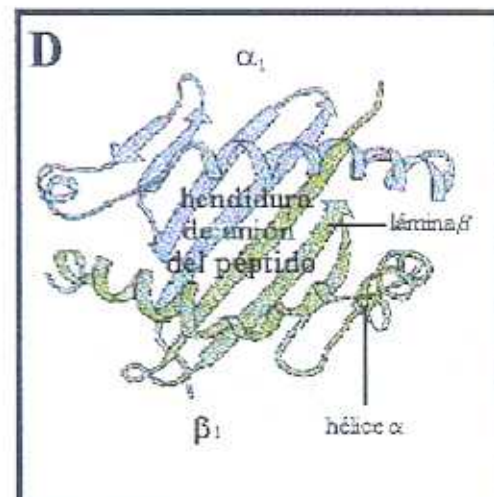
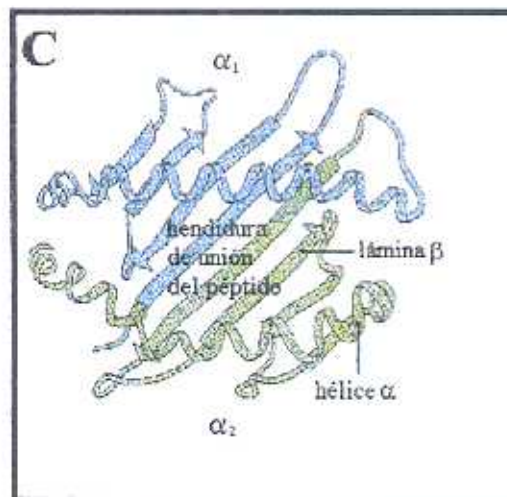
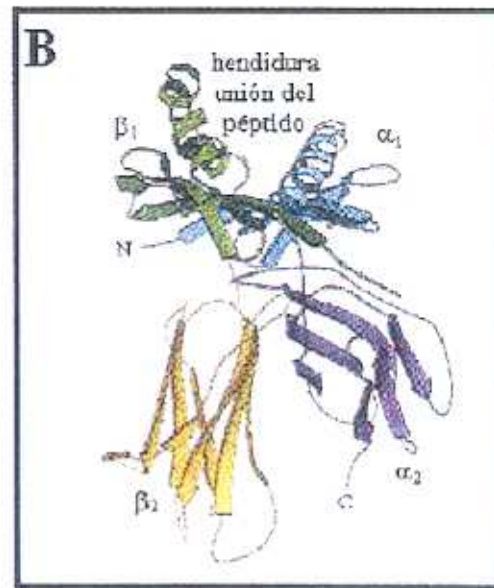
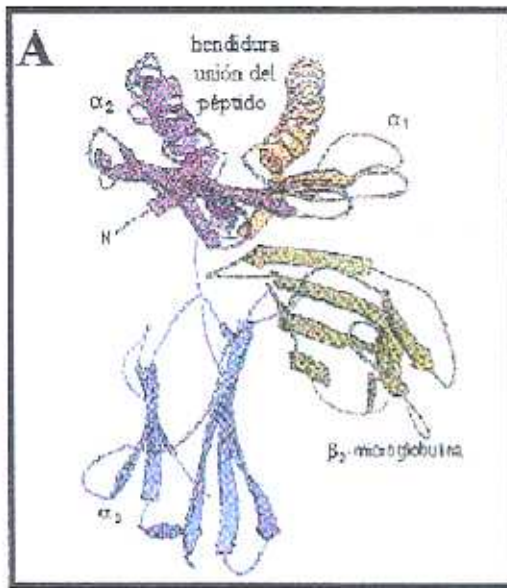


Figura 6: Estructura de las moléculas del MHC. A y C: molécula del MHC de clase I. A: vista lateral. C: vista frontal, indicando el sitio de unión del péptido. B y D: molécula del MHC de clase II. B: vista lateral. D: vista frontal, indicando el sitio de unión del péptido.

Determinados residuos de la hendidura de unión del péptido forman subcavidades o "pockets" a los que se unen los residuos de los péptidos denominados residuos de anclaje: en HLA de clase I es fundamental la unión de los residuos en posición 2 y 9 del péptido (P2 y P9), que se alojan respectivamente en las subcavidades B y C-F del HLA (47); en clase II, en cambio, el principal residuo de anclaje del péptido es P1 que se aloja en la subcavidad 1, pudiendo anclarse otros residuos a las subcavidades 3, 5 y 7 (47). El polimorfismo de los distintos alelos del HLA se concentra en los residuos de estas subcavidades (48), por lo que cada HLA aloja péptidos diferentes (47). Los estudios de difracción de rayos-X de cristales de complejos HLA/péptido unidos a dímeros $\alpha\beta$ del TCR de los que se han eliminado las regiones transmembrana (49, 50) han confirmado datos anteriores que indicaban que ambos dominios V del heterodímero $\alpha\beta$ del TCR interaccionaban con el complejo péptido-HLA a través de unos giros β denominados Regiones Determinantes de Complementariedad (CDRs) (2, 34). El TCR presenta 6 regiones CDR: 3 en la cadena α y 3 en la cadena β (Fig. 7). Las regiones CDR1 de ambas cadenas comprenden aproximadamente del residuo 23 al 34 y las CDR2 entre el residuo 47 y el 57 (numeración tomada de Kabat y cols. (51)). Tanto CDR1 como CDR2 están codificadas en los respectivos segmentos TCRV. Las CDR3 se sitúan entre los residuos 90 y 100, están codificadas por las zonas de unión entre los segmentos TCRV y TCRJ e incluyen los nucleótidos de las regiones N y N+D (26). Las regiones D codifican mayoritariamente Gly, mientras que los nucleótidos de las regiones N se introducen al azar durante la ontogenia, por lo que la variabilidad de las CDR3 es aún mayor que la de CDR1 y CDR2. CDR1 y CDR2 interaccionan mayoritariamente con residuos del HLA, mientras que CDR3 contacta principalmente con residuos del péptido (34) (Fig. 8).

2.2.- Superantígenos y su reconocimiento por el TCR.

Los SAg son proteínas de origen viral o bacteriano capaces de estimular grandes subpoblaciones de células T, independientemente de su especificidad antigénica. La activación por SAg induce la proliferación celular y, una vez desaparecido el estímulo, se produce la disminución de la subpoblación estimulada.

Los SAg de origen bacteriano (bSAg) son proteínas solubles secretadas por bacterias, como *Staphylococci*, *Mycoplasma*, *Yersinia*, etc. Tienen dos dominios, uno de los cuales puede interaccionar con el TCR y el otro con una molécula del MHC de clase II, aunque la interacción con la molécula del MHC no es necesaria para conseguir la activación de la célula T (37). Los SAg de origen viral (vSAg) son codificados por retrovirus y pueden estar integrados en el genoma del individuo (52). Se han estudiado en ratones, principalmente las proteínas del virus de tumor mamario murino (MMTV) y se han identificado con los antiguamente denominados Ags menores estimuladores de linfocitos (MIs). Se expresan como proteínas de membrana y poseen un dominio capaz de unirse al TCR, otro a la molécula de clase II, una región transmembrana y una pequeña cola intracitoplasmática.

Los SAg interaccionan con la cadena β del TCR. Se ha descrito que los bSAg y vSAg interaccionan con diferentes regiones del dominio VB. Los bSAg contactan con CDR2 y minoritariamente con la región HiperVariable 4 (HV4), codificada por la región V y que comprende los residuos 68 al 78 del dominio V. Los vSAg se unen principalmente a través de HV4 y de CDR1 (53) y cubren parcialmente el péptido. Cada SAg es capaz de estimular todas las células T que utilizan determinados segmentos TCRBV en su TCR. Así, la enterotoxina B de *S. aureus* (SEB) es capaz de activar células T humanas que expresen VB3, VB12, VB14, VB15, VB17 o VB20. Recientemente se han descrito SAg que, además de contactar con CDR1, CDR2 y HV4, presentan requerimientos de secuencia en las CDR3 β (54, 55).

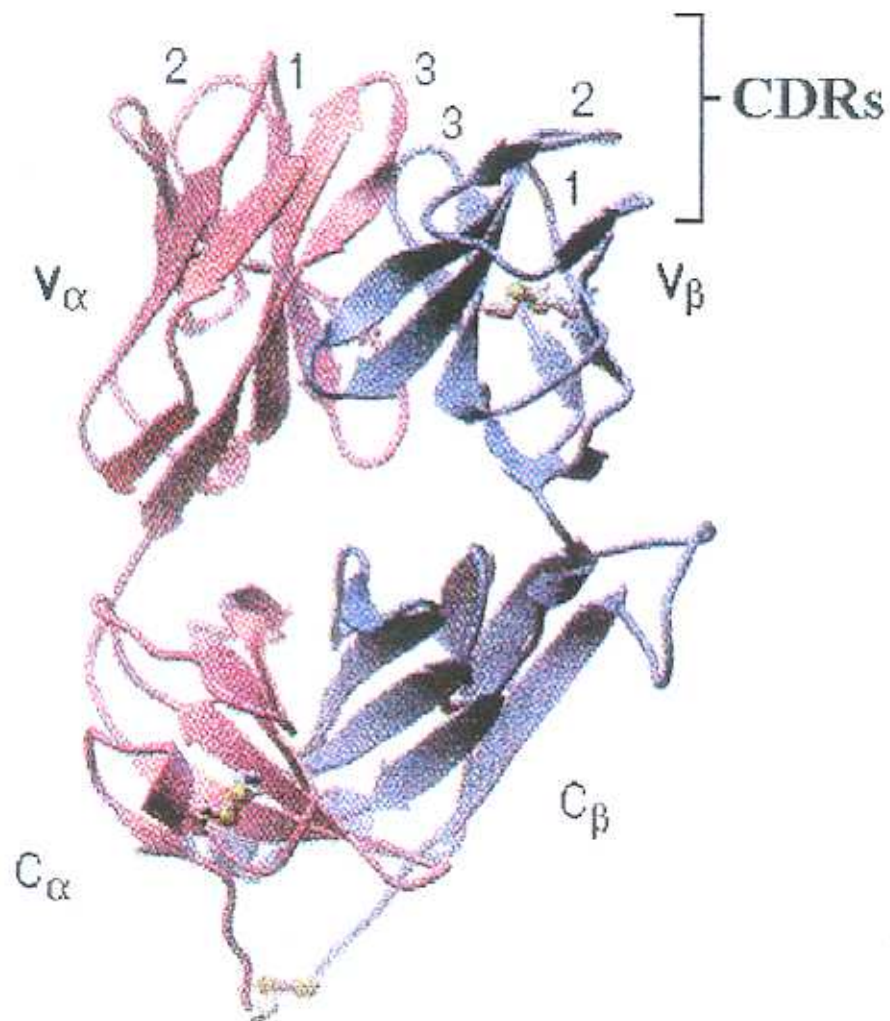


Figura 7: Estructura cristalográfica del TCR. Los números 1, 2 y 3 indican la posición de los CDRs, formando una estructura relativamente plana que facilita el reconocimiento y unión a complejos antigénicos. Tomado de García y cols. (49).

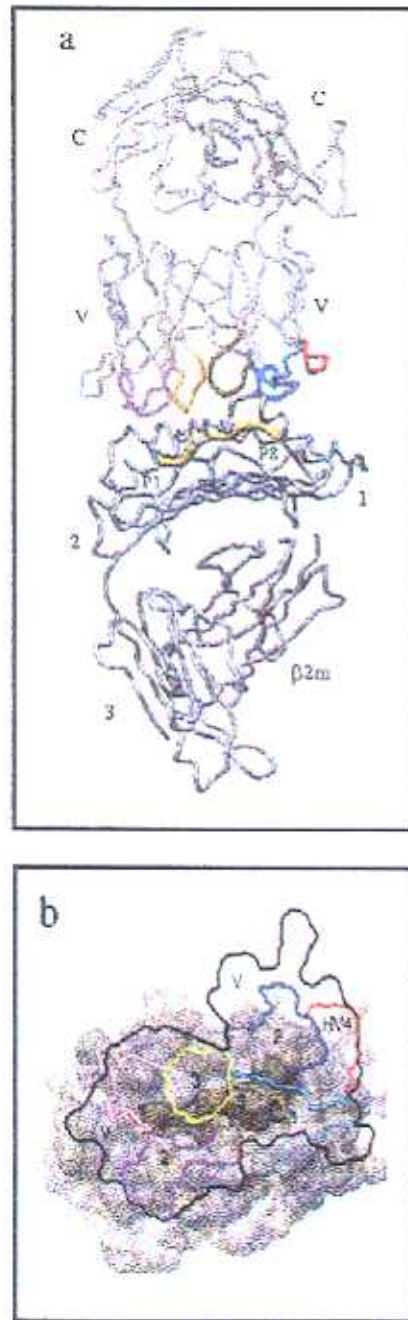


Figura 8: Estructura cristalográfica del complejo TCR-péptido-HLA. A: TCR (arriba) unido al complejo antigénico. Los CDRs se expresan coloreados: CDR1 y CDR2 de la cadena β en azul claro y azul oscuro, respectivamente. CDR1 y CDR2 de la cadena α en púrpura claro y oscuro, respectivamente. CDR3 β amarillo y CDR3 α pardo. La región HV4 de la cadena β rojo. B: Complejo antigénico en vista frontal. Las áreas indicadas indican los sitios de interacción de cada uno de los CDRs, según el código de colores que se ha indicado. El TCR se sitúa sobre el complejo antigénico. Los CDR3s se sitúan mayoritariamente sobre el péptido, en color amarillo-pardo. Tomado de García y cols. (49).

3.- Activación de la célula T.

Simultáneamente a la interacción del TCR con un Ag (complejo péptido-HLA o SAg), los correceptores CD4 o CD8 se asocian con el TCR y contactan con el HLA de clase II y de clase I, respectivamente. CD4 y CD8, cuya expresión en células T maduras es mutuamente excluyente, actúan sinérgicamente con el TCR pues poseen un dominio intracitoplasmático que interacciona fuertemente con la tirosin-quinasa *lck* que, junto a otras tirosin-quinazas de la familia *src*, se activa y fosforila las tirosinas presentes en los ITAMs de CD3. No se ha podido concluir con exactitud si cada ITAM controla una ruta o vía de activación distinta o si son redundantes. En cualquier caso, tras la fosforilación de los ITAMs se detecta activación de ZAP-70, aumento de los niveles de inositol trifosfato, liberación de $[Ca^{2+}]_i$, etc. (56). La activación completa provoca distintos efectos a cada subpoblación de células T:

- Las células T $CD4^+$, también denominadas células T cooperadoras o "helper" (Th), proliferan y secretan citoquinas que actúan sobre linfocitos B y T, macrófagos, células del endotelio vascular, leucocitos inflamatorios, etc.

- Las células T $CD8^+$ o células T citotóxicas (CTLs) también proliferan y secretan citoquinas al activarse, principalmente $IFN-\gamma$. Su característica principal es su capacidad de lisis de la célula que le presenta el Ag, denominada célula diana o célula presentadora de Ag (APC), mediante secreción de perforinas y granzimas o mediante fenómenos apoptóticos (57). Hay que indicar que se ha descrito una población minoritaria de células T $CD4^+$ con capacidad citotóxica (58).

No se conoce el mecanismo por el cual el reconocimiento del Ag se transmite a los diferentes ITAM y desemboca en la cascada de eventos que finalmente provoca la activación de la célula T, pero se han propuesto modelos que suponen la oligomerización de los TCRs (59), cambios conformacionales en éstos (60) o su acúmulo en el área de contacto entre las dos células y la consiguiente polarización del linfocito T (61, 62).

La estabilidad del complejo trimolecular TCR/complejo péptido-HLA está modulada por la presencia de otros receptores que pueden matizar la respuesta a diferentes Ags. Como detallaremos en el siguiente apartado, la activación de la célula T requiere, además de la interacción del TCR con el Ag, una segunda señal coestimuladora sin la que el linfocito T no es capaz de responder (63).

Según su estado de activación y sus contactos previos con el Ag los linfocitos T se clasifican en:

- *Células T activadas*. Estas células han interactuado con su Ag y están llevando a cabo las funciones efectoras que les corresponden. Su estado activado puede mantenerse mediante el reconocimiento de un número mínimo de complejos antigénicos, incluso en ausencia de coestímulos (64). Su fenotipo incluye varias moléculas (CD25, CD26, CD70, HLA-DR, etc.) que pueden emplearse como marcadores de activación. El estudio de la expresión de éstos en células de sangre periférica ha revelado que representan una proporción mínima de los linfocitos T del individuo. Las células T activadas expresan en membrana elevados niveles de Fas (65) y los primeros estudios indicaban una alta sensibilidad a la apoptosis por la vía Fas-Fas-L (66). A pesar de ello, estudios recientes han matizado dicha sensibilidad, indicando que los linfocitos T activados a través de su TCR resisten la apoptosis si existen simultáneamente señales coestimuladoras vía CD28 (67) y que únicamente son sensibles a la forma de membrana de Fas-L, por lo que en presencia de la forma soluble se produce una competencia entre ambas especies que puede regular los fenómenos apoptóticos en estas células (68). La sensibilidad a las formas solubles de Fas-L de las células activadas aumenta conforme envejecen (69, 70) o si se eliminan las citoquinas circundantes (71).

Dentro de las células T en reposo ("resting") de un adulto, las vírgenes oscilan entre el 50% y el 90%, siendo el resto células T de memoria (72). Este porcentaje es variable en función de la edad, exposición a Ags, etc. Ambas subpoblaciones presentan distintos marcadores de membrana, poseen distintas características de migración a órganos ("homing") y su capacidad de respuesta es diferente.

- *Células T vírgenes*. Nunca han sido expuestas a su Ag ni se han activado desde su maduración en el timo. Su fenotipo suele ser CD44^{lo}CD45RB^{hi}CD62L^{hi}, aunque su característica principal es la baja expresión de CD44 y los altos niveles de CD45RA y CD45RB (73). Presentan además bajos niveles de Fas y son poco sensibles a apoptosis (65, 68). Carecen de la mayoría de las moléculas de adhesión implicadas en extravasación y sólo se detectan en los órganos linfáticos y en tejidos en los que existe una inflamación crónica. Únicamente se activan si el reconocimiento del Ag es simultáneo a un fuerte coestímulo, habitualmente procedente de células que expresan gran cantidad de moléculas coestimuladoras y de adhesión, como las células dentríticas u otras APCs profesionales.

- *Células T de memoria*. Han respondido a su Ag y han retornado a un estado quiescente. Se diferencian de las vírgenes porque su capacidad de respuesta frente a una nueva aparición del Ag es más rápida, incluso cuando el Ag es presentado por células con niveles reducidos de moléculas coestimuladoras (74). Su fenotipo suele ser CD44^{hi}CD45RB^{lo}CD62L^{lo}. El rasgo más característico es la elevada expresión de CD44, pudiendo variar la expresión de CD45RB y CD62L (73). Habitualmente expresan elevados niveles de CD45RO que aumentan a mayor número de divisiones tras la activación antigénica (75), así como distintas moléculas de adhesión implicadas en extravasación a tejidos inflamados. Oehen y cols. (76) han propuesto que no existen células T CD8⁺ de memoria sino que sólo hay células T vírgenes o células T en un estado de activación continuo debido a que encuentran bajos niveles de Ag capaces de reestimar a la célula. Mullbacher (77) y Tanchot y cols. (78) demuestran que las células T CD8⁺ de memoria pueden mantenerse largos periodos en ausencia de Ag y que el simple contacto con una molécula del MHC, incluso distinta de la que presenta el Ag, permite la supervivencia de la población CD8⁺CD44^{hi} (78).

4.- Tolerancia.

Se define tolerancia inmunológica como la ausencia de respuesta inmunológica contra un Ag. El mantenimiento de la tolerancia se realiza mediante la inactivación o muerte de los linfocitos específicos de Ag y desemboca en la incapacidad del organismo para responder a éste. Habitualmente se diferencian dos tipos de tolerancia:

- *Tolerancia central*. La eliminación de las células potencialmente autorreactivas se lleva a cabo en el timo durante la ontogenia de las células T. La selección tímica asegura que los linfocitos T que abandonan el timo sean capaces de reconocer Ags presentados por moléculas del MHC propias y elimina las células T potencialmente autorreactivas. De hecho, se ha calculado que únicamente el 5% de los timocitos finaliza su maduración. La selección tímica puede dividirse en selección positiva, que elimina los timocitos que no reconocen complejos antigénicos expresados por células epiteliales del cortex tímico, y selección negativa, que suprime los timocitos que responden a Ags presentados por células del estroma tímico derivadas de médula ósea (macrófagos córtico-medulares y células dentríticas interdigitadas). La especialización celular en el timo no es absoluta y, de hecho, se ha descrito que la eliminación de las células del estroma o impide el correcto desarrollo del proceso de selección (79-81). Actualmente se discute cómo dos procesos contrapuestos como la selección positiva y la negativa pueden basarse en el reconocimiento de Ag

vía TCR. Se ha propuesto que los péptidos presentados por las distintas células del timo son diferentes (82) y que tanto la ausencia de reconocimiento como una señal intensa vía TCR producen la eliminación de los timocitos, conservándose únicamente los linfocitos con afinidad o avidez moderada por los Ags propios (83, 84).

- Tolerancia periférica. Los procesos que desembocan en ella actúan sobre células maduras. Neutralizan las células potencialmente autorreactivas no eliminadas en el timo y controlan la intensidad y duración de las respuestas antigénicas mediante procesos de apoptosis y anergia de manera que la exposición prolongada a un antígeno puede desembocar en una ausencia de respuesta contra éste.

La primera barrera para impedir respuestas inmunológicas indeseadas es la ausencia de receptores de migración en las células T vírgenes que impide su infiltración en tejidos no linfáticos y por ello su acceso a los Ags específicos de tejido.

Se ha comprobado que la interacción TCR-Ag no es suficiente para que se produzca una respuesta (63, 85), sino que es necesario que simultáneamente al reconocimiento antigénico se produzcan otras señales, ya sea a través de la interacción de otros receptores de la célula T, como CD28, con sus ligandos en la APC, B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), o bien por la presencia de distintas citoquinas, como IL-1, TNF α o IL-6 que pueden rescatar a las células T de la apoptosis inducida tras la activación (86, 87). La intensidad y duración de la respuesta también se controlan por la sensibilidad de las células T efectoras a la apoptosis, mayor a mayor número de divisiones tras la activación (88).

5.- Respuestas alorreactivas.

La alorreactividad es la respuesta del sistema inmunológico a células de individuos de la misma especie. Se describió al observar la fuerte respuesta que se inducía tras los trasplantes y que podía conducir al rechazo del injerto. La respuesta, mediada principalmente por células T, se produce principalmente por el reconocimiento de complejos péptido/molécula del HLA del respondedor (89). En los casos en los que no existen diferencias entre el HLA de las células diana y las células T, toman importancia los Ags menores de histocompatibilidad, es decir, péptidos propios de la célula extraña no expresados por el respondedor, como pueden ser los específicos de sexo, etc.. Se ha descrito también una alorreactividad indirecta, debida al reconocimiento de péptidos derivados de la célula extraña, pero presentados por APCs del respondedor. Su influencia en la respuesta alogénica total es limitada y sólo se ha estudiado la inducción de respuesta por péptidos derivados del HLA extraño.

Se supone que los linfocitos T alorreactivos se activan por una reacción cruzada entre un complejo péptido/molécula del MHC propia y los complejos antigénicos alogénicos, que mimetizan la estructura del primero a través de residuos del HLA y del péptido (90). Los linfocitos T que pueden participar en una respuesta alogénica suman entre el 1% y el 10% de las células T del individuo (91). Este elevado porcentaje se debe a que durante la selección tímica no se eliminan células T con capacidad de reconocimiento de HLAs no expresados por el individuo.

A pesar del gran número de células T con diferentes especificidades que participan en una respuesta alogénica se han descrito motivos comunes en los TCRs de las células T alo-específicas de un mismo alelo HLA, incluso cuando proceden de varios individuos diferentes (92-99). Estos usos preferentes pueden deberse a que: 1) determinados residuos del TCR interaccionan preferentemente con aminoácidos del HLA y, si todos los complejos antigénicos reconocidos tienen en común el mismo HLA, es lógico pensar que los diferentes TCRs empleen residuos similares para interaccionar con la molécula del MHC; 2) los péptidos presentados por determinado HLA están

parcialmente condicionados por éste y consecuentemente, los TCRs de las células alorreactivas pueden emplear residuos similares para reconocer los aminoácidos del péptido condicionados por el alelo. Así, a partir de linfocitos de sangre periférica (PBLs) de distintos individuos se han generado *in vitro* clones HLA-B27 específicos, se han analizado las secuencias de sus TCRs y se ha observado que existen usos preferentes de TCRAV2 y de determinados residuos en las CDR3 α y CDR3 β , aunque los sesgos más acusados se observan en la utilización de segmentos TCRBV (6, 7, 14 y 17) (92-94). Los autores proponen que la limitación más acusada en el uso de segmentos TCRBV se debe a que, aunque ambas cadenas del dímero $\alpha\beta$ del TCR interaccionan con la molécula del MHC, el dominio VB interacciona preferentemente con el dominio más polimórfico del HLA y por tanto la secuencia de dicho dominio de HLA-B27 limita los segmentos TCRBV que interaccionan con él (93). La interacción preferente del dominio V β con el dominio α 2 del HLA ha sido recientemente confirmada por los datos sobre la estructura de los complejos TCR/Ag deducidos por difracción de rayos-X (50). Otros grupos han encontrado limitaciones preferentemente en el uso de TCRBV, tanto en alorrespuestas contra HLA de clase I (97, 99), como de clase II (95, 96, 98) (Tabla 4). Se ha postulado que la mayor restricción de TCRBV se debe a que el dominio VB tiene un papel predominante en el reconocimiento del HLA, mientras que V α determina la especificidad antigénica interaccionando preferentemente con el péptido (100). La interacción de una cadena del TCR preferentemente con el HLA y la otra con el péptido contradice los resultados deducidos a partir de la difracción de rayos-X, que indica una interacción similar de ambas cadenas tanto con el péptido como con el HLA (50).

6.- Enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes son aquellas en las que el sistema inmune adaptativo responde contra Ags propios, destruyendo tejidos sanos. Tanto si son sistémicas como locales, se caracterizan por la presencia de un infiltrado de células T en los tejidos afectados. Esta infiltración de células T en las lesiones así como la asociación de muchas de las enfermedades con determinados alelos HLA (Tabla 5) apoya la hipótesis de una implicación directa de las células T en el inicio y desarrollo de las patologías a través de una respuesta contra dichos alelos, aunque plantea la incógnita de cómo las células T autorreactivas han podido eludir los mecanismos que desembocan en la tolerancia. El desarrollo de la enfermedad autoinmune no puede achacarse exclusivamente a la existencia de células autorreactivas, ya que se pueden aislar clones autorreactivos de individuos sanos (102). La obtención y mantenimiento en cultivo de dichos clones requiere la activación por un agente mitógeno, así como un aporte exógeno de citoquinas y el empleo de APCs autólogas que expresen niveles elevados de complejos péptido-HLA. Estas condiciones normalmente no se dan *in vivo*, por lo que las células potencialmente autorreactivas no siempre responden a los autoantígenos. Su existencia sugiere que la reacción autoinmune puede iniciarse si algún desencadenante varía las condiciones de presentación de los péptidos o la capacidad de respuesta del linfocito.

Determinados péptidos sólo son presentados por las APCs si una causa externa modifica su entorno y aumenta su síntesis de proteínas o varía sus mecanismos de procesamiento y presentación de péptidos (103). Estas modificaciones del entorno también afectan a péptidos que se presentan a niveles tan bajos que no provocan una respuesta. Estos péptidos, habitualmente denominados péptidos crípticos, pueden revelarse por:

- Procesos inflamatorios (Fig. 9). Las células fagocíticas secretan IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ y TNF- α durante las infecciones y traumatismos. Estas citoquinas provocan inflamaciones locales y aumentan la expresión del HLA y de moléculas de adhesión en las APCs (104), con lo que

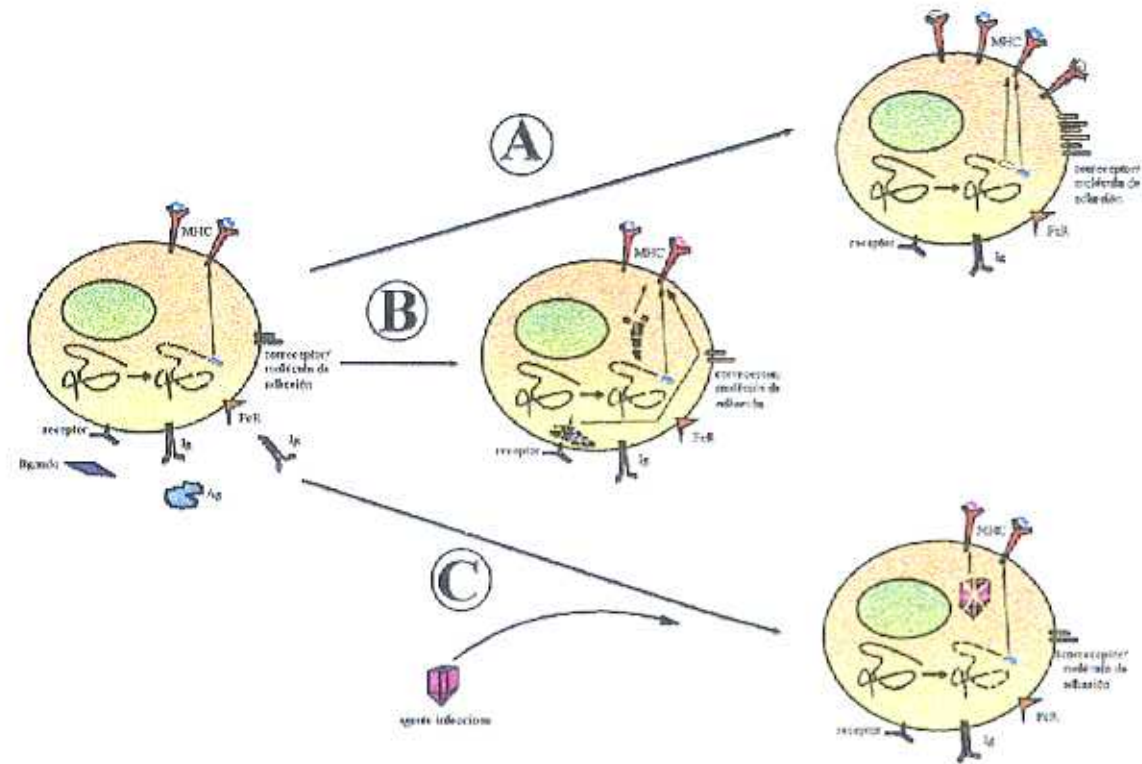


Figura 9: Mecanismos de revelación de epítopos crípticos. A: Inflamación. Las citoquinas inflamatorias aumentan la expresión de moléculas de adhesión, modifican los patrones de digestión y aumentan la expresión de moléculas del MHC en la APC. B: Internalización de receptores. Una vez unidos a sus ligandos, los receptores pueden ser internalizados junto a éstos y provocar el aumento de la presentación de los péptidos derivados tanto del receptor como del ligando hasta 1000 veces. C: Infección. Las infecciones modifican los patrones de digestión y pueden provocar la aparición de nuevos péptidos.

HLA	TCRA			TCRB			REF.
	V	N	J	V	N+D	J	
B7	2,6	N.U.P.	N.U.P.	14	N.U.P.	N.U.P.	(99)
B*2705	2	N.U.P.	J20	6,7,14,17	Función de TCRBV ^b	2S2,2S7	(94)
B35	2S3	Ile-His/Arg	J36	4S1	Gly-Gly	2S7	(97)
DRB1*0101, *0102	subgr. 1 ^a	N.U.P.	N.U.P.	subgr. 1 y 3 ^a	N.U.P.	N.U.P.	(96)
DRB1*0101	N.U.P.	N.U.P.	N.U.P.	2,13S1,18,20	N.U.P.	N.U.P.	(98)
DRB1*0301	N.U.P.	N.U.P.	N.U.P.	2,16,17	N.U.P.	N.U.P.	(98)
DRB1*0404	N.U.P.	N.U.P.	N.U.P.	2,5,6,7,13S2,18	N.U.P.	N.U.P.	(95)
DRB1*1301	N.U.P.	N.U.P.	N.U.P.	4,6,8,18	N.U.P.	N.U.P.	(98)
DRB1*1501	N.U.P.	N.U.P.	N.U.P.	2,8,13S2	N.U.P.	N.U.P.	(98)

Tabla 4: Usos preferentes de segmentos TCR por clones alógenos restringidos por el HLA indicado. N.U.P.: no existe uso preferente. ¹subgrupos definidos por Chothia y cols. (12).² motivos diferentes en función del segmento TCRBV empleado.

ENFERMEDAD	HLA ^a	FRECUENCIA		
		Pacientes	Controles	RR ^b
Espondilitis anquilosante	B27	>95	9	>150
Enfermedad de Reiter	B27	>80	9	>40
Uveitis anterior aguda	B27	68	9	>20
Tiroiditis subaguda	B35	70	14	14
Psoriasis vulgar	Cw6	87	33	7
Narcolepsia	DQ6	>95	33	>38
Enfermedad de Graves	DR3	65	27	4
Miastenia gravis	DR3	50	27	2
Enfermedad de Addison	DR3	69	27	5
Artritis reumatoide	DR4	81	33	9
Artritis reumatoide juvenil	DR8	38	7	8
Enfermedad celiaca	DQ2	99	28	>250
Esclerosis múltiple	DR2,DQ6	86	33	12
Diabetes tipo 1	DQ8	81	23	14

Tabla 5: Asociación de algunas enfermedades con el HLA.

^a HLA definido serológicamente.

^b Riesgo Relativo (cuantas veces es más frecuente la enfermedad en individuos con el alelo que en individuos sin éste).

Tomado de Thorsby (101).

se optimiza la presentación y se posibilita el inicio de la respuesta. Las citoquinas inflamatorias también aumentan los niveles de proteasas de las APCs por lo que se incrementa el número y variedad de péptidos presentados (105).

- Presentación por APCs profesionales (Fig. 9). Cada estirpe celular emplea distintas baterías de proteasas y, por tanto, genera distintos péptidos en función de los puntos de corte de las proteasas (106). Incluso cuando se presentan los mismos péptidos, la capacidad estimuladora de cada APC es distinta en función de los niveles de moléculas coestimuladoras (107). Se ha descrito que las células T pueden responder a péptidos presentados por células dentríticas que no son reconocidos al ser presentados por otras estirpes celulares (108).

- Internalización de receptores (Fig. 9). Las inmunoglobulinas (Ig) de membrana, los FcR y otros receptores se internalizan tras la unión a su ligando (Ag, Ig, etc.) y lo arrastran al interior de la célula donde ambos son procesados. La APC puede presentar péptidos tanto del ligando como del receptor y se ha descrito que la internalización de un anticuerpo unido a su Ag en células B o células con receptores FcR, provoca la aparición de nuevos epítomos unidos al HLA e incrementa la expresión de otros hasta dos órdenes de magnitud (109).

- Infecciones virales (Fig. 9). Las infecciones virales pueden provocar procesos inflamatorios que revelen péptidos crípticos o, si penetran en la célula a través de un receptor específico, pueden revelar epítomos mediante el mecanismo detallado en el apartado anterior. Así se han detectado células T autorreactivas durante la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) (110, 111). Las infecciones virales, además, pueden disminuir la síntesis de determinadas proteínas e incrementar la de otras (112), incluso hasta niveles que la hagan visible al sistema inmunológico.

Determinados péptidos no son accesibles a las células T porque se localizan en tejidos no linfáticos en los que las células T únicamente pueden penetrar una vez que han adquirido fenotipo de célula efectora o de memoria. Esta activación en la periferia puede deberse a:

- Respuestas contra superantígenos (Fig. 10). La activación por SAGs únicamente depende de la expresión de un segmento TCRBV. Las células T efectoras resultantes de esta activación policlonal pueden penetrar la barrera endotelial y reconocer el Ag específico de tejido.

- Exportación del Ag específico de tejido a los órganos linfáticos (Fig. 10). Los macrófagos y células dentríticas pueden fagocitar partículas en el tejido, migrar a los órganos linfáticos y presentar allí péptidos derivados de dichas partículas.

- Activación de células T con dos TCRs (Fig. 10). Las células T con dos TCRs diferentes pueden activarse en la periferia como respuesta a un Ag y una vez activadas, migrar a los órganos no linfáticos y responder a Ags específicos de tejido a través del otro TCR (113).

- Respuesta contra Ags homólogos (114) (Fig. 10). La similitud entre dos especies moleculares o mimetismo molecular supone que puedan producirse reacciones inmunológicas cruzadas: una célula T puede responder inicialmente a un péptido procedente de una infección vírica o bacteriana y, una vez activado, infiltrarse en un tejido y reconocer un péptido específico de éste (115). La factibilidad de este mecanismo queda evidenciada por el estudio de la respuesta de clones a distintas baterías de péptidos, que revela la existencia de miles de Ags capaces de activar un determinado clon de célula T (116). El mimetismo molecular entre distintos complejos antigénicos no implica necesariamente una homología de secuencia, sino que incluso péptidos con secuencias muy diferentes pueden adoptar configuraciones tridimensionales análogas o poseer una distribución de carga y unos perfiles de hidrofilia parecidos (117). La importancia de las reacciones cruzadas debidas al mimetismo molecular en el desarrollo de enfermedades autoinmunes ha sido recientemente demostrada en un modelo murino de queratitis herpética, en el que únicamente los ratones infectados por virus que contienen una secuencia análoga a la de un fragmento de proteína

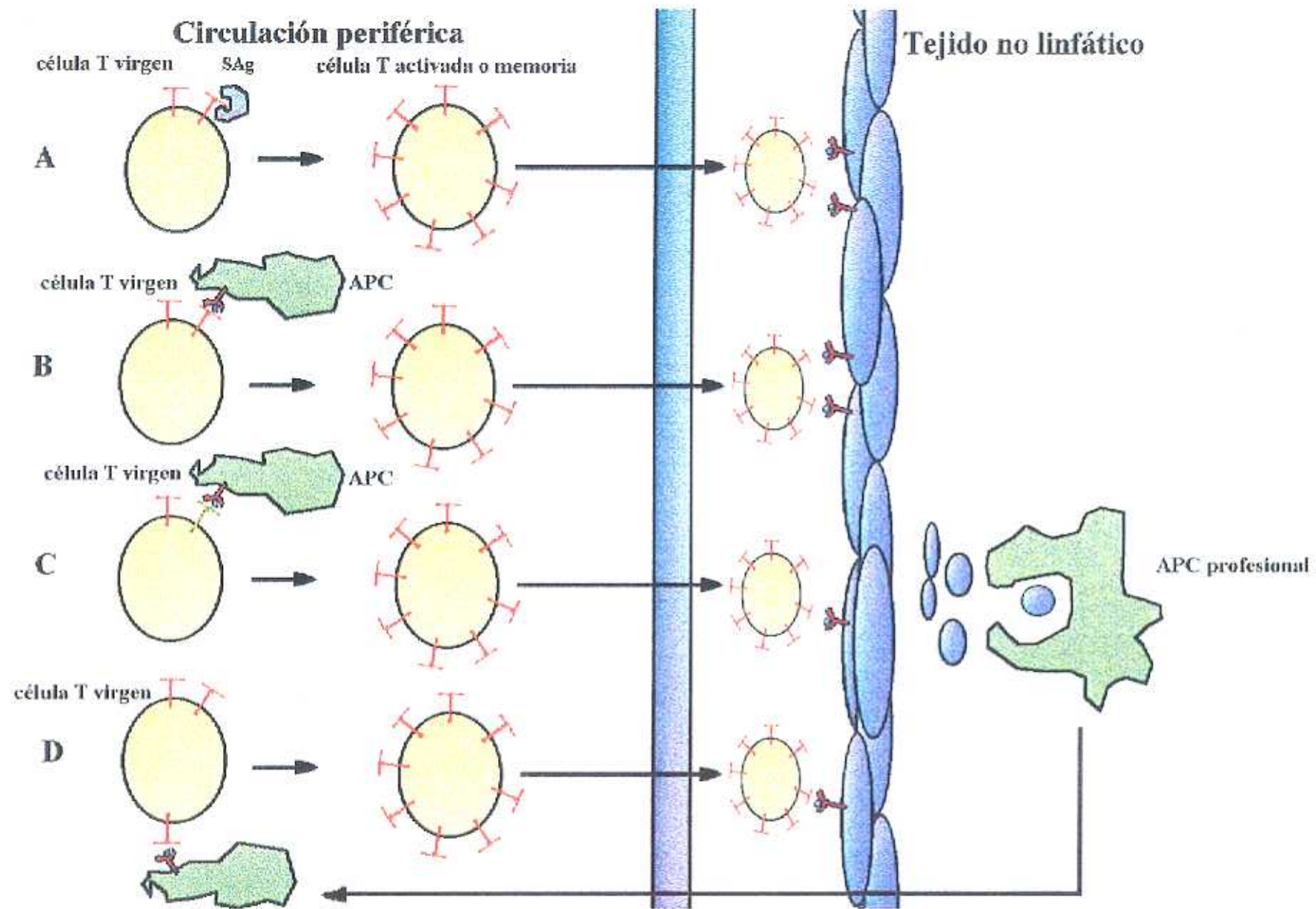


Figura 10: Mecanismos de revelación de epítomos específicos de tejido. Todos los mecanismos suponen una activación previa de la célula T en la periferia que aumente su capacidad de infiltración en órganos no linfáticos. A: Activación por SAg. B: Mimetismo molecular. C: Activación de células T con dos tipos de TCRs. D: exportación del antígeno específico de tejido por APCs profesionales.

específica de la córnea desarrollan la enfermedad, mientras que si la cepa vírica carece de ella, permanecen sanos (118).

El desarrollo de la enfermedad autoinmune, además del reconocimiento y respuesta contra Ags propios, supone que se eluden los sistemas de control de la respuesta inmunológica. Se han propuesto dos posibles mecanismos que explican la perpetuación de la respuesta inmunológica y obvian su control: 1) inhibición de los fenómenos apoptóticos. La presencia de citoquinas como IL-2, IL-4, IL-7, IL-13 o IL-15 en las inflamaciones locales puede inhibir la apoptosis (119). La apoptosis también puede inhibirse en ausencia de citoquinas, como han demostrado experimentos *in vitro* en los que células T cocultivadas con fibroblastos en ausencia de citoquinas se mantienen quiescentes y no sufren apoptosis, probablemente por la expresión de la proteína bcl-x_i (120). Se han detectado células T infiltradas en la cavidad sinovial de enfermos afectados por artritis reumatoide que expresan bcl-x_i (121), por lo que se ha propuesto que las células T quiescentes infiltradas en las articulaciones pueden mantenerse durante largos periodos y reactivarse episódicamente de manera que sean responsables de la cronicidad de la artritis reumatoide (122); 2) extensión de la respuesta a nuevos autoantígenos. Los restos celulares producidos por la respuesta pueden ser procesados y presentados por las APCs de manera que aparezcan nuevos epítomos frente a los que se reaccione, perpetuando así la respuesta (123). Las células activadas, presentes en las zonas afectadas, son más eficientes en la presentación antigénica y también pueden revelar nuevos Ags. Incluso se ha comprobado que linfocitos T humanos activados a través de su TCR son capaces de actuar como APCs en respuestas alogénicas (124).

7.- Enfermedad de injerto contra huésped (EICH).

Las leucemias, inmunodeficiencias y otras enfermedades que afectan los sistemas hematológico o inmunológico son tratadas con terapias que eliminan todas las células del sistema immuno-hematológico y sus precursoras de la médula ósea. Una vez finalizada la terapia es necesario reconstituir estas poblaciones celulares mediante trasplante de médula ósea (TMO). Algunas de estas patologías no permiten la infusión de células propias que podrían provocar la recaída en la enfermedad y por ello la reconstitución se realiza mediante TMO alogénico. La maduración de los precursores de médula ósea en las distintas estirpes puede observarse muy temprano; 60 días tras el TMO prácticamente todas las células detectadas en sangre periférica proceden del donante (125), aunque el número total de células es muy bajo y no se alcanzan los niveles y proporciones habituales de cada especie celular hasta aproximadamente un año tras el TMO. Así, la repoblación de células T CD8⁺ se completa en unos 2 meses, mientras que la de las células CD4⁺ tarda entre 6-12 meses (126).

La mayor complicación que puede presentarse como consecuencia del TMO alogénico es la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), en la que células del sistema inmunológico procedentes del donante inician una respuesta frente a las células del receptor. La EICH puede dividirse en dos entidades clínicas distintas: la enfermedad aguda y la crónica.

La EICH aguda (aEICH) se manifiesta durante los 60 días posteriores al trasplante y se caracteriza por daños a tejidos epiteliales: en piel se presentan erupciones maculopapulares y descamaciones; en el hígado existen daños que se evidencian por los elevados niveles de bilirrubina; la afectación del tracto intestinal varía entre diarreas a dolores abdominales severos. La aEICH se presenta en aproximadamente el 50% de los receptores de TMO alogénicos y su mortalidad puede llegar al 75% de los casos en los grados mayores de la enfermedad. Los estudios histológicos de los tejidos afectados por aEICH comparados con muestras de controles revelan que los enfermos presentan una elevada infiltración de células T $\alpha\beta^+CD45RO^+$ (127), ausencia de células dentríticas,

tales como las células de Langerhan, ausencia de células asesinas naturales (NK) y elevada expresión de HLA-DR en queratinocitos (128).

La EICH crónica (cEICH) se presenta a partir de dos meses tras el TMO y sus síntomas son erupciones cutáneas, junto a hiper o hipopigmentación y alopecia que finalmente puede degenerar en los mismos síntomas que la aEICH. Se presenta en el 10% de los trasplantados y en un 30% de los supervivientes de larga duración (>150 días). La mortalidad ronda el 10% y como factor de riesgo se incluye haber padecido aEICH por lo que no se sabe si ambas enfermedades son distintas o simplemente son distintas fases de una misma patología.

Dado que la aEICH aparece en momentos muy tempranos tras el TMO, se considera que la reacción se debe a células T maduras infundidas junto a las precursoras. Por ello, como tratamiento profiláctico, se eliminan las células T del injerto previamente al TMO. Se consigue así la disminución del número de afectados, pero aún así la patología sigue siendo frecuente, probablemente por la imposibilidad de eliminar completamente las células T infiltradas en el injerto. También como profilaxis se administran a los trasplantados medicamentos que impiden la proliferación de las células T activadas: ciclosporina A (CsA) u otras ciclofosfamidias, metotrexato (MTX), etc. que también se emplean como tratamiento una vez ha aparecido la enfermedad, combinados en ocasiones con anticuerpos específicos de citoquinas o sus receptores, para bloquear las señales coestimuladoras. Puesto que los medicamentos afectan a las células proliferativas, su suministro puede interferir con la colonización de la médula ósea lo que, unido a su toxicidad, impide su utilización a concentraciones elevadas que pudieran eliminar completamente la aEICH.

Las EICHs pueden considerarse respuestas alogénicas de las células del donante contra el receptor, ya sea contra alelos del HLA diferentes o contra Ags menores de histocompatibilidad. Dado que las EICH afectan principalmente a tejidos epiteliales, se piensa que la respuesta alogénica está dirigida a complejos antigénicos específicos de células epiteliales del receptor. Basándose en esta idea se han propuesto varios modelos de patogenia de las EICHs: a) revelación de Ags específicos de tejido por APCs profesionales. Según este modelo, las APCs del receptor captarían Ags en los tejidos epiteliales y los presentarían en los órganos linfáticos a células T del donante que, como células T activadas o con fenotipo de memoria, aumentarían su capacidad de infiltración en tejidos no linfáticos y podrían migrar a los tejidos epiteliales e iniciar la respuesta (129); b) procesos inflamatorios. Los regímenes condicionantes y los propios medicamentos profilácticos de la EICH pueden dañar tejidos, y en consecuencia pueden provocar la secreción de citoquinas inflamatorias que podrían aumentar la expresión de moléculas de adhesión y facilitar la migración e infiltración en el tejido de las células T del donante (130); c) diferenciación incorrecta. Como mecanismo específico de cEICH se ha propuesto que la CsA puede interferir en los procesos de selección tímica, permitiendo la selección positiva pero impidiendo la selección negativa con lo que se producirían células T maduras capaces de reconocer Ags presentados por las células del receptor (131).

Se ha descrito que las posibilidades de recaída en la enfermedad original, sobre todo en casos de leucemia, son menores en los post-trasplantados afectados por EICH (132). Este efecto, denominado efecto Injerto Contra Leucemia (ICL) es consecuencia directa de la presencia de células T del donante infundidas con el TMO, como evidencia un estudio en el que se observa mayor efecto ICL cuanto mayor es el número de linfocitos infundidos (133). Se piensa que el ICL se produce porque células T responden a complejos antigénicos específicos del tumor.

Dada la importancia del efecto ICL en la eliminación de las células malignizadas, se han realizado estudios que pretenden predecir la presencia y el grado de la EICH (134). Una reacción EICH de bajo grado puede aportar las ventajas asociadas del ICL sin conllevar excesivos problemas derivados de la enfermedad. El efecto ICL se ha intentado relacionar con los niveles de

determinadas citoquinas, presentes en sobrenadantes de cultivos de células T del donante junto a células del receptor. Los niveles de IFN- γ , TNF- α e IL-2 pueden utilizarse como parámetros predictivos de la EICH, al menos en individuos HLA-idénticos (135). El análisis por dilución límite de los cultivos mixtos también relaciona la presencia de EICH con la frecuencia de precursores de células T específicas de células del receptor (131). En aquellos casos en los que existen diferencias entre el HLA del receptor y del donante es previsible que la alorrespuesta sea muy intensa, de forma que en dichos casos los parámetros anteriores pueden no ser útiles como pronóstico de la enfermedad. La caracterización de las células T implicadas en la EICH podría permitir el diseño de terapias previas a la infusión de las células del donante en el receptor que minimicen los daños causados por éstas y puede sugerir modelos terapéuticos aplicables al receptor tras el trasplante que eliminen la EICH y conserven un prendimiento correcto y el efecto ICL. Existen varios estudios que analizan el repertorio de TCRs en muestras de piel de afectados por EICH y lo comparan con el repertorio de TCRs en PBLs del enfermo y del donante: Liu y cols. (136) han analizado el repertorio de TCRs de los linfocitos infiltrados en muestras de piel de 8 transplantados comparado con el de PBLs y han observado que los TCRs en piel utilizan preferentemente el segmento TCRBV2. Kubo y cols. (137) han comparado el repertorio en piel y en PBLs de un enfermo con el del donante y han hallado un uso preferente de TCRAV2 y TCRBV6. Dietrich y cols. (138) encuentran usos preferentes de TCRAV11 y TCRBV16. Las expansiones específicas encontradas por cada uno de los grupos no parecen estar relacionadas, probablemente porque las distintas células T reaccionan frente a distintos HLA. Los estudios anteriores no consideran los alelos HLA-DQ ni -DP de los pares receptor/donante cuya participación e importancia en el desarrollo de la EICH sigue siendo motivo de controversia (139-141). Así pues, parece lógico pensar que el estudio de los TCRs de las células T infiltradas en las lesiones epiteliales de EICH debe considerar su especificidad HLA, la cual puede evidenciar patrones de uso entre los elementos generadores de diversidad del TCR en función de dicha especificidad.

8.- Espondiloartropatías.

Las espondiloartropatías son un grupo de enfermedades reumáticas que comparten características clínicas, radiológicas y genéticas, tal y como se refleja en los criterios de clasificación del Grupo Europeo de Estudio de las Espondiloartropatías (142) o del grupo de Amor (143). Incluyen la espondilitis anquilosante, la artritis psoriasica, la artritis asociada a la enfermedad inflamatoria del intestino, la artritis crónica juvenil pauciarticular, la artritis reactiva y la espondiloartropatía indiferenciada. Sus características principales son la sinovitis, la sacroileitis y la ausencia de factor reumatoide (autoanticuerpos contra la región Fc de IgGs propias). Suelen aparecer acompañadas de psoriasis, afectación de la membrana sinovial, dactilitis, oligoartritis, etc. La localización de las inflamaciones es asimétrica afectándose mayoritariamente la articulación sacroiliaca y extendiéndose al endotelio articular. Pueden presentarse en asociación con otras enfermedades como la uveitis o el síndrome de Crohn. Las espondiloartropatías suelen iniciarse al final de la etapa de desarrollo, pueden presentarse tras infecciones bacterianas y se han relacionado con HLA-B27 (142-145). El patrón de secreción de citoquinas ha sido ampliamente estudiado midiendo los niveles de citoquinas en líquido sinovial, mediante inmunohistoquímica o cuantificando la cantidad de mRNA de cada citoquina en células sinoviales. Las articulaciones afectadas presentan elevados niveles de IL-4, IL-2, TNF- α y TNF- β (146-149). Aproximadamente el 50% de las células que infiltran las articulaciones afectadas son linfocitos T, de las que prácticamente el 100% tiene fenotipo de memoria (150), oscilando la proporción de células T CD8⁺ entre el 20% y el 50% de las células T infiltradas (151, 152).

8.1.- Espondiloartropatías y HLA.

La asociación de las espondiloartropatías con HLA-B27 es próxima al 70% aunque si analizamos independientemente cada enfermedad encontramos una asociación diferencial: 96% para espondilitis anquilosante, 70% para espondiloartropatía indiferenciada, hasta 80% para artritis reactiva y 25% para artritis psoriasica y espondiloartropatía asociada a la enfermedad inflamatoria intestinal (142-145). Se han descrito 12 subtipos de HLA-B27 y no todos se asocian con espondilitis anquilosante (153). También se ha descrito la asociación con HLA-B39 (154, 155), aunque es menos acusada que la descrita con HLA-B27.

Se han sugerido diversas explicaciones para justificar la marcada asociación con HLA-B27:

1) HLA-B27 es marcador de otro gen. Se ha propuesto que HLA-B27 no está directamente relacionado con las espondiloartropatías, sino que es marcador de otro gen cercano a él y verdadero responsable de la enfermedad.

2) Péptidos derivados de HLA-B27 son presentados por moléculas del MHC. Se ha sugerido que un fragmento de HLA-B27 es presentado por otra molécula del MHC, normalmente una proteína de clase II (156) u otra molécula de HLA-B27 (157, 158).

3) Las características de HLA-B27 como molécula presentadora de péptidos favorecen la enfermedad. Esta suposición implica que la enfermedad puede producirse porque:

- existen modificaciones o peculiaridades en HLA-B27 que son reconocidas por células T autorreactivas. El estudio de PBLs de afectados por espondiloartropatías ha permitido detectar células T citotóxicas que responden a células propias tratadas con homocisteína o infectadas por *Salmonella typhimurium* (159). Teniendo en cuenta que la homocisteína es producida naturalmente por distintos tipos de bacterias y que determinadas espondiloartropatías se han relacionado con infecciones bacterianas, se ha propuesto que la asociación de estas enfermedades con HLA-B27 está relacionada con la existencia de una Cys susceptible de unirse con homocisteína en la subcavidad B de HLA-B27, fundamental para el anclaje del péptido. La modificación de dicha Cys alteraría el sitio de unión del péptido y permitiría la unión de Ags radicalmente distintos de los normalmente presentados por HLA-B27. La Cys de la subcavidad B es exclusiva de HLA-B27 y HLA-B39, ambos alelos asociados a las espondiloartropatías. Otra peculiaridad de HLA-B27 que puede estar relacionada con su asociación a las espondiloartropatías ha sido descrita por David y cols., que han comprobado que HLA-B27, pero no otras moléculas de clase I, puede expresarse en la membrana de las células disociado de $\beta 2m$ (160). Las espondiloartropatías se producirían porque los HLA-B27 "libres" podrían mimetizar a moléculas de clase II y ser reconocidos por células T $CD4^+$ (161).

- determinados péptidos presentados por HLA-B27 son reconocidos por células T autorreactivas. La estructura del HLA condiciona la secuencia de los péptidos que puede alojar (47), por lo que la implicación de HLA-B27 en la patogenia podría deberse a que presentara los péptidos responsables del inicio y desarrollo de las espondiloartropatías. Estos péptidos tendrían Arg o Gln en P2 y distintos residuos, en función del subtipo, en P9. Se ha observado que los subtipos asociados a la enfermedad presentan péptidos con Tyr en P9, mientras que los no relacionados presentan péptidos con residuos básicos (162).

8.2.- El péptido artritogénico y las células T implicadas en su reconocimiento.

Existe una marcada influencia de factores ambientales en la aparición y desarrollo de las espondiloartropatías, como indica el hecho de que la enfermedad se manifieste durante

determinadas etapas del desarrollo y en determinadas épocas del año (163). La distribución de la enfermedad en gemelos homocigóticos indica una discordancia para el desarrollo de la enfermedad que únicamente puede explicarse por la existencia de un desencadenante ambiental en su patogenia (164). Se considera que todas las espondiloartropatías se desencadenan por factores ambientales, como evidencian la asociación con infecciones bacterianas de la artritis reactiva y el síndrome de Reiter (165, 166), pero en muchas otras enfermedades del grupo, como la espondilitis anquilosante o la artritis psoriásica, no han podido identificarse los desencadenantes ambientales. La asociación con HLA-B27 y la influencia ambiental fueron integrados por Parham en una propuesta de patogenia de la enfermedad denominada **teoría del péptido artritogénico** que supone que la enfermedad se desarrolla porque HLA-B27 presenta péptidos derivados de proteínas bacterianas. Como consecuencia de ello, se inicia una respuesta inmunológica contra los epítomos bacterianos pero se produce una respuesta cruzada con péptidos propios que da lugar a la reacción autoinmune (167).

Se ha intentado corroborar la validez de esta teoría estudiando las características de las células T implicadas en respuestas *in vitro* contra los posibles desencadenantes de las patologías. Así, Hermann y cols. cultivaron, en condiciones de dilución límite, PBLs de enfermos con espondilitis anquilosante junto a células autólogas incubadas con *K. pneumoniae* inactivada y encontraron que la frecuencia de clones proliferativos específicos de APC+bacteria es inferior en enfermos que en controles (168). Los autores sugieren que esta menor frecuencia se debe a que, en los enfermos, la mayoría de células T específicas de la bacteria y presumiblemente involucradas en la respuesta autoinmune están infiltradas en los tejidos inflamados. Esta explicación está de acuerdo con los resultados obtenidos del estudio de uso de segmentos TCRBV por PBLs de enfermos afectados simultáneamente por la enfermedad de Crohn y espondilitis anquilosante en los que se detecta una proporción baja de determinados segmentos TCRBV (V10, V17, V19 y V21), menor cuanto más acusados son los episodios de inflamación articular (169). Ninguno de los dos grupos amplió su estudio a muestras de líquido sinovial que pudieran corroborar sus hipótesis.

Como aproximación alternativa, determinados grupos han estudiado si las células T de los enfermos responden a péptidos derivados de proteínas propias, expresadas en las articulaciones, que poseen elevada homología con proteínas bacterianas. Teóricamente, durante la respuesta contra la bacteria en la periferia puede producirse una respuesta cruzada contra el péptido propio derivado de una proteína articular que puede ser la causa de la enfermedad. Micecz y cols. han cultivado PBLs de afectados por espondilitis anquilosante tras incubarlos con proteoglicanos purificados y han aislado clones CD4⁺ que proliferan específicamente frente a células autólogas preincubadas con proteoglicanos del 30% de los enfermos (170).

En conjunto, la mayoría de los estudios suponen que las células relevantes en el desarrollo de la enfermedad están infiltradas en los tejidos afectados, por lo que se han centrado en el aislamiento, a partir de líquido sinovial (SF), de clones con diferentes especificidades que, debido a su localización, pudieran ser relevantes a las espondiloartropatías. El grupo de E. Hermann se ha centrado en el aislamiento de células T específicas de APCs incubadas con bacterias. Tras cultivar SF de un paciente afectado por el síndrome de Reiter junto a células autólogas incubadas con *Y. enterocolitica* inactivada, se obtuvo un clon CD4⁺ que proliferaba en respuesta a células propias estresadas por calentamiento o preincubadas con la proteína de choque térmico humana, hsp65 (171). Dada la elevada homología entre las proteínas de choque térmico de *Yersinia* y las humanas, este resultado sugiere que durante la reacción contra la bacteria se produce una reacción cruzada con algún péptido derivado de la hsp65 del enfermo. Además de haber determinado que en SF de enfermos se encuentran células T capaces de responder contra hsp65, se ha determinado la existencia de células T con otras especificidades. Así, a partir de SF de afectados por artritis

reactiva y mediante cultivo de las células en condiciones de dilución límite en presencia de APCs alogénicas, se han obtenido clones proliferativos específicos de células autólogas incubadas con *Y. enterocolitica* inactivada (172). Los ensayos de proliferación frente a células propias preincubadas con distintas fracciones cromatográficas de la bacteria indican que la mayoría de los clones responden a la subunidad β de la ureasa (173). Utilizando el mismo procedimiento de clonaje se han aislado células T CD8⁺ citotóxicas que lisan células autólogas preincubadas con *Y. enterocolitica* inactivada pero sin restricción por HLA (174). También se han generado clones con estas características mediante dilución límite de cultivos de SF de enfermos con artritis reactiva. Como APCs se añadieron células de ratón transfectadas con HLA-B27 e infectadas con *Y. enterocolitica*. Los ensayos de bloqueo con AcM indican que la respuesta no es restringida por HLA de clase I, pero las células sin moléculas de clase I no son lisadas. Los autores sugieren que puede existir un mecanismo citotóxico dependiente de HLA pero que no involucra el reconocimiento de éste. Por último, el cultivo junto a células de ratón transfectadas con HLA-B27 más *Y. enterocolitica* ha permitido aislar células T citotóxicas CD8⁺ que en los ensayos de citotoxicidad lisan células autólogas vía reconocimiento de HLA-B27 (175, 176), lo que indica que puede existir una implicación directa de HLA-B27 como molécula presentadora en la patogenia de la enfermedad.

Los estudios que hemos descrito parecen confirmar que existen células T infiltradas en los tejidos inflamados implicadas en respuestas contra Ags de origen bacteriano y contra Ags propios pero, dado que el aislamiento de los clones implica estimulaciones *in vitro* que pueden provocar la expansión de determinadas poblaciones de células T, no se ha podido determinar la importancia de cada clon en la respuesta local *in vivo*.

8.3.- Problemática del estudio de espondiloartropatías. Posibles soluciones.

Las posibilidades de caracterización de las células T infiltradas en tejidos inflamados así como el análisis molecular de los receptores en afectados por espondiloartropatías presentan limitaciones inherentes a la propia enfermedad: i) El diagnóstico de las espondiloartropatías no es inmediato y habitualmente no se obtiene un diagnóstico definitivo hasta semanas después de la llegada del enfermo a la consulta. Puesto que se desconoce cómo se inicia y se desarrolla la enfermedad, es esencial controlar el momento de la toma de muestra. Idealmente, las muestras deberían obtenerse lo antes posible, incluso cuando únicamente se tienen indicios de la enfermedad; ii) los enfermos con espondiloartropatías suelen ser tratados con antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que impiden la migración y proliferación de las células T, lo que puede conducir a errores en la interpretación de los resultados. Este problema puede obviarse tomando las muestras previamente al inicio del tratamiento; iii) las espondiloartropatías, al igual que el resto de las enfermedades autoinmunes, pueden perpetuarse porque la respuesta se extiende a Ags diferentes de los que iniciaron el trastorno y, si la patología se cronifica, incluso pueden infiltrarse células vírgenes no implicadas en respuestas locales. Al igual que los dos problemas anteriores, la influencia de este efecto puede minimizarse si se controla el momento de la toma de muestras; iv) la mayoría de los afectados por espondiloartropatías sólo presentan inflamación en la articulación sacroiliaca, de la que sólo pueden obtenerse muestras de líquido o membrana sinovial mediante operación quirúrgica. En la práctica sólo es posible obtener muestras locales de aquellos enfermos que presenten artritis periférica; v) se desconoce el Ag responsable del inicio de la enfermedad, lo que impide el mantenimiento en cultivo de las células T. Actualmente se han desarrollado protocolos de infección con Herpesvirus Saimiri (HVS) que permiten mantener las células T en cultivo durante más de 1 año en medios suplementados con IL-2 sin necesidad de mitógenos o APCs (177, 178).

Las células transformadas, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$ expresan fenotipo de células T activadas ($CD2^+CD3^+CD45RO^+CD26^+CD25^+HLA-DR^+$) y conservan su capacidad proliferativa o citotóxica vía TCR (179, 180). La cinética de fosforilación es idéntica a la de células no infectadas, indicando que no existen diferencias en las rutas de señalización (181). La transformación de células T de enfermos con espondiloartropatías puede permitir el cultivo de las células durante tiempo indefinido, separar las poblaciones expandidas, realizar el análisis molecular de sus receptores y estudiar su reactividad frente a distintas dianas.

9.- Aproximaciones metodológicas para el estudio de repertorio de TCRs.

Los estudios de repertorio pretenden estimar el uso de TCRs dentro de una población celular. La base teórica supone que las células T que responden a un Ag proliferan. El aumento de células T específicas del Ag se refleja en el repertorio de TCRs como una mayor proporción de los TCRs expresados por dichas células. A otro nivel, una modificación del repertorio puede ofrecer información indirecta sobre la naturaleza de los Ags que la han producido. Así, una expansión policlonal indicaría que, probablemente, se ha producido una respuesta a un SAg, mientras que una única expansión oligoclonal se produciría por una respuesta específica de Ag y varias expansiones oligoclonales sugerirían respuestas contra varios complejos antigénicos. Los estudios de repertorio realizados en PBLs de individuos sanos indican que las expansiones oligoclonales aparecen de forma natural (182), más frecuentemente en personas de edad avanzada (183) y que difieren entre distintos individuos probablemente como consecuencia de la exposición a diferentes Ags. Son más frecuentes en la población $CD8^+$ (184), en concreto en la subpoblación $CD8^+CD45RO^+$ (185), que representa células de memoria, y en la subpoblación $CD8^+CD57^+$ (186).

En función de la información que se pretende obtener, los estudios de determinación del repertorio se pueden dividir en dos grupos:

- Estudios de uso de los segmentos TCRV. Este tipo de estudio valora la contribución al repertorio de cada subfamilia TCRV. Habitualmente evidencia expansiones o disminuciones muy acusadas de una subfamilia. Dado que los SAg son capaces de activar todas las células T con determinados segmentos TCRBV, los estudios de uso de los segmentos TCRV habitualmente son capaces de revelar la intervención de SAg en las modificaciones del repertorio. Los estudios se realizan mediante citometría de flujo o Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con iniciadores específicos de cada subfamilia TCRV.

- Estudios de uso de regiones N o N+D. Una expansión oligoclonal se puede detectar como aumento en la proporción de TCRs con una misma región N o N+D. La sensibilidad de estos estudios es superior que la de los de valoración de segmentos TCRV y puede detectar expansiones de una sola célula en ausencia de sesgos en el uso de segmentos TCRV. Se han descrito 2 diferentes procedimientos para la determinación del uso de regiones N y N+D: i) secuenciación directa. Conlleva la inserción de los transcritos de TCR en plásmidos, la transformación de bacterias con estos vectores, el clonaje de éstas y la secuenciación de los insertos contenidos en las bacterias. El procedimiento es extremadamente laborioso pues obtener datos estadísticamente significativos supone la secuenciación de gran cantidad de insertos; ii) tipaje espectral. Este procedimiento permite la identificación de las expansiones mediante la cuantificación de los transcritos de TCR de una subfamilia con diferentes tamaños de las regiones N+D separados por electroforesis en geles de alta resolución. Los estudios deben limitarse a transcritos TCRB porque la ausencia de exclusión alélica y el reordenamiento simultáneo de los dos alelos de TCRA se traducen en la complicación de su patrón de separación en función del tamaño y dificulta la interpretación de los resultados. Habitualmente se considera que existe una expansión oligoclonal si

al menos el 50% de los transcritos de una subfamilia son del mismo tamaño (184). La oligoclonalidad debe corroborarse mediante secuenciación para descartarse que la información obtenida por tipaje espectral corresponde a varios transcritos diferentes pero del mismo tamaño. Únicamente se secuencian los transcritos correspondientes a las subfamilias con expansiones por lo que disminuye enormemente el número de secuencias necesarias para confirmar la expansión. A diferencia de la secuenciación directa, no permite valorar la extensión de la expansión respecto al total de transcritos, sino que únicamente indica si existe expansión respecto al resto de transcritos de la misma subfamilia.

Los estudios de repertorio deben incluir controles adecuados para poder delimitar si las expansiones o usos preferentes se deben a diferencias de haplotipo HLA entre los individuos estudiados, a fenómenos de tolerización o a la exposición a un antígeno. El estudio de patologías locales, como las espondiloartropatías, presenta como ventaja la posibilidad de comparar las muestras locales con muestras de sangre periférica de los enfermos. Los resultados de dicha comparación indicarían qué expansiones son específicas del tejido afectado.

OBJETIVOS.

Nuestra investigación pretende caracterizar los receptores de antígeno expresados por células T que infiltran los tejidos afectados por enfermedades en las que parecen existir respuestas inmunológicas locales. El estudio se ha desarrollado en dos patologías distintas en las que se pretende cubrir diferentes objetivos:

A.- Estudio de células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.

- 1- Estudio de la especificidad HLA de las células T obtenidas de exudados de biopsias de lesiones de aEICH. Estimación de la importancia de las diferencias en los loci de clase I y II ante una selección donante/receptor.
- 2- Valoración de la amplitud de la respuesta inmunológica local en lo concerniente a su diversidad clonal.
- 3- Identificación de motivos comunes en los TCRs de las células T, con especificidad frente al HLA del receptor con objeto de diseñar un modelo terapéutico para la eliminación selectiva pre-transplante de las células portadoras de dichos motivos.

B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y en PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.

- 1- Diseño y evaluación de una metodología que, evitando la exposición previa a antígenos que puedan modificar el repertorio de TCRs, permita caracterizar expansiones específicas de células T procedentes del líquido sinovial de enfermos afectados con espondiloartropatías.
- 2- Determinación de la existencia de células T expandidas exclusivamente en las articulaciones afectadas e identificación de motivos comunes en sus secuencias de TCRs. Estimación del origen y tipo de antígeno responsable de las posibles expansiones.
- 3- Si se alcanza el objetivo anterior, examen de la capacidad de las células expandidas de proliferar frente a células propias con objeto de establecer si están realmente implicadas en la respuesta autoinmune local responsable de la espondiloartropatía.

MATERIALES Y MÉTODOS.

A.- Estudio de células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.

El procedimiento general empleado para el estudio aparece esquematizado en la figura 11.

A.1.- Obtención de clones de células T.

Los clones empleados en este estudio se aislaron y caracterizaron conjuntamente con el grupo del Dr. H. Vié, del Instituto Nacional de la Salud y la Investigación Médica (INSERM) de Nantes. Los tipajes, tanto de los pacientes como de las líneas linfoblastoides B (B-LCL) utilizadas, se detallan en la Tabla 6.

A.1.1- PACIENTES.

Paciente HER. Varón de 7 años que sufría leucemia linfoblástica aguda (ALL) en remisión completa tras radioterapia y quimioterapia, fue transplantado con médula ósea procedente de su madre. Previamente al trasplante y como profilaxis contra la EICH, la médula ósea se incubó con anticuerpos monoclonales (AcM) anti-CD2 y anti-CD7 y a continuación los inmunocomplejos se expusieron a complemento de conejo, que lisó las células T unidas a los AcM. Además, se suministraron intravenosamente (i.v.) AcMs anti-CD2 y anti-LFA-1 (0.2 mg/Kg/d desde el día -2 al día 11 y desde el día -3 al día 10, respectivamente) para minimizar la interacción de las células T del donante con moléculas coestimuladoras y evitar su migración a tejidos inflamados. A partir del día 19 post-trasplante se detectaron lesiones en la piel. El día 22 se realizó una biopsia de piel (biopsia HER-a) y el día 23 se comenzó un tratamiento con CsA (3mg/Kg/d i.v.) y esteroides (2mg/Kg/d i.v.). A pesar de ello las lesiones rebrotaron. El día 27 se tomó una segunda biopsia (biopsia HER-b) y se modificó el tratamiento contra la EICH inyectando por vía i.v. AcM anti-CD25 (5mg/d del día 29 al día 39 y 2.5mg/d del 40 al 80) y anti-TNF α (5mg/d del día 29 al día 32). La EICH desapareció completamente y no se presentó cEICH pero el día 120 el paciente recidivó y finalmente murió.

Paciente P. Varón de 10 años con mielodisplasia idiopática y pancitopenia severa y una historia de 7 años de transfusiones (hematíes y plaquetas). Fue tratado con radioterapia y quimioterapia y posteriormente transplantado con médula ósea de su madre. El tratamiento profiláctico contra la EICH fue el mismo que para el paciente HER. La aspiración de médula no mostró células del donante, lo que indicaba que el injerto no había prendido. El paciente fue sometido a un segundo tratamiento condicionante consistente en busulfan (8mg/Kg durante 2 días) y ciclofosfamida (200mg/Kg durante 4 días) y se le transplantó médula ósea del padre tras la depleción de células T. Como al paciente anterior, se le suministraron AcMs anti-CD2 y anti-LFA-1. El día 31 tras el segundo trasplante se observó una erupción en la piel y diarrea, por lo que se tomó una biopsia de piel en la que se encontró una elevada infiltración linfocítica en la que más del 80% eran células T CD4⁺. Por ello se le suministraron intravenosamente esteroides (2mg/Kg/d) y CsA (3mg/Kg/d). A pesar de ello las lesiones persistieron y el paciente murió de EICH intestinal severa 89 días después del segundo

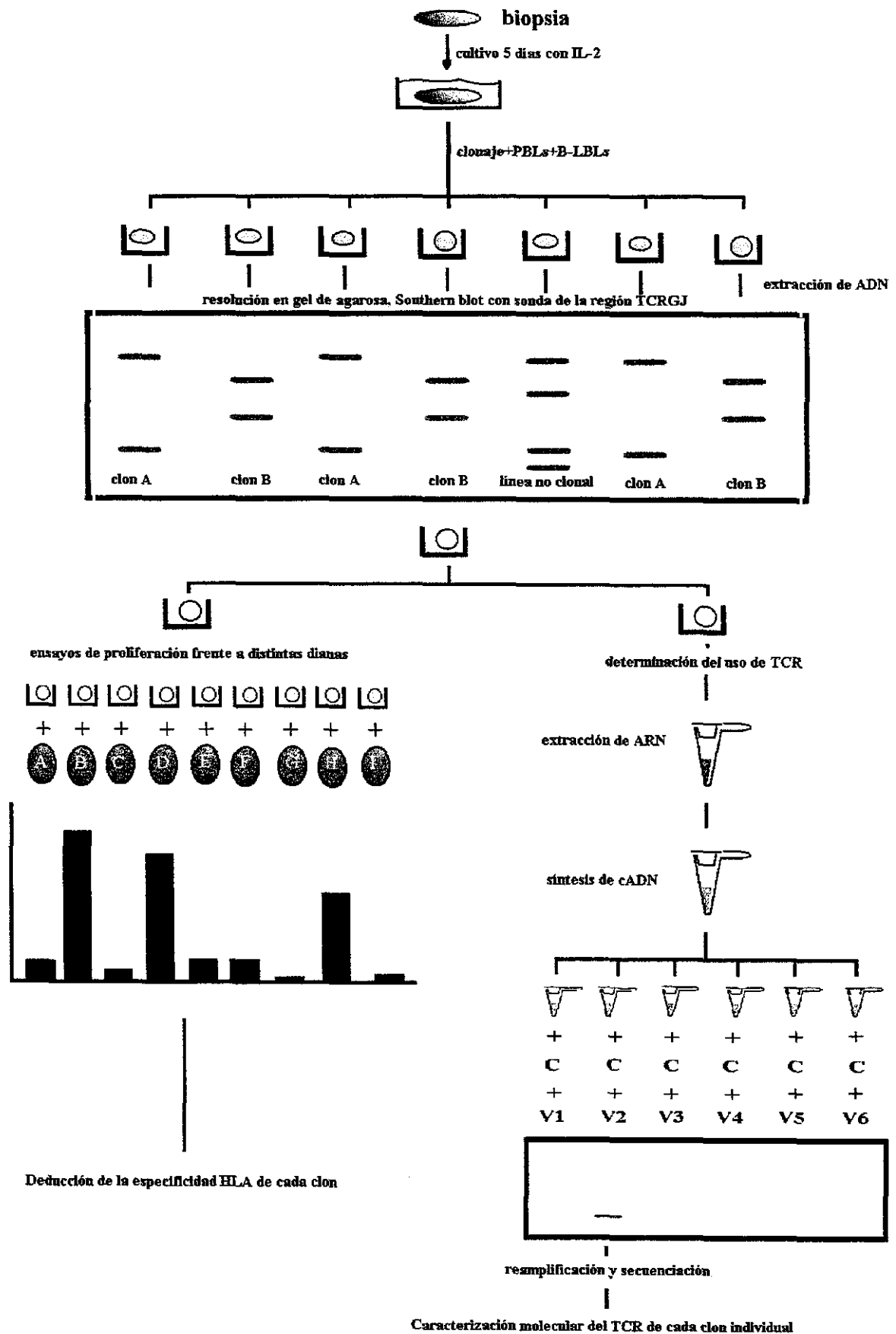


Figura 11: Procedimiento metodológico empleado en el estudio de las muestras de piel de los enfermos afectados por aEICH.

Individuo o línea	Sexo	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DPB1
HER	V	9,32	17,27	4,8	4,8	0401,1001
Donante (HER)	M	9,32	8,17	3,8	2,4	0601,1001
P	V	1,29	44,17	0402,7	2,8	1301,1901
Donante1 (P)	M	1,2	57,62	0402,11	7,8	0301,1301
Donante2 (P)	V	29,32	44,40	7,14	2,5	0401,1901
BOLETH	V	2	w62.3	0401	8	0401
BM14	V	3	7	4	8	0401
BSM	M	2	w62.3	0401	8	0201
BTB	V	2	27	0801	4	0401
DAB	-	2,11	18,55	8,11	2,4	0401,0501
DEM	-	2	57	16,4	5,8	0301,0401
HOM2	M	3	27	1	5	0401
IBW9	V	33	W65	7	5	0101
JB10	-	26,28	38	0402	7	-
JHA	V	31	W51	0407	7	0301
RML	M	2	51	1602	7	0402
ROU	M	2,3	51,44	4,13	6,7	0301,1301
RSH	V	68,30	W42	0302	4	0101,0402
T7526	-	2	W46	0901	9	1301
TONY	V	1,2	7,8	3,13	2	0101,1901
VAVY	M	1	8	0301	2	0101
WT24	V	2	27	1602	2	0301
DMG	V	2,9	21	7,11	-	-
MTSM	M	2,3	12,27	1,11	-	-
LG2	-	2	27	1	-	-
LG15	-	32	7,27	1	-	-

Tabla 6: Tipaje HLA de los individuos y de las líneas celulares linfoblastoides (B-LCL) empleados en ambos estudios. Las celdas con fondo blanco corresponden a los tipajes de las células empleadas en el estudio sobre aEICH. Las celdas con fondo gris corresponden a las células utilizadas en el estudio de las espondiloartropatías.

transplante.

A.1.2.- CLONAJE DE CÉLULAS T DE LAS BIOPSIAS DE PIEL.

Las muestras de piel se lavaron al menos 5 veces con RPMI completo (RPMI 1640 +10% de suero humano + Gln 2mM + gentamicina 50mg/l) y se cultivaron en una placa de 24 pocillos (Nunc) en RPMI completo suplementado con IL-2 recombinante (150 u/ml, Hoffman-Roche) a 37°C y 5% de CO₂. La proliferación de las células T fue detectable a partir de 3 días tras el inicio del cultivo. El día 5, las células se sembraron a una concentración de 0.3 células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron células alimentadoras ("feeder") alogénicas procedentes de una reserva ($5 \cdot 10^4$ PBLs/pocillo) y células B del receptor transformadas con el virus de Epstein-Barr ($5 \cdot 10^3$ células/pocillo). Estos dos tipos celulares habían sido previamente irradiados con 30Gy para evitar su proliferación. El medio se suplementó con leucoaglutinina-A (1µg/ml, Pharmacia) e IL-2 (150 u/ml, Roche) y todos los cultivos se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂.

A.1.3.- ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD CLONAL Y CONFIRMACIÓN DE LA CLONALIDAD.

Se extrajo el DNA genómico de los supuestos clones mediante el método "Salting out" (187) y se digirió con EcoRI o HindIII, tras lo cual las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Tras la electroforesis, se detectaron las bandas específicas mediante Southern blot (protocolo 1) empleando como sonda PH60, que contiene el segmento TCRGJ1 y que muestra hibridación cruzada con TCRGJ2 (188), marcada con ³²P mediante un sistema de marcaje por iniciación al azar (Random Primed DNA labeling Kit, Boehringer Mannheim).

Protocolo 1. Southern blot (189).

- El DNA separado por electroforesis se transfiere desde el gel a una membrana Hybond N+ (Amersham) o Z-probe-GT (BioRad) mediante un sistema de transferencia por vacío (Pharmacia) o por transferencia alcalina (transferencia por capilaridad durante un mínimo de 6h utilizando como tampón NaOH 0.4M, el cual se muestra muy eficiente en los casos en los que fragmentos de no superan los 1000-1500bp).

- La membrana se lava con 2xSSC (NaCl 0.3M, citrato sódico 0.03M) a temperatura ambiente para neutralizar el NaOH.

- Se incuba durante 45-60 min en solución de prehibridación (NaCl 0.9M, Na₂HPO₄ 50mM pH7.4, EDTA 5mM, ficol 0.2%, polivinil pirrolidona 0.2%, albúmina de suero bovino (BSA) 0.2%, SDS 0.1% y DNA de esperma de salmón 40µg/ml).

- Se elimina la solución de prehibridación y se sustituye por una solución de hibridación (NaCl 0.9M, Na₂HPO₄ 50mM pH7.4, EDTA 5mM, Ficol 0.1%, polivinil pirrolidona 0.1%, BSA 0.1%, SDS 0.1% y DNA de esperma de salmón 40µg/ml) que contiene la sonda marcada.

- La hibridación se lleva a cabo durante periodos que superan las 3h. Tanto la prehibridación como la hibridación se realizan a 65°C si se emplea una sonda de más de 25 nucleótidos o a 5°C por debajo de la temperatura de fusión (T_m) si la sonda es un oligonucleótido. La T_m se calcula con el siguiente algoritmo: $T_m = [4(G+C) + 2(A+T)] / C$, siendo G, C, A y T el número de dichas bases en el oligonucleótido.

- Tras la hibridación, las membranas se lavan 3 veces a temperatura ambiente con

6xSSC (NaCl 0.9M, citrato sódico 0.09M) durante periodos de 15 min y una cuarta vez a la temperatura de hibridación durante 5 min.

- La detección de las bandas que hibridan específicamente con la sonda se realiza mediante autorradiografía, usando películas X-Omat S (Kodak).

El estudio se continuó en aquellas muestras cuyo patrón de reordenamiento de TCRG correspondía con la presencia de un único clon. Los clones con distintos patrones de reordenamiento TCRGJ se consideraron diferentes, se determinó su especificidad y se caracterizaron sus TCRs.

A.2.- Estudios de especificidad de los clones.

La especificidad de los clones se determinó mediante ensayos de proliferación (protocolo 2) y citotoxicidad (protocolo 3) frente a un panel de dianas alogénicas. Los clones se mantuvieron sin estimulación durante al menos 15 días antes de realizar los ensayos. Para confirmar la especificidad, se realizaron nuevos ensayos de proliferación y citotoxicidad con células estimuladoras o dianas preincubadas durante 30 min con anticuerpos monoclonales específicos de cada uno de los alelos HLA (Tabla 7).

Protocolo 2. Ensayo de proliferación.

- $5 \cdot 10^4$ células T respondedoras se cocultivan, por triplicado, 42h junto a $5 \cdot 10^4$ células estimuladoras irradiadas (30 Gy) en placas de 96 pocillos de fondo plano.

- Se añade a cada pocillo $1 \mu\text{Ci}$ de ^3H -timidina y se mantiene el cultivo 6h más en las mismas condiciones.

- Se recolectan las células, se lavan y se cuantifica la incorporación de ^3H -timidina en un contador de radiactividad β .

- Cada punto se determina por triplicado.

Protocolo 3. Ensayo de citotoxicidad.

- $5 \cdot 10^5$ células diana se resuspenden en $50 \mu\text{l}$ de ^{51}Cr en forma de cromato sódico (50 mCi/ml, Amersham) y $50 \mu\text{l}$ de STF.

- Se incuba a 37°C durante 1h, agitando cada 15 min para evitar la decantación celular.

- Se lavan las células exhaustivamente con RPMI para eliminar el ^{51}Cr no incorporado y se resuspenden en RPMI+5%STF de manera que $50 \mu\text{l}$ contengan un mínimo de 500-800 cpm y que la concentración sea aproximadamente 40000 células/ml.

- Se distribuyen $50 \mu\text{l}$ de células diana marcadas en placas de 96 pocillos de fondo en V (Sterilin) y se añaden distintas proporciones de células efectoras. El volumen final en cada pocillo debe ser $150 \mu\text{l}$.

- La placa se centrifuga suavemente (120xg 5 min) y se incuba durante 4h a 37°C .

- Tras un pulso de centrifuga, se recogen $100 \mu\text{l}$ de sobrenadante y se cuentan en un contador de radiactividad γ .

- La liberación máxima de ^{51}Cr se determina añadiendo $100 \mu\text{l}$ de HCl 0.1M a $50 \mu\text{l}$ de diana marcada y la liberación espontánea añadiendo $100 \mu\text{l}$ de RPMI+5%STF a $50 \mu\text{l}$ de diana.

- La lisis específica se calcula según el siguiente algoritmo:

Anticuerpo	Especificidad	ref./casa comercial
Leu-4	Anti-CD3	Becton Dickinson
Leu-3	Anti-CD4	Becton Dickinson
Leu-2 ^a	Anti-CD8	Becton Dickinson
VER 2.32	Anti-TCRVβ12	Immunotech
TrC7	Anti-HLA-A29	(190)
GSP41	Anti-HLA-DR	(191)
1A3	Anti-HLA-DQ	(192)
B7-21	Anti-HLA-DP	(193)
SPV-T3b	Anti-CD3	(194)
HP2/6	Anti-CD4	(195)
B9/4	Anti-CD8	(196)
MAR108	Anti-CD25	(197)
MCA1509	Anti-TCRBV17	Serotec

Tabla 7: Anticuerpos empleados en citometría de flujo o bloqueo de la proliferación en el estudio de aEICH (celdas con fondo blanco) y en citometría de flujo o separación de subpoblaciones en el estudio de espondiloartropatías (celdas con fondo gris).

$$\%lisis = 100x (X-E)/(M-E)$$

Donde *X* son las cpm liberadas al enfrentar las células diana con las efectoras, *E* la liberación espontánea y *M* la liberación máxima. No se consideran los experimentos en los que la relación *E/M* es superior a 0.35.

- Cada punto se determina por triplicado.

A.3.- Determinación del uso de segmentos TCR.

La determinación del uso de TCRs por los clones se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Bragado y cols. (92) y Lauzurica y cols. (93) para obtener las secuencias de TCRA y TCRB de linfocitos T monoclonales. Consiste en la amplificación específica de los transcritos correspondientes a cada una de las cadenas del TCR. Así pues, $2 \cdot 10^5$ células de cada línea clonal se lisaron con NP-40 al 0.5% en presencia de complejos de vanadilribonucleótidos (VRC, Gibco-BRL), que inhibieron la acción de las ribonucleasas, y el RNA se aisló mediante sucesivas extracciones con fenol/cloroformo (fenol 49.5%, cloroformo 49.5%, alcohol isoamílico 1%), se precipitó en etanol y tras resuspenderlo en 20 μ l de H₂O se cuantificó la cantidad de RNA por espectrofotometría a 260nm.

Se empleó 1 μ g del RNA aislado como molde para cada reacción de síntesis de cDNA mediante transcripción reversa. Como iniciador se empleó oligo(dT)₁₅, con lo que se obtuvo cDNA de todos los mRNA presentes en la muestra.

El cDNA se utilizó como molde para llevar a cabo una batería de PCRs (protocolo 4). Cada PCR emplea como cebadores pares de oligonucleótidos distintos: un oligonucleótido hibrida en una posición 5' de todos los segmentos TCRAV o TCRBV de una subfamilia, pero no con el resto de subfamilias. El otro oligonucleótido, común para todas las PCRs, hibrida en una posición 3' del segmento TCRAV o de los TCRBV (Tablas 8 y 8B). De esta forma se amplifican fragmentos de DNA que contienen parte de la región V, las regiones N (o N+D) y J al completo y parte de la región C. Los oligonucleótidos se seleccionaron empleando los programas "Local" (Molecular Biology Computer Research Source) y "Pattern Matching" versión 4.3 para el sistema operativo MS-DOS (DNA and Protein Sequence Analysis Programs) así como el paquete informático "Wisconsin Package" versión 8.0 para el sistema operativo Open VMS (Genetics Computer Group, Inc). Los oligonucleótidos presentaban al menos 4 desapareamientos con los miembros de otras subfamilias y entre todos cubrían más del 85% de todos los segmentos. No se incluyeron oligonucleótidos para las subfamilias descritas durante la realización del estudio pues su representación en el repertorio no supera el 10% en el caso de segmentos TCRAV y el 3% en TCRBV (27, 28).

Protocolo 4. PCRs de subfamilias TCRV.

- Se alícuota el cDNA (1/25 del producto de reacción de la síntesis de cDNA) en tubo eppendorf (0.6ml).

- A cada alícuota se añade el par de oligonucleótidos cebadores correspondiente (Tablas 8A y 8B). La concentración de cada oligonucleótido en la mezcla de reacción fue 1 μ M.

- La mezcla de reacción ($V=50 \mu$ l) contiene además del cDNA y los cebadores, tampón 1xTAQ (Tris-HCl 10mM pH8.8, KCl 50mM y Tritón X-100 0.1%), MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 200 μ M cada uno y 1.25u de Taq DNA polimerasa (Replitherm, Ecogen).

- Previamente a la PCR se añaden unas gotas de aceite mineral sobre la mezcla de

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
VA1aE	GCTGAGGTGCAACTACTCAAT	VA1I	ATCTCTTCTGGTATGT
VA1bE	TCTGTGAGCCAGCATAACCAC	---	---
VA2E	GAAGATGGAAGGTTTACA	VA3I	ACTAGTATAAACAATTTACAG
VA3E	CAGGGAGAAGAGGATCCTCAG	VA4I	GAAGACAGAAAGTCCAG
VA4aE	AGCCAAATTCAATGGAGAGTA	VA5I	AACTATTCTCCAGCATACTTA
VA4bE	CCTCCATGGATTGCGCTGAAG	VA6I	ACCAGTGATCAAAGTTATGGT
VA5E	GAGGCCCTGAACATTCAGGAG	VA7I	CTGGTACCAGCAACATG
VA6E	AAGATAACTCAAACCCAACCA	VA8I	ATTATAGACATTCGTTT
VA7E	CACGTACCAGACATCTGGGTT	VA9I	TATTCTGGGAGTCCTGAACTC
VA8E	ACCTGAGTGTCCAGGAGGG	VA10I	AGTGTTTTTTCCAGCTTACAA
VA9E	AGAGTGACTCAGCCCGAGAAG	VA11I	GTGTCCAATGCTTACAACCTC
VA10E	CTGCTGGAGCAGAGCCCTCAG	VA12I	ACCCGTGATACTACTTATTAC
VA11E	GACCAAGTGTTCAGCCTTCC	VA13I	GACTCTGTGAACAATTTGCAG
VA12E	AAGGTA ACTCAAGCGCAGACT	VA14I	ACCAGTGAGAGTGATTATTAT
VA13E	CCTCCAGACCTGATTCTCCAG	VA15I	AGTCCTCCACCTACTTATAC
VA14E	ACAGTCACTCAGTCTCAACCA	VA16I	GGAAACCCTTATCTTTTTTGG
VA15E	GATGTGGAGCAGAGTCTTTTC	VA17I	ACTGCGTTTGACTACTTTCCA
VA16E	CAGTCAGTGGCTCAGCCGGAA	VA18I	TCCAGCAATTTTTATGCCTTA
VA17E	CAGCAGGTGAAACAAAGTCCT	VA19I	GTAGGAATAAGTGCCCTTACAC
VA18E	CTGAACGTGGAACAAGTCCT	VA20I	AACATTGCTACAAATGATTAT
VA19E	CAGAACCTGACTGCCCAGGAA	VA21I	AACAGCATGTTTGATTATTTT
VA20E	TCCATGGACTCATATGAAGGA	VA22I	AACAAAGGTTTTGAAGCCACA
VA21E	CAGCAAGTTAAGCAAAATTCA	CAI	CAGCTGGTACACGGCAGGGTC
VA22E	ATGTCAGGCAATGACAAGGGA		
CAE	CTTGTCACTGGATTTAGAGTC		

Tabla 8A: Bateria de oligonucleótidos empleados para amplificar por PCR los cDNAs que codifican cadenas α del TCR (93).

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
VB1E	TCCCCTAGGTCTGGAGACCTCTCT	VB1I	CAGGGCCTCCAGTTCCTCATT
VB2E	TTTCAGGCCACAACCTATGTTTTG	VB2I	CTCATGCTGATGGCAACTTCC
VB3E	GATATGGACCATGAAAATATGTTC	VB3I	AAAATGAAAGAAAAAGGAGAT
VB4E	ACGATCCAGTGTCAAGTCGA	VB4I	CTGATCGCAACTGCAAATCAG
VB5E	CTGATCAAACGAGAGGACAGCA	VB5I	CTGGGGGACTCGGCCCT
VB6E	TCAGGTGTGATCCAATTC	---	---
VB7E	CAACATATGGGGCACAGGGCAATG	VB7I	TTCTCACCTGAATGCCCAAC
VB8E	GAGGTGACAGAGATGGGACA	VB8I	TACTTTAACAACAACGTTCCG
VB9E	GAACAAAATCTGGGCCATGATACT	VB9I	ATTATAAATGAAACAGTTCAA
VB10E	GTTCTATAAAAGCACATAGTTAT	VB10I	ATTCAGAAAGCAGAAATAATC
VB11E	TCTCAAACCATGGGCCATGACAAA	VB11I	ACAGAGAAGGGAGATCTTTCC
VB12E	CTGAGATGTCACCAGACTGAG	VB12I	ACATCTGTGTACTTCTGTGCC
VB13E	GCATGACACTGCAGTGTGCC	VB13I	TCATTACTCAGTTGGTGCTGG
VB14E	ACCCAAGATACCTCATCACAG	VB14I	AACAGTGACTTGTTCTCAGA
VB15E	TCTCAGACTAAGGGTCATGATAGA	VB15I	TTTGATGTCAAAGATATAAAC
VB16E	GACCCAATTTCTGGACATGATAAT	VB16I	GTGAAAGAGTCTAAACAGGAT
VB17E	GAACAGAATTTGAACCACGATGCC	VB17I	CAGATAGTAAATGACTTTCAG
VB18E	AGCCCAATGAAAGGACACAGTCAT	VB18I	CTGGTATCGGCAGCTCCCAGA
VB19E	ACCCCGAAAAAGGACATACTTTT	VB19I	GGTATCAACAGAATCAGAATA
VB20E	GAGGGAACATGAAACCCCAACCTA	VB20I	ACCGACAGGCTGCAGGCAGGG
CBE	TTTTGGGTGTGGGAGATCTC	CBI	TTCTGATGGCTCAAACAC

Tabla 8B: Batería de oligonucleótidos empleados para amplificar por PCR los cDNAs que codifican cadenas β del TCR (92).

reacción para evitar la evaporación.

- Las alícuotas se someten a PCR en un termociclador (PTC-100, MJ Research).
- Los programas empleados para las amplificaciones son:

- Para cadenas α 30 ciclos en las siguientes condiciones:

1 min a 95°C (desnaturalización),

1 min a 42°C (hibridación) y

1 min a 72°C (elongación).

El último ciclo se prolonga con 5 min más a 72°C.

- Para cadenas β se utilizan condiciones similares pero disminuyendo la temperatura de hibridación a 39°C.

Una vez finalizada la amplificación específica se tomaron alícuotas de 10 μ l y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. La detección de las bandas específicas se realizó mediante Southern blot (protocolo 1) en el que se emplearon como sondas oligonucleótidos internos de los productos de PCR que hibridan con las regiones TCRAC o TCRBC (CAI y CBI, respectivamente) (Tablas 8A y 8B). Las temperaturas de hibridación fueron 65°C y 47°C, respectivamente. El marcaje de los oligonucleótidos se realizó incubándolos con γ -[³²P]-dATP (actividad específica >3000 μ Ci/mmol (Amersham o ICN)) en presencia de T4 polinucleótido quinasa.

Tras la identificación de la subfamilia amplificada, el resto del producto de PCR de dicha subfamilia se extrajo 2 veces con fenol/cloroformo y una con cloroformo. El DNA purificado se precipitó añadiendo 1/20 volumen de NaAc 3M pH5.3 y 2 volúmenes de etanol y se sometió a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve GTG, FMC) al 2%, se cortó el fragmento de gel de agarosa que contenía la banda específica y parte de este material se utilizó como molde en reamplificaciones asimétricas en las que la proporción entre los cebadores estaba descompensada (protocolo 5) para generar DNA de cadena sencilla y emplearlo como molde en las reacciones de secuenciación.

Protocolo 5. Amplificación asimétrica.

- Se emplean como cebadores un nuevo grupo de oligonucleótidos, VAnI y VBnI (Tablas 8A y 8B) que hibridan en posiciones más internas que VAnE y VBnE.

- Las condiciones de las PCRs son las mismas que las descritas en el protocolo 4 pero incorporando las siguientes variaciones:

- El volumen de reacción se aumenta a 100 μ l.

- Como molde se emplean 2-6 μ l de agarosa fundida conteniendo el DNA amplificado en la PCR anterior.

- Las concentraciones de los oligonucleótidos son 10nM de VAnE o VBnE y 1 μ M de CAI o CBI, para generar la cadena - o 1 μ M de VAnI o VBnI y 10nM de CAE o CBE para generar la cadena +.

- El producto de la reacción se extrae 2 veces con fenol/cloroformo y 1 vez con cloroformo y se concentra con un microconcentrador microcon-30 (Amicon), que se centrifuga a 10000xg a 4°C durante 15 min para eliminar el exceso de cebadores y dNTPs.

- El producto de la amplificación asimétrica, retenido en el volumen no filtrado, se recupera invirtiendo el microconcentrador y centrifugando a 2000xg durante 3 min.

- 1/10 del producto recuperado se somete a electroforesis en gel de agarosa para comprobar el rendimiento de la purificación.

El producto purificado de las amplificaciones asimétricas se secuenció mediante el método de los ddNTPs (198) utilizando el sistema "Sequenase version 2.0" (Amersham) según las recomendaciones del fabricante. Los productos de las reacciones de secuencia se resolvieron en gel de poliacrilamida en presencia de urea (urea 42%, Tris-borato 0.09M, EDTA 2mM, acrilamida 6%, bisacrilamida 0.13%, APS 0.05% y TEMED 0.03%), que permite separar fragmentos de DNA con diferencias de tamaño de hasta una base. Tras la electroforesis, el gel se secó a vacío durante 2h a 80°C y se expuso a autorradiografía con películas X-Omat S (Kodak).

En aquellos casos en que las secuencias de los transcritos de TCR no pudieron deducirse a partir del material obtenido por amplificación asimétrica, el material amplificado tras la PCR convencional se insertó en el vector pCR-script, se transformó en bacterias y se secuenció como se describe en los apartados correspondientes a Materiales y Métodos para el estudio del repertorio de TCRs en espondiloartropatías.

B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y en PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.

El procedimiento general empleado en el estudio se esquematiza en la figura 12.

B.1.- Obtención de linfocitos T y manipulación de células.

B.1.1.- PACIENTES.

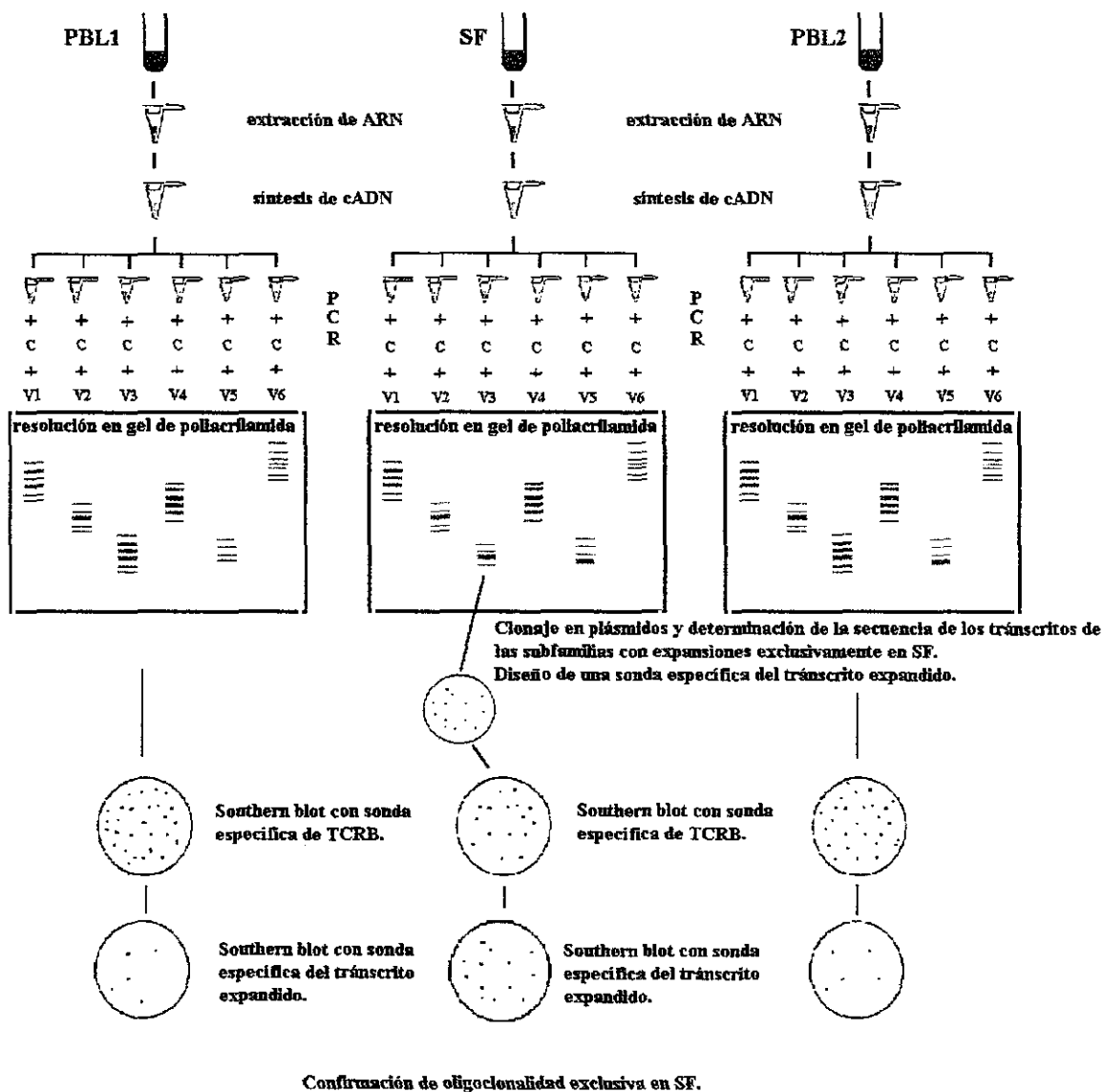
Paciente MTSM. La paciente, mujer de 56 años acude a consulta afectada por artritis periférica y sinovitis en ambas rodillas así como con un largo historial de artritis. No se detectan indicios de infecciones en ningún momento del diagnóstico ni durante las siguientes consultas. Sus síntomas se ajustan a los criterios de diagnóstico de espondiloartropatías (142, 143) y a los criterios de diagnóstico de espondilitis anquilosante (199, 200). Tras diagnosticársele dicha enfermedad, es tratada con AINE. Durante los 3 años siguientes no se detectan nuevos episodios. Cuando la paciente contaba 60 años, se le presentó un 2º episodio inflamatorio (el 1º crónico). Se obtiene entonces una muestra de líquido sinovial de la rodilla derecha (MTSMSFR1) y una de PBLs (MTSMPBL1). 6 meses después, se volvió a extraer líquido sinovial, en esta ocasión de ambas rodillas (MTSMSFR2 de la rodilla derecha y MTSMSFL2 de la izquierda) y de sangre periférica (MTSMPBL2). El tipaje de HLA se muestra en la tabla 6 (MTSM).

Paciente DMG. El paciente, varón de 22 años cuyo tipaje HLA se muestra en la tabla 6, se presentó en consulta mostrando artritis periférica y sinovitis afectando la rodilla derecha. Se detectaron además signos de dactilitis y velocidad de sedimentación globular elevada. En ningún momento se detectaron signos de infección bacteriana ni vírica. Dichos síntomas encajan en los criterios de diagnóstico de espondiloartropatías, tanto según el ESSG (142) como Amor (143). Finalmente se le diagnostica espondiloartropatía indiferenciada. Previamente a cualquier tratamiento se obtuvieron muestras de líquido sinovial (DMGSF), así como de sangre periférica (DMGPBL1). 6 meses después, tras tratamiento con AINE, se tomó otra muestra de sangre periférica (DMGPBL2) y 4 meses más tarde se extrajo una tercera muestra de sangre periférica (DMGPBL3).

B.1.2.- AISLAMIENTO, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE MUESTRAS Y LÍNEAS CELULARES.

Las muestras de líquido sinovial (SF) y PBLs se diluyeron a la mitad con solución salina (SS) (NaCl 0.9%) y se sometieron a centrifugación en gradiente de ficol (Lymphoprep). La interfase que contenía los linfocitos se recuperó y se lavó 3 veces con SS para eliminar los restos de ficol.

Las células se congelaron en medio de congelación (90% suero de ternera fetal (STF) y 10% de DMSO) a una concentración que osciló entre $5 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^6$ células/ml. La suspensión se conservó en viales de congelación que se mantuvieron un mínimo de 24h a -80°C antes de transferirse a contenedores de nitrógeno líquido donde se almacenaron por tiempo indefinido.



Determinación de la capacidad de respuesta de las células T portadoras del transcrito expandido frente a distintas líneas B linfoblásticas.

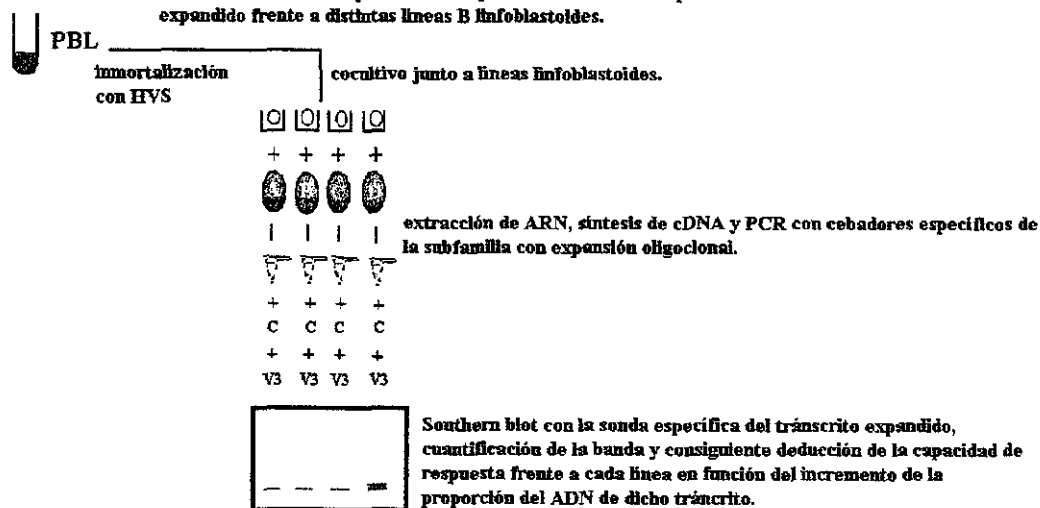


Figura 12: Procedimiento metodológico empleado para el estudio de las muestras derivadas de enfermos afectados por espondiloartropatías.

La descongelación se realizó añadiendo SS a la suspensión, diluyéndola hasta 14ml. Se centrifugó 5 min a 500xg. Esta última operación se repitió 3 veces antes de añadir el tampón o medio correspondiente para las subsiguientes manipulaciones.

B.1.3.- CITOMETRÍA DE FLUJO.

La expresión en superficie celular de los diferentes marcadores se determinó mediante citometría de flujo en un citómetro EPICS-XL (Coulter). Las células se incubaron 30 min a 4⁰C con el AcM específico correspondiente acoplado a FITC o PE. Como control de especificidad se emplearon Igs policlonales de ratón acoplados a los mismos compuestos fluorescentes. En los casos en que se emplearon AcM no acoplados, tras la incubación con el 1^{er} anticuerpo, las células se lavaron 2 veces con SS y se incubaron con un 2^o Ac anti-fracción Fc de las Igs de ratón acoplado a FITC o a PE. En estos casos se consideró negativa la fluorescencia medida tras la incubación de las células directamente con el Ac anti-fracción Fc de las Igs de ratón acoplado al compuesto fluorescente. Los anticuerpos empleados se detallan en la Tabla 7.

B.1.4.- SEPARACIÓN DE SUBPOBLACIONES.

Tras el aislamiento de las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de ficol, las muestras obtenidas del enfermo DMG se separaron en las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ por incubación (45 min a 4⁰C) con Acs específicos de dichos marcadores acoplados a bolas magnéticas (Dynabeads CD4 o Dynabeads CD8, Dynal) y selección de las células adheridas a las bolas por aplicación de un imán al que se unieron las bolas.

En determinados casos el AcM utilizado no estaba acoplado a las bolas magnéticas y las células se incubaron con el Ac específico durante 30 min a 4⁰C, se lavaron 3 veces con SS y se incubaron con Ac-anti fracción Fc de Igs murinas acoplado a bolas magnéticas (Dynabeads Goat anti-mouse IgG, Dynal) otros 30 min a 4⁰C, tras lo que las células se separaron con el imán.

La homogeneidad de cada población celular aislada se comprobó mediante citometría de flujo.

B.2.- Determinación de uso de TCR en células T expandidas específicamente en líquido sinovial.

B.2.1.- TIPAJE ESPECTRAL.

Tras la extracción de RNA de las muestras y la síntesis de cDNA, se realizaron baterías de PCRs para cadenas TCRB similares a las descritas en el protocolo 4, con las siguientes variaciones:

- Como molde de la PCR se empleó 1/100 del producto de la síntesis de cDNA (paritendo de 1 μ g de RNA).
- El volumen final de la reacción fue de 10 μ l, manteniéndose la concentración de todos los reactivos excepto la de los oligonucleótidos, que se utilizaron a 0.5 μ M.
- La temperatura de hibridación se aumentó a 49⁰C para aumentar la especificidad de la reacción.
- Se realizaron 40 ciclos de amplificación en lugar de 30 para incrementar la cantidad

de DNA. Una vez finalizada esta amplificación, el material se reamplificó cambiando uno de los oligonucleótidos por otro más interno, lo que permitió aumentar la especificidad de la amplificación. La reamplificación (PCR2A) se realizó en condiciones similares a las que acabamos de describir pero con las siguientes modificaciones:

- Como molde se emplearon 0.5µl de una dilución 1/200 del producto de la primera PCR.

- Se sustituyó el oligonucleótido CBE por CBI marcado con γ -[³²P]-dATP para facilitar la detección del material amplificado.

- Se realizaron 25 ciclos de amplificación.

Una vez finalizada la 2ª amplificación, se añadieron 5µl de tampón de parada (formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0.05% y xilencianol 0.05%). La mezcla se desnaturalizó a 95°C durante 5 min y se cargó en gel de poliacrilamida en presencia de urea.

La autorradiografía se densitómetró (ImageQuant, Molecular Dynamics) y se cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas en la amplificación de cada subfamilia. Se consideró que contenían una expansión oligoclonal aquellas amplificaciones en las que 1 banda suponía más del 50% de la amplificación total de la subfamilia (184) y cuyas bandas adyacentes no suponían más del 30% de dicha banda (201).

El estudio se continuó en aquellas subfamilias que presentaban expansiones oligoclonales en las células del SF pero no en PBLs, descartándose el resto.

B.2.2.- OBTENCIÓN DE COLONIAS Y SECUENCIACIÓN.

Se realizaron 2^{as} PCRs a mayor escala que las que se acaban de describir con objeto de generar material suficiente para ser introducido en vectores de clonaje y empleando CBI no marcado. El material obtenido se purificó mediante el sistema Wizard PCR-preps (Promega) para eliminar oligonucleótidos y dNTPs, tras lo que se insertó en un vector de clonaje (pCR o pBlueScript) mediante incubación en presencia de T4 polinucleótido ligasa. Los productos de la reacción de ligación se introdujeron mediante choque de calor en bacterias *E. coli* de la cepa DH5- α que se sembraron en placas petri con LB-Agar (bacto-triptona 10gr/l, extracto de levadura 5gr/l, NaCl 10gr/l, agar 15g/l, IPTG 0.1mM y X-GAL 40mg/l) con ampicilina (100mg/l). Las colonias obtenidas se chequearon para comprobar si el vector había incorporado el material amplificado mediante PCR (Protocolo 6) o Southern blot (Protocolo 7).

Protocolo 6. Chequeo de colonias por PCR.

- Se replica cada colonia en una placa con LB-Agar+Amp y el resto de la colonia se resuspende en 10µl de SS.

- Se añaden 10µl de solución de lisis (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH8.3, MgCl₂ 1.5mM, NP-40 0.45%, Tween-20 0.45% y proteinasa K 0.06mg/ml) para lisar la membrana de las bacterias y se incuba 30 min a 37°C.

- El producto de la lisis se divide en dos tubos y se somete a dos PCR distintas. En una se emplean como cebadores los oligonucleótidos CBI y T3 (ATTACCCCTCACTAAAG) y en la otra CBI y T7(AATACGACTCACTATAG). Las condiciones de PCR son iguales que las descritas en el protocolo 4 para la amplificación de cadenas β .

Protocolo 7. Chequeo de colonias por Southern blot.

- Se hacen dos réplicas de la colonia, una sobre LB-Agar y otra sobre una membrana

de Nylon (Amersham) colocada sobre otra placa de LB-Agar.

- Ambas réplicas se incuban 16-20h a 37°C.
- Las colonias presentes en las membranas se lisan durante 15 min en NaOH 0.4M, 2x 1 min en Tris-HCl 1M pH7.6 y 15 min en Tris-HCl 0.5M pH7.6, NaCl 1.5M.
- El DNA se fija a la membrana incubándola 2h a 80°C.
- Los procesos de prehibridación, hibridación y exposición son iguales a los descritos en el protocolo 1.

Parte de las colonias que incorporaron inserto se crecieron en 1.5ml de LB+Amp durante unas 20h y se extrajo el DNA plasmídico mediante los sistemas Wizard minipreps (Promega) o Flexiprep kit (Pharmacia). El DNA se desnaturalizó con NaOH/EDTA (NaOH 20mM y EDTA 0.2mM) durante 1h a 37°C tras lo que se neutralizó con NaAc y se precipitó con etanol. El DNA desnaturalizado se disolvió en H₂O y se secuenció como se ha detallado.

B.3.- Cuantificación de transcritos con una determinada región N+D.

Las colonias obtenidas como se acaba de describir se replicaron y se chequearon por Southern blot empleando como sonda CBI. Tras determinar el número de colonias positivas, las membranas se lavaron en 6xSSC durante 10 min a 95°C para deshibridarlas y se rehibridaron utilizando como sonda un oligonucleótido cuya secuencia coincidía con la de la región N+D estudiada (V17IRS(AGTAGTATAAGATCGGGC)) y se determinó la proporción de colonias que hibridaban con V17IRS dentro de las TCRB⁺. Para aumentar la especificidad, la hibridación se realizó a la T_m del oligonucleótido (56°C).

B.4.- Estudio de la capacidad autorreactiva de las células T que expresan determinada cadena β.

B.4.1.- TRANSFORMACIÓN DE LINFOCITOS Y MANTENIMIENTO EN CULTIVO.

Células T de las muestras DMGPBL2 y DMGPBL3 se infectaron con el virus del herpes de saimiri (HVS) siguiendo el protocolo 8.

Protocolo 8. Infección con HVS.

- Las células se siembran a 0.5·10⁶ células/ml en placa de 24 pocillos.
- Se incuban en 1ml de medio RPMI/CG (RPMI 68%, medio CG (Serotec) 22%, STF 10%, Gln 2mM, gentamicina 50mg/l y fungizona 1mg/ml) suplementado con IL-2 (Hoffman-Roche) 40u/ml y PHA a 10µg/ml. A este medio se añade 1ml del sobrenadante obtenido tras la incubación a 37°C de células OMK (células renales de macaco) junto a HVS hasta la lisis completa de las células.
- Se mantienen durante 7 días en presencia del virus, tras lo cual se retira el medio y se añade RPMI/CG+IL-2.
- Tras 1 mes en este medio, el cultivo está completamente compuesto por células T CD8⁺, como demuestran los análisis de las muestras por citometría de flujo, que pueden considerarse transformadas.
- Las células transformadas se mantienen en RPMI/CG+IL-2, que se renueva cada 3-4 días.

Con objeto de obtener célula B inmortalizadas de DMG para emplearlas como APCs, parte de la muestra DMGPBL3 se infectó con el virus de Epstein-Barr (EBV). El procedimiento de transformación se detalla en el protocolo 9.

Protocolo 9. Infección con EBV.

- Los PBLs se resuspenden a $3 \cdot 10^6$ células/ml en 2ml del sobrenadante obtenido tras el cultivo durante 1 semana de linfocitos de tití infectados con EBV.

- Se mantiene a 37°C durante 2h y se añade RPMI completo (RPMI 90%, STF 10%, Gln 2mM, gentamicina $50\mu\text{g/ml}$ y fungizona 1mg/ml) hasta dejar las células a una concentración de 10^6 células/ml.

- Las células se cultivan en estufa durante 7-15 días tras los cuales la transformación es completa.

- Se retira el medio con EBV y se sustituye por RPMI completo fresco.

- Las células transformadas con EBV se mantienen en RPMI completo que se renueva cada 3-4 días.

B.4.2.- COCULTIVO DE CÉLULAS T TRANSFORMADAS CON LÍNEAS B LINFOBLASTOIDES.

Las líneas T transformadas se cocultivaron en presencia de líneas B linfoblastoides, pero en ausencia de IL-2 u otros coestímulos (protocolo 10). Así, teóricamente, sólo las células T que reconocen específicamente un Ag deben proliferar, mientras que el resto deberían permanecer quiescentes o morir por falta de estímulos.

Protocolo 10. Cocultivo.

- Las células T transformadas se siembran en placas de 24 pocillos a $5 \cdot 10^5$ células/pocillo, concentración celular limitante para las células T transformadas con HVS.

- A cada pocillo se añaden células B linfoblastoides irradiadas (60 Gy) en una proporción de 2/1 respecto a las células T.

- Cada pocillo contiene 2ml de medio RPMI/CG sin IL-2 (para evitar el crecimiento de las células que no reconozcan un Ag).

- El medio se renueva cada 3-4 días y cada 7 días se añaden 10^6 células B linfoblastoides irradiadas.

- El cocultivo se mantiene 30 días, para que las células T no estimuladas queden minimizadas en el cultivo.

- Se añade IL-2 al medio y se deja de añadir células B para lograr la proliferación de las células activadas vía TCR.

Tras el ensayo, las células se mantuvieron en cultivo en presencia de IL-2 el tiempo mínimo necesario para disponer de células suficientes para el análisis por PCR de las mismas. Se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y éste se utilizó como molde para la PCR con el par de oligonucleótidos CBE y VB17E como se ha detallado (protocolo 4 con las variaciones descritas en el apartado B.2.). El producto amplificado se diluyó (1/200) y se reamplificó tal y como se ha descrito en el apartado B.2. utilizando como cebadores los oligonucleótidos CBI y VB17E. El producto de amplificación se resolvió en gel de agarosa al 1.5% y las bandas específicas se detectaron mediante Southern blot (protocolo 1) usando como sonda CBI (hibridación a 49°C). Tras exposición en autorradiografía, la membrana se lavó durante 10 min

a 95⁰C en 6xSSC, y se rehibridó con la sonda V17IRS (temperatura de hibridación 56⁰C).

La expresión relativa de TEV17 en cada cocultivo se calculó empleando el siguiente algoritmo:

$$\text{Expresión relativa}_i = (IV_i/IC_i)/(IV_{IL-2}/IC_{IL-2})$$

Siendo IV_i la intensidad de la banda i medida mediante densitometría tras la hibridación con la sonda V17IRS e IC_i la intensidad de la banda i medida por densitometría tras hibridación con la sonda CBI. IV_{IL-2} e IC_{IL-2} intensidad de las banda obtenidas tras cultivo en presencia de IL-2 tras hibridación con las mismas sondas. La división de cada intensidad IV entre IC elimina la variación debida a las diferencias de cantidad de material correspondiente a la amplificación de TCR sometido a electroforesis. La división entre el crecimiento en presencia de IL-2 relativiza el valor anterior haciéndolo independiente de la actividad de la sonda y las diferencias entre distintos momentos de cultivo.

RESULTADOS.

A.- Estudio de células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.

A.1.- Obtención de clones T, confirmación de la clonalidad y análisis de la diversidad clonal.

Con objeto de obtener células T activadas infiltradas en las muestras locales, las biopsias de piel se mantuvieron en medio de cultivo enriquecido con IL-2. Puesto que las células activadas expresan elevados niveles del receptor de alta afinidad de IL-2 (202), a priori, únicamente éstas proliferarán como respuesta a dicha citoquina, por lo que en principio se evita la selección antigénica *in vitro*. En las 3 biopsias de piel estudiadas, las células T comenzaron a exudar del tejido durante los 3 primeros días de cultivo. Tras 5 días de cultivo en estas condiciones, estas células T se sembraron en placas de 96 pocillos en condiciones de dilución límite (0.3 células/pocillo) en presencia de células B del receptor. Las condiciones de dilución límite impiden que el sobre-crecimiento de alguna célula T pueda desembocar en un enmascaramiento de la presencia de otras células T. El análisis por dilución límite indicó una frecuencia de proliferación de entre el 50 y el 100% de la teórica. Por tanto, el cultivo en las condiciones de dilución límite empleadas permitió obtener la mejor representación de las células T que inicialmente crecieron en presencia exclusiva de IL-2. No se obtuvieron células a partir de biopsias de transplantados en los que no se desarrolló aEICH.

De este modo, se obtuvieron 59 líneas celulares T del paciente HER, 21 derivadas del cultivo de la biopsia obtenida 22 días tras el trasplante (3 días desde la detección de la lesión dérmica) y 38 de la biopsia tomada el día 27 tras el trasplante (8 días desde la manifestación de la enfermedad), así como 24 líneas T de la biopsia del paciente P. Cada una de las líneas estaba exclusivamente compuesta por células T CD4⁺ o CD8⁺, como se confirmó mediante citometría de flujo.

Para confirmar la clonalidad de las líneas celulares, éstas se analizaron por Southern blot con una sonda específica del segmento TCRGJ1 que también reconocía el segmento TCRGJ2.

El análisis de las líneas obtenidas del enfermo HER mostró que todas las líneas CD4⁺ aisladas a partir de la primera biopsia presentaban el mismo patrón de reordenamiento del gen TCRG, por lo que se dedujo que debían corresponder a un solo clon que se denominó HER-1. Todas las líneas CD8⁺ de la primera biopsia de HER fueron reconocidas por un AcM anti-VB12, por tanto se asumió que también procedían de la expansión de un único clon, HER-3. La segunda biopsia de HER permitió aislar 38 clones, 26 CD4⁺ y 12 CD8⁺. El análisis de los reordenamientos TCRG indicó que los clones CD4⁺ únicamente presentaban 3 reordenamientos distintos y por tanto correspondían a 3 clones, HER-27, HER-28 y HER-29, diferentes de HER-1 (Fig. 13A). Todos los reordenamientos TCRG de los clones CD8⁺ de la segunda biopsia fueron iguales (Fig. 13B), lo que indicaba que correspondían a un único clon, HER-30, diferente de HER-3.

El análisis de las 24 líneas T de la biopsia del paciente P reveló que todas eran CD4⁺ y que presentaban 7 patrones de reordenamiento de TCRG diferentes, lo que permitió deducir que derivaban de 7 clones distintos: P1, P3, P6, P7, P10, P11 y P14 (Fig. 13C). Puesto que el paciente P se sometió a dos trasplantes, el primero procedente de su madre y el segundo del

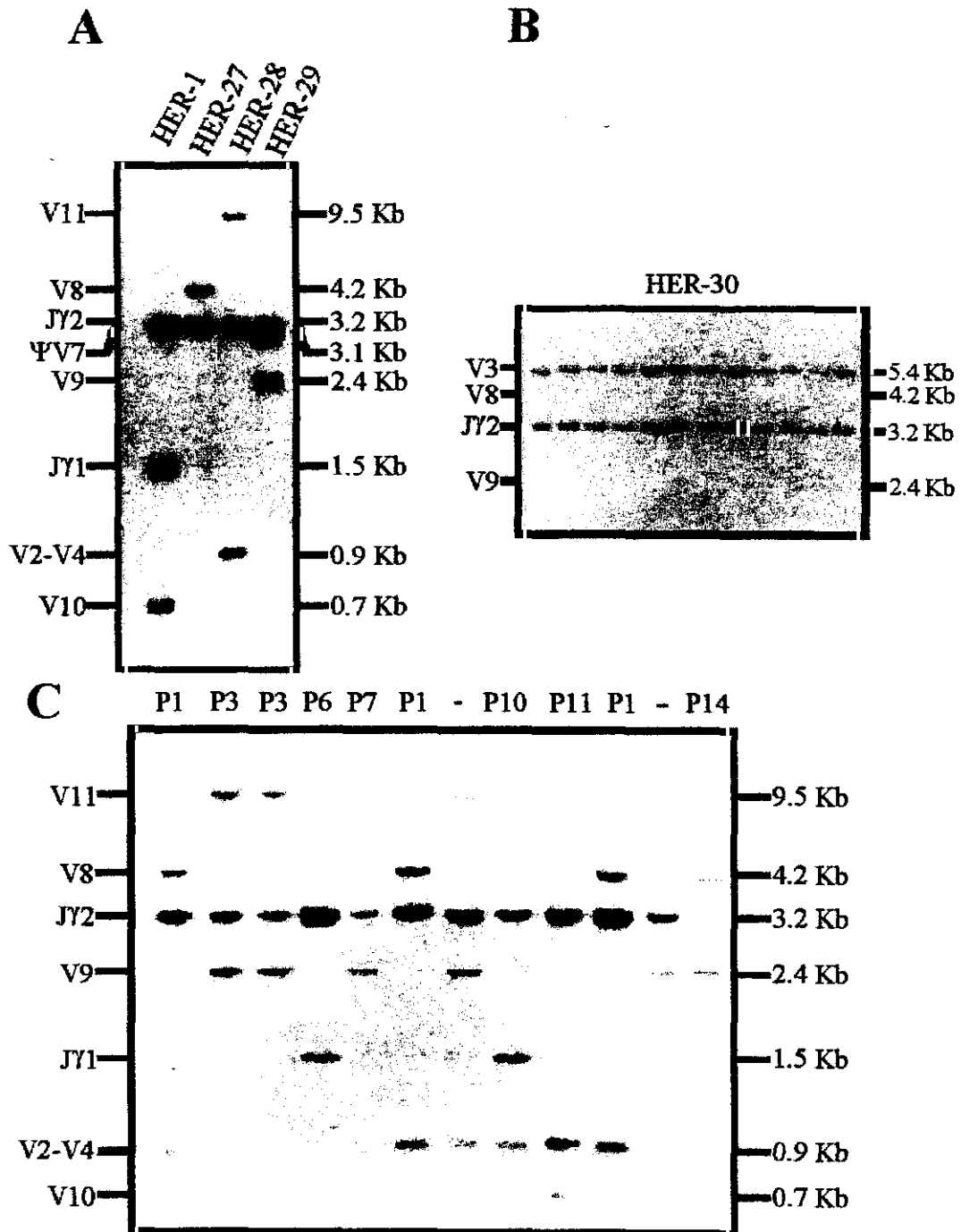


Figura 13: Reordenamiento del gen TCRG en las líneas T obtenidas a partir de las biopsias de piel de los pacientes afectados por aEICH. El DNA se digirió con EcoRI y se hibridó con la sonda PH60, específica de TCRGJ. A: líneas CD4+ obtenidas del paciente HER. B: líneas CD8+ obtenidas del paciente HER. C: líneas CD4+ obtenidas del paciente P.

padre, se determinó mediante citometría de flujo el fenotipo HLA de los clones. Este análisis indicó que todos los clones aislados eran HLA-A29⁺, alelo expresado únicamente por el padre, por lo que se dedujo que procedían del segundo trasplante.

La clonalidad de las líneas, además de apoyarse en los patrones de reordenamiento de TCRG, fue confirmada por los datos obtenidos por PCR de familias TCRAV y TCRBV y su posterior secuenciación (ver el epígrafe A.3).

A.2.- Análisis de la especificidad de los clones obtenidos. Diversidad clonal de la respuesta.

A fin de determinar si los clones obtenidos eran específicos de los alelos HLA del receptor, éstos se enfrentaron con un panel de líneas linfoblastoides en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales específicos de distintos alelos HLA y se determinó la capacidad proliferativa de los clones así como, en aquellos casos en los que procedía, su capacidad citotóxica.

El clon HER-1 proliferó frente a las líneas BM14 (HLA-A3; -B7; -DR4; -DQ8; -DP0401), DEM (HLA-A2.2; -B62.3; -DR4; -DQ8; -DP0202) y HOM2 (HLA-A3; -B27; -DR1; -DQ5; -DP0401) y no frente a BSM (HLA-A2.2; -Bw62.3; -DR0401; -DQ8; -DP0201) (Fig. 14A). Puesto que el único alelo coincidente entre las líneas frente a las que proliferó HER-1 fué HLA-DP0401, se supuso que HER-1 responde específicamente a dicho alelo. Esta especificidad se confirmó mediante el bloqueo de la proliferación frente a HOM2 con AcM específicos. El clon HER-27 proliferó frente a las líneas BSM y BOLETH (HLA-A2.2; -Bw62.3; -DR0401; -DQ8; -DP0401) pero no en presencia de JHA (HLA-A31; -Bw51; -DR0407; -DQ7) ni BTB (HLA-A2.2; -B2705; -DR0801; -DQ4; -DP0401) (Fig. 14A). HER-29 proliferó frente a las mismas líneas, pero no frente a RSH (HLA-A68.1,30.3; Bw42; -DR0302; -DQ4; -DP0101,0402) ni BTB (Fig. 14A). Puesto que el único alelo no coincidente entre donante y receptor presente en las líneas linfoblastoides reconocidas y ausente en el resto era HLA-DQ8 se supuso que tanto HER-27 como HER-29 eran específicos para dicho alelo. Esta suposición se vio reforzada por la ausencia de proliferación de ambos clones al ser cultivados junto a la línea BOLETH preincubada con un AcM específico de HLA-DQ (1A3) (Fig. 14B). HER-28 proliferó al enfrentarlo con BTB y BOLETH, pero no frente a BSM ni RSH, por lo que únicamente podía ser específico de HLA-DP0401, alelo presente en las dos líneas frente a las que proliferó y expresado por el receptor (Fig. 14A). La especificidad se confirmó porque su proliferación se bloqueó específicamente con el AcM anti-HLA-DP (B7.21) pero no con los anti-HLA-DR ni anti-HLA-DQ (Fig. 14B).

El clon CD8⁺ HER-3 proliferó en presencia de la línea BTB pero no en presencia de DAB (HLA-A2,11; -B18,55; -DR8,11; -DQ2,4; -DP0401,0501) ni ROU (HLA-2,3; -B51,44; -DR4,13; -DQ6,7; -DP0301). Por su parte, HER-30 proliferó en presencia de BTB y de WT24 (HLA-A2.2; -B2705; -DR1602; -DQ2; -DP0301) pero no lo hizo al enfrentarla con IBW9 (HLA-A33.1; -Bw51; -DR7; -DQ5; -DP0101) ni VAVY (HLA-A1; -B8; -DR0301; -DQ2; -DP0101) (Fig. 15A). Dado que los experimentos de citotoxicidad indicaron que ambos clones lisaban BTB pero no RML (HLA-B27), se dedujo que tanto HER-3 como HER-30 reconocían específicamente HLA-B27 (Fig. 15B).

Los clones P1, P3, P6, P7 y P10 proliferaron al cultivarlos en presencia de BOLETH pero no frente al resto de líneas linfoblastoides chequeadas: RSH, VAVY, TONY (HLA-A1,2; -B7,8; -DR3,13; -DQ2; -DP0101,1901), BTB ni IBW9 (Fig. 16A). Estos datos, unidos a la ausencia de proliferación al enfrentar dichos clones con la línea BOLETH preincubada con el AcM anti-HLA-DQ 1A3 (Fig. 16B) permitieron deducir que estos clones reconocen

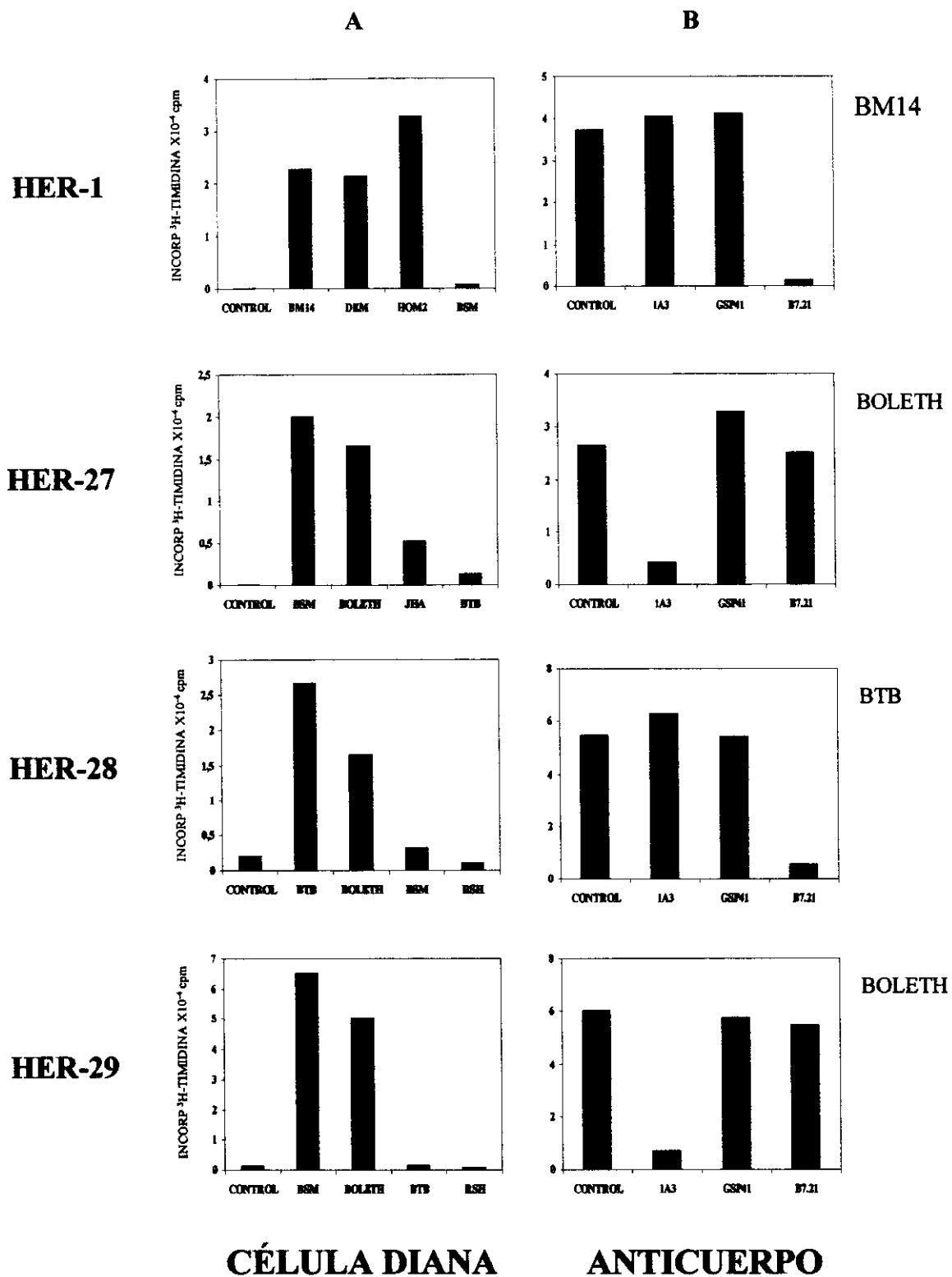
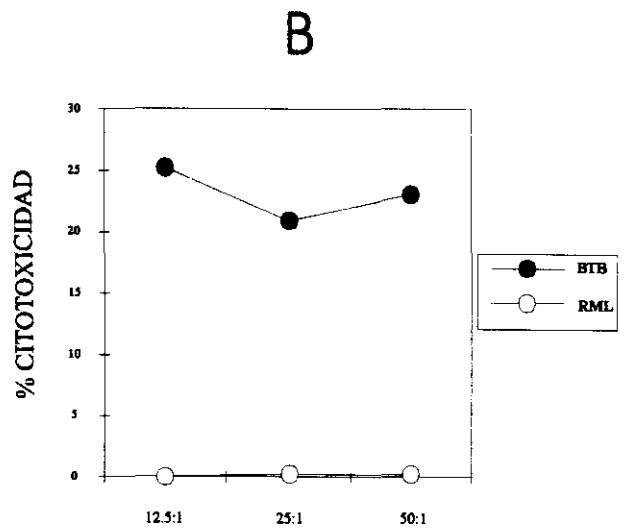
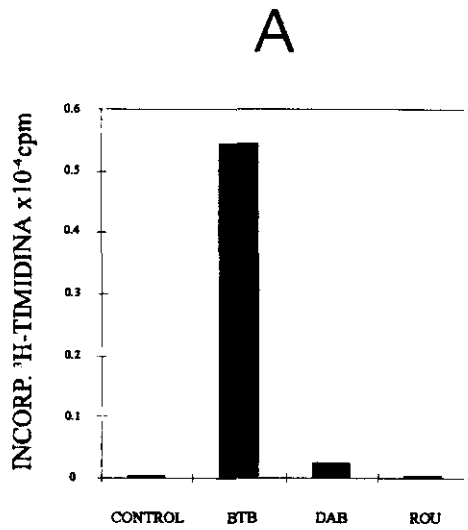
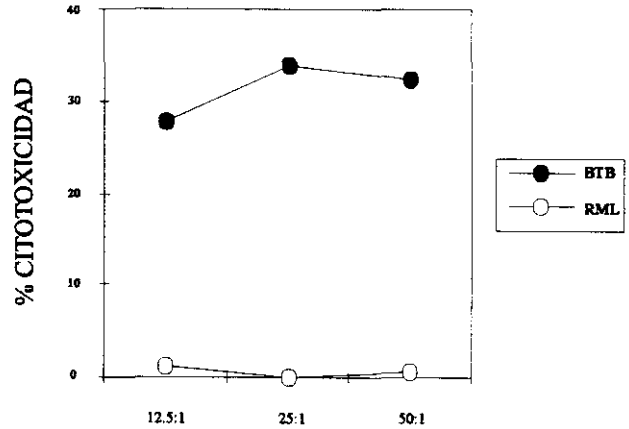
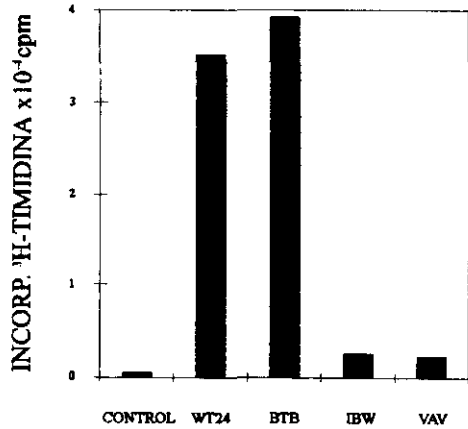


Figura 14: Determinación de la especificidad de los clones CD4⁺ derivados de HER a través de las medidas de proliferación frente a distintas células diana (A) y de bloqueo de la proliferación del clon al enfrentarlo a la línea indicada a la derecha preincubada con anticuerpos específicos (B). Las especificidades de los anticuerpos empleados son: 1A3 anti-HLA-DQ, GSP41 anti-HLA-DR y B7.21 anti-HLA-DP. La relación efector/diana es 1:1.

HER-3



HER-30



DIANA BLCL

RELACIÓN EFECTOR:DIANA

Figura 15: Determinación de la especificidad de los clones CD8⁺ derivados de HER a través de medidas de proliferación (A) y de ensayos de citotoxicidad (B) frente a distintas células diana. La relación efector/diana en los ensayos de proliferación es 1:1.

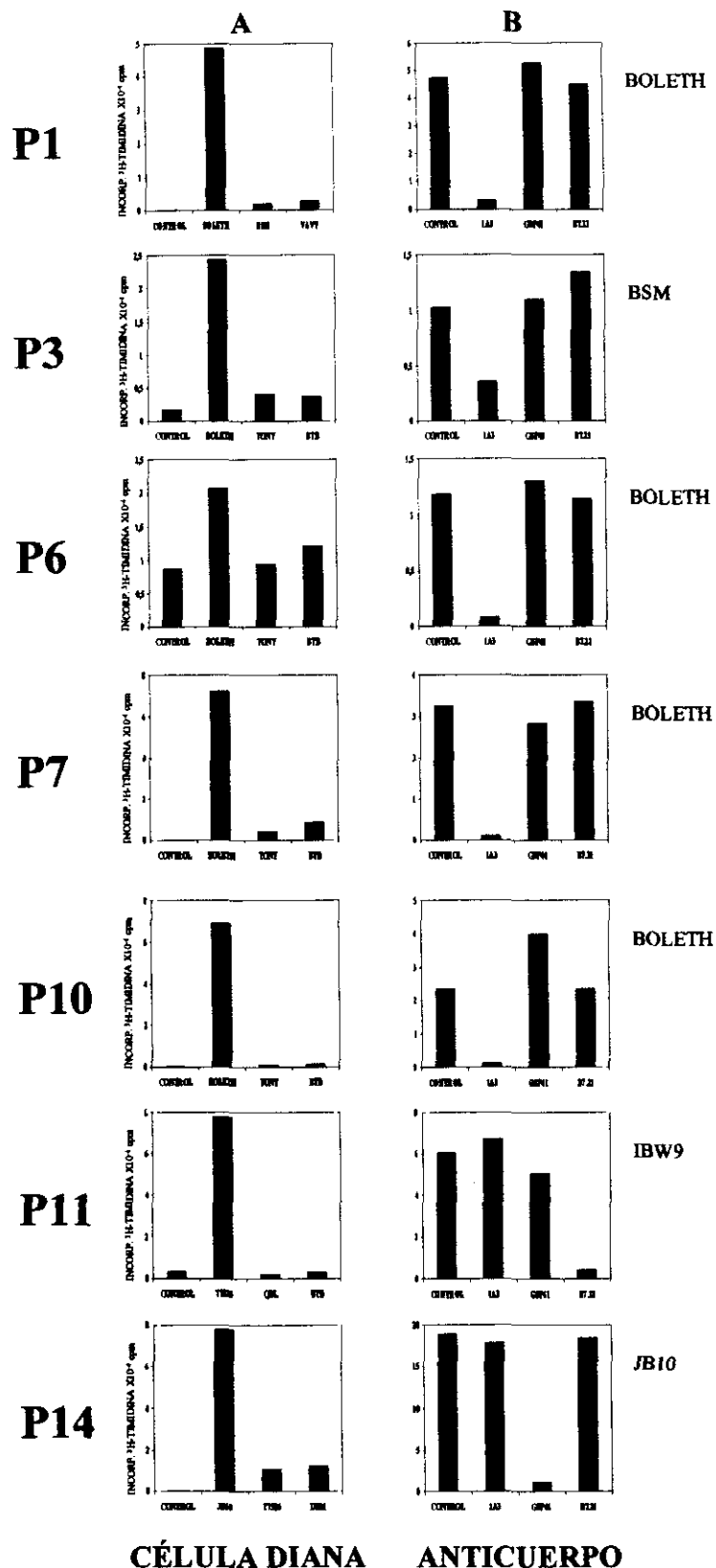


Figura 16: Determinación de la especificidad de los clones derivados de P a través de las medidas de proliferación frente a distintas células diana (A) y de bloqueo de la proliferación del clon al enfrentarlo a la línea indicada a la derecha preincubada con anticuerpos específicos (B). Las especificidades de los anticuerpos empleados son: 1A3 anti-HLA-DQ, GSP41 anti-HLA-DR y B7.21 anti-HLA-DP. La relación efector/diana es 1:1.

específicamente HLA-DQ8. P11, en cambio, proliferó únicamente frente a T75.26 (HLA-A2; -Bw46; -DR0901; -DQ2; -DP1301) (Fig. 16A) y la proliferación se bloqueó específicamente por el AcM anti-HLA-DP (Fig. 16B). Por tanto se dedujo que respondía específicamente contra HLA-DP1301, exclusivo del receptor. P14 proliferó al cultivarlo en presencia de JB10 (HLA-A26,28; -B38; -DR0402; -DQ7) pero no en presencia de T75.26 ni DEM (Fig. 16A). La proliferación de P14 se bloqueó únicamente cuando JB10 se preincubó con el AcM anti-HLA-DR. Estos datos indicaron que la línea reconocía específicamente HLA-DR0402.

Los resultados anteriores permitieron concluir que todos los clones aislados de las muestras locales del paciente HER así como los obtenidos de P eran específicos de alelos HLA de los receptores. Los clones aislados de HER se dirigían contra HLA-B27 (HER-3 y HER-30), HLA-DQ8 (HER-27 y HER-29) o HLA-DP0401 (HER-1 y HER-28), cubriendo así todos los alelos HLA del receptor no expresados por el donante. Por su parte, los clones obtenidos a partir de la biopsia de P reconocían los alelos HLA-DQ8 (P1, P3, P6, P7 y P10), HLA-DP1301 (P11) o HLA-DR0402 (P14), mientras que no se obtuvo ningún clon dirigido contra HLA-A1 o HLA-B17, también expresados exclusivamente por el receptor.

A.3.- Diversidad de TCRs empleados por los clones.

Con objeto de confirmar la clonalidad de las líneas T aisladas a partir de las biopsias de ambos enfermos, así como para comprobar si la respuesta restringida a cada alelo se reflejaba en la existencia de similitudes estructurales entre los TCRs que los reconocen, se procedió a la caracterización de los TCRs expresados por cada supuesto clon. Así pues, el RNA procedente de los clones se retrotranscribió a cDNA y se sometió a baterías de PCRs con objeto de amplificar el material correspondiente a la subfamilia TCRAV y TCRBV expresada por el receptor correspondiente. Puesto que, en principio, cada PCR de la batería únicamente debería amplificar los transcritos con segmentos TCRV de una subfamilia, el análisis por Southern blot teóricamente debería permitir la identificación de los segmentos TCRV que emplea cada clon (Fig. 17 y 18). En determinados casos los oligonucleótidos cebadores pueden hibridar con miembros de otras subfamilias, por lo que puede detectarse más de una amplificación aún cuando la línea celular T sea clonal. Este problema se solventó secuenciando todos los materiales amplificados en cada batería de PCRs, determinándose la porción 3' del segmento TCRAV/TCRBV, la región N/N+D, el segmento TCRAJ/TCRBJ y el extremo 5' del segmento TCRAC/TCRBC de cada cadena analizada.

Con la batería de PCRs realizada a partir del cDNA del clon HER-1 se amplificó material correspondiente a las subfamilias TCRAV4 y TCRBV13 (Fig. 17). A pesar de los repetidos intentos de reamplificación y secuenciación del material de TCRAV, no fue posible determinar la secuencia de dicho transcrito, aunque si pudo determinarse la secuencia correspondiente a la banda TCRBV13 (Tabla 9).

Las PCRs del material aislado del clon HER-27 mostraron amplificaciones de los tamaños esperados al emplear los pares de oligonucleótidos para TCRAV4, AV12 y BV9 (Fig. 17). La secuenciación del material correspondiente a cada una de las bandas indicó que únicamente correspondían a TCRAV12 y TCRBV9 (Tabla 9), siendo la banda TCRAV4 un producto secundario de la amplificación, probablemente correspondiente a la amplificación de un microsatélite o intrón de RNA inmaduro, y no correspondía a la secuencia de ningún TCR.

La retrotranscripción del RNA y PCR del cDNA del clon HER-28 produjo tres amplificaciones: TCRAV16, TCRAV17 y TCRBV7. La secuenciación de TCRAV16 demostró que correspondía a un reordenamiento no productivo del gen TCRA, mientras que

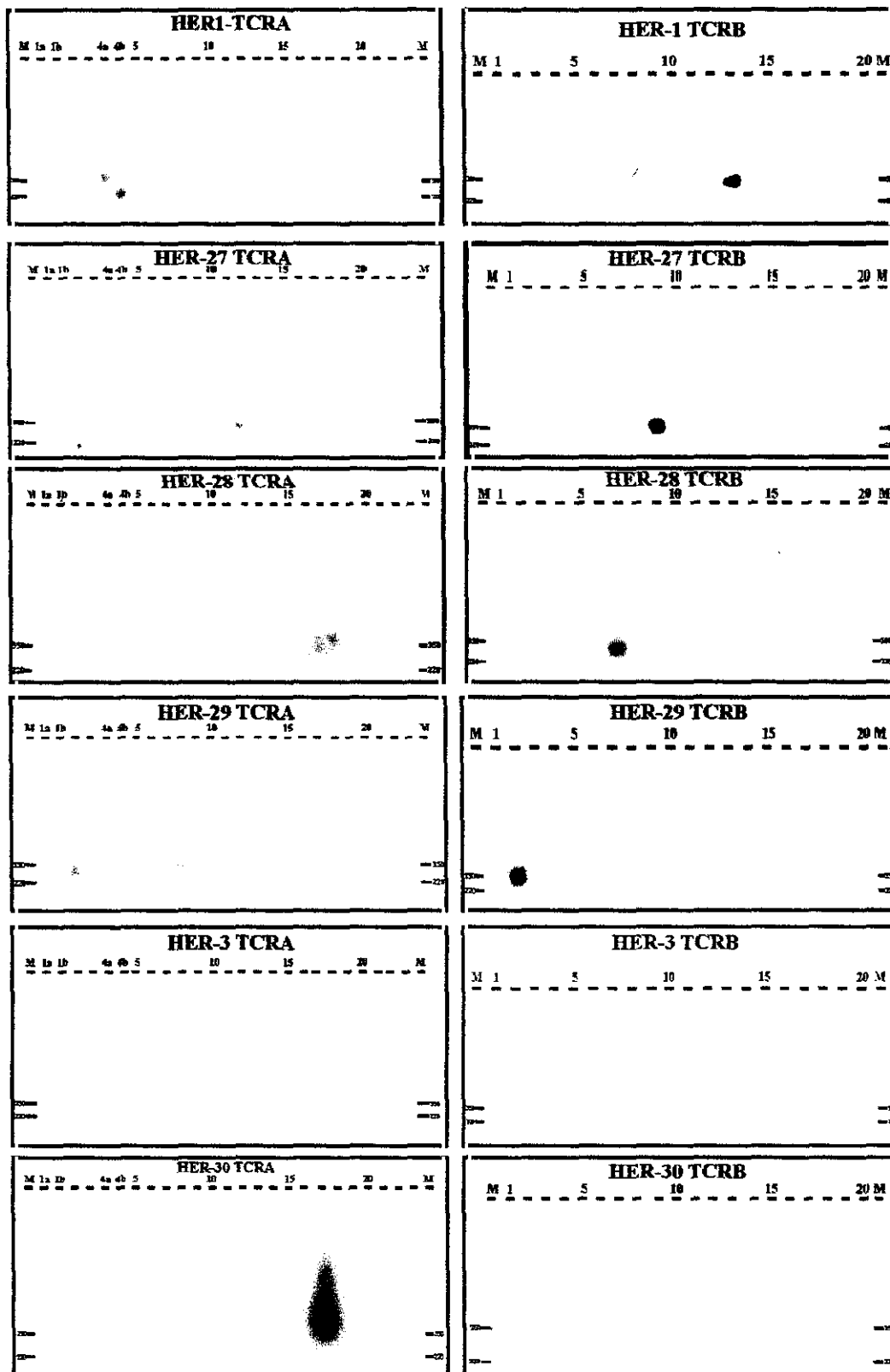


Figura 17: Southern blot de los productos amplificados tras someter el cDNA de los clones procedentes del paciente HER a las baterías de PCRs para TCRA y TCRB.

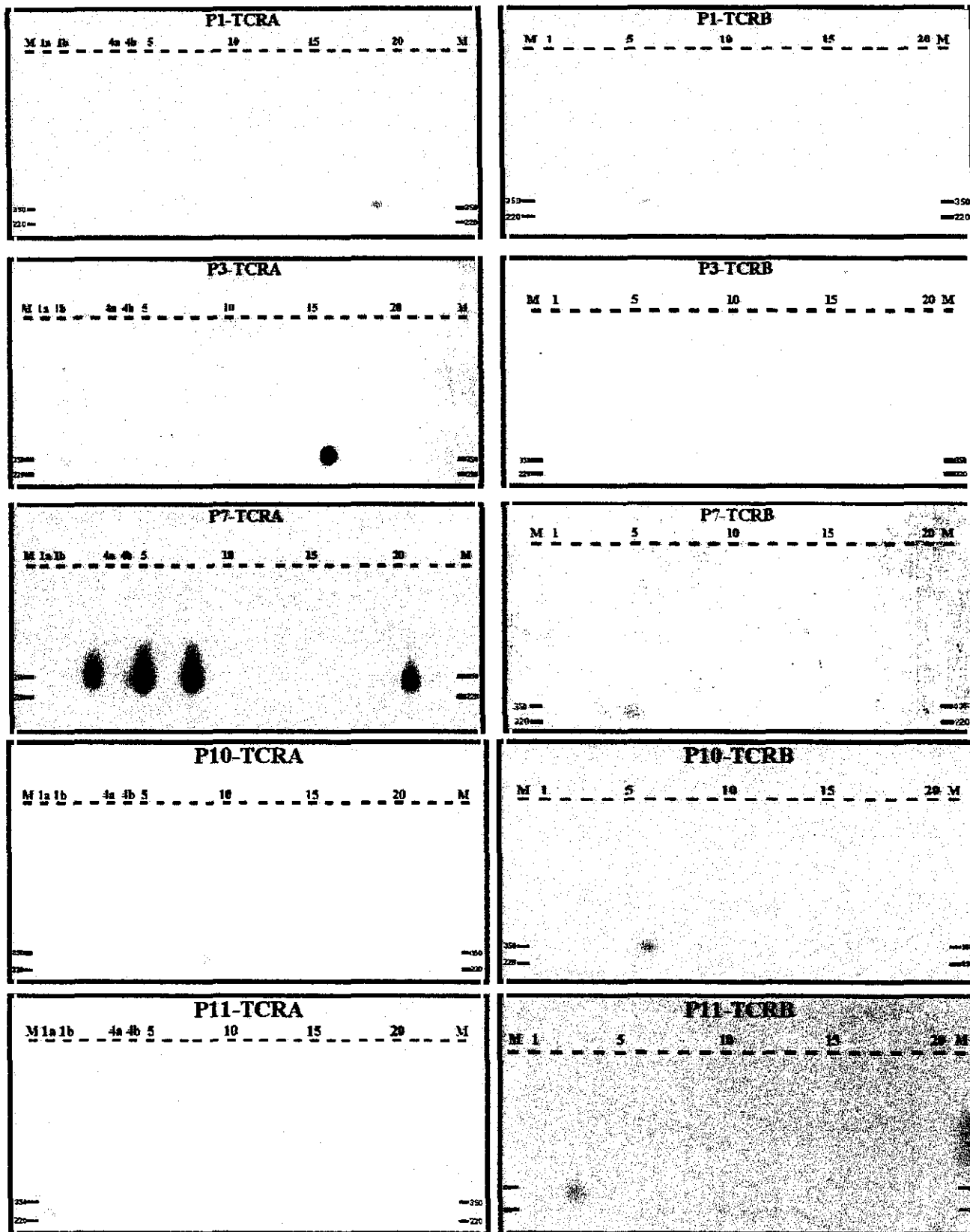


Figura 18: Southern blot de los productos amplificados tras someter el cDNA de los clones procedentes del paciente P a las baterías de PCRs para TCRA y TCRB.

Clon	CDR3 α			AV-AJ	CDR3 β			BV-BJ	Especificidad
	V	N	J		V	N	J		
HER-3	CAP	NDYK	LSFGAG	V7J20	CAVS	GGQGT	YEQYFGPG	V12J2S7	HLA-B27
HER-30	CA	GRGLTGGG	LIFGTG	V32J34	CAS	SPRTGL	NTEAFFGQG	V1J1S1	HLA-B27
HER-1		n.d.		V4	CAS	RRGQG	SYEQYFGPG	V13S2J2S7	HLA*DP0401
HER-28	CAAS	MS	AGNMLTFGGG	V17S1J39		n.d.		V7	HLA*DP0401
HER-27	CAL	RGT	YNTDKLIFGTG	V12S34	CASS	FRQGL	STDTQYFGRG	V9J2S3	HLA-DQ8
HER-29	CVVN	PPGY	KYIFGTG	V2J40	CSA	ARGQN	TDTQYFGPG	V2J2S3	HLA-DQ8
P1	CAV	VN	DMRFGAG	V19J43	CAS	RSDSL	TEAFFGPG	V6S7J1S1	HLA-DQ8
P3	CAVS	AGINAG	KSTGDG	V1S1J27	CASS	QDREL	YGYTFGSG	7J1S2	HLA-DQ8
	CAVS	YHNNN	DMRFGAG	V1S2J43					
P7	CA	TGNSGNT	PLVFGKG	V3S1J29	CASS	LVGAP	QYFGPG	V5J2S5	HLA-DQ8
P10	CAT	GSEGTYK	YIFGTG	V29J40	CASS	LTGGQD	FFGQG	V6S7J1S1	HLA-DQ8
P11		n.d.		V1	CA	SRPRDRG	NSPLHFGNG	V3J1S6	HLA*DP1301

Tabla 9: Reordenamientos V-J y secuencias de las regiones CDR3 de los clones aislados a partir de las muestras locales de enfermos afectados por EICH.

TCRAV17 correspondía a un alineamiento productivo (Tabla 9). El material correspondiente a TCRBV7 se intentó reamplificar y secuenciar repetidas veces, pero no se consiguió material adecuado para ello. El hecho de que no fueran posibles las reamplificaciones, aunque no permitió una afirmación rotunda, sugirió que el material que no pudo secuenciarse pertenecía a una de las subfamilias descritas posteriormente al diseño de los oligonucleótidos.

La amplificación del material procedente del clon HER-29 proporcionó productos amplificados con los oligonucleótidos para TCRAV2 y AV8 así como para TCRBV2 (Fig. 17). El material de TCRAV2 correspondía a un reordenamiento productivo, mientras que el TCRAV8 era improductivo (Tabla 9).

El RNA del clon HER-3 condujo a dos únicas amplificaciones: TCRAV7 y TCRBV12 (Fig. 17) que tras la secuenciación de sus productos indicaron que cada una correspondía a un reordenamiento productivo (Tabla 9). El análisis del material obtenido del clon HER-30 indicó amplificaciones en las subfamilias TCRAV3, AV5 y TCRAV17 y en la subfamilia TCRBV1 (Fig. 17). La secuenciación del material de TCRAV3 y TCRAV17 reveló que correspondían a un único reordenamiento productivo perteneciente a la subfamilia TCRAV32, mientras que la secuenciación del material TCRBV1 confirmó su pertenencia a dicha subfamilia (Tabla 9). El hecho de haber amplificado una subfamilia no incluida en el panel de oligonucleótidos indica que éste cubre mayor porcentaje de segmentos TCRV del inicialmente calculado, aunque la especificidad de cada oligonucleótido es menos elevada. Dado que el diseño del panel se realizó previamente a la descripción de todas las subfamilias TCRV es posible que algunos de los oligonucleótidos hibriden con zonas de las nuevas subfamilias coincidentes con las de subfamilias previamente descritas.

Los RNAs de los clones derivados del paciente P también se analizaron mediante retrotranscripción y PCR empleando los paneles de oligonucleótidos descritos como cebadores. El material correspondiente a P1 produjo una amplificación en TCRAV19 y una en TCRBV6 (Fig. 18). De manera análoga, también se produjeron amplificaciones únicas con las baterías de PCRs correspondientes a P10 (TCRAV9 y TCRBV6) y P11 (TCRAV1 y TCRB3) (Fig. 18). La secuenciación del material correspondiente a las amplificaciones confirmó la asignación a las subfamilias determinadas mediante el análisis por Southern blot, excepto para la amplificación TCRAV1 de P11, del que no se pudo obtener material válido para la secuenciación (Tabla 9). El análisis del material de P3 indica 3 amplificaciones (TCRAV1, TCRAV16 y TCRBV7). No fue posible la reamplificación de TCRAV16, mientras que la secuenciación de la banda TCRAV1 indicaba la existencia de dos secuencias diferentes. Como alternativa, el material de P3 amplificado se insertó en un vector de clonaje, se transformó en bacterias y se secuenciaron 15 de las colonias que introdujeron el inserto lo que reveló que P3 codificaba dos cadenas TCRA con reordenamiento productivo, ambas con segmentos TCRAV1 (Tabla 9). El RNA extraído del clon P7 condujo a la amplificación de las subfamilias TCRAV3, TCRAV5, TCRAV8 y TCRAV21 junto a la única amplificación de TCRBV5 (Fig. 18). La secuenciación de cada uno de los materiales confirmó que únicamente las bandas en TCRAV3 y en TCRBV5 correspondían a amplificaciones de reordenamientos productivos de TCR (Tabla 9), siendo el resto productos secundarios de la reacción de amplificación no relacionados con genes que codifican el TCR. Los clones P6 y P14 no se incluyeron en este estudio pues la sistemática contaminación de éstos con cepas bacterianas no permitió el aislamiento del material necesario.

A.4.- Motivos estructurales en los TCRs de los clones aislados a partir de las biopsias de piel de afectados por aEICH.

La comparación conjunta de las secuencias de los TCRs de los clones indicó una elevada heterogeneidad de uso de cada elemento generador de diversidad. Sin embargo, y dado que se obtuvieron varios clones con la misma especificidad HLA y que existen múltiples estudios que indican la existencia de motivos comunes entre los TCRs de células T alorreactivas de igual especificidad (Tabla 4), se consideró interesante la comparación de las frecuencias de uso de segmentos TCRAV, TCRAJ,TCRBV, TCRBJ y de aminoácidos en CDR3 en función de la especificidad HLA para detectar la existencia de elementos generadores de diversidad comunes entre los TCRs de los clones. La existencia de motivos en los TCRs de los clones en función de su especificidad HLA podría extrapolarse a otros pacientes con las mismas diferencias de MHC entre donante y receptor y podría servir como base para el diseño de aproximaciones terapéuticas que mediante la obtención de Ac específicos de dichos motivos permita la eliminación selectiva de las células T específicas de los alelos HLA discordantes.

El uso de los elementos generadores de diversidad en los TCRs de nuestros clones se comparó con las frecuencias de uso de dichos elementos descritas en estudios en los que se secuenciaron al menos 300 colonias que incluían insertos TCR procedentes de los PBLs de al menos 3 individuos sanos (27-30). Dado que estos estudios indican el uso de los elementos generadores de diversidad tras los fenómenos de reordenamiento preferente, los fenómenos de selección, etc., se puede asumir que si se detectan diferencias significativas de frecuencias de uso de estos elementos entre los TCRs de nuestros clones y los de los individuos sanos, deben ser consecuencia de su implicación en la respuesta alógena local. Excepto en aquellos casos en los que se indique lo contrario, los motivos destacados a continuación son aquellos que, tras la comparación, mostraron valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

Como ya hemos indicado, se supone que los linfocitos T alorreactivos reconocen péptidos endógenos asociados a moléculas del MHC (90). Dado que la posición del TCR sobre el Ag parece ser similar en todos los complejos TCR/Ag cristalografiados (49, 50, 203, 204), parece lógico pensar que las regiones CDR1 y CDR2, que interaccionan mayoritariamente con el HLA propio, también lo hagan con el HLA alógeno y que las CDR3, que contactan principalmente con el péptido, interaccionen con áreas similares del complejo alógeno, ya sean otros péptidos o áreas del HLA alógeno que mimetizan a éste. Los usos preferentes de TCRAV o TCRBV tendrían que deberse a la interacción con el HLA, mientras que los usos comunes en CDR3 y TCRJ deberían estar provocados por el reconocimiento de péptidos semejantes, que en parte están determinados por las características estructurales, en los alrededores de la hendidura, del HLA que los presenta. Así, la comparación de la frecuencia de aminoácidos en CDR3 de los TCRs de nuestros clones con los de PBLs de individuos sanos (30) podía aportar información acerca de la hidrofilia general de CDR3 mientras que la comparación de las CDR3 teniendo en cuenta la posición según los criterios definidos por Chothia y cols. (Cys-Ala-X₁-X₂-...-X_n para CDR3 α y Cys-Ala-Ser-Ser-X₁-X₂-...-X_n para CDR3 β) [93], informaría adicionalmente sobre la distribución de los aminoácidos sobre el péptido y las hélices α del HLA y por tanto sobre distribución espacial de la carga en dicha área.

A.4.1.- USO PREFERENTE Y MOTIVOS ESTRUCTURALES EN LOS TCRS DE LOS CLONES AISLADOS DEL PACIENTE HER.

Los 6 clones aislados a partir de la biopsia obtenida del paciente HER se agrupan en 3 pares en función del HLA contra el que responden. La comparación global de los TCRs, independientemente de la especificidad no revela ningún uso preferente de elementos de diversidad. Por otra parte, dado que únicamente se dispone de dos clones de cada especificidad, es difícil extraer reglas de uso de segmentos TCR y de aminoácidos en CDR3, e incluso en aquellos casos en los que se alcanza significación estadística, los datos deben ser considerados con precaución, pues la simple utilización de una cadena puede llevar a que el uso de dicho segmento aparezca como estadísticamente significativo.

Los clones HER-3 y HER-30, específicos de HLA-B27, empleaban respectivamente los segmentos TCRAV7 y TRCAV32, poco frecuentes en PBLs de individuos sanos (2.3% y 0.6%, respectivamente) (27), mientras que el uso de segmentos TCRBV (12 y 1) no se alejó de lo observado en controles (27), perteneciendo cada uno de los segmentos TCRV pertenece a un subgrupo de homología distinto (Tabla 1). Tampoco se observó uso preferente de segmentos TCRAJ o TCRBJ en comparación con los empleados por PBLs de individuos sanos (27, 28).

Los clones HER-27 y HER-29, HLA-DQ8 específicos, no mostraban ningún uso de segmentos TCRAV, TCRAJ y TCRBV estadísticamente significativo y cada segmento TCRV pertenecía a un grupo de homología distinto (Tabla 1). Podemos destacar que ambos clones empleaban el segmento TCRBJ2S3 mientras que su uso en PBLs de individuos sanos era del 7.4%. Ningún aminoácido es utilizado en CDR3 en una proporción lo suficientemente elevada como para alcanzar significación estadística.

Puesto que fue imposible determinar la secuencia de TCRA del clon HER-1 y la de TCRB del clon HER-28, ambos HLA*DP0401, no se pudo realizar un análisis de los usos de los segmentos generadores de diversidad en los TCRs de dichos clones. Incluso considerando correcta su asignación a las subfamilias mediante las baterías de PCRs, el análisis de frecuencia de uso de segmentos TCRAV y TCRBV de los clones HER-1 y HER-28 no reveló el empleo estadísticamente significativo de ningún segmento comparado con los obtenidos en estudios de repertorio en PBLs de individuos sanos.

A.4.2.- USO PREFERENTE Y MOTIVOS ESTRUCTURALES EN LOS TCRS DE LOS CLONES AISLADOS DEL PACIENTE P.

A diferencia de los clones obtenidos del enfermo HER, la mayoría de los clones del paciente P son específicos de un único alelo HLA: 5 clones eran específicos de HLA-DQ8, mientras que uno, P11, era específico de HLA*DP1301 y otro, P14 de HLA*DR0402. La búsqueda de motivos estructurales y generadores de diversidad se centró por ello en los clones HLA-DQ8 específicos.

Los clones P1, P3, P7 y P10, específicos de HLA-DQ8 empleaban segmentos TCRAV pertenecientes a los subgrupos de homología 2 (P1, P7 y P10) y 4 (ambas cadenas de P3) (Tabla 1). No se detectaron sesgos en el uso de segmentos TCRAJ, TCRBV o TCRBJ respecto a individuos sanos. El análisis de la frecuencia de uso de aminoácidos en CDR3 no revela incrementos estadísticamente significativos con respecto al las encontradas en PBLs de individuos sanos. Aún cuando no alcancen significación estadística, cabe destacar que 4 de las 5 regiones CDR3 α (80%) contienen Asn y que 3 de las 4 regiones CDR3 β (75%) contienen

Asp.

A.4.3.- USO PREFERENTE Y MOTIVOS ESTRUCTURALES EN LOS TCRS DE LOS CLONES ESPECÍFICOS DE HLA-DQ8.

Dado la escasa información obtenida del análisis por separado de los TCRs de ambos individuos, se decidió estudiar los TCRs de los clones T con la misma especificidad, independientemente del enfermo del que se aislaron. Así, se estudiaron conjuntamente HER-27, HER-29, P1, P3, P7 y P10. De esta manera hallamos que la frecuencia de uso de segmentos TCRAV de los grupos de homología 2 y 4 detectada en los clones HLA-DQ8 específicos aislados de P se atenuaba. No destacaba tampoco el uso preferente de segmentos TCRAJ, TCRBV ni TCRBJ respecto a los datos obtenidos a partir de sangre periférica de individuos sanos (27, 28, 30). Sin embargo, seguía destacando la utilización de Asn en 4 de las 7 CDR3 α , aún cuando no se observó un patrón relacionado con la posición relativa dentro de esta región. Asimismo, cobró importancia el uso de Thr en 4 de CDR3 α , aunque tampoco llegó a alcanzar significación estadística. Respecto a los aminoácidos de CDR3 β , se observa que 4 de los clones presenta Gln (el 12.5% de los aminoácidos en la región N+D eran Gln, mientras que en PBLs de individuos sanos no superaba el 3.7%) y que otro clon la contenía como primer aminoácido del segmento TCRBJ. Por otra parte, 3 de los 4 clones derivados del enfermo P también presentaban Asp en su CDR3 β . Este uso no es estadísticamente significativo, pero es destacable que HER-27 y HER-29, cuyas regiones N+D no contienen Asp, emplean segmentos TCRBJ que lo incluyen en una posición casi inmediatamente adyacente.

Así pues, podemos concluir que el análisis de usos de elementos generadores de diversidad entre los clones con igual especificidad HLA, incluso cuando procedían de diferentes enfermos, revela la existencia de varios motivos, aunque no lo suficientemente marcados para que adquieran significación estadística al compararlos con los usos en individuos sanos.

Únicamente se ha documentado un estudio en el cual se consiguieron aislar 5 clones específicos de HLA-DQ8 y determinar la secuencia de sus TCRs (205) (Tabla 10). Estos clones, aislados a partir de PBLs de 3 individuos sanos tras generar una alorrespuesta *in vitro* emplean mayoritariamente (80%) segmentos TCRBV cuyas CDR1 contienen el motivo Ile-Ser-Gly-His. Este motivo aparecía también en el 50% de los clones HLA-DQ8 específicos aislados en nuestro estudio. Por otra parte, el 100% de los clones aislados de PBLs utilizaban segmentos TCRBJ2S3 o TCRBJ2S5 (205). Análogamente, el 50% de los clones HLA-DQ8 específicos presentados en nuestra investigación empleaban uno de estos segmentos. Nuestros clones presentaban además motivos propios no detectados en los clones alorreactivos aislados de individuos sanos: el 20% de los aminoácidos empleados en las regiones CDR3 α de nuestros clones eran Asn, que no se expresaba en los clones aislados de sujetos sanos descritos, lo que indica que existían peculiaridades propias de los TCRs de nuestros clones. El uso de Gln (12.5%) y Asp (9.4%) en CDR3 β de nuestros clones era superior al de los clones específicos de HLA-DQ8 descritos en el estudio con PBLs de controles en los que el uso de estos aminoácidos era, respectivamente, 3.3% y 0%, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística. Las diferencias entre ambos grupos de clones parecían indicar que existían características propias de los TCRs de los clones aislados de las lesiones de EICH que principalmente se localizaban en CDR3. Dado que no podían existir diferencias en lo que respecta al HLA y que el reconocimiento de complejos antígenicos alogénicos no implica

Clon	TCRA				TCRB			
	V	N	J	AV-AJ	V	N+D	J	BV-BJ
BL22	CA	VT	LTG	V2S1J15	CASS	QVAGLEYP	STDTQYFG	V7S1J2S3
	CW	RGYS	G	V4S1JW				
BL25	CA	TDGE	TSGSRLTFG	V3S1J03	CASS	LTSRPWY	QETQYFG	V5S1J2S5
BL33	CA	ASLEY	GNKLVFG	V21S1J09	CASS	SGGY	TDTQYFG	V8S2J2S3
ØB44	CL	VGRSY	NTDKLIFG	V20S1JI	CASS	LVTGRA	DTQYFG	V6S7J2S3
BF37	CA	PW	LTFG	V19J03	CASS	LVVHA	ETQYFG	V5S3J2S5

Tabla 10: Reordenamientos V-J y secuencias de las regiones N/N+D de los clones específicos de HLA-DQ8 aislados de PBLs de 3 individuos sanos (205).

únicamente la interacción con el HLA, sino también con los péptidos presentados, determinados por éste, y dado que los análisis cristalográficos de los complejos TCR/péptido/HLA indican que CDR3 α y CDR3 β se sitúan mayoritariamente sobre el péptido, los motivos en estas regiones reflejaban características comunes entre los complejos antigénicos alogénicos.

B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.

El estudio de las espondiloartropatías pretendía, en primer lugar, definir una aproximación experimental que permitiera obtener información sobre las células T específicamente infiltradas en los tejidos afectados sin necesidad de exponerlas a los supuestos Ags responsables de la patología que, para la mayoría de las enfermedades del grupo, aún no han podido ser definidos.

Dado el carácter local de estas enfermedades, que se circunscriben únicamente a las articulaciones, se hizo la suposición razonable de que las expansiones oligoclonales que se detectaran únicamente en las muestras extraídas de las articulaciones afectadas debían reflejar una proliferación de las células T implicadas en una respuesta inmunológica local, probablemente relacionada con la enfermedad.

Por tanto, una vez determinadas dichas expansiones, se intentó comprobar si las células que portaban dichos TCRs tenían capacidad de respuesta contra células propias y, por tanto, podían estar implicadas en una respuesta autoinmune. Para ello y dada la imposibilidad de clonaje de las células T en ausencia de su antígeno, las células T se immortalizaron tras lo cual se comprobó su capacidad proliferativa al ser cultivadas junto a células propias.

B.1.- Tipaje espectral de las muestras recolectadas de la paciente MTSM.

Los primeros estadios del estudio suponían el análisis por tipaje espectral de las muestras derivadas de un enfermo crónico. El estudio en este tipo de enfermo presentaba la clara ventaja de que si, como habíamos supuesto, existían expansiones específicas de los tejidos afectados presumiblemente relacionadas con la respuesta local, la proliferación de las células T tras el inicio de la enfermedad sería mayor en un individuo con la enfermedad cronicada y, por tanto, la oligoclonalidad de las células implicadas debería ser más acusada y, consecuentemente, sería más fácilmente detectable. Incluso la ausencia de expansiones oligoclonales podía aportar información sobre la implicación de las células T en la patología: se podría deducir que la presencia de las células T se debía a una infiltración provocada por la presencia de citoquinas inflamatorias, pero sin existir una proliferación específica en el tejido inflamado, o que sí existía una proliferación en la articulación provocada por un SAg y que por tanto era de carácter policlonal.

Hasta el momento, varios grupos de investigación han logrado aislar clones de células T con distintas especificidades a partir de muestras locales de afectados por espondiloartropatías, indicando la posible participación de gran variedad de péptidos homólogos de proteínas propias (170, 171, 173). No parece muy plausible la existencia de tal variedad de péptidos artritogénicos en el inicio de la enfermedad. Dado que estos estudios no han tenido en cuenta el matiz temporal en la toma de muestras, podría considerarse que la falta de homogeneidad de resultados puede deberse a que las muestras en cada estudio se han tomado en distintas fases de la enfermedad. Para comprobar esta suposición, el estudio que realizamos en el enfermo crónico se realizó tomando dos muestras en un intervalo de 6 meses para comprobar si las expansiones variaban con el tiempo o se mantenían constantes. Si existía una variación en el tiempo de las expansiones oligoclonales, indicaría que células T que inicialmente no estaban implicadas en una respuesta local habían comenzado a participar en ésta. Esto informaría sobre la existencia fenómenos de perpetuación de la respuesta

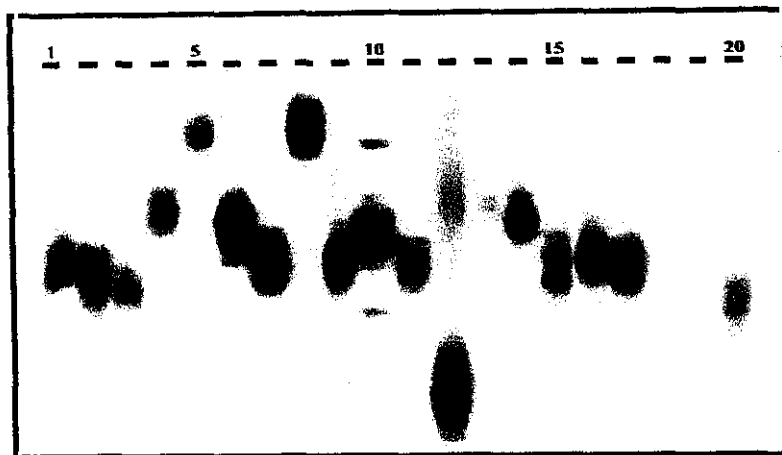
relacionada con la extensión de ésta contra nuevos Ags y confirmaría la necesidad de realizar los estudios sobre muestras obtenidas durante los primeros estadios de la enfermedad, de forma que se minimizaran los fenómenos de perpetuación. Si, por el contrario, las expansiones se mantuvieron constantes respecto al tiempo, el estudio podría realizarse sobre cualquier paciente independientemente del momento de desarrollo de la patología e indicarían que la existencia de células con gran multitud de especificidades en las articulaciones afectadas debe achacarse a otros motivos. Independientemente de cual de ambos resultados se obtuviera, éstos podían servirnos como sistema de referencia en estudios del mismo tipo realizados sobre muestras aisladas de individuos que sufrieran los primeros episodios de la patología.

MTSM era una enferma crónica con un largo historial de episodios artríticos que, en el momento de la toma de muestras, presentaba inflamación articular. El análisis por tipaje espectral de las distintas muestras aisladas de la paciente MTSM indicó que, en la primera extracción de líquido sinovial (MTSM(1)SFR), existía un elevado número de expansiones oligoclonales, según la definición de Gregersen y cols., que supone la existencia de expansiones oligoclonales cuando un único tamaño supone el 50% o más de todos los tamaños detectados mediante PCRs específicas para cada subfamilia TCRBV (184) y los tamaños adyacentes no suponen conjuntamente más del 30% del tamaño mayoritario (201). La determinación de la intensidad de cada tamaño mediante densitometría permitió detectar expansiones en las subfamilias TCRBV1, V2, V6, V11, V12, V15, V16, V17 y V18. Dichas expansiones no eran evidentes en la muestra de sangre periférica obtenida simultáneamente, MTSM(1)PBL (Fig. 19), como se confirmó por densitometría. Sin embargo, la expansión en la subfamilia TCRBV6 se detectó en la segunda extracción de sangre periférica, MTSM(2)PBL, junto a una expansión en la subfamilia TCRBV14 que no aparecía en MTSM(1)SFR (Fig. 19). A pesar de realizar varios intentos de amplificación de las subfamilias V19 y V20, no se logró material de las subfamilias V19 y V20 en la muestra MTSM(1)SFR.

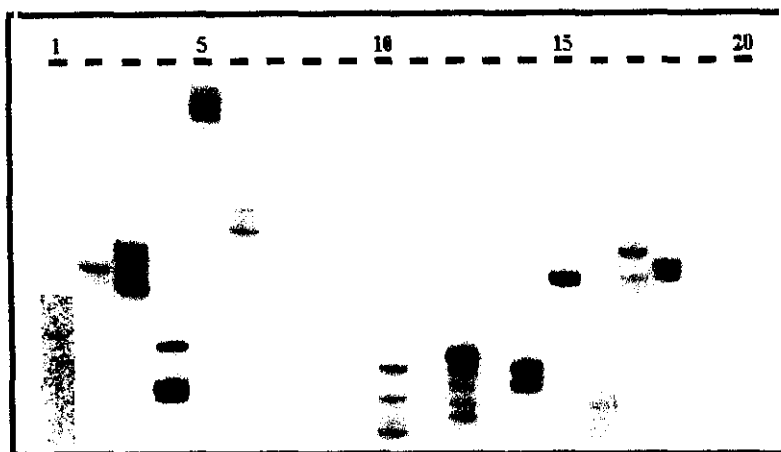
La comparación de las expansiones oligoclonales de la 2ª extracción de SF de la misma articulación, MTSM(2)SFR, reveló que algunas de las expansiones observadas en MTSM(1)SFR, TCRBV1, V2, V11 y V18, no se detectaban. Por contra se detectaron nuevas expansiones en las subfamilias TCRBV3, V4, V7, V10 y V14 (Fig. 20), conservándose respecto a MTSM(1)SFR las expansiones en las subfamilias TCRBV6, V9 y V16 (Fig. 20). La muestra aislada de la otra rodilla, MTSM(2)SFL, reveló expansiones en la mayoría de las subfamilias, incluyendo todas las que se observaban en la muestra MTSM(2)SFR más TCRBV11 y V17, también detectadas en MTSM(1)SFR, así como expansiones no detectadas en ninguna de las muestras anteriores en las subfamilias TCRBV9 y V10 (Fig. 19 y 20).

Todas las expansiones detectadas en la rodilla izquierda de MTSM se observaron o bien en la primera muestra de la rodilla derecha, MTSM(1)SFR, o bien en la segunda, MTSM(2)SFR. Dado que se ha comprobado que la respuesta contra un Ag puede ser responsable de la aparición de expansiones oligoclonales, como ha demostrado por el estudio de las células que responden in vivo a infecciones gripales (206) o por el estudio por tipaje espectral de los PBLs de un control antes y después de una vacunación (207), se supuso que cada expansión igual en ambas articulaciones podían corresponder a la respuesta contra un mismo Ag o a varios Ags homólogos presentes en ambas localizaciones. Así pues, las expansiones en MTSM(2)SFL parecían indicar que en dicha articulación se respondía a Ags que estaban presentes en MTSM(1)SFR así como a otros localizados en MTSM(2)SFR.

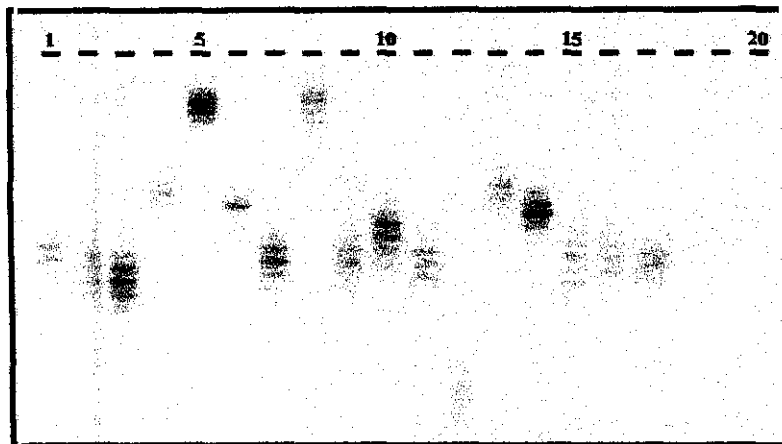
Podemos concluir que la existencia de expansiones oligoclonales específicas de SF indica que existió una respuesta contra complejos antigénicos localizados en las articulaciones afectadas. El elevado número de expansiones en todas las muestras, así como la variación en el



MTSM(1)PBL

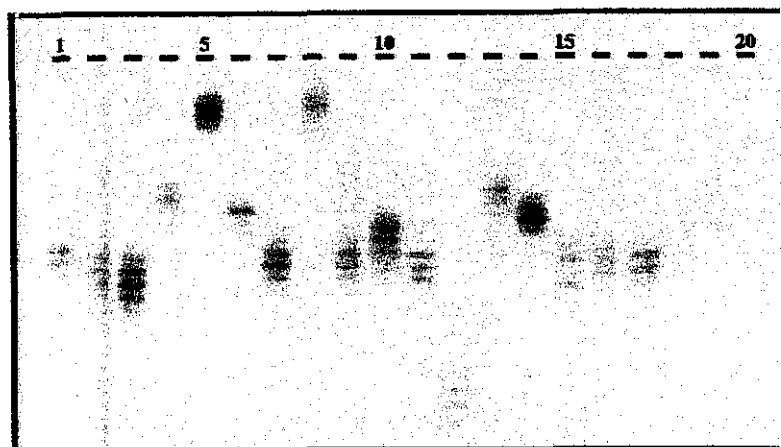


MTSM(1)SFR

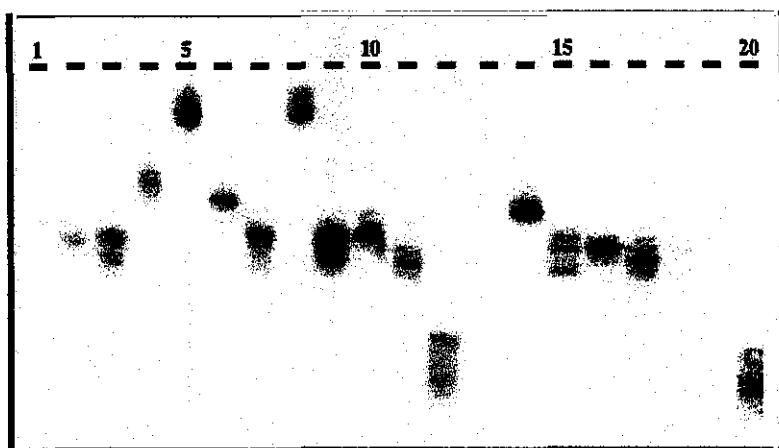


MTSM(2)PBL

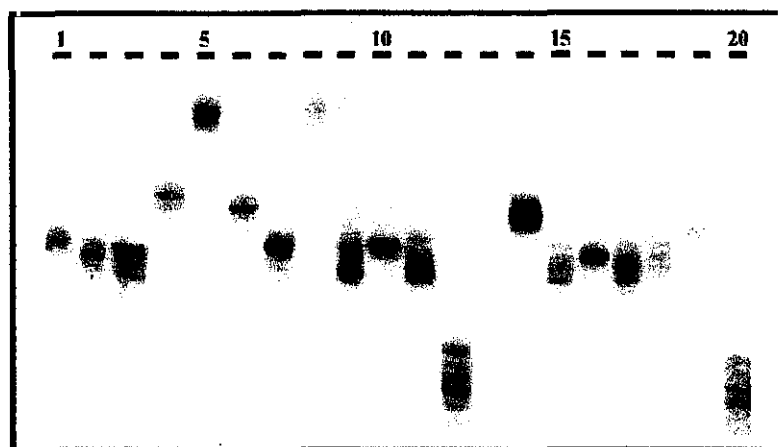
Figura 19: Tipaje espectral de la primera muestra de SF extraída de MTSM comparado con los tipajes espectrales de dos extracciones de PBLs. La detección de determinadas subfamilias necesitó incrementar el tiempo de exposición de las autorradiografías o, incluso sustituir los oligonucleótidos TCRBVnE por otros más internos, detallados en la Tabla 8B. Dichas exposiciones se presentan compuestas en cada una de las autorradiografías.



MTSM(2)PBL



MTSM(2)SFR



MTSM(2)SFL

Figura 20: Tipaje espectral de las muestras de SF extraídas de MTSM obtenidas 6 meses después que la primera comparado con el de la muestra de PBLs obtenida simultáneamente. La detección de determinadas subfamilias necesitó incrementar el tiempo de exposición de las autorradiografías o, incluso sustituir los oligonucleótidos TCRBVnE por otros más internos, detallados en la Tabla 8B. Dichas exposiciones se presentan compuestas en cada una de las autorradiografías.

tiempo de éstas, confirma las suposiciones hechas de forma general sobre la perpetuación de la respuesta mediante la extensión a nuevos Ags de las respuestas autoinmunes.

A la vista de los resultados anteriores, no era de extrañar que en los estudios en los ue no se consideró el momento de toma de las muestras se pudieran aislar clones con las más variadas especificidades a partir de SF de enfermos (170, 171, 173). Por tanto se hizo evidente la necesidad de realizar los estudios en individuos en las primeras fases de la enfermedad, en las que los fenómenos de expansión a nuevos antígenos fueran mínimos. Esto debería permitir identificar las expansiones correspondientes a las células T que hubieran proliferado durante las primeras fases de la enfermedad y que, probablemente, eran las responsables del desarrollo de ésta. El estudio de la enfermedad en sus primeros estadios eliminaría, además, la variable debida al tratamiento con AINE, cuya interacción con las células T no ha sido evaluada en términos de modificación del repertorio de TCRs.

B.2.- Tipaje espectral de las muestras recolectadas del paciente DMG.

DMG era un paciente que se presentaba por primera vez en consulta con síntomas que hacían sospechar que sufría una espondiloartropatía. Durante el episodio inflamatorio se tomaron muestras de PBLs y SF del enfermo y muestras de PBLs durante los meses siguientes al citado episodio. Los sucesivos reconocimientos y análisis confirmaron la primera impresión y condujeron al diagnóstico de espondiloartropatía no diferenciada.

En este punto del estudio se decidió estudiar separadamente las subpoblaciones CD8⁺ y CD4⁺, como aproximación que permitiera determinar la importancia de cada una de ellas en el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, era previsible que el estudio diferencial de ambas subpoblaciones simplificaría el patrón de expansiones, lo que facilitaría la interpretación de los resultados.

B.2.1.- SEPARACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LAS MUESTRAS PROCEDENTES DEL PACIENTE DMG.

Los enfermos afectados por espondiloartropatías presentan un porcentaje elevado de células T CD8⁺ infiltradas en las articulaciones en comparación con los hallados en afectados por otras enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide (143, 151). Esto ha sugerido que las células T que presentan dicho fenotipo están relacionadas con el desarrollo de las patologías. A pesar de ello, estudios realizados en modelos animales indican que las responsables de la enfermedad pueden ser células T CD4⁺ (161, 208). Por otra parte, la obtención de clones de células T mediante el cultivo de PBLs o SF de enfermos junto a APCs incubadas con diferentes bacterias o péptidos han conducido al aislamiento de células T pertenecientes a ambas subpoblaciones (168, 170-176).

Por tanto, dada la necesidad de definir separadamente la posible implicación de ambas subpoblaciones en los primeros estadios de la enfermedad, previamente a cualquier manipulación, se separaron las muestras obtenidas del paciente DMG en función de su expresión de los Ags CD4 y CD8 mediante el empleo de bolas magnéticas acopladas a Ac específicos. La contaminación de una subpoblación por células de la otra no superó en ningún caso el 5% y, en su mayoría, fue inferior al 1% (Fig. 21).

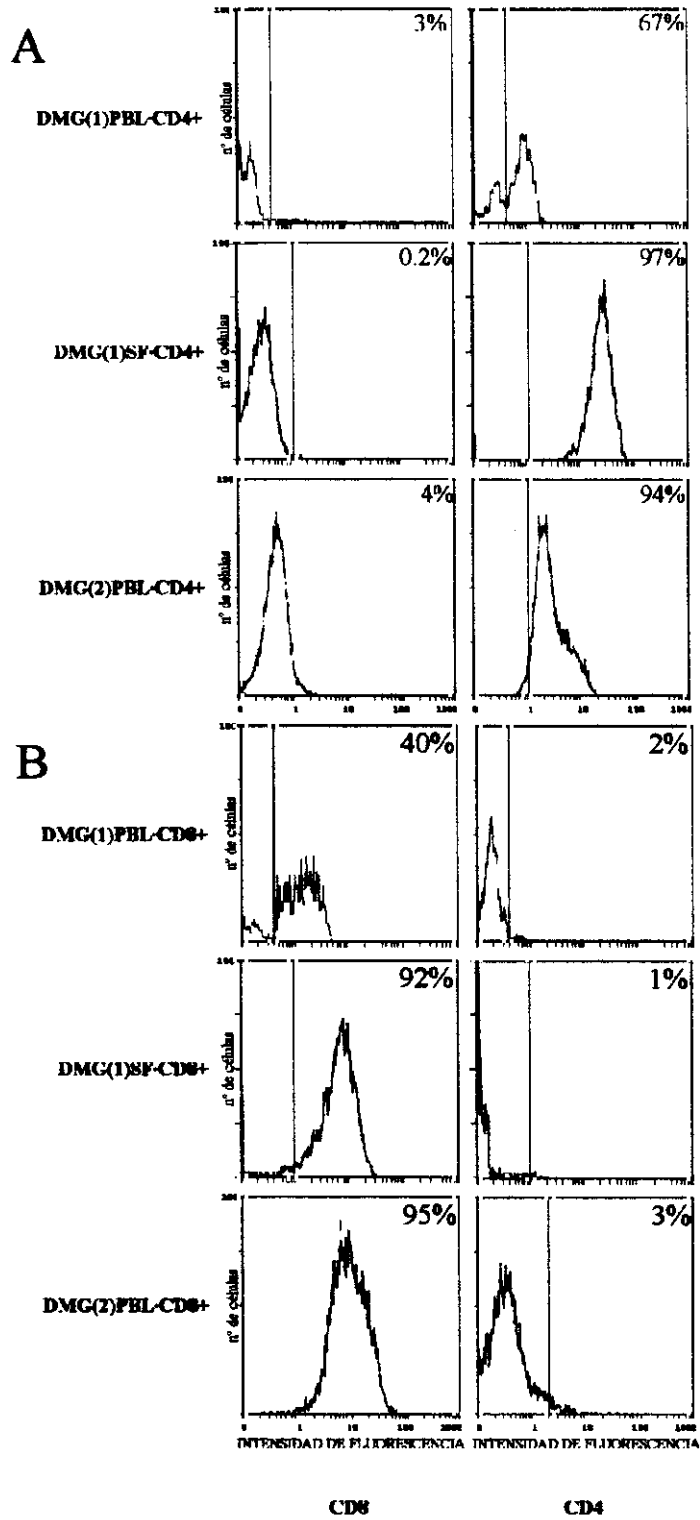


Figura 21: Histogramas de citometría de flujo de las subpoblaciones obtenidas tras separación mediante bolas magnéticas de las muestras aisladas de DMG. A: subpoblación CD4+. B: subpoblación CD8+.

B.2.2.- ANÁLISIS POR TIPAJE ESPECTRAL DE LAS SUBPOBLACIONES CD4⁺ DEL PACIENTE DMG.

Como acabamos de indicar, actualmente existe controversia sobre la participación de las células T CD4⁺ en la patogenia de las espondiloartropatías. Dado que, teóricamente, la participación en la respuesta local responsable de la patología debería reflejarse como una proliferación de éstas, el análisis por tipaje espectral comparativo de las muestras CD4⁺ de SF *versus* PBLs podría facilitar información relativa a su posible participación en los eventos relacionados con el fenómeno inflamatorio local. El densitometrado de las distintas bandas obtenidas tras el tipaje espectral reveló expansiones en DMG(1)PBL·CD4⁺ (TCRBV1 y V11), y en DMG(2)PBL·CD4⁺ (TCRBV6 y V11), pero no en DMG(1)SF·CD4⁺ (Fig. 22).

Podría especularse que las expansiones en DMG(1)PBL·CD4⁺ se deben a una respuesta en la periferia contra el péptido artritogénico y que, más adelante, las células activadas se infiltrarán en las articulaciones y se expandirán en ellas. Esta interpretación no parece correcta, puesto que los síntomas que presentaba el enfermo indicaban que en ese momento se estaba produciendo una respuesta autoinmune local y que, por tanto, las células responsables de ésta estaban infiltradas en el tejido dañado. Por tanto, la explicación más plausible a la ausencia de expansiones en la subpoblación CD4⁺ sería que no estaban directamente implicadas en el inicio de la enfermedad, aunque no podemos descartar una participación en los subsiguientes fenómenos de perpetuación de la respuesta. Por otra parte, el hecho de que la segunda extracción de PBLs indicara la aparición de una nueva expansión oligoclonal (TCRBV6) y la desaparición de una existente en la primera extracción (TCRBV1) sugería la variabilidad del repertorio respecto al tiempo y, aunque no podía relacionarse directamente con la enfermedad por aparecer en PBLs, sí apoyaba los resultados obtenidos anteriormente del enfermo crónico MTSM.

B.2.3.- ANÁLISIS POR TIPAJE ESPECTRAL DE LAS SUBPOBLACIONES CD8⁺ DEL PACIENTE DMG.

El tipaje espectral comparativo de las muestras CD8⁺ de SF y PBLs podría aportar información sobre la participación de esta subpoblación en los eventos iniciales de la respuesta y en el posterior desarrollo de la espondiloartropatía. El análisis mostró expansiones en DMG(1)PBL·CD8⁺ (TCRBV2, V4, V10, V11, V14 y V19), en DMG(1)SF·CD8⁺ (TCRBV2, V4, V11, V12, V15, V17, V19 y V20) y en DMG(2)PBL·CD8⁺ (TCRBV2, V6, V7, V9, V10, V11 y V19) (Fig. 23). Se detectaron expansiones exclusivas de PBLs (V10, V11 y V14 en DMG(1)PBL·CD8⁺ y V6, V7, V9 y V10 en DMG(2)PL·CD8⁺) que, como ya hemos explicado, podrían considerarse consecuencia de una respuesta inmunológica no relacionada con la enfermedad. Hay que destacar que varias de las expansiones detectadas en DMG(1)PBL·CD8⁺ aparecían también en DMG(2)PBL·CD8⁺, lo que sugirió que existía una cierta conservación del repertorio en periferia, aún cuando las diferencias entre éstas indicaban la variabilidad del repertorio en el enfermo. También se encontraron expansiones simultáneas en SF y PBLs como V2, V4 y V11 y V19. Incluso suponiendo que cada expansión en ambas localizaciones correspondía a la proliferación de un único clon, no fue posible diferenciar si era consecuencia de una proliferación en periferia y una infiltración de las células activadas en el tejido, facilitada por la presencia de citoquinas inflamatorias o si, tras la respuesta en la

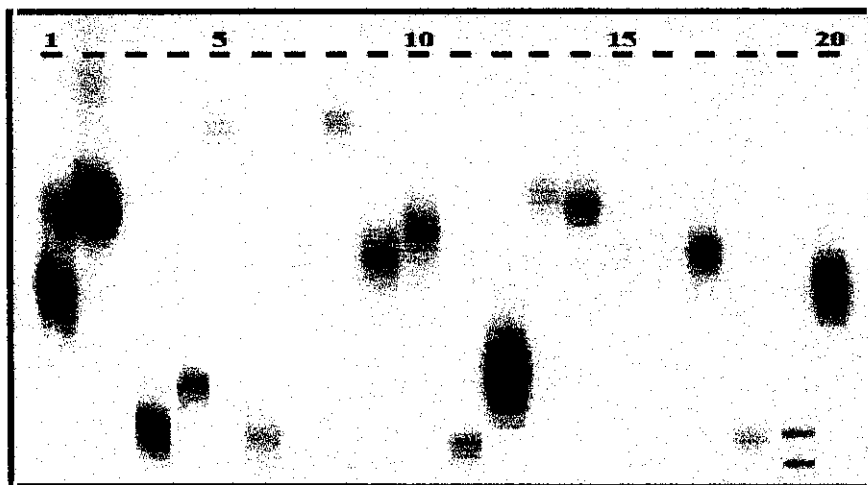
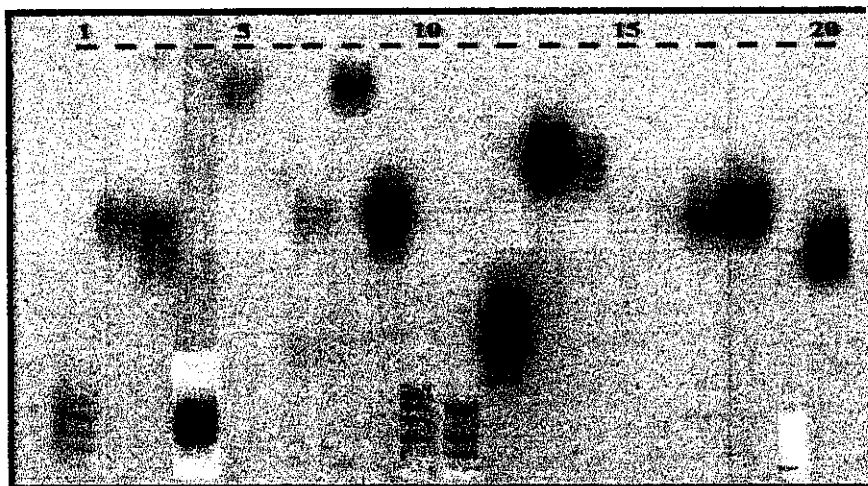
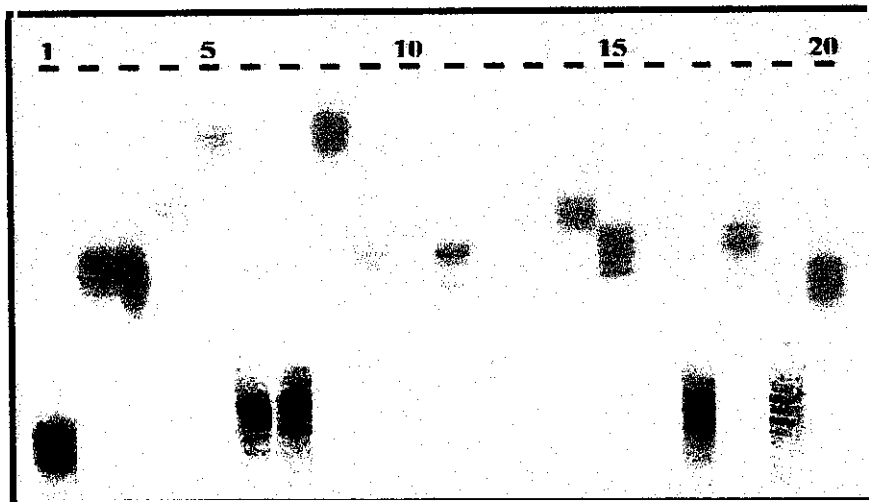


Figura 22: Tipaje espectral de las subpoblaciones CD4+ procedentes de las muestras aisladas de DMG. Determinadas subfamilias necesitaron incrementar su tiempo de exposición. Dichas exposiciones se presentan compuestas en cada una de las autorradiografías.

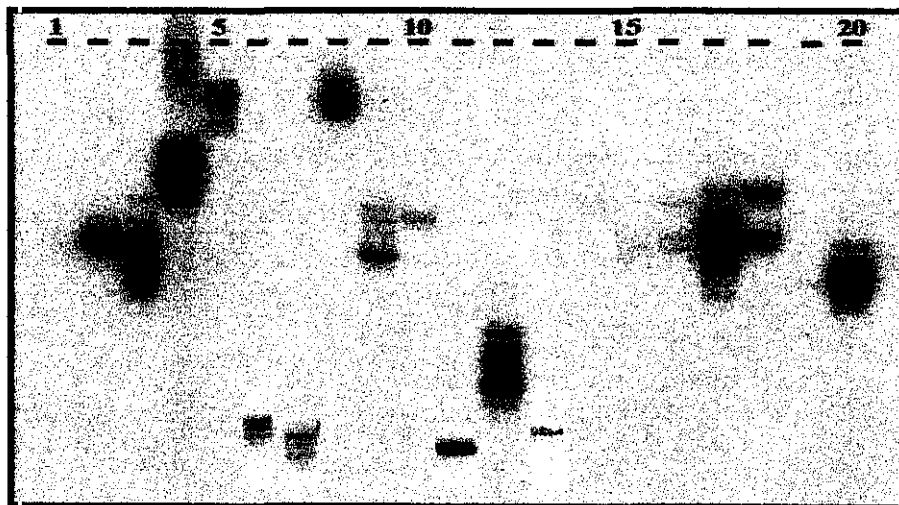
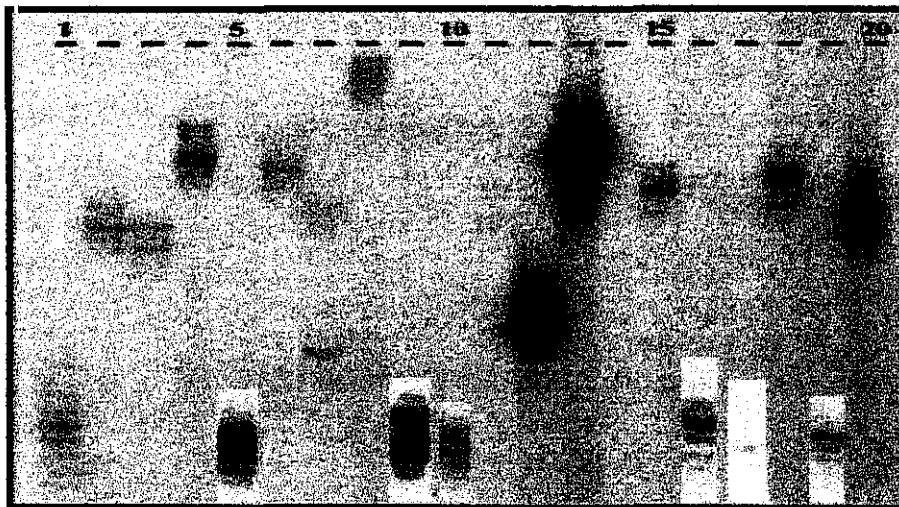
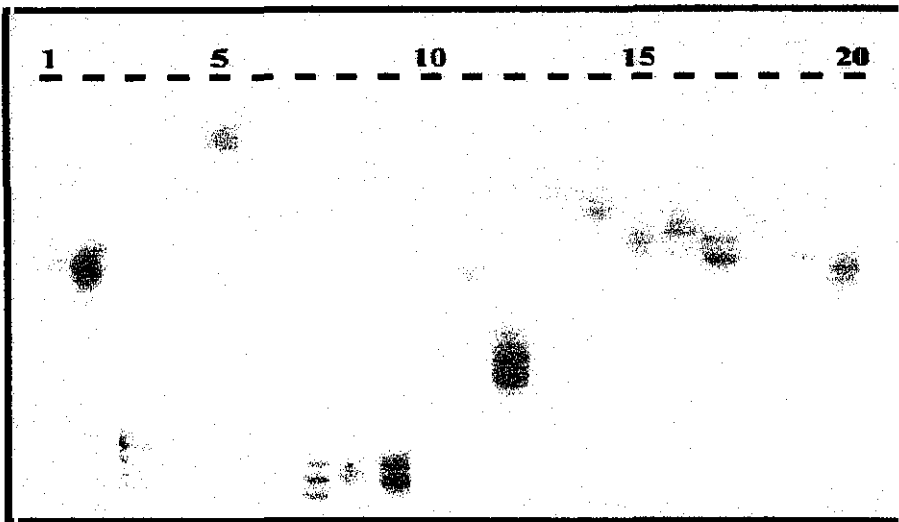


Figura 23: Tipaje espectral de las subpoblaciones CD8+ procedentes de las muestras aisladas de DMG. Determinadas subfamilias necesitaron incrementar su tiempo de exposición. Dichas exposiciones se presentan compuestas en cada una de las autorradiografías.

periferia, las células infiltradas participaron en la respuesta contra Ags relacionados con la enfermedad. Ambos fenómenos eran, en principio, indistinguibles. El hecho de que ninguna de las expansiones detectadas en DMG(1)SF·CD8⁺ y no en DMG(1)PBL·CD8⁺ apareciera en DMG(2)PBL·CD8⁺ parecía implicar que, al menos durante los primeros meses de la enfermedad y probablemente por influencia de la medicación, las células T específicamente expandidas en el SF no eran mayoritarias en la circulación periférica, sino que prácticamente se circunscribían al tejido inflamado. Nuestro estudio se centró en las expansiones exclusivas de SF: V12, V15, V17 y V20 (Fig. 24), que deben aparecer como consecuencia de la respuesta desarrollada en la articulación afectada contra Ags localizados exclusivamente en ella.

La existencia de expansiones exclusivamente en SF en la subpoblación CD8⁺ pero no en la CD4⁺ sugirió una participación directa de las células T CD8⁺ en la patogenia de la espondiloartropatía desarrollada por DMG, mientras que no parece existir una participación de las células T CD4⁺ en los primeros estadios de la enfermedad.

B.3.- Análisis de las secuencias de cadenas β expandidas en DMG(1)SF·CD8⁺.

Para confirmar la oligoclonalidad de las subfamilias con bandas expandidas en la muestra DMG(1)SF·CD8⁺, el material de las PCRs correspondientes a cada subfamilia con expansión oligoclonal se ligó en vectores que se introdujeron en bacterias mediante choque térmico. Se secuenciaron entre 10 y 12 colonias de cada subfamilia, que se estimaron suficientes para confirmar los datos de oligoclonalidad obtenidos a través del análisis por tipaje espectral. De esta manera, obtuvimos 12 secuencias TCRBV12⁺, de las cuales 7, el 58.3%, presentaban un único tamaño de CDR3 y por tanto correspondían a una única banda en el tipaje espectral. Este tamaño mayoritario correspondía realmente a 5 secuencias distintas, pero ninguna secuencia individual suponía el 50% o más de las secuencias totales (Tabla 11), por lo que la oligoclonalidad detectada no puede considerarse real. Del mismo modo, la secuenciación de 10 colonias TCRBV15⁺ mostró que 8 de ellas (80%) correspondían a un único tamaño de CDR3 aunque, análogamente a TCRBV12, ninguna de las 4 secuencias individuales de este tamaño daba cuenta del 50% o más de las secuencias obtenidas (Tabla 12), al igual que los 5 transcritos del mismo tamaño dentro de los 10 TCRBV20⁺ secuenciados (50%) (Tabla 13). Sin embargo, de las 11 colonias con insertos TCRBV17⁺ secuenciadas, 10 tenían el mismo tamaño (91%), correspondiendo 7 (64%) a una única secuencia (Tabla 14). Hay que señalar que los porcentajes de transcritos de cada tamaño obtenidos por secuenciación se alejaban en mayor o menor medida de los obtenidos mediante tipaje espectral porque, obviamente, el número de secuencias necesario para que los resultados fueran similares habría supuesto la secuenciación de un número de transcritos muy superior para cada subfamilia.

De este análisis cabe destacar que las subfamilias TCRBV12, V15 y V17 pertenecían al subgrupo de homología 4, definido por Chothia y col (12), mientras que TCRBV20 pertenecía al subgrupo 5. Dado que esta clasificación se basa en la homología de los aminoácidos en las CDR1 y CDR2, que interactúan mayoritariamente con residuos del HLA, pero también con aminoácidos del péptido, podemos suponer que existía una cierta homología entre los complejos antigénicos reconocidos.

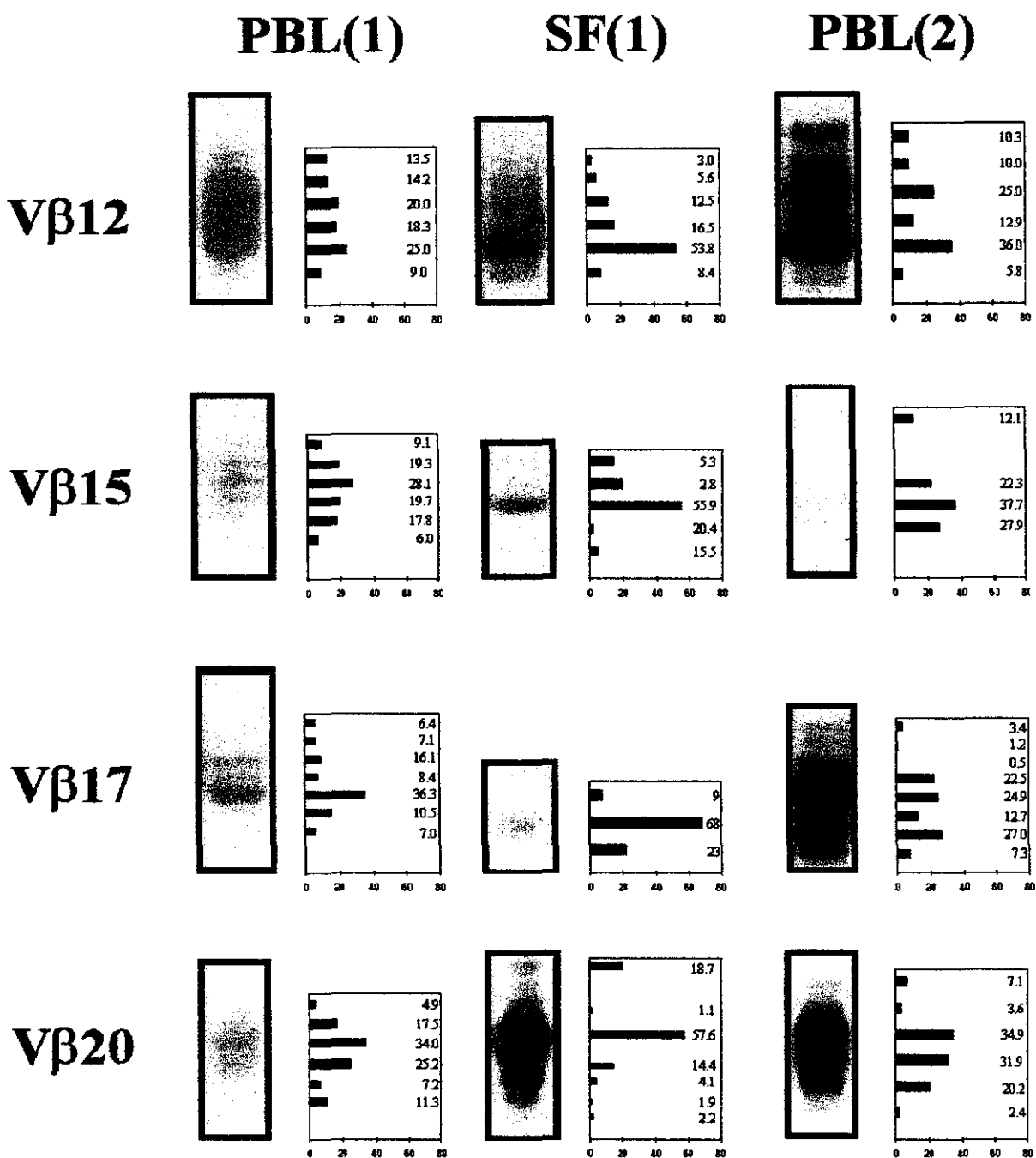


Figura 24: Análisis densitométrico de las amplificaciones de DMG CD8+ indicadas, obtenidas por tipaje espectral, y contribución de cada banda a la radiactividad total de su amplificación. El análisis densitométrico se realizó sobre exposiciones que no saturaban el grano de la película o directamente en Phosphorimager. Las aparentes incongruencia respecto a la intensidad de determinadas bandas respecto a su cuantificación se deben al sistema de densitometrado, que corrige la intensidad restando el fondo correspondiente a cada una.

CDR3			TCRBJ	n	% de transcritos	Tamaño de CDR3	% de transcritos de cada tamaño
Vβ12	N+D	Jβ					
CASS	YDEN	EQFFG	J2S1	1	8.3	7	66.7
CASS	FGQG	YEQYFG	J2S7	1	8.3	7	
CA	ITGGP	SYEQYFG	J2S7	1	8.3	7	
CASS	SSSG	YEQYFG	J2S7	2	16.7	7	
CASS	SLSG	YEQYFG	J2S7	2	16.7	7	
CAS	QGLI	NQPQHFG	J1S5	1	8.3	7	
CAS	GHRAGH	YEQYFG	J2S7	1	8.3	8	8.3
CASS	LLGGDL	YEQYFG	J2S7	1	8.3	9	25.0
CASS	YSNGVS	YGYTFG	J1S2	2	16.7	9	

Tabla 11: Secuencias de la CDR3β de transcritos TCRBV12+ de la muestra DMG(1)SF·CD8+. El tamaño de la CDR3 se midió contando el número de aminoácidos entre las secuencias CAXX y XFG. n indica el número de veces que se obtuvo la secuencia.

CDR3			TCRBJ	n	% de transcritos	Tamaño de CDR3	% de transcritos de cada tamaño
Vβ15	N+D	Jβ					
CATS	DRAQ	QPQHFG	J1S5	1	10	7	20
CAT	GEG	SNQPQHFG	J1S5	1	10	7	
CATS	GGEGGHG	AFFG	J1S1	2	20	8	80
CATS	DNRGDTED	FFG	J1S1	2	20	8	
CAT	IDTTT	NQPQHFG	J1S5	2	20	8	
CATS	DSGP	NQPQHFG	J1S5	2	20	8	

Tabla 12: Secuencias de la CDR3β de transcritos TCRBV15+ de la muestra DMG(1)SF·CD8+. El tamaño de la CDR3 se midió contando el número de aminoácidos entre las secuencias CAXX y XFG. n indica el número de veces que se obtuvo la secuencia.

CDR3			TCRBJ	n	% de transcritos	Tamaño de CDR3	% de transcritos de cada tamaño
Vβ20	N+D	Jβ					
CAWS	KDXTXX	HFG	J1S1	1	10	6	50
CAWS	WQGFGVQ	EAFFG	J1S5	1	10	7	
CAWS	PWGN	FFG	J1S1	1	10	7	
CAWS	TRTGXX	LHFG	J1S6	1	10	7	
CAWS	TGTG	SPLHFG	J2S7	1	10	7	
CAWS	VRGTDI	QYFG	J2S7	1	10	7	
CAWS	DQTGD	YEQYFG	J2S7	1	10	8	30
CAWS	TGTG	SYEQYFG	J2S7	1	10	8	
CAWS	VGVG	SYEQYFG	J2S7	1	10	8	
CA	SSIRIRSXNEX	FFG	J1S4	1	10	9	10

Tabla 13: Secuencias de la CDR3β de transcritos TCRBV20+ de la muestra DMG(1)SF-CD8+. El tamaño de la CDR3 se midió contando el número de aminoácidos entre las secuencias CAXX y XFG. n indica el número de veces que se obtuvo la secuencia.

CDR3			TCRBJ	n	% de transcritos	Tamaño de CDR3	% de transcritos de cada tamaño
Vβ17	N+D	Jβ					
CASS	TGG	TEAFFG	J1S1	1	9.1	6	20
CASS	VQGA	YEQYFG	J2S7	1	9.1	7	
CASS	IRSG	NEQFFG	J2S1	7	63.6	7	80
CASS	IRSS	YEQYFG	J2S7	1	9.1	7	
CASS	VRS	SYEQYFG	J2S7	1	9.1	7	

Tabla 14: Secuencias de la CDR3β de transcritos TCRBV17+ de la muestra DMG(1)SF-CD8+. El tamaño de la CDR3 se midió contando el número de aminoácidos entre las secuencias CAXX y XFG. n indica el número de veces que se obtuvo la secuencia.

B.3.1.- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS TRÁNSCRITOS PERTENECIENTES A LAS SUBFAMILIAS TCRBV12, TCRBV15 Y TCRBV20 DE DMG(1)SF-CD8⁺.

A pesar de que las expansiones en los transcritos TCRBV12⁺, TCRBV15⁺ y TCRBV20⁺ no correspondían a la proliferación de un único clon, debemos recordar que no existían bandas mayoritarias en PBLs, lo que indica que los TCRs del tamaño mayoritario se encontraban en periferia en una proporción baja y que estaban aumentados específicamente en la articulación lo que sugería su participación en una respuesta local. Aún cuando se han realizado estudios de repertorio que indican el sesgo de determinados tamaños de CDR3, tanto en TCRA como en TCRB de individuos sanos (29), no parece sencillo deducir una relación directa entre éstos y el posible reconocimiento antigénico aunque podemos considerar que los CDR3 del mismo tamaño deben adquirir una orientación espacial similar y, que deben interaccionar con posiciones análogas de los Ags. Puede pensarse que, si aminoácidos similares ocupan las mismas posiciones, deben interaccionar con residuos homólogos del complejo antigénico. Así pues, se analizaron los resultados de frecuencia de uso de segmentos TCRBJ y de aminoácidos de las regiones CDR3 β en función de la posición en dicha región, y que lógicamente se relaciona con la posición sobre el complejo antigénico de estos residuos. Complementariamente se estudió la frecuencia de uso de aminoácidos en CDR3 β independientemente de la posición que puede informar sobre el perfil hidrofílico general de la región. Estos usos se compararon con los encontrados en PBLs de individuos sanos (29, 30). Excepto si se indica lo contrario, los motivos que se destacan en los siguientes apartados demostraron ser estadísticamente significativos respecto a los controles ($p < 0.05$).

6 de las 8 cadenas β de los transcritos TCRBV12 del tamaño mayoritario (75%) empleaban el segmento TCRBJ2S7, frente al 17.6% de cadenas β TCRVB12⁺ que emplean dicho segmento en PBLs de controles (30). La comparación con el uso total de aminoácidos en las regiones N+D con las de PBLs TCRBV12⁺ de controles sanos reveló una frecuencia elevada de uso de Ser (34.5%) y de Ile o Leu (17.2%) comparada con la obtenida en controles, 10.5% y 3.5%, respectivamente. Se detectó, además, una frecuencia elevada de determinados aminoácidos en cada posición de la CDR3 β frente a la documentada en PBLs de controles. Así, la presencia de residuos polares en posición 3 (71.4%), Gly en posición 4 (71.4%) y Tyr en posición 5 (85.7%), destacaba sobre las proporciones en PBLs de sujetos sanos: 22.3%, 26.8% y 3.2% respectivamente.

La secuenciación de 10 colonias TCRBV15⁺ indicó que la banda cuya intensidad suponía más del 50% del total de las bandas obtenidas en el tipaje espectral correspondía a 4 cadenas β distintas (Tabla 12). Todas utilizaban segmentos TCRBJ del agrupamiento J1, al igual que el resto de cadenas secuenciadas. Esta proporción se aleja de los datos documentados de uso de segmentos TCRBJ por PBLs de controles (38.9%). Respecto a la frecuencia total de aminoácidos en la región N+D, se hizo patente que se empleaba Asp (20.8%), mientras que el uso de estos aminoácidos en PBLs de controles era del 6% (30). El estudio de los residuos de la CDR3 β en función de su posición reveló el uso preferente de Asp en posición 1 (75% frente al 9.8% de uso de residuos ácidos en PBLs de controles), y residuos polares en posición 2 (75% comparado con 27.3% en controles).

Al igual que en los casos anteriores, la secuenciación de 10 colonias TCRBV20⁺ indicó que la supuesta expansión oligoclonal en dicha subfamilia se debía a la existencia de 5 cadenas diferentes con el mismo tamaño de CDR3 (Tabla 13). Incluso aunque no fue posible solucionar algunas indeterminaciones y compresiones en las secuencias, la información obtenida permite deducir que la frecuencia de uso de Thr es significativo respecto a su uso por

PBLs de individuos sanos: 28% frente a 4.4%, no habiéndose detectado ningún otro motivo estructural relevante.

Así pues, podemos concluir que, incluso en aquellos casos en los que las expansiones oligoclonales no correspondían realmente a la proliferación de un único clon, se podían detectar usos preferentes en TCRBJ así como en la frecuencia de aminoácidos en CDR3 β dentro de los transcritos de la misma subfamilia. Dado que la posición relativa en el giro CDR3 sobre el complejo antigénico es similar en todos los complejos TCR/Ag cristalografiados (49, 50, 203, 204), se puede asumir que las homologías entre los TCRB mayoritarios de cada subfamilia evidencian homologías entre los Ags presentes en SF reconocidos por estos TCRs.

B.3.2.- ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE LOS TRÁNSCRITOS PERTENECIENTES A LA SUBFAMILIA TCRBV17 DE DMG(1)SF-CD8⁺.

A diferencia de las subfamilias anteriores, las secuencias obtenidas a partir de transcritos TCRBV17⁺ indicaron que 7 de los insertos secuenciados correspondían a una única secuencia que suponía por sí misma más del 60% de las cadenas TCRBV17⁺ secuenciadas (Tabla 14).

El análisis de las cadenas de tamaño mayoritario reveló que todas empleaban segmentos TCRBJ del agrupamiento 2 y que todas incluían el motivo Glu-Gln en su extremo 5'. La frecuencia de uso de Ser (25.6%), Ile+Leu (20.5%) y Arg (30.0%) en la región N+D era muy superior a la descrita en PBLs TCRBV17⁺ de individuos sanos: 8.1%, 5.8% y 8.3%, respectivamente. Todos los transcritos del tamaño mayoritario presentaban residuos hidrofóbicos en posición 1 (100% frente al 34.1% en controles), básicos en posición 2 (90% frente al 12.5%), polares en posición 3 (90% frente al 22.3%), Gly en posición 4 (70% frente al 26.8%) y Tyr en posición 5 (30% frente al 3.2%). La CDR3 del transcrito mayoritario, que en los subsiguientes estudios se denominó **Transcrito Expandido V17 (TEV17)**, incluía la secuencia aminoácido apolar-Arg-Ser. Este motivo se encontró en otros transcritos con el mismo tamaño de CDR3 dentro de la misma subfamilia, apareciendo en el 90% de los transcritos del tamaño predominante.

B.3.3.- COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LAS SUPUESTAS EXPANSIONES OLIGOCLONALES: MOTIVOS COMUNES ENTRE DISTINTAS SUBFAMILIAS.

Dada la existencia de motivos estructurales comunes dentro de los TCRs de tamaño predominante en cada subfamilia, pareció lógico evaluar la existencia de motivos comunes entre los TCRs de las distintas subfamilias. Dichos análisis podrían evidenciar homología entre los Ags reconocidos por las células T que expresan transcritos mayoritarios con independencia de la subfamilia a la que pertenecen. Este análisis reveló un uso elevado de segmentos TCRBJ2S1 y TCRBJ2S7 (25.8% y 32.3% frente a 19.2% y 17.0% en controles). Por otra parte, 23 de los 31 transcritos mayoritarios (74%) tenían el mismo tamaño de CDR3 β , tamaño minoritario (6%) entre los encontrados en PBLs de individuos sanos. Este dato, de difícil comprensión por sí solo, se mostró aún más relevante al introducir en el análisis los datos comparativos de uso de aminoácidos en función de su posición. Así, se detectaron aminoácidos básicos en posición 2 (36.6% frente a 12.5% en controles), aminoácidos polares en posición 3 (62.1% frente a 22.3%), Gly en posición 4 (60% frente a 26.8%) y Tyr en posición 5 (32.1% frente a 3.2%).

Sorprendentemente, estos usos coincidían con los encontrados en el transcrito expandido TCRBV17. Dada la enorme influencia del transcrito TEV17, representado 7 veces en los cálculos de frecuencias de uso de aminoácidos, que podía sesgar los resultados de las comparaciones, procedimos también a calcular las frecuencias pero excluyendo el citado transcrito. Incluso excluyendo de las comparaciones el transcrito TEV17, se encontró que el 66% de los transcritos tenían el mismo tamaño y que las frecuencias de uso de aminoácidos polares en posición 3 (50% frente a 22.3% en controles), Gly en posición 4 (39.3% frente a 26.8%) y Tyr en posición 5 (42.9% frente a 3.2%) eran elevadas.

Estos resultados indican que los requerimientos espaciales de la interacción de los TCRs correspondientes a los transcritos mayoritarios con los residuos de los péptidos y/o las hélices α de los HLAs que los albergan presentan similitudes y sugieren un perfil hidropático semejante entre los péptidos reconocidos por dichos TCRs.

B.4.- Estudio de los niveles de expresión del transcrito TEV17. Especificidad de las células TEV17⁺.

Dado que el análisis de las frecuencias de uso de aminoácidos en las CDR3B de los transcritos de tamaño mayoritario indicó que en gran parte de ellos aparecían residuos básicos en 2, polares en 3 y Gly en 4 y puesto que TEV17, además de ser el transcrito más veces hallado entre los transcritos secuenciados, contenía los motivos anteriores, nos propusimos confirmar si realmente representaba una proporción elevada exclusivamente entre los transcritos de SF y, tras ello, determinar si las células que lo expresan tienen capacidad autorreactiva y, por ello, puede pensarse si están implicadas en la respuesta autoinmune responsable de la enfermedad.

B.4.1.- CUANTIFICACIÓN DEL TRÁNSCRITO MAYORITARIO EN LA SUBFAMILIA TCRBV17. COMPARACIÓN ENTRE LA MUESTRA LOCAL Y LOS PBLs.

Como primer paso, nos propusimos confirmar la oligoclonalidad del transcrito mayoritario en TCRBV17 empleando un procedimiento que permitiera el rápido análisis de un gran número de transcritos en un tiempo limitado y que, por tanto, pudiera confirmar que los resultados obtenidos mediante secuenciación no eran producto del azar. Para ello diseñamos un oligonucleótido que hibridaba con la cadena complementaria a TEV17. Tras comprobar en repetidos experimentos que la sonda era específica para TEV17 y que incluso podía distinguirlo de transcritos que se diferenciaban únicamente en 2 bases, el RNA extraído de DMG(1)PBL-CD8⁺, DMG(1)SF-CD8⁺ y DMG(2)PBL-CD8⁺ se sometió a RT-PCR que amplificó los transcritos TCRBV17⁺. El material amplificado se insertó en vectores con los que se transformaron bacterias. Se obtuvieron al menos 200 colonias de cada una de las muestras y se hibridaron con sondas específicas para TCRBC y para TEV17 (un ejemplo se muestra en la Fig. 25A). La cuantificación de colonias indicó que TEV17 únicamente aparecía expandido en la muestra local DMG(1)SF-CD8⁺ (53.7%), mientras que suponía un bajo porcentaje de las células TCR-VB17⁺ de PBLs, que prácticamente no variaba a través del tiempo: 13.7% en DMG(1)PBL-CD8⁺ y 13.4% en DMG(2)PBL-CD8⁺ (Fig. 25B). Los cálculos estadísticos indicaron que la diferencia entre el porcentaje de colonias positivas en SF respecto a PBLs es significativa ($p < 0.05$) y confirmaron que la expresión del transcrito TEV17 en la articulación era muy superior a la expresión de éste en PBLs.

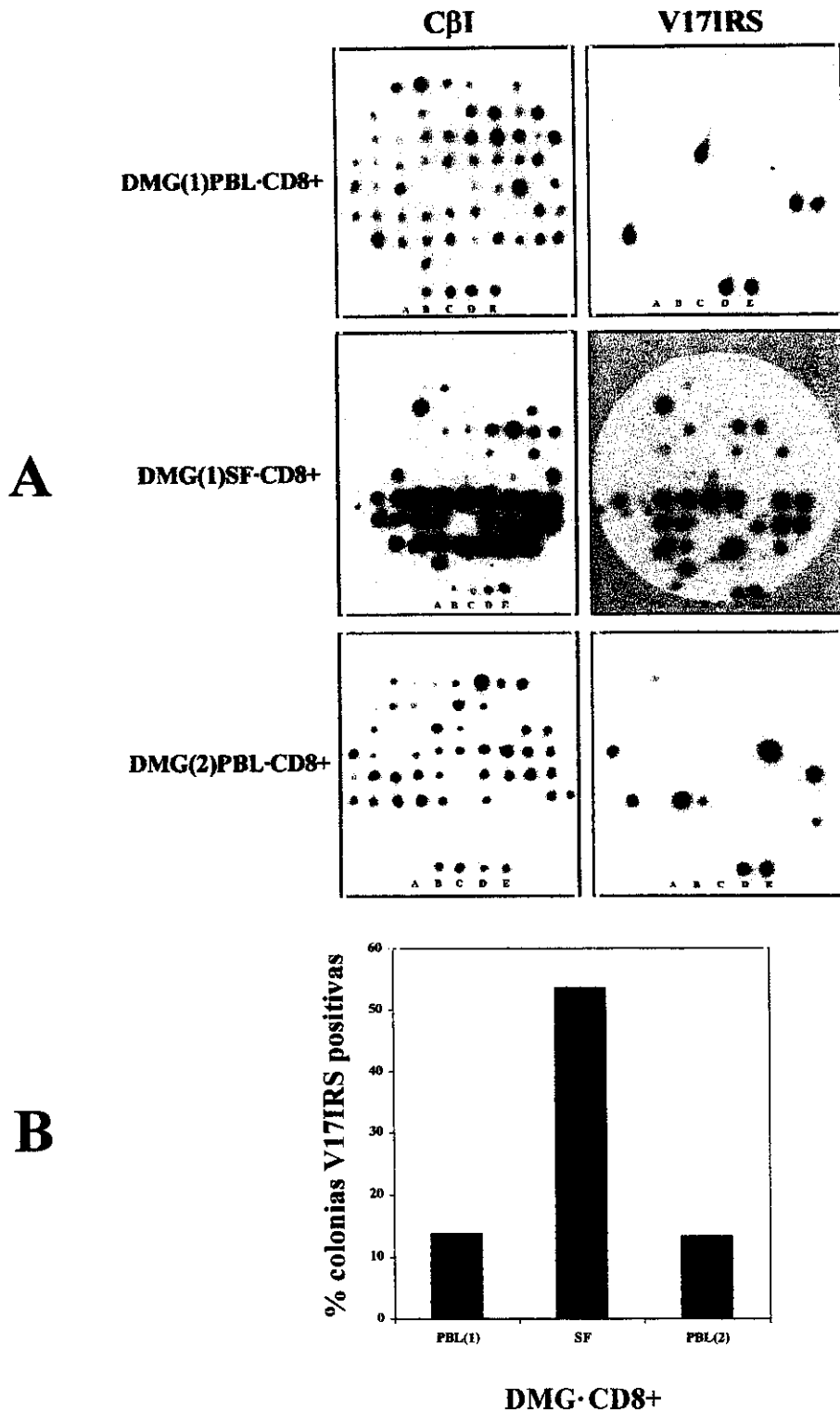


Figura 25: A: Muestreo significativo de la hibridación con las sondas CbI y V17IRS de las colonias obtenidas tras introducir en vectores y transformar los productos de PCR de la subfamilia TCRBV17. Control A: colonia sin inserto; controles B y C: colonia con inserto TCRBV17+TEV17-; controles D y E: colonias con inserto TCRBV17+TEV17+. B: Porcentaje de colonias TEV17+ respecto a las colonias TCRBC+ y, por tanto, proporción de colonias TEV17+ respecto al total de TCRBV17+.

B.4.2.- ESTIMACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RESPUESTA CONTRA AGS DE LAS CÉLULAS T TEV17⁺.

La aproximación al estudio de las células T en las espondiloartropatías ha consistido en el aislamiento de clones de células T específicos de presumibles Ags responsables de la enfermedad a partir de distintas muestras de enfermos y, en casos muy limitados, se ha determinado la secuencia de sus TCRs. Esta aproximación conlleva, como primer paso en el procedimiento de cultivo y clonación, la estimulación *in vitro* de las células con el supuesto Ag y, por ello, modifica la proporción de las células que lo reconocen y hace inviable la delimitación de la importancia de los clones aislados en la respuesta *in vivo*. Otra aproximación, no empleada hasta el momento para espondiloartropatías pero muy común en otros estudios de células T presentes en afectados por enfermedades autoinmunes, ha consistido en estudios de repertorio o tipaje espectral que han determinado la elevada frecuencia de algunos transcritos o el uso preferente de ciertos motivos en los TCRs de las células T presentes en PBLs o muestras locales de los enfermos pero sin determinar la especificidad de las células cuyos TCRs contienen dichos sesgos. A la vista de ello, parecía evidente la necesidad de diseñar una aproximación que pudiera aportar información conjunta sobre el repertorio en el enfermo previamente a las estimulaciones y sobre la especificidad de las células que expresan los TCRs más frecuentes y que, por esta elevada frecuencia, probablemente sean los principales responsables de la respuesta *in vivo*.

Así pues, tras determinar que el transcrito TEV17 estaba expandido en la muestra local y que, por tanto, era previsible que estuviera implicado en la respuesta autoinmune, diseñamos una aproximación experimental que nos permitiera evaluar la capacidad de respuesta de las células TEV17⁺ contra células autólogas.

Dado que los intentos de clonaje de células TEV17⁺ fueron infructuosos, hasta el punto que se consumieron completamente las células aisladas de SF, ello en gran parte debido a las limitaciones derivadas del desconocimiento del posible Ag reconocido por éstas, optamos por una aproximación alternativa basada en la transformación de PBLs de DMG con HVS, que permite el mantenimiento en cultivo de las células T sin necesidad de exponerlas a su Ag pero conservando su capacidad de reconocimiento antigénico y de activación vía TCR.

Una vez lograda dicha transformación, debía diseñarse un procedimiento que permitiera la detección de la capacidad de respuesta de las células TEV17⁺. Puesto que se ha observado experimentalmente que las células T transformadas con HVS necesitan determinadas condiciones de densidad celular (Regueiro, J.R. y cols., comunicación personal) que dificultan su clonaje, el diseño experimental debía tener en cuenta este hecho. Las medidas convencionales de proliferación celular o de lisis de dianas empleadas para medir la capacidad de una célula contra un Ag no permiten detectar qué célula es responsable del efecto medido en líneas no clonales. Por este motivo se optó por diseñar una aproximación alternativa que permitiera la estimación de la capacidad de respuesta contra los Ags de las células T TEV17⁺ dentro de una muestra con otras células T y cuya sensibilidad permitiera la detección del fenómeno medido, incluso cuando las células estudiadas fueran minoritarias dentro de la línea estudiada.

Así pues, el primer paso para la determinación de la capacidad de respuesta de las células T TEV17 consistía en la obtención de líneas T inmortalizadas con HVS que permitieran el mantenimiento en cultivo de las células.

B.4.2.1.- Obtención y caracterización fenotípica de líneas T transformadas con HVS.

Se transformaron con HVS alicuotas de las muestras DMG(2)PBL y DMG(3)PBL. No se empleó DMG(1)SF porque los infructuosos intentos de clonaje de las células TEV17⁺ consumieron completamente dicha muestra. Dado que las células que nos interesa estudiar son CD8⁺, en el momento de la transformación añadimos PHA, que favorece la infección por HVS de dichas células. A priori, el hecho de emplear células T transformadas a partir de PBLs no debería suponer ninguna diferencia respecto a hacerlo con células T de SF, dado que el protocolo de transformación implica la activación inespecífica de todas las células de la muestra y, por tanto, el estado inicial de la célula T es irrelevante. Las líneas transformadas se analizaron mediante citometría de flujo para determinar sus características fenotípicas. Además de determinar la expresión de CD3, CD4 y CD8, para confirmar la homogeneidad de la población, se determinó la expresión de CD25, cadena de alta afinidad del receptor de IL-2 cuya expresión es fundamental para el mantenimiento en cultivo de la línea que es dependiente de IL-2. Por otra parte se cuantificó el porcentaje de células T TCRBV17⁺ transformadas, entre las cuales debían encontrarse las células TEV17⁺ cuyo estudio pretendemos como representativo de las células con motivos similares a ella. El fenotipo de ambas líneas transformadas indicó que estaban formadas exclusivamente por células CD3⁺CD8⁺. El desplazamiento del histograma de CD25 respecto al control apuntó que todas las células expresaban CD25, lo que indicaba que todas se habían transformado y que habían adquirido características fenotípicas de células T activadas. Se distinguieron dos poblaciones dentro de cada muestra en función de su diferente expresión de CD25: 95% con expresión moderada y 5% con elevada expresión de CD25. Este hecho carecía de explicación sencilla y únicamente podría estar relacionado con el número de copias del virus que había infectado cada célula. Por último, ambas muestras contenían una población TCR-Vβ17⁺ de aproximadamente el 0.5% de las células T totales (Fig. 26). El pequeño porcentaje de células T TCRBV17⁺ transformadas podría explicarse porque únicamente 1 de cada 10000 células T son transformadas por el virus. Dado que la infección se realizó sobre aproximadamente 10⁶ células, la línea obtenida debería estar formada por, aproximadamente 100 células distintas. Dado que existen 30 subfamilias TCRBV, el porcentaje de células de cada subfamilia transformada no tenía por qué coincidir con la proporción que presentaban inicialmente en la muestra. Aún cuando no se determinó la proporción de células T TCRBV17⁺ en las muestras sin transformar, si suponemos que ésta era similar a la que se detecta en individuos sanos (1.1%), la proporción de células T TCRBV17⁺ obtenida no se alejó excesivamente de lo esperado.

B.4.2.2- Cuantificación de transcritos TEV17 tras el cocultivo de células T transformadas con líneas B linfoblastoides.

Una vez obtenidas las líneas celulares T inportalizadas con HVS, aprovechamos el hecho de que el crecimiento de estas células es dependiente de la presencia de IL-2 (177). Basándonos en este hecho, supusimos que al suprimir la IL-2 de los cultivos se detendría la proliferación de las células transformadas. En esta situación únicamente serían capaces de proliferar aquellas células T que reconocieran su Ag específico a través del TCR, ya que la capacidad de respuesta a través de ese receptor permanece inalterada (177). Las células T transformadas con HVS se cultivaron junto a diferentes líneas linfoblastoides B (B-LCL). Debido a la pequeña proporción de las células TCRBV17⁺, supusimos que sería conveniente

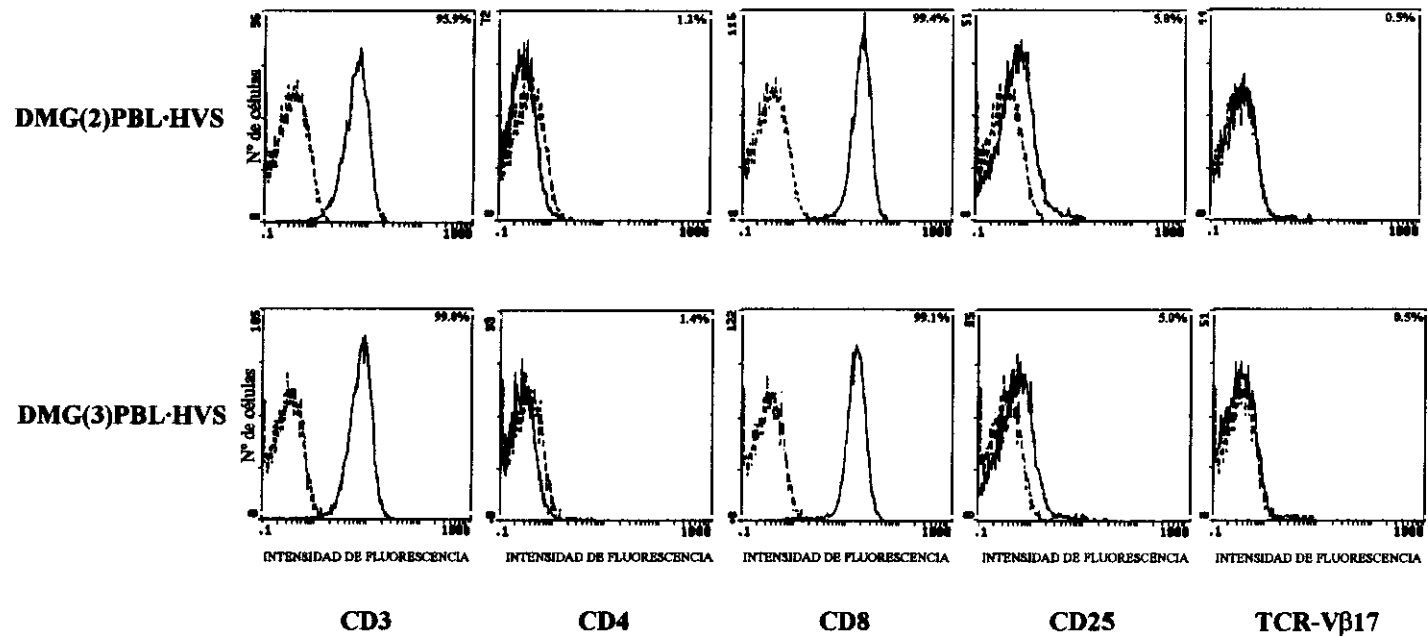


Figura 26: Histogramas de citometría de flujo de dos líneas celulares procedentes de DMG transformadas con HVS. El histograma trazado con línea discontinua representa la fluorescencia del control negativo.

mantener el estímulo durante un periodo moderadamente largo que permitiera detectar el aumento de células T TEV17⁺. Sorprendentemente, el motivo TCRBV17-IRSXX-TCRJ2 presentado por TEV17 también se ha detectado en los TCRs de células T específicas del complejo péptido M58-66 de la proteína de matriz del virus A de la gripe/HLA-A2 (209). Por ello se consideró que, a priori, podría existir una relación entre los Ags reconocidos por las células TEV17⁺ de DMG y las específicas de M58-66/HLA-. Así pues, como controles para la determinación de la capacidad autorreactiva de las células TEV17⁺ se escogieron la línea LG2 (HLA-A2⁺) y LG15, que comparte todos los alelos HLA con LG2 excepto HLA-A2 y que podría indicar si la presentación se producía a través de dicha molécula del MHC..

Tal y como hemos comentado, los ensayos convencionales de proliferación o de lisis de dianas no iban a permitir la detección de los efectos causados exclusivamente por las células TEV17⁺, y por ello se decidió emplear como medida de la capacidad de respuesta la cuantificación de la proporción de transcritos TEV17 respecto al cultivo en presencia de IL-2, por lo que, una vez finalizado el periodo de cultivo con la línea linfoblastoide, se extrajo RNA y se sometió a PCR específica para miembros de la subfamilia TCRBV17. Tras ello se realizó Southern blot empleando como sonda V17IRS y posteriormente CBI para corregir el número de transcritos TCRVB17 de cada muestra (Fig. 27). Los datos obtenidos demostraron que tanto en los cocultivos de DMG(2)PBL·HVS como DMG(3)PBL·HVS (no mostrado) existían mayor número de transcritos TEV17 en las líneas cultivadas junto a DMG(3)PBL·EBV (células B autólogas transformadas con el virus de Epstein-Barr) (Fig. 27). Los análisis de viabilidad celular (no mostrados) no detectaron crecimiento celular de los cocultivos con LG2 y LG15, mientras que tanto DMG(2)PBL·HVS como DMG(3)PBL·HVS evidenciaron una marcada proliferación celular al cultivarlas en presencia de DMG(3)PBL·EBV, equivalente a la detectada en las mismas células suplementadas con IL-2. Evidentemente esta proliferación no correspondía únicamente a las células TEV17⁺, cuya proporción dentro de la línea transformada no superaba el 0.5%, sino que puede pensarse que, junto a la proliferación de las células TEV17⁺ detectada por PCR también proliferan otras células, entre las que podrían encontrarse aquellas que también estaban expandidas en SF.

Se detectó incremento en la proporción de transcritos TEV17 al cultivar las células en presencia de células autólogas, pero no frente a LG2. Estos resultados parecían indicar que la presentación antigénica no era llevada a cabo por HLA-A2. A pesar de ello no se puede descartar la posibilidad de que sí se respondiera a un complejo HLA-A2/péptido pero que el péptido reconocido no fuera producido por las células LG2. Esta suposición no es descabellada si consideramos que las células de individuos sanos cuyos TCRs presentan motivos similares a TEV17 reconocen específicamente M58-66, procedente de una infección viral, unido a HLA-A2 pero no las diferentes APCs HLA-A2⁺ sin infectar (209). Incluso sin considerar qué alelo presenta el péptido, el crecimiento de las células T HVS⁺ frente a las células propias infectadas con EBV evidenció que los linfocitos T de DMG eran capaces de proliferar como respuesta a un autoantígeno. Estos datos junto al análisis por tipaje espectral, que indicaba la expansión de estas células exclusivamente en las articulaciones inflamadas del enfermo, sugiere su participación en la respuesta autoinmune local responsable de la espondiloartropatía. Evidentemente, no podemos descartar la participación de otras células, como en el inicio de la respuesta pero es la primera vez que se documenta que células específicamente expandidas en un tejido inflamado tienen capacidad de respuesta contra autoantígenos.

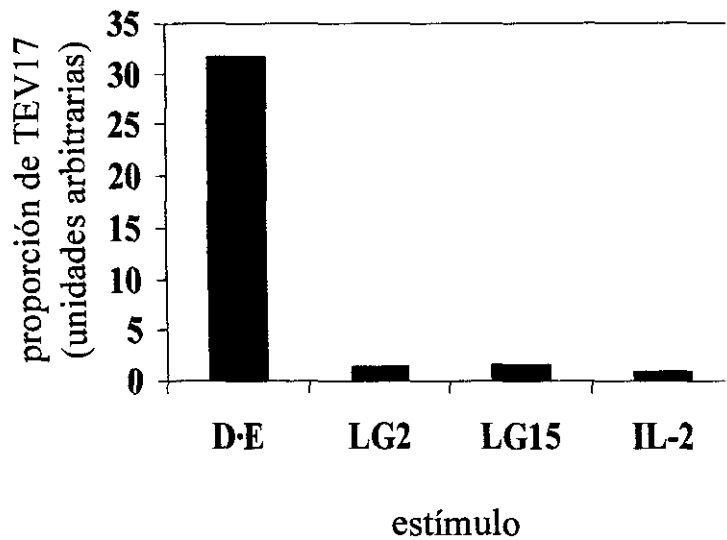
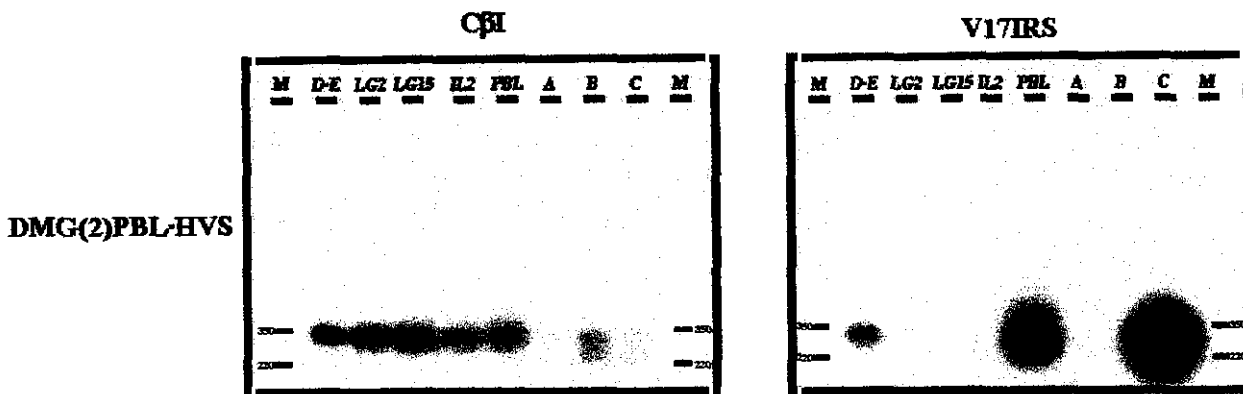


Figura 27: Capacidad proliferativa de las células TEV17+ frente a distintos estímulos, determinada como aumento de la expresión de transcritos TEV17+.

A: Expresión de los transcritos TCRBV17+ (izquierda) y TEV17+ (derecha) medido por PCR tras el cultivo de DMG(2)PBL-HVS frente a distintos estímulos. D·E: DMG(3)PBL·EBV. LG2:LG2. LG15:LG15. IL-2: con IL-2. Controles: PBL: expresión en la línea sin transformar DMG(2)PBL. A y B: transcritos TCRBV17+TEV17-. C: transcrito TCRBV17+TEV17+.

B: Expresión relativa de transcritos TEV17+, considerando la expresión en presencia de IL-2 como unidad.

DISCUSIÓN.

A.- Estudio de las células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.

Las primeras manifestaciones de la aEICH suelen detectarse en piel, extendiéndose más adelante al hígado, el tracto intestinal, etc. La enfermedad se considera una reacción de rechazo de las células del sistema inmunológico del donante contra el organismo del receptor mediada por linfocitos T del donante (127). Se considera que existen múltiples factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad, tales como las diferencias entre los alelos HLA del donante y el receptor, el régimen preparativo o la presencia de patógenos (129, 130). El hecho de que se hayan descrito síndromes similares a la EICH en situaciones de TMO autólogo indica la importancia que pueden adquirir los factores distintos al haplotipo HLA. Hasta el momento, el número de estudios dirigidos a caracterizar las células T infiltradas en las lesiones de EICH ha sido muy limitado (210-215), probablemente debido a que los primeros estudios realizados sugerían que la mayoría de las células T presentes en los injertos no eran alorreactivas (214, 216, 217) y, por tanto, la posibilidad de aislar clones desconociendo el Ag al que respondían era prácticamente nula. Así pues, nuestro estudio se proponía confirmar la importancia de las diferencias entre HLA de donante y receptor para el desarrollo de la enfermedad en los casos de TMO alogénico que, como hemos indicado, sigue siendo motivo de controversia. Para ello seguimos un protocolo que nos permitió aislar las células T específicamente activadas en las lesiones y determinar si eran específicas de alelos HLA expresados únicamente por el receptor.

Por otra parte, no se ha conseguido definir si existe o no una jerarquía entre las diferencias HLA donante-receptor, cuya influencia en el desarrollo de la EICH deba ser considerada al escoger el donante. En este sentido existen datos que sugieren una menor importancia de las diferencias entre alelos HLA-DQ y DP (139), mientras que otros estudios indican que las diferencias en dichos alelos sí son importantes (140, 141). Por ello, se intentó caracterizar un número suficiente de células T implicadas en la respuesta que se desarrolla en el tejido afectado que permitiera analizar la diversidad de dianas HLA a las que se dirigen y, por ello contribuir a esclarecer este punto.

Por último, se ha descrito que la depleción de células T del injerto previamente a su infusión en el receptor disminuye el riesgo de desarrollar EICH, pero aumenta el número de enfermos que recidivan en la enfermedad por la que se les realizó el TMO (132). Por otra parte, dicha depleción no elimina completamente la posibilidad de desarrollo de aEICH (210), probablemente debido a que no se haya conseguido eliminar la totalidad de las células T del injerto. Por tanto, y como tercer objetivo, nos propusimos caracterizar, en la medida de lo posible, las células T implicadas en el desarrollo de la EICH. La caracterización de la restricción en el uso de subfamilias de TCR o bien de motivos estructurales permitiría vislumbrar perspectivas para el diseño de reactivos específicos para la eliminación de células presumiblemente responsables de la aEICH sin detrimento del beneficioso efecto ICL de otras células T.

Evidentemente, la importancia del estudio está en relación directa con la demostración de que los clones que hemos obtenido están involucrados en el proceso patológico que se desarrolla en el tejido afectado. Dada la imposibilidad de demostrar de forma directa la implicación de las

células aisladas en la respuesta local, debemos basarnos en evidencias indirectas que apoyan la participación de los clones en la enfermedad:

- El cultivo inicial en presencia exclusiva de IL-2 induce el crecimiento de las células T activadas infiltradas en la biopsia de piel, las únicas que expresan elevados niveles del receptor de IL-2 (IL-2R) (202, 218). La importancia de las células T activadas en las reacciones de rechazo y las alorrespuestas ha sido demostrada por Heidecke y cols. (219) cuyos estudios han mostrado que la infusión de células T IL2-R⁺ de unas ratas trasplantadas a otras que recibieron injertos del mismo donante es capaz de acelerar los procesos de rechazo de los órganos trasplantados, mientras que la infusión de células no activadas no influye en el proceso.

- Nuestro estudio detectó crecimiento celular macroscópicamente a partir de los 3-5 primeros días tras el inicio del cultivo en las 3 biopsias analizadas. Habitualmente, los ensayos de clonaje de células T no detectan crecimiento hasta que han transcurrido al menos 10 días tras el inicio del cultivo. La elevada velocidad de crecimiento de las células T en nuestros cultivos indica que los clones aislados estaban sobrerrepresentados y preactivados en las biopsias. Por contra, no fue posible obtener células a partir de biopsias procedentes de trasplantados en los cuales no se desarrolló EICH. La correlación entre obtención de células y enfermedad parece indicar que dichas células deben estar implicadas en la patología.

-Las células T de las muestras de piel que crecieron en los cultivos con IL-2 se sembraron en condiciones de dilución límite junto a células B del receptor transformadas con EBV. La eficacia de clonaje fue cercana al 100%, lo que indica que los clones representaban prácticamente todas las células T que previamente habían crecido frente a IL-2. La caracterización de la especificidad de dichos clones demostró que todos eran específicos de HLA del receptor, a pesar de que el primer paso del aislamiento de las células no incluye ningún tipo de selección antigénica in vitro, por lo que puede suponerse que la capacidad alorreactiva de éstas células se ha desarrollado en la respuesta que se produjo en el tejido.

Estos resultados sugerían que los clones obtenidos participaban en el desarrollo de la enfermedad.

Como hemos indicado anteriormente, la existencia de reacciones tipo EICH, incluso en casos de trasplante autólogo, así como el hecho de que se haya descrito que gran parte de las células T infiltradas en las muestras locales no son alo-específicas, ponen en entredicho la importancia de las diferencias de alelos HLA entre donante y receptor en el desarrollo de la EICH (216, 217). Por otra parte, el régimen preparativo y la influencia de patógenos pueden tener una gran influencia en el desarrollo de la enfermedad. Evidentemente, estos dos últimos factores deben ser esenciales en los casos de trasplante autólogo o en el caso de los trasplantes alogénicos en los que no existen diferencias en el HLA de donante y receptor, donde probablemente adquieren importancia los antígenos menores de histocompatibilidad, pero en el resto de trasplantes alogénicos, se presentan dudas sobre el porqué de esa ausencia de alo-especificidad. Se puede argumentar que la presencia de citoquinas inflamatorias en las lesiones, puede inducir la migración de células T con fenotipo de memoria sin relación directa con el desarrollo de la aEICH, de forma que enmascaren la presencia de las células T implicadas en la patología. Nuestro estudio intentaba confirmar la importancia de las diferencias entre HLA de donante y receptor mediante el análisis de la especificidad de los clones aislados a partir de las lesiones de piel, presuntamente responsables de la enfermedad. La toma de las biopsias de piel en los primeros momentos de la

enfermedad minimizó dentro de lo posible la presencia de células T no relacionadas con la enfermedad. El análisis de los 13 clones aislados a partir de las muestras de los enfermos HER y P indicó que todos son específicos de HLA del receptor. Hay que señalar que el grupo del Dr. Vié (comunicación personal) realizó el estudio de otro enfermo y encontró 3 clones más específicos de alelos HLA expresados únicamente por el receptor, lo que confirmaba la importancia del HLA como diana contra la que se dirigen las células T, así como 8 clones sin especificidad HLA que evidenciaban la influencia de otros factores en el desarrollo de la enfermedad (214). Nuestros resultados apoyan los obtenidos en otros estudios que también describen células específicas de alo-Ags en lesiones de EICH (210-215) y contradicen los estudios iniciales que no hallaban células T alorreactivas (216, 217). La alorreactividad indirecta, debida al reconocimiento de péptidos derivados del HLA del receptor presentados por moléculas del MHC del donante, infundidas con el injerto, puede descartarse en nuestros clones, como indican los experimentos de proliferación celular en los que se bloqueó específicamente HLA-DR, -DQ o -DP.

Habitualmente se considera que las diferencias en HLA-C, HLA-DP y HLA-DQ tienen poca influencia en el desarrollo de la EICH y, en algunos casos, ni siquiera se realiza un tipaje HLA exhaustivo que incluya estos alelos (136, 220, 221). Esta actitud se basa en diferentes estudios que indican la falta de correlación entre diferencias en estos alelos y la aparición de EICH (139, 222). Los datos que aportamos, en cambio, indican que las células alorreactivas pueden dirigirse contra cualquiera de los alelos HLA del receptor diferentes de los del donante. De hecho, en el caso del enfermo P, todos los clones aislados eran específicos de HLA-DQ8 y HLA-DP*1301, mientras que, a pesar de existir diferencias en HLA-A y HLA-B, no se obtuvo ningún clon con esas especificidades. Nuestros resultados contradicen la jerarquía que consideraba más importantes las diferencias entre los alelos HLA-A y HLA-B e implican que la EICH puede estar causada por diferencias entre donante y receptor en cualquiera de los alelos HLA, por lo que están en consonancia con los de otros autores que detectan células específicas de distintos alelos HLA-DQ y DP del receptor en lesiones de afectados por EICH (140, 220, 223, 224). Estos resultados aconsejan, pues, que los tipajes HLA del donante y el receptor incluyan la determinación de los alelos de todos los loci para poder escoger, en la medida de lo posible, donantes cuyas diferencias de HLA respecto al receptor sean mínimas.

Actualmente, existe controversia sobre si la respuesta responsable de la EICH se debe a un número limitado de células alogénicas que reconocen Ags específicos de tejido o si, por el contrario, se desarrolla por células alorreactivas sin especificidad de tejido. Estudios iniciales indicaban que existía una enorme diversidad de células T infiltradas en los tejidos afectados por aEICH, basándose en la extracción directa de RNA de las muestras de piel y el análisis por PCR de los segmentos TCRAV y TCRBV (225). Otros estudios que han utilizado una aproximación similar han encontrado, en cambio, que determinados transcritos de TCR están sobreexpresados en las muestras locales (136-138). Se puede objetar que ninguno de estos estudios expone evidencias directas o indirectas de que las células T analizadas estuvieran presentes en las muestras de piel porque participaban en una respuesta inmunológica local o si, por el contrario, su presencia se debía a fenómenos de extravasación a tejidos inflamados. Como ya hemos explicado, existen evidencias indirectas de la implicación en el desarrollo de la enfermedad de las células presentadas en nuestro estudio y, dada la rápida velocidad de crecimiento de las células en los primeros momentos del cultivo, podemos aventurar que las células que hemos aislado

correspondían a las células activadas más representadas en la lesión. El análisis del reordenamiento TCRG y la posterior confirmación mediante secuenciación de sus TCRA y TCRB, indica que las células T activadas infiltradas en las muestras tienen un marcado carácter oligoclonal: las 83 células aisladas de ambos pacientes correspondían a únicamente 13 clones diferentes.

Dado que previamente al trasplante el injerto se sometió a procesos que debían deplecionar las células T infiltradas en él, sería lógico suponer que no era posible el desarrollo de aEICH. La aparición de la enfermedad implicaría que a pesar de esta medida profiláctica, la médula ósea trasplantada incluía un número residual de células T maduras responsables del desarrollo de la patología. Si los clones que hemos caracterizado estaban implicados en el desarrollo de la enfermedad, el carácter oligoclonal de la respuesta podría explicarse desde dos perspectivas:

- Una alorrespuesta supondría, en condiciones normales, la participación del 1-10% de las células T maduras. Si los procedimientos profilácticos han reducido en gran medida las células T maduras infiltradas en el injerto en el momento del TMO, la participación en respuesta alorreactiva del 1% de éstas podría suponer la expansión de un número reducido de células, lo que se reflejaría en los análisis como una respuesta llevada a cabo por un número limitado de clones. Si la oligoclonalidad se pudiera explicar desde esta perspectiva, los TCRs de los linfocitos implicados en la enfermedad deberían emplear segmentos TCRAV y TCRBV relacionados, dado que CDR1 y CDR2 están mayoritariamente implicados en el reconocimiento de los pocos alelos HLA del receptor diferentes a los del donante, pero no deberían existir motivos comunes entre los CDR3 dado que no es previsible que exista homología entre los péptidos presentados por las moléculas del MHC del receptor.

- La participación de un número limitado de células en la respuesta también podría explicarse si la respuesta se dirigiera a un número limitado de complejos antigénicos formados por péptidos derivados de proteínas específicas de la piel presentados por moléculas del MHC del receptor. La infiltración y activación de las células en la piel podría explicarse porque el daño tisular debido al régimen condicionante, podría provocar que las APCs profesionales tuvieran acceso a los Ags específicos de tejido, los cuales podrían ser presentados a las células T en los órganos linfáticos. Una vez activadas en la periferia, éstas expresarían moléculas de adhesión y de migración que les permitirían infiltrarse en la piel e iniciar la reacción inmunológica local responsable del desarrollo de la enfermedad. La respuesta contra un número limitado de complejos antigénicos implicaría que, además de encontrarse usos preferentes entre los segmentos TCRV empleados por las células T implicadas en la enfermedad, también deberían detectarse motivos comunes en la región CDR3.

Hasta el momento la disyuntiva entre ambas posibilidades patogénicas únicamente puede solucionarse mediante evidencias indirectas, como las derivadas del análisis de los elementos generadores de diversidad empleados por los TCRs de los clones aislados de la lesión. Por ello procedimos a la determinación de las secuencias de los TCRs empleados por los clones y al análisis de la utilización de cada elemento generador de diversidad en comparación con los usos descritos a partir del análisis de PBLs de individuos sanos.

El análisis global de los TCRs no permite identificar ningún motivo común a todos los TCRs independiente de su especificidad HLA, lo que parece indicar que, probablemente, no existe

un único péptido específico de tejido presentado por todos los alelos HLA del receptor. El hecho de que cada HLA imponga limitaciones distintas a los péptidos que puede presentar (47) explica esta situación.

Dado que obtuvimos 6 clones específicos de HLA-DQ8 (HER-27, HER-29, P1, P3, P7 y P10) nos centramos principalmente en el estudio de éstos, pues su número era suficiente como para que las comparaciones con otros estudios de uso de elementos generadores de diversidad en controles pudieran aportar información significativa. La comparación con los resultados de uso de los diferentes elementos generadores de diversidad en individuos sanos indicaron que nuestros clones empleaban preferentemente segmentos TCRAV pertenecientes a los subgrupos de homología 2 y 4, y que utilizaban Asn en CDR3 α y Gln en CDR3 β . La comparación con clones alorreactivos específicos de HLA-DQ8 aislados de individuos sanos indicó que, además de determinados usos preferentes también detectados en los clones de individuos sanos, los clones aislados a partir de las muestras epiteliales de los enfermos presentaban motivos exclusivos en las CDR3: Se empleaba Asn en CDR3 α y Gln y Asp en CDR3 β . Los motivos en CDR3 β no alcanzaban significación estadística pero el hecho de que tanto la comparación con los resultados de estudios de repertorio en PBLs de individuos sanos como con los clones HLA-DQ8⁺ específicos de controles indique la existencia de motivos específicos en las CDR3 β de los TCRs de nuestros clones, favorece la significación de éstos.

La existencia de estos motivos en las regiones CDR3 de los TCRs de los clones HLA-DQ8 específicos sugiere que éstos pueden reconocer péptidos estructuralmente relacionados que, dada la especificidad de las lesiones, presumiblemente derivan de proteínas expresadas exclusivamente en los tejidos afectados. En este sentido, Liu y cols. (136) han analizado el repertorio de TCRs en muestras de piel y en PBLs de trasplantados y han encontrado que el repertorio en piel indicaba un número elevado de cadenas TCRBV2 con motivos en CDR3 β que variaban entre individuos. Esta variación entre distintos afectados podría deberse a que no se controlaron las diferencias de HLA entre los distintos pares receptor-donante y, por tanto, no se puede realizar una clasificación sistemática en función de éstas. Kubo y cols. (137) han estudiado el repertorio de TCRs en las lesiones de piel de un enfermo que, tras serle injertada médula ósea de un donante con idéntico HLA, había desarrollado EICH. El estudio reveló que los TCRs de las células presentes en las muestras epiteliales presentaban motivos recurrentes, en concreto Val-Asn-Ser o Leu-Arg-Glu en CDR3 α y Gly-Ser-Leu-Gly o Ser-Pro en CDR3 β . En este caso, dada la igualdad en el HLA, la reacción debe ser consecuencia de las diferencias entre los antígenos menores de histocompatibilidad presentados por las moléculas presentadoras del receptor. Dada la interacción preferente de CDR3 con el péptido presentado y dada la igualdad de HLA, no parece extraño que se hayan detectado motivos comunes entre los CDR3 de las células implicadas en la respuesta. Análogamente, la existencia de motivos en CDR3 en nuestros clones también podría relacionarse con la existencia de determinados péptidos presentados exclusivamente por los receptores. En definitiva, nuestro estudio indica la enorme importancia de las diferencias entre HLA de donante y receptor, como demuestran las especificidades de los clones que hemos aislado, pero indica que no puede obviarse la influencia de otros factores, como la existencia de péptidos específicos de tejido contra los que puede responderse y que, por tanto, deben ser considerados a la hora de diseñar terapias y procedimientos profilácticos contra la EICH, tales como impedir la infiltración de las células en los tejidos, etc.

Una de las alternativas profilácticas propuestas para conseguir eliminar la aEICH, pero manteniendo la ventaja del efecto ICL, consistiría en la depleción específica de las células T implicadas en la EICH. Dado que los TCRs son exclusivos de cada célula T, la existencia de motivos comunes en los TCRs de las células implicadas en la EICH podría permitir el desarrollo de anticuerpos específicos de éstos que permitieran eliminarlas. Nuestros resultados indican que este tipo de aproximación necesitaría un desarrollo individualizado para cada uno de los pacientes en función de las diferencias entre alelos HLA del receptor y donante y teniendo en cuenta los posibles péptidos específicos de tejidos y los antígenos menores de histocompatibilidad presentados por dichas moléculas presentadoras. Por otra parte, hemos encontrado que, en los casos en los que distintos enfermos desarrollan una respuesta específica del mismo alelo HLA, existían motivos recurrentes en las regiones CDR3 de sus TCRs que parecen indicar que las células de ambos individuos respondían a péptidos estructuralmente relacionados. A pesar de esta recurrencia, los motivos que encontramos no aparecen excesivamente marcados. La existencia de un aminoácido con un grupo amida seguido de un aminoácido ácido en CDR3 β y de un aminoácido con un grupo amina en CDR3 α indica que los TCRs de nuestros clones presentan perfiles hidrofílicos similares, de forma similar a lo descrito en los estudios de May y cols., que indican que existen gran número de células T capaces de reconocer un mismo Ag y que sus TCRs suelen coincidir en sus perfiles hidrofílicos, incluso cuando no se encuentran elevadas homologías de secuencia (117). Así pues parece ser que el desarrollo de anticuerpos específicos para eliminar las células T cuyos TCRs reconocen determinados Ags se muestra como una alternativa inviable.

Los futuros procedimientos profilácticos para evitar la EICH pero conservando el efecto ICL pueden basarse en la transfección *in vitro* de las células T del donante con genes que las hagan sensibles a determinados antibióticos, de forma que las células T puedan eliminarse si se detectan las lesiones de la EICH (226). Por otra parte, dada la especificidad de tejido de la EICH, se puede suponer que las células T implicadas en la enfermedad expresan moléculas de adhesión y migración que les permiten penetrar en los tejidos epiteliales (227-229). La definición exacta de las moléculas de adhesión y migración a órganos no linfáticos que expresan las células T en las lesiones de EICH puede ayudar a definir estrategias orientadas a la depleción específica de esas células T o a bloquear el acceso de éstas a los tejidos epiteliales.

B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y en PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.

Las espondiloartropatías son un grupo de enfermedades con características clínicas comunes, entre las que destaca la inflamación articular, habitualmente con afectación asimétrica y en ausencia de factor reumatoide. El hecho de que aproximadamente el 50% de las células infiltradas sean linfocitos T con fenotipo de memoria hace suponer la implicación de éstas en el desarrollo de las patologías. Hasta el momento, gran parte de los estudios realizados sobre este grupo de enfermedades han analizado características fenotípicas de las células T infiltradas (150, 230) así como la presencia de citoquinas en las articulaciones inflamadas (146-149, 231). Otra de las aproximaciones más ampliamente extendidas en el estudio de las espondiloartropatías es la obtención de clones con diversas especificidades a partir de muestras locales de los enfermos (171-176). El principal problema en este tipo de aproximación es que se carece de información sobre el Ag al que están respondiendo las células y, por tanto, el clonaje debe realizarse eligiendo *a priori* un Ag candidato frente al que generar los clones, lo que supone que puedan obtenerse clones poco representados inicialmente en la muestra local. Hasta el momento no se ha documentado ningún estudio en el se analicen las células T infiltradas en articulaciones de afectados por espondiloartropatías previamente a la estimulación *in vitro*.

Nuestro estudio ha determinado la existencia de células T expandidas exclusivamente en las lesiones sin necesidad de realizar cultivos *in vitro* que puedan modificar la proporción original de cada linfocito. Únicamente entonces se ha desarrollado una metodología que ha permitido obtener información sobre la capacidad de respuesta de las células específicamente incrementadas en la muestra local que, en principio, deberían corresponder a aquellas que han proliferado como respuesta a un Ag y, por tanto, están implicadas en la respuesta local que se desarrolla en las articulaciones afectadas.

Al igual que en el estudio de las células T en la aEICH, la significación del estudio por tipaje espectral de las células T específicamente infiltradas en las articulaciones inflamadas está en relación directa con la posible demostración de que éstas están involucradas en el proceso patológico que se desarrolla en el tejido. Puesto que la enfermedad es consecuencia directa de la reacción inmunológica que se desarrolla en las articulaciones, debemos intentar relacionar la exposición frente a un Ag con el aumento de las células que responden contra él. En este sentido, se ha observado que la exposición a un SAg aumenta la proporción de aquellas células que han sido activadas a través de su TCR respecto al total de células T del individuo (232, 233). Del mismo modo, se ha documentado que la vacunación contra la hepatitis de un individuo sano provocó un aumento de la proporción de transcritos de un determinado tamaño dentro de una subfamilia (207). Estos y otros estudios (206, 234) permiten deducir que la respuesta a un Ag modifica el repertorio del individuo de forma que las células implicadas en la respuesta aumentan su proporción y que, por tanto, pueden ser detectadas mediante tipaje espectral.

Nuestra decisión de analizar comparativamente las expansiones en SF y PBLs y concentrar el estudio en los incrementos exclusivos de SF permite asegurar que las expansiones estudiadas son consecuencia del proceso inflamatorio desarrollado en los tejidos afectados. Precisamente para asegurar la relación directa con la respuesta inmunológica local se desechó el estudio de

expansiones simultáneas en SF y PBLs, que pueden estar implicadas en la patogenia por activación en la periferia y posterior infiltración en las articulaciones pero también pueden deberse la exposición a otros Ags presentes en la periferia pero no relacionados con la enfermedad o a otros factores capaces de modificar el repertorio.

El estudio se ha realizado sobre dos enfermos diferentes de los que se esperaba obtener distinta información. Por una parte se analizó por tipaje espectral la presencia de expansiones en una enferma crónica afectada por espondilitis anquilosante. Este análisis pretendía cubrir dos objetivos: por una parte podría servir como sistema de referencia que indicara la importancia de las sobreexpresiones de TCRs en el desarrollo y perpetuación de la enfermedad. Por otra parte pretendíamos determinar si, tal y como suponíamos, la enfermedad implicaba expansiones específicas en las articulaciones afectadas o si, por el contrario, era totalmente independiente de éstas. El estudio de un enfermo crónico, con la enfermedad más avanzada, debería facilitar la detección de las sobreexpresiones, si éstas existieran, por lo cual presentaba las condiciones ideales para optimizar la metodología. Una vez puesto a punto el sistema metodológico y obtenidos los datos sobre la existencia de expansiones oligoclonales en condiciones de cronicidad, se abordó el estudio sobre muestras obtenidas a partir de un enfermo en su primer episodio inflamatorio. El estudio en condiciones que se minimizaran al máximo los procesos de extensión y perpetuación de la respuesta y la influencia de la medicación debía definir los TCRs expandidos durante los primeros estadios de la respuesta local y por tanto aportaría información sobre las células T que participan en el proceso patogénico.

El estudio por tipaje espectral de las muestras locales y PBLs del enfermo crónico, MTSM, reveló la presencia de múltiples expansiones de las que una gran parte se expresaban únicamente en las muestras locales pero de forma diferencial entre distintas articulaciones. La variación de las expansiones en función del momento de la toma de muestras parece indicar que la respuesta local se extiende a nuevos Ags. Por lo tanto, nuestro estudio parece confirmar la hipótesis del "spreading" o extensión como mecanismo de perpetuación de las respuestas inmunológicas en enfermedades autoinmunes. Este fenómeno se ha documentado en modelos animales en los que la inmunización con un péptido derivado de la proteína básica de mielina provoca encefalitis que, una vez cronicada, permite aislar células T específicas de otros determinantes (123, 235). Nuestros datos apoyarían la hipótesis de perpetuación de las respuestas autoinmunes mediante la revelación de nuevos Ags, hecho que, hasta el momento, no ha podido relacionarse con la perpetuación de enfermedades en humanos.

Otro de los mecanismos de perpetuación descritos supone la perpetuación de la respuesta por inhibición de la apoptosis en las células T infiltradas en los tejidos afectados. En concreto, se ha comprobado que las células T aisladas de PBLs de un individuo sano y mantenidas en cultivo junto a fibroblastos expresan bcl-x₁ pero no bcl-2, ambas implicadas en la inhibición de la apoptosis (120). Dado que las células T infiltradas en sinovio de afectados por artritis reumatoide expresan esta proteína (121), se ha supuesto que las células pueden permanecer en un estado quiescente, infiltradas en las articulaciones, y reactivarse periódicamente de manera que sean responsables de la cronicidad de la artritis reumatoide (122). Esto supondría que las expansiones detectadas en un momento determinado deberían conservarse en los sucesivos episodios inflamatorios de la enfermedad. Los datos que hemos obtenido de MTSM no contradicen esta explicación, dado que ciertas expansiones oligoclonales en SF se mantenían durante el tiempo,

pero el hecho de que, junto a dicha conservación, existiera variación de otras expansiones, implica que la perpetuación de la respuesta no se producía únicamente por la interacción con los fibroblastos, sino simultáneamente al proceso de extensión a nuevos antígenos. No se han documentado estudios en los que se estudie en detalle la expresión de bcl- κ_1 en enfermos con espondiloartropatías, pero sí existen estudios que determinan la expresión de bcl-2 en las células T infiltradas en las articulaciones de estos enfermos (236). En estos casos, la expresión de bcl-2 parece estar más relacionada con la resistencia a la apoptosis provocada por las citoquinas presentes en el tejido (IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , TNF- β) (146-149, 231).

Los resultados obtenidos del análisis por tipaje espectral del enfermo crónico, además de informar sobre los posibles mecanismos que influyen en la perpetuación de la enfermedad, revelaron la necesidad de dirigir el estudio a muestras obtenidas durante los primeros episodios de enfermedad, en los que se minimizaran esos fenómenos. Así pues el estudio se continuó sobre DMG, afectado por un primer episodio de espondiloartropatía indiferenciada y que no había sido sometido a tratamiento en el momento de la primera toma de muestras.

Gran parte de los grupos de investigación enfrascados en el estudio de las espondiloartropatías suponen que existe una implicación preferente de las células T CD8⁺ (151, 175, 237). Su criterio se sustenta en que existe un porcentaje relativamente elevado de células T CD8⁺ infiltradas en las articulaciones de enfermos afectados (143, 151) y en la asociación con HLA-B27 (142-145). Por otra parte las investigaciones de David con ratones transgénicos para HLA-B27 han demostrado que el desarrollo de una enfermedad modelo de las espondiloartropatías requiere la presencia de células CD4⁺ y sugiere como hipótesis sobre la patogenia que la enfermedad se inicia porque parte de los linfocitos T CD4⁺ inician una respuesta contra HLA-B27 (161). Los estudios en los que se han aislado clones a partir de células infiltradas en SF no han aclarado este panorama, dado que han encontrado tanto células CD4⁺ como CD8⁺ y parte de ellas sin restricción por HLA (171-176). El análisis de los resultados obtenidos a partir de los tipajes espectrales de DMG mostró que no existían expansiones oligoclonales exclusivas de SF en la subpoblación CD4⁺, mientras que sí se detectaban en la CD8⁺. Aún cuando no podemos descartar completamente la participación de células T CD4⁺ en el desarrollo de la patología, nuestros datos están en concordancia con aquellos que indican la participación de células T CD8⁺ en la enfermedad (174, 175) y parecen contradecir la hipótesis formulada por David sobre la participación de las células T CD4⁺, que implicaría expansiones en dicha subpoblación (161).

Puesto que DMG es HLA-B27, no podemos inferir información directa sobre el modo de implicación de HLA-B27 en el desarrollo de las espondiloartropatías pero la existencia de estas enfermedades en individuos HLA-B27 permite validar o invalidar determinadas hipótesis sobre la implicación de HLA-B27 en la enfermedad. Así, la relación de HLA-B27 con la enfermedad derivada de características exclusivas de esta molécula, tales como la presencia en la lámina β de una Cys susceptible de transformarse en homocisteína que modifique la asociación de péptidos (159) o como la mala asociación de HLA-B27 con β_2m (160), no pueden justificar la existencia de enfermos HLA-B27, que alcanza el 75% en alguna de las patologías. Otras hipótesis parecen improbables a la vista de diferentes resultados experimentales: los estudios con animales transgénicos para HLA-B27 demuestran que éstos desarrollan patologías similares a las espondiloartropatías (208, 238), lo que parece invalidar la teoría de que HLA-B27 es simplemente marcador de otro gen realmente implicado en la patología. La presentación de fragmentos de

HLA-B27 contra los que se produce una respuesta inmunológica (156-158) también parece improbable porque no existen péptidos exclusivos de todos los subtipos de HLA-B27 relacionados con las espondiloartropatías que no puedan obtenerse también a partir de alguno de los subtipos no relacionados. Así pues, los indicios anteriores nos hacen suponer que la implicación de HLA-B27 con la enfermedad esté relacionada con su función como molécula presentadora y que determinados Ags susceptibles de ser presentados por ella sean los responsables de la enfermedad, tal y como supone la teoría del péptido artritogénico. Esta hipótesis supone una mayor facilidad de desarrollo de la enfermedad en individuos HLA-B27⁺, pero no excluye que otras moléculas del MHC, tales como HLA-B*3801, -B*3901 o -B*3902, cuyas restricciones a los péptidos presentados son similares a las de HLA-B27, sean capaces de presentar los mismos Ags. Es posible incluso que otras moléculas del MHC puedan presentar otros péptidos homólogos y que, por tanto, la enfermedad pueda desarrollarse en individuos HLA-B27.

El análisis por tipaje espectral de los TCRs de células CD8⁺ indicó que existían expansiones oligoclonales específicas de SF entre los TCRs que emplean segmentos TCRBV12, 15, 17 y 20. Los tres primeros segmentos pertenecen al subgrupo 4 definido por Chothia y col (12) y contienen el motivo His-Asp en CDR1 β y Tyr-(X)_n-Lys-Gly en CDR2 β . TCRBV20, en cambio, pertenece al subgrupo 5 y no parece compartir motivos con TCRBV12, V15 o V17. Curiosamente, la mayoría de los clones específicos de células autólogas aislados por Hermann y cols. a partir de SF de enfermos afectados por artritis reactiva también emplean segmentos TCRBV pertenecientes al subgrupo de homología 4 (TCRBV13, TCRBV14 y TCRBV17) (175, 176). Podría especularse sobre la posibilidad de participación de SAg en el inicio de ambas patologías a través de la activación de las células T con dichos segmentos, sobre todo si tenemos en cuenta que existen SAg, como SEB, que pueden activar células con los segmentos TCRBV3, TCRBV12, TCRBV14, TCRBV15, TCRBV17 y TCRBV20 (239). Si suponemos la presencia de un SAg en la zona inflamada, y dado que los SAg activan y provocan la proliferación de todas las células T que expresan determinados segmentos TCRBV (53), en principio no deberían detectarse incrementos en la proporción de ningún transcrito respecto al resto de transcritos con el mismo segmento TCRBV, sino que debería mantenerse constante respecto a lo observado en PBLs y, por tanto, no podría diferenciarse en su perfil de tamaños de CDR3 β , aún cuando el número total de células T con los segmentos activados fuera superior en SF. La reciente descripción de algunos SAg que activan células T no sólo en función del segmento TCRBV que emplean, sino también del segmento TCRBJ y de características de las regiones CDR3 β (54, 55) complica la delimitación de la participación de SAg en el inicio de enfermedades. Aún así, los SAg deberían provocar la expansión de todas las células T con determinados segmentos TCRBV o motivos de secuencia en CDR3 β , independientemente de la expresión de CD4 o de CD8.

Nuestros resultados mostraron que, en el caso de DMG, las expansiones en TCRBV12, TCRBV15, TCRBV17 y TCRBV20 eran exclusivas de la subpoblación CD8⁺ procedente de SF, por lo que podríamos descartar la presencia de un SAg infiltrado en los tejidos y decantarnos por el reconocimiento de complejos antigénicos convencionales como responsables de las expansiones oligoclonales en SF. Hay que señalar que no se puede descartar una intervención de SAg como responsables de la activación en la periferia de células T y que, una vez adquirido el fenotipo de memoria, fueran capaces de infiltrarse en las articulaciones y allí, aquellas que reconocieran

determinados péptidos específicos de tejido que inicialmente les eran inaccesibles, iniciaran la respuesta autoinmune.

La determinación de las secuencias de los TCRs específicamente expandidos en SF, además de servir como confirmación de la oligoclonalidad, podría informar sobre la existencia de usos preferentes y motivos comunes entre los TCRs y cuya comparación con los motivos encontrados por otros autores en controles ayudaría a establecer si el mecanismo de inicio de la enfermedad así como los disparadores de ésta pueden ser comunes.

El análisis de las secuencias ha permitido deducir que la expansión en TCRBV17 correspondía a la proliferación de un solo clon, mientras que las expansiones en TCRBV12, TCRBV15 y TCRBV20 correspondían a varios clones distintos con TCRs del mismo tamaño. El hecho de que el análisis por tipaje espectral haya indicado una expansión local que corresponde a más de un clon también puede ser considerado interesante si tenemos en cuenta que la expansión es exclusiva de SF. Esto indica que determinadas células proliferaron localmente y que todas ellas poseían TCRs que empleaban la misma subfamilia TCRBV con el mismo tamaño de CDR3 β . Para comprobar si existen motivos comunes entre las secuencias de cada tamaño mayoritario, se comparó el uso de cada aminoácido en las CDR3 β con las frecuencias de uso en PBLs de individuos sanos descritas en la bibliografía (29, 30). Se determinó que existían motivos comunes en las secuencias de tamaño mayoritario dentro de cada subfamilia (TCRBV12-(X)₂-polar-Gly-Tyr-(X)_n-TCRBJ2, TCRBV15-Asp-polar-(X)_n-TCRBJ1 y TCRBV17-Ile-Arg-Ser-Gly-Tyr-(X)_n-TCRBJ2), así como al analizarlas en conjunto (TCRBV_n-X-básico-polar-Gly-Tyr-TCRBJ2), lo que en principio parece indicar que responden a un mismo complejo antigénico o a varios con elevada homología. No hemos sido capaces de encontrar ninguna secuencia relacionada con éstas entre las de TCRs de los clones obtenidos a partir de SF de enfermos con artritis reactiva por Hermann y cols. (175, 176), lo que parece indicar que se dirigen a dianas diferentes. La ausencia de información sobre la extensión de la enfermedad en el momento de la toma de muestras, impide especular sobre si las diferencias se deben a que en los estudios de Hermann y cols., la respuesta puede haberse extendido a nuevos antígenos o si se deben a que los mecanismos patogénicos son diferentes entre las distintas enfermedades del grupo de las espondiloartropatías.

Es evidente que todas las deducciones que se realicen tomando como base los motivos de secuencia entre distintos TCRs deben considerar que el reconocimiento antigénico por el TCR es parcialmente degenerado (240, 241) y que un mismo TCR puede reconocer diferentes complejos antigénicos. Aún así, se ha descrito que, en aquellos casos en los que un mismo TCR reconoce Ags con una homología de secuencia no muy elevada, sí se mantienen unos perfiles hidrofílicos similares (117). Precisamente por ello podemos concluir que el incremento de determinados transcritos TCRB detectado en el SF de DMG corresponde a la respuesta local contra un número limitado de péptidos que, al menos, presentan perfiles hidrofílicos similares.

Puesto que se postula que el origen de las espondiloartropatías es de carácter autoinmune (156-158, 161, 167), es evidente que si las células TEV17 están implicadas en el desarrollo de la enfermedad, deberían tener capacidad de respuestas contra autoantígenos. Este punto se intentó confirmar en primer lugar mediante la clonación de las células T de SF, aunque los sucesivos intentos de clonaje en presencia de células autólogas resultaron infructuosos. Como método alternativo, se midió el aumento relativo de transcritos TEV17 tras enfrentar células T de DMG infectadas con HVS con una línea linfoblastoide autóloga así como a dos B-LCLs empleadas

como control. Curiosamente, el motivo TCRBV17-apolar-Arg-Ser que encontramos en TEV17 también se ha detectado en células T que responden contra el péptido M58-66 derivado de la proteína de la matriz del virus de la gripe presentado por HLA-A2 (209, 242). Por ello, una de las líneas linfoblastoides empleadas para comprobar el crecimiento de las células TEV17⁺ fue LG2, HLA-A2⁺. Los resultados obtenidos indicaron que las células TE-V17⁺ proliferaban al enfrentarlas a la línea autóloga DMG-EBV pero no frente a LG2 ni LG15. Dado que no se añadieron exógenamente péptidos, podríamos suponer que las células TEV17⁺ reconocen un Ag propio de DMG no presentado por el resto de las líneas linfoblastoides chequeadas. La ausencia de respuesta frente a LG2, HLA-A2⁺, parece indicar que la presentación antigénica no se producía a través de este alelo, aunque no puede descartarse que no existiera respuesta porque la línea LG2 no presenta los mismos péptidos que las células autólogas.

Podría argumentarse que, dado que las células T TEV17⁺ responden *in vitro* contra células B propias y que en el sistema circulatorio del enfermo existe gran número de células B que pueden actuar como APCs, debería existir un aumento de las células TEV17 en la periferia que hubiéramos detectado como una expansión en PBLs. Este argumento puede rebatirse considerando que las células B que hemos empleado han sido transformadas por un virus, por lo que sus patrones de presentación antigénica pueden haberse modificado dado que las infecciones virales alteran la expresión de proteínas, modifican los sitios de corte de las proteasas y aumentan la expresión del HLA (104). Además, el contexto de la presentación *in vitro* no es comparable al que puede existir *in vivo*: por una parte, la presencia de otras células en la circulación periférica puede modular la respuesta y, por otra, el cultivo *in vitro* de las células supone la adición de suplementos como el STF cuya alta composición en proteínas puede aportar péptidos muy diferentes a los que podrían aparecer en la periferia. De hecho, existen estudios en los que se comprueba que las células T pueden responder *in vitro* a péptidos derivados del STF (243). Así pues podemos concluir que las células TEV17⁺, que están específicamente aumentadas en el SF de DMG, tienen capacidad de respuesta a células propias, lo que apoya la hipótesis de que están implicadas en la respuesta autoinmune local responsable de la enfermedad.

Las búsquedas en distintas bases de datos revelan que en humano existen varias proteínas que contienen secuencias similares a las de M58-66 y que por tanto son susceptibles de activar las células T con el motivo TCRBV17-Ile/Leu-Arg-Ser. Una de las secuencias homólogas aparece integrada en el sindecano-2, un proteoglicano que se expresa en fibroblastos así como en otras estirpes celulares. Micecz y col han conseguido aislar a partir de PBLs de espondilíticos clones CD4⁺ que reconocen células autólogas preincubadas con proteoglicanos, aunque no caracterizan los TCRs que emplean (170). La ausencia de estudios en los que el aislamiento de las células se realice a partir de SF y en los que se obtengan células CD8⁺ específicas de proteoglicanos no permite aventurar ni descartar la implicación de los proteoglicanos en el inicio de la enfermedad como péptidos específicos de tejido mimetizados. Otra de las secuencias homólogas encontradas en proteínas de origen humano se localiza en IFI-56k, proteína inducible por interferón (IFN) y por infecciones virales, inductoras naturales de IFN- α e IFN- β (244). No se ha documentado ningún estudio que intente comprobar la existencia de células T autorreactivas dirigidas contra este péptido aunque es interesante pensar que la misma infección viral puede provocar la expresión del péptido propio que es mimetizado por el péptido viral.

En este punto hay que considerar la enorme plasticidad del TCR y que el reconocimiento

antigénico es parcialmente degenerado, lo que posibilita que el mecanismo de mimetismo molecular, posible responsable de la enfermedad, se produzca entre péptidos de la periferia y de los tejidos no linfáticos sin excesiva homología de secuencia.

Tomando como base la teoría del péptido artritogénico, la integración de los resultados anteriores permite especular un mecanismo patogénico que supondría la existencia de una primera respuesta contra el virus de la gripe y que, posteriormente, las células activadas en esta respuesta se infiltran en las articulaciones y comienzan una respuesta contra un péptido propio localizado en el tejido. La perpetuación de la respuesta podría pensarse que se debe a la extensión a nuevos Ags, como sugieren los resultados obtenidos de MTSM. Dado que las infecciones gripales son muy comunes y HLA-A2 es expresado por el 50% de la población, la presencia de la infección por sí sola no justifica el desarrollo de la enfermedad y, por tanto, debe existir otro condicionante, ya sea genético o ambiental que sumado a la infección desencadene la enfermedad. Hay que indicar que las células TEV17⁺ derivadas de DMG proliferaron únicamente en presencia de células autólogas, pero no como respuesta a otras células HLA-A2. Como hemos comentado, esto puede indicar que no se reconoce dicho alelo, sino que otro complejo péptido/HLA imita el formado por M58-66/HLA-A2 o que HLA-A2 presenta algún péptido homólogo de M58-66 característico de DMG que no es expresado por otros individuos, lo que podría explicar la aparición de la enfermedad en este individuo y no en otros sujetos HLA-A2⁺ que hayan sido expuestos al virus de la gripe.

Dado que en la mayoría de las espondiloartropatías se carece de información sobre cual pudo ser el desencadenante de la enfermedad y, por ello, es difícil el aislamiento de clones, la alternativa utilizada en el presente estudio puede ser muy útil para futuros estudios que pretendan aportar información sobre las características de los TCRs de las células infiltradas en los tejidos afectados y determinar la posible implicación en una respuesta autoinmune de las células más representadas en las lesiones. La extensión a un mayor número de pacientes de un estudio similar puede revelar la existencia de sesgos conservados entre los distintos afectados que podrían permitir el diseño de estrategias terapéuticas orientadas al bloqueo o eliminación específicas de las células potencialmente responsables de la patología. Por supuesto, si se lograra definir el origen de el/los péptido/s artritogénico/s mediante un chequeo exhaustivo de las células T implicadas en la respuesta, ya sea tras la transformación con HVS o mediante clonaje, se podría abordar el tratamiento de estas patologías atacando directamente a éste. Hasta el momento, ninguna de estas posibilidades es posible, aunque el procedimiento empleado en el presente estudio puede ser una importante herramienta metodológica para el estudio de estas variables.

Las más prometedoras perspectivas para el futuro tratamiento de estas enfermedades pasan por la definición más exacta posible de los distintos marcadores de las células T implicadas en la enfermedad. Así, actualmente se ha definido que existen poblaciones de células T infiltradas en SF que poseen marcadores propios de macrófagos (230), se ha comprobado que existen elevados niveles de la molécula de adhesión intercelular (ICAM) soluble en la articulación (245) y se sabe que un gran porcentaje de las células T infiltradas en las articulaciones poseen el fenotipo de memoria (150). El estudio de estos marcadores en células infiltradas en SF con capacidad autorreactiva puede definir diferencialmente la expresión en estas células, por lo que los estudios similares al nuestro pueden aportar la información previa requerida para ello.

Otra aproximación terapéutica puede estar basada en la definición exacta de las citoquinas

presentes en la articulación y la actuación sobre ellas. Hasta el momento se ha comprobado la presencia de IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α y TNF- β (146-149, 231). Estudios análogos al nuestro pueden contribuir a definir las variaciones en las células T en la articulación en función de los distintos tratamientos que bloqueen las distintas citoquinas y, por tanto, pueden ser útiles en la definición de la más adecuada infusión de citoquinas para evitar la proliferación de las células T en la articulación.

CONCLUSIONES.

A.- Estudio de las células T que infiltran lesiones de piel de afectados por aEICH tras TMO alogénico.

- 1.- La respuesta inmunológica local en aEICH es llevada a cabo por un número reducido de diferentes células T, en una reacción marcadamente oligoclonal.
- 2.- Todos los clones aislados son específicos de antígenos HLA expresados por el receptor, lo que confirma la importancia de éstos en el desarrollo de la patología y se opone a los estudios que defienden la ausencia total de especificidad HLA de las células T infiltradas en piel durante la aEICH.
- 3.- La existencia de clones alorreactivos contra cada uno de los antígenos HLA diferentes entre donante y receptor indica que, a diferencia de lo sugerido por otros grupos sobre la menor importancia de HLA-DP y HLA-DQ, se produce respuesta contra todas las posibles dianas HLA y sugiere la necesidad de realizar tipajes exhaustivos de donante y receptor.
- 4.- La existencia de motivos comunes en las CDR3 de los clones dirigidos contra HLA-DQ8 sugiere que la respuesta se produce contra un número limitado de complejos antigénicos y permite aventurar que la especificidad de tejido de la respuesta se debe a que los clones aislados reconocen complejos péptido específico de tejido/HLA alogénico.
- 5.- Los motivos comunes detectados en las CDR3 de los TCRs de clones con la misma especificidad HLA, no son lo suficientemente marcados como para permitir el desarrollo de anticuerpos específicos de las células T que los expresan como alternativa terapéutica general para eliminar de forma selectiva las células responsables de la aEICH, mientras se conserva el efecto ICL.

B.- Estudio de las diferencias entre el repertorio de TCRs en muestras locales y en PBLs de enfermos con espondiloartropatías. Relación con la respuesta autoinmune local.

- 1.- La perpetuación de las respuestas locales en afectados por espondiloartropatías y la cronificación de la enfermedad se produce por un proceso de extensión de la respuesta a nuevos antígenos, probablemente revelados por la propia reacción inmunológica.
- 2.- La existencia de expansiones específicas en SF durante el primer episodio inflamatorio, únicamente en la subpoblación CD8⁺, sugiere que no existe una implicación directa de SAGs en la patogenia de la enfermedad.
- 3.- La existencia de motivos comunes en las CDR3 β de los TCRs sugiere que las células T que los expresan han respondido a complejos antigénicos homólogos o con perfiles hidrofílicos similares.

4.- Las células TEV17⁺ derivadas de DMG son capaces de proliferar frente a células autólogas. La existencia de células T con capacidad autorreactiva localmente expandidas en enfermos no había sido descrita anteriormente e indica la posible participación de estas células en el proceso patológico que desencadena la espondiloartropatía.

5.- La similitud de motivos encontrados entre los TCRs expandidos en la muestra local y los implicados en el reconocimiento del péptido M58-66 de la proteína de matriz del virus de la gripe presentado por HLA-A2 sugiere que el desencadenamiento de la enfermedad en DMG pudo estar relacionado con la exposición a dicho virus e indica la necesidad de ampliar la búsqueda de péptidos artritogénicos a péptidos de origen viral en los futuros estudios sobre espondiloartropatías.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and J.S. Pober. 1994. Cellular and molecular immunology. W.B.Saunders company.
2. Davis, M.M. and P.J. Bjorman. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395-402.
3. Meuer, S.C., K.A. Fitzgerald, R.E. Hussey, J.C. Hodgson, S.F. Schlossman, and E.L. Reinherz. 1983. Clonotypic structures involved in antigen-specific human T-cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J.Exp.Med.* 157:705-713.
4. Siu, G., S.P. Clark, Y. Yoshikai, M. Malissen, Y. Yanagi, E. Strauss, T.W. Mak, and L. Hood. 1984. The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity, and joining gene segments that rearrange to generate a complete V gene. *Cell* 37:393-401.
5. Backstrom, B.T., E. Milia, A. Peter, B. Jaureguiberry, C.T. Baldari, and E. Palmer. 1996. A motif within the T cell receptor alpha chain constant region connecting peptide domain controls antigen responsiveness. *Immunity*. 5:437-447.
6. Backstrom, B.T., B.T. Hausmann, and E. Palmer. 1997. Signaling efficiency of the T cell receptor controlled by a single amino acid in the beta chain constant region. *J.Exp.Med.* 186:1933-1938.
7. Rodriguez-Tarduchy, G., A.G. Sahuquillo, B. Alarcon, and R. Bragado. 1996. Apoptosis but not other activation events is inhibited by a mutation in the transmembrane domain of T cell receptor beta that impairs CD3zeta association. *J.Biol.Chem.* 271:30417-30425.
8. Backstrom, B.T., B. Rubin, A. Peter, G. Tiefenthaler, and E. Palmer. 1997. T cell receptor alpha-chain tail is required for protein kinase C- mediated down-regulation, but not for signaling. *Eur.J.Immunol.* 27:1433-1441.
9. Fernandez-Miguel, G., B. Alarcon, A. Iglesias, H. Bluethmann, M. Alvarez-Mon, E. Sanz, and A. de la Hera. 1999. Multivalent structure of an alphabetaT cell receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:1547-1552.
10. Kolanus, W., C. Romeo, and B. Seed. 1993. T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell* 74:171-183.
11. Arden, B., S.P. Clark, D. Kabelitz, and T.W. Mak. 1995. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42:455-500.
12. Chothia, C., D.R. Boswell, and A.M. Lesk. 1988. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J.* 7:3745-3755.

13. Schiffer, M., E.A. Kabat, and T.T. Wu. 1992. Subgroups of Tcr alpha chains and correlation with T-cell function. *Immunogenetics* 35:224-234.
14. Caccia, N., G.A. Bruns, I.R. Kirsch, G.F. Hollis, V. Bertness, and T.W. Mak. 1985. T cell receptor alpha chain genes are located on chromosome 14 at 14q11- 14q12 in humans. *J.Exp.Med.* 161:1255-1260.
15. Rowen, L., B.F. Koop, and L. Hood. 1996. The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272:1755-1762.
16. Uematsu, Y., S. Ryser, Z. Dembic, P. Borgulya, P. Krimpenfort, A. Berns, H. von Boehmer, and M. Steinmetz. 1988. In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell* 52:831-841.
17. George, J.F., Jr. and H.W. Schroeder, Jr. 1992. Developmental regulation of D beta reading frame and junctional diversity in T cell receptor-beta transcripts from human thymus. *J.Immunol.* 148:1230-1239.
18. Roman-Roman, S., L. Ferradini, O. Azogui, F. Faure, T. Hercend, and F. Triebel. 1993. Alternatively spliced T cell receptor transcripts expressed in human T lymphocytes. *Mol.Immunol.* 30:423-431.
19. Fehling, H.J. and H. von Boehmer. 1997. Early alphabeta T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr.Opin.Immunol.* 9:263-275.
20. Davodeau, F., M.A. Peyrat, F. Romagne, A. Necker, M.M. Hallet, H. Vie, and M. Bonneville. 1995. Dual T cell receptor beta chain expression on human T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 181:1391-1398.
21. Padovan, E., C. Giachino, M. Cella, S. Valitutti, O. Acuto, and A. Lanzavecchia. 1995. Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor beta chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J.Exp.Med.* 181:1587-1591.
22. Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, S. Meyer, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. 1993. Expression of two T cell receptor alpha chains: dual receptor T cells. *Science* 262:422-424.
23. Furutani, M., Y. Yanagi, I. Fujisawa, T. Nakayama, H. Kishimoto, K. Kuida, Y. Asano, and T. Tada. 1989. Post-transcriptional allelic exclusion of two functionally rearranged T cell receptor alpha genes. *Int.Immunol.* 1:281-288.
24. Kuida, K., M. Furutani-Seiki, T. Saito, H. Kishimoto, K. Sano, and T. Tada. 1991. Post-translational attainment of allelic exclusion of the T cell receptor alpha chain in a T cell clone. *Int.Immunol.* 3:75-82.

25. Toyonaga, B. and T.W. Mak. 1987. Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 5:585-620:585-620.
26. Bentley, G.A. and R.A. Mariuzza. 1996. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 14:563-90:563-590.
27. Moss, P.A., W.M. Rosenberg, E. Zintzaras, and J.I. Bell. 1993. Characterization of the human T cell receptor alpha-chain repertoire and demonstration of a genetic influence on V alpha usage. *Eur.J.Immunol.* 23:1153-1159.
28. Rosenberg, W.M., P.A. Moss, and J.I. Bell. 1992. Variation in human T cell receptor V beta and J beta repertoire: analysis using anchor polymerase chain reaction. *Eur.J.Immunol.* 22:541-549.
29. Moss, P.A. and J.I. Bell. 1995. Sequence analysis of the human alpha beta T-cell receptor CDR3 region. *Immunogenetics* 42:10-18.
30. Quiros Roldan, E., A. Sottini, A. Bettinardi, A. Albertini, L. Imberti, and D. Primi. 1995. Different TCRBV genes generate biased patterns of V-D-J diversity in human T cells. *Immunogenetics* 41:91-100.
31. Hawes, G.E., L. Struyk, and P.J. van den Elsen. 1993. Differential usage of T cell receptor V gene segments in CD4⁺ and CD8⁺ subsets of T lymphocytes in monozygotic twins. *J.Immunol.* 150:2033-2045.
32. Gulwani-Akolkar, B., D.N. Posnett, C.H. Janson, J. Grunewald, H. Wigzell, P. Akolkar, P.K. Gregersen, and J. Silver. 1991. T cell receptor V-segment frequencies in peripheral blood T cells correlate with human leukocyte antigen type. *J.Exp.Med.* 174:1139-1146.
33. Jeddi-Tehrani, M., J. Grunewald, V. Hodara, R. Andersson, and H. Wigzell. 1994. Nonrandom T-cell receptor J beta usage pattern in human CD4⁺ and CD8⁺ peripheral T cells. *Hum.Immunol.* 40:93-100.
34. Jorgensen, J.L., P.A. Reay, E.W. Ehrich, and M.M. Davis. 1992. Molecular components of T-cell recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 10:835-73:835-873.
35. Kourilsky, P. and J.M. Claverie. 1989. MHC-antigen interaction: what does the T cell receptor see? *Adv.Immunol.* 45:107-93:107-193.
36. Niedergang, F., A. Hemar, C.R. Hewitt, M.J. Owen, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 1995. The Staphylococcus aureus enterotoxin B superantigen induces specific T cell receptor down-regulation by increasing its internalization. *J.Biol.Chem.* 270:12839-12845.
37. Hewitt, C.R., J.R. Lamb, J. Hayball, M. Hill, M.J. Owen, and R.E. O'Hehir. 1992. Major histocompatibility complex independent clonal T cell anergy by direct interaction of

- Staphylococcus aureus enterotoxin B with the T cell antigen receptor. *J.Exp.Med.* 175:1493-1499.
38. Campbell, R.D. and J. Trowsdale. 1993. Map of the human MHC. *Immunol.Today* 14:349-352.
 39. Ploegh, H.L., H.T. Orr, and J.L. Strominger. 1981. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* 24:287-299.
 40. Cresswell, P. 1994. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu.Rev.Immunol.* 12:259-93:259-293.
 41. Bjorman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
 42. Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 353:321-325.
 43. Engelhard, V.H. 1994. Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr.Opin.Immunol.* 6:13-23.
 44. Moore, M.W., F.R. Carbone, and M.J. Bevan. 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54:777-785.
 45. Pfeifer, J.D., M.J. Wick, R.L. Roberts, K. Findlay, S.J. Normark, and C.V. Harding. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361:359-362.
 46. Pinet, V., M.S. Malnati, and E.O. Long. 1994. Two processing pathways for the MHC class II-restricted presentation of exogenous influenza virus antigen. *J.Immunol.* 152:4852-4860.
 47. Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanović. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178-228.
 48. Parham, P., C.E. Lomen, D.A. Lawlor, J.P. Ways, N. Holmes, H.L. Coppin, R.D. Salter, A.M. Wan, and P.D. Ennis. 1988. Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 85:4005-4009.
 49. Garcia, K.C., M. Degano, R.L. Stanfield, A. Brunmark, M.R. Jackson, P.A. Peterson, L. Teyton, and I.A. Wilson. 1996. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274:209-219.

50. Garboczi, D.N., P. Ghosh, U. Utz, Q.R. Fan, W.E. Biddison, and D.C. Wiley. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384:134-141.
51. Kabat, E.A., T.T. Wu, K.S. Gottesman, and C. Foeller. 1991. Sequences of immunological interest. N.I.H. Publications.
52. Woodland, D.L., M.P. Happ, K.J. Gollob, and E. Palmer. 1991. An endogenous retrovirus mediating deletion of alpha beta T cells?. *Nature* 349:529-530.
53. Hong, S.C., G. Waterbury, and C.A.J. Janeway. 1996. Different superantigens interact with distinct sites in the Vbeta domain of a single T cell receptor. *J.Exp.Med.* 183:1437-1446.
54. Hodtsev, A.S., Y. Choi, E. Spanopoulou, and D.N. Posnett. 1998. Mycoplasma superantigen is a CDR3-dependent ligand for the T cell antigen receptor. *J.Exp.Med.* 187:319-327.
55. Ciurli, C., D.N. Posnett, R.P. Sekaly, and F. Denis. 1998. Highly biased CDR3 usage in restricted sets of beta chain variable regions during viral superantigen 9 response. *J.Exp.Med.* 187:253-258.
56. Cantrell, D. 1996. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu.Rev.Immunol.* 14:259-74:259-274.
57. Rouvier, E., M.F. Luciani, and P. Golstein. 1993. Fas involvement in Ca(2⁺)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J.Exp.Med.* 177:195-200.
58. Meuer, S.C., S.F. Schlossman, and E.L. Reinherz. 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4⁺ and T8⁺ effector T cells recognize products of different major histocompatibility complex regions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 79:4395-4399.
59. Wu, S., Y. Yang, S. Sadegh-Nasser, and J.D. Ashwell. 1993. Use of bispecific heteroconjugated antibodies (anti-T cell antigen receptor x anti-MHC class II) to study activation of T cells with a full length or truncated antigen receptor zeta-chain. *J.Immunol.* 150:2211-2221.
60. Janeway, C.A., Jr. 1995. Ligands for the T-cell receptor: hard times for avidity models. *Immunol.Today* 16:223-225.
61. Lowin-Kropf, B., V.S. Shapiro, and A. Weiss. 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J.Cell Biol.* 140:861-871.
62. Valitutti, S. and A. Lanzavecchia. 1997. Serial triggering of TCRs: a basis for the

- sensitivity and specificity of antigen recognition. *Immunol.Today* 18:299-304.
63. Schwartz, R.H. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248:1349-1356.
 64. Sykulev, Y., M. Joo, I. Vturina, T.J. Tsomides, and H.N. Eisen. 1996. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*. 4:565-571.
 65. Miyawaki, T., T. Uehara, R. Nibu, T. Tsuji, A. Yachie, S. Yonehara, and N. Taniguchi. 1992. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *J.Immunol.* 149:3753-3758.
 66. Wesswlborg, S., O. Janssen, and D. Kabelitz. 1993. Induction of Activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J.Immunol.* 150:4338-4345.
 67. McLeod, J.D., L.S.K. Walker, Y.I. Patel, G. Boulougouris, and D.M. Sansom. 1998. Activation of human T cells with superantigen (Staphylococcal enterotoxin B) and CD28 confers resistance to apoptosis via CD95. *J.Immunol.* 160:2072-2079.
 68. Suda, T., M. Tanaka, K. Miwa, and S. Nagata. 1996. Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. *J.Immunol.* 157:3918-3924.
 69. Suda, T., H. Hashimoto, M. Tanaka, T. Ochi, and S. Nagata. 1997. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J.Exp.Med.* 186:2045-2050.
 70. Ju, S.T., D.J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el-Khatib, D.H. Sherr, B.Z. Stanger, and A. Marshak-Rothstein. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T- cell activation. *Nature* 373:444-448.
 71. Zhang, X., L. Giangreco, H.E. Broome, C.M. Dargan, and S.L. Swain. 1995. Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. *J.Exp.Med.* 182:699-709.
 72. Croft, M. 1994. Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr.Opin.Immunol.* 6:431-437.
 73. Walker, P.R., T. Ohteki, J.A. Lopez, H.R. MacDonald, and J.L. Maryanski. 1995. Distinct phenotypes of antigen-selected CD8 T cells emerge at different stages of an in vivo immune response. *J.Immunol.* 155:3443-3452.
 74. Croft, M., L.M. Bradley, and S.L. Swain. 1994. Naive versus memory CD4 T cell response

- to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J.Immunol.* 152:2675-2685.
75. Salmon, M., D. Pilling, N.J. Borthwick, N. Viner, G. Janossy, P.A. Bacon, and A.N. Akbar. 1994. The progressive differentiation of primed T cells is associated with an increasing susceptibility to apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 24:892-899.
 76. Oehen, S., H. Waldner, T.M. Kundig, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1992. Antivirally protective cytotoxic T cell memory to lymphocytic choriomeningitis virus is governed by persisting antigen. *J.Exp.Med.* 176:1273-1281.
 77. Mullbacher, A. 1994. The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen. *J.Exp.Med.* 179:317-321.
 78. Tanchot, C., F.A. Lemonnier, B. Perarnau, A.A. Freitas, and B. Rocha. 1997. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276:2057-2062.
 79. Robey, E. and B.J. Folwkes. 1994. Selective events in T cell development. *Annu.Rev.Immunol.* 12:675-705.
 80. Bonomo, A. and P. Matzinger. 1993. Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance. *J.Exp.Med.* 177:1153-1164.
 81. Speiser, D.E., H. Pircher, and R.M. Zinkernagel. 1992. Clonal deletion induced by either radioresistant thymic host cells or lymphohemopoietic donor cells at different stages of class I-restricted T cell ontogeny. *J.Exp.Med.* 175:1277-1283.
 82. Marrack, P. and J. Kappler. 1988. The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol.Today* 9:308-315.
 83. Sprent, J., D. Lo, E.K. Gao, and Y. Ron. 1988. T cell selection in the thymus. *Immunol.Rev.* 101:173-90:173-190.
 84. Ashton-Rickardt, P.G. and S. Tonegawa. 1994. A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol.Today* 15:362-366.
 85. Valitutti, S., S. Muller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia. 1995. Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375:148-151.
 86. Weigle, W.O. and C.G. Romball. 1997. CD4⁺ T-cell subsets and cytokines involved in peripheral tolerance. *Immunol.Today* 18:533-538.
 87. Vella, A.T., J.E. McCormack, P.S. Linsley, J.W. Kappler, and P. Marrack. 1995. Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death. *Immunity.*

2:261-270.

88. Kurts, C., W.R. Heath, H. Kosaka, J.F. Miller, and F.R. Carbone. 1998. The peripheral deletion of autoreactive CD8⁺ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo- 1). *J.Exp.Med.* 188:415-420.
89. Sherman, L.A. and S. Chattopadhyay. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu.Rev.Immunol.* 11:385-402:385-402.
90. Burrows, S.R., S.L. Silins, R. Khanna, J.M. Burrows, M. Rischmueller, J. McCluskey, and D.J. Moss. 1997. Cross-reactive memory T cells for Epstein-Barr virus augment the alloresponse to common human leukocyte antigens: degenerate recognition of major histocompatibility complex-bound peptide by T cells and its role in alloreactivity. *Eur.J.Immunol.* 27:1726-1736.
91. Lindahl, K.F. and D.B. Wilson. 1977. Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency and specificity of precursors. *J.Exp.Med.* 145:508-522.
92. Bragado, R., P. Lauzurica, D. Lopez, and J.A. Lopez de Castro. 1990. T cell receptor V beta gene usage in a human alloreactive response. Shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J.Exp.Med.* 171:1189-1204.
93. Lauzurica, P., R. Bragado, D. Lopez, B. Galocha, and J.A. Lopez de Castro. 1992. Asymmetric selection of T cell antigen receptor alpha- and beta- chains in HLA-B27 alloreactivity. *J.Immunol.* 148:3624-3630.
94. Barber, D.F., D. Lopez, and J.A. Lopez de Castro. 1995. T cell receptor diversity in alloreactive responses against HLA- B27 (B*2705) is limited by multiple-level restrictions in both alpha and beta chains. *Eur.J.Immunol.* 25:2479-2485.
95. Goronzy, J.J., C. Xie, W. Hu, S.K. Lundy, and C.M. Weyand. 1993. Restrictions in the repertoire of allospecific T cells. Contribution of the alpha-helical sequence polymorphism of HLA-DR molecules. *J.Immunol.* 151:825-836.
96. Geiger, M.J., J. Gorski, and D.D. Eckels. 1991. T cell receptor gene segment utilization by HLA-DR1-alloreactive T cell clones. *J.Immunol.* 147:2082-2087.
97. Steinle, A., C. Reinhardt, P. Jantzer, and D.J. Schendel. 1995. In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. *J.Exp.Med.* 181:503-513.
98. Lobashevsky, A., M. Kotb, and A.O. Gaber. 1996. Selective T cell receptor Vbeta gene usage by alloreactive T cells responding to defined HLA-DR alleles. *Transplantation*

62:1332-1340.

99. Li, Y.Y., K.D. Smith, Y. Shi, and C.T. Lutz. 1996. Alloreactive anti-HLA-B7 cytolytic T cell clones use restricted T cell receptor genes. *Transplantation* 62:954-961.
100. Matis, L.A. 1990. The molecular basis of T-cell specificity. *Annu.Rev.Immunol.* 8:65-82:65-82.
101. Thorsby, E. 1997. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum.Immunol.* 53:1-11.
102. Wekerle, H., M. Bradl, C. Linington, G. Kaab, and K. Kojima. 1996. The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol.Rev.* 149:231-43:231-243.
103. Lanzavecchia, A. 1995. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity?. *J.Exp.Med.* 181:1945-1948.
104. von Herrath, M.G. and M.B. Oldstone. 1996. Virus-induced autoimmune disease. *Curr.Opin.Immunol.* 8:878-885.
105. Opdenakker, G. and J. Van Damme. 1994. Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases. *Immunol.Today* 15:103-107.
106. Vidard, L., K.L. Rock, and B. Benacerraf. 1992. Heterogeneity in antigen processing by different types of antigen- presenting cells. Effect of cell culture on antigen processing ability. *J.Immunol.* 149:1905-1911.
107. Butz, E.A. and M.J. Bevan. 1998. Differential presentation of the same MHC class I epitopes by fibroblasts and dendritic cells. *J.Immunol.* 160:2139-2144.
108. Quaratino, S., M. Feldmann, C.M. Dayan, O. Acuto, and M. Londei. 1996. Human self-reactive T cell clones expressing identical T cell receptor beta chains differ in their ability to recognize a cryptic self-epitope. *J.Exp.Med.* 183:349-358.
109. Simitsek, P.D., D.G. Campbell, A. Lanzavecchia, N. Fairweather, and C. Watts. 1995. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J.Exp.Med.* 181:1957-1963.
110. Salemi, S., A.P. Caporossi, L. Boffa, M.G. Longobardi, and V. Barnaba. 1995. HIVgp120 activates autoreactive CD4-specific T cell responses by unveiling of hidden CD4 peptides during processing. *J.Exp.Med.* 181:2253-2257.
111. di Marzo Veronese, F., D. Arnott, V. Barnaba, D.J. Loftus, K. Sakaguchi, C.B. Thompson, S. Salemi, C. Mastroianni, A. Sette, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and E. Appella. 1996.



- Autoreactive cytotoxic T lymphocytes in human immunodeficiency virus type 1-infected subjects. *J.Exp.Med.* 183:2509-2516.
112. Sercarz, E.E., P.V. Lehmann, A. Ametani, G. Benichou, A. Miller, and K. Moudgil. 1993. Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu.Rev.Immunol.* 11:729-66:729-766.
 113. Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, C. Giachino, and A. Lanzavecchia. 1995. Dual receptor T-cells. Implications for alloreactivity and autoimmunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 756:66-70:66-70.
 114. Barnaba, V. and F. Sinigaglia. 1997. Molecular mimicry and T cell-mediated autoimmune disease. *J.Exp.Med.* 185:1529-1531.
 115. Oldstone, M.B. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50:819-820.
 116. Evavold, B.D., J. Sloan-Lancaster, K.J. Wilson, J.B. Rothbard, and P.M. Allen. 1995. Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity.* 2:655-663.
 117. May, E., R. Duchmann, B. Ackermann, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, and E. Marker Hermann. 1996. TCRB junctional regions from HLA-B27-restricted T cells and HLA- B27 binding peptides display conserved hydropathy profiles in the absence of primary sequence homology. *Int.Immunol.* 8:1815-1823.
 118. Zhao, Z.S., F. Granucci, L. Yeh, P.A. Schaffer, and H. Cantor. 1998. Molecular Mimicry by Herpes Simplex Virus-Type 1: Autoimmune Disease After Viral Infection. *Science* 279:1344-1347.
 119. Akbar, A.N., N.J. Borthwick, R.G. Wickremasinghe, P. Panayoitidis, D. Pilling, M. Bofill, S. Krajewski, J.C. Reed, and M. Salmon. 1996. Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro- apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *Eur.J.Immunol.* 26:294-299.
 120. Gombert, W., N.J. Borthwick, D.L. Wallace, H. Hyde, M. Bofill, D. Pilling, P.C. Beverley, G. Janossy, M. Salmon, and A.N. Akbar. 1996. Fibroblasts prevent apoptosis of IL-2-deprived T cells without inducing proliferation: a selective effect on Bcl-XL expression. *Immunology* 89:397-404.
 121. Salmon, M., D. Scheel-Toellner, A.P. Huissoon, D. Pilling, N. Shamsadeen, H. Hyde, A.D. D'Angeac, P.A. Bacon, P. Emery, and A.N. Akbar. 1997. Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *J.Clin.Invest.* 99:439-446.
 122. Salmon, M., D. Pilling, N.J. Borthwick, and A.N. Akbar. 1997. Inhibition of T Cell

- Apoptosis -a Mechanism for Persistence in Chronic Inflammation. *the immunologist* 5:87-92.
123. Vanderlugt, C.J. and S.D. Miller. 1996. Epitope spreading. *Curr.Opin.Immunol.* 8:831-836.
124. Barnaba, V., C. Watts, M. de Boer, P. Lane, and A. Lanzavecchia. 1994. Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur.J.Immunol.* 24:71-75.
125. Rondon, G., S. Giralt, M. Pereira, K. Van Besien, R. Mehra, R. Champlin, and M. Andreeff. 1997. Analysis of chimerism following allogeneic bone marrow transplantation by fluorescent-in-situ hybridization. *Leuk.Lymphoma.* 25:463-467.
126. Sviland, L., A.D. Pearson, M.A. Green, B.D. Baker, E.J. Eastham, M.M. Reid, P.J. Hamilton, S.J. Proctor, and A.J. Malcolm. 1991. Immunopathology of early graft-versus-host disease--a prospective study of skin, rectum, and peripheral blood in allogeneic and autologous bone marrow transplant recipients. *Transplantation* 52:1029-1036.
127. Diamond, D.J., K.L. Chang, K.A. Jenkins, and S.J. Forman. 1995. Immunohistochemical analysis of T cell phenotypes in patients with graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 59:1436-1444.
128. Paller, A.S., A. Nelson, L. Steffen, L. Gottschalk, and H. Kaizer. 1988. T-lymphocyte subsets in the lesional skin of allogeneic and autologous bone marrow transplant patients. *Arch.Dermatol.* 124:1795-1801.
129. Brubaker, D.B. 1993. Immunopathogenic mechanisms of posttransfusion graft-vs-host disease. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 202:122-147.
130. Ferrara, J.L. 1993. Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Curr.Opin.Immunol.* 5:794-799.
131. Vogelsang, G.B. and A.D. Hess. 1994. Graft-versus-host disease: new directions for a persistent problem. *Blood* 84:2061-2067.
132. Weiden, P.L., K.M. Sullivan, N. Flournoy, R. Storb, and E.D. Thomas. 1981. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N.Engl.J.Med.* 304:1529-1533.
133. Mackinnon, S., E.B. Papadopoulos, M.H. Carabasi, L. Reich, N.H. Collins, F. Boulad, H. Castro-Malaspina, B.H. Childs, A.P. Gillio, and N.A. Kernan. 1995. Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood* 86:1261-1268.

134. Theobald, M. 1995. Predicting graft-versus-host disease. *Curr.Opin.Immunol.* 7:649-655.
135. Dickinson, A.M., L. Sviland, P.J. Hamilton, P. Usher, P. Taylor, G. Jackson, J. Dunn, and S.J. Proctor. 1994. Cytokine involvement in predicting clinical graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 13:65-70.
136. Liu, X., V. Chesnokova, S.J. Forman, and D.J. Diamond. 1996. Molecular analysis of T-cell receptor repertoire in bone marrow transplant recipients: evidence for oligoclonal T-cell expansion in graft-versus-host disease lesions. *Blood* 87:3032-3044.
137. Kubo, K., K. Yamanaka, H. Kiyoi, H. Fukutani, M. Ito, R. Hayakawa, R. Ohno, and T. Naoe. 1996. Different T-cell receptor repertoires between lesions and peripheral blood in acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 87:3019-3026.
138. Dietrich, P.Y., A. Caignard, A. Lim, V. Chung, J.L. Pico, C. Pannetier, P. Kourilsky, T. Hercend, J. Even, and F. Triebel. 1994. In vivo T-cell clonal amplification at time of acute graft-versus-host disease. *Blood* 84:2815-2820.
139. Moreau, P. and A. Cesbron. 1994. HLA-DP and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 13:675-681.
140. Gaschet, J., G. Gallot, C. Ibisch, A. Lim, J. Even, R. Vivien, M.M. Hallet, N. Milpied, and H. Vie. 1998. Acute graft-versus-host disease after bone marrow transplantation with a single HLA-DPB1*1001 mismatch: involvement of different TCRBV subsets. *Bone Marrow Transplant.* 22:385-392.
141. Odum, N., P. Platz, B.K. Jakobsen, C.M. Petersen, N. Jacobsen, J. Moller, L.P. Ryder, L. Lamm, and A. Svejgaard. 1987. HLA-DP and bone marrow transplantation: DP-incompatibility and severe acute graft versus host disease. *Tissue Antigens.* 30:213-216.
142. Dougados, M., S. van der Linden, R. Juhlin, B. Huitfeldt, B. Amor, A. Calin, A. Cats, B. Dijkmans, I. Olivieri, and G. Pasero. 1991. The European Spondylarthropathy Study Group preliminary criteria for the classification of spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 34:1218-1227.
143. Amor, B., M. Dougados, and M. Mijiyawa. 1990. [Criteria of the classification of spondylarthropathies]. *Rev.Rhum.Mal.Osteoartic.* 57:85-89.
144. Collantes-Estevez, E., d.M. Ciscal, and E. Munoz-Gomariz. 1995. Assessment of 2 systems of spondyloarthropathy diagnostic and classification criteria (Amor and ESSG) by a Spanish multicenter study. European Spondyloarthropathy Study Group. *J.Rheumatol.* 22:246-251.
145. Braun, J. and J. Sieper. 1996. The sacroiliac joint in the spondyloarthropathies.

Curr.Opin.Rheumatol. 8:275-287.

146. Simon, A.K., E. Seipelt, and J. Sieper. 1994. Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:8562-8566.
147. Grom, A.A., K.J. Murray, L. Luyrink, H. Emery, M.H. Passo, D.N. Glass, T. Bowlin, and C.3. Edwards. 1996. Patterns of expression of tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta, and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy. *Arthritis Rheum.* 39:1703-1710.
148. Wong, W.M., W.M. Howell, S.D. Coy, M.I. Cawley, and J.L. Smith. 1996. Interleukin-2 is found in the synovium of psoriatic arthritis and spondyloarthritis, not in rheumatoid arthritis. *Scand.J.Rheumatol.* 25:239-245.
149. Murray, K.J., A.A. Grom, S.D. Thompson, D. Lieuwen, M.H. Passo, and D.N. Glass. 1998. Contrasting cytokine profiles in the synovium of different forms of juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondyloarthropathy: prominence of interleukin 4 in restricted disease. *J.Rheumatol.* 25:1388-1398.
150. Braun, J., M. Bollow, L. Neure, E. Seipelt, F. Seyrekbasan, H. Herbst, U. Eggens, A. Distler, and J. Sieper. 1995. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 38:499-505.
151. Kidd, B.L., K. Moore, M.T. Walters, J.L. Smith, and M.I. Cawley. 1989. Immunohistological features of synovitis in ankylosing spondylitis: a comparison with rheumatoid arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* 48:92-98.
152. Bergroth, V., Y.T. Konttinen, P. Nykanen, R. von Essen, and K. Koota. 1985. Proliferating cells in the synovial fluid in rheumatic disease. An analysis with autoradiography-immunoperoxidase double staining. *Scand.J.Immunol.* 22:383-388.
153. Lopez de Castro, J.A. 1998. The pathogenetic role of HLA-B27 in chronic arthritis. *Curr.Opin.Immunol.* 10:59-66.
154. Yamaguchi, A., N. Tsuchiya, H. Mitsui, M. Shiota, A. Ogawa, K. Tokunaga, S. Yoshinoya, T. Juji, and K. Ito. 1995. Association of HLA-B39 with HLA-B27-negative ankylosing spondylitis and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis in Japanese patients. Evidence for a role of the peptide-anchoring B pocket. *Arthritis Rheum.* 38:1672-1677.
155. Khan, M.A., I. Kushner, and W.E. Braun. 1978. B27-negative HLA-BW16 in ankylosing spondylitis. *Lancet* 1:1370-1371.
156. Sieper, J. and J. Braun. 1995. Pathogenesis of spondylarthropathies. Persistent bacterial

- antigen, autoimmunity, or both? *Arthritis Rheum.* 38:1547-1554.
157. Scofield, R.H., B. Kurien, T. Gross, W.L. Warren, and J.B. Harley. 1995. HLA-B27 binding of peptide from its own sequence and similar peptides from bacteria: implications for spondyloarthropathies. *Lancet* 345:1542-1544.
158. Garcia, F., A. Marina, J.P. Albar, and J.A. Lopez de Castro. 1997. HLA-B27 presents a peptide from a polymorphic region of its own molecule with homology to proteins from arthritogenic bacteria. *Tissue Antigens.* 49:23-28.
159. Gao, X.M., P. Wordsworth, A.J. McMichael, M.M. Kyaw, M. Seifert, D. Rees, and G. Dougan. 1996. Homocysteine modification of HLA antigens and its immunological consequences. *Eur.J.Immunol.* 26:1443-1450.
160. Khare, S.D., J. Hansen, H.S. Luthra, and C.S. David. 1996. HLA-B27 heavy chains contribute to spontaneous inflammatory disease in B27/human beta2-microglobulin (beta2m) double transgenic mice with disrupted mouse beta2m. *J.Clin.Invest.* 98:2746-2755.
161. David, C.S. 1997. The mystery of HLA-B27 and disease. *Immunogenetics* 46:73-77.
162. Fiorillo, M.T., L. Meadows, M. D'Amato, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, E. Appella, and R. Sorrentino. 1997. Susceptibility to ankylosing spondylitis correlates with the C- terminal residue of peptides presented by various HLA-B27 subtypes. *Eur.J.Immunol.* 27:368-373.
163. Calin, A., J. Elswood, and P.T. Klouda. 1989. Destructive arthritis, rheumatoid factor, and HLA-DR4. Susceptibility versus severity, a case-control study. *Arthritis Rheum.* 32:1221-1225.
164. Brown, M.A., L.G. Kennedy, A.J. MacGregor, C. Darke, E. Duncan, J.L. Shatford, A. Taylor, A. Calin, and P. Wordsworth. 1997. Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment. *Arthritis Rheum.* 40:1823-1828.
165. Ahvonen, P., K. Sievers, and K. Aho. 1969. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta Rheumatol.Scand.* 15:232-253.
166. Keat, A. 1983. Reiter's syndrome and reactive arthritis in perspective. *N.Engl.J.Med.* 309:1606-1615.
167. Benjamin, R. and P. Parham. 1990. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol.Today* 11:137-142.
168. Hermann, E., B. Sucke, U. Droste, and K.H. Meyer Zum Buschenfelde. 1995. Klebsiella pneumoniae-reactive T cells in blood and synovial fluid of patients with ankylosing spondylitis. Comparison with HLA-B27⁺ healthy control subjects in a limiting dilution study

- and determination of the specificity of synovial fluid T cell clones. *Arthritis Rheum.* 38:1277-1282.
169. Lugerling, N., T. Kucharzik, M. Fisahn, W. Domschke, and R. Stoll. 1996. Crohn's disease (CD) patients suffering from peripheral arthritis or ankylosing spondylitis reveal restricted T cell receptor V beta regions in different temporal phases of disease. *Clin.Exp.Immunol.* 105:278-284.
170. Mikecz, K., T.T. Glant, M. Baron, and A.R. Poole. 1988. Isolation of proteoglycan-specific T lymphocytes from patients with ankylosing spondylitis. *Cell Immunol.* 112:55-63.
171. Hermann, E., A.W. Lohse, R. Van der Zee, W. Van Eden, W.J. Mayet, P. Probst, T. Poralla, z.B.K. Meyer, and B. Fleischer. 1991. Synovial fluid-derived Yersinia-reactive T cells responding to human 65- kDa heat-shock protein and heat-stressed antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.* 21:2139-2143.
172. Hermann, E., B. Fleischer, W.J. Mayet, T. Poralla, and K.H. Meyer Zum Buschenfelde. 1989. Response of synovial fluid T cell clones to Yersinia enterocolitica antigens in patients with reactive Yersinia arthritis. *Clin.Exp.Immunol.* 75:365-370.
173. Probst, P., E. Hermann, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, and B. Fleischer. 1993. Identification of the Yersinia enterocolitica urease beta subunit as a target antigen for human synovial T lymphocytes in reactive arthritis. *Infect.Immun.* 61:4507-4509.
174. Hermann, E., W.J. Mayet, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, and B. Fleischer. 1992. MHC-unrestricted recognition of bacteria-infected target cells by human CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Cell Immunol.* 143:253-260.
175. Hermann, E., D.T. Yu, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, and B. Fleischer. 1993. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 342:646-650.
176. Duchmann, R., E. May, B. Ackermann, B. Goergen, K.H. Meyer Zum Buschenfelde, and E. Marker Hermann. 1996. HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self-antigens are dominated by closely related TCRBV gene segments. A study in patients with reactive arthritis. *Scand.J.Immunol.* 43:101-108.
177. Weber, F., E. Meinel, K. Drexler, A. Czlonkowska, S. Huber, H. Fickenscher, I. Muller-Fleckenstein, B. Fleckenstein, H. Wekerle, and R. Hohlfeld. 1993. Transformation of human T-cell clones by Herpesvirus saimiri: intact antigen recognition by autonomously growing myelin basic protein- specific T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:11049-11053.
178. Saadawi, A.M., F. L'Faqihi, B.Y. Diab, M.A. Sol, G. Enault, H. Coppin, A. Cantagrel, B. Biesinger, B. Fleckenstein, and M. Thomsen. 1997. Dominant clones in immortalized T-cell

- lines from rheumatoid arthritis synovial membranes. *Tissue Antigens*. 49:431-437.
179. Meinel, E., R. Hohlfeld, H. Wekerle, and B. Fleckenstein. 1995. Immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri. *Immunol.Today* 16:55-58.
 180. Berend, K.R., J.U. Jung, T.J. Boyle, J.M. DiMaio, S.A. Mungal, R.C. Desrosiers, and H.K. Lyerly. 1993. Phenotypic and functional consequences of herpesvirus saimiri infection of human CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *J.Virol.* 67:6317-6321.
 181. Mittrucker, H.W., I. Muller-Fleckenstein, B. Fleckenstein, and B. Fleischer. 1993. Herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes: normal functional phenotype and preserved T cell receptor signalling. *Int.Immunol.* 5:985-990.
 182. Gorski, J., M. Yassai, X. Zhu, B. Kissela, B.c.t.K.B. Kissella, C. Keever, and N. Flomenberg. 1994. Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. *J.Immunol.* 152:5109-5119.
 183. Posnett, D.N., R. Sinha, S. Kabak, and C. Russo. 1994. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy". *J.Exp.Med.* 179:609-618.
 184. Gregersen, P.K., R. Hingorani, and J. Monteiro. 1995. Oligoclonality in the CD8⁺ T-cell population. Analysis using a multiplex PCR assay for CDR3 length. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 756:19-27:19-27.
 185. Struyk, L., G.E. Hawes, R.J. Dolhain, A. van Scherpenzeel, B. Godthelp, F.C. Breedveld, and P.J. van den Elsen. 1994. Evidence for selective in vivo expansion of synovial tissue-infiltrating CD4⁺ CD45RO⁺ T lymphocytes on the basis of CDR3 diversity. *Int.Immunol.* 6:897-907.
 186. Morley, J.K., F.M. Batliwalla, R. Hingorani, and P.K. Gregersen. 1995. Oligoclonal CD8⁺ T cells are preferentially expanded in the CD57⁺ subset. *J.Immunol.* 154:6182-6190.
 187. Miller, S.A., D.D. Dykes, and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic.Acids.Res.* 16:1215
 188. Lefranc, M.P., A. Forster, and T.H. Rabbitts. 1986. Rearrangement of two distinct T-cell gamma-chain variable-region genes in human DNA. *Nature* 319:420-422.
 189. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* 98:503-517.
 190. Kolstad, A., A. Bratlie, and K. Hannestad. 1989. A cytotoxic human-human hybridoma

- antibody (TrC7) specific for HLA-A29. *Tissue Antigens*. 33:542-545.
191. Lepage, V., I. Khalil, C. Douay, C. Mallet, M.N. Loste, L. Morin, J. Hors, and J. Colombani. 1991. Local analysis of HLA class II monoclonal antibodies (mAb) proposed for prescreening for the 11th International Histocompatibility Workshop. *Tissue Antigens*. 37:44-48.
 192. Shookster, L., T. Matsuyama, G. Burmester, and R. Winchester. 1987. Monoclonal antibody 1a3 recognizes a monomorphic epitope unique to DQ molecules. *Hum.Immunol*. 20:59-70.
 193. Heyes, J., P. Austin, J. Bodmer, W. Bodmer, A. Madrigal, M.C. Mazzilli, and J. Trowsdale. 1986. Monoclonal antibodies to HLA-DP-transfected mouse L cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 83:3417-3421.
 194. de Vries, J.E. and H. Spits. 1984. Cloned human cytotoxic T lymphocyte (CTL) lines reactive with autologous melanoma cells. I. In vitro generation, isolation, and analysis to phenotype and specificity. *J.Immunol*. 132:510-519.
 195. Carrera, A.C., F. Sanchez-Madrid, M. Lopez-Botet, C. Bernabeu, and M.O. De Landazuri. 1987. Involvement of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation. *Eur.J.Immunol*. 17:179-186.
 196. Malissen, B., N. Rebai, A. Liabeuf, and C. Mawas. 1982. Human cytotoxic T cell structures associated with expression of cytolysis. I. Analysis at the clonal cell level of the cytolysis-inhibiting effect of 7 monoclonal antibodies. *Eur.J.Immunol*. 12:739-747.
 197. Donnadieu, E., D. Cefai, Y.P. Tan, G. Paresys, G. Bismuth, and A. Trautmann. 1992. Imaging early steps of human T cell activation by antigen- presenting cells. *J.Immunol*. 148:2643-2653.
 198. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5463-5467.
 199. Kellberg, J.H., M.R. Jeffrey, and J. Ball. 1963. The Epidemiology of Chronic Rheumatism. Anonymous Blackwell Scientific Publications, 326-327.
 200. Gofton, J.P., J.S. Lawrence, P.H. Bennet, and T.A. Burch. 1966. Sacroiliitis in Eight Populations. *Ann.Rheum.Dis*. 25:528-533.
 201. Waase, I., C. Kayser, P.J. Carlson, J.J. Goronzy, and C.M. Weyand. 1996. Oligoclonal T cell proliferation in patients with rheumatoid arthritis and their unaffected siblings. *Arthritis Rheum*. 39:904-913.
 202. Grabstein, K., S. Dower, S. Gillis, D. Urdal, and A. Larsen. 1986. Expression of interleukin

- 2, interferon-gamma, and the IL 2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. *J.Immunol.* 136:4503-4508.
203. Speir, J.A., K.C. Garcia, A. Brunmark, M. Degano, P.A. Peterson, L. Teyton, and I.A. Wilson. 1998. Structural basis of 2C TCR allorecognition of H-2Ld peptide complexes. *Immunity.* 8:553-562.
204. Daniel, C., S. Horvath, and P.M. Allen. 1998. A basis for alloreactivity: MHC helical residues broaden peptide recognition by the TCR. *Immunity.* 8:543-552.
205. Hansen, T., K.E. Lundin, G. Markussen, and E. Thorsby. 1992. T cell receptor usage by HLA-DQw8-specific T cell clones. *Int.Immunol.* 4:931-934.
206. Prevost-Blondel, A., R. Lengagne, F. Letourneur, C. Pannetier, E. Gomard, and J.G. Guillet. 1997. In vivo longitudinal analysis of a dominant TCR repertoire selected in human response to influenza virus. *Virology* 233:93-104.
207. Hingorani, R., I.H. Choi, P. Akolkar, B. Gulwani-Akolkar, R. Pergolizzi, J. Silver, and P.K. Gregersen. 1993. Clonal predominance of T cell receptors within the CD8⁺ CD45RO⁺ subset in normal human subjects. *J.Immunol.* 151:5762-5769.
208. Khare, S.D., H.S. Luthra, and C.S. David. 1995. Spontaneous inflammatory arthritis in HLA-B27 transgenic mice lacking beta 2-microglobulin: a model of human spondyloarthropathies. *J.Exp.Med.* 182:1153-1158.
209. Moss, P.A., R.J. Moots, W.M. Rosenberg, S.J. Rowland-Jones, H.C. Bodmer, A.J. McMichael, and J.I. Bell. 1991. Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:8987-8990.
210. Gaschet, J., C. Denis, N. Milpied, M.M. Hallet, F. Romagne, A. Necker, R. Vivien, J. David-Ameline, F. Davodeau, and M. Bonneville. 1995. Alterations of T cell repertoire after bone marrow transplantation: characterization of over-represented subsets. *Bone Marrow Transplant.* 16:427-435.
211. Nishimura, M., S. Uchida, S. Mitsunaga, Y. Yahagi, K. Nakajima, K. Tadokoro, and T. Juji. 1997. Identification of HLA class II antigens as the targets of effector clones which may cause transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transfus.Med.* 7:89-94.
212. Gaschet, J., A. Lim, L. Liem, R. Vivien, M.M. Hallet, J.L. Harousseau, J. Even, E. Goulmy, M. Bonneville, N. Milpied, and H. Vie. 1996. Acute graft versus host disease due to T lymphocytes recognizing a single HLA-DPB1*0501 mismatch. *J.Clin.Invest.* 98:100-107.

213. Orosz, C.G., P.W. Adams, and R.M. Ferguson. 1987. Frequency of human alloantigen-reactive T lymphocytes. II. Method for limiting dilution analysis of alloantigen-reactive helper T cells in human peripheral blood. *Transplantation* 43:718-724.
214. Gaschet, J., B. Mahe, N. Milpied, M.C. Devilder, B. Dreno, J.D. Bignon, F. Davodeau, M.M. Hallet, M. Bonneville, and H. Vie. 1993. Specificity of T cells invading the skin during acute graft-vs.-host disease after semiallogeneic bone marrow transplantation. *J.Clin.Invest.* 91:12-20.
215. Nikaiein, A., T. Poole, R. Fishbeck, G. Ordonez, L. Dombrasusky, M.J. Stone, R.H.J. Collins, and J.W. Fay. 1994. Characterization of skin-infiltrating cells during acute graft-versus- host disease following bone marrow transplantation using unrelated marrow donors. *Hum.Immunol.* 40:68-76.
216. Orosz, C.G. and D.K. Bishop. 1990. Limiting dilution analysis of alloreactive T-cell status and distribution during allograft rejection. *Hum.Immunol.* 28:72-81.
217. Feng, H.M., A.L. Glasebrook, H.D. Engers, and J.A. Louis. 1983. Clonal analysis of T cell unresponsiveness to alloantigens induced by neonatal injection of F1 spleen cells into parental mice. *J.Immunol.* 131:2165-2169.
218. Miller, R.A., M.K. Rozans, A.A. Ythier, and T.B. Strom. 1986. Stages of T cell activation: continued antigen dependence of IL 2- producing cells after IL 2 receptor expression. *J.Immunol.* 136:977-983.
219. Heidecke, C.D., R. Brauer, J. Schneider-Eicke, T. Schilling, S. Wolff, and T. Diamantstein. 1990. Direct evidence of a functional separation of alloreactive T lymphocytes from bystander cells infiltrating rat allografts. Interleukin 2 receptor-positive cells reacting with the monoclonal antibody ART 18 mediating second-set rejection. *Transplantation* 50:101-106.
220. Lonnqvist, B., P. Ljungman, M. Norrby, O. Olerup, O. Ringden, and J. Winiarski. 1995. Less acute GVHD in patients receiving totally matched transplants from unrelated donors. *Transplant.Proc.* 27:3528-3529.
221. Yamanaka, K., Kwok, W. W., Mickelson, E. M., Masewicz, S., Smith, F., and Nepom, G. T. Selective T-cell-receptor gene usage in allorecognition and Graft-versus-Host disease. *Transplantation* 55, 1167-1175. 1993.
222. Pawelec, G., G. Ehninger, H. Schmidt, and P. Wernet. 1986. HLA-DP matching and graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 42:558-560.

223. Nomura, N., M. Ota, S. Kato, H. Inoko, and K. Tsuji. 1991. Severe acute graft-versus-host disease by HLA-DPB1 disparity in recombinant family of bone marrow transplantation between serologically HLA-identical siblings: an application of the polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism method. *Hum.Immunol.* 32:261-268.
224. Kato, Y., Y. Mitsuishi, M. Cecka, J. Hopfield, L. Hunt, R. Champlin, P.I. Terasaki, and J.L. Gajewski. 1991. HLA-DP incompatibilities and severe graft-versus-host disease in unrelated bone marrow transplants. *Transplantation* 52:374-376.
225. Dietrich, P.Y., A. Caignard, A. Diu, C. Genevee, J.L. Pico, M. Henry-Amar, J. Bosq, E. Angevin, F. Triebel, and T. Hercend. 1992. Analysis of T-cell receptor variability in transplanted patients with acute graft-versus-host disease. *Blood* 80:2419-2424.
226. Tiberghien, P., C.W. Reynolds, J. Keller, S. Spence, M. Deschaseaux, J.M. Certoux, E. Contassot, W.J. Murphy, R. Lyons, and Y. Chiang. 1994. Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood* 84:1333-1341.
227. Schlegel, P.G. 1997. The role of adhesion and costimulation molecules in graft-versus-host disease. *Acta Haematol.* 97:105-117.
228. Poritz, L.S., G.J. Olt, F.M. Ruggiero, P. Colony, A.F. Tilberg, and W.A. Koltun. 1998. Increased LFA-1 expression in intestines of rats with GVHD after small bowel transplantation. *Dig.Dis.Sci.* 43:221-228.
229. Poritz, L.S., A.F. Tilberg, and W.A. Koltun. 1997. Decreased expression of LFA-1 on peripheral blood lymphocytes in graft versus host disease. *J.Surg.Res.* 69:316-320.
230. Khalkhali-Ellis, Z., S.T. Roodman, A.P. Knutsen, K.R. Mueller, B. Chauhan, T.L. Moore, and M.J. Hendrix. 1998. Expression of macrophage markers by a population of T cells obtained from synovial fluid of a subgroup of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 25:352-360.
231. Murray, K.J., A.A. Grom, S.D. Thompson, D. Lieuwen, M.H. Passo, and D.N. Glass. 1998. Contrasting cytokine profiles in the synovium of different forms of juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondyloarthritis: prominence of interleukin 4 in restricted disease. *J.Rheumatol.* 25:1388-1398.
232. White, J., A. Herman, A.M. Pullen, R. Kubo, J.W. Kappler, and P. Marrack. 1989. The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 56:27-35.
233. Kappler, J., B. Kotzin, L. Herron, E.W. Gelfand, R.D. Bigler, A. Boylston, S. Carrel, D.N. Posnett, Y. Choi, and P. Marrack. 1989. V beta-specific stimulation of human T cells by

staphylococcal toxins. *Science* 244:811-813.

234. Hayashi, Y., H. Hamano, N. Haneji, N. Ishimaru, and K. Yanagi. 1995. Biased T cell receptor V beta gene usage during specific stages of the development of autoimmune sialadenitis in the MRL/lpr mouse model of Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 38:1077-1084.
235. Mamula, M.J. 1998. Epitope spreading: the role of self peptides and autoantigen processing by B lymphocytes. *Immunol.Rev.* 164:231-9:231-239.
236. Zdichavsky, M., C. Schorpp, A. Nickels, B. Koch, M. Pfreundschuh, and A. Gause. 1996. Analysis of bcl-2⁺ lymphocyte subpopulations in inflammatory synovial infiltrates by a double-immunostaining technique. *Rheumatol.Int.* 16:151-157.
237. Hermann, E., B. Fleischer, and K.H. Meyer Zum Buschenfelde. 1994. Bacteria-specific cytotoxic CD8⁺ T cells: a missing link in the pathogenesis of the HLA-B27-associated spondylarthropathies. *Ann.Med.* 26:365-369.
238. Taurog, J.D. and R.E. Hammer. 1996. Experimental spondyloarthropathy in HLA-B27 transgenic rats. *Clin.Rheumatol.* 15 Suppl 1:22-27.
239. Herman, A., J.W. Kappler, P. Marrack, and A.M. Pullen. 1991. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 9:745-72:745-772.
240. Bhardwaj, V., V. Kumar, H.M. Geysen, and E.E. Sercarz. 1993. Degenerate recognition of a dissimilar antigenic peptide by myelin basic protein-reactive T cells. Implications for thymic education and autoimmunity. *J.Immunol.* 151:5000-5010.
241. Tallquist, M.D., T.J. Yun, and L.R. Pease. 1996. A single T cell receptor recognizes structurally distinct MHC/peptide complexes with high specificity. *J.Exp.Med.* 184:1017-1026.
242. Lehner, P.J., E.C. Wang, P.A. Moss, S. Williams, K. Platt, S.M. Friedman, J.I. Bell, and L.K. Borysiewicz. 1995. Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. *J.Exp.Med.* 181:79-91.
243. Pullen, A.M. and A.J. Munro. 1988. Fetal calf serum stimulates 'autoreactive' T-cell hybridomas. *Immunology* 63:255-260.
244. Wathélet, M.G., I.M. Clauss, J. Content, and G.A. Huez. 1988. Regulation of two interferon-inducible human genes by interferon, poly(rI).poly(rC) and viruses. *Eur.J.Biochem.* 174:323-329.

245. Wendling, D., E. Racadot, B. Auge, and E. Toussirot. 1998. Soluble intercellular adhesion molecule 1 in spondylarthropathies. *Clin.Rheumatol.* 17:202-204.

APÉNDICE.

(Publicaciones generadas a partir de los resultados reflejados la presente tesis)

HLA-Target Antigens and T-Cell Receptor Diversity of Activated T Cells Invading the Skin During Acute Graft-Versus-Host Disease

By Joëlle Gaschet, Miguel Angel Treviño, Michel Cherel, Regine Vivien, Almudena Garcia-Sahuquillo, Marie-Martine Hallet, Marc Bonneville, Jean-Luc Harrousseau, Rafael Bragado, Noël Milpied, and Henri Vié

To study the repertoire and specificity of T lymphocytes infiltrating skin lesions during graft-versus-host disease (GVHD), we performed an exhaustive molecular and functional analysis of 146 T-cell clones derived from the skin of three patients undergoing an acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation (BMT) from HLA-mismatched related donors. Analysis of T-cell receptor (TCR) rearrangement and TCR chain junctional sequences demonstrated the presence of 11 distinct clones among the 64 derived from patient UPN1, six among the 58 derived from patient UPN2, and seven among the 24 derived from patient UPN3. Three of the 11 T-cell clones from patient UPN1, and all clones from patients UPN2 and UPN3 reacted with mis-

matched HLA alleles between the bone-marrow donor and recipient. Moreover, both HLA class I (HLA-A2 and -B27) and class II (HLA-DP101, DP401, DP1301, DQ8, and DR402) molecules were recognized during this early antihost response. Finally, both TCR α and β chains turned out to be extremely diverse, even within populations of clones derived from the same patient and directed against the same HLA allele. Taken together, these results indicate that any HLA mismatch is potentially targeted during early GVHD, and that the T-cell response at the onset of GVHD is both oligoclonal and highly diversified.

© 1996 by The American Society of Hematology.

ALLOGENEIC BONE MARROW transplantation (BMT) is an important therapeutic option that can cure certain malignant and nonmalignant diseases. Its chief complication, the acute graft-versus-host disease (GVHD),¹ is caused by T lymphocytes and is indissociable from the beneficial antileukemic reaction known as the graft versus leukemia (GVL) effect, which is also mediated by T cells. Accordingly, efforts to eliminate GVHD through T-cell depletion have led to increased relapses, the overall picture of depletion being negative.² $\alpha\beta$ T lymphocytes, the main effectors of the allogeneic reaction, possess antigenic receptors whose variable regions are made up of a combination of different T-cell receptor (TCR)-V, -D and -J elements (VDJ for β chains and VJ for α chains). Besides this combinatorial diversity, a junctional diversity is produced by the addition or removal of nucleotides at the junctions of the rearranged genes. Combinatorial and junctional diversity of T-cell receptors are now both amenable to analysis: the former by using TCR-V region specific monoclonal antibodies (MoAbs) and the latter by studying CDR3 length using recently developed techniques.^{3,4} Determining the T-cell response diversity in GVHD is particularly crucial as, if a restricted T-cell repertoire is involved, this repertoire could be specifically removed.⁵ This would permit specific therapy with less global immunosuppression.

The two major observations in favor of such a possibility are the following: (1) acute GVHD occurs very rapidly after BMT, at a time when T-cell reconstitution is just starting. Indeed, numerous T-cell repertoire alterations have recently been documented during this period, demonstrating that a few T-cell clones can represent an important proportion of the T-cell pool at the time GVHD occurs.⁶⁻⁹ (2) The main immunological characteristic of GVHD is its tissue specificity. This might lead to an even more restricted response as T cells can distinguish between major histocompatibility complex (MHC) molecules on different cell types.¹⁰⁻¹² To determine whether or not the T-cell response is restricted during acute GVHD, we first developed a method to isolate *in vivo* activated T cells from the skin. Next, we characterized both the diversity of the HLA-target antigens recognized during the GVHD process by these T cells and the diversity of their TCR. A total of 146 T-cell clones derived from four skin biopsies performed on three patients at the onset of

acute GVHD were studied. The results obtained support the view that activated T cells infiltrating the skin at the onset of GVHD are host specific and can recognize any HLA mismatch between donor and recipient. Moreover, this T-cell response appears at the same time oligoclonal and is highly diverse in terms of TCRV usage.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Four biopsies were obtained from three patients.

Patient UPN1. A 9-year-old boy was grafted for chronic myelogenous leukemia with his mother's bone marrow. HLA typing is indicated in Table 1. The conditioning regimen consisted of cyclophosphamide (120 mg/kg) and total body irradiation (TBI): 12 Gy through six fractions. GVHD prophylaxis consisted of cyclosporine A (CsA) and methotrexate (at days 1, 3, 6, and 11) and 5 mg/day of BB10, an anti-interleukin (IL-2R) antibody, for 10 days. GVHD was first suspected at day 13, but the first skin biopsy culture was negative. At day 34, GVHD was again suspected, and three skin biopsies were performed for histological study, immunocytochemistry, and culture. A large infiltrate was observed composed of 70% CD8⁺ and 5% CD4⁺ T cells; no CD1 Langerhans cells were detected. Keratinocytes expressed class II. Biopsy-confirmed GVHD was treated with CsA (3 mg/kg/d), corticosteroids (2 mg/kg/d), and BB10. Unfortunately, treatment failed and GVHD extended to gut and liver. The patient died at day 99 postgrafting.

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Unité 211), Nantes, cedex, France; Fundacion Jimenez Diaz, Department of Immunology, Madrid, Spain; and Centre Hospitalier Régional (CHR) Nantes, Service Hématologie, CHR Nantes Plateau Technique du CHR, Nantes, cedex, France.

Submitted August 22, 1995; accepted October 24, 1995.

Supported by an institutional grant from the INSERM and by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 94/0494) and Ministerio de Educacion y Ciencia (PM95-0047). M.A.T. and A.G. are fellows of the Fundacion Conchita Rabago.

Address reprint requests to Henri Vié, PhD, INSERM U211, Plateau Technique du CHR, Quai Moncoussu, 44035 Nantes cedex France.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734 solely to indicate this fact.

© 1996 by The American Society of Hematology.

0006-4971/96/8706-0018\$3.00/0

Table 1. HLA-Typing of Hosts, Donors, and Panel B Lymphoblastoid Cell Lines

Patients or BLCL	Sex	HLA-A	HLA-B	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DPB1
UPN1	M	1/2	7/8	3/13	2	0101/1901
UPN1 donor	F	1/1	7/8	3/13	2	0301/1901
UPN2	M	9(24)/32	17/27	4(w14)/8	4/8	0401/1001
UPN2 donor	F	9(24)/32	8/17	3/8	2/4	0601/1001
UPN3	M	1/29	44(12)/17	0402/7	2/8	1301/1901
UPN3 donor1	F	1/2	57(17)/62(15)	0402/11	7/8	0301/1301
UPN3 donor2	M	29/32	44(12)/40	7/14	2/5	0401/1901
2046	—	26	39	0402	7	—
BOL	M	2.2	w62.3	0401	8	0401
BSM	F	2.2	w62.3	0401	8	0201
BTB	M	2.2	27.5	0801	4	0401
DAB	—	2/11	18/55	8/11	2/4	0401/0501
IBW	M	33.1	w65	7	5	0101
JB10	—	26/28	38	0402	7	—
JHA	M	31	w51	0407	7	0301
JSM	—	26	38/16	0402	3	—
RML	M	2.4	51	1602	7	0402
ROU	F	2/3	51(5)/44(12)	4/13	6/7	0301/0301
RSH	M	68.1/30.3	w42	0302	4	0101/0402
T75	—	2.2	w46	0901	9	1301
TON	M	1/2	7/8	3/13	2	0101/01901
VAV	F	1	8	0301	2	0101
WT24	M	2.2	27.5	1602	2	0301

Patient UPN2. A 7-year old boy was grafted with his mother's bone marrow for acute lymphoblastic leukemia in second complete response. HLA typing is indicated in Table 1. The conditioning regimen consisted of TBI and high doses of cytarabine and melphalan. GVHD prophylaxis consisted of T-cell depletion of the graft using anti-CD2 and anti-CD7 MoAbs with baby rabbit complement. In addition, the patient received intravenously (IV) anti-LFA-1 and anti-CD2 MoAbs at a dose of 0.2 mg/kg/d from day -3 to day 10 and from day -2 to day 11, respectively. Skin lesion occurred on day 19, and three skin biopsies for histological study, immunohistochemistry, and culture were performed on day 22 (biopsy UPN2-a). Because the clinical aspect was compatible with acute GVHD, treatment with cyclosporine (3 mg/Kg/d IV) and steroids (2 mg/kg/d IV) was started on day 23 and continued although histological and immunological aspects were only weakly consistent with GVHD. Despite this treatment, skin lesions flared, and a second skin biopsy was performed on day 27 (biopsy UPN2-b). At that time GVHD was histologically evident. Treatment of GVHD was then modified with IV addition of MoAbs anti-IL-2R (BB10)¹³ (5 mg/d from day 29 to day 39 then 2.5 mg/d every other day until day 80) and anti-tumor necrosis factor (TNF) α (5 mg/d from day 29 to day 32). GVHD completely disappeared, and no chronic GVHD was documented, but on day 120, a hematological relapse was documented and the patient died. MoAbs for T-cell depletion or IV use were provided by P. Hervé from the Centre de Transfusion Sanguine de Besançon, France.

Patient UPN3. A 10-year old boy with idiopathic myelodysplasia and severe pancytopenia with, at the time of transplant, a 7 year history of transfusion (red blood cells and platelets). The conditioning regimen consisted of TBI 12 Gy, high-dose cytarabine and melphalan (idem as for patient UPN2). GVHD prophylaxis was exactly the same as for the previous patient. The donor was his mother. The patient failed to engraft, as on day 40 bone marrow aspiration showed no cells, and analysis of DNA in marrow and peripheral blood cells by fingerprinting showed no donor DNA. The patient received a second conditioning regimen consisting of busulfan 8 mg/kg over 2 days and cyclophosphamide 200 mg/kg

over 4 days. The marrow of the father was harvested and T-cell depleted with MoAbs (anti-CD2, anti-CD7 plus baby rabbit complement). Additional in vivo immunotherapy with anti-LFA1 and anti-CD2 was performed according to the same schedule as the first transplant, because no antimouse antibodies were found. Engraftment was documented on day 31 following the second transplantation. On day 37, skin eruption and diarrhea were observed. As for the other two patients, three skin biopsies were performed. Acute GVHD was documented both on skin and large bowel biopsies. Immunophenotypic analysis of skin biopsies showed very few Langerhans cells, a strong expression of DR on keratinocytes, and a lymphocytic infiltration made up of 80% CD4 positive cells. The patient then received an association of steroids (2 mg/kg/d and CsA, 3 mg/kg/d IV). Skin and gut lesions improved transiently, but ultimately flared, and the patient died with severe gut GVHD on day 89 after the second transplant.

Expansion of T lymphocytes from skin biopsy. Skin specimens were washed at least five times in RPMI containing 10% pooled human sera, 1% L-glutamine (2 mmol/L), and 50 μ g/mL gentamycin and then cultured in a 24-well plate (Nunc, Copenhagen, Denmark) in the same medium supplemented with recombinant IL-2 (rIL-2, 150 BRMP U/mL). Cultures were kept at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. In the four cases presented, T-cell proliferation started as early as 3 days after initiation of the culture. At day 5, to generate a panel of clones from each skin biopsy-derived T-cell line, one responder T cell was seeded in every three culture wells in 96-microwell round bottom culture plates together with pooled allogeneic feeder cells (5×10^4 peripheral blood lymphocytes (PBL) and 5×10^3 B lymphoblastoid cell line (BLCL), 30 gray irradiated) in the presence of leucoagglutinin-A (1 μ g/mL) (Pharmacia, Uppsala, Sweden), and rIL-2 (150 BRMP U/mL). Under these conditions, where 100% T cells are stimulated, maximal cloning efficiency is obtained (as assessed by limiting dilution analysis: frequency of proliferation about 50% to 100%). These conditions were chosen to avoid in vitro antigenic selection, while maintaining as closely as possible the best representation of T cells that grew under rIL-2 alone during the initial culture period. Before specificity assays, the

clones were cultured without stimulation in IL-2 alone for at least 2 weeks.

Southern blot analysis. Filter hybridization: after digestion with *EcoRI* or *Hind III*, 15 μ g of genomic DNA samples were sized-fractionated by electrophoresis through 1% agarose gels. Southern blotting was performed using a vacuum blotting system (LKB-Pharmacia, St. Quentin en Yvelines, France) on Hybond N+ filters (Amersham, Les Ulis, France) according to suppliers instructions. Hybridization, washing, and autoradiography were performed as previously described¹⁴ with ³²P multiprimed probes. Probes: The *J γ* probe, PH60, containing the 700-bp *Hind III EcoRI* fragment from M13H60, includes the *J γ 1* segment.^{15,16} This fragment cross-hybridizes with *J γ 2*, but not with *JP*, *JP1*, or *JP2*. The *C β* probe 1B10BB1 corresponds to the *C β 1* fragment and cross-hybridizes with *C β 2*.¹⁷

Polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. They were performed essentially as described.^{18,19} Briefly, total RNA was isolated from each clone and TCR- α or - β cDNA was obtained, by reverse transcription, using specific *C α* or *C β* antisense primers, respectively. TCR- α and - β cDNA amplifications were done by PCR with sense V-family specific primers and the above mentioned C primer. Different sets of *V α /C α* and *V β /C β* -derived oligonucleotides were used as sense/antisense primers to perform asymmetric PCR on each strand of the PCR-amplified cDNA, so that an excess of single stranded DNA of a chosen strand was produced. These second (internal) sets matched to sequences located 3' and 5', respectively, from those of the V and C primers used for the first amplification. Direct sequencing of amplified DNA strands was performed with sequenase (Amersham, Buckinghamshire, UK) following the manufacturer's instructions and using the corresponding V- and C-internal oligonucleotides as primers for sequencing the minus and the positive strand, respectively. Exceptionally, PCR amplified products were cloned in the pCR-Script vector (Stratagene GMBH, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's instructions. Positive colonies were sequenced by using T3 and T7 primers.

Proliferation assay. Resting T cells (2.5 to 5×10^4), taken more than 2 weeks after the last stimulation, were cocultured for 48 to 72 hours with the indicated irradiated (30 Gy) BLCL in 96-microwell flat-bottomed culture plates at a 1:1 responder-to-stimulator ratio. Six hours before harvesting, 1 μ Ci of (³H)thymidine was added to each well, and (³H)thymidine uptake was then measured in a liquid scintillation counter. Results are expressed as the mean of triplicate or quadruplicate cultures. Host BLCL were obtained by coculturing of PBL with Epstein-Barr virus (EBV)-containing supernatant from the virus-producing B95.8 cell line in the presence of 1 μ g/mL CsA. The following MoAbs were used for specificity studies: anti-DP/DR (2D6), -DP (B7.21), -DQ (1A3 or Leu-10).

Cytotoxic assay. Cytotoxic activity was tested using a standard ⁵¹Cr release assay already described:²⁰ briefly, target cells were labeled with 100 μ Ci ⁵¹Cr for 2 hours at 37°C, washed three times, and plated at the indicated effector-to-target ratio in a 96-well round-bottom plate. After 4 hours of incubation at 37°C, 100 μ L of supernatant from each well was removed and counted in a gamma scintillation counter. Each test was performed in triplicate. Results are expressed as percentage of lysis, according to the following formula: $(\text{experimental release} - \text{spontaneous release}) / (\text{maximal release} - \text{spontaneous release}) \times 100$, where experimental release represents mean counts per minute released from the target cells and maximum release from target incubated with 1% cetavlon.

RESULTS

Obtaining cell lines and cloning. T cells were recovered after culturing skin biopsies in the presence of IL-2 alone and were then cloned by limiting dilution under conditions that trigger the growth of virtually all T cells present in the

culture (see Materials and Methods section and Fig 1). This procedure should select most in vivo activated T cells during the first culture step and during the second step, should allow recovery of virtually all T cells amplified during the first step. In the four cases studied, T cells began to exude from biopsies within 3 days after initiation of the culture. Occurrence of GVHD was confirmed for each case by histopathological analyses. We never obtained skin biopsy-derived T-cell lines when the diagnosis of GVHD was not confirmed; this has also been observed by others.²¹

Clonal diversity of the lines obtained. Partial analysis of the UPN1 line has been reported in a previous study (Table 2).²² Of 34 T-cell clones analyzed in that study, 11 were found to be different. They were then tested for their capacity to recognize mismatched HLA-alleles of the graft. Such capacity was found for three of the 11 clones characterized: two CD4⁺ clones (A4 and D2) recognized HLA-DP101 and one CD8⁺ clone (TM15) recognized HLA-A2, two of the mismatched HLA-alleles in the GVHD direction (see Tables 1 and 2). For this study, 30 more UPN1-derived clones were analyzed and no new type of clone detected (data not shown). Two biopsies were studied for patient UPN2 (UPN2-a and UPN2-b). One was performed 3 days and the other 8 days after onset of GVHD. T cells from UPN2-a were cloned as described in the Materials and Methods section, and CD4⁺ and CD8⁺ T-cell clones were analyzed separately. Analysis of TCR γ gene rearrangement status of the 21 CD4⁺ clones indicated that all of them had the same rearrangement pattern and thus were probably derived from a single original T-cell clone, clone HER-1 in Table 2 (data not shown). All CD8⁺ T cells were recognized by an anti-TCR-V β 12 antibody. Moreover, a single junctional sequence was obtained from these cells (Table 3). Taken together, these results suggest that only two different clones compose the UPN2-a cell line, clones HER-1 and -3. From the second biopsy (UPN2-b), we derived 38 T-cell clones (26 CD4⁺ and 12 CD8⁺). All the CD8⁺ clones shared the same rearrangement and thus were probably derived from a single original clone (HER-30, Fig 2). Three different rearrangements were found for the CD4⁺ T-cell clones, suggesting that they derived from three original clones (HER-27, -28, -29). These three CD4⁺ T-cell clones from the second biopsy were all distinct from the single CD4⁺ T-cell clone HER-1 derived from the first biopsy, as indicated in Fig 3. All T-cell clones obtained from the UPN3 line were CD4⁺. Seven different TCR γ gene rearrangement patterns were found within the 24 T-cell clones whose TCR γ gene rearrangement status was determined (Fig 4 shows the 12 first clones analyzed).

Analysis of the specificity of the clones obtained. The donor-host pairs are indicated in Table 1. Patient UPN3 received two grafts, the first from his mother and the second from his father. All the clones obtained were HLA-A29 and came from the second donor (not shown). Clone specificities were determined in a classical manner using MoAbs and BLCL lines from the 1987 New York Workshop panel. Results from representative experiments are shown in Fig 5. T-cell clones, P1, P3, P6, P7, and P10 proliferated strongly when cocultured with the irradiated BLCL BOL, but not against BLCL RSH, VAV, TON, or BTB (for extensive HLA-typing of hosts, donors, and BLCL, see Table 1). Their

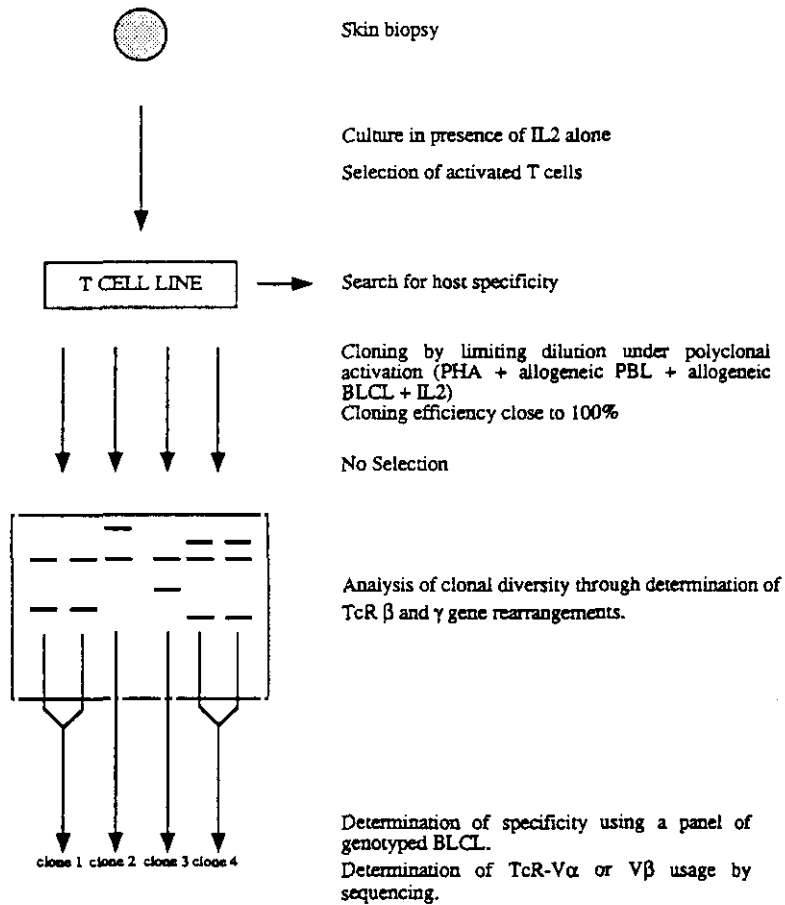


Fig 1. Procedure.

proliferation was blocked by an anti-HLA-DQ (1A3) MoAb, but not by MoAb against HLA-DR (2D6) or HLA-DP (B7-21). Consequently, these clones were probably specific for HLA-DQ8. The only BLCL recognized by the T-cell clone

P11 was T75, whose recognition was specifically blocked by the HLA-DP specific MoAb B7-21, confirming that this clone recognized HLA-DP1301 on T75. Finally, clone P14 proliferated only when cocultured with the BLCL JB10 and

Table 2. Number of Clones Tested and Found to be Different After Southern Blot Analysis

Biopsy	No. of Clones			Clone Characteristics			
	Tested	Different	Host Specific	CD4	CD8	Specificity	Cytotoxic
UPN1	64	11	3	A4	TM15	DP0101*	No
				D2		DP0101*	No
UPN2-a	21	2	2	HER-1		HER-3	A201*
					DP0401*		Yes
UPN2-b	38	4	4	HER-27	HER-30	B2705	Yes
				HER-28		DQ8	No
				HER-29		DP0401	No
	DQ8	No					
UPN3	24	7	7	P1	HER-30	B2705	Yes
				P3		DQ8	No
				P6		DQ8	No
				P7		DQ8	Yes
				P10		DQ8	No
				P11		DP1301	No
P14	DR0402	Yes					

Characteristics of each clone: coreceptor, specificity, and lytic potential.

* Gaschet et al.²²

Table 3. TCR Structure of Selected Clones

Clone	V α	CDR3	J α	V β	CDR3	J β	Specificity
HER-3	7	NDYKL	20	12	SGGQGTVEQ	2.7	HLA-B27
HER-30	32	RGLTGGGNKL	10	1	SPRTGLNTEA	1.1	HLA-B27
HER-27	12	RGTYNTDKL	34	9	SFRQGLSTDTQ	2.3	HLA-DQ8
HER-29				2	ARGQNTDTQ	2.3	HLA-DQ8
P1	19.1	VNDM	43	6.7	RSDFLFTEA	1.1	HLA-DQ8
	1.1	SAGINAGKS	27				
P3*				7	SQDRELYGY	1.2	HLA-DQ8
	1.2	SHYNNNDM	43				
P7	3.1	GNSGNTPL	29	5	SLVGAPQETQ	2.5	HLA-DQ8
P10	w29	GSEGTYKY	40	6.7	SLTGGQD	1.1	HLA-DQ8

For nomenclature, see Koop et al.⁴⁴ and Wei et al.⁴⁵

* For clone P3, two in frame V α rearrangements were found.

its proliferation was specifically blocked by MoAb against HLA-DR, thus confirming that P14 probably recognized the HLA-DR402. HLA-DQ8, -DR0402 and -DP1301 were all mismatches of the graft in the GVHD direction. Specificity analysis of the CD4⁺ T-cell clones HER-27, HER-28, and HER-29 is shown in Fig 6. Clone HER-27 proliferated against BSM and BOL, but not against JHAF or BTB, HER-29 proliferated against BSM and BOL but not against RSH or BTB (again, see Table 1 for extensive HLA typing). Proliferation of both clones was blocked by a HLA-DQ-specific MoAb, but not by HLA-DP or -DR-specific MoAbs. These results suggested that HER-27 and HER-29 T-cell clones were specific for HLA-DQ8. Clone HER-28 proliferated against BTB and BOL, but not against BSM or RSH, and this proliferation was blocked by the HLA-DP-specific MoAb B7-21 and not by MoAb against HLA-DR or -DQ. Consequently, this clone probably recognized HLA-DP401. Finally, with respect to the two CD8⁺ clones HER-3 (from the first biopsy, UPN2-a) and HER-30 (from the second biopsy, UPN2-b) whose specificity analysis is shown in Fig 7, data from both proliferation and cytotoxicity assays demonstrated recognition of the two HLA-B27+ BLCL (BTB and WT24) only. HLA-B27, HLA-DQ8, and HLA-DP401 were all mismatched HLA-alleles in the GVHD direction in this donor/recipient combination.

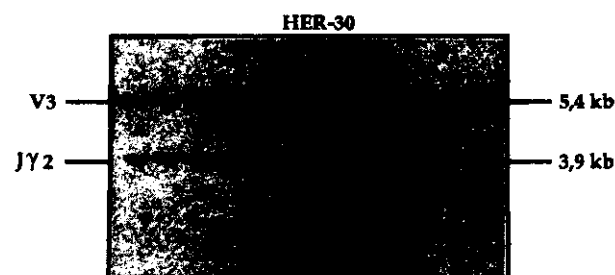


Fig 2. TCR γ gene rearrangements of the UPN2-b-derived CD8⁺ T-cell clones. Southern blot analysis of TCR diversity among CD8⁺ clones derived from the UPN2-b biopsy. Rearrangements of T cell rearranging γ genes in the different T-cell clones: DNA was digested with *EcoRI* and hybridized with PH60, a J γ probe. The 12 T-cell colonies tested were derived from the same clone.

Analysis of the cytotoxic capacity of the above CD4⁺ T-cell clones was not presented in detail, but their cytotoxic potentials are indicated in Table 2. For all T-cell clones having a cytotoxic potential, their pattern of reactivity always confirmed their specificity, usually tested through proliferation assays.

Diversity of the TCR used. TCR-V α and -V β chain sequences of selected clones are presented in Table 3. They confirm the individuality of each clone, as previously deduced from the Southern blot analysis. Most importantly, though the number of clones was low, marked heterogeneity

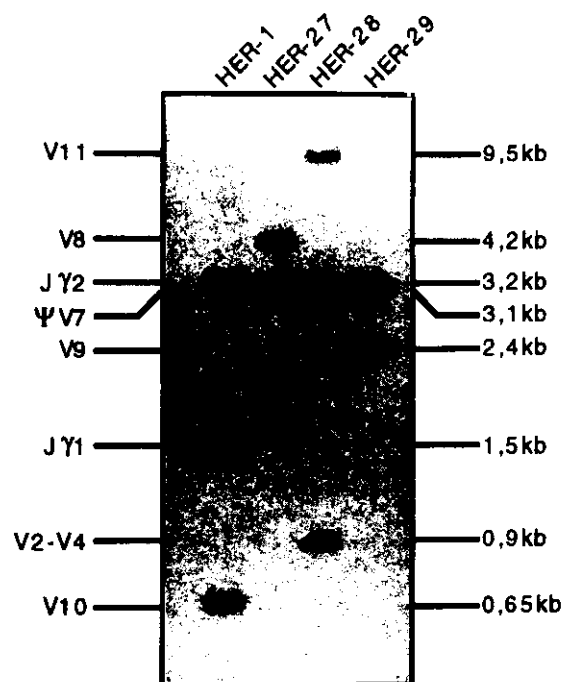


Fig 3. TCR γ gene rearrangements of the UPN2-a and -b-derived CD4⁺ T-cell clones (see legend to Fig 2). The CD4⁺ clone HER-1 (derived from the UPN2-a biopsy) was compared with the CD4⁺ clones HER-27, HER-28, and HER-29 derived from the UPN2-b biopsy. These four distinct T-cell clones were detected after Southern blot analysis of 21 different colonies from the UPN2-a and 26 from the UPN2-b biopsies, respectively (not shown).

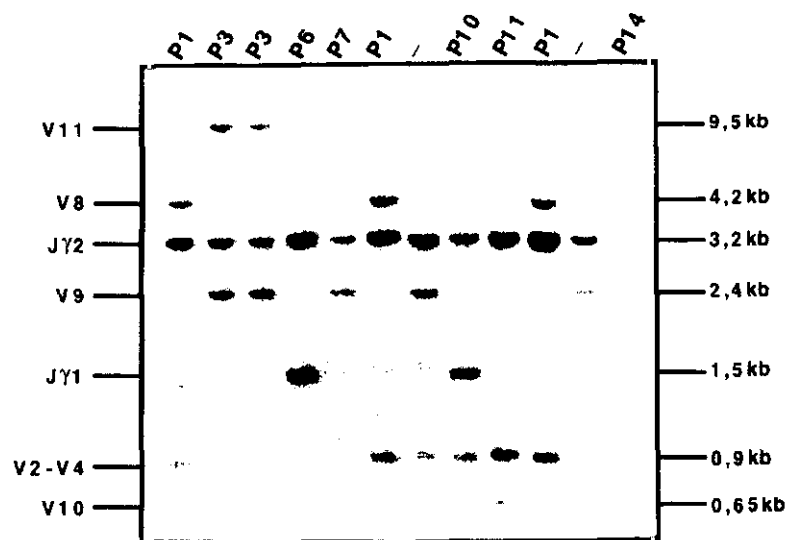


Fig 4. TCR γ gene rearrangement of the UPN3 biopsy derived T-cell clones (see legend to Fig 2 for the T-cell clones derived from the UPN3 biopsy). Lanes marked as (-) correspond to polyclonal colonies. All clones were CD4⁺.

of the TCR expressed could be demonstrated. Particularly informative were the sequences of the TCR expressed by the anti-DQ8 specific clones derived from patient UPN3. Thus, although P1 and P10 used the same V β 6.7-J β 1.1 rearrangement, the corresponding CDR3 regions were completely different. Furthermore, T-cell clones P3 and P7 used different V β -J β combination, V β 7-J β 1.2 and V β 5-J β 2.5, respectively. Altogether, these four T-cell clones, although derived from the same patient and having the same specificity within the same tissue, used four different TCR-V α and three different TCR-V β chains.

DISCUSSION

Since the initial analysis of the parameters critical for the development of GVHD,²³ other factors than the possibility

of the graft to mount an allogeneic reaction against the host have been recognized as important in the pathogenesis and clinical outcome of this disease. The preparative regimen, the host response, the presence of microbacterial pathogens and the viral status, have all been evoked and extensively studied.²⁴ A GVHD-like syndrome has also been observed in some autologous situations.⁵ Nevertheless, acute GVHD remains primarily a T-cell mediated disease, which occurs early after BMT and with the immunological peculiarity of being tissue-specific. Very few studies focusing on the characterization of T-cell reactivity at a site of GVHD lesions have been reported.^{22,25-27} This is perhaps because of conclusions drawn from initial studies suggesting that the majority of T cells in allografts lack allo-antigen specificity.²⁸⁻³² Thus, the initial cellular events leading to GVHD are still poorly

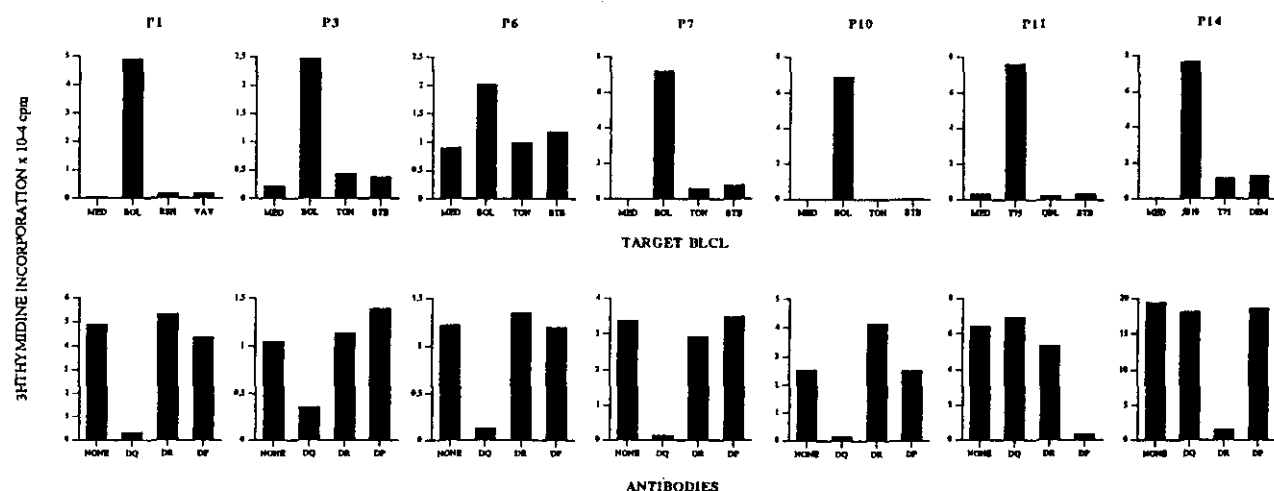


Fig 5. Determination of specificity for the clones derived from patient UPN3. Specific recognition of HLA-DQ8+ BLCL by UPN3 skin biopsy derived T-cell clones P1, P3, P6, P7, P10, or HLA-DP1301 by P11 and HLA-DR0402 by P14 (top panel). Accordingly, recognition of target BLCL was blocked by MoAb against HLA-DQ (1A3) for P1, P3, P6, P7, P10, against HLA-DP (B7.21) for P11, and against HLA-DR (GSP41) for P14. HLA-DQ8, -DP1301, and -DR0402 were all mismatches of this graft in the GVHD direction. See Materials and Methods for culture conditions and Table 1 for HLA-typing of host, donor, and target BLCL.

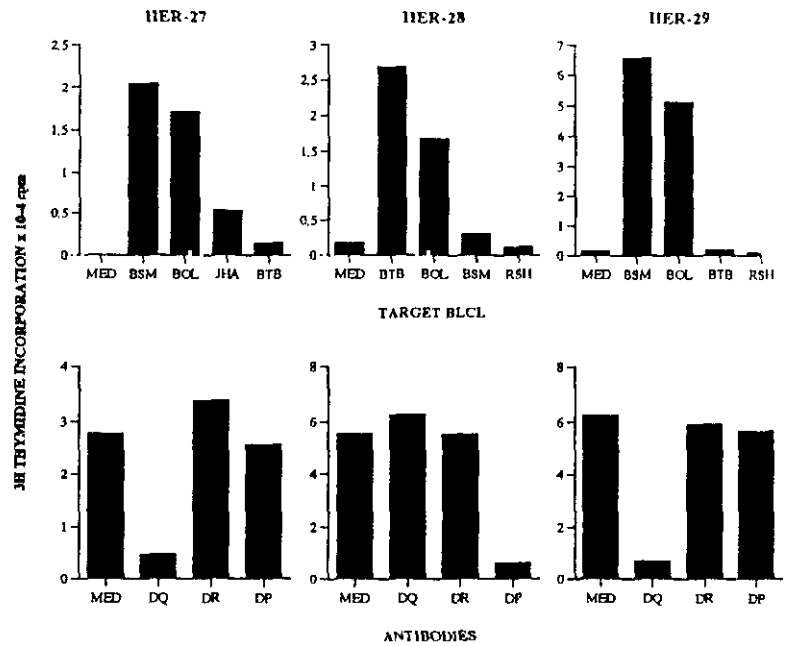


Fig 6. Determination of specificity for the CD4⁺ clones from patient UPN2 (same as Fig 5). Specific recognition of HLA-DQ8+ BLCL by clones HER-27, HER-29 and of HLA-DP0401+ BLCL by clone HER-28, derived from the UPN2-b biopsy (top panel). Recognition of target BLCL was blocked by MoAb against HLA-DQ for HER-27 and HER-29 and by MoAb against HLA-DP for HER-28 (bottom panel). HLA-DQ8 and -DP0401 were mismatches of the graft in the GVHD direction (see Table 1).

understood. Here we report on the functional and structural characterization of skin infiltrating T cells during early GVHD. The objective of the present study was to obtain a sufficient number of host-specific clones to analyze both the diversity of their potential targets and the diversity of the TCRs involved in their recognition. We studied four skin biopsy-derived cell lines obtained from three patients who

developed an acute GVHD after allogeneic BMT from HLA mismatched related donors. Our results, summarized in Table 2, demonstrated (1) that these cell lines were markedly oligoclonal, (2) that a majority of skin biopsy-derived T-cell clones were reactive against host-HLA, and (3) that these T-cell clones used highly diverse TCR, even though they recognized the same HLA specificity within the same tissue. Obviously, the general impact of these results relies on a demonstration that the T cells studied were actually involved in the pathological process. Evidence in support of this assumption, which is necessarily indirect because of the constraints linked to human studies, is as follows: first, our culture conditions should allow growth of clones that are representative of the activated (ie, IL-2-receptor positive) T cells infiltrating the biopsy. In this respect, Heidecke et al³³ elegantly demonstrated that IL-2-receptor positive graft infiltrating cells, but not the IL-2-receptor negative cells were alloreactive effectors on adoptive transfer in syngeneic hosts.

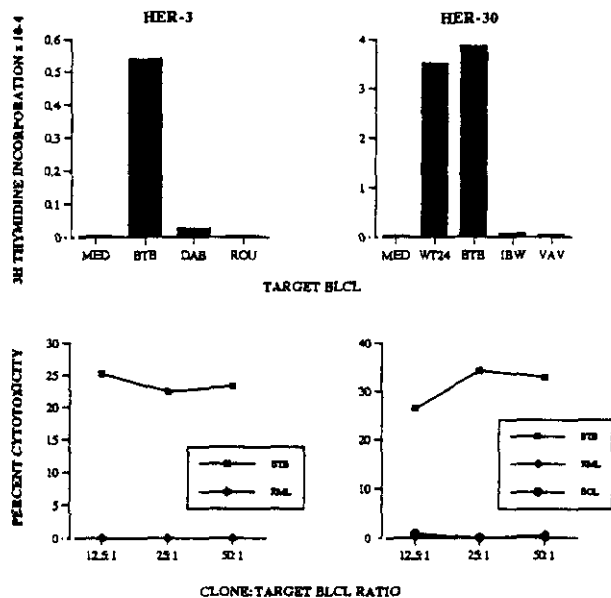


Fig 7. Specific proliferation and lysis of CD8⁺ clones from patient UPN2. Specific proliferation (top panel) or cytotoxicity (bottom panel) against HLA-B27+ BLCL by the CD8⁺ clones HER-3 and HER-30 derived from the UPN2-a and -b biopsies. In line with the notion of diversity for these T-cell clones involved in the GVHD process, HER-3, but not HER-30, was able to recognize the HLA-B27 molecule transfected in the xenogeneic P815 target (not shown).

Second, T-cell clones characterized in the present work exuded from the biopsies and started to grow actively within 3 days after initiation of the culture. In contrast, we never obtained cell lines when GVHD was not confirmed, strongly suggesting a correlation between the clinical outcome and the obtention of a T-cell line from these biopsies. Along this line, our results are comparable with several other studies, either after kidney, BMT, or heart^{21,26,34} transplantation.

Third, a majority of the clones derived from these biopsies are specific for host antigens, although they were obtained without in vitro antigenic selection. Although we cannot formally prove that the clones presented here would have reproduced the clinical manifestations that are characteristics of GVHD, we think we can reasonably infer from our results, as well as from the literature, that the host HLA-specific T-cell clones described in this paper actively took part in the initiation of the GVHD process.

The next comment to be made concerns the cell lines oligoclonality. After Southern blot analysis of the TCR gene rearrangements of 146 clones obtained under limiting dilution of the cells exuding from the biopsies, we found only 25 distinct T-cell clones (11, 2, 4, and 8 from the four biopsies, respectively, see Table 2). In a regular T-cell cloning assay, it takes more than 10 days for a clone to become macroscopically detectable. Consequently, the fact that we obtained within 5 days a detectable amplification of T-cell lines composed of 2, 4, 8, and 11 clones implies that these clones were both overrepresented and activated *in situ*. Naturally, this does not necessarily mean that these clones were the only T cells present in the biopsy. Particularly, in view of other works where an important diversity of TCR-V α and TCR-V β gene transcripts was detected in the skin at the time of acute GVHD,^{35,36} our results are also in full agreement with the recent report by R. Leibnitz et al,³⁷ who studied the reactivity of murine hybridomas derived from T cells activated *in vivo* during GVHD and who suggested that early in the course of the disease, a high percentage of activated T cells sequestered in host spleen or liver were allospecific.

Although the presence of histoincompatible tissue antigens between donor and recipient is the main prerequisite for the development of GVHD, there remains the possibility that allogeneic T cells are not the only cells responsible for the appearance of the disease. Donor TCR- $\alpha\beta$ T cells can also recognize pathogens, autologous determinants, or allogeneic fragments indirectly, ie, presented by self MHC molecules. If such a recognition had occurred in the situation we have studied, the T cells involved should have been activated, and consequently our culture conditions should have favored them as well as those directed at classical MHC alloantigens. We cannot exclude from our data that such cells were present among the eight T-cell clones derived from UPNI for which we could not document antihist reactivity. In contrast, all clones from the three other biopsies were specific for mismatched HLA-alleles of the graft (see Tables 1 and 2). The *in vivo* relevance of indirect recognition during an allo-antigenic response is a matter of debate. Although the precise nature of the peptides presented together with the host HLA-molecules is presently unknown, indirect recognition can be excluded from our data: for example, clone P1 recognized only HLA-DQ8 bearing BLCL, and this reactivity was specifically blocked by an anti-DQ MoAb with no possible indirect presentation of an HLA-DQ8 peptide within another DQ-allele, which should have been matched with the host, ie, DQ2 in the present case. The same reasoning holds for the other clones, and therefore mismatched HLA-alleles were probably recognized in a direct, rather than an indirect, manner in the cases presented.

Although the high frequency of alloreactive T cells suggests the expression of a broad spectrum of TCRs by these effectors, evidence for restricted TCR-V gene usage by alloreactive T cells has been recently provided.^{18,36-43} Such observations raised the possibility that the immune response leading to graft rejection or acute GVHD could be prevented by selective depletion of alloreactive T cells. Indeed in the case of GVHD, two factors might have contributed to the restricted response: first, acute GVHD occurs rapidly after

BMT, when T-cell reconstitution is not yet complete, and second, GVHD lesions affect mainly epithelia, which implies that only part of the allo-repertoire may be involved in this process. Our data demonstrate that this is not the case between HLA mismatched related donors. The best example comes from the analysis of the four DQ8 clones from patient UNP-3, whose TCR was made up of four distinct TCR-V regions combinations.

In conclusion our data provide evidence that in the early stages of acute GVHD after allogeneic BMT, activated T cells at the site of GVHD lesions are host-specific and could potentially recognize any mismatch. Moreover, this T-cell response appears at the same time oligoclonal and clearly not TCR-V region restricted. In the context of an allogeneic graft between HLA mismatched related donors, it is clear that T cells responsible for GVHD cannot be discriminated by the use of any particular TCR-V chain. Therefore, the potential usefulness of TCR-V specific MoAbs as immunotherapeutic agents for the selective elimination of particular TCR-V bearing cells is questionable.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Marie-Luce Chereau, Emma Teixeira, Ana del Amo, Francoise Bonneville, Patricia Herry, Sylvie Cury, and Jean-Denis Bignon for their help in HLA typing and Els Goulmy and Linda Liem for their gift of HLA-DR0402 BLCL.

REFERENCES

1. Thomas ED, Storb R, Klift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lesner KG, Glucksberg H, Buckner CD: Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 292:832, 1975
2. Maraninchi D, Blaise D, Rio B, Leblond V, Dreyfus F, Gluckman E, Guyotat D, Pico JL, Michallet M, Ifrah N: Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukemias. *Lancet* 2:175, 1987
3. Cochet M, Pannetier C, Regnault A, Darche S, Leclerc C, Kourilsky P: Molecular detection and *in vivo* analysis of the specific T cell response to a protein antigen. *Eur J Immunol* 22:2639, 1992
4. Pannetier C, Cochet M, Darche S, Casrouge A, Zoller M, Kourilsky P: The size of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor β chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4319, 1993
5. Vogelsan GB, Hess D: Graft-versus-host disease: New directions for a persistent problem. *Blood* 84:2061, 1994
6. Gorski J, Yassai M, Zhu X, Kissella B, Keever C, Fomenberg N: Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analysed by CDR3 size spectratyping. *J Immunol* 152:5109, 1994
7. Villers D, Milpied N, Gashet J, Davodeau F, Hallet MM, Bonneville M, Vié H: Alteration of the T cell repertoire after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 13:29, 1994
8. Vilmer E, Triebel F, David V, Rabian C, Schumpp M, Leca G, Degos L, Hercent T, Sigaux F, Bensussan A: Prominent expansion of circulating lymphocytes bearing γ T-cell receptors, with preferential expression of variable γ genes after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 72:841, 1988
9. Gorochov G, Debre P, Leblond V, Sadat-Sowti B, Sigaux F, Autran B: Oligoclonal expansion of CD8+CD57+ T cells with restricted T-cell receptor β chain variability after bone marrow transplantation. *Blood* 83:587, 1994
10. Marrack P, Kappler J: T cell can distinguished between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell type. *Nature* 332:840, 1988

11. Parfrey NA, Sainte Croix H, Prud'homme J: Evidence that nonlymphoid tissue injury in acute graft versus host disease is limited to epithelial cell aberrantly expressing MHC antigen. *Transplantation* 48:655, 1989
12. Santamaria P, Boyce Janino MT, Lindstrom L, Rich SS, Faras AJ, Barbosa JJ: Alloreactive T cells can distinguished between the same class II MHC products on different B cell lines. *J Immunol* 146:822, 1991
13. Belanger C, Esperou-Bourdeau H, Bordigoni P, Jouet JP, Souillet G, Milpied N, Troussard X, Kuentz M, Herve P, Reiffers J, Demeocq F, Dauriac C, Blaise D, Michallet M, Fiere D, Freycon F, Gratecos N, Rio B, Leblond V, Ifrah N, Attal M, Bergerat JP, Vilmer E, Pico J, Raffoux P, Cudrelier P, Gluckman E: Use of an anti-interleukine receptor monoclonal antibody for GVHD prophylaxis in unrelated donor BMT. *Bone Marrow Transplant* 11:293, 1993
14. Moisan JP, Bonneville M, Bouyge I, Moreau JF, Souillou JP, Lefranc MP: Characterization of T-cell receptor gamma (TCR) gene rearrangement in alloreactive T cell clones. *Hum Immunol* 24:95, 1989
15. Lefranc MP, Rabbit TH: Two tandemly organized human genes encoding the T-cell gamma constant region sequences show multiple rearrangement in different T-cell type. *Nature* 319:420, 1986
16. Lefranc MP, Forster A, Baer R, Stinson MA, Rabbit TH: Diversity and rearrangement of the human T-cell rearranging gamma genes: Nine germline variable genes belonging to two subgroups. *Cell* 45:237, 1986
17. Sims JE, Tunnaclyffe WJ, Smith WJ, Rabbits TH: Complexity of human T cell antigen receptor beta-chain constant and variable-region genes. *Nature* 312:541, 1984
18. Bragado R, Lauzurica P, Lopez de Castro JA: T cell receptor V β gene usage in a human alloreactive response: Shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J Exp Med* 171:1189, 1990
19. Lauzurica P, Bragado R, Lopez D, Galocha B, Lopez de Castro JH: Asymmetric selection of T cell antigen receptor α - and β -chains in HLA-B27 alloreactivity. *J Immunol* 148:3624, 1992
20. Vié H, Chevalier S, Garand R, Moisan JP, Praloran V, Devilder MC, Moreau JF, Souillou JP: Clonal expansion of lymphocytes bearing the $\gamma\delta$ T-cell receptor in a patient with large granular lymphocyte disorder. *Blood* 74:285, 1989
21. Kirk AD, Ibrahim MA, Bellinger RR, Dawson DV, Finn OJ: Renal allograft-infiltrating lymphocytes. A prospective analysis of in vitro growth characteristics and clinical relevance. *Transplantation* 53:329, 1992
22. Gaschet J, Mahe B, Milpied N, Devilder MC, Dreno B, Bignon JD, Davodeau F, Hallet MM, Bonneville M, Vie H: Specificity of T cells invading the skin during acute graft versus host disease after semiallogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 91:12, 1993
23. Billingham RE: The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 62:21, 1967
24. Elkins WL: Cellular immunology and the pathogenesis of graft-versus-host reaction. *Prog Allergy* 15:78, 1971
25. Reinsmoen NL, Kersey JH, Bach FH: Detection of HLA restricted anti-minor histocompatibility antigen(s) reactive cells from skin GVHD lesions. *Hum Immunol* 11:249, 1984
26. Kasten Sportes C, Masset M, Varrin F, Devergie A, Gluckman E: Phenotype and function of T lymphocyte infiltrating the skin during graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 47:621, 1989
27. Nikaein A, Poole T, Fishbeck R, Ordenez G, Dombrausky L, Stone MJ, Collins RH, Fay JW: Characterization of skin-infiltrating cells during acute graft-versus-host disease following bone marrow transplantation using unrelated donors. *Hum Immunol* 40:68, 1994
28. Strom TB, Kupiec-Weglinski JW, Tilney NL: On the mechanism of rejection of vascularized organ allografts: A review and an attempt at synthesis, in Morris PJ, Tilney N (eds): *Progress in Transplantation*. New York, NY, Churchill Livingstone, 1985, p 126
29. Orosz CG, Bishop DK: Limiting dilution analysis of alloreactive T-cell status and distribution during allograft rejection. *Hum Immunol* 28:72, 1990
30. Feng HM, Glasebrook AL, Engers HD, Louis JA: Clonal analysis of T cell unresponsiveness to alloantigens induced by neonatal injection of FI spleen cells into parental mice. *J Immunol* 131:2165, 1983
31. Orosz CG, Adams PW, Ferguson RM: Frequency of human alloantigen-reactive T lymphocytes. II Method for limiting dilution analysis of alloantigen-reactive helper T cells in human peripheral blood. *Transplantation* 43:255, 1987
32. Manca FB, Ferry B, Jaakkola M, Halttunen J, Horsmanheimo L, Hayry P: Frequency and functional characterization of specific T-helper cells infiltrating rat kidney allograft during acute rejection. *Scand J Immunol* 25:255, 1987
33. Heidecke CD, Brauer R, Schneider-Eicke J, Schilling T, Wolf S, Diamanstein T: Direct evidence of a functional separation of alloreactive T lymphocytes from bystander cells infiltrating rat allografts. Interleukin 2 receptor-positive cells reacting with the monoclonal antibody ART 18 mediating second-set rejection. *Transplantation* 50:101, 1990
34. Harcombe AA, Cary NR, Mullin P, Sharples LD, Schofield PM, Large SP, Wallwork J, Weissberg PL, Borysiewicz LK: Lymphocyte culture from endomyocardial biopsies. Effects of polyclonal T cell activators compared with interleukine-2 alone. *Transplantation* 58:1277, 1994
35. Dietrich PY, Caignard A, Diu A, Genevee C, Pico JL, Henry-Amar M, Bosq J, Angevin E, Triebel F, Hercent T: Analysis of T cell receptor variability in transplanted patients with graft-versus-host disease. *Blood* 80:2419, 1992
36. Dietrich PY, Caignard A, Lim A, Chung Y, Pico JL, Pannetier C, Kourilsky P, Hercent T, Even J, Triebel F: In vivo T-cell clonal amplification at time of acute graft-versus-host disease. *Blood* 84:2815, 1994
37. Leibnitz RR, Lipsky PE, Thiele DL: Reactivity of hybridomas derived from T cells activated in vivo during graft-versus-host disease. *J Immunol* 153:4959, 1994
38. Beal SS, Lawrence JV, Bradley DA, Mattson DH, Singer DS, Biddison WE: β -chain gene rearrangements and V β gene usage in DPW2-specific T cells. *J Immunol* 139:1320, 1897
39. Geiger MJ, Gorski J, Eckels DD: T cell receptor gene segment utilization by HLA-DR1-alloreactive T cell clones. *J Immunol* 147:2082, 1991
40. Miceli C, Finn OV: T cell receptor β -chain selection in human allograft rejection. *J Immunol* 142:81, 1989
41. Katovich Hurley C, Steiner N, Wagner A, Geiger MJ, Eckels DD, Rosen-Bronson S: Nonrandom T cell receptor usage in the allorecognition of HLA-DR1 microvariation. *J Immunol* 150:1314, 1993
42. Goronzy JJ, Xie C, Hu W, Lundy SK, Weyand M: Restrictions in the repertoire of allospecific T cells. Contribution of the α -helical sequence polymorphism of HLA-DR molecules. *J Immunol* 151:825, 1993
43. Yamanaka K, Kwok W, Mickelson EM, Masewicz S, Smith F, Nepom GT: Selective T-cell-receptor gene usage in allorecognition and graft-versus-host disease. *Transplantation* 55:1167, 1993
44. Koop BF, Rowen L, Wang K, Lam Kuo C, Seto D, Lenstra JA, Howard S, Shan W, Deshanpe P, Hood L: The human T-cell receptor TCRAC/TCRDC (*Ca/C δ*) region: Organization, sequence, and evolution of 97.6 kb of DNA. *Genomics* 19:478, 1994
45. Wei S, Charmley P, Robinson MA, Concannon P: The extend of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics* 40:27, 1994

