

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1

CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A MOLÉCULAS DE MHCII MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

IV.1.1.

EVALUACIÓN DE DIVERSOS MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS
ASOCIADOS A MOLÉCULAS DE MHCII MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La caracterización de los repertorios peptídicos presentados por la molécula de MHCII reviste importantes dificultades derivadas de la baja concentración de estos péptidos, de la heterogeneidad del *pool* peptídico y de la complejidad de la matriz en la que se encuentran.

Los primeros trabajos de secuenciación publicados utilizaban la secuenciación de Edman para identificar péptidos de clase I aislados mediante inmunoafinidad y fraccionados previamente por HLPC (Rudensky 1991). Sin embargo, esta técnica de secuenciación presentaba muchas limitaciones ya que requería péptidos con unas características de pureza y concentración que la mayoría de los péptidos asociados a MHCII no presentaban. Actualmente la espectrometría de masas ha sustituido con ventaja a la secuenciación de Edman como método para la secuenciación de estos péptidos. Los repertorios más estudiados hasta el momento son los asociados al alelo DR4. En conjunto, se han identificado más de 150 ligandos peptídicos asociados a este alelo de MHCII a partir de diversas líneas celulares linfoblastoides homocigotas (Lippolis 2002; Rammensee 1995). Estos ligandos son péptidos largos (10 a 29 aa) procedentes mayoritariamente de proteínas exógenas, de superficie o de proteínas residentes en la vía endocítica. El número de estas proteínas origen es, en comparación al de péptidos, relativamente bajo, ya que en muchos casos la mayor parte de los péptidos corresponden a secuencias anidadas. Así, por ejemplo, en el trabajo con más secuencias descritas para DR4 (142 péptidos) se seleccionaron solo aquellos péptidos que estaban formando parte de secuencias anidadas, aportando únicamente 11 proteínas origen diferentes (Lippolis 2002).

Las limitaciones de las técnicas empleadas en estos estudios provienen tanto de su sensibilidad como de las dificultades derivadas de la extracción de información de secuencia a partir de los datos espectrométricos. Se estima que estos péptidos se encuentran a niveles de $0.3\text{-}3\text{ fmol}/10^6$ células (Hunt 1992), lo que exige la utilización de métodos de alta sensibilidad para su detección. Por otro lado, muchos péptidos originan espectros de fragmentación ambiguos o con insuficiente información para derivar un *tag* de secuencia a partir de ellos. También ocurre frecuentemente que, por problemas inherentes a los procedimientos de búsqueda en las bases de datos, tampoco se obtenga esta información de secuencia aunque se disponga de información espectrométrica de calidad.

Estos problemas reducen el abanico de antígenos conocidos a aquellos más abundantes o con características de secuencia que favorezcan su identificación. Estas limitaciones técnicas son también responsables de la poca información existente sobre los repertorios presentados *in vivo*. Es importante indicar que, hasta hoy, no había datos referentes a los péptidos presentados *in vivo* por moléculas de MHCII en células epiteliales diana de la respuesta. A medida que se desarrollen métodos cada vez más sensibles es esperable un aumento del número de epítomos de unión y proteínas conocidas, y por tanto un conocimiento más completo de los mecanismos implicados en la presentación. Probablemente estos objetivos no se consigan mediante una

única estrategia ya que los diferentes métodos de secuenciación generalmente aportan datos complementarios debido a su diferente eficiencia y selectividad.

En consecuencia, en este capítulo se pretende caracterizar el repertorio peptídico asociado a DR4 en células B-LCL, evaluando de forma paralela la eficiencia relativa de diversas técnicas de espectrometría de masas utilizadas para este propósito (Las características de esta línea celular se encuentran descritas en el apartado IV.1.2).

Las técnicas comparadas han sido nESI-ITMS/MS, MALDI-TOF/TOF y capLC- μ ESI-ITMS/MS. Esta última técnica se aplicó al análisis directo de los extractos peptídicos obtenidos por cromatografía de inmunoafinidad mientras que en el caso de las dos primeras, el análisis se realizó sobre fracciones de estos extractos obtenidas mediante HPLC. En el caso del análisis mediante MALDI-TOF/TOF se analizó el total de las fracciones cromatográficas obtenidas (60) mientras que para nESI-ITMS/MS se utilizaron solo 24 de éstas (fracciones 31, 34, 36-57 y 63), en su mayor parte correspondientes a tiempos de retención donde se observaron señales intensas en el detector UV (zonas de elución correspondientes a 20-35% ACN, minutos 50-72).

1. IDENTIFICACIÓN DE LOS LIGANDOS PEPTÍDICOS ASOCIADOS A DR4 POR NANOSPRAY Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM EN UN INSTRUMENTO DE TRAMPA IÓNICA

El método de ionización por nanospray, acoplado a un espectrómetro de masas de trampa iónica (nESI-ITMS/MS) fue el primero que se aplicó en este trabajo y el que ha generado el mayor número de secuencias diferentes. La alta sensibilidad de esta técnica y el bajo consumo de muestra del nanospray permitieron un análisis eficiente de este tipo de muestras.

Para la secuenciación de los péptidos se obtuvieron tres tipos de espectros: de barrido completo, de alta resolución (ZoomScan) y de fragmentación o espectro MS/MS (Figura 31). En general, los espectros de barrido mostraban señales que correspondían a diferentes estados de carga de los péptidos presentes en la muestra (Figura 31a). Los espectros de alta resolución se utilizaron para determinar la carga del ión correspondiente y el peso molecular del péptido. Generalmente se observaban iones doble o triplemente cargados de los péptidos siendo estos últimos los más frecuentes. Los espectros de fragmentación se han obtenido, sin embargo, de forma preferente a partir de iones doblemente cargados ya que estos producen espectros MS/MS más fácilmente interpretables.

El péptido de mayor tamaño caracterizado en el repertorio analizado correspondió a una secuencia de 28 aa derivada de la proteína HLA-A2. Aunque, en teoría, el procedimiento de

identificación mediante búsqueda en bases de datos a partir de los espectros de fragmentación o de los *tag* de secuencia derivados a partir de éstos, permite caracterizar péptidos de casi cualquier tamaño, en la práctica, a medida que el tamaño del péptido aumenta, su identificación se hace más difícil, restringiendo la eficiencia de este método a longitudes de unas pocas decenas de aminoácidos. El péptido de mayor longitud descrito en un repertorio asociado a MHCII mediante técnicas espectrométricas del que tenemos noticia corresponde a una secuencia de 29 aa presentada por el alelo I-A^{g7} (Suri, 2002). En esta tesis se mostrará que en las condiciones de trabajo empleadas es posible identificar secuencias incluso más largas, como la del epítipo 180-216 de la GTPasa (37 aa) detectado en células epiteliales (IV.1.3). No se conoce si existe un límite de tamaño para estos péptidos aunque se ha descrito que las moléculas de MHCII son capaces de unir proteínas de gran tamaño, como la lisozima HEL, una proteína de 15 kDa (Castellino, 1998). Dado que el método utilizado para la obtención de nuestros extractos peptídicos utiliza una filtración en una membrana con corte a 10 kDa no es probable la presencia de cantidades importantes de péptidos de mas de 40-50 aminoácidos en el caso de que estos existan.

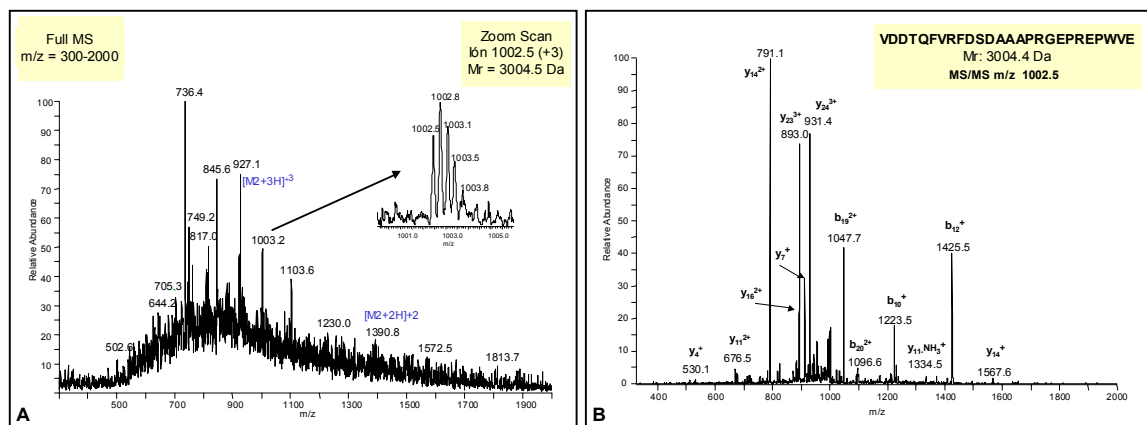


Figura 31: Espectros de secuenciación de un péptido de 26 aa presentado por las células B-LCL (A) Espectro de barrido completo y de alta resolución (ZoomScan) obtenido por nESI-ITMS. (B) Espectro de fragmentación del ión triplemente cargado a m/z 1002.5.

Durante la secuenciación mediante nESI-ITMS/MS es frecuente encontrar casos en los que debido a la baja intensidad de las señales y a las interferencias del ruido químico en los espectros no se detecta ninguna señal en los espectros de barrido completo, aunque los datos obtenidos previamente mediante MALDI-TOF indiquen la presencia de péptidos en la muestra. Esta limitación en la detección es especialmente grave en el caso del análisis de los repertorios de las células transfectantes y del tejido *ex vivo* que se abordan en esta tesis (IV.1.3 y IV.1.4). En estos casos la capacidad de acumulación de iones de la trampa durante tiempos largos junto con el bajo consumo de la fuente de nanospray resultaron cruciales. A diferencia de otros sistemas, la trampa permite acumular iones durante un tiempo indefinido, de forma que estos sean capaces de producir una cantidad de iones de fragmentación suficientemente alta para

generar una respuesta observable incluso a partir de señales muy débiles. Por otra parte, el ruido químico, producido por los disolventes y otros componentes de la muestra en el análisis por nESI, tiende a ocultar la presencia de las señales más débiles. Sin embargo, este ruido químico prácticamente desaparece en los espectros MS/MS debido al "filtrado" producido en la selección del ión precursor. En consecuencia, es posible obtener buenos espectros de fragmentación a partir de péptidos difícilmente observables en los espectros de barrido. Así, en este trabajo utilizamos la información de peso molecular obtenida por MALDI-TOF, que es una técnica más sensible y eficiente que en nESI-ITMS, como referencia para la selección de los iones que posteriormente se seleccionan "a ciegas" para obtener el espectro de fragmentación (Fig. 32 y 33).

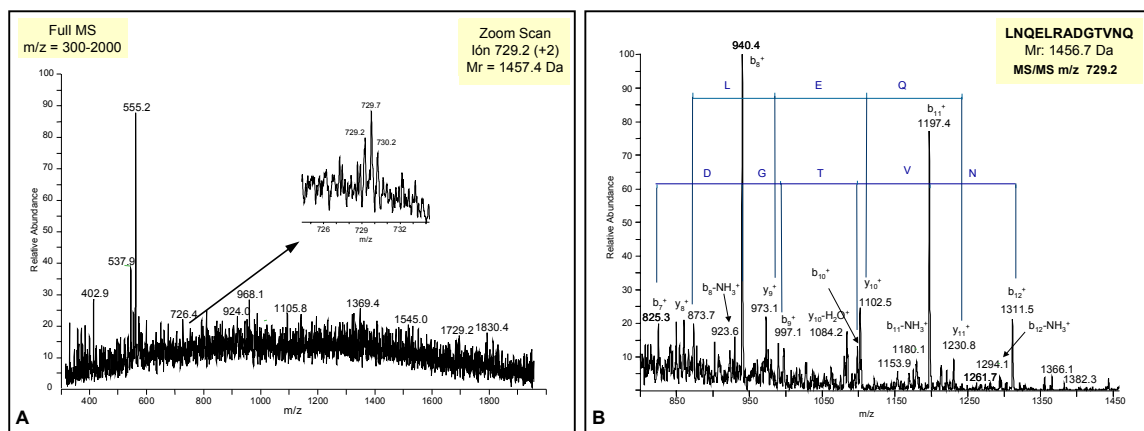


Figura 32: (A) Espectro de barrido completo de una fracción en la que no se detectó ninguna señal diferente a las generadas por la matriz en el espectro de barrido completo. Sin embargo, a partir de los datos obtenidos en el MALDI-TOF, pudo detectarse la presencia del ión doblemente cargado 729.7 en el barrido de alta resolución (insertado). (B) El espectro MS/MS obtenido permitió caracterizar la secuencia.

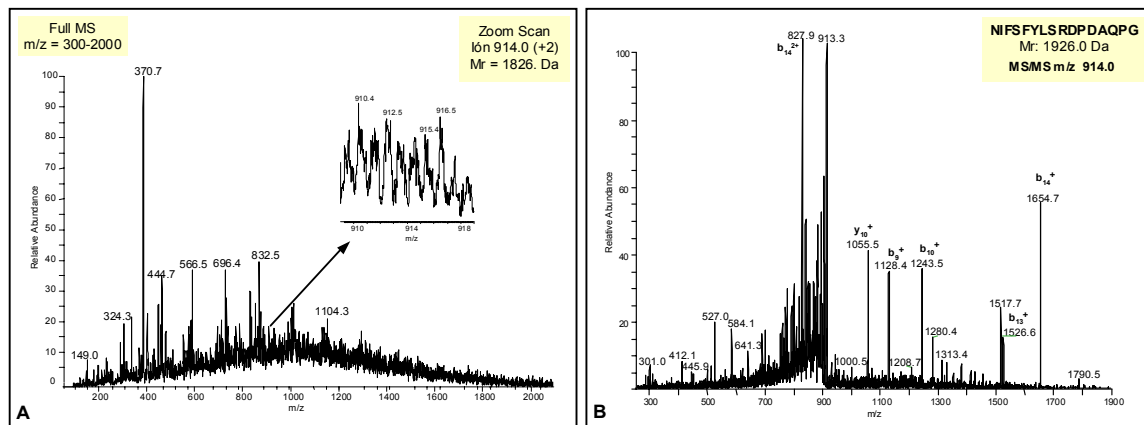


Figura 33: (A) Espectros de barrido y de alta resolución de una muestra de tejido tiroideo. En el espectro de barrido únicamente se detectaron señales de iones monocargados de bajo peso molecular que correspondían a contaminantes de la preparación. A partir de la información obtenida en el análisis por MALDI-TOF se seleccionó el valor m/z correspondiente al ión doblemente cargado 914.0 no detectándose ninguna señal en el barrido ZoomScan. Sin embargo, al seleccionar y fragmentar este ión "a ciegas" se obtuvo información suficiente para llegar a la identificación de la secuencia (B).

1.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM MÚLTIPLE (MSⁿ)

En algunos casos las dificultades encontradas en la caracterización de las secuencias no estaban relacionadas únicamente con la intensidad de las señales o los límites de detección de la técnica. Así, es frecuente encontrar péptidos que generan espectros de fragmentación dominados por una o unas pocas señales mayoritarias que son insuficientes para determinar un *tag* de secuencia útil. Este comportamiento deriva de las características químicas de las secuencias peptídicas. Este es el caso, por ejemplo, de péptidos con modificaciones químicas o postraduccionales que impliquen la formación de enlaces covalentes de baja energía (por ejemplo, fosforilación o glicosilación) o que provean de una estabilidad especial al fragmento de rotura correspondiente. En muchos casos la presencia de fragmentos derivados de la rotura en estos enlaces proporciona importante información acerca de la composición del péptido ya que pueden evidenciar la presencia de combinaciones especiales de aminoácidos especialmente sensibles a la fragmentación o la presencia de modificaciones. Por ejemplo, los fragmentos formados por pérdidas características de 98 y 80 Da que revelan la presencia de un fosfopéptido o la pérdida de 64 producida por la presencia de la metionina oxidada (Neubauer 1999; Qin 1997). La fragmentación en estos enlaces puede, sin embargo, estar tan favorecida que produzca espectros MS/MS dominados por uno o unos pocos iones sin que aparezca otra información de utilidad para la secuenciación.

En numerosas ocasiones este problema pudo resolverse gracias a una característica única de la trampa iónica: su capacidad para llevar a cabo análisis en tándem múltiple (MS³). Algunos de los casos en los que se recurrió a este procedimiento se describen a continuación.

► Péptidos que contienen metionina oxidada:

Del total de péptidos secuenciados, 63 contenían en su secuencia una o varias metioninas. De éstos, 10 estaban oxidados con la metionina en forma de sulfóxido. Es difícil determinar si esta oxidación es una modificación postraduccionales o si es el resultado de la manipulación de la muestra, aunque esta última posibilidad puede ser la más probable en la mayoría de los casos ya que prácticamente todos estos péptidos también se podían detectar en las muestras en la forma no oxidada (6 de 10).

Cuando estos péptidos se analizaron mediante MS/MS se observó la aparición de un ión intenso derivado de la pérdida de 64 unidades de masa (-CH₃SOH). En varios casos este fragmento era tan mayoritario que no era posible la secuenciación del péptido (Figura 34a). En el ejemplo mostrado, el análisis mediante MS³ del ión mayoritario (m/z 830.2) produjo iones fragmento tanto de la serie b (fragmentos b₃-b₁₃) como de la serie y (fragmentos y₅-y₁₃) permitiendo de esta forma una identificación inequívoca de la secuencia peptídica (Figura 34b).

Debido a que se parte de un ión en el que ya se ha eliminado el grupo CH_3SOH de su estructura, los fragmentos del espectro de MS^3 que contienen el residuo metionina aparecen 48 unidades de masa por debajo del valor teórico esperado a partir de la secuencia del péptido no oxidado.

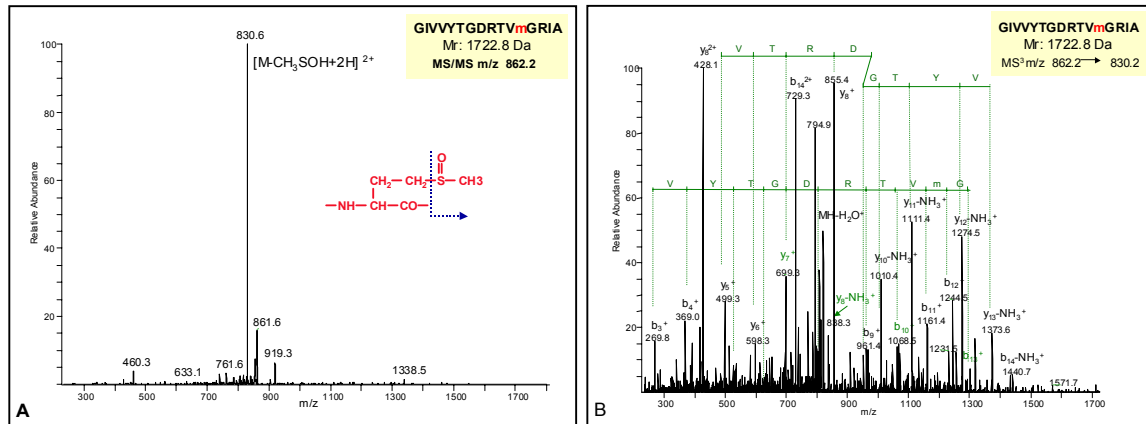


Figura 34: Identificación del péptido GIVVYTGDRVTmGRIA utilizando MS^3 . El espectro de MS/MS no permitió la identificación del péptido ya que estaba dominado por un fragmento mayoritario derivado de la pérdida del grupo sulfóxido de la metionina oxidada (A). Cuando aplicamos MS^3 a este ión se obtuvo un espectro a partir del cual pudo determinarse la secuencia peptídica.

► Péptidos conteniendo aminoácidos con grupos hidroxilo

El 14% de los péptidos identificados mostraron un perfil de fragmentación en el que el ión mayoritario era la pérdida de una molécula de agua (Figura 35a). Todos estos péptidos contenían en su estructura uno o varios residuos de los aminoácidos treonina y/o serina que eran los responsables de este comportamiento. De la misma forma que en el caso de la metionina oxidada, la fragmentación mediante MS^3 de estos iones deshidratados proporcionó espectros que permitían la identificación de la secuencia peptídica (Figura 35b).

Aunque tanto serina como treonina pueden originar espectros de este tipo, en general, las treoninas se deshidratan con más facilidad. Las pérdidas por deshidratación pueden deberse también a la presencia de ácido glutámico, especialmente cuando este aminoácido se encuentra en los extremos de la secuencia. En estos casos, sin embargo, la deshidratación no era un proceso dominante y no requirió nunca la utilización de MS^3 .

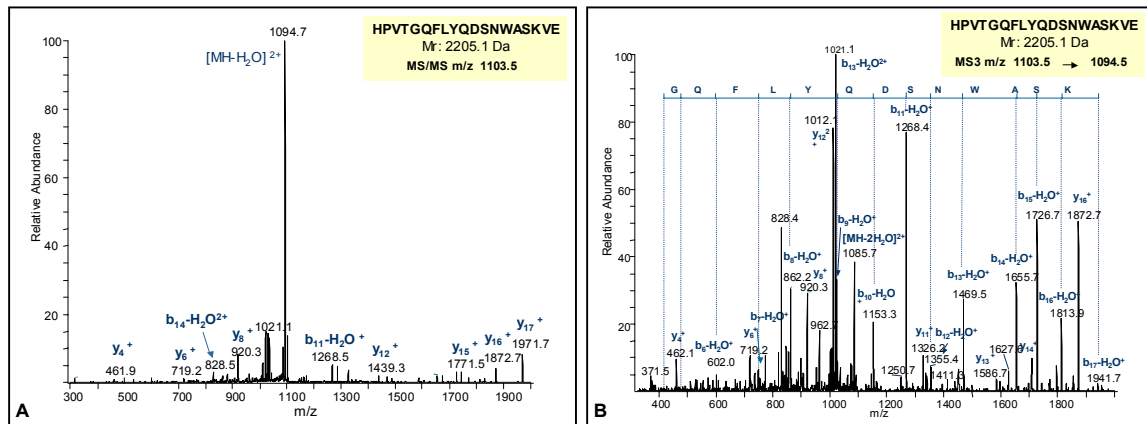


Figura 35: Espectros de MS/MS (A) y MS³ (B) de un péptido que contiene una treonina y dos serinas en su secuencia. La presencia de estos aminoácidos favoreció la formación de un ión mayoritario en el espectro de MS/MS que correspondía con la pérdida de una molécula de agua. El análisis MS³ permitió identificar la secuencia y determinar que el aminoácido responsable de la deshidratación inicial era la treonina en posición 4, ya que todos los iones de la serie b_6 - b_{16} , que contenían este aminoácido aparecían 18 unidades por debajo del valor esperado para el péptido original, mientras que los de la serie Y_4 - Y_{14} , que no contenían en ningún caso esta treonina, aparecían todos a su valor de m/z “correcto”.

► Péptidos con combinaciones específicas de aminoácidos:

El 23% de los péptidos secuenciados mostraban espectros de MS/MS con un fragmento dominante junto con otros fragmentos cuya abundancia relativa no superaba en ningún caso el 50% del ión principal. Estos patrones de fragmentación indicaban roturas específicas en ciertos aminoácidos o combinaciones de aminoácidos. En la mayoría de estos casos esta fragmentación estaba relacionada con la presencia de prolina, que mostraba una rotura preferente en el enlace amida de su lado N-terminal (Figura 36). Esta rotura podía estar, además, favorecida por el tipo de aminoácido que formaba parte de la pareja “XP” en la secuencia. Se conoce, por ejemplo, que en el caso de iones doblemente cargados, la presencia de un aminoácido ácido en el extremo amino de una prolina favorece la fragmentación selectiva en el enlace amida entre la pareja (Maux 2002; Schlosser 2000). En el conjunto de péptidos conteniendo parejas del tipo XP que mostraban este comportamiento la distribución de los residuos X fue la siguiente: Leu (22%), Asp (17%), Glu (17%), Asn (13%), Gln (13%), Lys (7%), Val (7%) y Thr (4%). De acuerdo con lo dicho arriba, el conjunto de nuestros datos espectrométricos indicaba que el ácido aspártico favorecía de forma importante esta fragmentación, ya que su frecuencia en estas parejas era alrededor de 3 veces superior a la encontrada en los espectros donde no se detecta una fragmentación preferente, observándose también un comportamiento similar para la glutamina y, en menor grado, para la asparagina y la leucina. Por el contrario, la presencia de fenilalanina en la pareja parecía proteger al enlace de la rotura de forma notable (solo 1 de un total de 14 péptidos con el motivo FP produjo problemas de identificación). Este mismo efecto, aunque menor, se observó en el caso del glutámico.

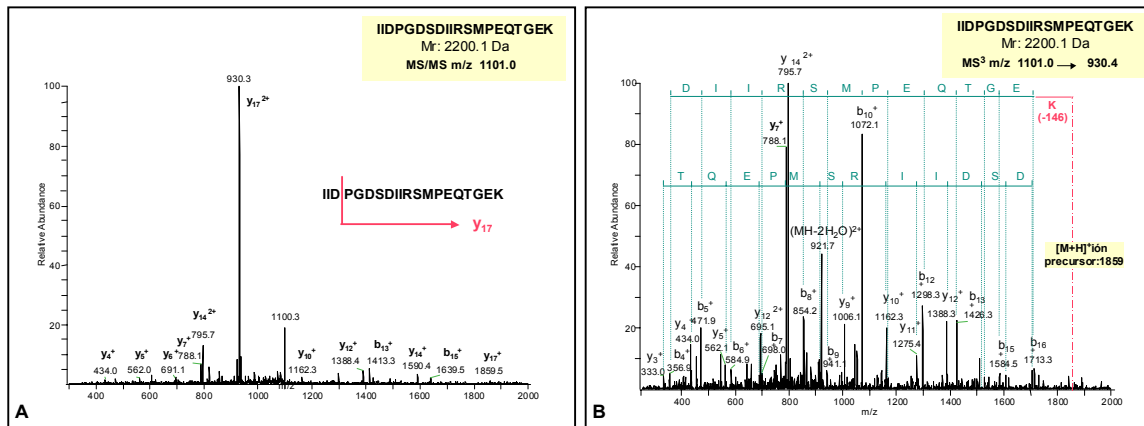


Figura 36: (A) Espectro de MS/MS del ión doblemente cargado (m/z 1101.0) del péptido IIDPGDSDIIRSMPEQTGEK. Aunque se observan diversos iones fragmento, todos excepto el principal tienen abundancias relativas inferiores al 20%. La señal mayoritaria es un ión doblemente cargado que aparece a m/z 930.3 y que corresponde con el fragmento y_{17}^{2+} formado a partir de la rotura específica del enlace Asp3-Pro4. (B) MS³ sobre el fragmento doblemente cargado a m/z 930.4. En este caso se obtiene información, tanto de la serie **b** como de la serie **y**, que permite la caracterización inequívoca de esta secuencia.

► Secuenciación de iones múltiplemente cargados:

Los péptidos de clase II tienen un tamaño de 15-30 aa por lo que en muchas ocasiones se forman iones triplemente cargados. La fragmentación de estos iones puede producir series de iones con una, dos o tres cargas. La complejidad de los patrones de secuencia obtenidos hace difícil su interpretación por lo que, si están también presentes, generalmente se seleccionan los correspondientes iones doblemente cargados para el análisis MS/MS. Sin embargo, dada la tendencia de las secuencias largas a generar iones triplemente cargados, en el análisis de péptidos de clase II, frecuentemente estos son los únicos con intensidad suficiente para generar espectros de fragmentación. En estos casos, el procedimiento seguido consistió en realizar un análisis MS³ sobre alguno de los iones mono o preferiblemente doblemente cargados en el espectro tal como se ejemplifica en figura 37.

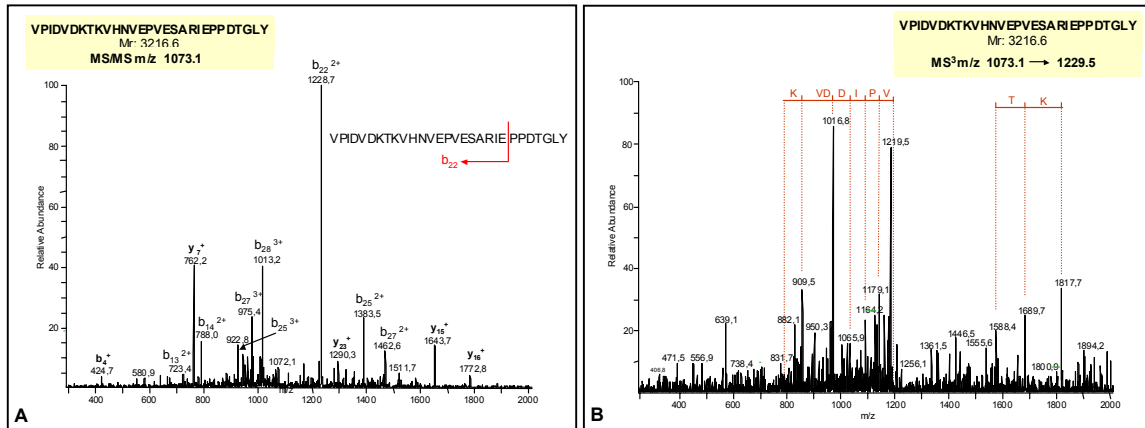


Figura 37: A) Espectro de MS/MS del ión triplemente cargado derivado de un péptido de 3215 Da. Se observa un patrón con un ión mayoritario doblemente cargado a 1228 que deriva de la rotura preferente del enlace Asp-Pro, a partir del cual no fue posible la secuenciación *de novo* del péptido aunque sí mediante búsqueda directa en base de datos. (B) La secuencia se confirmó mediante el análisis MS³ del ión b²²⁺, el más abundante del espectro.

1.3. SECUENCIAS DETECTADAS MEDIANTE nESI-ITMS/MS

En conclusión, las características de sensibilidad y resolución y la posibilidad de realizar experimentos de espectrometría de masas en tándem múltiple y de seleccionar las mejores condiciones para cada señal (trabajo interactivo entre el analista y la muestra) hacen la técnica de nESI-ITMS/MS un método muy eficiente para el análisis de los repertorios peptídicos asociados a la molécula de MHCII. Así, en el estudio de la línea celular B-LCL se consiguieron identificar, a partir de 24 fracciones cromatográficas, un total de 90 ligandos peptídicos que provenían de 25 proteínas diferentes (Tabla XII, páginas 92-95). Aunque la mayoría de las fracciones correspondían a la zona del cromatograma donde aparentemente, y en base a la traza del detector UV, eluía un mayor número de compuestos, también fue posible la identificación de péptidos fuera de esta zona en fracciones correspondientes al principio y final de la separación cromatográfica (fracciones correspondientes a 18-19% y 43-44% de acetonitrilo, respectivamente).

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS LIGANDOS PEPTÍDICOS ASOCIADOS A DR4 MEDIANTE MALDI-TOF/TOF

Las desventajas más importantes de las técnicas basadas en nESI-ITMS son su lentitud y la dificultad de la automatización del análisis. Por el contrario, las técnicas de MALDI-TOF, además de ser más sensibles, son extremadamente rápidas y fáciles de automatizar. Desgraciadamente, los métodos clásicos de secuenciación mediante MALDI basados en los fenómenos denominados de PSD (*Post Source Decay*), no proporcionan, generalmente, información de buena calidad para la identificación. La aparición reciente de sistemas tándem del tipo MALDI-TOF/TOF ha mejorado de forma importante la eficacia del MALDI aunque hasta este momento no se han publicado análisis de repertorios peptídicos asociados a MHCII utilizando esta metodología.

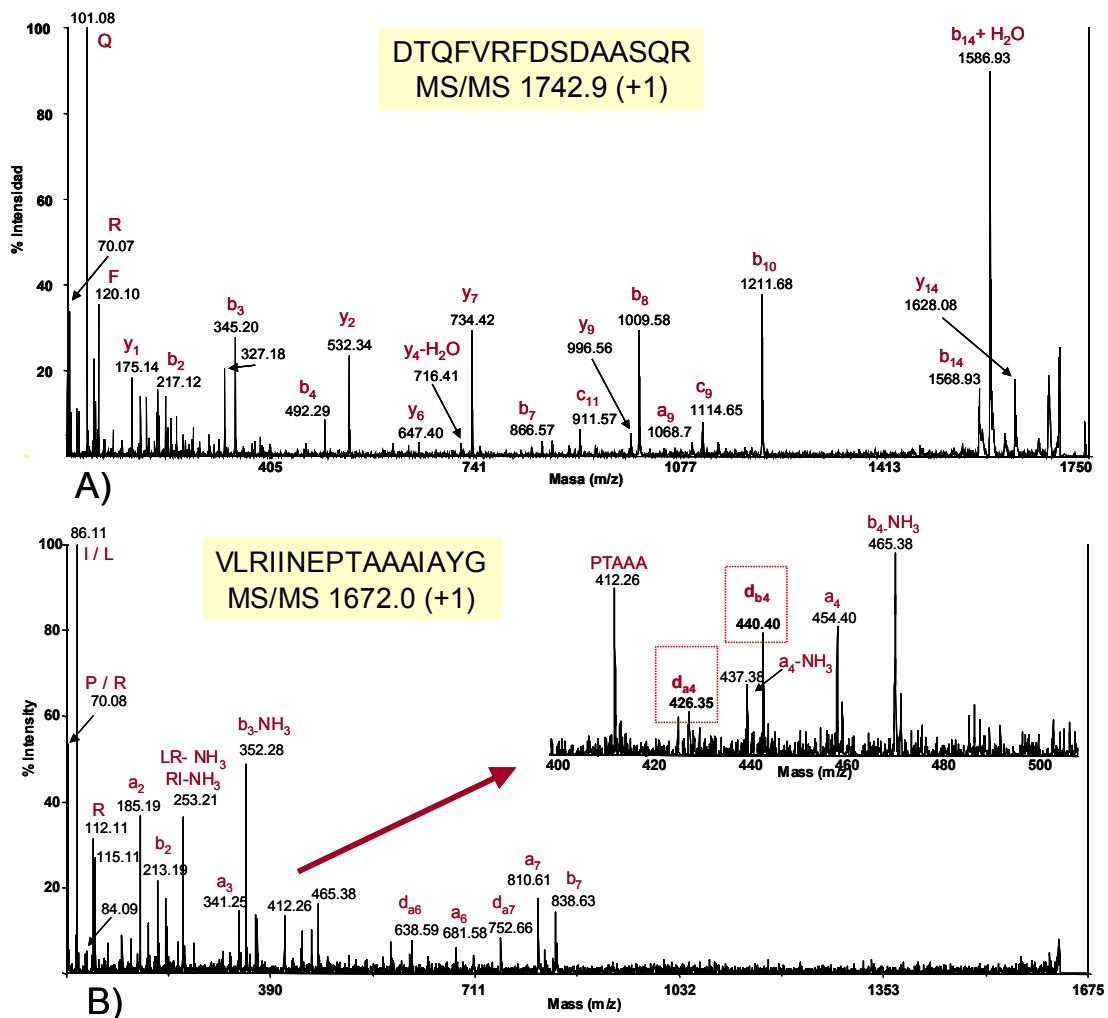


Figura 38: Espectros de MS/MS obtenidos mediante MALDI-TOF/TOF.

En la práctica, el MALDI-TOF/TOF produjo menos espectros con información de secuencia que el nESI-ITMS/MS. Solo en el 33% de los espectros obtenidos a partir de las células B-LCL pudo identificarse la proteína, mientras que en el caso del nESI-ITMS/MS este valor fue del 72%. Los iones más abundantes en los espectros de fragmentación TOF/TOF fueron los iones imonio, siendo en algunos casos los únicos iones detectados. Estos fragmentos, que proveen de una valiosa información cualitativa sobre la secuencia peptídica, no contienen, como grupo, ninguna información de secuencia.

Por otro lado, nuestros resultados indican que, en general, la secuenciación de iones dicargados o tricargados a energía baja, tal como ocurre en el análisis nESI-ITMS/MS, produce series más completas y reconocibles que el análisis de iones monocargados a altas energías característico del MALDI-TOF/TOF. Además de los iones **y** y **b** (mayoritarios en la fragmentación en la trampa iónica), en MALDI-TOF/TOF es frecuente observar iones del tipo **a**, producidos por pérdida del grupo carbonilo a partir de los de tipo **b**, de tipo **c** y numerosos fragmentos internos e iones derivados de la rotura de la cadena lateral (**v**, **w**, **d**) (Figura 38). La complejidad de estos espectros hace que la obtención manual de *tags* de secuencia sea a veces difícil.

A pesar de estos inconvenientes, la secuenciación mediante MALDI-TOF/TOF nos permitió obtener información sobre el repertorio peptídico de una forma muy rápida y con un consumo de muestra mínimo. Los fragmentos característicos de las colisiones de alta energía derivados de la rotura de las cadenas laterales, permitieron caracterizar asignaciones ambiguas como las derivadas de la presencia de aminoácidos o grupos de aminoácidos isobáricos (Figura 38b). Mediante esta técnica se consiguieron identificar 51 péptidos correspondientes a 20 proteínas diferentes (Tabla XII, páginas 92-95) utilizando 5 veces menos muestra que por nESI. Teniendo en cuenta la presencia o ausencia de los iones imonio en los espectros se observó que al menos el 93% de los iones fragmentados eran de naturaleza peptídica, ya que de los 189 espectros de MS/MS únicamente en 14 de ellos no se detectaron iones imonio. Del total de secuencias caracterizadas 34 ya habían sido identificadas previamente en el análisis por nESI-ITMS/MS. De los 17 péptidos adicionales obtenidos, 6 se detectaron en fracciones no analizadas previamente por nESI-ITMS/MS y el resto en fracciones analizadas mediante ambas técnicas.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS LIGANDOS PEPTÍDICOS ASOCIADOS A DR4 MEDIANTE capLC- μ ESI-ITMS/MS

En los análisis descritos en los apartados anteriores el fraccionamiento previo de la muestra mediante HPLC fue un paso imprescindible. En esta tercera aproximación se realizó el análisis directo del eluido de la columna de inmunoafinidad acoplando la separación por cromatografía líquida capilar a la secuenciación mediante espectrometría de masas en tándem (capLC- μ ESI-ITMS/MS).

Uno de los inconvenientes clásicos de la cromatografía capilar es su requerimiento de bajos volúmenes de inyección. Por un lado, los bajos flujos utilizados en esta técnica (aprox. 2 μ l/min en nuestro caso), provocan que el tiempo de carga de una muestra en la columna después de su inyección en un volumen de, por ejemplo, 50 μ l sea de más de 20 minutos. En estas condiciones, las últimas moléculas de la muestra alcanzan la columna mucho tiempo después de que las primeras empezaran a separarse o incluso fueran ya eluidas. En consecuencia no se obtiene una separación adecuada de estos componentes. Por otro lado, el volumen de inyección en el caso de las columnas utilizadas en este trabajo (180 μ m ID trabajando a 2 μ l/min) no debería superar los 0.4 μ l si se quieren mantener las condiciones óptimas de separación. Estos problemas pueden resolverse en parte mediante la utilización de un gradiente de disolventes y la inyección de la muestra en condiciones de fuerza eluotrópica por debajo de la requerida para la separación. Esta estrategia permite inyectar volúmenes muy superiores gracias a la “*re-concentración*” de los péptidos en la cabeza de la columna antes de la separación (Oosterkamp 1998, Abián 1999). Aún en estos casos, los compuestos más polares en la muestra pueden no ser retenidos y aparecer como picos anchos o incluso no ser observados.

Los problemas citados hacen recomendable el uso de volúmenes de inyección bajos en estas aplicaciones lo que redundará además en un ahorro del tiempo necesario para la separación. En nuestro caso el alto volumen de las fracciones obtenidas por inmunoafinidad (500 μ l) hacía necesaria su concentración previa. Sin embargo, observamos que este proceso provocaba la precipitación de sales y otros componentes de la muestra. Además, la alta concentración de sales y detergente provenientes de los tampones de la inmunopurificación interferían de tal forma en la separación y la ionización que no pudo detectarse ninguna señal en las muestras incluso después de mantener la columna cromatográfica lavándose en condiciones iniciales durante tiempos largos antes de la separación. Para solucionar este problema, el eluido de la columna de inmunoafinidad se purificó previamente a su análisis utilizando una columna capilar corta (0.53 ID x 1 cm de largo) para eliminar las sales y componentes más polares. El material desalado se eluyó de la mini-columna con un 50% de acetonitrilo antes de inyectarse en el sistema de capLC- μ ESI-ITMS/MS.

El análisis por capLC generó 137 espectros de MS/MS a lo largo de un cromatograma de 90 min de duración (Figura 39). La mayoría de los péptidos se encontraron entre los minutos 40 y 55 del cromatograma. A partir del minuto 55 se detectaron numerosas e intensas señales producidas en este caso por contaminantes orgánicos retenidos con los péptidos en la columna de prepurificación y copurificados con ellos. De esta forma, en una única inyección, se consiguieron identificar un total de 21 péptidos que pertenecían a 9 proteínas diferentes (Tabla XII, páginas 91-94).

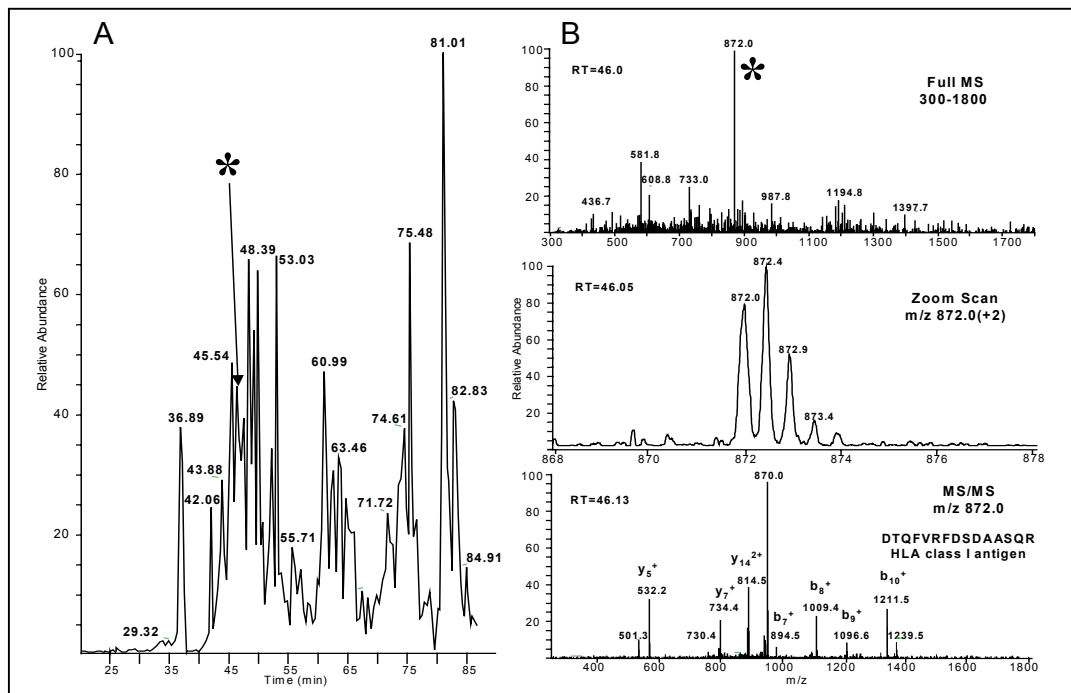


Figura 39: (A) Cromatograma de capLC-ESI-ITMS/MS obtenido en el análisis del repertorio peptídico asociado a DR4 a partir de 500 millones de células B-LCL. Todos los péptidos detectados eluyen en una zona del cromatograma que comprende desde el minuto 44 al 59. El resto de señales detectadas corresponden a contaminantes de baja polaridad copurificados con la fracción peptídica. (B) Espectros de barrido completo, de alta resolución y de MS/MS obtenidos para uno de los péptidos identificados.

4. IDENTIFICACIÓN DE DE LOS LIGANDOS PEPTÍDICOS ASOCIADOS A DR4 MEDIANTE SECUENCIACIÓN *DE NOVO*.

En los trabajos realizados en esta tesis, se han conseguido identificar un total de 295 péptidos a partir de sus espectros de fragmentación y mediante búsqueda en bases de datos (ver apartado III.7). Sin embargo, una parte de los espectros obtenidos no dio ningún resultado positivo en dicha búsqueda, a pesar de que estos fueran, aparentemente, de buena calidad. Este hecho

puede ser debido a que los péptidos fragmentados correspondan a secuencias pertenecientes a proteínas no descritas en las bases de datos o a secuencias diferentes a las descritas, ya sea por la presencia de modificaciones postraduccionales, por modificaciones en los genes que codifican por dichas proteínas o por posibles errores en la base de datos. En estos casos, la estrategia utilizada ha sido la secuenciación *de novo* de los péptidos, con objeto de determinar su secuencia completa o al menos *tags* de secuencia susceptibles de dar información sobre el posible origen del péptido mediante análisis de homología. Actualmente existen programas diseñados para secuenciar péptidos *de novo* a partir de los espectros de fragmentación. A diferencia de la identificación mediante búsqueda en bases de datos (en la que se comparan los valores de los fragmentos obtenidos en el espectrómetro con los valores que se obtienen al fragmentar virtualmente secuencias peptídicas extraídas de la base de datos con el mismo peso molecular que el ión precursor), en la secuenciación *de novo* los espectros se interpretan a partir del análisis de los patrones de fragmentación, sin recurrir a datos de secuencia externos.

En este trabajo se utilizó el programa de secuenciación *de novo* Lutefisk XP, desarrollado por Richard Johnson y Amgen Inc en 1996 (Johnson 2002; Taylor 2002) (<http://www.hairyfatguy.com/Lutefisk/>). Aunque este programa de acceso libre ha sido ya utilizado por diversos grupos (Banoub 2004; Guo 2000) su fiabilidad se evaluó previamente con espectros de secuenciación de péptidos de MHCII. Para ello, se seleccionaron al azar un grupo de espectros que habían producido identificaciones positivas por búsqueda en bases de datos y se sometieron al análisis *de novo*. Se observó que en todos aquellos casos en los que el valor de probabilidad (Prc) calculado por el programa de secuenciación era igual o superior a 0.3-0.4 la secuencia identificada era correcta o contenía *tags* válidos para su utilización en búsquedas de homología (Tabla XI)

Así, en nuestro estudio, todos los espectros de MS/MS que no produjeron ningún resultado mediante búsqueda en bases de datos se secuenciaron también manualmente y mediante el programa Lutefisk XP. En el caso de las células B-LCL se obtuvo información adicional de secuencia de 9 espectros, determinándose *tags* de hasta 13 aa de longitud (Tabla XIV). Ninguno de estos *tags* pudo relacionarse, sin embargo, con ninguna secuencia proteica descrita en bases de datos en la búsqueda por homología. En la caracterización de los repertorios de las células epiteliales que se describen en las secciones siguientes (Apartados V y VI) el análisis *de novo* permitió identificar seis nuevos *tags* que condujeron a las correspondientes proteínas de origen mediante búsqueda por homología (En las tablas de los repertorios presentadas en los capítulos siguientes se incluyen las identificaciones obtenidas a partir de secuencias *de novo*. Los *tags* no identificados se encuentran también en una tabla anexa). Una de estas proteínas, la filamina, resultó ser una proteína recién incluida en la base de datos y que por este motivo, no fue identificada en su momento.

Tabla XI: Resultados obtenidos para la secuenciación *de novo* de 10 péptidos de clase II, previamente identificados por búsqueda en bases de datos, utilizando el software Lutefisk XP. Para cada secuencia se muestra marcado en color el *tag* identificado correctamente. Las secuencias candidatas están ordenadas de acuerdo con su Pr(c) que es la probabilidad estimada de ser correcto. Este valor se calcula a partir de una ecuación en la que se incluyen los otros cuatro parámetros indicados en la tabla. *Pevzscr* es un valor que penaliza la ausencia de iones esperados (Dancik 1999), *Quality* es el porcentaje de las masas del péptido que puede ser explicada por una serie consecutiva de iones, *Intscr* es el porcentaje de la intensidad de los iones fragmento que puede ser explicada utilizando iones de tipo b, y, internos, etc. y *X-corr* es el valor de correlación cruzada normalizado.

Péptido identificado por búsqueda en base de datos	Tag Lutefisk						
	Secuencia	Ran k	Pr(c)	PevzSc	Quality	IntScr	X-corr
KNTLYLQMNLSRAEDT	KNTLYLKMNMAVKNTK	1	0.29	0.57	0.66	0.61	0.51
	KNTLYLKMNMAAT[299.2]V	2	0.27	0.52	0.66	0.64	0.47
	KNTLYLKMNMAARNTK	3	0.27	0.55	0.66	0.58	0.51
QVTQPTVGMNFKTPRGAV	[229.0][269.2]TKFNMGVTPK[293.2]	1	0.51	0.75	0.46	0.88	0.56
	[228.0][270.1]TKFNMGVTPK[293.2]	2	0.49	0.73	0.46	0.86	0.56
	[245.0][253.2]G[172.0]FNMGVTPK[293.2]	3	0.43	0.66	0.46	0.85	0.52
MAYMASKE	MAYMASKE	1	0.83	0.99	1.00	0.82	0.64
	FKSAMYAL	2	0.77	0.95	1.00	0.82	0.58
VPGTYKITASARGYNPVT	[196.2]GTYKLT[229.0]R[220.1]N[196.2]T	1	0.77	0.85	0.46	0.91	0.81
	196.2]SAYKLT[229.0]R[220.1]N[196.2]T	2	0.63	0.82	0.27	0.87	0.78
TGQEVVFAEPDNKNVYK	[211.1]P[206.0]VFVAE[229.0][225.2]NVYK	1	0.30	0.65	0.27	0.78	0.50
	[211.1]P[206.0]VFVAE[284.2][170.1]NVYK	2	0.29	0.62	0.27	0.78	0.50
	[354.1][160.0]VFVAE[229.0][225.2]NVYK	3	0.27	0.68	0.27	0.75	0.47
GGPSVFIFPPKIKDVLMS	[397.2]FLFAMFK[201.0]V[244.0][200.0]	1	0.17	0.58	0.44	0.67	0.37
	[397.2]FLFAMF[144.0]GKV[244.0][200.0]	2	0.17	0.53	0.37	0.69	0.39
	[397.2]FLFAMF[144.0]GNL[244.0][200.0]	3	0.16	0.57	0.37	0.67	0.39
LQPFDYDPNEKSK	[241.2]PFDYDTD[190.0]A[206.0]	1	0.60	0.72	0.70	0.94	0.52
	[241.2]PFDYDTD[190.0][277.1]	2	0.59	0.72	0.70	0.94	0.50
	[241.2]PFDYDT[241.2]T[240.1]	3	0.57	0.71	0.63	0.88	0.58
GFGDLKTPAGLQVLND	[247.0]ELKT[168.0]GLKVLND	1	0.57	1.14	0.46	0.86	0.46
	[247.0]LVKLG[168.1]TKLEND	2	0.53	1.04	0.43	0.86	0.48
	[247.0]LEKT[168.0]GLKVLND	3	0.53	1.17	0.46	0.84	0.42
EDLRSWTAADTAAQITQ	[359.7]KAATDAATRAAKLTK	1	0.71	1.21	0.81	0.81	0.49
	[247.0]MY[245.0]TAADTAAKLT	2	0.61	1.07	0.58	0.84	0.51
	[247.0]MY[190.0]DAARTAAKLT	3	0.60	1.09	0.61	0.85	0.47
GPTPSQSRFQVDPVSEENAG	54.1]TPSSA[213.1]FGAVD[196.2]SE[242.1]	1	0.28	0.67	0.27	0.75	0.50
	[154.1]TPSSA[213.1]FKVD[196.2]SE[242.1]	2	0.27	0.63	0.27	0.75	0.50
	[154.1]EENAD[215.0]SAVD[196.2]SE[242.1]	3	0.25	0.53	0.37	0.75	0.47
GPEYWEEQTQRAKG	[283.2]YWE[170.1]STKRA[185.0]	1	0.19	0.65	0.46	0.60	0.42
	[283.2]YWE[170.1]STKR[256.2]	2	0.16	0.63	0.46	0.57	0.42

Es importante indicar que del total de espectros analizados no identificados inicialmente en base de datos el 28% generaron mediante análisis *de novo*, secuencias tentativas con puntuaciones superiores a 0.3 y *tags* de más de tres aminoácidos. El 17% de estos *tags* permitieron identificar la proteína origen. En la mitad de los casos la secuencia encontrada en la base de datos era idéntica a la experimental mientras que en la otra mitad se trataban de secuencias homólogas que diferían en un aminoácido de las descritas en la base de datos.

Muchos de los espectros no identificados producían *tags* de secuencia de alta fiabilidad bien a través de la secuenciación manual o utilizando el software Lutefisk. Estos péptidos podrían contener modificaciones postraduccionales o corresponder a *tags* de secuencia de proteínas no descritas en las bases de datos que impedirían su identificación. Se han descrito además recientemente fragmentos peptídicos presentados por MHC I que están formados por dos secuencias no contiguas en la proteína de origen y que son producidos por un procesamiento alternativo de ésta denominado transpeptidación. El mecanismo que da lugar a estos péptidos implicaría un procesamiento postraduccionales de la proteína y se ha sugerido que el corte y el procesado del péptido podría ser llevado a cabo por el proteasoma (Hanada 2004; Vigneron 2004). En algunos casos, el rápido crecimiento de las bases de datos ha permitido identificar nuevas proteínas a partir de espectros no identificados previamente. Por este motivo a lo largo de estos estudios la información espectrométrica almacenada se ha reevaluado de forma periódica.

5. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

La aplicación de las técnicas descritas en este capítulo al análisis de los repertorios peptídicos asociados a DR4 en células B-LCL ha permitido identificar un total de 117 péptidos correspondientes a 25 proteínas diferentes (Tablas XII-XIV y figura 40). Las características de este repertorio se discutirán en el apartado V.

El conjunto de datos presentados en este capítulo indican que el nESI-ITMS/MS es el método más efectivo y a la vez, el más lento y menos automatizable para la identificación exhaustiva de los repertorios peptídicos. A pesar de la limitada efectividad del MALDI-TOF/TOF en la producción de espectros interpretables con relación al nESI-ITMS/MS, la velocidad con que puede obtenerse esta información puede hacer preferible esta técnica en casos donde el número de muestras a analizar es alto. La velocidad de análisis de estas muestras mediante la técnica de nanospray fue de aproximadamente 1-2 muestras por hora mientras que mediante MALDI-TOF/TOF pudo analizarse el repertorio completo en un espacio de pocas horas. Por otro lado no todos los péptidos responden igual a estos métodos de ionización de forma que algunos pueden detectarse en una de las técnicas y no en la otra. En consecuencia, para una descripción no sesgada del repertorio peptídico es necesario utilizar estos procedimientos de forma complementaria.

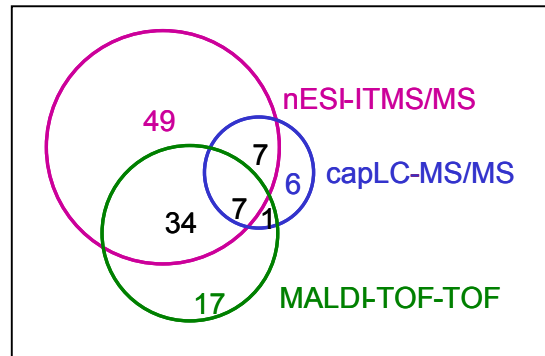


Figura 40: Número de péptidos identificados mediante cada una de las técnicas de utilizadas.

Tabla XII: Comparación de los resultados obtenidos en la caracterización del repertorio peptídico mediante nESI-ITMS/MS, MALDI-TOF/TOF y capLC-ESI-ITMS/MS.

Técnica	Consumo de muestra (%)	n° péptidos identificados	Automatización	n° de proteínas identificadas	n° de epítomos caracterizados
nESI-ITMS/MS	40%	91	-	22	27
MALDI-TOF/TOF	8%	51	↑	20	21
CapLC- μ ESI-ITMS/MS	16%	21	↑↑↑	9	7
TOTAL	-	116	-	25	32

El análisis por capLC-MS/MS resultó ser, en conjunto, un método adecuado para determinar las características generales del repertorio de forma rápida y automatizada, ya que con una cantidad de muestra mínima y sin un procesamiento previo se pudo caracterizar el número de péptidos suficiente para conocer los patrones de los ligandos que se unen a un determinado alelo de MHCII.

Tabla XIII: Repertorio peptídico asociado a DR4 en las células B-LCL. Los péptidos identificados se ordenaron en función de su motivo de unión a DR4 indicándose para cada uno la fracción de HPLC donde se secuenció (excepto en el caso del μ LC, donde no se realiza separación previa del extracto), la técnica o técnicas con las que se identificó, el peso molecular, el número de aa, la proteína origen y el índice de afinidad teórico.

Fr HPLC	Técnica secuenciación	Mr (Da)	Motivo unión DR4	n° aa	Proteína origen (aa ₁ -aa _n)	acceso DB	L*	IA**
	NESI TOF μ LC		P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9					
34	x	1577.8	FVVKDQTVIQNTDGN	14	Serotransferrin (559-572)			
41,42	x	1691.8	DVA FVVKDQTVIQNTD	15	Serotransferrin (556-570)			
42	x	1749.9	DVA FVVKDQTVIQNTDG	16	Serotransferrin (556-571)	Q29443	EX	6
41	x	1805.9	GDVA FVVKDQTVIQNTDG	17	Serotransferrin (555-571)			
41	x	1862.9	DVA FVVKDQTVIQNTDGN	17	Serotransferrin (556-572)			
41	x	1919.9	GDVA FVVKDQTVIQNTDGN	18	Serotransferrin (555-572)			
39	x	2230.1	KPVVAEFHGTKDNPTTHYY	19	Serotransferrin (96-114)	Q29443	EX	1.7
31	x	1456.7	LNQELRADGTVNQ	13	Apolipoprotein D (77-89)			
35	x	1528.8	QELRADGTVNQIEG	14	Apolipoprotein D (79-92)	P05090	EX	5.1
36	x	1657.8	QELRADGTVNQIEGE	15	Apolipoprotein D (79-93)			
31	x	1779.9	IKEKYGKDATNVGDEGG	17	α -enolase (196-212)	P06733	C	3.4
53	x	1923.0	GVPLYRHIALDLGNSEVI	18	α -enolase (126-143)	P06733	C	1.8
37	x	1565.8	IEKFEKEAAEMGKG	14	Elongation Factor \square (1-16)	P24534	C	0.8
38	x	1241.7	FVRFSDSAASQ	11	HLA-A2, A69 (57-67, 29-42)			
37	x	1397.7	FVRFSDSAASQR	12	HLA-A2, A69 (57-68, 29-43)			
40	x	1626.8	TQFVRFSDSAASQR	14	HLA-A2, A69 (55-68, 27-43)			
40,41	x	1741.8	DTQFVRFSDSAASQR	15	HLA-A2, A69 (54-68, 26-43)			
44	x	1872.9	DTQFVRFSDSAASQRM	16	HLA-A2, A69 (54-69, 26-44)			
42	x	1955.9	VDDTQFVRFSDSAASQR	17	HLA-A2, A69 (52-68, 24-43)			
41	x	1856.8	DDTQFVRFSDSAASQR	17	HLA-A2, A69 (53-68, 25-43)			
44	x	1984.8	DDTQFVRFSDSAASQRM	17	HLA-A2, A69 (53-69, 25-44)			
43	x	1998.8	DTQFVRFSDSAASQRME	17	HLA-A2, A69 (54-70, 26-45)			
44,45	x	2098.9	DTQFVRFSDSAASQRMEP	18	HLA-A2, A69 (54-71, 26-46)	P01892 P10316	M	3
44	x	2216.0	VDDTQFVRFSDSAASQRME	19	HLA-A2, A69 (52-70, 24-45)			
45	x	2214.1	DDTQFVRFSDSAASQRMEP	19	HLA-A2, A69 (53-71, 25-46)			
43	x	2271.0	DTQFVRFSDSAASQRMEPR	19	HLA-A2, A69 (54-72, 24-47)			
	x	2370.3	DDTQFVRFSDSAASQRMEPR	20	HLA-A2, A69 (53-72, 25-45)			
46	x	2313.0	VDDTQFVRFSDSAASQRMEP	20	HLA-A2, A69 (52-71, 24-46)			
44,45	x	2469.1	VDDTQFVRFSDSAASQRMEPR	21	HLA-A2, A69 (52-72, 24-45)			
51	x	2823.3	VDDTQFVRFSDSAASQRMEPRAPW	24	HLA-A2, A69 (52-75, 24-48)			
52,53	x	3065.3	VDDTQFVRFSDSAASQRMEPRAPWIE	26	HLA-A2, A69 (52-77, 24-50)			
54	x	3327.6	YVVDDTQFVRFSDSAASQRMEPRAPWIE	28	HLA-A2, A69 (50-77, 22-50)			

Sigue →

Tabla XIII :

Fr HPLC	Técnica secuenciación	Mr (Da)	Motivo unión DR4	n° aa	Proteína origen (aa ₁ -aa ₂)	acceso DB	L.*	IA**
nESI	TOF TOF	μLC	P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9					
38	x		1366.7	F V R F D S D A A S P R	12	HLA-B35 /HLA-Cw04 (58-68)		
41	x	x	1595.8	T Q F V R F D S D A A S P R	14	HLA-B35 /HLA-Cw04 (55-68)		
41	x	x	1710.8	D T Q F V R F D S D A A S P R	15	HLA-B35 /HLA-Cw04 (54-68)	P30685	M 3
39,42	x	x	1825.8	D D T Q F V R F D S D A A S P R	16	HLA-B35 /HLA-Cw04 (53-68)	P30481	
43	x	x	1924.8	V D D T Q F V R F D S D A A S P R	17	HLA-B35 /HLA-Cw04 (52-68)		
41,43	x	x	2150.0	D T Q F V R F D S D A A S P R G E	19	HLA-Cw04 (54-70)		
44	x		2208.0	V D D T Q F V R F D S D A A S P R G E P	20	HLA-Cw04 (52-71)		
44	x		2236.1	V D D T Q F V Q F D S D A A S P R G E P R	21	HLA-Cw04 (52-72)		
42	x	x	2364.1	V D D T Q F V R F D S D A A S P R G E P R	21	HLA-Cw04 (52-73)	P30504	M 3
41	x		2265.0	D D T Q F V R F D S D A A S P R G E P R	21	HLA-Cw04 (53-72)		
49	x	x	2776.3	V D D T Q F V R F D S D A A S P R G E P R E P W	24	HLA-Cw04 (52-75)		
49,51	x	x	3004.5	V D D T Q F V R F D S D A A S P R G E P R E P W V E	26	HLA-Cw04(52-77)		
42	x		2037.9	D T Q F V R F D S D A A S P R T E P	18	HLA-B35 (54-71)		
44	x	x	2252.0	V D D T Q F V R F D S D A A S P R T E P	20	HLA-B35 (52-71)		
41	x	x	2194.0	D T Q F V R F D S D A A S P R T E P R	20	HLA-B35 (54-72)		
40,41	x	x	2309.1	D D T Q F V R F D S D A A S P R T E P R	21	HLA-B35 (53-72)	P30685	M 3
42,43	x	x	2408.1	V D D T Q F V R F D S D A A S P R T E P R	21	HLA-B35 (52-72)		
50	x	x	2762.4	V D D T Q F V R F D S D A A S P R T E P R A P W	24	HLA-B35 (52-75)		
53	x		2875.4	V D D T Q F V R F D S D A A S P R T E P R A P W I	25	HLA-B35 (52-76)		
39	x	x	1701.9	K H K W E A A H V A E Q L R	14	HLA-A2,A69 (168-181,140-156)	P01892	M 1.5
39	x	x	1803.0	T K H K W E A A H V A E Q L R	15	HLA-A2,A69 (167-181,142-156)	P10316	
39	x		1904.0	T T K H K W E A A H V A E Q L R	16	HLA-A2,A69 (166-181,141-156)		
45	x		1434.7	L S S W T A A D T A A Q I T	14	HLA-B35, B44 (154-167)		
45	x		1562.8	L S S W T A A D T A A Q I T Q	15	HLA-B35, B44 (154-168)		
		x	1677.4	D L S S W T A A D T A A Q I T Q	16	HLA-B35, B44 (153-168)	P30685	M 2.4
47	x		1833.9	D L S S W T A A D T A A Q I T Q R	17	HLA-B35, B44 (153-169)	P30481	
47	x	x	1962.9	E D L S S W T A A D T A A Q I T Q R	18	HLA-B35, B44 (152-169)		
52	x		2406.2	E D L S S W T A A D T A A Q I T Q R K W E	21	HLA-B35, B44 (152-172)		
45,46	x	x	1746.9	D L R S W T A A D T A A Q I T Q	16	HLA-Cw04, A69 (153-168, 128-143)		
45	x		1875.9	E D L R S W T A A D T A A Q I T Q	17	HLA-Cw04, A69 (152-168, 127-143)	P30504	M 2.4
46	x		1903.0	D L R S W T A A D T A A Q I T Q R	17	HLA-Cw04, A69 (153-169, 128-144)	P10316	
53	x		2277.1	E D L R S W T A A D T A A Q I T Q R K W	20	HLA-Cw04, A69 (152-171, 127-145)		
52	x		1793.9	K D Y I A L N E D L R S W T A	15	HLA-Cw05 (145-159)		
52	x		1864.9	K D Y I A L N E D L R S W T A A	16	HLA-Cw05 (143-160)		
52	x		1850.9	G K D Y I A L N E D L R S W T A	16	HLA-Cw05 (144-159)	Q9TNN7	M 1.2
		x	1896.8	D G K D Y I A L N E D L R S W T A	17	HLA-Cw05 (143-159)		
53	x	x	1779.0	V P K W I S I M T E R S V P H	15	Annexin A2 (210-224)	P07355	M 4.9
55	x	x	1894.0	D V P K W I S I M T E R S V P H	16	Annexin A2 (209-224)		

Sigue →

Tabla XIII:

Fr HPLC	Técnica secuenciación	Mr (Da)	Motivo unión DR4	n° aa	Proteína origen (aa ₁ -aa ₂)	acceso DB	L.*	IA**
	nESI	TOF TOF	μLC	P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9				
48	x	x	1767.9	NTLYLQMNSLRAEDT	15	Ig Heavy Chain (32-46)		
46	x		1897.9	KNTLYLQMNSLRAEDT	16	Ig Heavy Chain (31-46)	P01764	M 3.6
48	x	x	1838.9	NTLYLQMNSLRAEDTA	16	Ig Heavy Chain (32-47)		
47	x		1967.0	KNTLYLQMNSLRAEDTA	17	Ig Heavy Chain (31-47)		
36-37	x		1570.8	HKVYACEVTHQGLS	14	Ig kappa light ch. (189-202)		
36	x		1698.9	KHKVYACEVTHQGLS	15	Ig kappa light ch. (188-202)		
36	x		1827.9	EKHKVYACEVTHQGLS	16	Ig kappa light ch. (187-202)		
37,38	x	x	1882.9	KHKVYACEVTHQGLSSP	17	Ig Kappa light ch. (188-204)	P01834	M 2.4
38	x	x	1754.9	HKVYACEVTHQGLSSP	17	Ig kappa light ch. (189-204)		
38	x		2011.9	EKHKVYACEVTHQGLSSP	18	Ig kappa light ch. (187-204)		
40	x	x	1982.0	KHKVYACEVTHQGLSSPV	18	Ig kappa light ch. (188-205)		
40	x		2111.1	EKHKVYACEVTHQGLSSPV	19	Ig kappa light ch. (187-205)		
58		x	1715.9	GE L V T E G V A E S L F L P R	16	HLA class II, DPα ch. (156-171)	P20036	M 4.2
58		x	1829.9	NGE L V T E G V A E S L F L P R	17	HLA class II, DPα ch. (155-171)		
56		x	1951.9	MHHWLLFEMSRHSLE	15	li (185-199)	P04233	M 2.8
52	x		1910.9	YLLYYTEFTPTKDE	15	β2-microglobulin (83-97)	P01884	M 1.9
34	x		2025.0	TPKIQVYSRHPAENGKSN	18	β2-microglobulin (24-41)	P01884	M 0.7
49	x	x	2205.1	HPVTGQFLTQDSNWA SKVE	19	Transferrin recep. (534-561)	P02786	M 4.2
			1613.8	VLR I I N E P T A A A I A Y	15	HSC 71 (169-183)		
50	x	x	1670.9	VLR I I N E P T A A A I A Y G	16	HSC 71 (169-184)		
52	x		1785.0	NVLR I I N E P T A A A I A Y G	17	HSC 71 (168-184)		
57	x	x	1898.0	LNVLRIINEPTAAA IAYG	18	HSC 71 (167-184)	P11142	U 4
57	x		2013.1	NVLR I I N E P T A A A I A Y G L D	19	HSC 71 (168-186)		
63	x		2426.3	DAGTIAGLNVLR I I N E P T A A A I A Y	24	HSC 71 (160-183)		
63	x	x	2483.3	DAGTIAGLNVLR I I N E P T A A A I A Y G	25	HSC 71 (160-184)		
53	x		1935.0	GERA M T K D N N L L G K F E L	17	HSC 71 (445-461)		
51	x		2036.0	GERA M T K D N N L L G K F E L T	18	HSC 71 (445-462)	P11142	U 1.4
32	x			GERA M T K D N N L L G K F E	16	HSC 71 (445-460)		
61		x	2218.2	LPSEKAI FLFVDKTVPPQSS L	20	Ganglioside expres. factor 2 (70-89)	O08765	U 4.2
67		x	1694.9	HPPE L L F S A S L P A L G F	16	Mannosidase α B (559-574)		
63	x	x	1781.9	HPPE L L F S A S L P A L G F S	17	Mannosidase α B (559-575)	O00754	VE 3.3
63	x		1883.0	HPPE L L F S A S L P A L G F S T	18	Mannosidase α B (559-576)		
56	x	x	2011.9	N I F S F Y L S R D P D A Q P G G E	18	Catepsin D (227-244)	P07339	VE 0.9
55	x		2478.3	GPQEKKV V V Y L Q K L D T A Y D D L G	22	Cathepsin C (58-79)	P53634	VE 1.2
54		x	1933.1	Y D H N F V K A I N A I Q K S W	16	Cathepsin C (170-185)		
54,55		x	2034.1	Y D H N F V K A I N A I Q K S W T	17	Cathepsin C (170-186)	P53634	VE 3.9

Segue →

Tabla XIII:

Fr HPLC	Técnica secuenciación	Mr (Da)	Motivo unión DR4	n° aa	Proteína origen (aa _n -aa _i)	acceso DB	L*	IA**
nESI	TOF TOF	μLC	P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9					
43	x	1596.8	T G N Y R I E S V L S S S G K	15	Ganglioside GM2 act (168-179)	P17900	VE	7.5
		1752.9	T G N Y R I E S V L S S S G K R	16	Ganglioside GM2 act (168-180)			
65		1189.7	F P L M T L Q L L D	10	Lysosomal-assoc. prot. (134-143)	Q13571	VE	-0.7
47.48	x	1759.9	L P S Y E E A L S L P S K T P E	16	Lysosomal-assoc. prot. (231-252)			
51		1957.8	V V L P S Y E E A L S L P S K T P E	17	Lysosomal-assoc. prot. (229-252)			
47	x	1816.9	L P S Y E E A L S L P S K T P E G	17	Lysosomal-assoc. prot. (231-253)	Q13571	VE	1.3
51	x	2231.2	V V L P S Y E E A L S L P S K T P E G G P A P P P	23	Lysosomal-assoc. prot. (229-257)			
50	x	1829.9	Q P P H E Y V P W V T V N G K P	16	γ-INF induc. prot IP-30 (210-225)	P13284	VS	2.2

(*) Localización: C: Citosol, E: Exógena, ER: Retículo endoplasmático, M: Superficie celular, VE: Vesículas endocíticas, VS: Vesículas secretoras, U: Ubicua, L: Lisosomal. (**) Índice de afinidad teórico (1) Secuencia identificada por búsqueda por homología en BLAST a partir de/ tag obtenido mediante secuenciación de novo.

Tabla XIV: Secuencias parciales o tags obtenidos a partir de los espectros de MS/MS que no dieron resultado en la búsqueda en bases de datos. Las secuencias obtenidas en Lutefisk XP con una puntuación superior a 0.5 y los tags de más de 4 aminoácidos obtenidos manualmente se utilizaron para realizar una búsqueda por homología mediante BLAST, no identificándose ninguna proteína con una homología significativa.

Fr HPLC	Mr (Da)	Tags secuenciados manualmente*	Tags secuenciados con Lutefisk*** (n) puntuación
42	1516.6	786-FSVNH[QK] / 786-SFVNL[XG o AV]	[170.1]XNVFS[266.1]ST[185.0]E (0.106)
34	1653.6	147-TG[QK]V[QK]A-922 / 147-TG[QK]CAD-931 o 147-TGC[QK]AD-931	FTGKVK[A]200.0]DAKCGTE (0.610) [245.0]YKAD[200.0]AKVKGTE (0.579)
57	1691.8	461-NXTTVXS[QK]DX[QK] (COOH)	XEPYSXVTTXDLSNK (0.508) NKPYSLVTTXDLSNK (0.506)
57	1692	576-XTTVXS-502	-
57	1713.8	912-VXSNE[XKQ] (COOH)	KXP[196.2]L[265.2]V[201.0]XKXK (0.157)
37	1756.8	939-GGTVNI[QK]XEG	[356.2]AGN[204.0]HGTVNI[300.1] (0.061)
36	1766.8	248-G[QK]V[QK]A-1035 o 830-TDA[QK]Y-358.5	[380.2]A[198.1]AD[200.0]AKVK[287.1] (0.256)
56	1725.9	326-IFmIDMAVSXEGYXR	[227.1]VFDMAVSXEGYLR (0.967)
40	1948.6	1294-XAYA[FM]A (COOH)	[236.2]AYFNR[315.1]EF[225.2]RA (0.044)

(***). Los aa Ile y Leu se marcan con una X. En el caso de que existan dos posibles aa en una posición, se han indicado los dos dentro de corchetes.

IV.1.2.

COMPARACIÓN DE LOS REPERTORIOS DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A HLA-DR4 EN
CÉLULAS EPITELIALES FRENTE A CÉLULAS DE EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DEL
MISMO ALELO

1. ANTECEDENTES Y MODELO EXPERIMENTAL

La expresión constitutiva de moléculas de MHCII está restringida a una subpoblación de células especializadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T que se denominan células presentadoras de antígeno (APC). Estas células tienen desarrollados mecanismos muy efectivos para captar proteínas provenientes de patógenos exógenos, procesarlas y presentar en la superficie celular los péptidos generados unidos a las moléculas de MHCII. Sin embargo, en condiciones de autoinmunidad, las células epiteliales periféricas también pueden expresar moléculas de MHCII en su superficie (Catalfano 1997). En las enfermedades autoinmunes órgano-específicas estas células epiteliales son el principal objetivo de la respuesta inmune evidenciándose que existe una relación entre los complejos péptido-MHCII formados y el inicio o la perpetuación de esta respuesta.

Las células epiteliales están especializadas en la síntesis y secreción de moléculas específicas del tejido en el que se encuentran (como pueden ser las hormonas en las células endocrinas) existiendo, por lo tanto, diferencias importantes en las vías endocítica y secretora de estas células respecto a las APC. Estas características, junto con la expresión de diferentes proteasas en cada tipo celular, condicionarán el repertorio peptídico capaz de unirse a la molécula de MHCII en cada célula.

En este capítulo se ha comparado el repertorio peptídico asociado a DR en una APC homocigota para el alelo HLA-DR4*0401 (células B-LCL) con el de una línea celular de insulinoma de rata (RIN) transfectada con el mismo alelo de DR y las moléculas Ii y HLA-DM (línea celular DR4IiDM). Esta línea transfectada expresa moléculas de clase II en superficie y se considera un modelo de célula epitelial autoinmune (Serradell 1999). En este trabajo se han evidenciando diferencias tanto en el tipo de péptidos presentados como en las características de las proteínas origen identificadas a partir de éstos.

Las líneas celulares fueron generadas en trabajos previos en el laboratorio de la Dra Jaraquemada (Serradell 1999). El nivel de expresión de las moléculas DR4, Ii y DM en estas células se determinó por inmunofluorescencia y citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-DR, Ii y DM y un anticuerpo anti-CLIP (CerCLIP) que es específico para todos los complejos de CLIP presentes en la superficie, incluyendo DR/, DP/ y DQ/CLIP. Los niveles de expresión en la línea DR4IiDM se compararon con los de la línea B-LCL de referencia. Estos análisis se realizaron cada 2 o 3 semanas durante el crecimiento de las células para comprobar que los niveles de expresión de las moléculas eran correctos y no existían problemas de desdiferenciación.

Los niveles de CLIP detectados en la superficie de las células B-LCLs fueron bajos, no detectándose estos complejos en la superficie de las células DR4IiDM (Figura 41a). Este hecho puede ser el resultado de diferencias en los mecanismos de presentación o consecuencia de la contribución de otras moléculas como DP y DQ a la presentación de CLIP en el caso de las B-LCL (estas moléculas están ausentes en la célula epitelial transfectada).

Tabla XIV: Cuantificación de los niveles de expresión de las tres moléculas utilizando la intensidad media de fluorescencia detectada (MFI) (Muntasell 2002).

MFI	DR4	Ii	HLA-DM
B-LCL	425	97	22
DR4IiDM	325	77	35

La expresión de DR e Ii era mayor en las células B-LCL mientras que los niveles de HLA-DM eran superiores en las células DR4IiDM (Tabla XIV). La relación DR/DM era muy diferente entre estas células (9 frente a 19 en células epiteliales y B-LCL respectivamente) mientras que la relación DR/Ii no variaba (4 en ambos casos). Es interesante observar que las relaciones observadas para estas moléculas en nuestro modelo de célula autoinmune eran similares a las observadas en situación de autoinmunidad en células foliculares del tiroides (Catalfamo 1999).

Otra chaperona implicada en la presentación de péptidos de clase II es la molécula HLA-DO. Esta molécula sólo se expresa en las APC e interviene en el proceso de presentación antigénica modulando la actividad de HLA-DM (Kropshofer 1999; Van Ham 2000). La ausencia de esta molécula en las células epiteliales RIMm5F se corroboró mediante RT-PCR e hibridación con una sonda específica para HLA-DO utilizando RNA total de células RIMm5F y bazo y timo de rata como control positivo (Muntasell 2002).

La distribución celular de HLA-DR, Ii y HLA-DM se determinó mediante microscopía electrónica utilizando criosecciones ultrafinas inmunomarcadas con oro, observándose que los compartimentos intracelulares que contenían las moléculas de MHCII en las células DR4IiDM eran morfológicamente homólogos a los de las células B-LCL. Estos compartimentos pueden clasificarse en seis tipos distintos (Kleijmeer 1997): endosomas tempranos (tipo 1 y 2, rellenos de BSA después de 5 minutos); endosomas tardíos multivesiculares (tipo 3 y 4, rellenos de BSA después de 20 minutos); lisosomas (tipo 5, rellenos de BSA a los 80 minutos); y compartimentos multilaminares (tipo 6, sin BSA a los 80 minutos). La cuantificación de las moléculas de HLA-DR, Ii y HLA-DM en las criosecciones mediante el conteo de las partículas de oro observadas en cada región mostró que cerca del 80% de las moléculas de DR se encontraban en la superficie en ambos tipos celulares, estando el resto distribuido entre los diferentes compartimentos de la vía endocítica. Por otro lado, el patrón de distribución de HLA-DM era similar en ambos tipos

celulares detectándose el mayor número de moléculas en los compartimentos endocíticos de tipo 4, 5 y 6. Sin embargo, en las células B-LCL también se detectó un alto porcentaje de moléculas en los compartimentos de tipo 2. Por el contrario, la distribución de li mostraba patrones muy diferentes en los dos tipos celulares. Mientras que en las células epiteliales el 38% de las moléculas se detectaron en la superficie, en las B-LCL únicamente se encontró el 9% situándose la mayor parte de estas moléculas en compartimentos más internos de la vía, principalmente en los de tipo 3 y 4, detectándose incluso en los de tipo 6. Este análisis confirmó además las diferentes relaciones observadas por citometría de flujo entre los niveles de DR li y DM en las líneas estudiadas.

2.- REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A HLA-DR4 EN UNA LÍNEA CELULAR CON EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE MOLÉCULAS DE MHCII (B-LCL)

Los péptidos asociados a DR en las células B-LCL se purificaron por cromatografía de inmunoafinidad y los péptidos en los extractos se secuenciaron mediante nESI-ITMS/MS, MALDI-TOF-TOF y capLC- μ ESI-ITMS/MS tal como se describió en el apartado IV.1.1. El conjunto de péptidos y proteínas identificadas en estos análisis se muestra en las tablas XIII y XIV. Previamente al análisis de secuencia, las diferentes fracciones cromatográficas obtenidas a partir de los eluidos de la inmunocromatografía se analizaron por MALDI-TOF para determinar la distribución y el peso molecular de los péptidos en el repertorio.

2.1. DISTRIBUCIÓN DEL PESO MOLECULAR

Los pesos moleculares de los componentes de cada una de las fracciones obtenidas en el HPLC se determinaron mediante MALDI-TOF. Para minimizar las interferencias producidas por los iones de la matriz de MALDI se seleccionaron únicamente los iones detectados en el rango de masas de 600 a 8000 que tenían un área absoluta superior a 1000 y un área mínima del 2% respecto al máximo en cada fracción. En estas condiciones los iones seleccionados tienen siempre valores señal/ruido superiores a 3. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XVa.

Tabla XV: Características del repertorio peptídico asociado a DR4 en células B-LCL obtenidas directamente a partir de los valores detectados en el espectro de MALDI-TOF (Datos sin filtrar) y después de filtrarlos para eliminar las masas debidas a compuestos no peptídicos (Datos filtrados).

	A) Datos sin filtrar	B) Datos filtrados
nsd*	868	811
Péptidos / fracción	16	15
Masa promedio	1975	1974
n° aa promedio	17	17
Desviación estándar	399	394
Rango masa	606-3287	625-3287
Coefficiente de asimetría	-0.14	-0.06
Curtosis	1.9	1.9

(*) nsd: número de señales detectadas

Diversos autores han utilizado esta misma estrategia (el análisis de pesos moleculares por MALDI-TOF) para la comparación de repertorios peptídicos (Ovsyannikova 2000; Sesma 2003). Sin embargo, no se puede descartar que algunas de las señales observadas en los espectros correspondan a interferencias no peptídicas presentes en las muestras (por ejemplo iones debidos a la matriz del MALDI o polímeros derivados del material de plástico o de los detergentes utilizados en la preparación de la muestra) lo que podría invalidar los resultados obtenidos mediante este método. Para evitar este problema se analizó el peso molecular de cada una de las señales para determinar si estos valores se encontraban entre los esperados para un péptido de masa similar.

La masa molecular de un compuesto se puede expresar como masa molecular nominal (M), monoisotópica (Mi) o promedio (Mavg). Para un determinado péptido, existe una diferencia entre el valor de M y el de Mi y Mavg que aumenta con el incremento de masa. Además, la masa molecular de un péptido no puede tener un valor cualquiera, sino que está determinada por las diferentes distribuciones posibles de los átomos que lo forman. El grupo de Mathias Mann analizó todas las distribuciones atómicas posibles para una determinada masa nominal y observó que no todos los valores de Mi o Mavg tenían la misma probabilidad de ocurrir. Estos autores describieron una sencilla ecuación que permitía determinar el rango de masas monoisotópicas más probable de los péptidos con un determinado valor de masa nominal (Mann 1995; Zubarev 1996). Los valores que quedan fuera de estos grupos fueron denominados "*masas prohibidas*" ya que la probabilidad de que la masa de un péptido tenga ese valor es muy baja. Las ecuaciones que describen la diferencia entre el valor de M y las masas monoisotópicas y promedio (ΔM), y la anchura del grupo de valores posibles que incluirían al 95% de todos los péptidos con una determinada masa nominal (W_m) son las siguientes:

$$\text{Masa molecular monoisotópica} \rightarrow \Delta M = 0.00048 * M$$

$$\text{Masa molecular promedio} \rightarrow \Delta M = 0.00115 * M$$

$$W_m = 0.19 + 0.0001 * M$$

En la tabla XVI se muestran los valores que se obtienen a partir de esta fórmula matemática para algunos valores de masa molecular nominal en el rango de 250 a 4000 Da.

Tabla XVI: Valores de masas moleculares monoisotópicas más probables para una determinada masa nominal.

Masa nominal	Mp (mi)	Wm	M (mi) mínima	M (mi) máxima
250	250.120	0.215	250.013	250.228
1000	1000.480	0.290	1000.335	1000.625
4000	4001.920	0.590	4001.625	4002.215

M (mi): Masa molecular monoisotópica; Mp (mi): Masa molecular monoisotópica más probable para una determinada masa nominal.

La validez de esta aproximación para descartar posibles interferencias no peptídicas en los espectros MALDI-TOF, se confirmó mediante el análisis de los valores correspondientes a los iones monocargados de 11 péptidos de clase II previamente descritos en la literatura (Chicz 1993; Dongre 2001; Lippolis 2002; Suri 2002) y de 7 iones conocidos procedentes de la matriz de MALDI (CHCA) (Figura 42). Los iones correspondientes a los péptidos de MHCII se situaron siempre dentro del intervalo de Wm esperado para moléculas de naturaleza peptídica. Por el contrario, todos los iones correspondientes a la matriz se situaron fuera de este intervalo demostrando que este procedimiento podía usarse para distinguir entre las señales debidas a compuestos de naturaleza peptídica y aquellas debidas a compuestos con composiciones atómicas diferentes.

Este procedimiento se utilizó para filtrar los datos de peso molecular obtenidos en el análisis de las células B-LCL eliminándose de la colección de señales aquellas que aparecían a “*masas prohibidas*”. Mediante este proceso se eliminaron un total de 57 iones (6.5% de los detectados). Posteriormente se comprobó que ninguna de las señales correspondientes a los péptidos secuenciados en estos repertorios había sido eliminada mediante este método de filtrado.

No se observaron, sin embargo diferencias significativas en los valores de masa promedio y de distribución de los datos antes y después del filtrado ($p=0.94$) (Tabla IV). Estos resultados indicaron que la mayor parte de las señales detectadas correspondían a iones monocargados de moléculas de péptidos.

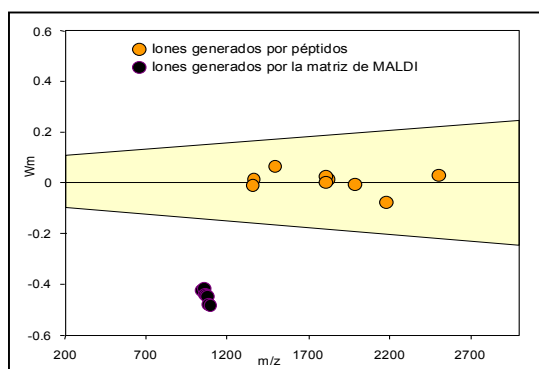


Figura 42: Representación gráfica de la desviación de masa para cada uno de las señales detectadas respecto al valor más probable para los péptidos en ese rango de masa. La parte central coloreada del gráfico corresponde con la zona delimitada por el valor de W_n para cada masa. Los valores de desviación que se sitúan fuera de esta área se consideran interferencias ya que son masas “prohibidas” para un péptido. En la figura se muestra la desviación de los valores de m/z correspondientes a 11 péptidos de clase II (color naranja) y de 7 iones derivados de la matriz de MALDI (color lila). (Hoja de cálculo cortesía del Dr. Jesús Vázquez del CBMSO de Madrid).

2.2. REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A DR4 EN CÉLULAS B-LCL.

El análisis del repertorio asociado a DR4 en las células B-LCL permitió identificar un total de 117 péptidos que provenían de 25 proteínas diferentes (ver apartado IV.1.1). El peso molecular promedio de los péptidos identificados fue de 1873 siendo el de menor tamaño un péptido de 10 aminoácidos y el de mayor tamaño uno de 28. Estos datos coincidían con los valores promedio obtenidos a partir del análisis por MALDI-TOF de los pesos moleculares de los componentes del repertorio.

Todas las secuencias caracterizadas cumplían el motivo de unión descrito para DRB1*0401. Los correspondientes índices de afinidad teóricos se calcularon utilizando la matriz descrita por Hammer (Sturniolo 1999) (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>). En el caso de que un péptido presentara más de un posible motivo de unión, en los estudios posteriores se tuvo en cuenta el que tenía un mayor índice de afinidad teórica. Los valores calculados iban desde -0.7 a 7.5, con una afinidad teórica promedio de 3 (el coeficiente de afinidad teórica más alto posible para este alelo es 8.6). También se determinó la proteína origen de cada péptido, su localización celular (a partir de la información disponible en las bases de datos) y la posición relativa del péptido dentro de dicha proteína (Tabla XIII).

De los 117 péptidos identificados únicamente 12 de ellos no estaban formando parte de grupos de secuencias anidadas. El resto de péptidos se podían ordenar formando 20 grupos de secuencias anidadas conteniendo entre 2 y 19 especies cada uno. Los péptidos mostraban un promedio de 4.3 aa en el extremo N-terminal y 4.9 aa en el extremo C-terminal a partir de la secuencia central que formaban los 9 aa del motivo de unión.

Todas las proteínas identificadas, excepto dos, correspondían a proteínas sintetizadas por la célula. Las excepciones correspondían con la serotransferina y la apolipoproteína D, componentes muy abundantes en el medio de cultivo utilizado para su crecimiento. Se identificaron 7 péptidos derivados de la serotransferrina que definían 2 posibles epítomos de unión distintos a DR4. Uno de estos péptidos (555-571) ya había sido descrito previamente como ligando presentado por este alelo (Lippolis 2002), mientras que el 96-114 era la primera vez que se identificaba. Los grupos de proteínas autólogas más abundantes eran los correspondientes a proteínas de membrana (56%) y proteínas residentes en vesículas endocíticas (22%). Se encontraron además dos proteínas citoplasmáticas, dos de expresión ubicua y una residente en vesículas secretoras.

La mayor parte de los péptidos identificados eran derivados del procesamiento de moléculas de MHCI expresadas en estas células. Esta característica ya había sido descrita por otros grupos para este y otros alelos de HLA-DR (Chicz 1993; Hayden 1996; Kirschmann 1995; Lippolis 2002; Rammensee 1995). Realizando una comparación con los repertorios asociados a DR4 descritos en la literatura se observó que la mayor parte de los péptidos y epítomos derivados de la molécula de MHCI son siempre los mismos a pesar de que las células utilizadas y las condiciones de cultivo no sean iguales. Esto nos indica la alta especificidad del repertorio asociado a un determinado alelo en las APC. Otros grupos numerosos fueron los de los péptidos derivados de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina y los derivados de la chaperona HSC71.

Algunos de los ligandos identificados en este estudio no habían sido descritos previamente como péptidos de unión a DR en APC. Dentro de este grupo se encuentran el péptido 210-225 de la proteína inducida por γ -interferón IP-30, el 70-89 del factor de expresión de gangliósido-2, los péptidos 24-41 y 83-97 de la β 2-microglobulina, el 210-224 de la anexina-2, el 1-16 del factor de elongación α y los péptidos 96-114 y 126-143 de la α -enolasa. Un péptido de esta última proteína ha sido descrito por el grupo de Sato (Kondo 2002) como posible péptido antigénico unido a la molécula de HLA-DR8 con una fuerte actividad citotóxica frente a linfocitos CD8⁺ en una línea celular tumoral. Teniendo en cuenta que se han detectado anticuerpos frente a la α -enolasa en algunas enfermedades autoinmunes y que la expresión de esta proteína se encuentra aumentada en ciertos tumores, estos autores sugieren que esta proteína puede ser inmunogénica también en el contexto de la inmunidad tumoral. El epítomo caracterizado en ese trabajo no es el mismo que el descrito en nuestro repertorio, si bien esto no es extraño ya que se trata de dos alelos diferentes de DR.

Tabla XVII:(A) Porcentaje de aminoácidos detectados en cada una de las posiciones del motivo de unión a partir de las secuencias de todos los péptidos identificados y a partir únicamente de los epítomos de unión a DR4. (B) Distribución de los diferentes tipos de aminoácidos en cada una de las posiciones del motivo de unión a partir de las secuencias de todos los péptidos identificados y a partir únicamente de los epítomos de unión a DR4. Se muestran marcadas en negrita las posiciones con un porcentaje superior al 40%.

A)

		% aa (todos los péptidos)																			% aa (epítomos de unión a DR4)																				
		A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
Motivo de unión	P1	0	0	0	0	12	0	0	10	0	10	2	0	0	0	0	0	0	34	13	20	0	0	0	0	26	0	0	7	0	15	4	0	0	0	0	0	0	7	7	33
	P2	11	0	0	7	1	1	1	8	0	8	0	0	1	2	38	1	11	10	2	0	7	0	0	7	4	4	4	7	0	11	0	0	4	7	15	4	7	11	0	7
	P3	14	7	0	4	37	1	1	2	12	5	0	6	1	4	1	2	4	1	0	0	7	4	0	4	11	4	4	4	22	11	0	4	4	4	4	4	7	4	0	0
	P4	17	0	44	20	0	0	1	3	0	1	4	4	0	1	0	4	1	0	1	0	11	0	26	19	0	0	4	7	0	4	7	4	0	4	0	7	4	0	4	0
	P5	5	0	11	4	1	4	3	2	2	4	3	5	7	5	1	35	1	8	0	0	15	0	11	4	4	4	0	4	7	4	4	7	7	4	4	11	4	7	0	0
	P6	2	0	40	0	0	0	0	0	1	0	4	1	0	0	11	36	6	0	0	7	0	22	0	0	0	0	0	0	4	0	7	0	0	0	15	41	4	0	0	
	P7	56	0	0	4	0	0	7	0	0	17	0	3	2	1	1	1	0	10	0	0	22	0	0	11	0	0	4	0	0	26	0	11	7	4	0	0	0	15	0	0
	P8	50	0	1	4	0	0	1	7	1	3	1	4	7	7	9	2	1	1	1	1	19	0	4	0	0	0	0	7	0	7	4	11	15	4	11	4	4	4	4	4
	P9	14	0	1	1	0	13	0	0	0	1	0	0	23	0	46	1	0	0	0	19	0	4	4	0	26	0	0	0	4	0	0	0	22	0	22	0	0	0	0	0

B)

Grupos químicos de aa	% aa (todos los péptidos)									% aa (sin secuencias anidadas)								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Grande e hidrófobo (Y,F,W)	45	3	37	1	1	0	0	2	0	67	11	11	4	4	0	0	7	0
Pequeño e hidrófobo (V,L,I,M)	55	26	8	8	16	7	27	12	1	33	30	19	19	19	7	41	22	4
Polar (S,T,N,Q)	0	13	15	9	47	50	4	14	70	0	19	19	19	26	63	15	22	44
Carga positiva (K,R,H)	0	39	13	1	5	0	8	11	0	0	19	30	4	11	0	4	11	0
Carga negativa (E,D)	0	7	4	65	14	40	4	5	2	0	7	4	44	15	22	11	4	7
aa pequeños (G,A)	0	12	15	17	10	2	56	50	27	0	11	11	11	19	7	22	19	44
Prolina (P)	0	1	1	0	7	1	2	7	0	0	4	4	0	7	0	7	15	0

A partir de los péptidos identificados se calcularon los aminoácidos más frecuentes en cada una de las posiciones del motivo de unión (Tabla XVII). Las matrices obtenidas reflejan las características del motivo de unión aunque no permiten determinar la afinidad de esta como en el caso de las matrices de afinidad teórica disponibles en la literatura (Hammer 1994; Rammensee 1995; Singh 2001; Sturniolo 1999). Las matrices se calcularon de dos formas: teniendo en cuenta todos los péptidos identificados y, alternativamente, considerando solo los diferentes motivos de unión a DR encontrados, con objeto de evitar el sesgo derivado del alto número de péptidos que forman parte de grupos de secuencias anidadas. En el primer caso se obtuvieron distribuciones que mostraban aminoácidos preferenciales en las posiciones de anclaje P1, P4, P6 y P9. Sin embargo la presencia de grupos de secuencias anidadas hacía aparecer como muy frecuentes en éstas y otras posiciones aminoácidos pertenecientes a los motivos más repetidos en estos grupos. Por ejemplo, en la posición P1 se detectó una preferencia por la valina debido en parte a los 34 péptidos de MHC I que contienen el epítomo *VRFDSDAAS* de la molécula de MHC I (35% del total) y que producían un sesgo importante en el motivo de unión calculado. Este efecto se extiende a posiciones que no corresponden a los puntos de anclaje canónicos. Así, tal como se muestra en la tabla, se encuentran proporciones inusualmente altas de arginina en P2 (38%), de fenilalanina en P3 (37%), de serina en P5 (35%) y de alanina en P7 y P8 (58 y 50%, respectivamente). La consideración de motivos en vez de secuencias generó tablas con las

distribuciones esperadas para estos patrones de reconocimiento (Hammer 1993; Hammer 1994; Rammensee 1995; Singh 2001). Las tablas que incluyen series anidadas puede ser, sin embargo, de utilidad para la evaluación de la afinidad de las uniones MHCII-péptido ya que la presencia y detección de grupos con numerosas secuencias anidadas podría también reflejar péptidos con epítomos de alta afinidad.

3.- IDENTIFICACIÓN DE LOS LIGANDOS NATURALES ASOCIADOS A HLA-DR4 EN LAS CÉLULAS DR4iDM

3.1.- DISTRIBUCIÓN DEL PESO MOLECULAR

Los pesos moleculares de los péptidos se calcularon de la misma forma que en las células B-LCL (apartado 2.1) (Tabla XVIII). En este caso, cuando se compararon los datos obtenidos antes y después del filtrado de masas se observó que las dos poblaciones mostraban distribuciones de peso molecular diferentes (t Student masas promedio, $p=0.07$). Esta diferencia indicaba una mayor contribución de las señales producidas por interferencias en los espectros (Se eliminaron el 11% de las señales detectadas frente al 6.5% en B-LCL) que puede ser debida tanto a la presencia de una mayor cantidad de contaminantes no peptídicos en estos extractos como a una menor intensidad relativa de las señales peptídicas frente a otras señales.

Tabla XVIII: Características de los péptidos asociados a DR4 en células epiteliales transfectadas con DR4, li y DM obtenidas a partir de los valores detectados en el espectro de MALDI-TOF (A, Datos sin filtrar) y después de filtrarlos para eliminar las masas debidas a interferencias (B, Datos filtrados).

	A) Datos sin filtrar	B) Datos filtrados
nsd*	733	649
Péptidos / fracción	10	13
Masa promedio	1913	1979
n° aa promedio	16.2	16.8
Desviación estándar	700	633
Rango masa	597-6276	597-6276
Coefficiente de asimetría	2	2.8
Curtosis	11.4	17

(*) nsd: número de señales detectadas

3.2.- REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A DR4 EN CÉLULAS DR4iDM.

A partir del análisis por nESI-ITMS/MS de 24 fracciones de HPLC se identificaron 84 péptidos que provenían de 46 proteínas diferentes (Tabla XIX). Todas las secuencias caracterizadas cumplían el motivo de unión descrito para DRB1*0401. La masa promedio de los péptidos identificados fue de 1871 y el número de aminoácidos promedio de 17, siendo el de menor tamaño un péptido de 9 aa y los de mayor tamaño cuatro secuencias de 21 aa. De la misma forma que en las células B-LCL, los péptidos se alinearon en función de su motivo de unión y se calculó su índice de afinidad teórico. Los valores calculados iban desde -4 a 6.5, con una afinidad teórica promedio de 3.2.

De las 84 secuencias caracterizadas, 55 de ellas (65%) estaban formando series de secuencias anidadas. Se identificaron 19 grupos de secuencias anidadas con un número de especies en cada grupo que variaba de 2 a 6 y con un número de aminoácidos promedio de 4.8 en el extremo N-terminal y 2.9 en el extremo C-terminal a partir de la secuencia central que formaban los 9 aa del motivo de unión.

De las 46 proteínas origen caracterizadas 5 eran de origen exógeno y el resto eran proteínas sintetizadas por la propia célula (89%). Entre estas últimas encontramos 19 proteínas de superficie (46%), ocho de citoplasma (20%), seis en vesículas secretoras (15%), cuatro de retículo endoplasmático (10%), dos descritas en vesículas endocíticas y una de localización ubicua. La mayor parte de estas proteínas eran de expresión ubicua, si bien algunas presentaban una expresión restringida a tejido endocrino como N-CAM, carboxipeptidasas D y H, preprotaquichinina y Efrina-B2, esta última recientemente descrita como proteína que participa en la coestimulación de los linfocitos T (Yu 2003). También se identificaron proteínas implicadas en las vías de presentación de péptidos de clase I y II, como son la chaperona HSC71, la isomerasa Erp57 y las moléculas de MHC de clase I y II. A diferencia de los repertorios obtenidos a partir de las células B-LCL, donde las secuencias derivadas de moléculas de MHC eran mayoritarias (47%), en este caso la proporción de estos péptidos era de solo el 8% no apareciendo tampoco secuencias derivadas de inmunoglobulinas, que en B-LCL eran también abundantes.

Las proteínas origen identificadas estaban repartidas entre los 5 grupos de función molecular diferentes de la clasificación GOA y estaban implicadas en al menos 7 tipos de procesos biológicos diferentes (Tabla XIX).

Tabla XIX: Clasificación de las proteínas origen caracterizadas a partir del repertorio peptídico asociado a DR4 en la línea celular DR4liDM de acuerdo con su clasificación GOA (*Gene Ontology Annotation*). A cada proteína se asignó el número de *LocusLink* apropiado (Pruitt 2000) utilizando el programa *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID, <http://apps1.niaid.nih.gov>) que estandariza la nomenclatura de las proteínas origen sea cual sea la base de datos utilizada para su identificación a partir del espectro de MS/MS. Algunas de las proteínas caracterizadas no se pudieron clasificar porque no existía información disponible.

<i>Según el proceso biológico en el que participan</i>	
Metabolismo (11)	Plasma mb. Ca transp. ATPase1, EGFR, fatty acid synthase, NOS, carboxypeptidase E, carboxypeptidase D, protein tyrosine phosphatase, disulfide isomerase ER-60, apolipoprotein D, prosaposin, inosine triphosphatase
Comunicación celular (7)	EGFR, calcitonin receptor, NOS, NCAM, GD3 ganglioside synthase, protein tyrosine phosphatase, tachykinin 1
Procesos fisiológicos celulares (5)	Plasma mb. Ca transp. ATPase1, EGFR, Na ⁺ , K ⁺ , ATPase α -subunit, ferritin light chain 1, apolipoprotein D
Morfogénesis (3)	EGFR, protocadherin alpha 4, ephrin B2
Homeostasis (1)	Ferritin light chain
Procesos fisiológicos orgánicos (1)	Preprotachykinin
Respuesta a estímulos (1)	HSC71
<i>Según su función molecular</i>	
Unión de ligandos (11)	Plasma mb. Ca transp. ATPase1, EGFR, HSP 70kDa, fatty acid synthase, ferritin light chain 1, NOS, NCAM, ephrin B2, apolipoprotein D, preprotachykinin, growth hormone releasing hormone
Actividad catalítica (10)	Plasma mb. Ca transp. ATPase1, EGFR, fatty acid synthase, ribophorin 2, NOS, carboxypeptidase E, carboxypeptidase D, protein tyrosine phosphatase, Erp57, inosine triphosphatase
Actividad transportadora (7)	Plasma mb. Ca transp. ATPase1, EGFR, amino acid transport system A3, Na ⁺ , K ⁺ , ATPase α -subunit, NOS, disulfide isomerase ER-60
Trasducción de señal (6)	EGFR, calcitonin receptor, protein tyrosine phosphatase, glypican, preprotachykinin 1, growth hormone releasing hormone
Chaperonas (1)	HSC71

Tabla XX: Péptidos secuenciados en la línea celular DR4liDM. Los péptidos se ordenaron en función de su motivo de unión por DR4.

Fr.HPLC	Mr (Da)	PPPPPPPP 1 2 3 4 5 6 7 8 9	n° aa	Proteína origen (aa-aa)	Acceso DB	L*	IA**
41,42	1934.9	D L R H T F S G V A S V E S S S G E A	19	Fetuin-A (311-329)	P12763	EX	1.8
39	1934.0	K G D V A F V K D Q T V I Q N T D G	18	Serotransferrin (554-571)	Q29443	EX	6
40	1806.0	G D V A F V K D Q T V I Q N T D G	17	Serotransferrin (555-571)			
46	2233.2	Y D R N T K S P L F V G K V V N P T Q A	20	α -1-antiproteinase (411-420)	P34955	EX	4.5
38	1984.0	V L N Q E L R A D G T V N Q I E G E	18	Apolipoprotein D (74-94)			
35	1755.9	L N Q E L R A D G T V N Q I E G	16	Apolipoprotein D (75-93)	P05090	EX	5.1
32	1528.8	Q E L R A D G T V N Q I E G	14	Apolipoprotein D (77-93)			
33	1828.0	T T F D K Y K V E K S L N Q Q	15	Apolipoproteína B-100 (125-139)			
41	1952.0	T F D K Y K V E K S L N Q Q P K	16	Apolipoproteína B-100 (126-141)	Q7YQR4	EX	5.3
46	1952.0	T T F D K Y K V E K S L N Q Q P K	17	Apolipoproteína B-100 (125-141)			
43	2165.8	T T F D K Y K V E K S L N Q Q P K I	18	Apolipoproteína B-100 (125-142)			
44	2035.6	F N N N E Y S Q D F S A Y N T K D	17	Apolipoproteína B (1987-2003)	P04114	EX	0.7
38	2170.2	C V N V V G T Q N A H N L I T V S T D G	21	Dynein chain 1 (392-411)	Q63100	C	1.9
35	1779.8	S S A T V Y N I D A S S E S P D H	17	Fatty acid synthase (858-874)	P12785	C	5.2
47	2101.1	K I D L P E Y Q G E P D E I S I Q K	18	Inosine triphosphatase. (39-56)	21104378	C	2.7
47	1973.0	I D L P E Y Q G E P D E I S I Q K	17	Inosine triphosphatase (40-56)			
38,40	1567.8	R L A P I T S D P T E A A A V G	16	M2 Piruvate Kinase (399-414)	P11981	C	2.7
41,42	1638.9	R L A P I T S D P T E A A A V G A	17	M2 Piruvate Kinase (399-415)			
50	2153.0	G F P K P P S Y N V A T T L P S Y D E A	20	Nedd4 WW bind. prot. (120-189)			
50	2096.0	F P K P P S Y N V A T T L P S Y D E A	19	Nedd4 WW bind. prot. (121-189)			
50	1895.9	F P K P P S Y N V A T T L P S Y D	17	Nedd4 WW bind. prot. (123-188)	Q9EQH8	C	4.6
43	1780.8	K P P S Y N V A T T L P S Y D E	16	Nedd4 WW bind. prot. (125-189)			
35	1727.9	Q A N G V A I D T M K S T K A N	16	Nitric oxidase synthase (173-190)	57529	C	5.3
35	1606.4	K D Q E F A I D T N G A G G Q G	16	Filamin (969-984)	Q80X90	C	1.9
47	2271.1	A I I D P G D S D I I R S M P E Q T G E K	21	Ribosomal protein L30 (95-115)	206728	C	0.6

Sigue →

Tabla XX :

Fr.HPLC	Mr (Da)		n° aa	Proteína origen (aa-aa)	Acceso DB	L*	IA**
		P P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9					
40	952.6	L V S P T P V L Q	9	Calcitonin receptor (16-24)	P32214	ER	-0.3
48	2014.0	T E D E F K K F I S D K D A S V V G	18	Erp57 (142-159)	P11598	ER	0.9
43	2036.0	T G Q E V V F V A E P D N K N V Y K	18	Ribophorin (433-450)	P25235	ER	1.7
48	1390.8	M L H I W G K Y T R S	11	Transport protein Sec 61 (86-95)	P38391	ER	-2
32	2185.9	N S E K G A M D S Q F A N E D A E S Q K	20	AA transport system A3 (32-51)			
32	1854.8	K G A M D S Q F A N E D A E S Q K	17	AA transport system A3 (35-51)	Q9EQ25	M	2.7
32	1726.7	G A M D S Q F A N E D A E S Q K	16	AA transport system A3 (36-51)			
31	1451.6	R S V K G L V A V V T G G A S	15	Amyloid β -pept.binding prot. (9-23)	2078284	M	0.8
41	2005.9	Y N P T T Y Q M D V N P E G K Y S	17	EGFR (270-286)			
38,39	1842.8	N P T T Y Q M D V N P E G K Y S	16	EGFR (271-286)	6478868	M	3.6
43	1889.0	K N K D Y Y I I I S T S N G S L E G	17	Ephrin-B2 (129-145)	P52800	M	5.7
34	2186.3	D E S G T G D K E F M G N Q D N N S L K	20	GD3 ganglioside synthase (215-234)	P70490	M	2.4
43	2027.9	H Q E E Y V R F D S D V G E Y R	16	HLA class II (DR4) (62-77)	P13760	M	1.6
54	1677.9	V T R A F V A A R T F A Q G L A	16	k-Glipican (211-226)	758627	M	3.5
32	1663.6	S G A L Q I E S S E E S D Q G K	16	LAR protein prec. (179-194)	P10580	M	5.1
43	2190.0	Y V D D T E F V R Y D S D A E N P R	18	MHC Class I (28-45)	1871631	M	0.9
38,39	1962.9	R E G P E Y W E E Q T Q R A K G	16	MHC class I (54-69)			
39	2229.4	R E G P E Y W E E Q T Q R A K G H E	18	MHC class I (54-71)			
39	1806.8	E G P E Y W E E Q T Q R A K G	15	MHC class I (55-69)			
40	1943.8	E G P E Y W E E Q T Q R A K G H	16	MHC class I (55-70)	1871631	M	2.1
39	2072.9	E G P E Y W E E Q T Q R A K G H E	17	MHC class I (55-71)			
38	1677.7	G P E Y W E E Q T Q R A K G	14	MHC class I (56-69)			
43	1522.5	G I V V Y T G D R T V M G R	14	Na ⁺ , K ⁺ , ATPase α - subunit (258-273)			
50	1707.0	G I V V Y T G D R T V M G R I A	16	Na ⁺ , K ⁺ , ATPase α - subunit (258-273)	P06685	M	2.6
48	1650.0	I V V Y T G D R T V M G R I A	15	Na ⁺ , K ⁺ , ATPase α - subunit (259-275)			

Signe →

Tabla XX :

Fr.HPLC	Mr (Da)	PPPPPPPP 1 2 3 4 5 6 7 8 9	n° aa	Proteína origen (aa-aa)	Acceso DB	L*	IA**
38	1972.0	GPTPSQSR FQVDPVSEN AG	19	Na-K-Cl cotransporter (69-87)	3342264	M	2.4
44	2126.0	NAEYEV YVVAENQQG SKA	18	N-CAM (678-696)	P13596	M	2.9
42	2012.0	AEYEV YVVAENQQG KSKA	18	N-CAM (679-696)			
42	1662.9	TS WTAEKSIAQL NSK	15	Nepriylisin (180-194)	P07861	M	3.1
38	1496.8	GT YRPEYAVNS IK	13	Nepriylisin (696-708)			
38	1712.9	GT YRPEYAVNS IKTD	15	Nepriylisin (696-710)			
54	1916.0	THPE FRIEDSEPH IPL	16	Plasma mb.Ca transp. ATPase1 (1184-1199)	P20020	M	6.5
39	1865.9	RAGPAGE LLSQGNPTG SSPA	21	Prot.tyrosine-phosphat. IA-2 (139-158)	Q63259	M	0.6
54	2281.1	IVEPSVHNY FAIDPTTGA IHT	21	Protocadherin (1812-1832)	4426629	M	4.7
50	1968.0	EPSVHNY FAIDPTTGA IH	18	Protocadherin (1815-1831)			
50	1755.9	VHNY FAIDPTTGA IHT	16	Protocadherin (1817-1832)			
48	2249.0	VIDEHTPL YSADPNAID TDY	20	Protocadherin (4406-4425)	4426629	M	0.7
54	2164.0	QTSYTM FVRENNSPA LHIG	19	Protocadherin beta (453-471)	13876290	M	5.4
48	2110.0	AQPEYTV FVKENNP GAHI	19	Protocadherin α 4 (456-473)	23395244	M	3.2
36, 38	1647.6	NKA FSMDEPASA KRP	15	Retinoic acid inducible prot.3 (339-353)	22074648	M	2.5
54	1785.0	NVLR IINEPTAAA IAYG	17	HSC 71 kDa (170-186)	P11142	U	4
61	1898.1	LNVL RINEPTAAA IAYG	17	HSC 71 kDa (170-186)			
47	1567.6	I AFFANSPSIAA HIO	14	nolvmerase (rat leukemia virus) (546-560)	Q771.03	?	3
50	1976.0	QSLQE YLAEQNQRQ LE	16	Prosaposin, SGP-1 (140-154)	P10960	VE	4.3
42	1605.8	SLQE YLAEQNQRQ	13	Prosaposin, SGP-1 (141-152)			
46	1847.9	SLQE YLAEQNQRQ LE	15	Prosaposin, SGP-1 (141-154)			
4607	1934.9	SLQE YLAEQNQRQ LES	16	Prosaposin, SGP-1 (141-155)			
35		QE YLAEQNQRQ LE	13	Prosaposin, SGP-1 (143-154)			
35	1519.7	E YLAEQNQRQ LE	12	Prosaposin, SGP-1 (144-154)			
41	1579.8	LQP FDYDPNEKSK	13	VAMP- associated Prot (74-86)	Q9Z270	VE	3.1
40	1844.9	LQP FDYDPNEKSK HK	15	VAMP- associated Prot (74-88)			

Sigue →

Tabla XX :

Fr.HPLC	Mr (Da)	PPPPPPPP 1 2 3 4 5 6 7 8 9	n° aa	Proteína origen (aa-aa)	Acceso DB	L*	IA**
42	1894.0	V P G T Y K I T A S A R G Y N P V T	18	Carboxipeptidase D (837-854)	O35850	VS	3.3
44	1791.8	G E P E F K Y I G N M H G N E A	16	Carboxypeptidase H (104-119)	P15087	VS	4.8
45	2017.9	E P G E P E F K Y I G N M H G N E A	18	Carboxypeptidase H (104-119)			
65	2247.1	G V A Q A S L G E Y L F E R L T L K H D	19	Ferritin light chain (165-183)	204131	VS	1.8
64,65	2190.1	V A Q A S L G E Y L F E R L T L K H D	19	Ferritin light chain (165-183)			
32	1668.8	T L E R Y T V E R T N S G S G	15	Nephrin 1 (459-473)	23272200	VS	3.5
43	1845.8	A L N S V A Y E R S A M Q N Y E	16	Preprotachykinin (112-127)	P06767	VS	2.8
46	1601.9	A L E S I L Q G F P R M K	14	GHRH (87-99)	P09916	VS	-4

(*) Localización: C: Citosol, E: Exógena, ER: Retículo endoplasmático, M: Superficie celular, VE: Vesículas endocíticas, VS: Vesículas secretoras, U: Ubicua, L: Lisosomal.
 (***) Índice de afinidad teórico. (1) Secuencia identificadas por secuenciación *de novo* e identificadas por homología con proteínas descritas en las bases de datos.

Tabla XXI: Secuencias parciales o *tags* obtenidos a partir de los espectros de MS/MS que no dieron resultado en la búsqueda en bases de datos. Las secuencias obtenidas en Lutefish XP con una puntuación superior a 0.5 o y los *tags* de más de 4 aa obtenidos manualmente se utilizaron para realizar una búsqueda por homología mediante BLAST, no identificándose ninguna proteína con una homología significativa.

Fr HPLC	Mr (Da)	Tags secuenciados manualmente*	Tags secuenciados con Lutefish* / (n) puntuación
42	1129.4	(NH ₂) V A T V A S -600	AVFPWSAV[253] (0.824) / AVTVASWP[299.2] (0.767)
65	1291.4	X P T X I F M I -720	L P T L F [296.2] L [293.2] (0.524)
38	1622.7	633.2-RV TYG-294.3	[423.2][210.2] T G [289.1] E P L [185.0] (0.109)
32	1763.4	959-E D A E -360	[361.2] E A [144.0] V [284.2] D A E [342.2] (0.336)
32	1791.4	(NH ₂) [F M] A T P Y [Q K] A E -883 / 883-E A [Q K] Y P T A E (COOH)	[416.3] Y K A K [226.1] N [226.1] [300.1] (0.030)
43	2054.6	272-PSY N X -1207	[273.1][204.0] P M Y V [184.1] A [202.0] A G [211.1] [273.1] (0.093)
32	2078.4	1319-NTD XX V N (COOH)	N V [255.2] [196.2] T E [210.2] [319.2] T D [225.2] [196.2] (0.030)
47	2095	1116.5-A T E G S -533.2b b n	[365.1] [168.1] S G E T A [257.1] [200.0] A K L N [215.0] (0.333)
54	1853.8	952.5-D X N X I Q K I D W	[327.2] G L W [269.2] D L N L K N W (0.545)

(*) Los aa Ile y Leu se marcan con una X. En el caso de que existan dos posibles aa en una posición, se han indicado los dos dentro de corchetes.

Para caracterizar el patrón de unión a DR4 en estas células epiteliales se determinaron los aminoácidos detectados en cada una de las posiciones de motivo de unión y se calculó su porcentaje con respecto al total de aminoácidos. De la misma forma que en el análisis de las células B-LCL, estos cálculos se realizaron teniendo en cuenta todas las secuencias identificadas o sólo los motivos de unión a DR4 identificados (Tabla XXII).

Tabla XXII: (A) Porcentaje de aminoácidos detectados en cada una de las posiciones del motivo de unión a partir de las secuencias de todos los péptidos identificados y a partir únicamente de los epítomos de unión a DR4. (B) Porcentaje de grupos químicos de aminoácidos detectados en cada una de las posiciones del motivo de unión a partir de las secuencias de todos los péptidos identificados y a partir únicamente de los epítomos de unión a DR4. Se muestran marcadas en negrita las posiciones con un porcentaje superior al 40%.

A)

Motivo de unión	% aa (todos los péptidos)																				% aa (epítomos de unión a DR4)																			
	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
P1	0	0	0	0	30	0	0	7	0	12	3	0	0	0	0	0	4	1	42	0	0	0	0	32	0	0	6	0	13	4	0	0	0	0	0	11	2	32		
P2	10	0	3	1	0	1	0	7	7	7	0	7	0	8	12	3	10	19	5	0	9	0	2	2	0	2	0	9	4	9	0	4	0	9	11	6	11	23	0	0
P3	12	0	0	5	3	10	1	11	4	0	4	10	3	0	7	8	0	12	0	10	15	0	0	2	2	13	4	15	2	0	4	6	2	0	11	6	0	9	0	9
P4	10	0	32	36	3	0	0	4	1	0	0	0	3	3	0	4	4	1	0	0	6	0	26	34	2	0	2	4	4	0	0	4	4	0	4	6	2	0	0	
P5	4	0	8	5	1	7	0	1	4	3	1	3	19	12	11	3	8	5	0	3	6	0	9	4	2	6	0	0	6	2	2	4	17	6	11	4	9	6	2	2
P6	7	0	7	0	0	3	0	0	0	3	0	22	4	1	0	14	38	1	0	0	4	0	9	0	0	2	0	0	0	2	2	23	6	2	0	23	19	6	0	0
P7	12	0	1	16	1	4	1	1	0	5	3	8	5	11	0	4	7	18	0	0	17	0	2	15	2	4	0	4	4	2	2	13	6	6	0	6	4	11	0	0
P8	8	0	0	8	1	8	4	7	4	4	5	11	4	11	14	1	3	0	0	11	0	0	13	2	4	4	4	4	4	4	4	13	4	6	13	2	4	0	2	
P9	22	0	1	0	0	22	1	0	3	1	0	7	3	18	0	18	3	1	0	0	15	0	2	0	0	19	2	0	2	2	0	9	2	17	0	17	11	2	0	0

B)

Grupos químicos de aa	% aa (todos los péptidos)									% aa (sin secuencias anidadas)								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Grande e hidrófobo (Y,F,W)	74	5	12	3	4	0	1	1	0	66	0	11	2	6	0	2	4	0
Pequeño e hidrófobo (V,L,I,M)	26	33	27	5	11	4	27	19	3	34	40	28	6	11	11	19	17	4
Polar (S,T,N,Q)	0	27	18	11	26	75	30	25	45	0	30	13	15	23	68	30	23	53
Carga positiva (K,R,H)	0	19	12	1	15	0	1	19	4	0	15	17	6	17	0	4	15	4
Carga negativa (E,D)	0	4	5	67	14	7	18	8	1	0	4	2	60	13	9	17	13	2
aa pequeños (G,A)	0	11	22	10	11	10	16	16	44	0	11	28	6	13	6	21	15	34
Prolina (P)	0	0	3	3	19	4	5	11	3	0	0	2	4	17	6	6	13	2

Tal como se había observado en las células B-LCL, en la posición P1 (residuo de anclaje) se detectaron únicamente aminoácidos hidrófobos mostrando una especial preferencia por los de tamaño grande (74% y 66% del total según el método de cálculo). En la posición P4 el 67% y 60% de los aminoácidos detectados eran E o D lo que indicaba una clara preferencia por aminoácidos cargados negativamente. Los aminoácidos N, S y T eran el 75% y 68% de los aminoácidos detectados en P6 indicando que en esta posición estos aminoácidos polares son los de elección. En el resto de posiciones no había un enriquecimiento posición específico tan claro si bien algunos residuos parecen ser detectados con más frecuencia. Se observa también que en la posición P9 los aminoácidos más frecuentes son los polares y/o los pequeños y, que los aminoácidos grandes e hidrófobos no son aminoácidos frecuentes en ninguna posición exceptuando en el residuo de anclaje. Otro rasgo interesante es la alta proporción de prolina en la posición P5.

4.- COMPARACIÓN DE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS ASOCIADOS A HLA-DR4 EN CÉLULAS B-LCL y DR4liDM

4.1. HETEROGENEIDAD DE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS.

Los cromatogramas UV obtenidos en el fraccionamiento de estas muestras mostraron perfiles claramente diferentes. Aunque en ambos casos la mayoría de las señales se detectaron entre los minutos 40 y 80 (Figura 43), lo que correspondía a péptidos que eluían entre el 15-40% de acetonitrilo, el perfil total obtenido era diferente en cada caso. En las células epiteliales se detectaron señales abundantes distribuidas a lo largo de todo este intervalo mientras que en las B-LCL los picos más abundantes se encontraban agrupados en el centro, en un intervalo de menos de 15 minutos correspondiente al 18-33 % de acetonitrilo. Estos datos sugerían que los péptidos asociados a DR4 en las células epiteliales era más heterogéneos que los asociados a las B-LCL. La aparición de señales que eluían con porcentajes de acetonitrilo altos en la células epiteliales indicaban la presencia en el repertorio de péptidos apolares que probablemente podrían corresponder a péptidos de peso molecular más elevado que en las APC. Los resultados obtenidos en el estudio de los pesos moleculares confirmaron esta suposición: el rango de los pesos moleculares medidos estaba entre 597-6276 en las células DR4liDM y entre 625-3287 en las B-LCL (tablas XV y XVIII).

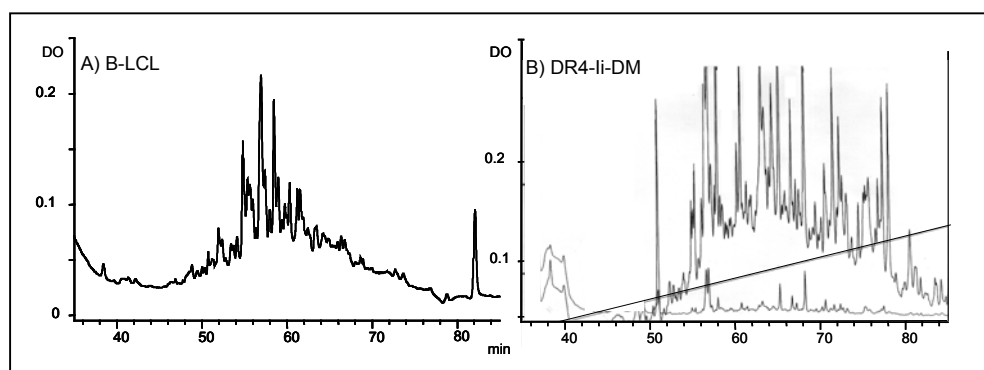


Figura 43: Perfiles de HPLC-UV obtenidos en el fraccionamiento de los repertorios peptídicos asociados a las células B-LCL y DR4liDM.

Esta heterogeneidad se observó también en la distribución de estos pesos moleculares en cada repertorio. El coeficiente de variación de la colección de pesos moleculares era del 32% en las células epiteliales mientras que bajaba hasta el 20% en las B-LCL. Estas mismas observaciones se han descrito en relación a los perfiles de HPLC-UV y a los pesos moleculares de los repertorios asociados a diferentes alelos de MHCII (Chicz 1993; Kirschmann 1995), si bien hasta

ahora no se había reportado la diferencia entre los perfiles obtenidos para dos tipos de células diferentes que expresaran el mismo alelo de DR.

Estas diferencias se confirmaron de nuevo cuando se identificaron los péptidos asociados a cada tipo celular. Las secuencias determinadas en las células B-LCL estaban formadas en su mayoría por series de secuencias anidadas que contenían entre 2 y 19 péptidos cada una, generando un total de 33 epítomos de unión a DR4 diferentes. Solo 12 de los péptidos eran secuencias únicas (11.5%). El repertorio asociado a DR4IiDM también mostraba series de secuencias anidadas pero formadas por grupos de 2 a 6 péptidos y generando un total de 44 epítomos diferentes. En este caso, el 37% de los péptidos identificados eran secuencias únicas.

No se detectó CLIP en ninguno de los dos repertorios tal como estaba descrito para otras células B-LCL con el alelo DR4 (Chicz 1993; Kirschmann 1995; Lippolis 2002; Rammensee 1995). En las células B-LCL, sin embargo, se detectó un péptido derivado de la cadena invariante que no correspondía con la secuencia del CLIP (li 185-199) pero que tenía una afinidad teórica prácticamente igual a la de este péptido (2.8 vs 2.9). Este péptido, probablemente, se habría formado por proteólisis de la cadena invariante en compartimentos o por mecanismos diferentes a los descritos para CLIP. El péptido CLIP se ha detectado en otros alelos probablemente debido a una diferente modulación de la edición peptídica por DM (Kropshofer 1995).

Solo tres de las proteínas identificadas eran comunes a ambas líneas, detectándose los mismos epítomos en ambos casos (epítomo 174-182 de HSC71, 559-567 de la serotransferrina y 79-97 de la apolipoproteína D) lo que indicaba que, independientemente de poseer patrones de unión iguales, los correspondientes proteomas, vías de procesamiento o de presentación podían presentar diferencias importantes. Así, aunque todos estos péptidos comunes presentaban una afinidad teórica alta para DR4 (entre 3 y 6), también se caracterizaron en las células B-LCL otros epítomos con índices de afinidad inferiores (1.5-2.4) correspondientes a tres de estas proteínas (serotransferrina, HSC71 y molécula de MHC I). Estas tres proteínas son muy abundantes en estas células y la caracterización de epítomos de menor afinidad teórica junto con su detección en repertorios distintos puede ser por tanto un reflejo de ello. No puede descartarse, sin embargo, que esta observación pueda deberse también a la mayor probabilidad de detectar estos péptidos en los repertorios debido al mayor número de complejos presentes en las células.

4.2. PATRONES DE PROCESAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS PRESENTADOS

En ambos repertorios se observaron posibles patrones de procesamiento de los péptidos en su extremo N-terminal y C-terminal (Figura 44).

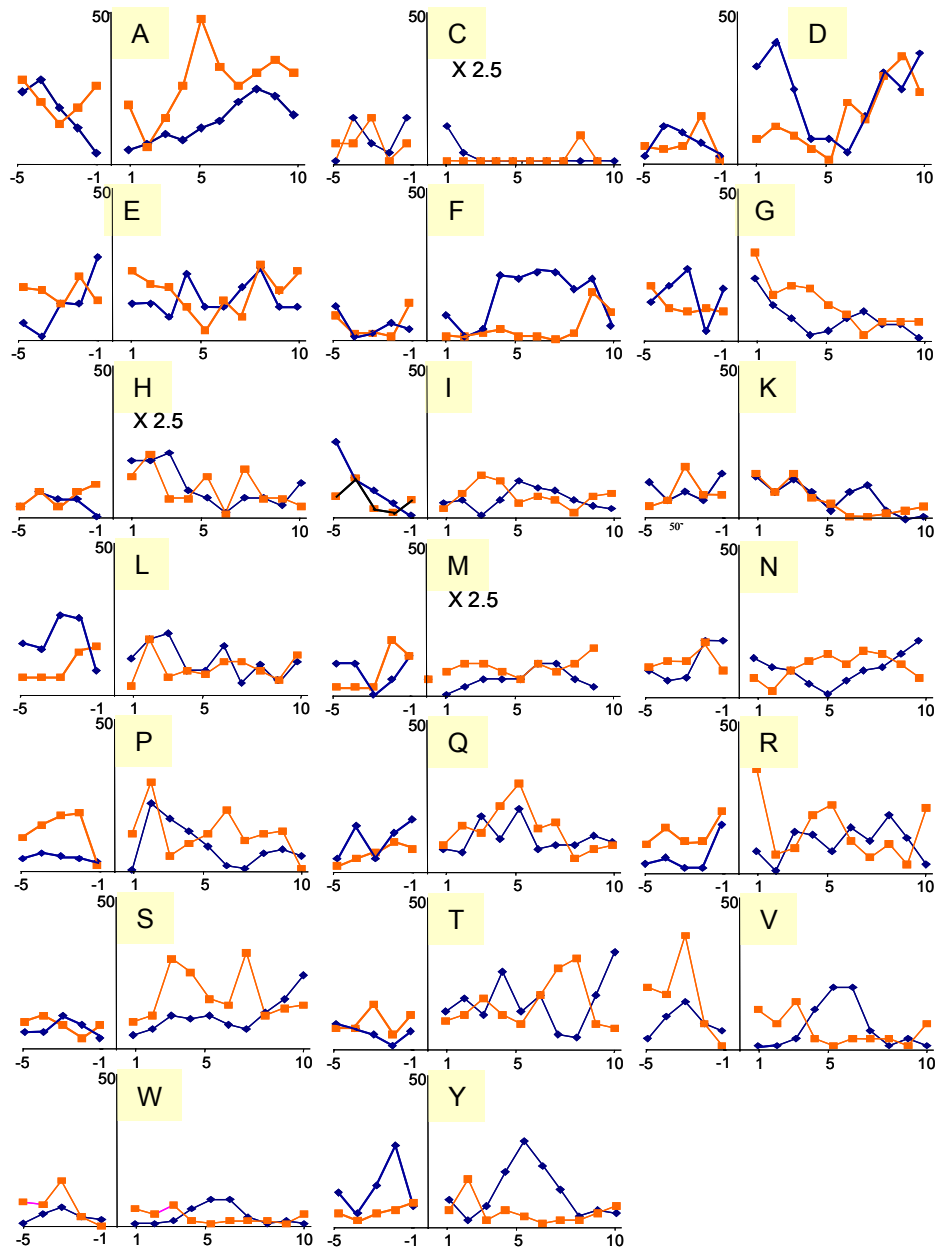


Figura 44: Distribución de aminoácidos en el extremo N-terminal (traza azul) y C-terminal (traza naranja) de todos péptidos presentados por las células B-LCL y DR4liDM. Para cada extremo se muestran los aminoácidos desde la posición -5 a la 10 (tomando como posición 1 el primer o último aminoácido de los péptidos identificados en el repertorio).

El dato más significativo fue la ausencia de prolina en la posición 1 del extremo N-terminal de todos los péptidos, mientras que su presencia estaba muy favorecida en las posiciones 2, 3 y 4. Esta observación coincide con datos reportados en los que se sugiere que la prolina podría actuar como una señal de parada del procesamiento N-terminal (Kropshofer, 1993), indicando que este aminoácido, junto con el impedimento estérico de la molécula de MHCII, podrían proteger al péptido de la degradación por parte de las proteasas. Nuestros datos muestran que tanto en las APC como en las células transfectadas este proceso parece ocurrir. Por su parte, el ácido aspártico aparece con muy baja frecuencia en la posición -1 N- o C- terminal mientras que presenta un aumento muy importante en las posiciones 1, 2 y 3 del N-terminal lo que indica que este aminoácido podría estar inhibiendo la actividad de las exopeptidasas implicadas en la presentación.

El aumento de los aminoácidos aromáticos y la valina entre las posiciones 3-8 del extremo N-terminal se debe a que la posición P1 del motivo de unión se encuentra en esta zona (el promedio de aminoácidos en el lado amino de este motivo es de 4.5 aa).

4.3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LAS PROTEÍNAS ORIGEN

Las proteínas origen de los péptidos que forman cada repertorio peptídico se clasificaron en función de su localización celular en 7 grupos diferentes (Figura 45). En las células B-LCL, el 80% de las proteínas origen pertenecían a proteínas exógenas, situadas en la membrana celular o residentes en vesículas endocíticas, todas ellas de fácil acceso a la vía endocítica. Este dato está en concordancia con la especialización de estas células presentadoras en la captación de proteínas exógenas y su posterior procesamiento para presentar los péptidos en la superficie unidos a la molécula de MHCII. Aunque este grupo sigue siendo el mayoritario cuando analizamos el repertorio de las células epiteliales, su proporción disminuye hasta el 57% incrementándose el número de péptidos que provienen de proteínas situadas en el citosol y en vesículas secretoras. Estos datos confirman que la diferente especialización de estas células afecta de forma importante al origen de los péptidos que se sitúan en la superficie.

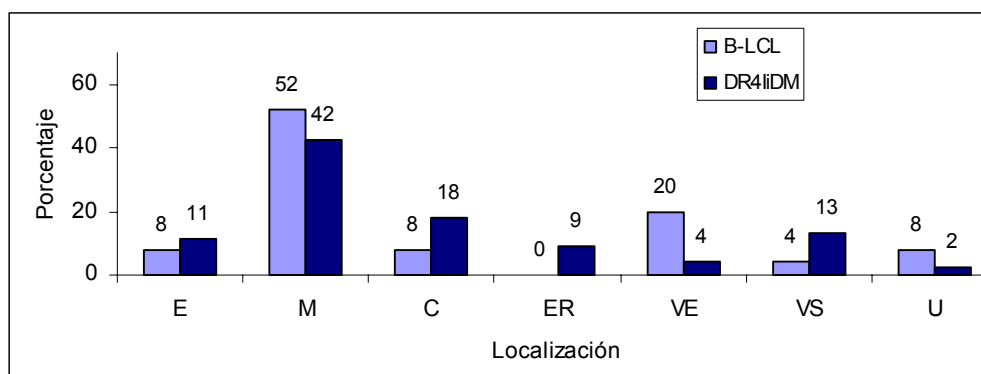


Figura 45: Localización de las proteínas origen identificadas a partir de los repertorios peptídicos asociados a HLA-DR4 en las células DR4iDM y en las B-LCL. (C: citoplasma; E: exógena; M: superficie celular; ER: retículo endoplasmático; VE: vesículas endocíticas; VS: vesículas secretoras; U: ubicua)

En las B-LCL se caracterizaron 25 proteínas origen diferentes mientras que en las células epiteliales el total fue de 46, mostrando, por tanto, las células epiteliales una mayor heterogeneidad que estaba en concordancia con las diferencias observadas en los correspondientes repertorios peptídicos. En las células B-LCL únicamente se caracterizaron 13 proteínas de superficie, siendo siete de ellas moléculas de MHC I y otras cuatro inmunoglobulinas, ambas proteínas sobrepresadas en la superficie de estas células. Por el contrario, en las células epiteliales, las 25 proteínas de superficie correspondían, excepto una, a proteínas diferentes de MHC I e inmunoglobulinas.

4.4. MOTIVO DE UNIÓN A HLA-DR4_0104: COMPARACIÓN ENTRE DR4iDM Y B-LCL.

Con objeto de evitar sesgos debidos al método analítico, en el caso de las células B-LCL, únicamente se tuvieron en cuenta para la comparación las secuencias identificadas por nESI-ITMS/MS, la única técnica utilizada para la identificación del repertorio asociado a DR4iDM.

► En la posición P1 las células epiteliales mostraban una preferencia por los aminoácidos grandes e hidrófobos, aumentando el número de fenilalanina y tirosina detectados, mientras que en las B-LCL la proporción entre los dos grupos es la misma, mostrando preferencia por el aminoácido valina (Figura 46). Sin embargo, si tenemos en cuenta únicamente los motivos de unión a DR4 identificados en cada caso, esta diferencia desaparece y en ambos casos la preferencia es por aminoácidos grandes e hidrófobos. En el resto de posiciones solo se muestran los datos teniendo en cuenta los motivos de unión identificados.

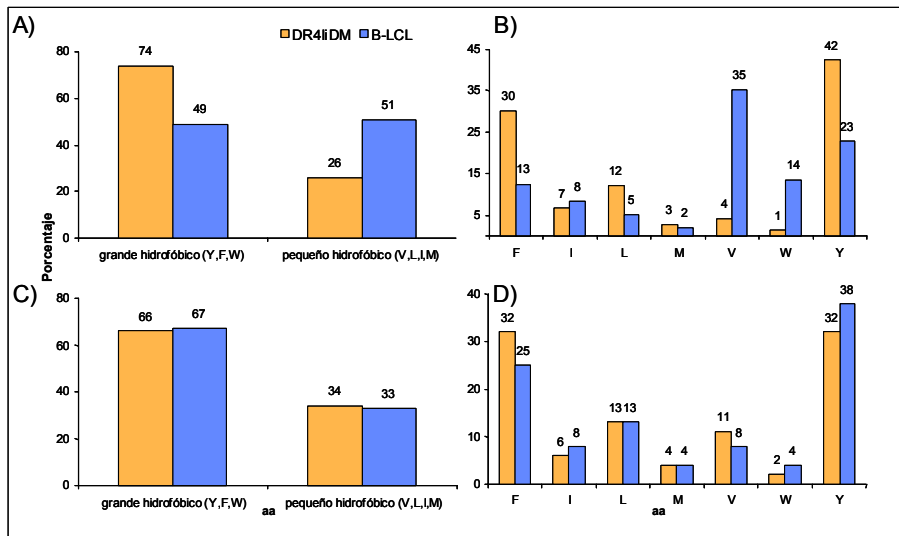


Figura 46: Aminoácidos y grupos de aminoácidos situados en P1, teniendo en cuenta todos los péptidos identificados (A, B) o únicamente los diferentes epítomos de unión a MHCII (C,D).

► En la posición P4 se evidenció que en ambos tipo celulares existía una preferencia por los aminoácidos con carga negativa, no existiendo diferencias entre ambas líneas (Figura 47).

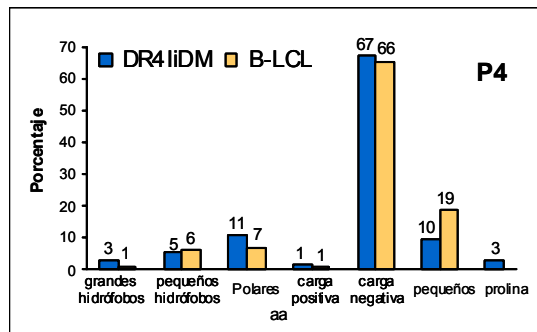


Figura 47: Grupos químicos de aminoácidos situados en P4 (epítomos diferentes).

► En la posición P6 se detectó una preferencia clara por aminoácidos polares en las dos líneas. En las B-LCL el aspártico es el aminoácido más abundante (Figura 48a)

► En la posición P9 los aminoácidos más frecuentes detectados fueron los pequeños y los polares. Dado la diversidad de aminoácidos detectados en P9 ésta parece ser la posición de anclaje menos restringida del epítomo de unión (Figura 48b).

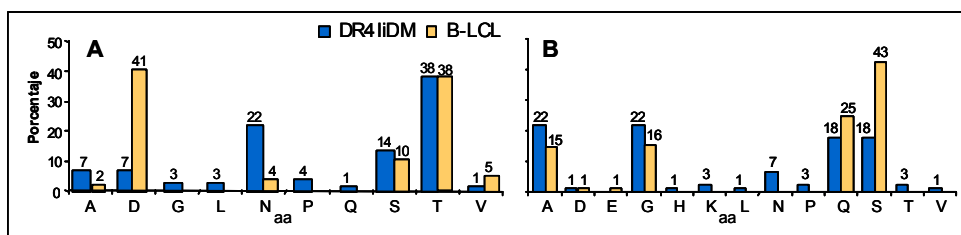


Figura 48: Aminoácidos situados en la posición P6 (A) y P9 (B) del motivo de unión.

La matriz de distribución para este alelo de DR4 (tabla XXIII) muestra importantes diferencias con respecto a la reportada a partir de ensayos de unión utilizando librerías peptídicas (Hammer 1993), incluso corrigiendo el efecto de la abundancia natural de los diferentes aminoácidos (un sesgo intrínseco al uso de librerías de secuencias aleatorias). La diferencias cualitativas observadas entre estos datos pueden deberse, en parte, a la utilización de librerías de secuencias muy cortas (9 aminoácidos) cuando se ha descrito que para conseguir afinidades altas es necesario la presencia de 12 restos (Marshall 1995). Por otra parte, estas diferencias podrían reflejar también el efecto de otros factores diferentes a la propia afinidad por MHCII, como la modulación de la presentación por otras proteínas, como HLA-DM, que tiene lugar *in vivo* o la actividad de las proteasas encargadas de exponer determinadas secuencias proteicas a su interacción con la molécula presentadora.

Tabla XXIII: Matrices de distribución de los motivos de unión al alelo de HLA DRB1*0401. A) Teniendo en cuenta los 200 péptidos identificados en este trabajo B) Teniendo en cuenta únicamente los diferentes motivos de unión descritos.

A)

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
P1	0	0	0	0	20	0	0	8	0	8	2	0	0	0	0	0	0	22	8	31
P2	10	0	1	5	0	1	1	7	3	7	0	3	0	5	28	2	11	14	2	1
P3	14	5	0	4	22	5	1	6	9	2	2	8	2	2	4	4	1	5	0	4
P4	15	0	40	26	1	0	1	2	1	1	2	1	1	2	0	4	2	1	1	0
P5	5	0	11	4	1	4	2	2	2	3	1	5	12	9	5	22	4	8	0	1
P6	4	0	26	0	0	1	0	0	0	1	0	12	2	1	0	12	38	4	0	0
P7	38	0	1	8	1	2	5	1	0	12	1	5	4	5	0	2	3	13	0	0
P8	34	0	1	5	1	4	2	8	2	3	3	5	8	7	8	7	1	2	1	1
P9	18	0	1	1	0	18	1	0	1	1	0	3	1	22	0	32	1	1	0	0

B)

	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
P1	0	0	0	0	30	0	0	7	0	13	4	0	0	0	0	0	0	10	3	34
P2	8	0	1	4	0	3	1	7	3	10	0	3	0	8	13	6	10	20	0	3
P3	13	1	0	3	6	10	4	11	10	3	3	6	3	1	8	4	3	6	0	6
P4	8	0	25	30	1	0	3	4	3	1	1	1	3	4	0	6	6	1	1	0
P5	10	0	10	4	3	6	0	1	6	3	1	6	14	6	8	7	6	7	1	1
P6	6	0	14	0	0	1	0	0	0	1	1	18	4	1	0	21	25	6	0	0
P7	20	0	1	13	1	3	1	3	3	11	1	13	7	4	0	4	3	11	0	0
P8	14	0	1	8	1	3	3	6	3	4	4	7	13	4	7	10	3	4	1	3
P9	17	0	3	1	0	23	1	0	1	1	0	6	1	18	0	18	7	1	0	0

IV.1.3.

EFFECTO DE LAS CHAPERONAS DE LA VÍA DE CLASE II, CADENA INVARIANTE Y HLA-DM, EN LOS REPERTORIOS ASOCIADOS A DR4 EN CÉLULAS EPITELIALES TRANSFECTADAS

1. ANTECEDENTES Y MODELO EXPERIMENTAL

En las enfermedades autoinmunes órgano-específicas las células epiteliales endocrinas son la diana de la respuesta inmune. Se ha descrito que en estas patologías, las células epiteliales expresan moléculas de MHCII y sobreexpresan moléculas de MHCI así como otras proteínas implicadas en las vías de presentación de péptidos (Bottazo 1983; Marelli-Berg 1999). Catalfamo y col. demostraron que en la enfermedad de Graves-Basedow las células foliculares del tiroides expresaban, además de moléculas de MHCII, otras moléculas asociadas a la vía de presentación de clase II como son Ii y HLA-DM (Catalfamo 1999). Sin embargo, el estudio del papel que tenían estas chaperonas en la presentación de péptidos asociados a MHCII estuvo limitado por la dificultad en la obtención de material *ex-vivo* y por la pérdida de expresión de las moléculas de clase II en células endocrinas primarias aisladas y mantenidas en cultivo.

Para poder estudiar la influencia de las moléculas Ii y HLA-DM en la presentación de péptidos asociados a moléculas de MHCII en células epiteliales endocrinas, Serradell y col. generaron líneas celulares derivadas de la línea epitelial de insulinooma de rata RINm5F que expresaban por transfección estable la molécula humana DRB1*0401 y las moléculas auxiliares Ii y HLA-DM. Mediante transfección secuencial de los diferentes genes se generaron cuatro líneas celulares endocrinas que expresaban las 4 combinaciones posibles: DR4, DR4Ii, DR4DM y DR4IiDM. Posteriormente se evaluó como la coexpresión de las chaperonas Ii y HLA-DM afectaba al transporte y a la estabilidad de las moléculas de MHCII expresadas. Se demostró que en la superficie de las células que coexpresaban Ii y HLA-DM los complejos formados entre la molécula de MHCII y los péptidos presentaban una conformación compacta resistente a SDS a temperatura ambiente. Además, se demostró que la expresión de la molécula HLA-DM en ausencia de Ii era suficiente para que parte de los complejos formados presentaran una conformación compacta, sugiriendo que HLA-DM jugaba un papel importante en la presentación en ausencia de Ii. En cambio, la expresión de Ii en ausencia de HLA-DM permitía únicamente la detección de complejos no estables DR-CLIP en la superficie celular. Además, en ausencia de las dos chaperonas los complejos detectados en la superficie eran sensibles a SDS a temperatura ambiente indicando que, a pesar de llegar a la superficie celular, hay una ausencia de ligandos peptídicos capaces de estabilizar estos complejos. Mediante ensayos de localización celular por microscopía electrónica se determinó que la molécula DR se localizaba principalmente en la superficie celular en las células Ii⁺, acumulada en vesículas del citoplasma perinuclear en las DR4DM y en ER/Golgi en las células DR4. En las líneas Ii⁺ esta molécula se acumulaba en las vesículas periféricas. En las líneas que expresaban DM esta colocalizaba con DR en las vesículas yuxtanculares (Serradell 1999).

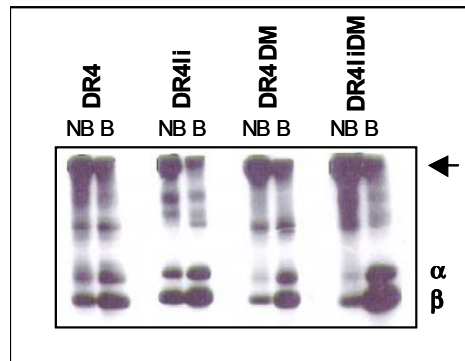


Figura 49: Separación en SDS-PAGE de las moléculas de DR inmunoprecipitadas con el anticuerpo B8.11.2 procedentes de extractos celulares marcados con ^{125}I antes (NB) y después (B) de hervirlos. Las bandas de alto peso molecular corresponden con los dímeros compactos (flecha). En las células DM^+ la intensidad de las bandas correspondientes a las cadenas α y β aumentan al hervir la muestra (B vs NB) mientras que en las células DR4 y DR4Ii el incremento es muy bajo después de hervir indicando que los dímeros de DR están principalmente unidos de forma inestable a péptidos en las células deficientes en HLA-DM (Muntasell 2002; Serradell 1999).

La expresión de DR4 se analizó por citometría de flujo utilizando una tinción de superficie con el anticuerpo L243 y la expresión de Ii y HLA-DM utilizando una tinción citoplasmática con los anticuerpos VYC-Y1 y 5C1 respectivamente (Figura 50a), realizándose estos análisis cada dos o tres semanas durante el crecimiento de las células para comprobar que los niveles de expresión de las moléculas eran correctos y no existían problemas de desdiferenciación. Se detectó DR4 en la superficie de todas las células, variando la expresión en función de la coexpresión de Ii y HLA-DM. El nivel más alto de expresión se detectó en las líneas DR4Ii y DR4IiDM. La expresión de Ii y HLA-DM era ligeramente superior en las células DR4Ii y DR4DM que en la triple transfectante, si bien la relación DR/DM era superior en la triple transfectante respecto a DR4DM (7.9 vs 2.6) y la relación DR/Ii era similar en las dos líneas (4.2 vs 4.8) (Figura 50b). Los niveles de expresión de HLA-DR α , Ii y HLA-DM se analizaron por western-blot a partir de extractos proteicos totales de todos los transfectantes, no observándose diferencias significativas (Figura 50c).

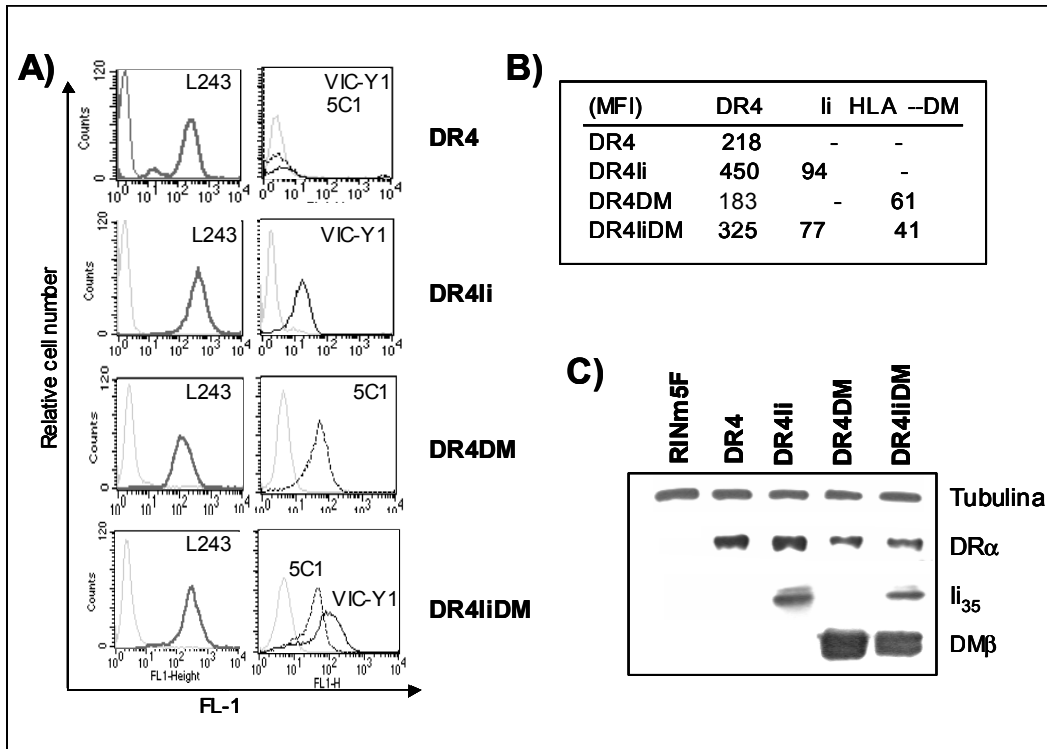


Figura 50: Cuantificación de la expresión de las moléculas DR4, li y HLA-DM en las cuatro líneas celulares. (A) Análisis mediante citometría de flujo, (B) cuantificación de la expresión utilizando la intensidad media de fluorescencia (MFI) en cada tipo celular y (C) análisis por western-blot.

En conclusión, las cuatro líneas celulares derivadas de la línea RINm5F expresaban por transfección estable DRB1*0401 y las moléculas li y DM en diferentes combinaciones. Por otra parte algunas de estas líneas eran capaces de presentar complejos estables en membrana proveyendo así de un modelo para el estudio de la presentación antigénica en células epiteliales que expresan la molécula de MHCII.

En este capítulo, se utilizará este modelo de células RIN transfectadas para, a través del estudio de los repertorios peptídicos asociados a cada uno de los transfectantes, intentar determinar el papel de estos cambios en la presentación antigénica. En el contexto de la autoinmunidad, una baja expresión de li o HLA-DM en el epitelio autoinmune podría afectar al transporte y carga de la molécula de MHCII. Como ya hemos indicado, la expresión relativa de MHCII, HLA-DM y li en células epiteliales de tiroides en estado de autoinmunidad es diferente a la de APCs profesionales como la línea B-LCL (Catalfamo 1999). Además, se ha demostrado en varios casos que la inducción por IFN- γ , que en las APCs profesionales no produce cambios relativos en la expresión de estas moléculas, si que induce cambios en las relaciones DR/DM y DR/li en células no profesionales (Muczynski 1998; Ponzoni 1993). Cambios en las cantidades relativas de las moléculas implicadas en la presentación pueden implicar cambios en los repertorios peptídicos que podrían estar relacionados con la presentación de péptidos propios a las células T autorreactivas.

2. REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A HLA-DR4 EN LAS LÍNEAS CELULARES DR4, DR4li, DR4DM Y DR4liDM

En este apartado se describen los repertorios peptídicos asociados a las líneas celulares DR4, DR4li y DR4DM y el estudio, a partir de los péptidos identificados, de la influencia de las chaperonas li y HLA-DM en la presentación de los péptidos de clase II, comparando estos repertorios con el repertorio asociado a DR4 en la triple transfectante (DR4liDM descrito en IV.1.2).

2.1. PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A LA MOLÉCULA DE MHCII MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD Y HPLC.

Los péptidos asociados a DR4 en cada una de las líneas celulares se purificaron por cromatografía de inmun afinidad según se describe en el Apartado III. Los eluidos obtenidos se analizaron mediante HPLC-UV recogiendo una fracción cada minuto (Figura 51).

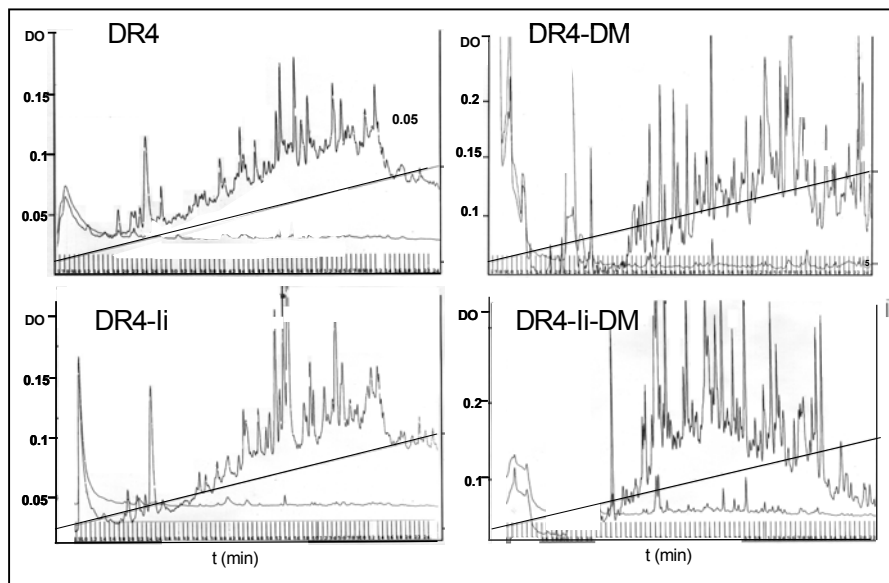


Figura 51: Perfiles HPLC-UV obtenidos en el fraccionamiento de los péptidos asociados a DR4 en las líneas DR4, DR4li, DR4DM y DR4liDM. La intensidad de las señales en los cromatogramas de las células DM⁺ es superior al de las DM⁻ debido a que el número de células de partida fue mayor.

En todos los casos se observó un perfil de UV complejo y con una heterogeneidad aparente superior a la detectada en las células presentadoras profesionales estudiadas en IV.1.1 y a los descritos en la literatura para diversas APC (Chicz 1993).

2.2. DISTRIBUCIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LOS LIGANDOS ASOCIADOS A DR4.

Las distribuciones de las masas de los componentes en los distintos repertorios medidas mediante MALDI-TOF se muestran en los histogramas de las figuras 52 y 53. El test de Sapiro-Wilk indicó que estas poblaciones no seguían una distribución normal por lo que se utilizó para su análisis comparativo el test de Krustall-Wallis, que evidenció diferencias significativas entre las cuatro poblaciones. Las células DM^+ dieron lugar a un mayor número de péptidos detectados que las DM^- siendo la línea DR4DMli la que mostró el repertorio más amplio y de distribución más homogénea. Estos datos son solo indicativos dado que debe tenerse en cuenta que el número de células del cual se partió en las líneas DM^- fue la mitad que en las líneas DM^+ . En las células DR4liDM, DR4DM y DR4li se observó un máximo a valores de masa de 2000, mientras que en las células DR4 el máximo aparece a valores de 1600.

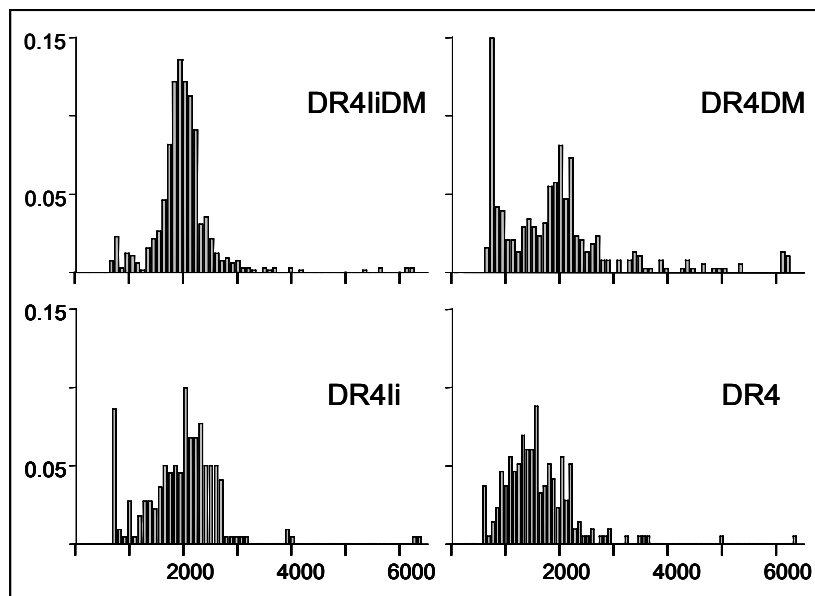


Figura 52: Histograma de frecuencia de masas de los péptidos asociados a HLA-DR4 en las líneas celulares DR4liDM, DR4DM, DR4li y DR4. Se formaron grupos de 100 unidades de masa a partir de los pesos moleculares determinados por MALDI-TOF y filtrados según se indicó en IV.1.2.

Excepto en las células DR4, en todas las líneas se observó una bimodalidad en la distribución de las poblaciones, con un segundo máximo a valores de peso molecular de aproximadamente 800 Da. Inicialmente se consideró la posibilidad de que esta observación fuera el reflejo de las interacciones péptido-MHCII fuera del surco de unión. Se conoce, que debido a la estructura abierta del surco de unión, éste puede alojar polipéptidos largos que son procesados por las proteasas de los MIIC. La actividad de estas proteasas probablemente está modulada, en parte, por los impedimentos estéricos derivados de la propia molécula de MHCII, de forma que ésta

protegería frente a la degradación aquellas zonas en los extremos de la secuencia del péptido que aunque sobresalen del motivo, interaccionan con la molécula de MHCII. Para ello sería necesario que el motivo de interacción externo estuviera situado en una posición de la secuencia suficientemente alejada del surco de unión para alcanzar la zona de interacción con el MHCII. A falta de una interacción externa, la secuencia sería recortada hasta péptidos de tamaño muy inferior de forma únicamente limitada por la especificidad de las proteasas presentes y en último término por la protección aportada por el entorno del surco de unión. Esta situación implicaría que aquellas longitudes de secuencia que estuvieran entre la mínima determinada por la protección del surco de unión y la necesaria para alcanzar la zona de interacción externa podrían tener una frecuencia menor que otras secuencias de mayor tamaño generándose el collado observado en los histogramas.

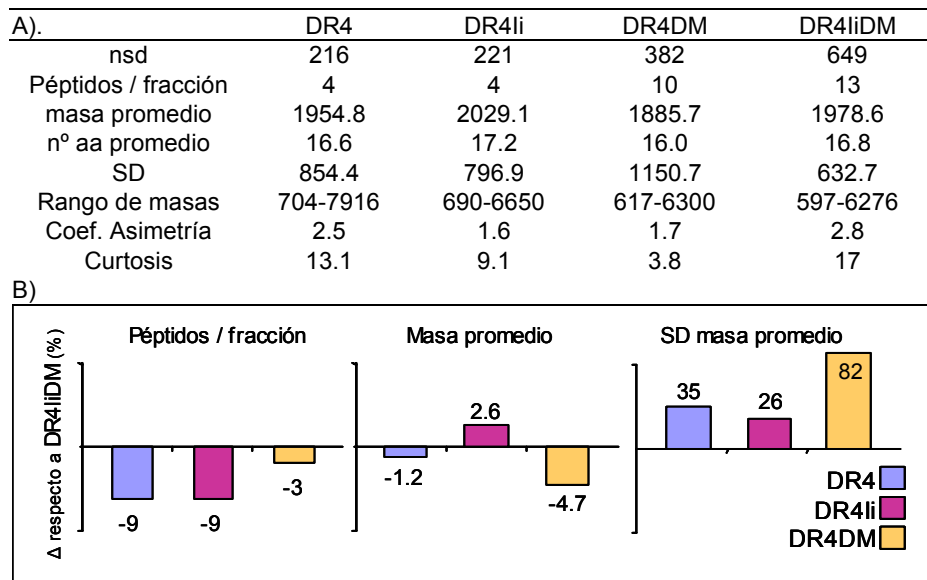


Figura 53: (A) Valores estadísticos correspondientes a los pesos moleculares de los repertorios peptídicos asociados a las células DR4, DR4li, DR4DM y DR4liDM a partir de los datos del análisis por MALDI-TOF. (B) Variación porcentual con respecto a la línea DR4liDM de los valores de péptidos/fracción, masa promedio y desviación estándar de la masa promedio en las líneas DR4, DR4li y DR4DM.

Este fenómeno podría ser debido también a la presencia de un alto número de interferencias no peptídicas a masas bajas responsables de la distorsión del perfil de frecuencias que el proceso de filtrado no habría sido capaz de corregir o a fragmentos peptídicos originados por la degradación de péptidos de mayor tamaño durante los procesos de aislamiento de los correspondientes complejos y la extracción de los péptidos. De hecho, aceptando la necesidad de un patrón de 9 aminoácidos para la interacción péptido-MHCII en el surco de unión, la probabilidad de que se presenten péptidos de masas inferiores a 700 Da (primera y segunda barra en los histogramas) es

muy baja (el peso molecular medio de un péptido de 9 aa es de 994 Da teniendo en cuenta la abundancia relativa de los aminoácidos en vertebrados). En el caso de la línea DR4LiDM, cuando se seleccionaron aleatoriamente 22 señales en el rango de masas de 500 a 1330 y se sometieron a un análisis por MS/MS, se comprobó que el 50% de las señales correspondía a interferencias no peptídicas. El resto de las señales mostraban perfiles de fragmentación similares a los de los péptidos aunque solo de la mitad pudo deducirse una secuencia. De las 8 señales que produjeron información de secuencia, 5 de ellas correspondían a un mismo péptido de 4 aminoácidos (sales de Na y K o a formas oxidadas de la secuencia). Ninguno de los tres *tag* diferentes estaba incluido, sin embargo, en la secuencia de péptidos de tamaño superior. Cuando se consideró el rango de 500 a 800 Da (tres primeras barras en los histogramas), casi el 90% correspondían a interferencias no peptídicas. Estos resultados indicaron que el aumento característico de la frecuencia de especies con estos rangos de masa se debe en su mayor parte a la contribución de estas interferencias.

2.2.1. Influencia de la cadena invariante en células DM⁺.

Cuando se compararon por MALDI-TOF las mismas fracciones cromatográficas se observaron diferencias importantes entre las líneas DR, DRli y las líneas DM⁺. Los repertorios peptídicos presentados en las células DR4DM y DR4LiDM eran, sin embargo, muy similares (Fig. 54). Más del 50% de las señales detectadas en la línea DR4DM coincidían con señales observadas en la triple transfectante, confirmando que la expresión de esta molécula era suficiente para una edición selectiva del repertorio. Además, estos iones comunes, cuya expresión era independientemente de la presencia de li, correspondían a las señales más intensas en estos repertorios (en promedio un 23% o 81% mayores que el valor medio del área del total de iones en los espectros de DR4DM y DRliDM, respectivamente). Únicamente el 8-17% de las señales detectadas en las células DM⁻ coincidían con las detectadas en las células DM⁺.

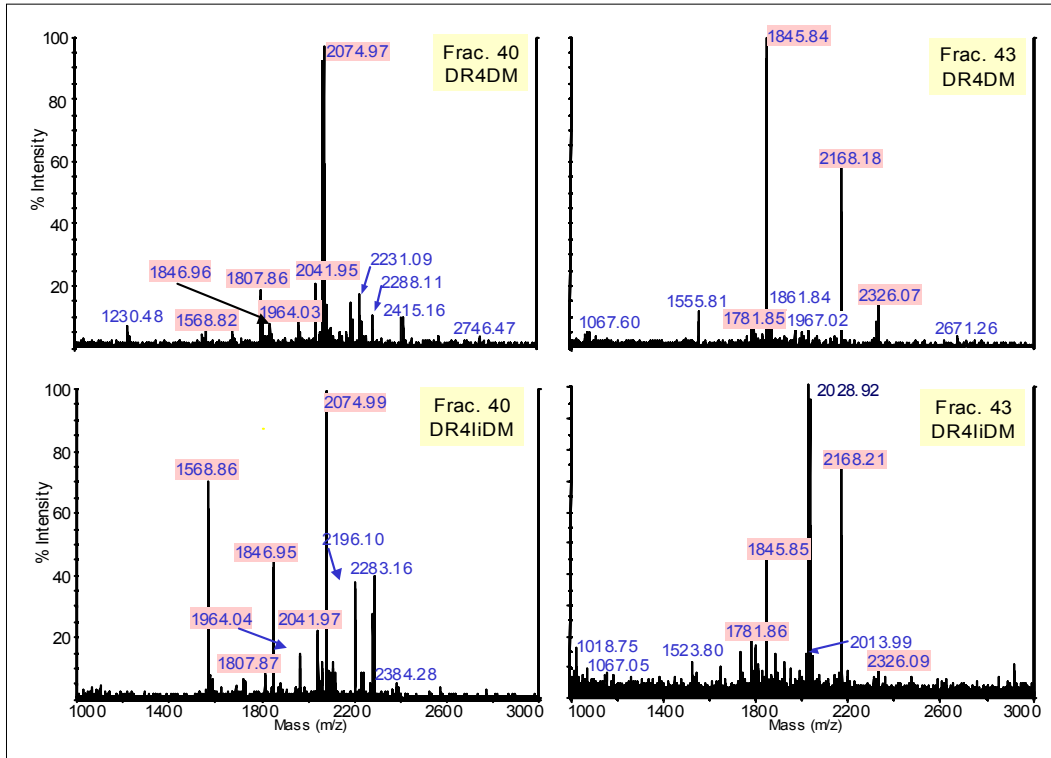


Figura 54: Espectros de MALDI-TOF de las fracciones 40 y 43 de las líneas celulares DR4iDM y DR4DM. El número de secuencias comunes entre las líneas se valoró en base a la coincidencia en el peso molecular de las señales en los espectros MALDI-TOF, considerándose solo aquellas parejas con diferencias en masa inferiores a la unidad y detectadas en la misma fracción cromatográfica o en una fracción contigua.

2.2.2. Influencia de la cadena invariante en células DM⁺.

De acuerdo con lo que se conoce para otros modelos experimentales (Koonce 2003; Martin 1996; Riberdy 1992; Sette 1992), en las células con expresión de Ii y ausencia de HLA-DM, CLIP fue el péptido mayoritario que se presentó en la superficie. Además de los dos péptidos CLIP identificados se detectaron más de 200 señales adicionales. El 86 % de los iones de las células DR4Ii eran específicos de esta línea y corresponderían con péptidos capaces de desplazar a CLIP y unirse a la molécula de MHCII a pesar de la ausencia de la chaperona HLA-DM. Estos datos estarían de acuerdo con otros trabajos donde se ha descrito que el mecanismo de autodisociación de CLIP y HLA-DR4 permite intercambiar CLIP con otros péptidos en ausencia de DM aunque con baja eficiencia (Avva 1994; Kropshofer 1999; Vogt 1996).

2.2.4. Abundancia relativa de los ligandos peptídicos presentados

Si bien la diferente respuesta de diferentes péptidos a la ionización por MALDI-TOF impide cuantificar la abundancia de un determinado péptido en función únicamente de la intensidad de su señal, este parámetro puede aportar, sin embargo, datos interesantes sobre el conjunto de los repertorios. Así, se observó que existía una diferencia de casi tres ordenes de magnitud entre las mayores áreas detectadas y el valor límite de detección establecido en 1000 unidades de área (Fig. 55). La señal mas intensa (excluido CLIP) correspondió a un péptido de la línea DR4liDM (fracción 41, área 812576) que no se pudo identificar.

Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de la molécula HLA-DM aumentaba el número de señales en los espectros y que este aumento era mayor en el grupo de iones de intensidad alta (aquellos con áreas por encima del 2% del máximo). Dado que el mayor número de señales de intensidad alta (reflejo de una mayor abundancia de los correspondientes péptidos en los repertorios) estaría relacionado con un aumento en el número de péptidos que forman complejos muy estables, estos datos estarían de acuerdo con lo ya descrito en líneas B-LCL donde la presencia de HLA-DM favorece la formación de complejos de alta afinidad.

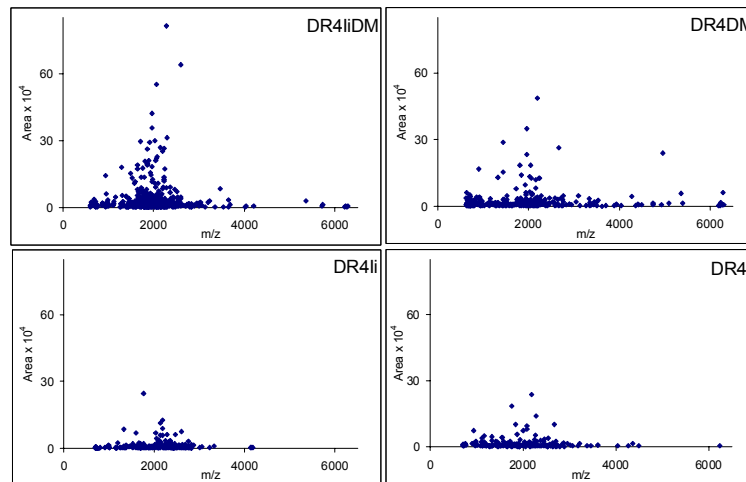


Figura 55: Gráficas de distribución (valores de m/z frente al área) para las líneas celulares DR4, DR4li, DR4DM y DR4liDM (En la línea celular DR4li no se tuvieron en cuenta los péptidos CLIP).

2.3. IDENTIFICACIÓN DEL REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A DR4 EN CÉLULAS QUE ÚNICAMENTE COEXPRESAN HLA-DM.

Se consiguieron secuenciar 27 péptidos asociados a las células DR4DM que pertenecían a 17 proteínas diferentes (Tabla XXV). Igual que en el caso de las células DR4IiDM (IV.1.2) todas las secuencias obtenidas cumplían el motivo de unión descrito para DRB1*0401, con un índice de afinidad promedio de 2.6. La longitud promedio de los péptidos fue de 17 aa y el peso molecular promedio de 1958 Da, ligeramente superior al obtenido en el análisis por MALDI-TOF, lo que podría indicar de nuevo la presencia de interferencias de bajo peso molecular.

Once de las 27 secuencias se habían identificado asimismo en el repertorio de las células DR4IiDM, una proporción similar a la calculada en base al peso molecular de las señales en las fracciones cromatográficas. Por otro lado, entre las secuencias restantes, 12 de ellas podían considerarse como parte de grupos de péptidos recortados de secuencias descritas en las células DR4IiDM. Estos datos muestran de nuevo la alta semejanza entre ambos repertorios. Solo 4 de los péptidos secuenciados se detectaron específicamente en DR4DM. Tres de ellos provienen de sendas proteínas no identificadas a partir de los repertorios de las otras líneas celulares: un receptor de mineralocorticoides situado en el citoplasma y las proteínas de membrana cadherina y MHC *non-RT1*, implicadas en procesos de adhesión celular y en la presentación de antígenos respectivamente. La cuarta secuencia, un péptido que proviene del factor de transcripción ELYS y que también se detectó en las células DM/Ii, era uno de los dos únicos péptidos derivados de una proteína nuclear identificados en estos estudios (el otro se identificó en DR4).

Estos datos confirman los resultados obtenidos en los estudios bioquímicos y de peso molecular del repertorio que confieren un papel principal a la molécula de HLA-DM en el mecanismo de presentación dejando a la cadena Ii en un segundo plano. En ausencia de Ii la presentación sigue teniendo lugar de forma efectiva lo que sugiere al menos dos posibilidades: un papel adicional de DM en el transporte/estabilización de los complejos MHC hacia/en los endosomas o la posible existencia de otras chaperonas alternativas a Ii que intervienen en el transporte de la molécula de MHCII desde el RE (ver IV.2).

Tabla XXV: Repertorio peptídico asociado a DR4 en las células DR4DM.

Fr HPLC	Mr (Da)	P 1 2 3 4 5 6 7 8 9	nº aa	Proteína origen (aa ₁ -aa _n)	Acceso DB	L*	IA**
68	1441.8	L P P D V E F N R P F L	12	α-1-antiproteínase (383-393)	P34955	EX	-4.2
39	1934.0	K G D V A F V K D Q T V I Q N T D G	18	Serotransferrin (554-571)	204584	EX	6
41	1934.9	D L R H T F S G V A S V E S S S G E A	19	Fetuin (311-329)	P12763	EX	1.8
37	1855.0	V L N Q E L R A D G T V N Q I E G	17	Apolipoprotein D (77-93)	P05090	VS	5.1
41	1638.9	R L A P I T S D P T E A A A V G A	17	M2 Piruvate Kinase (399-415)	P11981	C	2.7
39	2229.1	D G L K S Q A A F E E M R T N Y I K E	19	Mineralocorticoid receptor (881-899)	P22199	C	2.0
49	2298.0	E S G F P K P P S Y N V A T T L P S Y D E	17	Nedd4 WW dom.bind. prot. (118-137)			
49	2082.0	G F P K P P S Y N V A T T L P S Y D E	19	Nedd4 WW dom.bind. prot. (120-138)			
49	1895.9	F P K P P S Y N V A T T L P S Y D	21	Nedd4 WW dom.bind. prot. (121-137)	12004976	C	4.6
49	2026.0	F P K P P S Y N V A T T L P S Y D E	18	Nedd4 WW dom.bind. prot. (121-138)			
45	1784.9	D E F K K F I S D K D A S V V G	16	Disulfide isomerase ER-60 (143-158)	P11598	ER	0.9
58	1598.8	V A F P E N N K P G E V V A E	15	Cadherin like 1 (418-432)	18848252	M	-1.2
41	2005.9	Y N P T T Y Q M D V N P E G K Y S	17	EGFR (269-287)			
39	1842.8	N P T T Y Q M D V N P E G K Y S	16	EGFR (270-287)	6478868	M	3.6
45	2120.0	L Y N P T T Y Q M D V N P E G K Y S	18	EGFR (272-287)			
39	1962.9	R E G P E Y W E E Q T Q R A K G	16	MHC class I (54-69)			
39	2229.6	R E G P E Y W E E Q T Q R A K G H E	18	MHC class I (54-71)	P70527	M	2.1
39	1806.9	E G P E Y W E E Q T Q R A K G	15	MHC class I (55-69)			
39	1963.9	E R E G P E Y W E E Q T L V A K	16	MHC non-RT1.A alpha-1-chain (77-93)	P15978	M	2.8
45	1764.8	S Y T M F V R E N N S P A L H	15	Protocadherin beta (455-469)	13876288	M	5.4
50	1958.9	Q S L Q E Y L A E Q N Q R Q L E	16	Prosaposin, SGP-1 (140-155)			
46	1847.9	S L Q E Y L A E Q N Q R Q L E	15	Prosaposin, SGP-1 (141-155)			
46	1934.9	S L Q E Y L A E Q N Q R Q L E S	16	Prosaposin, SGP-1 (141-156)	P10960	VE	4.3
45	2050.2	S L Q E Y L A E Q N Q R Q L E S N	17	Prosaposin, SGP-1 (141-157)			
41	1579.8	L Q P F D Y D P N E K S K	13	VAMP-associated prot (74-86)	Q9Z270	VE	3.1
45	3060.5	S P T G T A V S T L S Y I S R T N Q L A A G F S D G Y L A L	30	Transcript. fact.ELYS (218-246)	17298096	N	0.7
45	2017.9	E P G E P E F K Y I G N M H G N E A	18	Carboxypeptidase H (102-119)	P15087	VS	3.8

(*) Localización: C: Citosol. E: Exógena. ER:Reticulo endoplasmático. M: Superficie celular. VE: Vesículas endocíticas. VS: Vesículas secretoras. (**) Índice de afinidad teórico.

2.4. IDENTIFICACIÓN DEL REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A DR4 EN CÉLULAS QUE ÚNICAMENTE COEXPRESAN Ii.

Tal como se observó en el análisis por MALDI-TOF, la línea celular DM⁻/Ii⁺ presentaba en su superficie mayoritariamente el péptido CLIP. La cantidad de péptido purificado en el fraccionamiento mediante HPLC fue suficientemente alta y pura como para permitir secuenciar los dos péptidos CLIP detectados en el MALDI-TOF mediante degradación de Edman. Se identificó el péptido CLIP₁₀₀₋₁₂₀ en las fracciones 53 y 54 y el CLIP₉₈₋₁₂₁ en las fracciones 63 y 64 (Tabla XXVI). Ambas secuencias contienen los residuos 81-89 que están implicados en la liberación espontánea de CLIP (Kropshofer 1995).

Además, mediante nESI-ITMS/MS, se secuenciaron otros 16 péptidos minoritarios que provenían de 13 proteínas (Tabla XXVII). Todos estos péptidos cumplían el motivo de unión por DR4, con un índice de afinidad promedio de 1.7. El número de aminoácidos y el peso molecular promedio fueron de 16 y 1747 Da respectivamente.

Cuatro de los péptidos detectados provenían de la proteína exógena Fetuina. De éstos, tres correspondían a la misma zona de la proteína (péptidos 325-341, 331-347 y 332-347) si bien definían dos epítomos distintos (331-339 y 336-344). Ambos motivos de unión se encuentran en la secuencia del péptido 331-347, aunque, dado que la diferencia de afinidad teórica entre ellos es notable (0.7 y 2.2 respectivamente), probablemente el epítomo 336-344 sea el principal responsable de la interacción. El resto de péptidos identificados pertenecían a proteínas autólogas localizadas en el citoplasma, membrana, retículo endoplasmático o en la vía endocítica. No se encontró ningún péptido derivado de proteínas residentes en la vía secretora. Dos de las proteínas identificadas, la fetuina y la protocadherina, también fueron detectadas en otras líneas celulares: la fetuina aparecía en todas las células DM⁺ y la protocadherina en la DR4IiDM. En ambos casos el epítomo identificado era diferente. En el caso de la fetuina se detectó el epítomo 312-320 en las líneas DM⁺, mientras que en las células DM⁻/Ii⁺ fueron los epítomos 331-339 y 336-344 ya indicados y el 191-199. Los epítomos de la protocadherina en las células DM⁺/Ii⁺ fueron el 4414-4422 y el 1821-1829 mientras que en las DM⁻/Ii⁺ fue el 268-276. La variedad de epítomos observados sugiere la existencia de diferencias de especificidad relacionadas con la ausencia de la función editora de la chaperona HLA-DM. Estas diferencias podrían reflejar también cambios en los procesos de desnaturalización y degradación enzimática de las proteínas de origen en las líneas transfectadas que podrían dar lugar a proporciones variables de los diferentes motivos capaces de unirse a la molécula de MHCII favoreciendo o determinando la presentación de un determinado epítomo (Esta posibilidad se valorará en VI.2).

Tabla XXVI: Péptidos CLIP secuenciados mediante degradación de EDMAN en las células DR4li.

Fr HPLC	Mr (Da)	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	n° aa	Proteína origen (aa ₁ -aa _i)	Acceso DB	L*	IA**
53.54	2333.3	K	P	P	P	P	P	P	P	P	21	Invariant chain (100-120)	P04233	VE	2.9
63.64	2674.5	L	P	K	P	P	K	P	V	S	24	Invariant chain (98-121)			

(*) Localización: VE: Vesículas endocíticas. (**) Índice de afinidad teórico

Tabla XXVII: Repertorio peptídico asociado a DR4 en las células DR4li identificado mediante EM.

Fr HPLC	Mr (Da)	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	n° aa	Proteína origen (aa ₁ -aa _i)	Acceso DB	L*	IA**
38	1933.9	K	G	D	V	A	F	V	K	D	18	Serotransferrin (554-571)	Q29443	EX	6
40	1659.0	G	K	T	P	I	V	G	Q	P	17	Fetuin (332-347)			
40	1758.0	V	G	K	T	P	I	V	G	Q	18	Fetuin (331-347)	P12763	EX	2.2
40	1709.9	S	G	E	A	F	H	V	G	K	17	Fetuin (325-341)	P12763	EX	0.7
55	1727.0	I	S	R	A	Q	F	V	P	L	16	Fetuin (186-201)	P12763	EX	4.6
31	1311.7	A	A	Q	N	L	I	P	A	S	14	GA-3P-DH (200-213)	P04797	C	1
60	1444.6	P	Y	L	I	D	G	S	H	K	13	GST Yb4 (61-73)	4558493	C	4.2
62	1781.9	G	R	P	T	L	L	P	E	E	16	p58 (296-311)	562084	C	1.4
49	2054.5	D	L	L	S	G	K	K	N	T	20	Prot. tyr phosphat. 2E (823-842)	Q62728	C	-0.2
49	1759.0	K	P	P	Q	L	P	S	G	R	14	Epoxide hydrolase (131-146)	P07687	C	-3
49	1661.8	K	P	L	P	K	E	M	E	E	14	UDPGT (283-297)	P36510	ER	-2.9
49	2088.0	S	E	Q	H	D	I	A	I	D	19	Mannose 6-P GFR (324-342)	1398935	M	2.2
55	1519.8	F	Q	T	L	V	M	L	E	T	13	HLA-DR4 beta (151-163)	P13760	M	4.3
49	1761.9	L	P	S	S	E	L	D	K	D	16	Protocadherin (263-278)	4426629	M	-0.5
?	2074	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	17	MHC class I (57-71)	P12763	M	2.1
58	1714.0	L	A	N	F	L	V	R	S	S	16	Amylin precursor (49-64)	P12969	VE	3.5

(*) Localización: C: Citosol. E: Exógena. ER:Reticulo endoplasmático. M: Superficie celular. VE: Vesículas endocíticas. (**) Índice de afinidad teórico

Tabla XXVIII: Repertorio peptídico asociado a DR4 en las células DR4

Fr HPLC	Mr (Da)	Peptido	Nº aa	Proteína origen (aa ₁ -aa _n)	Nº Id	L*	IA**
		P P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9					
44	1930.0	Q V T Q P T V G M N F K T P R G A V	18	40S Ribos. prot.S17 (118-135)	P04644	C	-1.7
51	1643.9	G F G D L K T P A G L Q V L N D	16	EF 1-beta (2-17)	O70251	C	0.2
49	1371.8	A R K L I G D P N L E F	12	GTPase (166-176)	11228976	C	2.7
67	3958.9	P A L A P P E V V M D P A L A A Q Y E H D L E V A Q T T A L P D E D D D L	37	GTPase (180-216)	11228976	C	4.6
64	1930.9	A Q D D Q A K Q V L K G M S D V A Q	18	Flightless-I prot. (437-454)	Q13045	C	0.7
51	1558.7	Y V G D L H P D V T E A M L	14	PABP (14-27)	P29341	C	3.2
44	2814.3	V A L S Q D S T Y Q G E R A Y Q H G G V T G L S Q Y	26	Regul. nonsense transcript1 (1078-1113)	Q9EPU0	C	1.8
44	2200.1	I I D P G D S D I I R S M P E Q T G E K	20	Ribosomal prot. L30 (95-115)	206728	C	0.6
51	1934.9	M K I F V G N V D G A D T T P E E L	18	RNA bind. Motif prot 14 (1-18)	12836486	C	-0.7
54	1114.6	M R Y V A S Y L L	9	60S acid ribos. prot. (1-9)	P02401	C	-0.1
51	3208.5	R I E P F S S P P E L P D V M K P Q D S G G S A N E Q A V Q	30	RNA polymerase II (89-118)	1054562	C	1.6
67	1632.9	I G A G G T G A A L Y V M R L A L	17	NADH-ubiq.oxidred. (22-38)	Q62425	M	-1.5
54	1820.0	N V W Q V N T S R T R I T F V	15	CDC47 homolog (705-719)	Q61881	N	1.4
44	3060.5	S P T G T A V S T L S Y I S R T N Q L A A G F S D G Y L A L	30	Transcript. Fact.ELYS (218-246)	17298096	N	0.7
64	2190.1	V A Q A S L G E Y L F E R L T L K H D	19	Ferritin light ch.(165-183)	204131	VS	1.8
49	3216.7	V P I D V D K T K V H N V E P V E S A R I E P P D T G L	29	Nucleobindin (25-52)	Q9J185	VS	1.3
31	892.5	A E F A K S L Q	8	Neural stem cell neuron. survival prot. (138-145)	20799379	C	-
31	912.5	I V I Q N P T E	8	Dynein-ass.prot. RKM23 (89-96)	6435931	C	-
39	1652.7	G N G G A A T T A E E N G S M M R	17	Porphobilinogen deamin. (3-19)	P19356	C	-
40	924.5	L E T L H E A L	8	n-chimaerin (251-258)	P30337	C	-
54	1620.8	S A M T E E A A V A I K A M A K	16	eIF- 5A (139-153)	P10159	C	-
31	973.6	A A V A I K A M A K	10	eIF- 5A (145-153)	P10159	C	-
32	850.4	F I S N H A Y	7	Fruct.-biphosph. Aldol. (358-364)	P05065	C	-
39	1669.0	E A R G A R R G V K K V M V L	15	Integrin A-1 prec. (264-278)	P18614	M	-

(*) Localización: C: Citosol. E: Exógena. ER:Reticulo endoplasmático. M: Superficie celular. VE: Vesículas endocíticas. VS: Vesículas secretoras. U: Ubicua. L: Lisosomal. (**) Índice de afinidad teórico.

2.5. REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A DR4 EN AUSENCIA DE HLA-DM y Ii.

La ausencia de las chaperonas Ii y HLA-DM implica graves restricciones tanto en lo referente al transporte de DR hacia la membrana como en el proceso de carga de péptidos. A pesar de ello, datos previos indicaron que en estas circunstancias se presentaban péptidos en la superficie celular, si bien el número de complejos estables era inferior al de la triple transfectante (ver IV.1.2.1). El tipo de péptidos presentados en estas condiciones es muy interesante ya que puede revelar mecanismos secundarios de transporte y carga de los complejos péptido-MHCII.

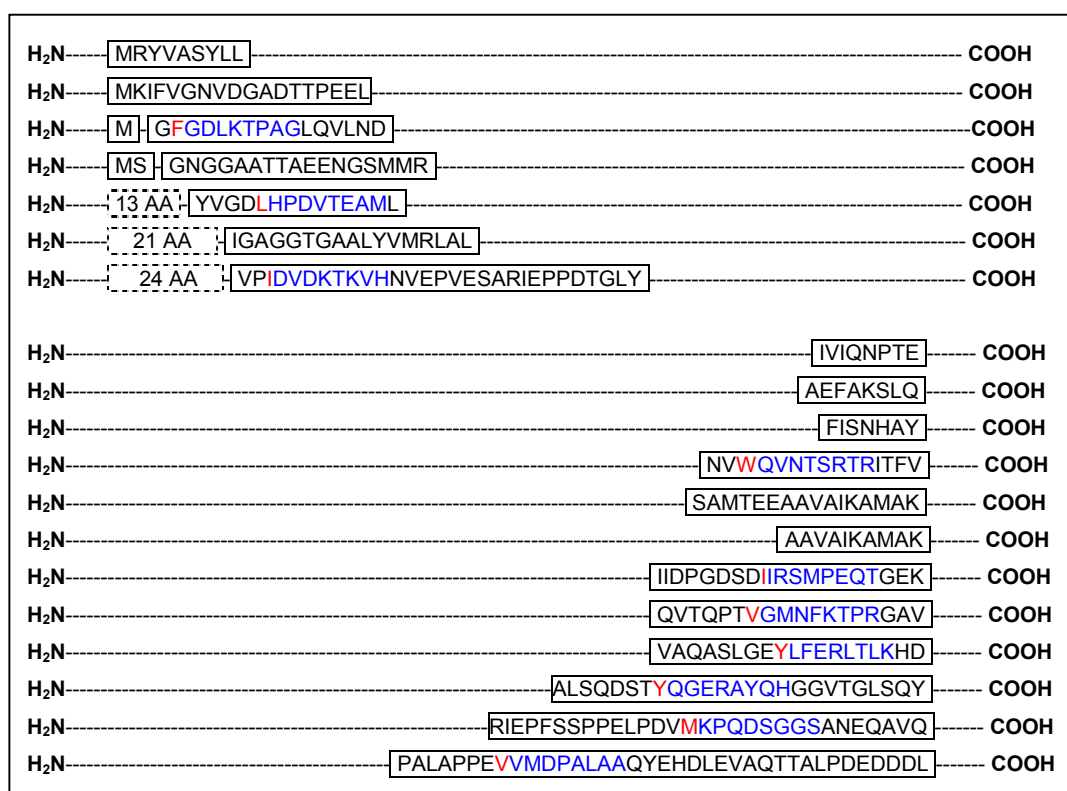


Figura 56: Péptidos identificados en las células DM/Ii situados en los extremos N- y C-terminal de las proteínas origen. Se muestran únicamente las secuencias localizadas a menos de 25 aa de los extremos de las proteínas.

En las fracciones analizadas pudieron secuenciarse 24 péptidos, de los cuales únicamente 16 cumplían el motivo de unión por DR4, aunque con un índice de afinidad promedio de solo 1.1. Las secuencias restantes no cumplían el motivo de unión por carecer del residuo de anclaje P1 o por tener menos de 9 aa de longitud (Tabla XXVIII). El peso molecular promedio fue de 1872 Da y el número de aminoácidos promedio de 17, valores que, igual que en las células DR4Ii, estaban por debajo que los detectados en el estudio de los pesos moleculares. A partir de estas 24 secuencias se caracterizaron 22 proteínas origen. Solo 6 de estas proteínas no eran de

origen citoplasmático y correspondían a dos proteínas nucleares, dos de membrana y dos residentes en la vía secretora.

De los 24 péptidos identificados 19 estaban situados en los extremos N- o C- terminal de la proteína origen (Figura 56) siendo la mayoría de ellos derivados de proteínas citoplasmáticas. Dos de estas secuencias contenían el extremo amino terminal de la proteína y 11 el carboxilo terminal. Otros dos péptidos de este grupo correspondían con la secuencia N-terminal de la proteína pero con los aa Met1 y Met1Ser2 eliminados. Se detectaron además dos secuencias solapadas que pertenecían al extremo C-terminal de eIF- 5a pero que no cumplían con el motivo de unión. El resto de péptidos N- o C- terminales estaban alejados de los extremos de la secuencia de la correspondiente proteína por un número de aminoácidos que oscilaba entre 13 y 24.

La presentación de péptidos N- y C- terminales en la superficie celular de forma casi exclusiva así como el origen citoplasmático de éstos es, por tanto, una característica única de la línea DR4 y sugiere la existencia de un mecanismo de presentación independiente de las chaperonas HLA-DM y Ii y de los mecanismos de degradación en la vía endocítica.

En el resto de transfectantes se identificaron también algunos péptidos N- o C-terminales, aunque en un número mucho más bajo (6, 2 y 3 para DR4IiDM, DR4DM y DR4Ii respectivamente). Cinco de los péptidos C-terminales derivaban de la proteína exógena fetuina, común a las tres transfectantes, y dos de la α -antitripsina, común en las células DM⁺. Estos péptidos podrían provenir de la degradación enzimática de estas proteínas en condiciones no desnaturizantes (por ejemplo en el medio de cultivo o en los fagosomas) que favorecieran el recorte de los extremos de la secuencia. Otro de los péptidos de este grupo corresponde a la secuencia C-terminal de la preprotachikinina, una proteína de la vía secretora que mediante la acción de endoproteasas da lugar a diferentes péptidos que son secretados (Kage 1988). La secuencia identificada corresponde a un fragmento de uno de estos péptidos. Finalmente, dos de los péptidos C-terminales de DM⁺/Ii⁻ que mostraban el motivo de unión para DR4 se identificaron también en la línea DM⁺/Ii⁺ (péptidos derivados de la proteína ribosomal L30 y de la ferritina) lo que podría indicar que este mecanismo de presentación en ausencia de chaperonas puede estar funcionando de forma paralela a los de la vía convencional.

2.6. PÉPTIDOS PRESENTADOS INDEPENDIENTES POR HLA-DM Y Ii.

El número de péptidos comunes a las cuatro líneas transfectantes detectados en el análisis por MALDI-TOF fue bajo, representando únicamente entre el 0.8-1.8% del total de cada línea. Se observó, por otro lado, que el área promedio de este grupo de péptidos era mucho más alta que la media total (Tabla XXIX). Excepto el ión a m/z 710.5, el resto de las señales comunes se encontraban entre los 15 iones más abundantes en las líneas celulares.

Tabla XXIX: Iones detectados en las cuatro líneas celulares. Para cada célula se indica las fracciones donde se han detectado.

[M+H] ⁺	DR4	DR4Ii	DR4DM	DR4IiDM	Péptido secuenciado	Proteína origen
710.5	41	41	42	42	-	-
1329.5	26, 27, 31	26, 27, 31	27	32	-	-
1442.8	68	68	68	68	LPPDVEFXRPFL	α -1-antiproteínase (411-420)
2190.2	64,65	64,65	64,65	64,65	VAQASLGEYLFERLTLKHD	Ferritin light chain (165-183)
2247.3	65, 66	65	65	65, 66	GVAQASLGEYLFERLTLKHD	Ferritin light chain (165-183)
2280.4	40	40	41	40, 41	-	-

Se secuenciaron tres de estos péptidos, observándose que provenían de dos proteínas diferentes, una de origen exógeno y otra residente en la vía secretora. Estos datos sugieren que estos péptidos se pueden estar uniendo a la molécula de MHCII en los compartimentos más superficiales, intercambiándose por otros ligandos de menor afinidad sin necesidad de la chaperona HLA-DM.

2.7. EFECTO DE LAS CHAPERONAS HLA-DM y Ii EN LOS PÉPTIDOS ASOCIADOS A DR4 EN LAS CÉLULAS EPITELIALES TRANSFECTADAS.

2.7.1. Motivo de unión

Las distribuciones de aminoácidos que forman el motivo de unión fueron diferentes en función de la expresión de Ii y HLA-DM.

► En la posición P1 únicamente se unen aminoácidos hidrófobos, detectándose una clara diferencia entre células DM⁺ y DM⁻: en las células DM⁺ los aminoácidos que predominan son los grandes e hidrófobos, mientras que en las DM⁻ los que predominan son los pequeños e hidrófobos (Figura 57). Esto podría ser debido a la conformación abierta que adopta la molécula de DR cuando se une a HLA-DM (Verreck 2001) que permitiría que aminoácidos aromáticos entraran en la posición P1, mientras que en ausencia de DM, la conformación más compacta de DR favorecería la unión de aminoácidos pequeños en esta posición.

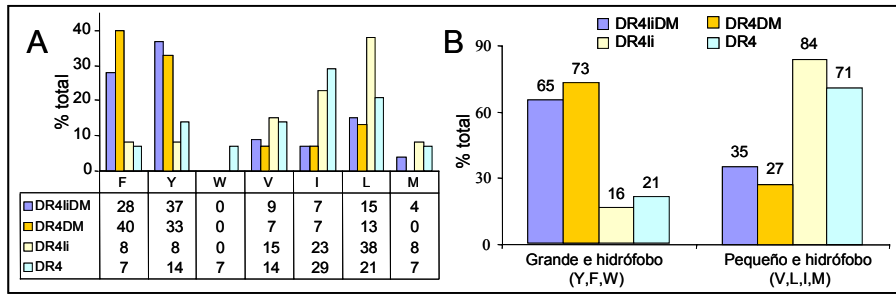


Figura 57: Aminoácidos (A) o grupos de aa (B) situados en la posición P1.

► En la posición P4 se detectó una preferencia por aminoácidos con carga negativa en todas las líneas celulares, aunque esta preferencia era mayor en las células DM⁺ (Figura 58). Esta característica podría ser debida a que la influencia del aminoácido cargado positivamente K71 de la molécula de HLA-DR4 que se sitúa formando parte del bolsillo P4 (Hammer 1995) aumentaría en la conformación abierta adoptada por DR cuando interacciona con HLA-DM.

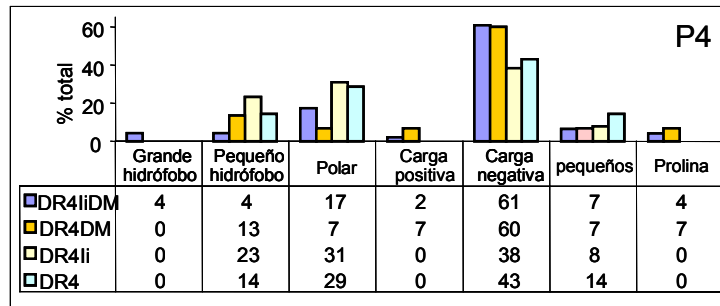


Figura 58: Grupos químicos de aa situados en la posición P4.

► En la posición P6 se observó una preferencia por aminoácidos polares en todas las líneas celulares (Figura 59a). De éstos, los más frecuentes en las cuatro líneas celulares fueron los aminoácidos hidroxilados. Además, la asparagina se detectó principalmente en células DM⁺. El único aminoácido polar cuya presencia no estaba favorecida en ninguna de las líneas fue la glutamina (Figura 59b).

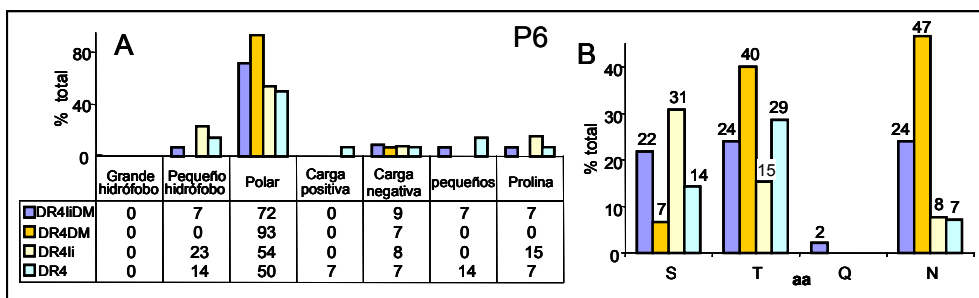


Figura 59: Grupos químicos de aa (A) y aa polares (B) situados en P6.

► En la posición P9 los aminoácidos más frecuentes detectados fueron los pequeños y los polares. Sin embargo, y a diferencia de los otros puntos de anclaje, la variedad de aminoácidos presentes era muy amplia (16 diferentes aminoácidos se encontraron en esta posición) lo que indicaba que este punto de anclaje es el de menor restricción del motivo (Figura 60). La presencia de prolina en esta posición parece estar modulada por la presencia de DM. Otro dato interesante en esta posición fue el aumento de los aminoácidos con carga positiva en ausencia de las chaperonas DM y li.

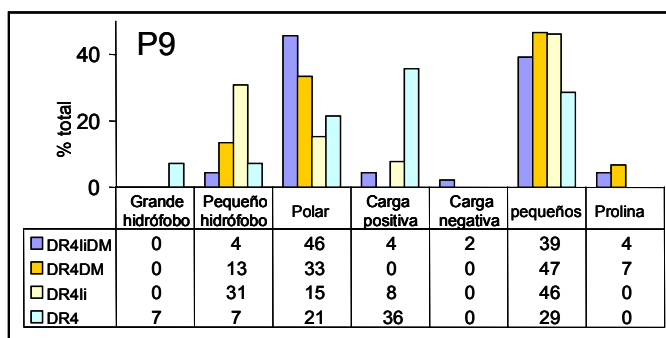


Figura 60: Grupos de aa situados en la posición P9.

El resto de posiciones del motivo de unión no presentaban restricciones posición-específicas aunque se pudo observar que ciertos aminoácidos son detectados más frecuentemente en algunas posiciones (Figura 61). En P2 hay una preferencia por los aminoácidos hidrófobos y pequeños, especialmente en las células DM. También destacar la abundancia de prolina en P5 en las células DR4li.

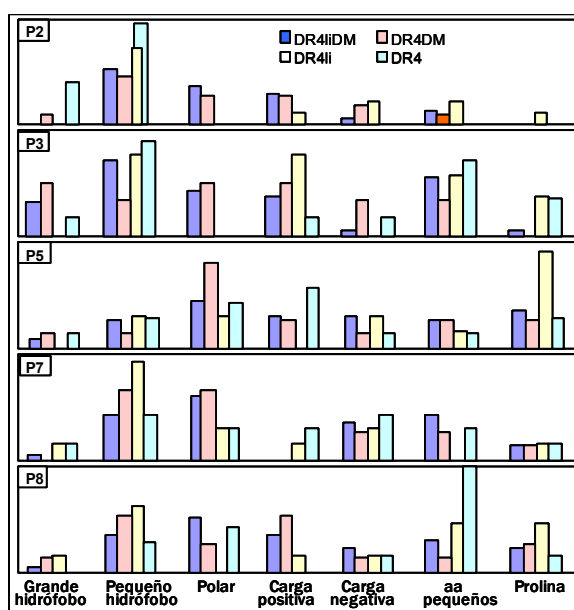


Figura 61: Grupos de aa situados en las posiciones P2, P3, P6, P7 y P8.

En conclusión, podemos decir que la interacción de DR con la chaperona HLA-DM modula claramente el tipo de secuencias aminoacídicas que se unen a la molécula de MHCII, regulando por tanto el tipo de péptidos presentados en la superficie de las células epiteliales. La función editora de DM queda claramente demostrada en estos resultados.

2.7.2. Estabilidad de la unión MHCII-péptido

Para determinar diferencias en la estabilidad de los complejos MHCII-péptido se compararon los índices de afinidad teórica promedio de cada tipo celular (Tabla XXX). Las líneas DR4 y DR4li mostraron diferencias significativas respecto a DR4liDM, siendo DR4 también diferente de DR4DM (tabla XXXI). Estos datos nos confirman que la coexpresión de DM era suficiente para generar péptidos estables en la superficie celular, mientras que los péptidos que se presentan en ausencia de esta chaperona son poco estables (a excepción del péptido CLIP en DR4li).

Tabla XXX: Valores de índice de afinidad promedio de los repertorios peptídicos asociados a DR4.

Células	IA* promedio	SD	Máximo	Mínimo
DR4liDM	3.2	1.8	6.5	-4.0
DR4DM	3.0	2.2	6.0	-4.2
DR4li	1.9	2.4	6.0	-3.0
DR4	1.0	1.7	4.6	-1.7

(*) Índice de afinidad teórico

Tabla XXXI: Comparación de los valores de índice de afinidad teórica promedio de los repertorios.

Relación	valor p	¿diferentes?
DR4liDM/DR4DM	0.74372	no
DR4liDM/DR4li	0.04243	Si
DR4liDM/DR4	0.00012	Si
DR4DM/DR4li	0.11144	No
DR4DM/DR4	0.00170	Si
DR4li/DR4	0.24895	No

2.7.3. Localización de las proteínas origen

Las proteínas de superficie fueron las más frecuentes en las dos líneas DM⁺ (42 y 29%) mostrando una vez más la homología que existe entre ambos repertorios. Por el contrario, en las células DM⁻/li⁻ la mayoría de las proteínas eran citoplasmáticas (76%) bajando la proporción de proteínas de superficie al 5% y no detectándose péptidos procedentes de proteínas exógenas, del RE ni residentes en la vía endocítica.

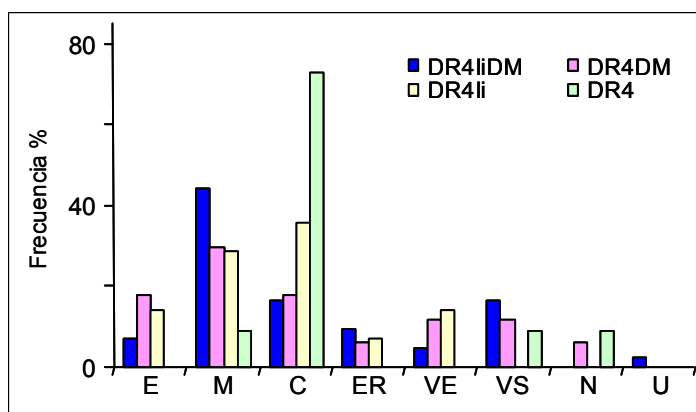


Figura 62: Distribución de las proteínas origen en cada una de las células (E: exógena; M: superficie celular; C: citosol. ER: retículo endoplasmático; VE: vesículas endocíticas; VS: vesículas secretoras. N: núcleo. U: ubicua).

Estas características sugieren, como ya se indicó anteriormente, la existencia de vías de procesamiento en las que no intervendrían HLA-DM ni li y que implicarían la presentación mayoritaria en membrana de complejos de baja estabilidad del MHCII con péptidos N- o C-terminales derivados de proteínas del citoplasmáticas. La maquinaria y las moléculas implicadas en este proceso se desconocen, si bien la generación de péptidos por la acción del proteasoma o de otras proteasas citosólicas y su posterior translocación al retículo endoplasmático serían una posible vía alternativa. La ausencia de la cadena invariante, que protege y dirige la molécula de MHCII hacia el RE, posibilitaría la unión de péptidos de baja afinidad en el retículo y la ausencia de HLA-DM impediría el intercambio de éstos por péptidos de alta estabilidad.

En las células DM/li⁺ además de la cadena invariante, se detectaron porcentajes altos de proteínas de superficie y de citoplasma. Esta línea es la que mostró una mayor proporción de proteínas procedentes de la vía endocítica. Los péptidos de estas proteínas presentados en la superficie por la molécula de MHCII podrían haberse unido en el RE al surco de unión de moléculas no protegidas todavía por li o bien, ya en los endosomas, por un proceso de intercambio de CLIP independiente de DM. Esta última posibilidad explicaría también la presentación de los péptidos derivados de proteínas exógenas, de superficie o de las situadas en la vía endocítica.

Todas las proteínas residentes en las vesículas de la vía secretora detectadas eran proteínas específicas de células endocrinas y la mayoría eran comunes a las distintas líneas. Esto es importante porque en los procesos autoinmunes órgano-específicos muchos de los autoantígenos conocidos son moléculas residentes en estas vesículas.

IV.1.4

IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS ASOCIADOS A LAS MOLÉCULAS DE HLA-DR EN
TIROIDES HUMANOS AUTOINMUNES

Hasta ahora, la mayor parte de estudios de caracterización de ligandos asociados a MHCII se han realizado utilizando líneas celulares en cultivo. Este tipo de análisis en tejido humano *ex vivo* conlleva importantes dificultades derivadas de la escasez de tejido disponible, de la baja expresión de las moléculas de MHCII y de la complejidad de la matriz. El primer trabajo de identificación de péptidos de clase II en material *ex vivo* se realizó en bazo, partiendo de 50 gramos de tejido y reportando un total de 17 ligandos peptídicos identificados (Gordon 1995). Recientemente también se han identificado péptidos de clase II en estudios relacionados con enfermedades inflamatorias del intestino (Oshitani 2003) partiendo en este caso de tejido intestinal procedente de 22 pacientes e identificando un total de 55 ligandos peptídicos (de uno a doce péptidos por muestra).

Hasta ahora no se ha reportado ningún péptido de MHCII presentado *in vivo* por moléculas de MHCII en un órgano diana de una enfermedad autoinmune órgano-específica. En este trabajo hemos establecido el sistema que permite la identificación de péptidos asociados a clase II en tejido *ex vivo* procedente de enfermos con autoinmunidad tiroidea. Este estudio se está llevando a cabo en colaboración con Laia Muixí, del grupo de D. Jaraquemada.

1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL TEJIDO TIROIDEO

A diferencia de los dos ejemplos comentados más arriba donde la obtención de tejido quirúrgico no era un factor limitante, uno de los principales problemas inherente a este análisis fue la escasa cantidad de tejido disponible. El material de partida para este estudio fue tejido tiroideo procedente de pacientes con la enfermedad de Graves-Basedow. Se descartaron aquellas muestras que no mostraban expresión de moléculas de MHCII. Las muestras se tiparon para determinar las variantes alélicas de HLA-DR expresadas en cada caso. Finalmente se seleccionaron 5 muestras, dos de las cuales eran homocigotas para HLA-DR. Sus características se describen en la tabla XXXII. Dada la cantidad disponible de cada tiroides se decidió utilizar los tiroides TB190, 269, 270 y 237 para la puesta a punto de la técnica. El tiroides TB448 se procesó el último para caracterizar el máximo número de ligandos peptídicos posibles utilizando el protocolo ya optimizado.

Tabla XXXII: Tejido utilizado para la identificación de péptidos de clase II.

ID tiroides	Expresión de clase II	Fenotipo para clase II	Cantidad (g)
TB-190	++	DRB1_1101, DRB1_1104, DQB1_0301	< 1
TB-269	++	DRB1_1101, DRB1_1104, DQB1_0301	2
TB-270	+++	DRB1_0701, DQB1_0202, DQB1_0303	3.3
TB-237	+	DRB1_1501, DQB1_0602	1.1
TB-448	++	DRB1_0407, DRB1_1501, DQB1_0301, 0602	8

2. PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS NATURALES ASOCIADOS A MOLÉCULAS HLA DE CLASE II EN TEJIDO TIROIDEO AUTOINMUNE HUMANO

2.1. PURIFICACIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS ASOCIADOS A DR.

En trabajos previos en los que se estudió la presentación de clase II en tiroides autoinmunes, el tejido se disgregaba mediante digestión con tripsina, colagenasa y DNAsa y las células en suspensión obtenidas se cultivaban durante 18 horas para eliminar las células no adherentes (Catalfamo 1997; Roura-Mir 1997; Sospedra 1995). Aunque la viabilidad celular durante este proceso era superior al 85%, el número de células totales no era suficiente para abordar el análisis de los ligandos presentados por MHCII. Además, durante el proceso de cultivo las células se desdiferenciaban y la expresión de MHCII se reducía, lo que dificultaba todavía más el análisis. Con objeto de superar estas limitaciones, se decidió purificar los complejos MHC-péptido directamente a partir de bloques congelados de tejido. El inconveniente de esta aproximación es que no da información sobre las células que están presentando los diferentes péptidos en el tiroides. Aunque el tirocito es el tipo celular más abundante que expresa MHCII en tiroides autoinmune, los péptidos presentados podrían provenir también de células B, macrófagos, células dendríticas o células T activadas. A pesar de ello, y dado que todas estas células pueden estar implicadas en la generación y/o mantenimiento de la respuesta inmune, la caracterización de cualquiera de los ligandos presentados puede proveer de información importante sobre el origen de la respuesta.

El protocolo que se utilizó para la purificación y el fraccionamiento de los péptidos fue similar al descrito para el análisis en las líneas celulares en cultivo (apartados IV.2-3) con algunas modificaciones (Figura 63).

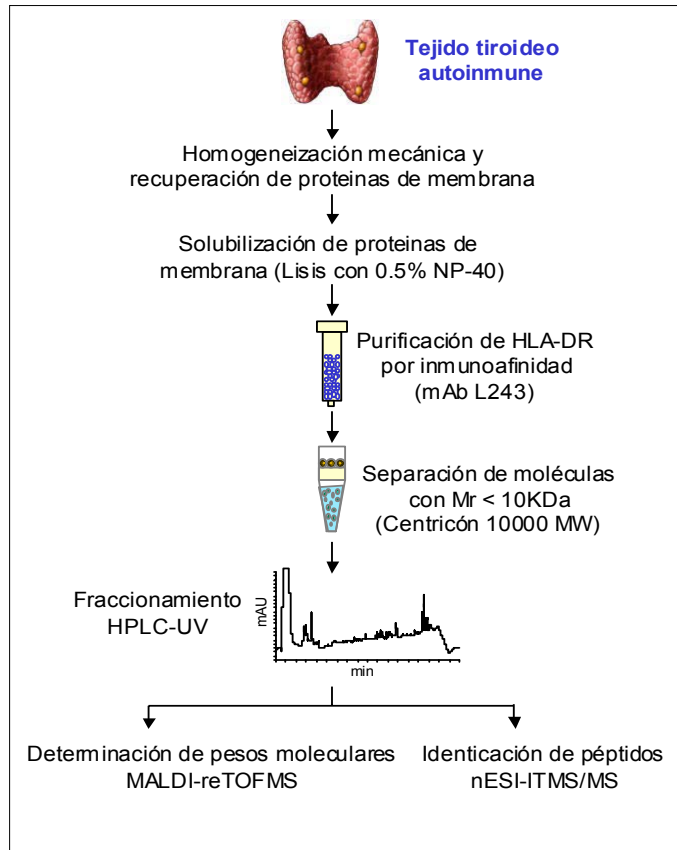


Figura 63: Protocolo de purificación e identificación de péptidos asociados a HLA-DR en tejido tiroideo.

Debido a la baja expresión de moléculas de MHCII en el tejido, la eliminación de interferencias en la purificación fue fundamental para alcanzar el nivel de sensibilidad necesario. Aprovechando que los complejos MHC-péptido se encuentran en la membrana, se llevó a cabo una purificación previa de esta fracción separándola de otras moléculas solubles de la célula. Para ello, el tejido se homogeneizó en un tampón sin detergente, las membranas se recuperaron por centrifugación y, posteriormente, se solubilizaron en presencia de 1% NP-40. Para comprobar que no se perdían moléculas de MHCII en el sobrenadante se realizó un ensayo de western-blot contra HLA-DR α con este material, no detectándose ninguna banda (datos no mostrados).

Para la inmunopurificación se utilizaron columnas de un tamaño más pequeño que en el caso de las líneas celulares. Teniendo en cuenta el material de partida, se esperaba obtener un número de complejos MHCII-péptido muy inferior al detectado en las líneas celulares, por lo que el volumen de las columnas se redujo 5-10 veces. Se utilizaron columnas de 1 ml con un total de 5 mg de anticuerpo inmovilizado. De esta forma se disminuyó la superficie de contacto donde los complejos podrían adsorberse y se mejoró el proceso de lavado sin aumentar el tiempo en el

que los péptidos estaban en la columna. El eluido de la columna de afinidad se filtró y los extractos peptídicos se fraccionaron mediante HPLC siguiendo el mismo protocolo que en las líneas celulares (Figura 64). Se recogieron fracciones en todas las muestra desde el minuto 20 hasta el 100. En los tiroides utilizados para la optimización del método se recogieron fracciones de 2, 3 y 5 minutos (TB190, TB237 y TB270 y TB269 respectivamente). De la misma forma que en las líneas celulares, en el tiroides TB448 se recogieron 80 fracciones, una cada minuto.

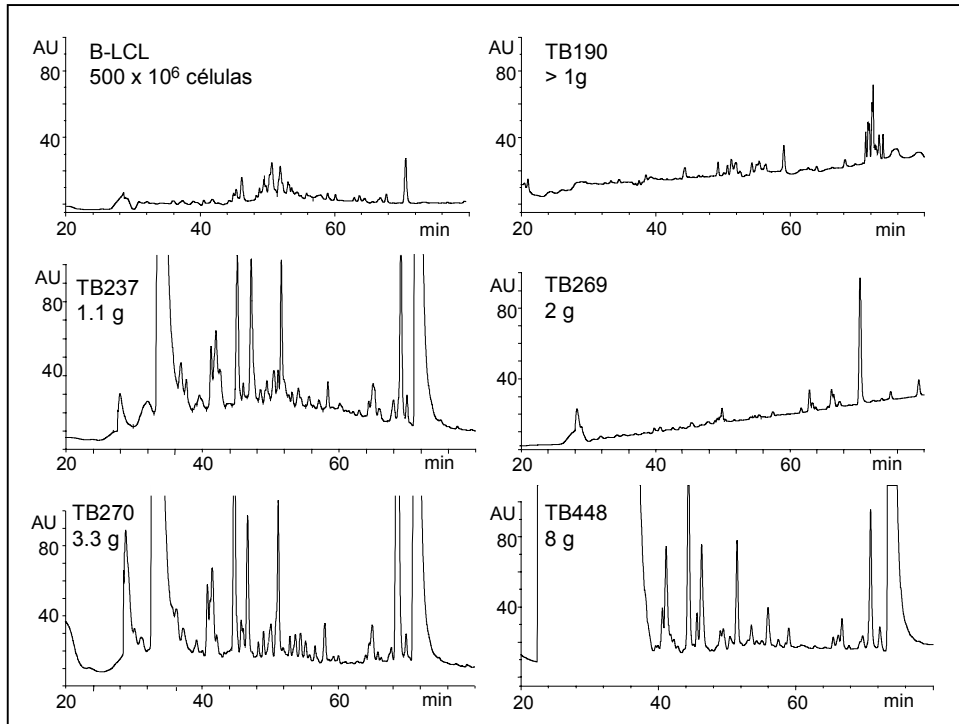


Figura 64: Perfiles de HPLC-UV de las muestras de tiroides TB190, TB237, TB269, TB270 y TB448 y de la línea celular B-LCL utilizada como control (en este caso se partió de únicamente 5×10^8 células, una cantidad 6 veces inferior a la utilizada en los experimentos de caracterización de los repertorios peptídicos en las líneas celulares).

Aunque en todos los cromatogramas se observaron señales, su altura sugería que se trataba de interferencias procedentes de la matriz o del propio proceso de aislamiento. Tal como se ilustra en figura 65, estas señales equivaldrían a cantidades de péptido del orden del nanomol, mucho mas altas que las esperadas para los componentes de los repertorios.

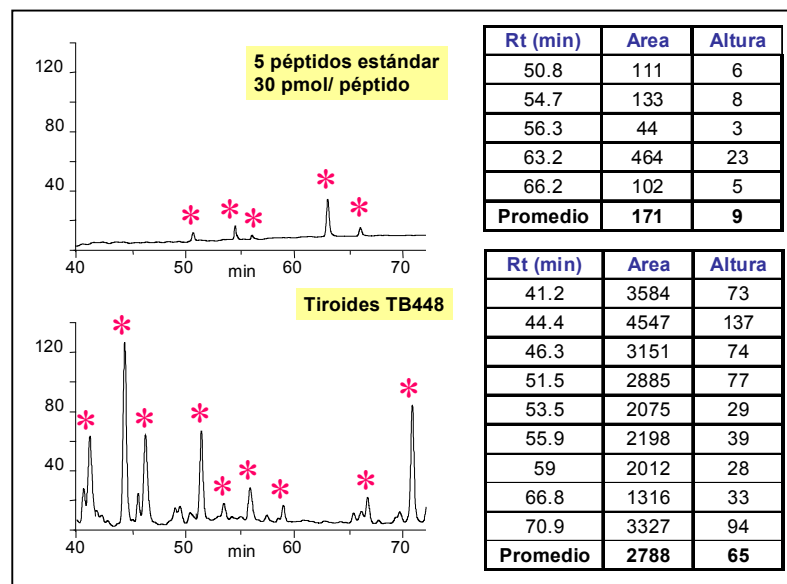


Figura 65: Cromatogramas de HPLC-UV de (A) una mezcla de 5 péptidos estándar (30 pmol) y (B) del extracto obtenido por cromatografía de inmunoafinidad del tiroides TB448. Los 30 pmoles de péptido estándar generaron picos con un área promedio de 171 mientras que el grupo de picos más intenso en los cromatogramas obtenidos a partir de los tiroides poseen un área promedio 16 veces mayor.

Posteriores análisis de estas fracciones por espectrometría de masas en tándem revelaron que los picos mayoritarios que eluían a partir del minuto 70 correspondían con restos del detergente utilizado en la purificación (NP-40). Estas señales también se observaban en los cromatogramas obtenidos en las líneas celulares, si bien la mayor cantidad de péptidos en el extracto hacía que no fueran tan evidentes en el perfil de UV. Además, en los tiroides también se detectaron iones debidos a NP-40 en fracciones recogidas a lo largo de todo el cromatograma. La abundancia de estos iones era muy baja, pero en ausencia de otros compuestos, se podían detectar.

2.2. DISTRIBUCIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LOS LIGANDOS ASOCIADOS A DR.

Las fracciones de HPLC se analizaron mediante MALDI-TOF para determinar el peso molecular de los péptidos aislados (Tabla XXXIII).

Tabla XXXIII: Características de los repertorios peptídicos asociados a la molécula de MHCII de los tiroides TB-269, -237, -270, -190 y -448 obtenidas a partir del peso molecular de las señales detectadas mediante análisis por MALDI-TOF y posterior filtrado de los datos.

	TB-269	TB-237	TB-270	TB-190	TB-448
gr tejido	2	1.1	3.3	<1	8
nsd	22	14	62	78	802
Masa promedio	1663	1184	1741	1466	1852
n° aa promedio	14	10	15	12	16
Desviación estándar	161	359	368	458	529
Rango de masas	1348-2034	701-1634	613-2409	782-2601	614.2-5964
Coeff.asimetría	-0.3	-0.2	-1.3	0.4	4.7
Curtosis	0.7	-1.6	2.2	-0.6	33.4

A diferencia de las líneas celulares estudiadas hasta ahora, los repertorios de todos los tiroides, excepto el del TB448, mostraron una distribución normal de peso molecular. Este hecho posiblemente sea debido a que en las muestras en las que se han contabilizado muy pocas señales existe un sesgo muy importante ya que solo se han detectado los péptidos más abundantes. Por el contrario, en el TB448 el número de señales fue suficientemente alto como para mostrar las características típicas de los extractos peptídicos descritos en el apartado IV.2-3 (Figura 66).

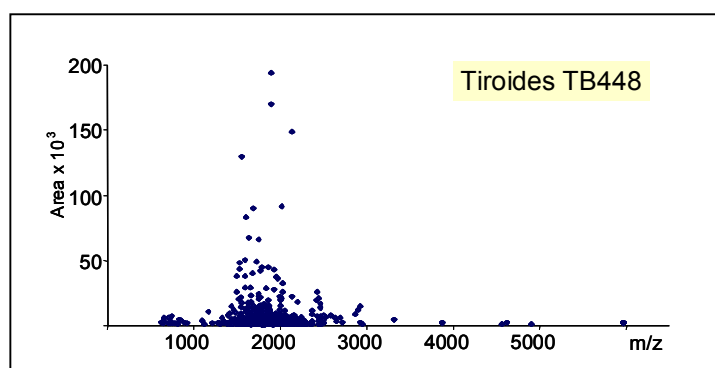


Figura 66: Gráfica de distribución (valores de m/z frente a área) para el tiroides TB-448. Este repertorio muestra un perfil similar al obtenido en las líneas celulares.

2.3. IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS ASOCIADOS A MOLÉCULAS DE MHCII MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

A partir del análisis de todas las fracciones en las que se observaron señales en los espectros de MALDI-TOF se secuenciaron un total de 28 péptidos asociados a MHCII que provenían de 16 proteínas distintas (Tabla XXXIV). En total, se detectaron 4 grupos de secuencias anidadas compuestos por 2, 3 o 4 secuencias por grupo. Todos los péptidos que formaban estos grupos derivaban de proteínas exógenas o de membrana muy abundantes. El resto de péptidos se identificaron como secuencias únicas. Esta es la primera vez que se reporta la identificación de péptidos asociados a MHCII provenientes de tejido autoinmune humano.

En los experimentos de optimización del método se identificaron 4 péptidos en la muestra de 1 gr (TB190), uno en la de 1.1 gr (TB237), tres en la de 2 gr (TB269) y cuatro en la de 3.3 gr (TB270), todos ellos utilizando nESI-ITMS/MS. En el tiroides TB448 (8 gr) se identificaron 16 secuencias, 12 por nESI-ITMS/MS, 3 por MALDI-TOF-TOF y 1 mediante ambas técnicas. En conjunto, se identificaron 4 péptidos mediante MALDI-TOF-TOF y 25 mediante nESI-ITMS/MS. Únicamente una de las secuencias caracterizadas (péptido 1006-1020 del perlecan) se identificó mediante las dos técnicas, mostrando la complementariedad de ambas en el análisis de estas muestras.

Aunque pudieron identificarse péptidos de clase II a partir de únicamente 1 gramo de material de partida, la mayoría de las señales detectadas por MALDI-TOF no pudieron secuenciarse debido a su baja intensidad (Figura 67).

El peso molecular promedio de los péptidos identificados fue de 1711, siendo el de menor tamaño una secuencia de 12 aa y el de mayor una de 18. La mayor parte de los péptidos tiene entre 15 y 16 aa. Estos valores se compararon con los obtenidos en los análisis de los repertorios peptídicos asociados a MHCII en las células epiteliales transfectadas con diferentes combinaciones de DR, Ii y HLA-DM (apartado IV.3) y se observó que no mostraban diferencias significativas con los obtenidos en los repertorios peptídicos asociados a las células DM⁻ ($p=0.1651$ y 0.3742 para DR4Ii y DR4 respectivamente) pero si que eran diferentes a los asociados a las células DM⁺ ($p=0.0006$ y 0.0007 para DR4IiDM y DR4DM respectivamente). Estos datos podrían estar en concordancia con los bajos niveles de expresión de la molécula HLA-DM descritos en estos tiroides (Catalfamo 1997).

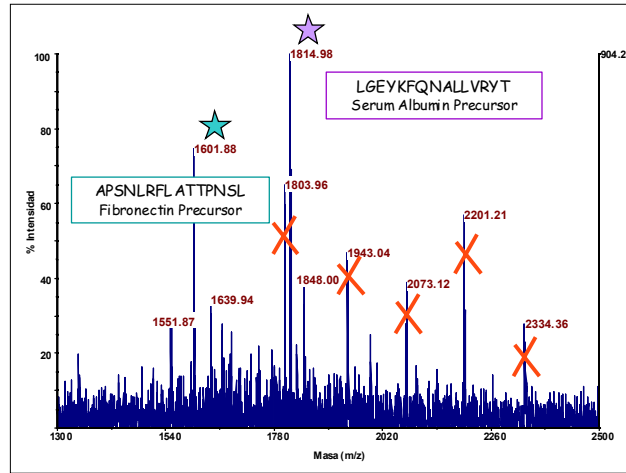


Figura 67: Espectro de MALDI-TOF de una fracción del tiroides TB270. Las señales que corresponden con péptidos secuenciados se muestran marcadas con una estrella y las que no se han identificado tachadas con una cruz roja.

Todas las secuencias cumplían el motivo de unión descrito para los péptidos de clase II. Para cada una de ellas se calculó el índice de afinidad teórico utilizando el software ProPred. Para comparar los diferentes alelos se utilizó el porcentaje del valor del índice de la secuencia respecto al índice de afinidad teórica máximo para este alelo. Los valores calculados se encontraban entre 5 y 58%. En los péptidos del tiroides TB448 únicamente se calculó el porcentaje para el alelo DRB1_1501 ya que todavía no existe la matriz para el alelo DRB1_0407 aunque sí se ha descrito su motivo de unión (aunque únicamente a partir de 7 secuencias). (Figura 68). Aunque el cálculo de la afinidad por DRB1_1501 se ha aplicado a todas las secuencias identificadas, es posible que algunos de los péptidos que contienen los aminoácidos requeridos por el motivo de unión de DRB1_0407 en el ancla P1 sean presentados preferentemente por esta molécula y den valores de afinidad bajos en el cálculo relativo a DRB1_1501. Los datos obtenidos a este respecto hasta la presentación de esta tesis son por tanto limitados. En posteriores ensayos de unión se pretende analizar la afinidad de cada uno de estos ligandos por cada uno de los alelos para determinar a cual de ellos podría estar unido con mayor afinidad. Actualmente se están cultivando células B-LCL homocigotas para este alelo con objeto de analizar el repertorio peptídico y poder establecer una matriz que nos permita cuantificar estos valores.

P1	P4	P6	P9
F, Y, W	A, V, K	N, T, D, S	Q, N

Figura 68: Motivo de unión publicado para el alelo DRB1_0407 (Davenport 1997)

Tabla XXXIV: Péptidos asociados a MHCII identificados a partir de tejido tiroideo de pacientes afectados con la enfermedad de Graves-Basedow. Para cada tejido se indica el fenotipo, los péptidos caracterizados, las proteínas origen caracterizadas y su localización (L) y el índice de afinidad teórico expresado en porcentaje (%IA).

Muestra	Fenotipo	Técnica	Motivo de unión	Mr (Da)	n° aa	Proteína origen (aa ₁ -aa _n)	Acc. DB	L.*	%IA			
		NESI TOFTOF	PPPPPPPP 1 2 3 4 5 6 7 8 9									
TB270 3.31g	DRB1_0701	X	A P S N L R F L A T T P N S L	1600.9	15	Fibronectina (1905-1919)	P02751	ME	57.8			
		X	L G E Y K F Q N A L L V R Y T	1814.0	15	Albúmina sérica (422-436)	P02768	E CL	39.7			
		X	Q L G E Y K F Q N A L L V R Y T	1925.1	16	" (421-436)						
		X	Q L G E Y K F Q N A L L V R Y T K	2053.2	17	" (421-437)						
TB190 1g	DRB1_1101 DRB1_1104	X	T P T L V E V S R N L G K V G	1568.8	17	Albúmina sérica (444-458)	P02768	E CL	6 *			
		X	S T P T L V E V S R N L G K V G	1655.9	16	" (443-458)						
		X	T P T L V E V S R N L G K V G S	1655.9	16	" (444-459)						
		X	V S T P T L V E V S R N L G K V G	1755.1	17	" (442-458)						
TB269 2g	DRB1_1101 DRB1_1104	X	S T P T L V E V S R N L G K V G	1655.9	16	Albúmina sérica (443-458)	P02768	E CL	6*			
		X	T P T L V E V S R N L G K V G S	1655.9	16	" (444-459)						
		X	T P T L V E V S R N L G K V G	1569.6	15	" (444-458)						
TB237 1.1g	DRB1_1501	X	D V G V Y R A V T P Q G R P D	1628.9	15	HLA-II, DQB1*0602 β-ch.(75-89)	P03992	M	27.6			
		X	D I P E L V N M G Q W K I R A	1768.9	15	Complement C3 (194-208)	P01024	E	41.8			
		x	R E I F N M A R D Q R S R	1678.0	12	Apolipoprotein B-100 (427-439)	P04114	E	27.6			
		X	R L P I I D V A P L D V G A P D	1659.9	16	Colágeno α1 (I) (1445-1461)	P02452	ME	20.4			
		X	A A G L L S T Y R A F L S S H	1592.8	15	Colágeno α1 (XV) (1252-1266)	P39059	ME	33.7			
		X	A G L L S T Y R A F L S S H	1521.8	14	" (1251-1266)						
		TB448 8g	DRB1_0407 DRB1_1501	X	R P K D Y E V D A T L K S L N N	1862.0	16	Colágeno α2 (I) propéptido C-terminal (1436-1451)	P08123	ME	7.8	
				x	x	G G E L R F T V T Q R S Q P G	1631.8	15	Perlecan (1006-1020)	P98160	ME	21.0
				x		I R A S Y A Q Q P A E S R V S G	1718.9	16	Perlecan (1089-1104)	P98160	ME	5.1
				x		D V G V Y R A V T P Q G R P D	1628.9	15	HLA-II, DQB1*0602 β-ch.(75-89)	P03992	M	27.6

Sigue →

Tabla XXXIV:

Muestra	Fenotipo	Técnica	Motivo de unión	Mr (Da)	n° aa	Proteína origen (aa ₁ -aa _n)	Acc. DB	L.*	%IA
		nESI TOFTOF	P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9						
	x		DVGE γ RAVTWLGRPD	1676.8	15	HLA DRB1*4 (72-86)	P13760	M	19.4
	x		DVPK γ WISIMTERSVP H	1894.0	16	Annexin A2 (209-224)	P07355	M	18.4
	x		N γ IFSFYLSRDPDAQPG	1825.9	16	Catepsina D (227-241)	P07339	VE	20.4
	x		YDHN γ VKA γ INA IQK	1659.9	14	Catepsina C (170-183)	P53634	VE	15.3
	X		CPTPCQLQSEQAF LRTVQ	2030.0	18	Tiroglobulina (726-743)	P01266	VS/CL	10.2
	X		EDFRDGLKLMLL	1448.8	12	Alfa-actinina (57-68)	P12814	C	20.4
	X		KPGQF γ RSVDPDSPA	1613.8	15	Intercambiador Na/H (174-188)	O14745	M	6.1

(*) Localización: C: Citosol, E: Exógena, ME: Matriz extracelular, CL: Coloide tiroideo, ER:Reticulo endoplasmático, M: Membrana celular, VE: Vesículas endocíticas, VS: Vesículas secretoras.

Si bien todos los péptidos identificados cumplían con las características de tamaño y secuencia de los péptidos de clase II, se realizó un experimento control para evaluar si alguno de ellos podría provenir de una contaminación debida a la degradación de las proteínas en el extracto durante el tratamiento del material. La contaminación más probable sería debida a la degradación de las proteínas purificadas junto a los péptidos en la cromatografía de inmunoafinidad, ya que el extracto que se obtiene de dicha purificación (que contiene las proteínas y los péptidos aislados) se encuentra en un medio ácido y se somete a diversas manipulaciones para la reducción del volumen antes de separar las proteínas de los péptidos mediante centrifugación a través de la membrana de 10 kDa. Con objeto de caracterizar las proteínas presentes en estos extractos el material retenido en la parte superior de estas membranas se digirió con tripsina y los péptidos generados se secuenciaron mediante capLC-MS/MS identificándose en las bases de datos las correspondientes proteínas. Los datos detallados de este experimento se encuentran descritos en el **anexo II**. Se observó que el único péptido que podría provenir de una contaminación es la secuencia 72-86 de la molécula HLA DRB1_4 ya que esta proteína se encontró en el retenido del tiroides TB448 y podría haberse degradado, dando lugar a ese péptido. Ninguna de las otras proteínas origen caracterizadas se ha detectado en el retenido, confirmando que los péptidos purificados eran ligandos asociados a la molécula de MHCII.

2.3.1. Tiroglobulina

Sin duda, el péptido más interesante de todos los identificados es el epítipo 726-743 de la tiroglobulina. La tiroglobulina representa el 75% del contenido proteico en la glándula tiroidea y ha sido descrita como uno de los autoantígenos más importantes en la autoinmunidad tiroidea (Carayanniotis 1997; Rose 2000) aunque nunca hasta ahora se había identificado directamente ningún péptido presentado por la molécula de MHCII derivado de esta proteína. Este péptido no pudo identificarse directamente a partir del espectro de fragmentación y el uso de buscadores debido a un puente disulfuro entre dos cisteínas en su secuencia. Este enlace hacía que los fragmentos que contenían el puente disulfuro aparecieran con valores de m/z dos unidades inferiores a los esperables según las bases de datos de forma que los buscadores no lo lograron identificar y fue necesaria la identificación a partir de *tags* obtenidos de forma manual. Esta identificación se confirmó mediante la comparación del espectro de secuencia obtenido a partir de la fracción de HPLC con el de un estándar sintético (Figura 69).

Aunque no hemos podido determinar si el péptido estaba presentado en la forma oxidada (podría oxidarse posteriormente a la extracción del péptido), no se puede descartar esta posibilidad. En este caso, dado que las dos cisteínas se encuentran en un extremo fuera del motivo de unión, su estado de oxidación podría ser no relevante para la interacción.

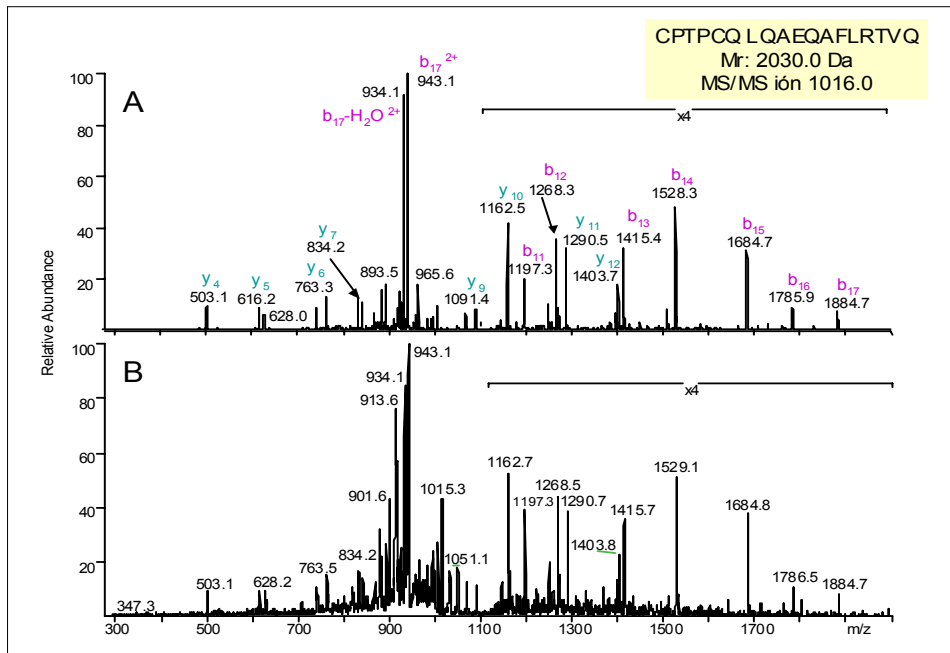


Figura 69: Espectros de MS/MS del péptido 726-743 de la tiroglobulina obtenidos a partir del péptido sintético (A) y a partir del extracto peptídico del tiroides TB448 (B). El perfil de fragmentación es prácticamente idéntico excepto por diversas señales en la zona de m/z 850-1000 de la muestra de tiroides que correspondían con fragmentos derivados de iones monocargados con el mismo valor de m/z que el ión precursor doblemente cargado del péptido, y que provendrían de otros péptidos o contaminantes de la muestra.

2.3.2. Albúmina y Perlecan

La albúmina es una proteína ubicua que se encuentra en el coloide (Anderberg, 1981; Baggio, 1996), siendo después de la tiroglobulina la proteína más abundante del tiroides. Siete péptidos derivados de esta proteína fueron identificados en 3 de las muestras analizadas, observándose una relación entre éstos y el HLA del tiroides del cual provenían. Los tiroides TB190 y TB269 tenían el mismo fenotipo HLA y ambos presentaban péptidos procedentes de la albúmina que contenían el mismo epítipo (péptidos 444-459, 443-459, 444-460 y 442-459 en el TB190 y 443-459 y 444-460 en el TB269). Sin embargo, el tiroides TB270, que tenía un HLA distinto, presentaba péptidos de esta misma proteína pero con un epítipo diferente (422-437, 421-437 y 421-438).

Es de destacar que ambos epítipos se encuentran situados en zonas contiguas del dominio 3 de la albúmina (Figura 70) lo que sugiere una proteólisis inicial de la albúmina que generaría un fragmento de tamaño grande que por su alta abundancia o por ventajas específicas para su transporte a lo largo de la vía sería el que interaccionaría preferentemente con MHC. El polipeptido completo o fragmentos del mismo podrían unirse a la molécula de MHCII por el epítipo más afín para cada alelo y, posteriormente, las secuencias serían recortadas hasta generar los péptidos identificados. Este fenómeno también se ha detectado en una de las

proteínas caracterizadas a partir del tiroides TB448 donde se han identificado dos epítomos diferentes de la proteína perlecan (*heparan sulfate proteoglycan*) situados ambos en zonas muy cercanas en la secuencia (epítomos 1006-1020 y 1089-1104). En este caso el tejido es heterocigoto para DR por lo que cada epítomo podría unirse preferentemente a un alelo distinto. El perlecan es el componente principal de las membranas basales e interacciona con otros componentes como la laminina, la prolargina y el colágeno de tipo IV. Los dos péptidos identificados se encuentran en el dominio laminina IV 2.

1	11	21	31	41	51	61	71
MKWVTFISLL	FLFSSAYSRG	VFRRDAHKSE	VAHRFKDLGE	ENFKALVLIA	FAQYLQQCFP	EDHVKLVNEV	TEFAKTCVAD
81	91	101	111	121	131	141	151
ESAEKCDKSL	HTLFGDKLCT	VATLRETYGE	MADCCAKQEP	ERNECFLOHK	DDNPNLPRLV	RPEVDMVCTA	PHDNEETFLK
161	171	181	191	201	211	221	231
KYLVEIARRH	PYFYAPELFF	FAKRYKAAFT	ECCQAADKAA	CLLPKLDELRL	DEGKASSAKQ	RLKCAQLQKF	GERAFKAWAV
241	251	LGEYKFNALLVRYT	1	281	TPTLVEVSRNLGKVG		311
ARLSQRPFKA	EFAEVSKLVT	DLTKVHTECC	HGDLLECADD	RADLAKYICE	NQDSISSKLL	ECCEKPLLEK	SHCIAEVEND
321	331	341	351	361	371	STPTLVEVSRNLGKVG	
EMPADLPSLA	ADFVESKDVC	KNYAEAKDVF	LGMFLYEYAR	RHPDYSVLL	LRLAKTYETT	LEKCCAAADP	HECYAKVFDE
QLGEYKFNALLVRYT	421	431	441	451	461	471	
FKPLVEEPQN	LIKQNCLEFE	QLGEYKFNQA	LLVRYTKKVP	QVSTPTLVEV	SRNLGKVGSK	CCKHPEAKRM	PCAEDYLSVV
481	491	501	511	521	531	TPTLVEVSRNLGKVG	
LNQLCVLHEK	TPVSDRVTKC	CTESLVNRRP	CFSALEVDET	YVPEFNAET	FTFHADICTL	SEKERQIKKQ	TALVELVKHK
561	571	LGEYKFNALLVRYTK	591	601	VSTPTLVEVSRNLGKVG		
PKATKEQLKA	VMDDFAAFVE	KCKKADDKET	CFAEKGKLV	AASQAALGL			

Figura 70: Secuencia aminoacídica de la albúmina sérica humana, con los epítomos caracterizados a partir de los tiroides TB190, 260 y 270 marcados en rojo. Los péptidos identificados para cada epítomo se muestran encuadrados en naranja.

2.3.3. Moléculas de MHCII DQB1_0602 y DRB1_4

Se han identificado dos péptidos derivados de moléculas de MHCII: el péptido 72-86 de HLA DRB1_04 identificado en el tiroides TB448 y el péptido 75-89 de la molécula de MHCII DQB1_0602 identificado tanto en TB448 como en TB237. Este último péptido, una secuencia situada en la parte extracelular de la molécula de MHC, en el dominio beta-1, es probablemente presentado por el alelo DRB1_1501, que es común a los dos tiroides. Este dato estaría de acuerdo con lo observado en APCs homocigotas para este alelo donde se ha observado la presentación de la misma secuencia (Chicz 1993; Vogt 1994; Wucherpfenning 1994). Como en el caso del péptido de la tiroglobulina, la identificación se confirmó mediante el análisis del péptido sintético (Figura 71).

Los dos péptidos anteriores, junto con el 174-188 del intercambiador de Na/H y el 209-224 de la anexina son las cuatro secuencias identificadas que provienen de proteínas de membrana. El

péptido 209-224 de la anexina A2 ya había sido caracterizado en el repertorio peptídico asociado a DR4 en las células B-LCL (ver IV.1 y IV.2) y en la literatura unido a este mismo alelo (Friede, 1996; Halder, 1997; Hammer 1993; Hammer, 1995; Sette, 1993).

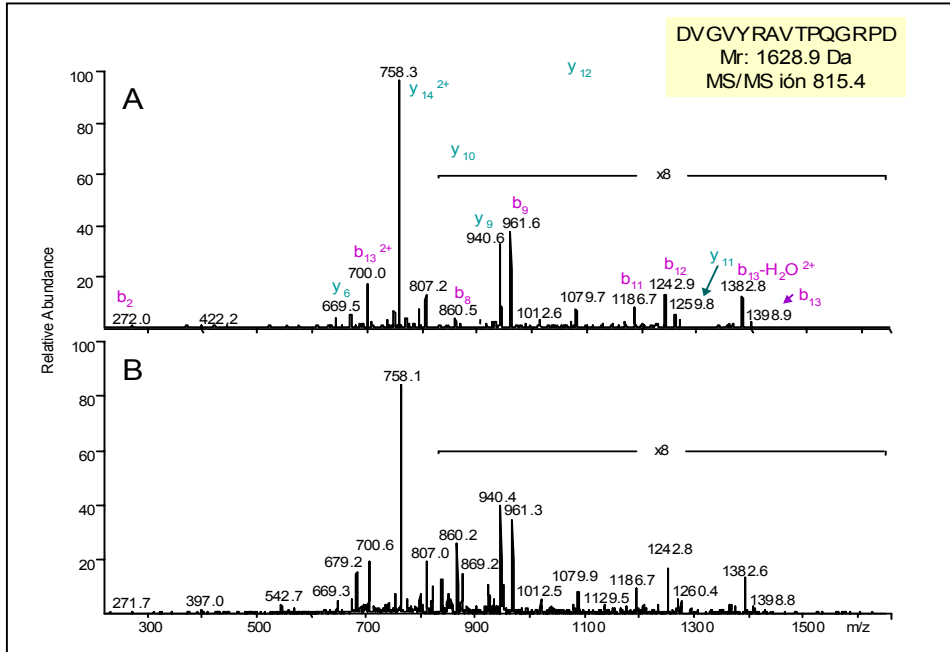


Figura 71: Espectros de MS/MS del péptido 75-89 de la molécula de MHCII DQB1*0602 obtenidos a partir del péptido sintético (A) y del extracto peptídico del tiroides TB448 (B).

2.3.4. Péptidos derivados de proteínas de la vía endocítica

Se han caracterizado dos péptidos derivados de dos proteasas residentes en la vía endocítica, las catepsinas C y D. En el repertorio asociado a DR4 caracterizado en las células B-LCL (I.V.1-2) ya se habían identificado varios péptidos de diferente longitud que contenían estas mismas secuencias (formarían un grupo de secuencias anidadas con los identificados en el tiroides). El péptido 170-184 de la catepsina C es uno de los ocho péptidos descritos por el grupo de Rammensee unido al alelo DRB1_0407 (Davenport 1997). En total, tres de las secuencias caracterizadas en el tiroides TB448 se han encontrado también en las APC homocigotas para DR4, indicando que existe similitud en los motivos de unión de los alelos DRB1_0401 y _0407.

2.3.5. Otros péptidos

Se han caracterizado cuatro péptidos derivados del colágeno. El colágeno es la proteína más abundante en mamíferos para la que se han descrito 25 formas diferentes. Los péptidos identificados provienen de colágeno de tipo I y de tipo XV, ambos de tipo fibrilar. El colágeno de

tipo I se encuentra formando las fibras de tendones, ligamentos y huesos mientras que el de tipo XV se expresa mayoritariamente predominantemente en órganos internos. Dos de los péptidos son secuencias anidadas mientras que los otros dos pertenecen a moléculas de colágeno diferentes y están situados en las colas del propéptido C-terminal.

Otra secuencia caracterizada procedente de una proteína residente principalmente en la matriz extracelular es el péptido 1905-1919 de la fibronectina. La fibronectina es una glicoproteína implicada en procesos de adhesión y migración celular de la cual se han descrito dos variantes. Esta proteína puede encontrarse como un dímero soluble en el plasma sanguíneo o como dímero o multímero insoluble en la membrana celular y en la matriz extracelular. Las células foliculares pueden producir y depositar selectivamente fibronectina insoluble (Di Matola 2000). También se ha identificado el péptido 194-208 del factor de complemento C3. Esta secuencia está situada en la zona N-terminal de la proteína. La única secuencia que proviene de una proteína citoplasmática es el péptido 57-68 de la α -actinina, epítipo también situado en la parte N-terminal.

2.3.2 Proteínas origen identificadas

La mayor parte de los péptidos identificados pertenecían a proteínas extracelulares procedentes del coloide y la matriz del tiroides y de la sangre (Figura 72). Se identificaron además cuatro proteínas de membrana y cuatro proteínas intracelulares, una citoplasmática, dos residente en la vía endocítica y la tiroglobulina, que además de encontrarse en el folículo del tiroides también se localiza en las vesículas secretoras de los tirocitos. Esta distribución es la esperable si se tiene en cuenta que los péptidos de origen extracelular fueron las señales mas intensas observadas en el estudio de las líneas celulares y que en el caso del tiroides, debido a las limitaciones en la sensibilidad del método probablemente solo se han detectado los iones mas abundantes. Además, debido a su especialización, los tirocitos tienen la vía endocítica muy desarrollada, favoreciendo la entrada de estas proteínas en la célula, tanto desde la matriz extracelular como desde el coloide.

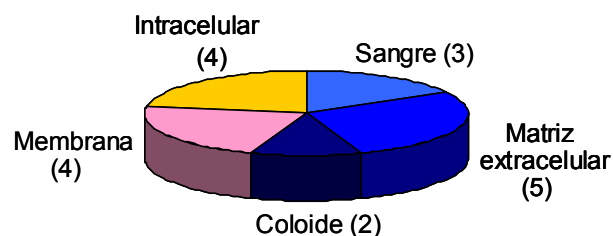


Figura 72: Localización celular de las proteínas origen identificadas a partir de tejido tiroideo.

IV.2

IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA VÍA DE PRESENTACIÓN DE CLASE II EN CÉLULAS EPITELIALES MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS

IV.2.1

ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS EPITELIALES
QUE EXPRESAN MOLÉCULAS DE MHCII Y LAS CHAPERONAS Ii Y HLA-DM

La expresión de la molécula de MHCII y de las chaperonas Ii y HLA-DM en células epiteliales está claramente relacionada con la patología autoinmune. Sin embargo, no existen estudios de como esta expresión afecta al perfil proteico global de las células epiteliales, una información que puede ser relevante para entender los cambios celulares que se pueden generar.

Con objeto de determinar el efecto de la expresión de las moléculas HLA-DR, Ii y HLA-DM sobre la expresión proteica global de las células RIN se realizó un análisis de expresión diferencial de proteínas, utilizando el sistema de marcaje y detección DIGE. Posteriormente, las proteínas cuya expresión variaba entre las dos células, aumentando o disminuyendo de manera significativa se identificaron mediante espectrometría de masas. El análisis de expresión proteica diferencial en geles bidimensionales ha sido aplicado con éxito en diversas ocasiones para determinar los cambios inducidos por la transfección. Toda y col. utilizaron este tipo de estudios para caracterizar el efecto de la inmortalización de una línea B-LCL. Se sabe que la infección de linfocitos B humanos con el virus de Epstein-Barr induce líneas celulares B-linfoblastoides linfoproliferativas. Sin embargo, solo una pequeña parte de las células resulta inmortalizada. Estos autores identifican la fosfoproteína *stathmin* como la proteína clave en este proceso, cuya eliminación es necesaria para que las células pueden proliferar de forma indefinida (Toda 2000). En otro estudio se mostró que la transfección del gen NAG7, un factor de función desconocida asociado con el carcinoma nasofaríngeo, en células HNE1 inducía la aparición o desaparición significativa de al menos 22 manchas en los geles. Las proteínas que se identificaron estaban implicadas en el ciclo celular, la regulación de la transcripción y en vías de señalización y apoptosis, sugiriendo que NAG7 podría ejercer sus funciones mediando en los niveles de estas proteínas (Tan 2002). Recientemente, se ha descrito también la identificación de proteínas de membrana diferencialmente expresadas en queratinocitos humanos transfectados con el gen E5 del papilomavirus humano. Más del 90% de los tumores cervicales humanos contienen secuencias de papilomavirus, no existiendo, sin embargo, información sobre la modulación de la expresión proteica en queratinocitos infectados o transfectados y su relación con los cambios que se observan en dichas células. En este trabajo se identificaron 17 proteínas de expresión diferencial, la mayoría relacionadas con el procesamiento, la regulación y la degradación de las moléculas de MHC. Estos resultados se correlacionaron con los datos clínicos en los se observaba la disminución de las moléculas de MHC en tejidos malignos o premalignos (Leykauf 2004).

Todos estos estudios se llevaron a cabo utilizando la tinción con plata para la detección de las manchas y el posterior análisis de imagen. La tinción de plata es un método de revelado con una sensibilidad en el orden del nanogramo, que presenta algunos inconvenientes a la hora de realizar el análisis de imagen. Los más importantes son la baja reproducibilidad gel a gel (CV > 20%) y la no linealidad de la tinción, lo que impide una correcta cuantificación a partir de la intensidad observada en diferentes manchas. Por estas razones, en el presente estudio se

decidió utilizar el sistema de revelado DIGE. El DIGE utiliza un marcaje fluorescente donde no hay pasos tan críticos como en el caso de la tinción con plata por lo que se obtienen imágenes más reproducibles. La separación de las dos muestras en estudio se realiza en el mismo gel, de forma que no son necesarios los largos análisis de los geles para el emparejamiento (*matching*) de las manchas que deben realizarse en el caso de la tinción con plata de parejas de geles. Además, la utilización de un patrón interno permite una normalización de los datos de expresión entre los diferentes geles y aumenta la reproducibilidad y precisión de las medidas.

Para el análisis de expresión diferencial de las líneas RIN y DR4liDM se realizaron un total de cuatro geles. Para cada uno de los geles se obtuvieron 3 imágenes de fluorescencia, una para cada una de las líneas en estudio (Figura 73) y otra correspondiente al patrón interno. En el análisis de estas imágenes se detectaron una media de 2052 manchas por gel, consiguiéndose emparejar una media de 1559 manchas (Tabla XXXV).

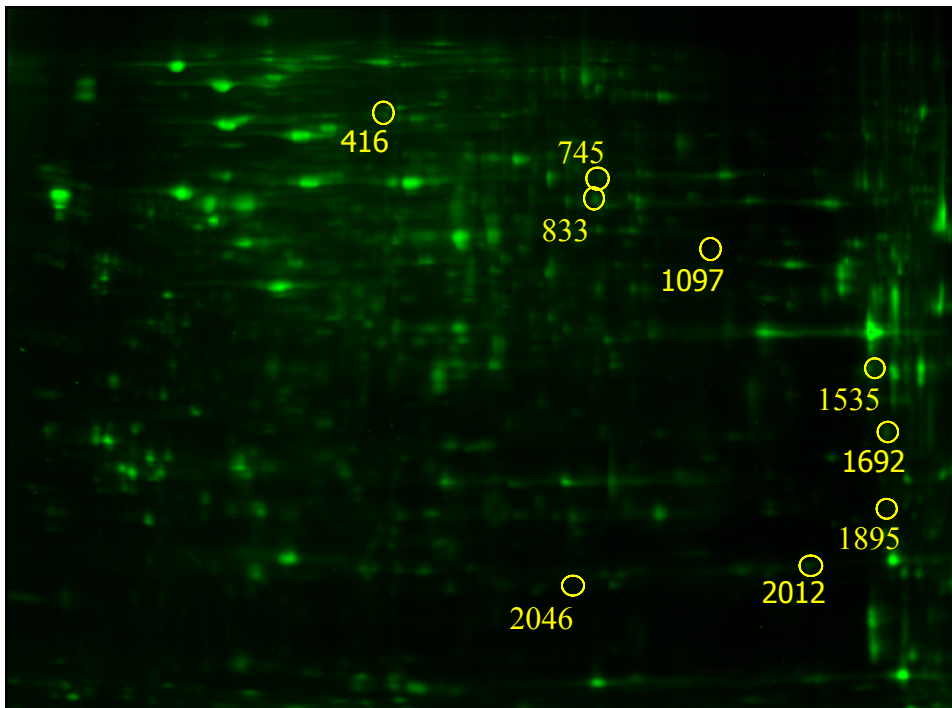
Tabla XXXV: Manchas detectadas y emparejadas para cada una de las imágenes obtenidas en el análisis de expresión diferencial de las células RIN y DR4liDM.

Línea Celular	Imagen	Marcaje	Manchas detectadas	Manchas emparejadas
DR4liDM	1	Cy5	2238	2238
DR4liDM	2	Cy5	1815	1311
DR4liDM	3	Cy3	2187	1383
DR4liDM	4	Cy3	1969	1304
RIN	1	Cy3	2238	2238
RIN	2	Cy3	1815	1311
RIN	3	Cy5	2187	1383
RIN	4	Cy5	1969	1304

La cuantificación de los cambios de expresión se realizó en modo automático teniéndose en cuenta únicamente aquellas manchas detectadas en todos los geles. Este análisis de expresión permitió detectar 9 manchas diferenciales que se confirmaron manualmente (Figura 74). Todos los cambios observados fueron pequeños (entre x2 y x5), no detectándose en ningún caso aparición/desaparición de manchas. Dos de las manchas diferenciales disminuían su expresión tras la transfección (manchas 416 y 745) y 7 se sobreexpresaban (833, 1097, 1535, 1692, 1895, 2012 y 2046).

Posteriormente, los geles se revelaron con tinción de plata con objeto de visualizar las manchas y poder recortarlas de forma manual. Las manchas diferenciales se digirieron con tripsina y los péptidos de digestión se extrajeron y se analizaron por MALDI-TOF para la identificación de las proteínas mediante PMF. Las proteínas que no pudieron ser identificadas por PMF se desalaron y los péptidos eluidos se analizaron mediante nESI-ITMS/MS. Se identificaron 8 de las 9 proteínas diferenciales (Tabla XXXVI).

A) RIN



B) RIN-DR4IiDM

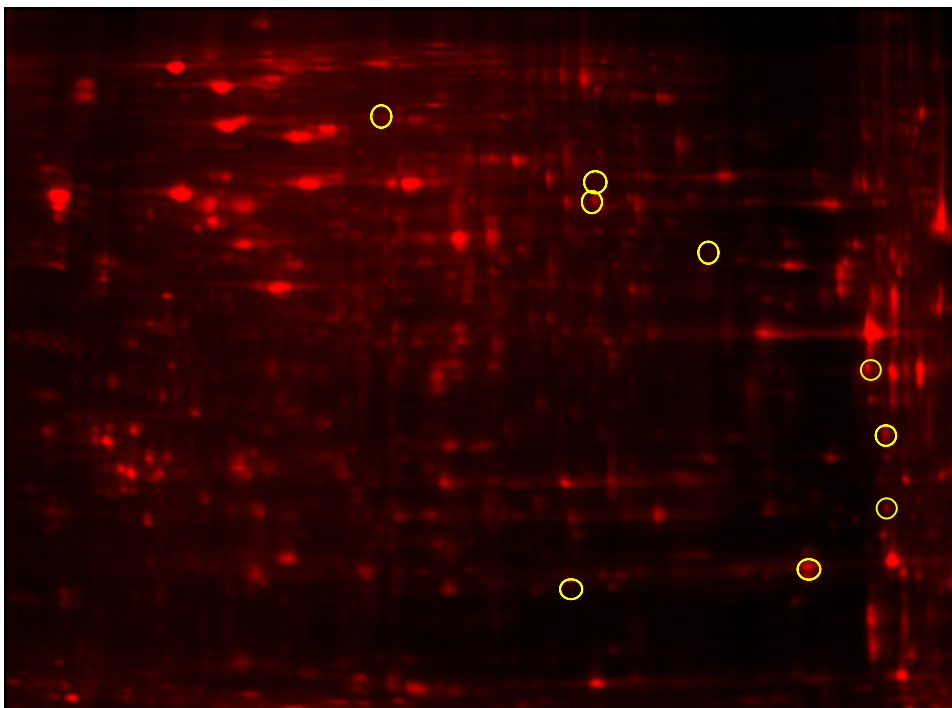


Figura 73: Imágenes obtenidas en el análisis de expresión diferencial de las líneas celulares A) RIN y B) DR4IiDM mediante el sistema DIGE. Se muestran marcadas las manchas diferenciales.

Tabla XXXVI: Proteínas diferenciales identificadas en el análisis de expresión proteica entre las células RIN y las células DR4liDM (PMF: mapeo peptídico, MS/MS: espectrometría de masas en tándem. Todas las proteínas identificadas son de rata).

Mancha	Proteína identificada	Masa (Kda)/pI	Nº acceso*	Pép. Identif. aa _r -aa _r	DR4liDM vs RIN	Técnica identif.
2046	Peroxiredoxin 1	22 / 8.3	sp Q63716	159-168 129-140 141-151	↑	MS/MS
2021	Superoxide dismutase (Mn), mitoch. prec.	25 / 9.0	sp P07895	54-68 90-208 135-158 195-202 203-216	↑	PMF
1895	Glutathione S-transferase Yb-1	26 / 8.3	sp P04905	2-11 97-108	↑	MS/MS
1692	HIV-1 tat interactive protein 2, homolog	30 / 7.6	nc 34856130	87/107 88/107 108-129 159-166 171-180 187-194 195-207 208-218 220-241 242-261	↑	PMF
1535	Short chain, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, mitoch. prec.	34 / 8.8	sp Q9WVK7	126-133 137-163 163-185 166-179 193-202 222-232 213-221	↑	PMF
1097	Creatine kinase, mitoch. 1	47 / 8.7	sp P25809	47-58 47-59 60-75 152-158 258-270 302-310 311-326	↑	PMF
833	Glutamate dehydrogenase 1	62 / 8.1	nc 6980956	69-76 91-98 108-123 125-136 212-231 213-231 303-318 400-420 445-453 461-476 481-496 504-516 528-535	↑	PMF
416	Thimet oligopeptidase	78 / 5.5	sp P24155	26-34 67-79 105-115 181-193 221-229 239-247 287-300 325-331 332-338 351-367 401-418 411-418 422-436 544-553 560-578	↓	PMF

*nc: NCBI, sp: SwissProt.

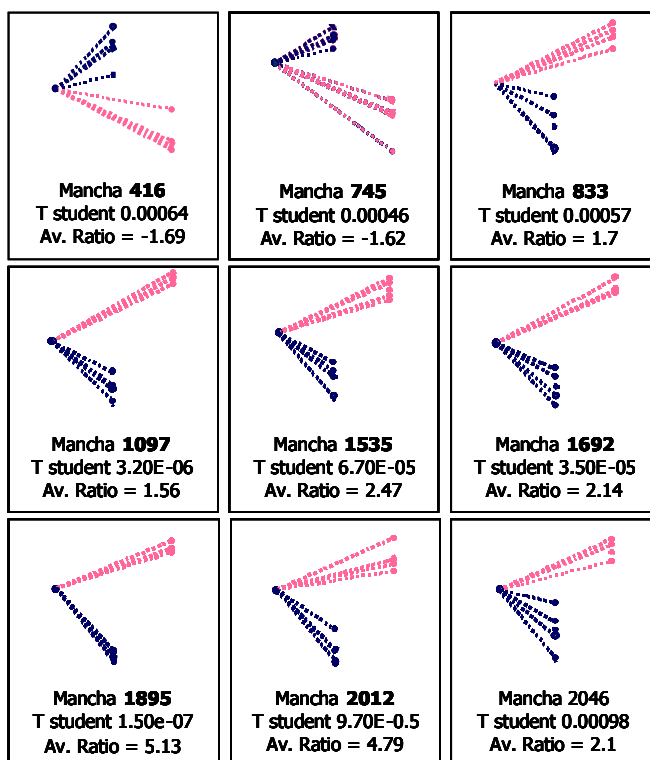


Figura 74: Representación gráfica del valor de la abundancia normalizada de las 9 manchas diferenciales en los cuatro geles. En color rosa se muestran los valores de DR4liDM y en azul los de RIN. Para cada mancha se indica el resultado del test T de Student y el valor promedio de la relación DR4liDM/RIN.

1.1. PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Las proteínas identificadas se clasificaron según los criterios GOA (apartado IV.1.2). Tres de estas proteínas están descritas como citoplasmáticas, cuatro mitocondriales y una nuclear. Siete de las ocho proteínas son moléculas con actividad catalítica. De éstas, cinco están implicadas en el metabolismo celular, una en la motilidad celular, una en la proliferación celular y organogénesis y una, ya incluida en el primer grupo, que también está implicada en la regulación de la transcripción del promotor Pol II.

De las siete enzimas identificadas, cuatro son oxidorreductasas. La glutamato-DH cataliza la deamidación oxidativa del 1-glutamato a 2-oxoglutarato, siendo por lo tanto un enzima importante en el metabolismo de los aminoácidos. La 3-hidroxiacil-CoA-DH es una proteína imprescindible en el proceso de beta-oxidación de los ácidos grasos de cadena corta en la mitocondria, siendo su función la deshidrogenación del 3-hidroxiacil-CoA a 3-cetoacil-CoA con la consiguiente reducción del NAD a NADH. Finalmente, la peroxirredoxina 1 y la superóxido dismutasa [Mn] son proteínas con una función antioxidante protectora en las células, siendo sus funciones principales la eliminación de peróxidos generados durante el metabolismo a través de

la reducción del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos de alquilo, y la eliminación de radicales producidos en las células. Se ha descrito además la interacción entre estas dos proteínas. La peroxirredoxina participa también en la proliferación celular y en la organogénesis y está implicada en las cascadas de señalización de factores de crecimiento y TNF- α a través de la regulación del H₂O₂ intracelular.

Otras dos enzimas, las proteínas GST-Mu1 y creatina quinasa tienen actividad transferasa. La creatina quinasa es el enzima responsable de la transferencia de fosfatos de alta energía desde la mitocondria al citosol. Las funciones principales de la isoforma Mu1 de la GST incluyen la detoxificación de compuestos electrófilos por conjugación con glutatión.

La séptima enzima catalítica, la oligopeptidasa *Thimet*, es la única proteína identificada que disminuyó su expresión en las células transfectadas. Esta proteína es una endopeptidasa que hidroliza oligopéptidos (generalmente de 6 a 17 aa) pero no péptidos largos o proteínas. Está situada en el citosol y se ha descrito que en extractos celulares es responsable de la degradación de muchos de los péptidos producidos por el proteasoma (York 2003). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de esta molécula reduce la presentación de péptidos de clase I, si bien no afecta a la presentación de péptidos generados en el RE o en los endosomas como son los de clase II.

La única proteína identificada que no presenta actividad catalítica es la *HIV-1 Tat interactive protein 2*, una molécula localizada en el núcleo y cuya función principal es la regulación de la transcripción, actuando sobre el promotor Pol II. Este promotor también está regulado por la superóxido dismutasa.

La transfección con las moléculas HLA-DR, HLA-DM y Ii parece por tanto estar relacionada con un aumento de la actividad metabólica de estas células, aunque sin producir cambios drásticos en su proteoma global. Esta transfección podría afectar además la expresión de proteínas que, como *Thimet*, están directamente relacionadas con la regulación de la vía de presentación. Estos datos están de acuerdo con la hipótesis de que los cambios observados en los repertorios podrían no derivar únicamente de la capacidad de las diferentes líneas para expresar DR y las chaperonas HLA-DM y Ii, sino que podrían deberse en parte a la regulación de otros mecanismos implicados en las vías de presentación. En este sentido, debe indicarse que los datos obtenidos no reflejan el total de los cambios que tienen lugar en la célula sino que se refieren únicamente a proteínas con niveles relativamente altos de expresión (las propias moléculas transfectadas no han sido detectadas como diferenciales debido a su baja concentración). Es probable que, además de *Thimet*, otras proteínas de alta importancia funcional en la presentación sufran cambios de expresión debidos a la transfección.

IV.2.2

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON MOLÉCULAS DE MHCII EN EL INTERIOR DE LA CÉLULA. ESTUDIO COMPARATIVO EN PRESENCIA O AUSENCIA DE LAS CHAPERONAS Ii y HLA-DM.

Los datos presentados en el apartado IV.2.3 mostraban como los repertorios peptídicos asociados a las moléculas de MHCII varían en función del tipo celular y de la presencia o ausencia de las chaperonas Ii y HLA-DM. Hemos podido concluir que, a pesar de la ausencia de una o ambas de estas chaperonas en las células, los complejos MHC-ligando pueden llegar a la superficie celular donde los péptidos son presentados. Particularmente interesante es el caso de las células DR4, en las que a pesar de no expresar ninguna de las dos chaperonas los complejos MHC-péptido se forman y se expresan en la membrana, generando además un repertorio peptídico con unas características muy peculiares tanto en el origen de los péptidos como en su secuencia

La presentación de péptidos en ausencia de Ii y HLA-DM podría deberse a la presencia de otras proteínas que pudieran ejercer funciones similares permitiendo la formación de los complejos MHC-péptido y su expresión en membrana. Con objeto de identificar estas proteínas se aislaron, a partir de las líneas celulares transfectadas, moléculas de HLA-DR4 en condiciones en que estas moléculas podían mantener unidas las proteínas que pudieran estar interaccionando con ellas en ese momento. Las proteínas afines a HLA-DR4 se purificaron por cromatografía de inmunoafinidad utilizando el anticuerpo L243 y se analizaron mediante 2DE o se digirieron para el análisis de los péptidos mediante MDLC- μ ESI-ITMS/MS. En el primer caso se realizó un estudio comparativo en las cuatro líneas transfectantes con objeto de identificar las diferencias existentes. El análisis por MDLC se llevó a cabo únicamente con la línea DR4 y su objeto era el de conseguir de forma rápida la identificación del mayor número posible de proteínas que pudieran estar interaccionando con la molécula de MHCII y que hubieran pasado desapercibidas en el análisis por 2DE.

1. LISIS CELULAR

Para la extracción de los complejos se utilizó un tampón de lisis suave, sustituyendo el detergente NP-40 utilizado en los experimentos de purificación de péptidos por digitonina. De esta forma se pudieron solubilizar de forma eficiente las moléculas de MHCII intentando preservar las posibles interacciones proteína-proteína que pudieran existir. Se comprobó por western-blot que la mayor parte de las moléculas de MHCII se solubilizaron en este paso (Figura 75).

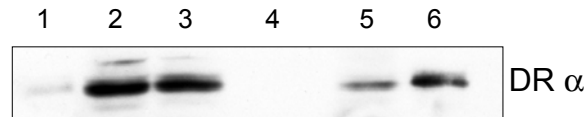


Figura 75: 1.5×10^8 células de la línea DR4liDM se incubaron en tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% digitonina, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA) durante 1 hora a 4°C. El extracto obtenido se centrifugó a 12000 xg durante 30 minutos y el sobrenadante se incubó 2 horas a 4°C con 200 μ l de bolas de sefarsa acopladas al anticuerpo L243. Posteriormente, las bolas se lavaron y las proteínas retenidas se eluyeron con 0.1% TFA. El pellet remanente tras la solubilización con 1% digitonina se resuspendió en 2% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 0.1% azul de bromofenol y se hirvió durante 5 minutos para solubilizar las proteínas resistentes al tratamiento anterior. Como control negativo se utilizaron bolas de sefarsa que no tenían unida ninguna molécula y que se habían desactivado siguiendo el mismo protocolo. Se realizó un análisis por western-blot utilizando el anticuerpo DA6.147 de 1) Resto no solubilizado con digitonina y solubilizado con 2% SDS, 2) Extracto proteico solubilizado con 1% digitonina, 3) Fracción no-retenida control, 4) Eluido control, 5) Fracción no retenida L243 y 6) Eluido L243.

2. INMUNOPURIFICACIÓN Y ELECTROFORESIS EN GEL

En una primera aproximación se utilizaron 200 μ l de anticuerpo L243 inmovilizado (1 mg Ab por mililitro de bolas) y 6 mg de extracto proteico total. El 10% del eluido se utilizó para confirmar la presencia de la cadena β de HLA-DR4 mediante western-blot y el 90% restante se separó mediante SDS-PAGE y se reveló con tinción de plata. Se detectaron dos bandas diferenciales anchas, con una movilidad electroforética que coincidía con las cadenas α y β de la molécula de MHCII lo que se confirmó por mapeo peptídico. Una tercera banda analizada confirmó la efectividad de la estrategia ya que se identificó como la proteína BiP, una chaperona de MHC conocida. En este experimento previo, las imágenes mostraron bandas de MHCII de intensidad baja, observándose además muchas otras bandas, más intensas incluso, a lo largo de todo el gel, lo que indicaba una falta de especificidad en la purificación. Para eliminar interferencias y posibles falsos positivos, se modificó el protocolo incrementando a 7 mg/ml la cantidad de anticuerpo inmovilizado para aumentar el rendimiento, y se disminuyó el volumen de bolas a la mitad, de forma que la superficie que podría producir uniones inespecíficas también disminuyó. Se incrementó además el volumen y la fuerza osmótica del lavado y la cantidad de proteína de partida (8 mg) y se disminuyó la proporción de extracto separada por SDS-PAGE al 40% del total. En las imágenes obtenidas se observaron claramente las dos cadenas de la molécula de MHCII junto con otras bandas de menor intensidad situadas en distintos puntos del gel, entre ellas la correspondiente a la proteína BiP, que habían sido copurificadas junto con MHCII (Figura 76).

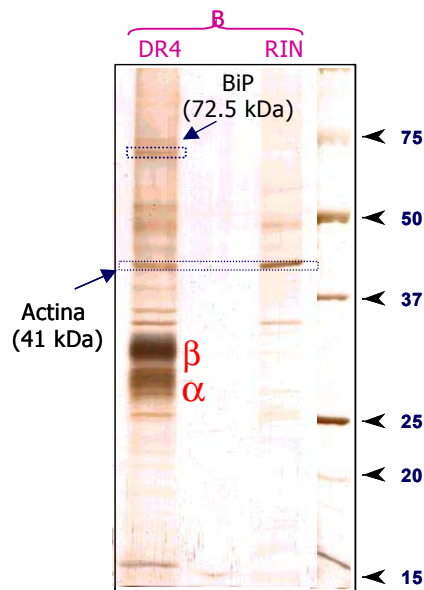


Figura 76: Separación SDS-PAGE de los eluidos obtenidos en la inmunopurificación con el anticuerpo L243 (7 mg/ml de sefarosa) de los extractos proteicos obtenidos a partir de células RIN y DR4liDM (8 mg de proteína de partida). Las columnas preparadas con 100 μ l de bolas se incubaron 3.5 horas / 4°C. Posteriormente se lavaron con 2 x 1 ml de tampón de lisis (LB) conteniendo 0.05% digitonina, 1 ml LB 300 mM NaCl con 0.05% digitonina y 1 ml LB 0.05% digitonina. El material todavía retenido se eluyó con 1 ml 0.1% TFA. Para preparar los geles SDS-PAGE se utilizó el 40% del eluido total. La banda identificada como actina aparece en todos los extractos, indicando que es una proteína que se une de forma inespecífica a la superficie. En cambio, la banda de BiP es específica de células con DR.

La separación de estos extractos mediante 2DE necesitó un paso previo de concentración y desalado del eluido ya que el isoelectroenfoque requiere que las muestras estén en un tampón específico y con la menor cantidad de sales y otras interferencias. Para concentrar y limpiar la muestra, el 40% del volumen de los eluidos obtenidos en el experimento anterior se redujo hasta aproximadamente 100 μ l y las proteínas se precipitaron. Este precipitado se resuspendió en el tampón de rehidratación de isoelectroenfoque y se realizó la electroforesis bidimensional según se explica en el apartado de material y métodos.

Los geles correspondientes a las células RIN mostraron la presencia de proteínas purificadas en ausencia de DR. La identificación de estas señales mostró que correspondían a proteínas muy abundantes que posiblemente se habían purificado de forma inespecífica (actina) o a cadenas del anticuerpo que sangraba del soporte cromatográfico (*Ig kappa* de ratón). Los transfectantes mostraron señales específicas de alta intensidad algunas de las cuales se identificaron en un análisis preliminar como las cadenas α y β de la molécula de MHCII y la chaperona BiP (Fig. 77).

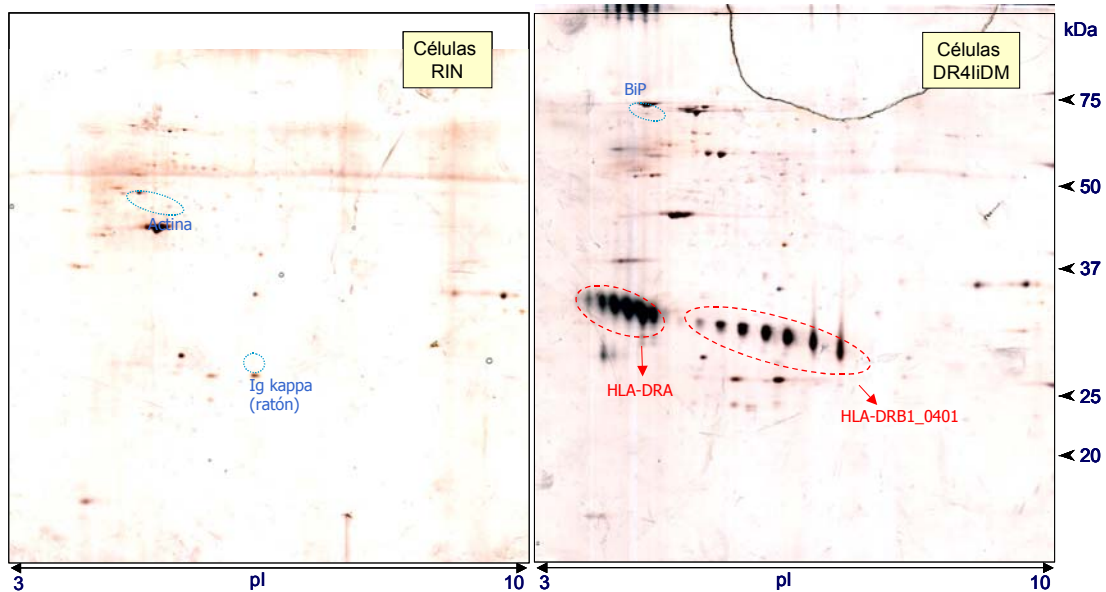


Figura 77: Imágenes 2DE obtenidas en el análisis de las proteínas que interaccionan con DR4. A) Control negativo de células RIN, B) Células DR4liDM. En las células DR4liDM se identificaron las cadenas α y β de las moléculas de MHCII y las proteínas actina y BiP. De la misma forma que en la separación por SDS-PAGE, se observó que la actina se une de forma inespecífica en ambas células, mientras que la chaperona BiP únicamente lo hace en las que expresan la molécula de MHC.

Las cadenas α y β de las moléculas de MHCII aparecían en el gel como un rosario de manchas con diferente peso molecular y punto isoeléctrico debido a las diferentes formas glicosiladas de ambas cadenas y al polimorfismo existente en las secuencias (Nag 1994). La heterogeneidad de estas proteínas se observó por primera vez en geles 2DE en moléculas murinas y en 1980 en moléculas humanas (Charron-Weleah 1980; Jones 1977), realizándose posteriormente diversos estudios referentes a los diferentes tipos y grados de glicosilación (Kämpgen 1991; Kijimoto-Ochiai 1989).

Para realizar la comparación entre los diferentes transfectantes se realizaron dos experimentos, aumentando la cantidad de extracto proteico de partida a 12 y 20 mg respectivamente. En promedio, se detectaron 49 manchas en los geles de las células RIN mientras que en las transfectantes este número fue de 82, 62, 87 y 97 para DR4, DR4li, DR4DM y DR4liDM, respectivamente. A partir de uno de los experimentos se creó un gel de referencia que contenía un total de 153 manchas. Treinta y siete de estas manchas eran características de todas las células transfectantes y 2 manchas adicionales (692 y 702) sólo se detectaron en las células que no coexpresaban las dos chaperonas. Estas 39 manchas se analizaron mediante mapeo peptídico, identificándose un total de 18 proteínas que podrían estar interaccionando con la molécula de MHCII en la célula bien directamente, bien a través de otras proteínas puente, además de diversas isoformas de las cadenas α y β de la molécula de MHCII así como fragmentos y dímeros de estas moléculas (Figura 78, tabla XXXVII).

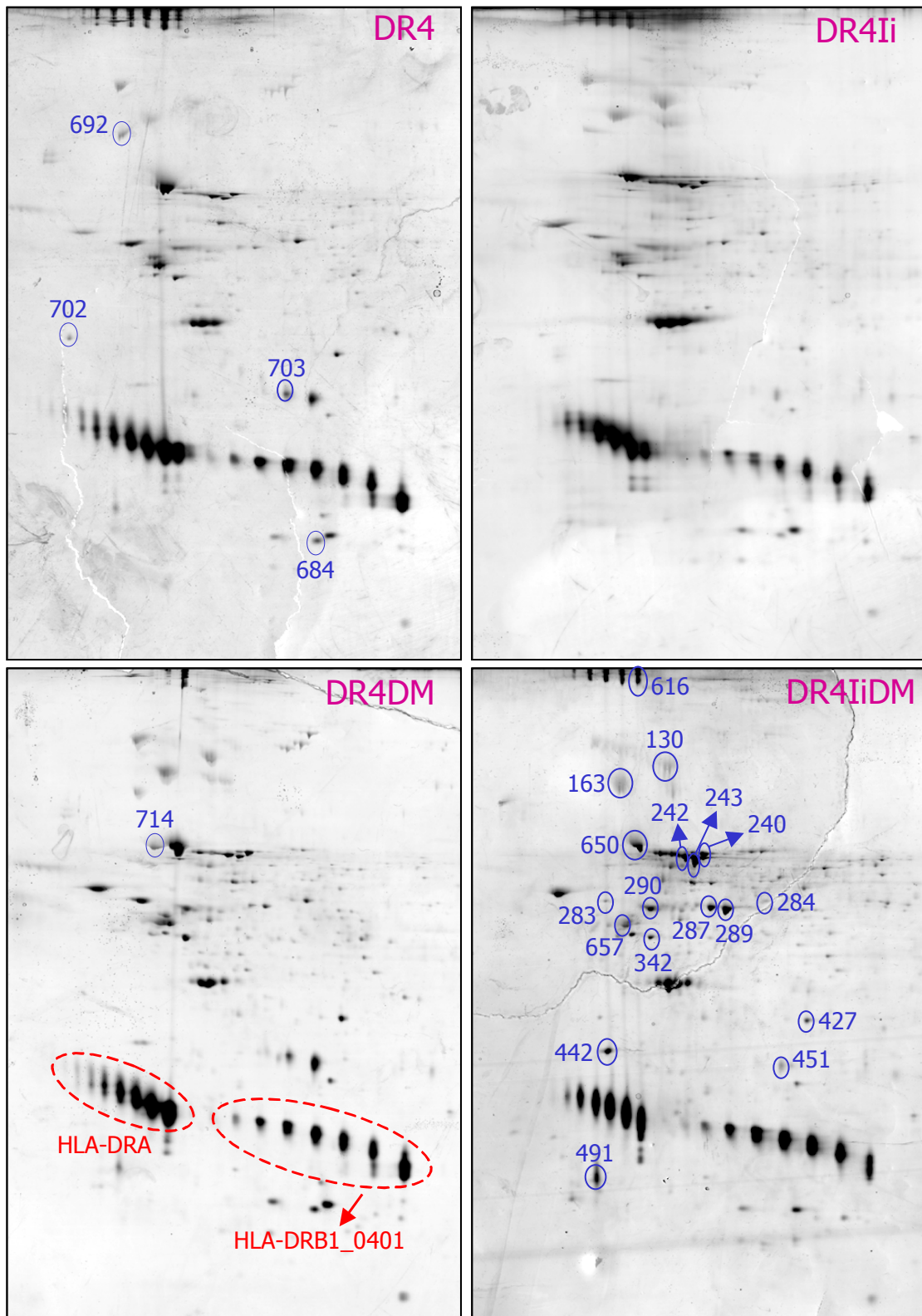


Figura 78: Imágenes 2DE obtenidas en el análisis de las proteínas que interaccionan con HLA-DR4 en las líneas DR4, DR4Ii, DR4DM, DR4IiDM. Las proteínas identificadas se muestran marcadas con su número de mancha. En la figura se muestra la parte del gel en las que se detectaron proteínas diferenciales (pI 3-8, Mr 20-100 kDa).

En estos análisis no se detectaron señales diferenciales entre las líneas DM⁺ o I⁺ y las DM⁻ o I⁻, a pesar de que, como mínimo, estas líneas deberían diferenciarse por la expresión de las propias chaperonas. La probable ausencia de HLA-DM en los geles podría ser debida a problemas derivados de la estabilidad de los complejos DM-DR. Se ha descrito que estos complejos son estables a pH 5 pero que a pH más alto (como el utilizado en nuestros experimentos) estas moléculas no copurifican (Sanderson 1996). En cuanto a la no detección de Ii como mancha diferencial, se ha descrito que esta proteína aparece en los geles situada muy próxima a las series de intensas señales derivadas de las cadenas α y β de la molécula de MHCII (Maeda 1984) por lo que es posible que su presencia quede oculta entre estas señales.

Tabla XXXVII: Proteínas asociadas a HLA-DR4 identificadas mediante espectrometría de masas.

Mancha	Proteína identificada	Masa (kDa)/pI	nº acceso*	Expresión diferencial			
				DR4	DR4Ii	DR4 DM	DR4 IiDM
650, 714	BiP (Heat shock 70kDa protein 5)	72 / 5.1	sp P06761	1.65	-2.28	1.2	-1.41
240	GRP75 (Heat shock 70 kDa protein 9B)	74 / 5.9	sp P48721	-1.09	-3.02	-1.99	1.75
242	HSC71 kDa (Heat shock 70 kDa prot. 8)	71 / 5.4	nc 5729877	1.47	-2.74	1.34	-1.22
163	Heat shock protein HSP-90 (alfa/beta)	83 / 5.0	sp P34058	-6.76	-2.01	-1.66	-1.33
284	ERp57 (ER-60 protease)	57 / 5.9	nc 38382858	-1.04	-2.57	1.21	-2.26
427	ER-associated HSP40 co-chaperone	41 / 5.8	sp Q99KV1	1.46	-1.82	-1.18	1.46
283	Protein disulfide isomerase precursor	57 / 4.8	sp P04785	1.93	-3.85	-1.04	-2.86
342	Protein disulfide isomerase A6 precursor	47 / 5.0	sp Q63081	1.72	-5.30	1.1	-1.01
684	Peroxiredoxin 4	31 / 6.2	nc 16758274	1.41	-3.57	-1.02	-3.07
692	Similar to Protein OS-9 precursor	79 / 5.1	nc 34865743	-1.62	-2.89	-1.86	-
702	Similar to reticulocalbin	38 /	nc 34856626	1.47	-4.35	-3.39	-
290	Tubulina alfa (mouse)	50 / 5	sp P05216	-1.05	-2.63	-1.05	1.44
657	Tubulina beta	50 / 4.8	sp P04691	1.92	-4.50	-1.20	-1.9
243	Vacuolar proton pump α subunit	69 / 5.6	nc 34869154	-1.55	-3.40	1.25	1.97
287, 289	Vacuolar proton pump β isoform 2	57 / 5.6	sp P50517	-3.12	-1.90	-1.18	2.31
442	Vacuolar proton pump δ subunit	40 / 4.9	sp P51863	-2.67	-1.86	-4.96	1.30
451, 703	Similar to RIKEN cDNA 1600024D17 (Trinucleotide repeat containing 5 en humanos)	31 /	nc XP236925	1.21	-6.84	1.3	-1.2
130	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	89 / 5.1	sp P46462	1.60	-6.84	1.16	-1.7
616, 491	HLA-DRA	29 / 4.9	sp P01903	-4.20	-2.11	-1.50	-1.6
				na	na	na	na

* sp: SwissProt, nc: NCBI

3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON DR4 MEDIANTE MDLC- μ ESI-ITMS/MS

El análisis comparativo de los extractos proteicos mediante 2DE y análisis de imagen tal como se ha descrito en el apartado anterior resultó ser un método muy eficiente para la caracterización de proteínas implicadas en la presentación en las células estudiadas. Una alternativa a la utilización de geles bidimensionales es el análisis por cromatografía multidimensional acoplado a espectrometría de masas en tándem (Peng 2003; Sanders 2002; Washburn 2001). Mediante esta técnica, el extracto proteico se trata con un enzima, los péptidos de digestión se separan mediante dos cromatografías consecutivas y se identifican mediante MS/MS. Esta aproximación experimental, además de su rapidez, permite identificar proteínas que por sus características pueden no haberse detectado en el gel y por lo tanto ofrece datos complementarios a los obtenidos por esa técnica. Así, proteínas con pesos moleculares o puntos isoeléctricos fuera del rango de separación de la 2DE pueden identificarse mediante el análisis por MDLC de sus péptidos de digestión. De la misma forma, proteínas no detectadas en el gel por encontrarse en manchas que contenían otras proteínas de abundancia superior, pueden ser identificadas mediante esta estrategia (Koller 2002).

En este trabajo se ha puesto a punto un sistema de MDLC- μ ESI-ITMS/MS que se ha utilizado para la caracterización de las proteínas que están interaccionando con HLA-DR en las células DR4 (Figura 79). Las series de cromatogramas de capLC- μ ESI-ITMS/MS obtenidos en el análisis MDLC se procesaron utilizando el programa SEQUEST. Este programa generó un total de 672 archivos .dta, identificándose un total de 48 péptidos diferentes y 22 proteínas, once de las cuales habían sido también identificadas en el análisis 2DE (Tabla XXXVIII). Entre las proteínas identificadas únicamente por MDLC se encontraban algunas difícilmente identificables por 2DE como la α -glucosidasa-2, con un peso molecular teórico de 107 kDa (sin tener en cuenta las modificaciones) y la proteína de unión a RNA FUS y la hnRNP que tienen puntos isoeléctricos superiores a 9.5.

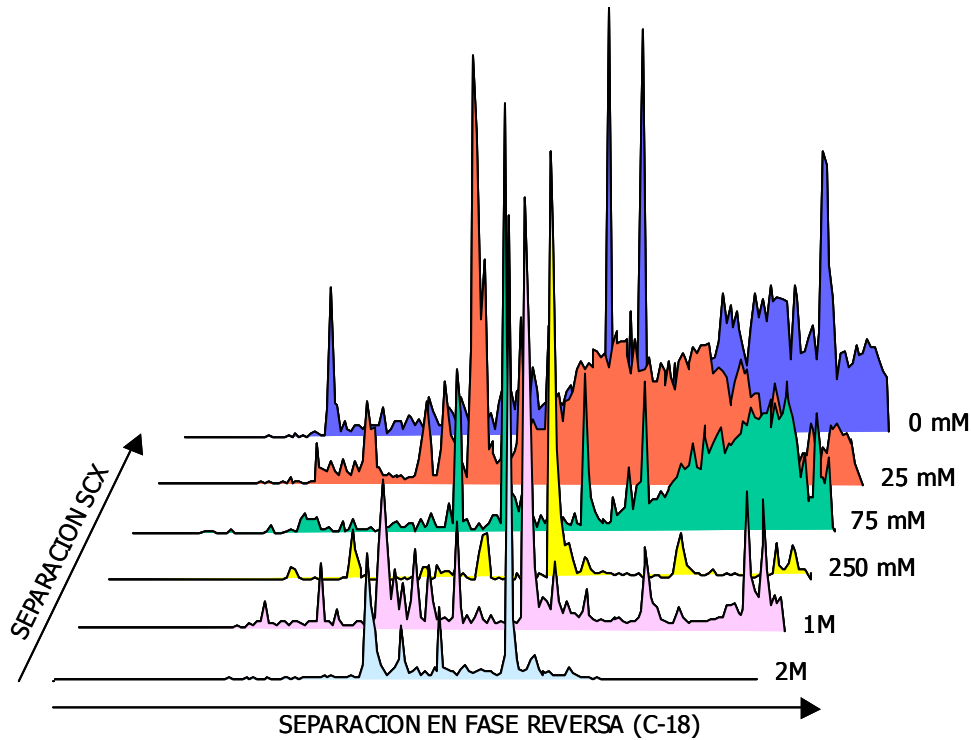


Figura 79: Cromatogramas obtenidos en el análisis de las proteínas que interaccionan con HLA-DR en la línea celular DR4 mediante MDLC- μ ES-ITMS/MS. El extracto obtenido de la columna de inmunofinidad se evaporó a sequedad y se redisolvió en una solución que contenía 6M urea y DTT para desnaturalizar y reducir las proteínas. Posteriormente estas proteínas se carbamidometilaron con iodoacetamida y la muestra se diluyó 3 veces con tampón bicarbonato con objeto de disminuir la concentración de urea a 2M, se añadió tripsina y se dejó incubando durante 24 horas. Este extracto peptídico desalado se inyectó en la columna de intercambio iónico y los péptidos no unidos quedaron retenidos en la columna de fase reversa, separándose y analizándose en un primer análisis por capLC- μ ESI-ITMS/MS (0 mM sal). Posteriormente se realizaron eluciones con 5 concentraciones de acetato amónico (25, 75 y 250 mM, 1 y 2M).

El análisis mediante MDLC tiene también sus propias limitaciones derivadas de la velocidad de muestreo del sistema espectrométrico. En el caso de mezclas complejas de proteínas el número de espectros obtenidos en un análisis de este tipo suele ser muy inferior al del total de péptidos en el extracto, por lo que una parte de las proteínas, especialmente aquellas menos abundantes o que generan menos péptidos o señales menos intensas, pueden no ser identificadas¹. Estas limitaciones son probablemente las responsables de que nueve de las proteínas identificadas en los geles, la mayoría del grupo de manchas menos intensas, no se identificaran mediante MDLC.

¹ Esta limitación es especialmente importante en nuestro caso dado que estos trabajos se realizaron con el primer modelo de trampa iónica disponible en el mercado para LC-MS. Los instrumentos actuales permiten barridos más de 10 veces más rápidos por lo que la probabilidad de identificar nuevas proteínas aumenta considerablemente.

Tabla XXXVIII: Proteínas identificadas por MDLC-ESI-ITMS/MS en el extracto de las células DR4.

Proteína identificada y localización celular	Masa (KDa) / pI	nº acc.*	Péptidos secuenciados	Conc. de sal (mM)
HLA-DR4	30 / 6.7	sp P13760	AVTELRPDEEYWSQK (78-94)	25, 75
			HHNLLVCSVNGFYPGSIEVR (140-159)	250
			HNYGVGESFTVQR (110-122)	25, 75, 250
			RVYPEVTVYPAK (123-134)	250
			SGEVYTCQVEHPSLTSPLTVEWR (196-218)	25,75, 1 y 2 M
			TGVVSTGLIQNGDWTFTLVMLETVPR (169-195)	25
			TQPLQHHNLLVCSVNGFYPGSIEVR (135-159)	250 , 1 M
			AAVDTYCR (59-68)	NR
			FSDVGEYR (102-109)	NR
YFYHQEEYVR (69-77)	25, 75			
HLA-DRA	29 / 4.9	sp P01903	FHYLPFLPSTEDVYDCR (173-189)	25, 75,250 2M
			KFHYLPFLPSTEDVYDCR (172-189)	1, 2 M
			NGKPVTTGVSETVFLPR (149-165)	25, 250, 1 2M
			SNYTPITNVPPEVTLTNSPVELR (102-125)	75
VEHWGLDEPLK (190-201)	25, 75, 250			
BIP	72 / 5.1	sp P06761	DNHLLGTFDLTGIPPAPR (475-492)	250
			IEWLESHQDA DIEDFK (602-607)	25
			IINEPTAAAIYGLDKR (198-214)	75, 250
			VTHAVVTPAYFNDAGR (165-181)	1 M
Peroxiredoxin 4	31 / 6.2	nc 16758274	IPLLSDLNHQISK (176-188)	250
			SINTEVVACSVDSQFTHLAWINTPR (142-166)	250
			VS VADHSLHLSK (69-80)	250, 1M
Protein disulfide-isomer. A6	47 / 5.0	sp Q63081	EPWDGKDGELPVEDDIDLSDVELDDLEKDEL(401-431)	1M
Protein disulfide-isomer.prec.	57 / 4.8	Sp P04785	QFLAAEAADDIPFGITSNSDVFSK (173-197)	25
			YKPESDELTAEK (329-340)	25
			EADDIVNWLK (123-132)	0
			VDATEESDLAQQYGVV (84-99)	0
α -glucosidase 2	107 / 5.7	nc 26349461	SIRPGLSPYR	1 M
			DAAEGNGAEPEARPGDGKPEETQEK	25
Vacuolar proton pump δ sununit	40 / 4.9	sp P51863	AVELLVELASLQTSFVTLDEAIK (141-163)	1 M
Nucleobindin 2	50 / 5.0	sp Q9J185	AATADLEQYDR	0
			KFQQGIAPSGPAGELK	1 M
RNA-binding protein FUS	53 / 9.5	nc 7440064	HDSEQDNSDNNTIFVQGLGENVTIESVADYFK (278-309)	25, 75
hnRNP protein	18 / 9.6	nc 3021529	SSGSPYGGYGGGGGGYGSR (170-191)	0
LAMP-2	45 / 8.0	sp P17046	GILTVIIPVGSQPLPLGVIFK (129-148)	250
MHC class Ib antigen	39 / 5.4	nc 27805185	AHVT LHPRPEGDVTLR (187-202)	1, 2 M
Tubulina α	50 / 5.0	sp P05216	FDGAINV DITEFQTNLV PYPR (244-264)	25
ER protein ERp46	46 / 5.5	sp Q91W90	VDCTQHYAVCSEHQVR (231-246)	75
Ribophorin I	68 / 6.1	sp P07153	VTAEVLAHPGGGSTAR (47-63)	250
GA-3-P-DH	31 / 7.6	nc 34875903	VIHDNFGLEGLMTTVHAITATQK (118-141)	1 M
hypothetical protein FLJ22625	53 / 6.8	nc 34873635	AFPTLGLFALDASQHSLSLSTR (361-381)	1 M
similar to RIKEN cDNA 1600025D17	40 / 8.4	nc XP236925	ELGSLEEDANPDEEGVQK (332-349)	NR
			NHQE EDLTQFLCAN HVLK (267-284)	75, 250
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	69 / 5.6	nc 34869154	VDNSSLTGESEPQTR (211-225)	0
Tubulina beta	50 / 4.8	sp P04691	SGP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN WAK (78-103)	1 M
Ig gamma-2a (ratón)	-	-	RADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFYPK	2 M
			CPAPNLLGGPSV FIFPPK	1M

4.- PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON HLA-DR

A partir de los análisis por 2DE y MDLC- μ ESI-ITMS/MS se identificaron un total de 30 proteínas que podrían estar asociadas a la molécula de MHCII en la célula (Tablas XXXVII y XXXVIII). La mayoría estaban implicadas en el transporte de proteínas asociado a membrana o eran chaperonas, enzimas de óxido-reducción o proteínas implicadas en el transporte de iones a través de membrana. Muchas de estas proteínas mostraban una clara relación funcional o de localización según los datos en la literatura. En muchos casos además se habían descrito interacciones entre las diferentes moléculas identificadas (Figura 80).

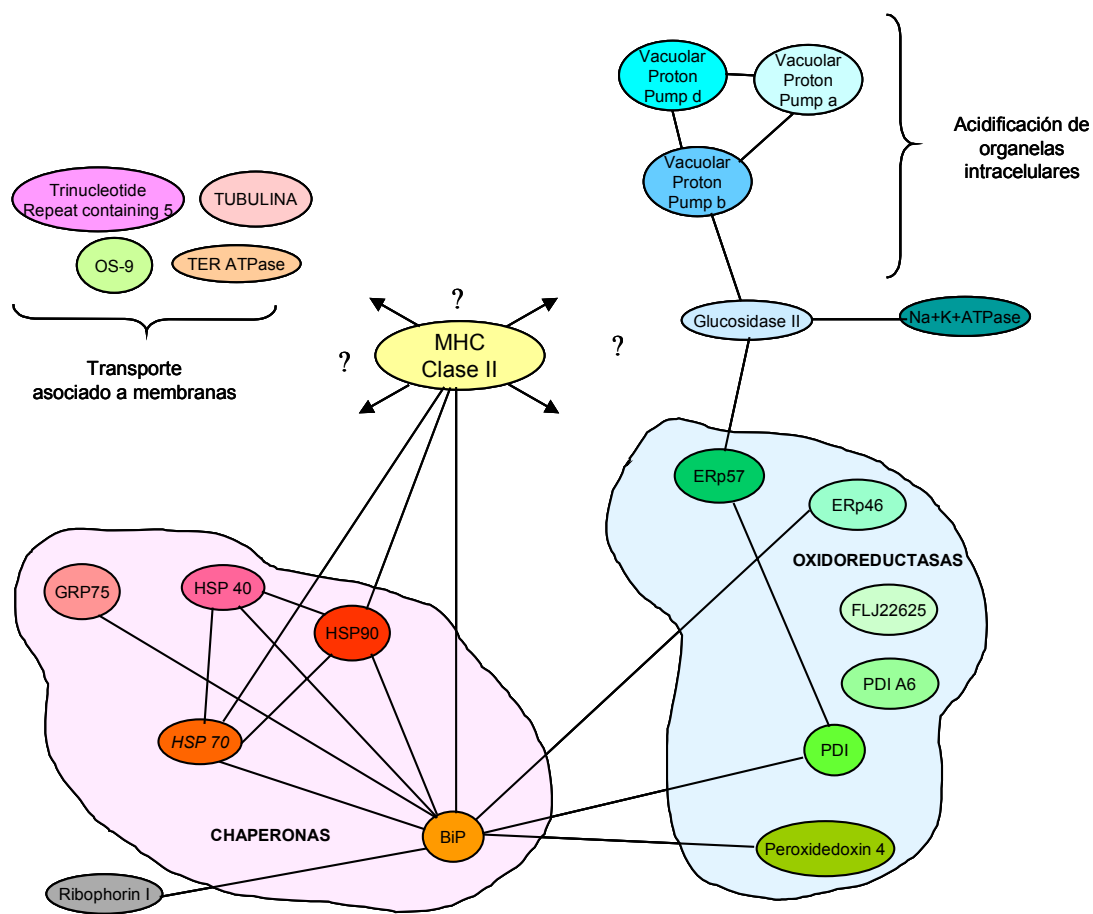


Figura 80: Proteínas identificadas en el estudio de las moléculas que interaccionan *in vivo* con HLA-DR. Las parejas para las que se ha descrito una interacción se muestran unidas mediante líneas. Las proteínas que no tienen una relación clara con el resto no se han incluido. La información sobre las interacciones se ha extraído de la base de datos STRING (<http://string.embl.de>).

4.1. Proteínas implicadas en el transporte asociado a membrana.

La capacidad de los complejos péptido-MHCII de expresarse en superficie en ausencia de las chaperonas de la vía de clase II, HLA-DM y Ii, sugiere la existencia de vías de transporte y procesamiento diferentes a las ya descritas. Además, en las células DR4DM, la ausencia de la cadena invariante no impide la generación de un repertorio muy similar al obtenido en presencia de ambas chaperonas. Así, es posible que algunas de las proteínas identificadas en estos experimentos estén implicadas en el transporte de esta molécula hacia la superficie celular, ejerciendo funciones similares a las de las chaperonas Ii o DM. Este podría ser el caso de las proteínas OS-9, TRC-5, TerATPase y tubulina, todas ellas implicadas en el transporte asociado a membrana y que copurificaron junto con la molécula de MHCII.

La proteína más interesante desde el punto de vista del transporte de los complejos desde el RE hacia la superficie celular es OS-9. Esta es una de las dos proteínas detectadas únicamente en las líneas donde no hay coexpresión de las chaperonas Ii y HLA-DM. Se trata de una proteína de función todavía desconocida de la cual se conocen tres isoformas que se generan por procesamiento alternativo. Se ha descrito que en rata esta proteína se encuentra en las membranas del RE expuesta hacia el lado citoplasmático y que está asociada con el mismo tipo de vesículas que las que contienen las chaperonas del RE calnexina, BiP y GRP94. Además, se ha demostrado que OS-9 puede interactuar transitoriamente con la meprina beta cuando ésta está siendo transportada desde el RE al Golgi (Litovchick 2002). Estos resultados sugieren la posibilidad de que OS-9 pudiera tener una función como transportador en el RE interaccionando con otras proteínas de membrana que posean un motivo similar al lugar de unión de OS-9 a la meprina. Estudios realizados con el homólogo de OS-9 en levadura, Yos9, indican que esta proteína parece jugar un papel directo en el transporte de las proteínas ancladas a GPI desde el RE al Golgi (Friedmann 2002). La asociación de OS-9 con la molécula de MHCII observada en las líneas con una transfección parcial de chaperonas podría indicar por tanto la intervención de esta proteína en un mecanismo alternativo para el transporte de las moléculas de MHCII a través del RE, dirigiéndolas hacia los compartimentos de carga de péptidos y permitiendo su llegada a la superficie celular.

Otras dos proteínas podrían estar relacionadas con el transporte de MHCII a través del Golgi: la proteína denominada *Similar to RIKEN cDNA 1600025D17* que en humanos se ha descrito como *trinucleotide repeat containing 5* (TRC-5) y la ATPasa del retículo endoplasmático de transición (TER-ATPasa). La TRC-5 está relacionada con el transporte a través de las membranas y la TER-ATPasa tiene como única función conocida la formación del retículo endoplasmático de transición (tER). Las vesículas del tER derivan del RE e intervienen en la transferencia de membranas desde el RE hacia el aparato de Golgi. La formación de estas vesículas es un proceso ATP dependiente en el que está implicada la TER-ATPasa.

La identificación de las cadenas α y β de la tubulina entre las proteínas que interaccionan con HLA-DR puede ser el reflejo de la importancia del citoesqueleto, del cual son componentes mayoritarios, en la vía de presentación de clase II. En este sentido se ha descrito que los microfilamentos de actina están implicados en la degradación de la cadena invariante y en la carga de los péptidos (Barois 1998).

4.2. Chaperonas

Se han identificado seis proteínas que se pueden agrupar por su función como chaperonas. Son las proteínas Erp57, BiP, *ER-associated HSP40 co-chaperone*, HSP90 (α/β), HSC71 y GRP75 (el homólogo mitocondrial de la HSP70). Las tres primeras se encuentran localizadas en RE mientras que HSP90 (α/β) y HSC71 son chaperonas situadas principalmente en el citoplasma, aunque se ha demostrado su presencia también en las vesículas de la vía secretora, de la endocítica y en retículo.

Dos de ellas, Erp57 y BiP, intervienen, junto con otra de las proteínas identificadas, la α -glucosidasa-2, en el control de calidad del RE. Erp57 y la α -glucosidasa-2, forman parte del sistema de control de calidad del RE calnexina/calreticulina (Oliver 1999). ERp57, una proteína de la familia de las disulfuro isomerasas (ver apartado siguiente), es además una chaperona conocida de la vía de presentación de clase I. El trímero formado por la calreticulina, la cadena α de la molécula de MHCI y la β 2- microglobulina, se une a la tapasina y a la Erp57 formando un complejo que permite que los péptidos que entran en el RE a través de TAP se unan a la molécula de MHCI (Purcell 2000). El posible papel de esta proteína en la vía de clase II es hasta ahora desconocido.

BiP, un miembro de la familia de las HSP70, es la chaperona más importante en el control de calidad del RE. Se conoce que las cadenas α y β de la molécula de MHCII sin ensamblar, así como una proporción de los complejos sintetizados en ausencia de Li se retienen en el RE en asociación con BiP (Bonnerot 1994). Nuestros datos coinciden con esta información, ya que en el análisis de expresión diferencial la mancha correspondiente a la proteína BiP presenta un volumen normalizado aproximadamente dos veces superior en las líneas Li^- respecto a las Li^+ .

BiP, como todas las HSP70, tiene en su estructura un dominio ATPasa y un dominio de unión a péptidos que coordinan ciclos repetitivos de hidrólisis de ATP e intercambio de ADP, estimulando la unión y liberación de las proteínas sin plegar y plegadas respectivamente. Existen numerosas cochaperonas que influyen en el ciclo modulando la hidrólisis de ATP, como por

ejemplo la cochaperona asociada a RE HSP40, otra de las chaperonas identificadas (Shen 2002). Se ha demostrado además que la proteína BiP puede formar complejos multichaperona, aún en ausencia de sustratos, con otras proteínas en el RE como GRP94, el homólogo en el RE de la HSP90, Gro170 y las oxidorreductasas Erp72 y PDI (Meunier 2002). Tanto PDI (ver 2.4.3) como HSP90 forman parte de las 30 proteínas identificadas en este apartado.

Las proteínas de estrés térmico o *heat shock proteins* (HSPs) son proteínas solubles intracelulares muy abundantes. A pesar de que mayoritariamente son proteínas citoplasmáticas, las proteínas HSP70 y HSP90 también se han descrito asociadas a la molécula de MHCII en los endosomas de células B (Wubbolts 2003). Además, estas proteínas también muestran funciones inmunológicas. Se ha descrito que algunas HSPs aumentan el procesamiento y presentación de diversos péptidos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Estas moléculas podrían actuar como transportadores de estos péptidos colaborando con HLA-DR en la presentación. Las primeras evidencias de la unión de péptidos por HSP se observaron al tratar con ATP un extracto inmunogénico de HSP70 obtenido de células tumorales y observar la desorción de péptidos unidos a esta molécula y la pérdida de sus propiedades inmunogénicas (Menoret 1999). Recientemente se ha descrito que el reconocimiento de un péptido de 32 aa derivado del HIV por los linfocitos T solo tiene lugar cuando este se añade unido a la HSP gp96 (SenGupta 2004). Se ha descrito también que la respuesta de los linfocitos T a la proteína básica de la mielina (MBP, el autoantígeno más importante en la esclerosis múltiple) aumenta con la expresión de HSP70 en APCs (Mycko 2004). HSP70 se asocia a MBP formando complejos de forma ATP/ADP dependiente, colocalizando ambas proteínas con HLA-DR en la vía endocítica. Aunque los dos péptidos inmunodominantes de MBP, MBP₈₅₋₉₉ y MBP₈₀₋₉₉ muestran afinidad por HSP70 *in vitro*, el aumento de respuesta inducido por HSP70 sólo se observó para la secuencia más larga (MBP₈₀₋₉₉) por lo que estos autores implican más a HSP en las tareas de procesamiento de los péptidos que en la presentación en sí.

Se han descrito diversas chaperonas que unen péptidos incluyendo la gp96, BiP, HSP70, calreticulina y HSP90 (Srivastava 2002) y se ha observado que esta capacidad no es dependiente del alelo de HLA-DR. Probablemente estas HSPs unen péptidos de forma poco selectiva aunque existe todavía poca información de secuencia que confirme este punto. Los péptidos asociados a las HSPs pueden ser re-presentados en la superficie de la célula por moléculas de MHC, tanto de clase I como de clase II, posiblemente a través de un receptor situado en la membrana de las células, CD91 (Srivastava 2002). La asociación de la molécula de MHCII con estas HSPs podría explicar la presentación de péptidos atípicos observada en las células DR4. Estos péptidos podrían ser transportados por las HSPs desde el citoplasma a la superficie celular donde interaccionarían con el receptor CD91 y entrarían en la célula por endocitosis mediada por receptor. Una vez en los endosomas los péptidos unidos a las HSP podrían unirse a las moléculas de MHCII que estuvieran en estos compartimentos. Este

mecanismo podría tener lugar en todas las líneas celulares estudiadas aunque sería más evidente en la línea DR4 donde se ha eliminado la contribución de Ii y DM al proceso de presentación. La ausencia de DM afectaría además la edición de péptidos favoreciéndose la formación de complejos MHCII-péptido estables (en los estudios bioquímicos realizados se ha demostrado que los complejos péptido-MHCII de las células DM/Ii⁻ no son estables), dando lugar a repertorios que como los estudiados contienen incluso péptidos que no cumplen el motivo de unión.

4.3. Enzimas de óxido-reducción

Casi todas las proteínas que catalizan reacciones redox que implican a ditiolos reactivos *in vivo* pertenecen a la superfamilia de las tiorredoxinas. Esta familia incluye proteínas de tipo tiorredoxina, glutarredoxina y disulfuro isomerasas o PDI. Las PDI son los enzimas más importantes en el proceso de maduración de las proteínas en el RE. Estos enzimas son los catalizadores de las reacciones de formación de puentes disulfuro, isomerización y reducción en el RE (Freedman 1994) y además tienen actividad chaperona. Se han descrito otras nuevas proteínas en el RE con identidad de secuencia a la PDI que se han denominado ERp-n, siendo n el peso molecular calculado para esa proteína a partir de datos de electroforesis en gel. La función de algunas de estas nuevas proteínas está todavía por determinar, aunque se supone que todas ellas tienen tanto actividad enzimática como de chaperona (Ferrari 1999). Las diferencias entre los miembros de esta familia se reflejan en su diferente distribución tisular, en sus niveles de expresión en los sustratos sobre los que actúan y en el tipo de regulación.

En este trabajo se han identificado cinco proteínas de la familia de las PDI: Son la PDI, PDI A6, Erp57, Erp46 y una proteína similar a la proteína hipotética FLJ22625, que es 100% homóloga a la PDI humana pero descrita en rata. Erp46 ha sido descrita recientemente como componente del RE (Knoblach 2003), mostrando una acción menos localizada que Erp57 que está asociada al complejo calnexina/calreticulina para ejercer su función como oxidorreductasa. La asociación de estas proteínas con la molécula de MHCII podría tener diversas funciones como su participación en el proceso de plegamiento de la propia molécula de MHCII o en el desplegamiento de otras proteínas para su degradación y producción de posible ligandos para la molécula de MHCII.

Otra oxidorreductasa identificada es la peroxirredoxina-4 (que pertenece al grupo de las glutarredoxinas). El papel de la peroxirredoxina dentro de esta vía podría estar relacionado con su función antioxidante. Esta proteína, igual que las PDI, contiene dominios tiorredoxina y podría estar implicada también en la estabilización de puentes disulfuro. En el estudio de expresión diferencial realizado en el apartado 1 de este capítulo se ha identificado otro miembro de esta

familia, la peroxirredoxina-1, que se sobreexpresa por efecto de la transfección de HLA-DR, Ii y HLA-DM, y que confirma la relación de esta familia de proteínas con la vía de clase II.

4.4. Proteínas implicadas en el transporte de iones a través de membrana.

Se han identificado tres de las cuatro subunidades que forman la ATPasa vacuolar, una enzima que media la acidificación de organelas intracelulares en eucariotas. Este proceso es muy importante para la unión de los péptidos a la molécula de clase II, aunque previamente no se había descrito ni la interacción física ni funcional directa entre estas proteínas y el MHCII. Si se conoce la interacción de estas subunidades con una de las proteínas identificadas en los complejos de MHC en nuestro estudio, la α -glucosidasa-2, hecho que podría relacionar el proceso de acidificación de estos compartimentos con el control de calidad del RE, ya que la α -glucosidasa es una enzima imprescindible para el funcionamiento del sistema calreticulina/calnexina.

La otra proteína implicada en el transporte de iones identificada, la ATPasa de sodio y potasio es una proteína de membrana responsable del establecimiento y mantenimiento de los gradientes electroquímicos de los iones de sodio y potasio a través de la membrana plasmática, también se conoce que interacciona con la α -glucosidasa-2.

4.5. Otras proteínas

Se han identificado otras proteínas que no hemos podido clasificar en ninguno de los grupos anteriores. Por ejemplo, la riboforina II que es una proteína implicada en la unión a ribosomas localizada exclusivamente en las membranas del RE y que se sabe que interacciona con BiP. También se han identificado dos proteínas de unión a calcio, la nucleobindina y la reticulocalbina y dos proteínas nucleares, ambas de unión al RNA: hnRNP, proteína implicada en el procesamiento, metabolismo y transporte del mRNA, y la proteína de unión a RNA FUS.

No se ha identificado ningún miembro de la familia de las tetraspaninas, proteínas que se ha descrito que interaccionan con las moléculas de clase II formando microdominios que facilitan la presentación de los péptidos a los linfocitos T (Karacsonyi 2004). Esto es posiblemente debido a que estos dominios son insolubles en el detergente utilizado en la lisis celular (Poloso 2004). En un trabajo reportado por Wubbolts y col. en el que se caracterizaron proteínas que se unen a la molécula de MHCII en los exosomas, tampoco se pudieron detectar estas proteínas mediante solubilización con detergente, SDS-PAGE y espectrometría de masas aunque su presencia se confirmó por microscopía inmunoelectrónica y western-blot (Wubbolts 2003).

En conclusión, en este apartado hemos identificado 30 proteínas que interactúan directa o indirectamente con la molécula de MHCII. Solo 3 de estas proteínas (HSP-70, -90 y BiP) habían sido descritas previamente mostrando una interacción directa con MHCII. De nueve de estas proteínas no se han encontrado referencias de su interacción con MHCII y su presencia en los extractos tampoco puede explicarse por interacción indirecta a través de otras moléculas puente. La mayor parte de las proteínas identificadas están relacionadas con procesos relevantes en la vía de presentación de péptidos de clase II, como son el correcto plegamiento de las moléculas de MHCII, la acidificación de los endosomas o la movilidad de las proteínas a través de las membranas. Algunas de estas proteínas no se habían relacionado anteriormente con la molécula de MHCII, siendo especialmente interesante el grupo de proteínas implicadas en el movimiento de las proteínas a través de las membranas ya que pueden ser las responsables de mecanismos de transporte alternativos a los conocidos. Se han identificado proteínas que son chaperonas residentes en el RE responsables del control de calidad en dicho compartimento, tanto relacionadas con el sistema de control calnexina/calreticulina, como con el sistema basado en la proteína BiP. También se han identificado diversos miembros de la familia de las disulfuro isomerasas, enzimas implicados tanto en el plegamiento de las proteínas como en la degradación de estas.