

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Programa de Doctorado en Bioquímica, Bienio 1997-1999

ESTUDIO DE LA VÍA DE PRESENTACIÓN DE PÉPTIDOS POR
MOLÉCULAS DE MHC DE CLASE II MEDIANTE ESTRATEGIAS
PROTEÓMICAS

MONTSERRAT CARRASCAL PÉREZ

Febrero, 2005

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA

Memoria presentada por

MONTSERRAT CARRASCAL PÉREZ

Para optar al grado de

DOCTORA EN FARMACIA

Tesis realizada en la Unidad de Espectrometría de Masas Estructural y Biológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona bajo la dirección del Dr. Joaquin Abián y la codirección de la Dra. Dolores Jaraquemada.

La doctoranda

El director

MONTSERRAT CARRASCAL

Dr. JOAQUIN ABIAN
Científico Titular, IIBB-CSIC

El tutor

La codirectora

Dr. MIQUEL LLOBERA
Catedrático de Bioquímica, UB

Dra. DOLORES JARAQUEMADA
Catedrática de Inmunología, UAB

Barcelona, Febrero de 2005

A Joaquin
por todo lo que me ha enseñado
por lo bueno y lo menos bueno
y por todo lo que queda

A todos los que de una forma u otra han contribuido a la realización
de esta tesis

¡muchas gracias!

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

2DE: Electroforesis en gel bidimensional.

aa: Aminoácido.

ACN: Acetonitrilo.

AITD: Enfermedades autoinmunes tiroideas (*AutoImmune Thyroid Disease*).

APC: Célula presentadora de antígeno (*Antigen Presenting Cell*).

B-LCL: Línea celular linfoblastoide (*Lymphoblastoid Cell Line*).

CapLC: Cromatografía líquida capilar.

CHAPS: Sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propano.

CLIP: Péptido de la cadena invariante asociado a clase II.

DIGE: Método para el análisis de expresión diferencial en gel que utiliza distintos fluoróforos para el marcaje y detección diferencial de las proteínas en las muestras (*Differential In Gel Electrophoresis*).

DTT: Ditiotreitolo.

EM: Espectrometría de Masas.

ESI: Electropray.

FWHM: Anchura de pico a media altura

GOA: *Gene Ontology Annotation*.

HED: Disulfuro de hidroxietilo

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*)

HSP: Proteínas de choque térmico (*Heat Shock Proteins*).

ID: Diámetro interno (*Internal Diameter*).

IEF: Isoelectroenfoque.

Ii: Cadena invariante.

INF: Interferón.

IT: Trampa iónica (*Ion Trap*).

LB: Tampón de lisis (*Lysis Buffer*).

LMP: *Large Multifunctional Proteasome*.

M: Masa nominal

Mavg: Masa nominal promedio.

Mi: Masa nominal monoisotópica.

MALDI: Ionización/desorpción por láser asistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*).

MDLC: Cromatografía líquida multidimensional (*MultiDimensional Liquid Chromatography*).

MeOH: Metanol

MHCI y MHCII: Complejo principal de histocompatibilidad de clase I y II respectivamente.

Mr: Masa molecular relativa.

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem.

MSⁿ: Espectrometría de masas en tándem múltiple.

nESI: nanoelectrospray.

NP-40: Nonidet P-40.

OD: Diámetro externo (*Outside Diameter*).

PDI: Proteínas disulfuro isomerasas (*Protein Disulfide Isomerase*).

pI: Punto isoeléctrico

PMF: Mapeo de masas peptídicas (*Peptide Mass Fingerprinting*).

QqQ: Triple cuadrupolo.

RE: *R*etículo *E*ndoplasmático.

RIN: Insulinoma de rata.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (*Sodium-Dodecyl-Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*).

TAP: *T*ransporters associated with *A*ntigen *P*rocessing.

TCA: Acido tricloroacético.

TCR: Receptor de células T (*T Cell Receptor*).

TFA: Ácido trifluoroacético.

TOF: Tiempo de vuelo (*Time Of Flight*).

UV: Ultravioleta.

μESI: Microelectrospray.

ÍNDICE

ABREVIATURAS**I) INTRODUCCIÓN**

1. El Complejo Principal de Histocompatibilidad	2
1.1. Estructura tridimensional de las moléculas de MHCI y MHCII	3
1.1.1. Unión MHC-péptido	4
1.1.2. Caracterización del motivo de unión	5
1.2. Biosíntesis de las moléculas de MHCI y MHCII .	9
1.2.1. Moléculas de MHC de clase I: la vía endógena.	9
1.2.2. Moléculas de MHC de clase II: la vía exógena	10
1.3. Función de las chaperonas Ii y HLA-DM en la vía de presentación de clase II	11
1.3.1. Cadena invariante	11
1.3.2. HLA-DM	13
1.4. Otras chaperonas del retículo endoplasmático	16
1.5. Generación de péptidos presentados por la molécula de MHCII	17
1.6. Reconocimiento del complejo MHCII-péptido	19
2. Autoinmunidad y enfermedades autoinmunes	21
2.1. Autoinmunidad tiroidea	23
2.1.1. El tiroides	23
2.1.2. Enfermedad de Graves-Basedow	24
2.1.3. Las moléculas de MHCII en la autoinmunidad tiroidea	25
3. Aproximaciones experimentales aplicadas al estudio de la presentación antigénica	26
3.1. Espectrometría de masas de péptidos y proteínas	27
3.1.1. Ionización por láser asistida por matriz (MALDI)	29
3.1.2. Ionización por electrospray (ESI)	31
3.2. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	34
3.2.1. Secuenciación de péptidos mediante MS/MS	36
3.3. Proteómica y procesamiento y presentación de antígenos	42

II) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 45**III) MATERIAL Y MÉTODOS** 47

1. Purificación de péptidos asociados a la molécula de MHCII	47
1.1. Acoplamiento del anticuerpo L243 a bolas de sefarosa activadas	47
1.2. Preparación y lisis de las células	48

1.3. Homogeneización y lisis del tejido tiroideo	48
1.4. Cromatografía de inmunoafinidad por HLA-DR	49
1.5. Aislamiento de los péptidos mediante ultrafiltración	50
1.6. Fraccionamiento del extracto peptídico mediante HPLC	50
2. Identificación de los repertorios de péptidos asociados a MHCII	51
2.1. MALDI-TOF	51
2.2. MALDI-TOF/TOF	52
2.3. nESI-ITMS/MS	52
2.4. capLC- μ ESI-ITMS/MS	53
3. Identificación de péptidos asociados a células B-LCL mediante capLC- μ ESI-ITMS/MS	53
3.1. Preparación de columnas capilares	54
3.2. Preparación de la interfase de microelectrospray	55
3.3. Preparación de la muestra y análisis	56
4. Análisis de expresión diferencial de células epiteliales endocrinas que expresan por transfección HLA-DR, Ii Y HLA-DM	57
4.1. Preparación de la muestra	58
4.2. Separación 2DE	59
4.3. Análisis de imagen	59
5. Identificación de nuevas proteínas que interaccionan con HLA-DR en la célula en células epiteliales endocrinas	60
5.1 Preparación de la muestra	60
5.2 Análisis mediante 2DE	61
5.2.1. Tinción con plata	62
5.2.2 Análisis de imagen	63
5.3 Análisis de nuevas proteínas que interaccionan con HLA-DR en células epiteliales endocrinas mediante MDLC- μ ESI-ITMS/MS	64
6- Identificación de proteínas separadas en geles de poliacrilamida mediante técnicas proteómicas	67
6.1. Digestión en gel	67
6.2. Identificación de proteínas mediante mapeo peptídico	68
6.3. Identificación de proteínas mediante secuenciación de péptidos	68
7. Herramientas bioinformáticas	69
7.1. Búsqueda en bases de datos	69

7.2. Secuenciación <i>de novo</i>	70
7.3. Bases de datos	71
8. Líneas celulares	71
8.1. Células RINm5F	71
8.2. Células B linfoblastoides (B-LCL)	72
8.3. Citometría de flujo	72
8.4. Western-blot	73

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Caracterización del repertorio peptídico asociado a moléculas de MHCII mediante espectrometría de masas

IV.1.1. Evaluación de diversos métodos de secuenciación de péptidos asociados a la molécula de clase II mediante espectrometría de masas	75
1. Identificación por nanospray y espectrometría de masas en tándem en un instrumento de trampa iónica	76
1.2. Espectrometría de masas en tándem múltiple (MS ⁿ)	79
1.3. Secuencias detectadas mediante nESI-ITMS/MS	83
2. Identificación mediante MALDI-TOF/TOF	84
3. Identificación mediante capL-μESI-ITMS/MS	86
4. Identificación mediante secuenciación <i>de novo</i> .	87
5. Comparación de los métodos de identificación	90
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	97
1. Antecedentes y modelo experimental	97
2. Repertorio peptídico asociado a HLA-DR4 en una línea celular con expresión constitutiva de moléculas de MHCII (B-LCL).	99
2.1. Distribución del peso molecular	99
2.2. Repertorio peptídico asociado a DR4 en células B-LCL	102
3. Identificación de los ligandos naturales asociados a HLA-DR4 en las células DR4IiDM	105
3.1. Distribución del peso molecular	105
3.2. Repertorio peptídico asociado a DR4 en células DR4IiDM.	106
4. Comparación de los repertorios peptídicos asociados a HLA-DR4 en células B-LCL y DR4IiDM	113
4.1. Heterogeneidad de los repertorios peptídicos.	113

4.2. Patrones de procesamiento de los péptidos presentados	115
4.3. Localización celular de las proteínas origen	116
4.4. Motivo de unión a HLA-DR4: comparación entre DR4IiDM y B-LCL	117
IV.1.3. Efecto de las chaperonas de la vía de clase II, cadena invariante y HLA-DM, en los repertorios asociados a HLA-DR4 en células epiteliales transfectadas	121
1. Antecedentes y modelo experimental	121
2. Repertorio peptídico asociado a HLA-DR4 en las líneas celulares DR4, DR4Ii, DR4DM y DR4IiDM	124
2.1. Purificación de péptidos asociados a MHCII mediante cromatografía de inmutofinidad y HPLC	124
2.2. Distribución del peso molecular de los ligandos asociados a DR4.	125
2.2.1. Influencia de la cadena invariante en células DM ⁺ .	127
2.2.2. Influencia de la cadena invariante en células DM ⁻ .	128
2.2.4. Abundancia relativa de los ligandos peptídicos presentados	129
2.3. Identificación del repertorio peptídico asociado a DR4 en células que únicamente coexpresan HLA-DM	130
2.4. Identificación del repertorio peptídico asociado a DR4 en células que únicamente coexpresan Ii.	132
2.5. Repertorio peptídico asociado a DR4 en ausencia de HLA-DM y Ii	135
2.6. Péptidos presentados independientes de HLA-DM y Ii.	137
2.7. Efecto de las chaperonas HLA-DM y Ii en los péptidos asociados a DR4 en las células epiteliales transfectadas.	137
2.7.1. Motivo de unión	137
2.7.2. Estabilidad de la unión MHCII-péptido	140
2.7.3. Localización de las proteínas origen	140
IV.1.4. Identificación de ligandos asociados a las moléculas de MHCII en tiroides humanos autoinmunes.	143
1. Obtención y caracterización del tejido tiroideo	143
2. Purificación e identificación de los ligandos naturales asociados a moléculas de HLA de clase II en tejido tiroideo autoinmune humano	144
2.1. Purificación y fraccionamiento de los péptidos asociados a DR	144
2.2. Distribución del peso molecular de los ligandos asociados a DR	148
2.3. Identificación de ligandos asociados a moléculas de MHCII mediante espectrometría de masas.	149
2.3.1. Tiroglobulina	153
2.3.2. Albúmina y Perlecan	154

2.3.3. Moléculas de MHCII DQB1_0602 y DRB1_4	155
2.3.4. Péptidos derivados de proteínas de la vía endocítica	156
2.3.5. Otros péptidos	156
2.3.6. Proteínas origen identificadas	157
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 HLA-DR4 y las chaperonas li y HLA-DM.	159
IV.2.2. Identificación de proteínas que interaccionan con la molécula de MHCII en el interior de la célula. Realización de un estudio comparativo de la presencia de estas proteínas en las cuatro líneas transfectantes.	165
1. Lisis celular	165
2. Inmunopurificación y electroforesis en gel	166
3. Identificación de proteínas que interaccionan con DR4 mediante MDLC- μ ES-ITMS/MS	171
4. Proteínas que interaccionan con HLA-DR4	174
4.1. Proteínas implicadas en el transporte asociado a membrana.	175
4.2. Chaperonas	176
4.3. Enzimas de óxido-reducción	178
4.4. Proteínas implicadas en el transporte de iones a través de membrana.	179
4.5. Otras proteínas	179
V. DISCUSIÓN GENERAL	181
VI. CONCLUSIONES	187
VII. REFERENCIAS	189
VIII. ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario es el encargado de defender al organismo frente a los agentes patógenos. De entre las células que intervienen en este sistema, los linfocitos son las responsables de la respuesta inmune adaptativa. Los linfocitos T, protagonistas de la inmunidad celular, poseen receptores que reconocen fragmentos peptídicos, generados a partir de proteínas, que son presentados en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC) asociados a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (moléculas de MHC). La importancia de las moléculas de MHC en la respuesta inmune se descubrió en 1974 cuando Zinkernagel y Doherty observaron que linfocitos T aislados de un ratón infectado podían reconocer células de otro ratón infectadas por el mismo virus solo en el caso de que ambos expresaran la misma isoforma de MHC (Zinkernagel 1974), demostrando que en la activación de las células T intervienen tanto determinantes del antígeno como de las moléculas del MHC. Es lo que se conoce como restricción por el MHC.

El estudio de los mecanismos que dan lugar a la formación de los complejos MHC-péptido, su presentación en la superficie de la APC y el reconocimiento de los mismos por parte de las células T es fundamental para poder entender, no sólo la respuesta inmune a infecciones, sino también patologías tan relevantes como el cáncer, la autoinmunidad o el rechazo de trasplantes. Asimismo, la identificación de los péptidos asociados a las moléculas de MHC puede ser una vía en el desarrollo de vacunas y fármacos para el tratamiento de enfermedades asociadas con fallos en el reconocimiento de antígeno.

En esta tesis se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la vía de presentación de péptidos por las moléculas de MHC de clase II, utilizando diversas estrategias proteómicas. En la introducción se describirá la estructura de las moléculas de MHC y los mecanismos conocidos de generación y presentación de péptidos. Se introducirán las enfermedades autoinmunes y más específicamente las que afectan el tiroides, que es el modelo fisiológico que se analiza en el estudio. Por último, se incluye un resumen sobre la espectrometría de masas y su aplicación a la secuenciación de péptidos y a la identificación de proteínas, ya que ésta es la herramienta básica que se ha utilizado en este trabajo.

1. EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es un complejo de genes que codifican un grupo de proteínas denominadas moléculas de MHC (Dunham 1987; Kumanovics 2003). En humanos, el MHC se sitúa en el cromosoma 6 y se denomina antígeno leucocitario humano o HLA. El MHC se divide en tres regiones (Figura 1). Las regiones de clase I y II codifican glicoproteínas de membrana especializadas en la presentación de antígenos, las moléculas de MHC de clase I y de clase II (MHCI y MHCII), y otras moléculas implicadas en las vías biosintéticas de las propias moléculas del MHC, como HLA-DM, HLA-DO, TAP (*Transporters associated with Antigen Processing*) o los componentes del proteasoma LMP-2 y LMP-7 (*Large Multifunctional Proteasome*) (Kelly 1991). La región intermedia o región de clase III contiene genes que codifican una gran variedad de proteínas, incluyendo citocinas, componentes del sistema del complemento, proteínas de shock térmico (HSP) y transportadores ABC (Campbell 1993). Existen otros muchos genes dentro de la región de clase III cuya función se desconoce.

Las moléculas de MHCI tienen una distribución muy amplia ya que se encuentran en casi todas las células del organismo. En humanos, existen tres *loci* que codifican estas moléculas, denominados HLA-A, HLA-B y HLA-C. Las moléculas de MHCII tienen una distribución tisular muy restringida, expresándose sólo en macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y células epiteliales del timo (Knight 1993). Están codificadas por una región del cromosoma 6 denominada HLA-D que está formada por tres subregiones: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR (Monaco 1993).

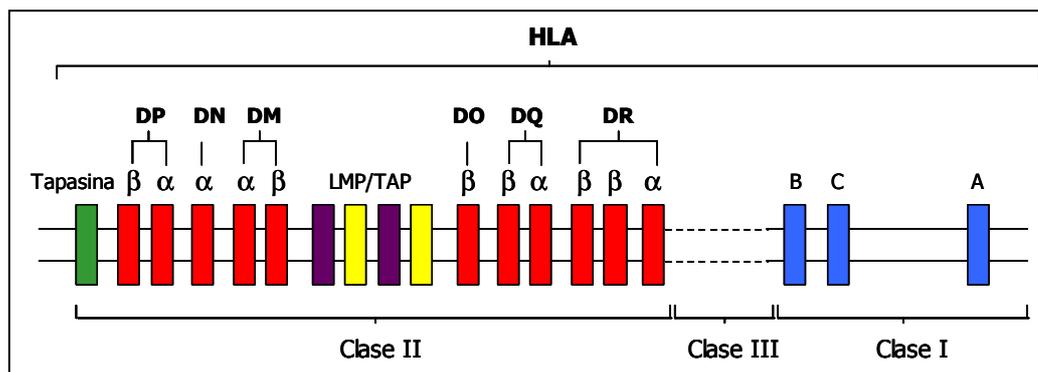


Figura 1: Estructura génica del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano.

El MHC es poligénico y los genes que lo constituyen son característicamente codominantes y polimórficos. La poligenia, o presencia de varios genes en cada individuo que codifican por proteínas de función similar, junto con la codominancia o expresión simultánea de alelos procedentes de cromosomas homólogos hace que en cada célula se puedan expresar hasta seis

moléculas de clase I y ocho de clase II diferentes. Esta diversidad es además incrementada en la población por el alto grado de polimorfismo existente en la mayoría de los genes estructurales del MHC.

1.1. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LAS MOLÉCULAS DE MHCI y MHCII

Las moléculas de MHCI son heterodímeros formados por una glicoproteína de membrana de 43 kDa, denominada cadena α , asociada no covalentemente a la proteína β 2-microglobulina, de 12 kDa. Las moléculas de MHCII están formadas por la asociación no covalente de dos glicoproteínas de peso molecular 35 y 30 kDa denominadas cadenas α y β , respectivamente. A diferencia del resto de cadenas, los genes que codifican la β 2-microglobulina del MHCI se encuentran en el cromosoma 15 en humanos (Goodfellow 1975).

El análisis cristalográfico por rayos X de las moléculas de MHC ha permitido conocer su estructura y el modo en que une el ligando peptídico (Dessen 1997; Lee 2001; Stern 1994). La primera estructura tridimensional que se describió fue la de la molécula de clase I HLA-A2.1 hace ya casi 20 años (Bjorkman 1987). La cadena α del MHCI está formada por una parte extracelular, que se divide en los dominios α 1, α 2 y α 3, un segmento transmembrana de 25 aa y una cola citoplasmática de 31 aa (Figuras 2-3). El plegamiento de los dominios α 1 y α 2 da lugar a una hendidura que será el lugar donde se unirán los péptidos y que se denomina surco de unión. Este surco de unión está formado por una base de 8 cadenas β antiparalelas con 2 hélices α sobre ella. Cada uno de los dominios aporta una hélice α y 4 cadenas β al surco de unión (Madden 1992). El dominio α 3 está situado próximo a la membrana y su estructura es similar a la de los dominios constantes de las inmunoglobulinas. La β 2-microglobulina interacciona principalmente con el dominio α 3.

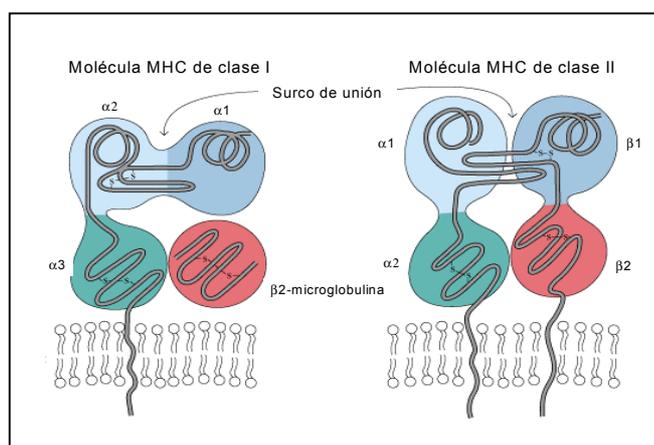


Figura 2: Estructura de las moléculas de MHCI y MHCII.

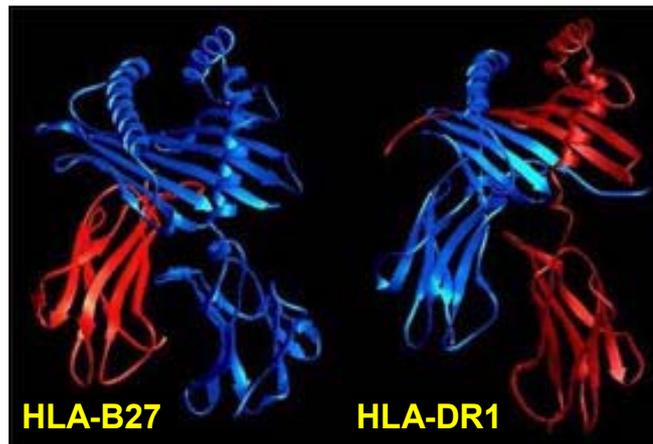


Figura 3: Estructura tridimensional de las moléculas HLA-B27 (clase I) y HLA-DR1 (clase II) (<http://users.umassmed.edu>).

Las cadenas α y β de la molécula de MHCII también están formadas por una parte extracelular, un segmento transmembrana de 20-25 aa y una cola citoplasmática de 12-15 aa. La parte extracelular de cada cadena está dividida en dos dominios denominados $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y $\beta 1$ y $\beta 2$, respectivamente. El surco de unión está formado por los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ de manera que cada cadena aporta una hélice α y 4 cadenas β a la estructura (Brown 1993). Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ contienen un puente disulfuro interno y presentan, como en el caso de clase I, un dominio de tipo inmunoglobulina.

1.1.1. UNIÓN MHC-PÉPTIDO

A pesar de la similitud estructural de las moléculas de clase I y II, existe una diferencia importante que determina el tipo de péptidos que se unen en cada caso: el surco de unión al péptido en la molécula de MHCI forma una hendidura cerrada en los extremos que restringe el tamaño de los péptidos que pueden asociarse mientras que en el de clase II está abierto por los lados, de manera que puede unir ligandos más largos. Así, los péptidos que se unen a la molécula de MHCI tienen un tamaño de 8-10 aa y se estabilizan principalmente por la interacción de sus extremos N- y C-terminal con los extremos del surco de unión. Los péptidos de clase II tienen una longitud variable de entre 13 y 25 aa y se unen a la molécula de MHCII mediante interacciones a lo largo de todo el surco de unión. En ambos casos los aminoácidos que se unen específicamente a residuos polimórficos del surco de unión se denominan residuos de anclaje.

Existen dos tipos de interacciones que contribuyen a la estabilidad de los complejos MHC-péptido: los puentes de hidrógeno entre la cadena lineal del péptido y los residuos conservados del surco de unión (Stern 1994) y las interacciones de las cadenas laterales de los residuos de anclaje con zonas polimórficas de la molécula de MHC que forman unas cavidades

tridimensionales, denominadas bolsillos, donde se alojan estas cadenas. Las zonas más polimórficas de las moléculas de MHC están localizadas en el surco de unión al péptido siendo estos residuos los que determinarán el repertorio de péptidos presentados. El conjunto de residuos de anclaje de cada variante alélica es diferente y se denomina motivo de unión. El motivo de unión de los péptidos de clase II está formado por 9 aminoácidos y se encuentra en el centro del péptido, formando el llamado “core”. El primer aminoácido de esta zona *core*, en el extremo N-terminal del motivo, es el más importante para la interacción y se denomina ancla. La posición de este aminoácido se denomina posición P1 (Tabla I).

Variaciones mínimas en el surco de unión pueden causar cambios en el repertorio presentado. Así, Suri y col. demostraron que moléculas de MHCII que se diferenciaban en un único aminoácido situado en la cadena beta (alelos I-A^d y I-A^{g7}) presentaban repertorios peptídicos diferentes y específicos de cada alelo a pesar de que las proteínas disponibles para el procesamiento eran las mismas (Suri 2003).

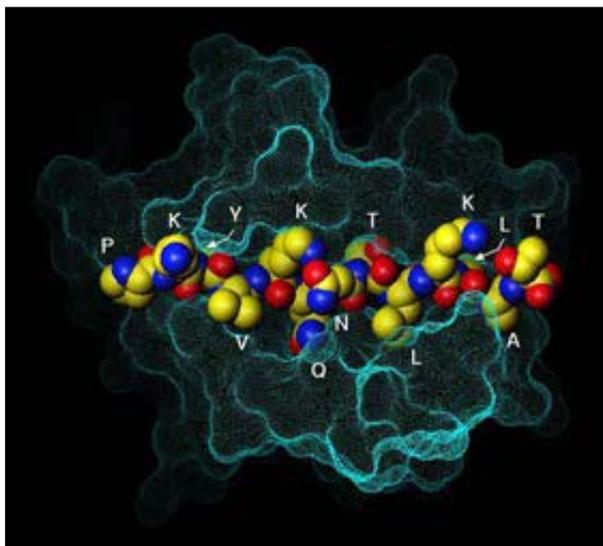


Figura 4: Imagen tridimensional de un péptido situado en el surco de unión de la molécula de MHC de clase II (<http://users.umassmed.edu>).

1.1.2. CARACTERIZACIÓN DEL MOTIVO DE UNIÓN

La existencia de motivos de unión específicos de alelo se evidenció en diversos estudios dirigidos a la secuenciación de los péptidos unidos de forma natural a moléculas de MHCI y que utilizaban una estrategia basada en la degradación de Edman (Falk 1994; Hammer 1992; Stern 1994). Esta estrategia, denominada “secuenciación en *pool*”, implica una secuenciación directa de las mezclas de péptidos presentados. Para ello, los complejos MHC-péptido se purificaban a

partir de extractos de cultivos celulares mediante cromatografía de inmutofinidat aislándose los péptidos asociados a los complejos mediante elución ácida y ultrafiltración. Posteriormente se realizaba un fraccionamiento de los péptidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con objeto de disminuir la complejidad de las muestras a secuenciar. En base a la información obtenida de cada uno de los ciclos de degradación de Edman, la secuenciación en *pool* permitía determinar los aminoácidos más frecuentes en cada posición de la secuencia peptídica, caracterizándose de esta forma la posible presencia de residuos específicos en estas posiciones. Estos primeros estudios estuvieron facilitados por una característica típica de los péptidos de clase I: su longitud uniforme (entre 8 y 11 aa). Esta misma estrategia se utilizó también para obtener los primeros datos sobre los motivos de unión de clase II a pesar de que estos péptidos tienen un rango de longitudes más amplio y la aproximación era mucho menos eficiente (Falk 1994; Verreck 1994).

Tabla I: Motivos de unión descritos para diversos alelos de HLA de clase II. El motivo de unión está formado por 9 aa. Las cadenas laterales de los aminoácidos situados en las posiciones P1, P4, P6 y P9 se sitúan en los bolsillos del surco de unión y determinan la estabilidad y especificidad de la unión, mientras que las cadenas laterales de los aminoácidos situados en P2, P5 y P8 se extienden hacia fuera del surco y contactan con el TCR. El residuo más importante en la interacción MHCII-péptido es el situado en P1.

Alelo (referencia)	Motivo de unión								
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
DRB1*0101 (Falk 1994; Hammer 1992; Stern 1994)	Y,V,L,F,I, A,M,W			L,A I,V,M,N,Q		A,G S,T,P			L,A,I,V N,F,Y
DRB1*0401 (Friede 1996; Hammer 1993; Hammer 1995; Sette 1993)	F,Y,W I,L,V,M			F,W,I,L,V A,D,E no R,K		N,S,T, Q,H,R	polar cargado alifático		Polar alifático K
DRB1*0407 (Davenport 1997)	F, Y, W			A,V,K		N,T,D,S			Q, N
DRB1*1501 (Vogt 1994; Wucherpfenning 1994)	L,V,I			F,Y,I		I,L,V,M,F			
DRB1*0701 (Chicz 1993; Gelder 1998)	F,Y,W,I L,V			D,E,H,K,N Q,R,S,T,Y		N,S,T			V,I,L,Y,F
DRB1*1104 (Verreck 1996)	I,L,V			L,V,M,A F,Y		R,K,H			A,G,S,P
DRB1*1101 (Hammer 1993; Newcomb 1993; Verreck 1996)	W,Y,F			M,L,V		R,K,H			A,G,S,P

Trabajos posteriores dirigidos al análisis de las secuencias individuales de estos péptidos aplicando la secuenciación de Edman sobre péptidos purificados (Jardetzky 1991; Rudensky 1991) o, más frecuentemente, mediante secuenciación por espectrometría de masas (Hunt 1992b; Lippolis 2002; Muntasell 2002), han permitido la obtención de las secuencias aminoacídicas de los péptidos asociados de forma natural a diversos alelos de clase I y clase II. Mediante la alineación de estas secuencias individuales se ha determinado el motivo de unión

de múltiples alelos (Rammensee 1995), si bien estos datos pueden estar sujetos a sesgos importantes cuando el número de secuencias alineadas no era suficientemente alto.

La información correspondiente a cada motivo de unión puede presentarse en forma de una matriz de afinidad en la que se indica la importancia relativa de la presencia de los diferentes aminoácidos en cada una de las posiciones del motivo (Figura 5). Estas matrices de afinidad permiten calcular la afinidad teórica de un péptido por un determinado alelo de MHC. Para calcular el índice de afinidad teórica de un determinado péptido, se asignan valores a cada uno de los residuos de aminoácido de la secuencia y la suma de estos valores se correlaciona con la afinidad de unión a MHC de ese péptido. Este cálculo se basa en la hipótesis de que la unión del péptido a la molécula de MHC es el resultado neto de los efectos individuales de las cadenas laterales de cada uno de los aminoácidos que forman un péptido y tiene en cuenta el hecho de que el efecto de un aminoácido no depende de su posición absoluta en la secuencia sino de su posición relativa al aminoácido ancla en la posición P1.

aa	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999.0	0.0	0.0	0.0	-	0.0	0.0	-	0.0
D	-999.0	-1.3	-1.3	1.4	-	-1.1	-0.3	-	-1.7
E	-999.0	0.1	-1.2	1.5	-	-2.4	0.2	-	-1.7
F	0.0	0.8	0.8	-0.9	-	-1.1	-1.0	-	-1.0
G	-999.0	0.5	0.2	-1.6	-	-1.5	-1.3	-	-1.0
H	-999.0	0.8	0.2	1.1	-	-1.4	0.0	-	0.08
I	-1.0	1.1	1.5	0.8	-	-0.1	0.08	-	-0.3
K	-999.0	1.1	0.0	-1.7	-	-2.4	-0.3	-	-0.3
L	-1.0	1.0	1.0	0.8	-	-1.1	0.7	-	-1.0
M	-1.0	1.1	1.4	0.9	-	-1.1	0.8	-	-0.4
N	-999.0	0.8	0.5	0.9	-	1.3	0.6	-	-1.4
P	-999.0	-0.5	0.3	-1.6	-	0.0	-0.7	-	-1.3
Q	-999.0	1.2	0.0	0.8	-	-1.5	0.0	-	0.5
R	-999.0	2.2	0.7	-1.9	-	-2.4	-1.2	-	-1.0
S	-999.0	-0.3	0.2	0.8	-	1.0	-0.2	-	0.7
T	-999.0	0.0	0.0	0.7	-	1.9	-0.1	-	-1.2
V	-1.0	2.1	0.5	-0.9	-	0.9	0.08	-	-0.7
W	0.0	-0.1	0.0	-1.2	-	-1.0	-1.4	-	-1.0
Y	0.0	0.9	0.8	-1.6	-	-1.5	-1.2	-	-1.0

Figura 5: Matriz de afinidad para el alelo HLA-DRB1_0401 (Sturniolo, 1999).

Una herramienta muy utilizada en la caracterización de los motivos de unión requiere la realización de ensayos de unión utilizando librerías peptídicas o de fagos (Hammer 1993; Hammer 1992). Las primeras matrices se generaron a partir de librerías peptídicas mediante el método denominado "*side chain scanning*" (Hammer 1994; Marshall. 1995). Los métodos basados en ensayos de unión son, sin embargo, largos y requieren un número muy alto de experimentos para que el resultado sea fiable. Recientemente, se han desarrollado algoritmos

matemáticos y métodos de modelización molecular que permiten hacer estimaciones sobre la afinidad entre un péptido y un determinado alelo de MHC (Tabla II). Los resultados de la modelización molecular son muy fiables cuando existe una proteína homóloga de la cual se conoce su estructura tridimensional como es el caso de las moléculas de MHC. Actualmente existen numerosas bases de datos de péptidos, tanto de clase I como de clase II, y programas de predicción de epítopos y de cálculo de afinidades teóricas accesibles a través de la red global (Tabla II).

Tabla II: Herramientas bioinformáticas relacionadas con el procesamiento y presentación de antígenos por las moléculas de MHC.

<i>HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS RELACIONADAS CON EL PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS</i>		
<i>Nombre</i>	<i>Dirección internet</i>	<i>Descripción</i>
BASES DE DATOS		
MHCBN	http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbn/	Péptidos que se unen y que no se unen a las moléculas de MHC (A partir de la literatura y de bases de datos públicas).
JenPep	http://www.jenner.ac.uk/jenpep/	Información cuantitativa de unión de péptidos a las moléculas de MHC de clase I y II y a TAP (A partir de datos experimentales publicados).
MHCPEP	http://wehih.wehi.edu.au/mhcpep/	Péptidos que se unen a las moléculas de MHC (A partir de datos experimentales).
SYFPEITHI	http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/	Base de datos de péptidos de unión a moléculas de MHC (A partir de datos experimentales publicados).
IMGT	http://www.ebi.ac.uk/imgt/	Inmunoglobulinas, Receptores de células T y moléculas de MHC de vertebrados.
MÉTODOS DE PREDICCIÓN DE PÉPTIDOS DE UNIÓN A MHC Y DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T		
Propred	http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html	Predicción de posibles péptidos de unión a moléculas de MHC o de epítopos CTL a partir de secuencias peptídicas.
RANKPEP	http://mif.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html	
EPIPREDICT	http://www.epipredict.de/index.html	
SYFPEITHI	http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/	
nHLAPred	http://bioinformatics.uams.edu/immuno/predict.html	
MAPPP	http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/information.html	
PREDICT	http://sdmc.krdl.org.sg:8080/predict-demo/information.html	
TEPITOPE	http://www.vaccinome.com/pages/597444/index.htm	
HLADR4Pred	http://bioinformatics.uams.edu/mirror/hladr4pred/	Predicción de péptidos de unión a HLA-DRB1*0401 a partir de una secuencia.
MHCBench	http://www.imtech.res.in/raghava/mhcbench/	Interfase para la evaluación de algoritmos de predicción de péptidos de unión a MHC
PREDICCIÓN DE PROCESAMIENTO POR EL PROTEASOMA		
TAPPred	http://bioinformatics.uams.edu/mirror/tappred/	Predicción de la afinidad de unión de péptidos hacia el transportador TAP
PAPROC	http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/	Predicción de roturas por el proteasoma 20S humano y de levadura

1.2. BIOSÍNTESIS DE LAS MOLÉCULAS DE MHC I Y MHC II.

1.2.1. MOLÉCULAS DE MHC DE CLASE I: LA VÍA ENDÓGENA

Las moléculas de MHC I se asocian principalmente a péptidos derivados de proteínas degradadas en el citosol y los presentan a las células T CD8⁺ (Palmer 1998). De esta forma, la vía de clase I está especializada en la presentación a los linfocitos T de péptidos antigénicos derivados de patógenos intracelulares, como son los virus y algunas bacterias. Las proteínas se degradan en el citosol por diversos mecanismos que generan péptidos que son transportados al interior del RE por la acción de transportadores específicos (York 1999). El mecanismo más importante en la generación de péptidos en el citosol implica a un complejo multicatalítico formado por 28 subunidades denominado proteasoma, responsable de gran parte del proceso de degradación proteica en la célula. Los péptidos generados en el citosol se transportan al RE principalmente por la acción de los transportadores asociados al procesamiento de antígeno 1 y 2 (TAP-1/TAP-2). Un esquema del ensamblaje del complejo MHC I-péptido se muestra en la figura 6.

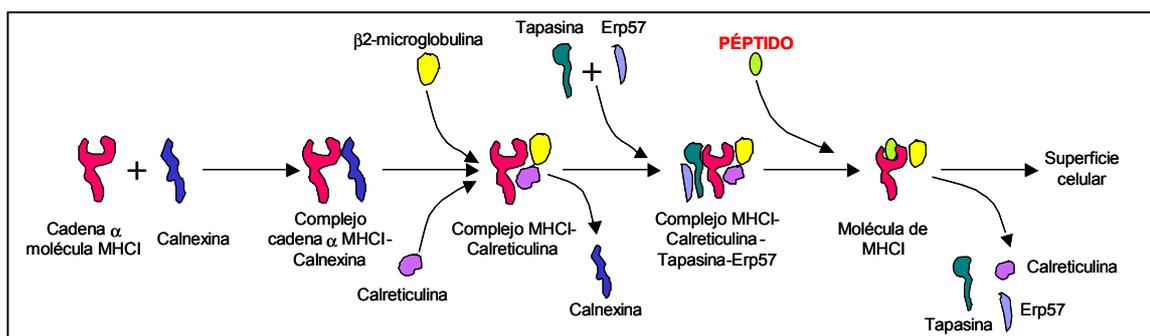


Figura 6: Esquema del ensamblaje del complejo MHC I-péptido. La cadena α del MHC I se sintetiza en el citosol y es translocada al lumen del RE donde se asocia con la calnexina que la mantiene parcialmente plegada. La unión de la β 2-microglobulina provoca la disociación de la calnexina y el heterodímero α - β 2m se une a la proteína calreticulina. Este trímero forma un complejo con la tapasina y la Erp57 permitiendo la carga de los péptidos que entran en el RE a través de TAP (Purcell 2000). Una vez unido el péptido, la molécula de MHC I ya es estable y el complejo MHC I-péptido es transportado a la superficie celular.

En algunos casos MHC I también puede presentar péptidos derivados de proteínas de membrana o pertenecientes a la vía secretora (Heath 2001). Estas proteínas pueden llegar al citosol mediante un mecanismo denominado translocación inversa y allí ser degradadas por el proteasoma y entrar en la vía convencional de presentación de clase I. También se ha descrito la presentación de proteínas exógenas por MHC I (Joncal 1996). Estas proteínas pueden ser translocadas al citosol después de su endocitosis o pueden ser degradadas en los endosomas y

los péptidos generados ser capturados por moléculas de MHC I de la membrana también internalizadas en el proceso de endocitosis (Houde 2003; Yewdell 1999).

1.2.2. MOLÉCULAS DE MHC DE CLASE II: LA VÍA EXÓGENA

La vía de presentación de clase II está especializada en la presentación a los linfocitos T de patógenos de origen extracelular. La mayoría de las moléculas de clase II presentan péptidos generados en vesículas endocíticas, derivados principalmente de proteínas exógenas, de membrana o de la vía secretora, a las células T CD4+, aunque, tal como se explica más adelante, cada vez existen más evidencias de que también se presentan péptidos derivados de proteínas citosólicas. En ausencia de infección, la mayoría de los péptidos presentados por moléculas de MHCII derivan de proteínas autólogas. (Dongre 2001; Engelhard 1994; Hunt 1992b).

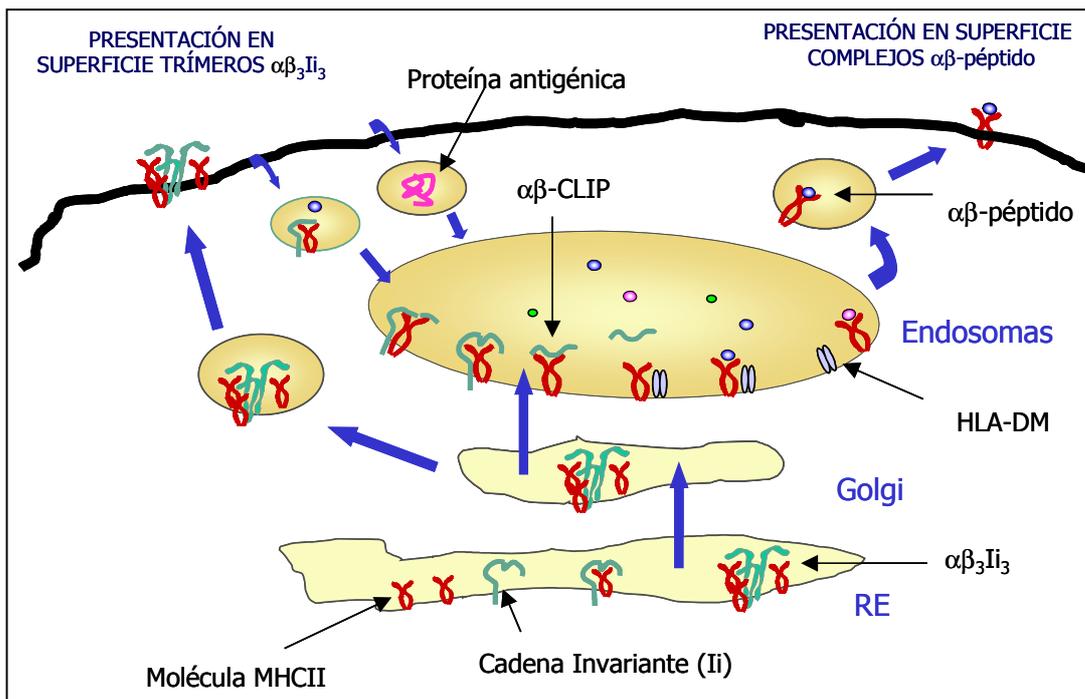


Figura 7: Esquema de la vía de presentación de péptidos de clase II.

El primer paso de la vía de presentación de clase II es la síntesis de las cadenas α y β en los ribosomas del RE rugoso, su transporte al lumen del RE y su posterior ensamblaje en la membrana de este último (Kvist 1982) (Figura 7). Para evitar la unión a los péptidos que se encuentran en el RE, este dímero $\alpha\beta$ se une de forma no covalente a una proteína denominada cadena invariante (Ii) (Cresswell 1996). En el RE, Ii se agrupa formando trímeros y une una

molécula de MHCII en cada subunidad, generando nonámeros $I_i(\alpha\beta)_3$. Durante el proceso de formación de estos nonámeros sus componentes se encuentran asociados a la calnexina (Anderson 1994). Una vez formado el complejo, la calnexina se disocia y el nonámero se dirige hacia la vía endocítica donde la cadena invariante es degradada por proteasas ácidas dando lugar a un fragmento corto que queda unido a la molécula de MHCII y que se denomina CLIP o péptido de la cadena invariante asociado a clase II. La mayor parte de los complejos $I_i(\alpha\beta)_3$ llegan a la vía endocítica a través del Golgi dirigidos por péptidos señal situados en la parte citoplasmática de I_i (Bakke 1990). Algunos complejos llegan a la superficie celular a través de la vía secretora y son rápidamente internalizados hacia los compartimentos endocíticos. La liberación del péptido CLIP y la posterior unión de la molécula de MHC a otros péptidos está catalizada por una molécula denominada HLA-DM. El complejo MHCII-péptido formado es transportado a la superficie donde el péptido unido es presentado a las células T. Finalmente, como otras proteínas de membrana, este complejo puede volver a entrar en la célula por endocitosis dirigiéndose a los compartimentos lisosomales para su destrucción. No obstante, la molécula de MHCII puede también volver a adquirir péptidos y resituarse en la superficie celular (Askew 2000).

1.3. FUNCIÓN DE LAS CHAPERONAS CADENA INVARIANTE Y HLA-DM EN LA VÍA DE PRESENTACIÓN DE CLASE II

1.3.1. CADENA INVARIANTE

La cadena invariante es una glicoproteína transmembrana de tipo II de la cual se han descrito 4 isoformas en humanos (Strubin 1986). Estas isoformas se generan por procesamiento alternativo de su RNA o por variación del codón de inicio de la transcripción y se denominan p33, p35, p41 y p43. La isoforma mayoritaria es la p33.

La cadena invariante se localiza en la membrana del RE con su extremo amino terminal situado en el lado citoplasmático donde existen dos motivos Leu-Leu que median el transporte de los complejos $I_i(\alpha\beta)_3$ hacia la vía endocítica (Bakke 1990; Lotteau 1990). En esta zona se sitúa también la señal que dirige la internalización de los complejos que llegan a la superficie celular a través de la vía secretora (Bremnes 1994). La zona responsable de la formación de los trímeros I_i previa a la unión a MHCII en el RE se sitúa en la parte carboxilo terminal (Roche 1991).

La importancia de I_i en la vía de presentación se evidenció en estudios con ratones deficientes en esta proteína, en los que se observó una reducción de la expresión de moléculas de MHCII en la superficie (Bikoff 1993; Viville 1993). Mediante técnicas de tinción intracelular y

experimentos de western-blot se demostró además que en estos ratones no se afectaba, sin embargo, la síntesis de moléculas de clase II. Estos estudios sugerían que en ausencia de li se produce una asociación de la molécula de MHCII con otras chaperonas de la vía, como pueden ser BiP o calnexina, que impiden su llegada a la superficie de la célula (Koonce 2004). Las funciones de li son principalmente tres:

- ▶ Estabilizar el plegamiento de las cadenas α y β .
- ▶ Impedir la unión de otras proteínas o péptidos que se encuentren en el RE al surco de unión de la molécula de MHC (Busch 1996).
- ▶ Dirigir el complejo MHCII-li hacia los compartimentos de la vía endocítica.

La interacción más importante entre li y la molécula de MHCII está determinada por una secuencia denominada CLIP (90-102). Esta secuencia se inserta en el surco de unión a péptidos de MHCII de forma similar a como lo haría un péptido (Ghosh 1995). Otras tres zonas dentro de la secuencia de li contribuyen a la interacción con la molécula de MHCII fuera del surco de unión: las zonas N- y C- terminal contiguas a CLIP (residuos 81-87 y 103-118) y una región localizada en el dominio de trimerización (Castellino 2001; Stumptner 1997; Thayer 1999; Wilson 1998).

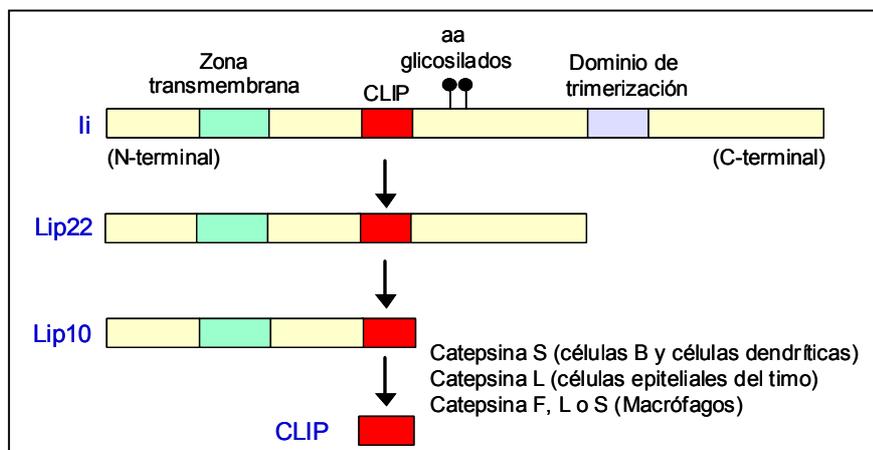


Figura 8: Degradación de li y formación del péptido CLIP.

A lo largo del proceso de presentación, li se degrada secuencialmente por la acción de un grupo de proteasas ácidas residentes en los compartimentos de la vía endocítica (Villadangos 2001). El primer fragmento que se elimina es el dominio de trimerización de li, generándose el fragmento LIP22 que contiene los segmentos que dirigen los complejos hacia la vía endocítica (Figura 8). La pérdida del dominio de trimerización produce la desestabilización del nonúmero dando lugar a tres complejos LIP22- $\alpha\beta$. Seguidamente, se corta el extremo C-terminal de LIP22

para generar LIP10, eliminándose los residuos glicosilados situados en el C-terminal del CLIP y permitiendo el acceso de la catepsina S, L o F (según el tipo celular) que cortará y dejará únicamente el péptido CLIP unido al dímero $\alpha\beta$ (Manoury 2003; Neumann 2001).

La estabilidad de la unión MHCII-CLIP varía en función del alelo de DR. El grado de estabilidad podría estar relacionado con el desarrollo de ciertas enfermedades. Así, Mellins y col. mostraron una disminución de la afinidad DR-CLIP en alelos de DR asociados con la artritis reumatoide, sugiriendo que este hecho podría estar implicado en el desarrollo de la enfermedad (Patil 2001). En un trabajo reciente con ratones transgénicos, se ha demostrado, sin embargo, que la disminución de la afinidad MHC-CLIP no afecta al repertorio peptídico ni aumenta la susceptibilidad a la autoinmunidad en este modelo (Honey 2004).

Las diferentes isoformas de Ii juegan también un papel importante en la presentación. La isoforma p41 aumenta el intercambio de CLIP por otros péptidos cuando éste no es eliminado por la acción de HLA-DM (Bevec 1996; Chiva 2003). Por otro lado, esta isoforma tiene un dominio que interacciona con la catepsina L y la inhibe. En el caso de las células epiteliales corticales de timo se ha observado que esta inhibición es responsable de cambios en la actividad proteasa que resultan en una disminución de la selección positiva de células T. Estas diferencias no han sido observadas en APCs derivadas de médula ósea o en modelos de ratones transgénicos $I^{\text{-/-}}$ en los que se introducen estas isoformas, lo que indica que su papel puede ser muy específico del tipo celular (Nakagawa 1998).

1.3.2. HLA-DM

La molécula HLA-DM está formada por dos cadenas polipeptídicas denominadas HLA-DM α y HLA-DM β . La secuencia de esta molécula está muy conservada entre especies y tiene un grado de polimorfismo bajo (Sanderson 1994). A pesar de tener solo un 25% de homología con las moléculas clásicas de MHCII, las estructuras tridimensionales de estas dos moléculas son similares (Fremont 1998; Mosyak 1998). De la misma forma que en MHCII, las cadenas α y β de HLA-DM están ancladas en la membrana y la parte no citoplasmática se dispone formando cuatro dominios: $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y $\beta 1$ y $\beta 2$. Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ forman una estructura similar a una hendidura formada por 8 hojas beta y dos hélices alfa. Sin embargo, estos dominios están alterados de manera que la hendidura es cerrada e incapaz de unir péptidos (Kropshofer 1997). Dos puentes disulfuro en esta zona contribuyen a la estructura cerrada de la hendidura y previenen la flexibilidad de estos dominios al interactuar con la molécula MHCII.

Después de su ensamblaje en el RE, la mayor parte de las moléculas de HLA-DM se dirigen, gracias a la presencia en su cola citoplasmática de un motivo basado en tirosina, hacia

compartimentos de la vía endocítica denominados compartimentos de MHC de clase II o MIIC, donde colocalizan con la molécula de MHCII. En estos compartimentos HLA-DM tiene tres funciones principales (Figura 9):

- ▶ Catalizar la liberación de los fragmentos CLIP y la posterior unión de otros péptidos a las moléculas de MHCII (Fling 1994; Moris 1994).
- ▶ Asociarse y estabilizar moléculas de MHCII vacías (Denzin 1996).
- ▶ Favorecer la liberación de péptidos unidos de forma inestable permitiendo que otros más afines los reemplacen (Kropshofer 1996; Sloan 1995). Este proceso se denomina “edición de péptidos”.

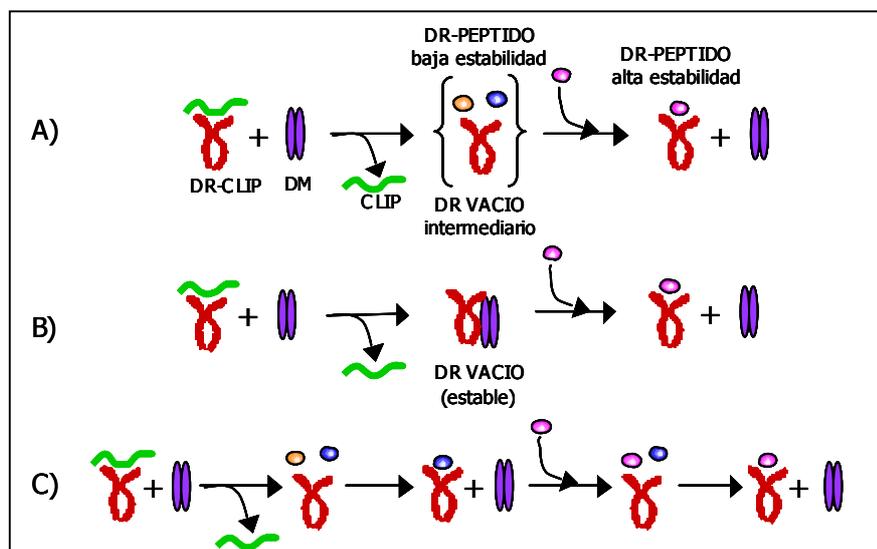


Figura 9: Funciones principales de la molécula HLA-DM en la vía de presentación de péptidos de clase II. A) Liberación del péptido CLIP: DM se une a los complejos $\alpha\beta$ -CLIP y cataliza el intercambio de CLIP por otros péptidos de alta estabilidad. B) Estabilización de moléculas de MHCII vacías: después de la eliminación de CLIP, DM se une a la molécula de DR vacía y la estabiliza hasta que se une a un péptido de alta estabilidad. C) Edición de péptidos: en algunas ocasiones, CLIP se intercambia por péptidos de baja estabilidad. En estos casos DM es capaz de liberar este péptido para permitir que se una un ligando de alta estabilidad.

Existe un pequeño porcentaje de moléculas HLA-DM (10-15%) que se sitúan en la superficie celular y en los endosomas tempranos donde interaccionan con las moléculas de MHCII que se encuentran en la membrana o que se internalizan. Las funciones de estas moléculas son, principalmente, estabilizar las moléculas situadas en la superficie, participar en la presentación de epítopos sensibles a proteasas que se tienen que unir en los endosomas tempranos para no ser degradados durante la proteólisis (Pinet 1998) y modular la presentación de péptidos generados por proteasas externas favoreciendo que péptidos exógenos estables se puedan unir e impidiendo la unión de péptidos exógenos de baja afinidad.

Las moléculas de MHCII existen en las células en un equilibrio entre dos formas: una de conformación compacta o cerrada y una de conformación abierta. Cuando un péptido de alta estabilidad se une al surco de unión, la molécula adopta una conformación cerrada. Cuando el péptido que se une es de baja estabilidad o no hay un péptido asociado, la conformación que adopta es la abierta. En esta conformación las moléculas MHCII se vuelven inestables debido a la exposición de los residuos hidrofóbicos del surco de unión que normalmente están protegidos por el péptido y tienden a desnaturalizarse y agregarse volviéndose inactivas (Sadegh-Nasseri 1992; Stern 1992). La interacción de HLA-DM con MHC estabiliza la conformación abierta permitiendo mantener el surco de unión expuesto durante el tiempo suficiente para la unión de un péptido estable, evitando su degradación y favoreciendo la liberación de péptidos de baja afinidad (Kropshofer 1997; Kropshofer 1999). De esta forma HLA-DM juega un papel importante en la selección del repertorio peptídico, favoreciendo la presentación de péptidos de alta afinidad (Lovitch 2003) o, al menos, capaces de inducir alta estabilidad al complejo (péptidos de alta estabilidad).

HLA-DM interviene también en la disociación de CLIP tal como se ha demostrado en diversos estudios con células y con ratones mutantes deficientes en DM donde se ha detectado una presentación antigénica anormal y una acumulación de complejos MHCII-CLIP (Fung-Leung 1996; Martin 1996; Riberdy 1992; Sette 1992). El papel jugado por HLA-DM varía, sin embargo, en función del alelo de DR (Koonce 2003; Kropshofer 1995). Los alelos DR1 y DR2 son muy dependientes de la acción de DM mientras que DR5 y en menor grado DR3 y DR4 pueden intercambiar CLIP por otros péptidos en ausencia de DM (Avva 1994; Kropshofer 1999; Vogt 1996). Por otro lado, diversos trabajos han relacionado la susceptibilidad a la acción de DM con la estabilidad intrínseca (en ausencia de DM) de la unión péptido-MHC. Mellins y col. demostraron que la estabilidad intrínseca del complejo era un mal predictor de la susceptibilidad de éste a la acción de DM y que factores adicionales relacionados con la estructura del péptido y del bolsillo de unión en su conjunto debían jugar un papel importante en estos procesos (Belmares 2002).

Experimentos *in vitro* han indicado que H2-M podría actuar estabilizando conformaciones específicas del complejo péptido-MHC. En un trabajo reciente se ha descrito como a partir de un mismo péptido (HEL₄₈₋₆₁) presentado por la molécula de MHCII I-A^k, se activan dos poblaciones de células T diferentes que distinguen entre el complejo generado por el procesado intracelular de HEL y el que se forma con el péptido añadido de forma exógena (Pu 2004). Estas diferencias podrían explicarse por la existencia de conformeros de los complejos MHC-péptido que representarían distinta especificidad para los linfocitos T. El tipo de conformeros formado dependería de los compartimentos implicados en la presentación y la molécula DM actuaría favoreciendo una de estas conformaciones.

Se ha demostrado que los niveles de DM pueden influenciar en la presentación de autoantígenos y tener un efecto importante sobre la respuesta mediada por células T. Variaciones en estos niveles podrían estar relacionados con el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Lich 2003)..

En las células epiteliales del timo y en células B existe una segunda molécula auxiliar llamada HLA-DO que actúa como co-chaperona de HLA-DM. Es un heterodímero formado por las cadenas HLA-DN α y HLA-DO β que se ensambla en el RE. Allí, HLA-DO se une a HLA-DM y es transportada a los compartimentos MIIC. Igual que DM, esta molécula no puede unir péptidos. Las características y el nivel de expresión de DO dependen del tipo celular. DO interacciona con DM y modula su actividad de un modo dependiente del pH (Kropshofer 1998). HLA-DO interacciona con HLA-DM formando un complejo que aumenta la estabilidad de la unión MHCII-HLA-DM, aumentando la vida media de estas moléculas y afectando al repertorio peptídico ya que da lugar a repertorios de péptidos más estables. Se ha descrito que DO juega un papel en la selección (edición) de los repertorios peptídicos (Alfonso 2003; Fallas 2004).

1.4. OTRAS CHAPERONAS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Entre las funciones más importantes del RE se incluye el plegamiento y control de calidad de las proteínas recién formadas y la regulación de la homeostasis de calcio. Las proteínas de secreción o de membrana recién sintetizadas tienen que plegarse correctamente en el RE para poder viajar a lo largo de la vía secretora y llegar a su destino celular. Fallos en los procesos de plegamiento dan lugar a la retención de estas proteínas en el RE y su posterior degradación. La correcta maduración y plegamiento están controlados por chaperonas residentes en el RE y por enzimas de plegamiento, en un proceso de control de calidad del RE (Hammond 1994b). Los dos sistemas de chaperonas más importantes en este proceso son el sistema calnexina/calreticulina y el sistema BiP (*Immunoglobulin heavy chain binding protein*) (Kleizen 2004). Los enzimas de plegamiento más abundantes son las óxidoreductasas que catalizan reacciones redox de tioles, dando lugar a la formación de puentes disulfuro.

El sistema calnexina/calreticulina asiste el plegamiento de las glicoproteínas de secreción y membrana y su acción depende de la presencia de N-glicanos monoglicosilados y de regiones sin plegar en las proteínas recién sintetizadas. La proteína residente en el RE UDP-glucosiltransferasa se une a las regiones mal plegadas de estas proteínas y añade un residuo de glucosa al glicano generando el lugar de unión de las chaperonas calnexina y calreticulina. La rotura de esta glucosa por la glucosidasa II anula este lugar de unión y libera la proteína plegada del complejo. Si el plegamiento es correcto la proteína sale del RE. En caso contrario la UDP-

glicosiltransferasa se une de nuevo y se vuelve a repetir el ciclo (Hammond 1994a; Hebert 1995) o bien la proteína sale de la vía de plegamiento y se dirige hacia la vía de degradación asociada al RE (ERAD), que retrotransloca las proteínas mal plegadas al citosol donde son degradadas por el proteasoma.

El sistema de control de calidad basado en BiP depende únicamente de la presencia de regiones sin plegar en las proteínas recién sintetizadas que contienen residuos hidrofóbicos, los cuales son reconocidos por esta chaperona (Flynn 1991). BiP es un miembro de la familia de las proteínas HSP70 y, como todas ellas, regula su interacción con otras proteínas mediante la unión de ATP y ADP. La hidrólisis de ATP a ADP induce que las proteínas HSP70 se unan fuertemente a los sustratos, mientras que el intercambio de ADP por ATP produce un cambio de conformación que libera los sustratos unidos. Se ha demostrado que en los complejos proteína-BiP intervienen un buen número de otras chaperonas y enzimas de plegamiento del RE, incluyendo Grp94, CaBP1, PDI, ER Hsp40, GRP170, Erp72, ciclofilina B, UDP-GT y la proteína SDF1-L1 (Meunier 2002). Tanto BiP como PDI han sido también relacionadas con la vía de degradación ERAD.

1.5. GENERACIÓN DE PÉPTIDOS PRESENTADOS POR MOLÉCULAS DE MHCII

La vía endocítica está formada por una serie de compartimentos denominados compartimentos de MHC de clase II o MIIC. Estos compartimentos varían en su morfología, contenido y propiedades físico-químicas (Mellnam 1996). Podemos dividirlos en tres tipos en función de su pH y su actividad proteolítica: endosomas tempranos (EE), endosomas tardíos (LE) y lisosomas. Los EE son los primeros compartimentos donde entra el material endocitado, tienen un pH ligeramente ácido y poca actividad proteolítica. Los LE son más ácidos y contienen algunas proteasas y las glicoproteínas Lamp 1 y 2 que se suelen utilizar como marcadores moleculares de estos compartimentos. Los lisosomas tienen pH más ácido, son ricos en enzimas y poseen una elevada actividad proteolítica (Neefjes 1999). Los MIIC están interconectados con la parte final del aparato de Golgi y con la membrana plasmática. La parte final del Golgi (trans-Golgi) es el lugar donde las moléculas de MHC que provienen del RE entran en la vía secretora para llegar a la membrana plasmática o se dirigen a cualquiera de los compartimentos del MIIC si contienen en su estructura unas secuencias señal que las dirigen hacia la vía endocítica.

El material antigénico puede entrar en la célula mediante mecanismos como la pinocitosis, la fagocitosis, la autofagocitosis o la endocitosis mediada por receptor (Watts 1997). Una vez en la vía endocítica las proteínas se exponen a las condiciones desnaturizantes y proteolíticas de sus compartimentos, produciéndose una degradación secuencial a medida que van internalizándose en la vía. También sufren este proceso las proteínas de membrana y las

secretadas cuando se internalizan y las proteínas residentes en las vesículas secretoras y endocíticas (Villadangos 2001). Las proteasas endosomales son las principales responsables de la degradación proteica en los MHC. Estas enzimas se sintetizan como precursores inactivos que maduran a su forma activa por autoproteolisis (Bohley 1992) y se clasifican en función del residuo que hidrolizan, siendo las más relevantes una familia de proteasas ácidas denominadas catepsinas. La actividad y estabilidad de cada proteasa depende del pH de forma que cada una tiene su máximo de acción en una localización determinada estando además su actividad afectada por la presencia y/o ausencia de otras proteasas (Honey 2001; Lennon-Dumenil 2002; Lennon-Dumenil 2001). Existen además factores no proteolíticos implicados en la degradación, como la acidificación progresiva de los compartimentos endosomales (Jensen 1993), la acción de enzimas implicados en la reducción de puentes disulfuro (tiol reductasas) o en la eliminación de carbohidratos (Neumann 2001) y la presencia de inhibidores de proteasas endógenos. La mayor parte de los inhibidores de proteasas se encuentran en el citoplasma y en el espacio extracelular y su principal función es asegurar que las proteasas que escapan de los compartimentos endocíticos permanezcan inactivas.

Debido a que el surco de unión a péptido en MHCII está abierto en los extremos, los heterodímeros $\alpha\beta$ pueden unir fragmentos proteicos de diferentes medidas. Es frecuente observar grupos de péptidos que comparten el motivo de unión pero que se extienden en un número variable de aminoácidos desde el extremo C- y/o N-terminal de este motivo (estos grupos de péptidos se denominan *nested [sequence] sets* o series de secuencias anidadas). En la formación de los péptidos de secuencias anidadas parecen intervenir al menos dos mecanismos: una degradación inicial de la proteína, que genera polipéptidos que exponen el motivo de unión, y el recorte por exopeptidasas de los extremos del péptido que sobresalen del surco de unión (Sercarz 2003; Villadangos 2000).

Se han descrito otros mecanismos alternativos para la generación de péptidos de clase II. En primer lugar, las proteínas extracelulares se pueden degradar en el exterior de la célula por proteasas solubles o de membrana (Dong 2000; Larsen 1996) generando péptidos que se pueden unir directamente a MHCII en la superficie desplazando otros péptidos de menor afinidad o pueden ser internalizados hacia la vía endocítica e incorporados a la vía normal de carga de péptidos. Se ha demostrado asimismo que péptidos generados en el citosol, probablemente mediante degradación por el proteasoma o las calpaínas, pueden ser presentados por moléculas de MHCII mediante su translocación a los compartimentos endocíticos (Lich 2000) y que los complejos MHCII-péptido pueden detectarse ya en los lisosomas (Dani 2004). Se ha descrito que esta presentación es dependiente de las chaperonas Ii y HLA-DM (Dani 2004). Existen además numerosos trabajos en los que se describen péptidos unidos a MHCII derivados de proteínas citosólicas propias, sugiriendo que esta vía alternativa tiene importancia en la regulación de la respuesta inmune y de la tolerancia. Los mecanismos implicados en el

transporte de los péptidos desde el citosol a la vía endocítica son poco conocidos. El transportador TAP, encargado de este proceso en la vía de clase I, no parece ser necesario en el caso de clase II para la presentación de péptidos citosólicos. Así, en macrófagos de ratones deficientes para TAP1 no se detectan diferencias en los repertorios peptídicos con respecto a los macrófagos TAP1⁺. Estos datos sugieren la existencia de un nuevo mecanismo de transporte de estos péptidos desde el citosol a la vía endocítica. En este sentido, existen datos que indican que las sulfonamidas, inhibidores de la acción de los transportadores ABC, inhiben la presentación de antígenos citosólicos por moléculas de MHCII (Rajagopal 2004, Malnat 1992, Jaraquemada 1991).

1.6. RECONOCIMIENTO DEL COMPLEJO MHCII-PÉPTIDO

Las células T se dividen en dos grupos con funciones distintas y que se diferencian por la expresión en la membrana de los correceptores CD4 y CD8. Las células CD8⁺ reconocen las moléculas de MHC I y son activadas para destruir células que presentan fragmentos derivados de patógenos citosólicos, mientras que las CD4⁺ reconocen las moléculas de MHCII unidas a péptidos derivados de patógenos exógenos activando otras células efectoras del sistema inmunitario que destruyen los agentes patógenos (Figura 10) (Cresswel 1994; Germain 1994; Germain 1992).

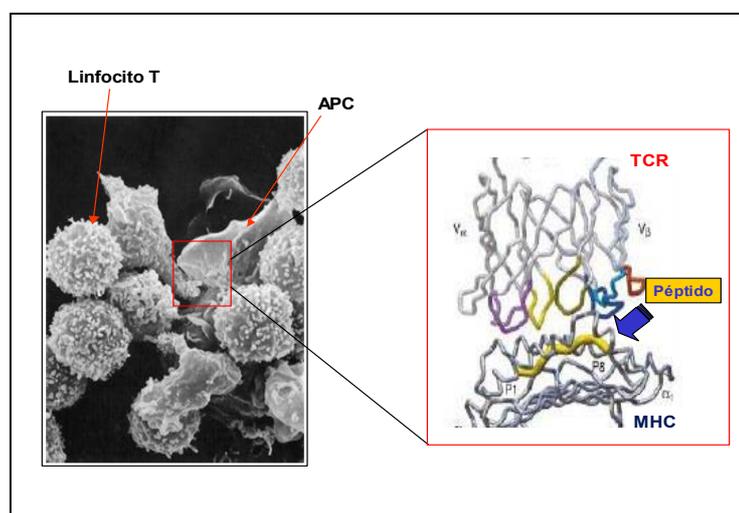


Figura 10: Interacción entre el TCR y el complejo MHCII-péptido.

El receptor de la células T (TCR) reconoce los complejos MHC-péptido presentados por las APCs. Las estructuras tridimensionales de diversos complejos MHC-péptido-TCR elucidadas mediante rayos X han permitido la identificación de puntos de contacto que son claves para el reconocimiento y la posterior repuesta de la célula T (Garboczi 1996; Hennecke 2002; Rudolph 2002). El TCR es un complejo multiproteico formado por un dímero transmembrana $\alpha\beta$ unido covalentemente y asociado de forma no covalente con las subunidades α , δ y ϵ y el homodímero $\zeta\zeta$ de CD3 . Las cadenas $\alpha\beta$ presentan regiones variables específicas de cada célula que son las que le dan la especificidad, mientras que las proteínas CD3 son las responsables de la transducción de la señal al interior celular cuando el TCR interacciona con un ligando (Janeway 1994). La respuesta final de los linfocitos es la inducción de la expresión de nuevos genes a través de la activación de factores de transcripción.

2. AUTOINMUNIDAD Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La maduración de los linfocitos T tiene lugar en el timo a través de la interacción de los TCR de los timocitos con péptidos propios unidos a las moléculas de MHC que se expresan en el estroma tímico. Esta maduración se realiza en dos etapas. En la primera tiene lugar una selección positiva que requiere una interacción mínima entre los complejos MHC-péptido de las células epiteliales corticales del timo y el TCR para que el timocito sobreviva. En una segunda etapa, la selección negativa, los TCR vuelven a interactuar con complejos MHC-péptido en las células epiteliales y dendríticas de la médula tímica, eliminándose los que presentan una interacción fuerte (delección tímica de linfocitos T autorreactivos). Una incompleta selección negativa durante el proceso de maduración puede ser un posible mecanismo que contribuya al desarrollo de las enfermedades autoinmunes ya que pueden llegar a sangre periférica células T que reconocen antígenos propios

La autoinmunidad es la respuesta inmune frente a componentes propios, que cuando causa patología da lugar a las llamadas enfermedades autoinmunes.. Las enfermedades autoinmunes son multifactoriales y muy complejas, distribuyéndose en un rango amplísimo que va desde aquellas en que la respuesta inmune está dirigida a antígenos específicos de un órgano o un tejido, de forma que la patología se restringe a determinados órganos (llamadas enfermedades órgano-específicas). Al otro extremo están las llamadas enfermedades sistémicas o no-órgano-específicas, en que la respuesta inmune va dirigida a moléculas ubicuas. La figura 11 muestra una lista que muestra las más comunes de estas enfermedades, según esta clasificación.

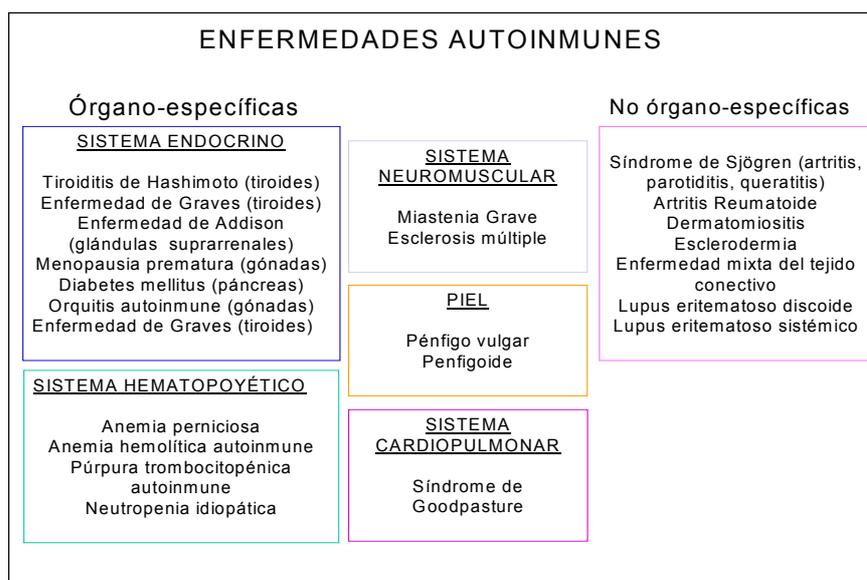


Figura 11: Las enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan comúnmente por la presencia en el suero de autoanticuerpos reactivos frente a proteínas autólogas (autoantígenos), y la presencia de infiltrados linfocitarios crónicos en los tejidos afectados. No se conocen las causas exactas que desencadenan la autoinmunidad pero existen factores genéticos de susceptibilidad a sufrir una determinada enfermedad. Uno de los factores con mayor incidencia y a la vez más estudiado es el HLA. Existe una asociación muy importante entre la expresión de determinados alelos de MHC y algunas enfermedades (Gebe 2002). En la tabla III se muestra un listado de algunas enfermedades autoinmunes y su asociación con alelos de HLA de clase I y de clase II.

Tabla III: Alelos de HLA asociados con algunas enfermedades autoinmunes.

Enfermedad	Alelo HLA
Espondilitis anquilosante	B27
Uveítis anterior aguda	B27
Síndrome de Goodpasture	DR2
Esclerosis múltiple	DR2
Enfermedad de Graves	DR3
Miastenia grave	DR3
Lupus eritromatoso sistémico	DR3
Diabetes mellitus tipo I	DR4/DR4
Artritis reumatoide	DR4
Pénfigo vulgar	DR4
Tiroiditis de Hashimoto	DR5

Otros factores como el sexo, factores hormonales y factores ambientales también influyen en la predisposición a la enfermedad, sobre todo en el caso de enfermedades autoinmunes endocrinas en las que los niveles hormonales tienen un papel importante. Por otra parte, diversas alteraciones en los linfocitos pueden generar un fallo de la tolerancia a moléculas propias dando lugar a una situación de autoinmunidad. Ejemplos de estas alteraciones podrían ser una selección anormal del repertorio de linfocitos, una activación policlonal de linfocitos autoreactivos o la estimulación de la respuesta inmune por antígenos extraños que generan reactividad cruzada con anticuerpos. En este estudio nos limitaremos a analizar una posible función de las moléculas de MHC de clase II en autoinmunidad como presentadoras de péptidos autólogos.

2.1. AUTOINMUNIDAD TIROIDEA

En las enfermedades autoinmunes que afectan tejidos endocrinos la diana de la respuesta inmune son a menudo las propias células epiteliales endocrinas, que se caracterizan por un elevado grado de diferenciación y por expresar moléculas específicas del tejido. Las enfermedades tiroideas autoinmunes (AITD, *autoimmune thyroid disease*) están incluidas dentro

de este grupo. Las principales AITD son tres: tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario y enfermedad de Graves-Basedow. En el trabajo presentado en esta tesis se utilizó material de tiroides de pacientes afectados por la enfermedad de Graves-Basedow para identificar péptidos presentados por MHCII .

2.1.1. EL TIROIDES

La glándula del tiroides es un órgano situado en la región anterior del cuello que consta de dos lóbulos simétricos adosados a los lados de la tráquea y la laringe y unidos entre sí por un istmo. La glándula consta de folículos tiroideos agrupados, revestidos por un epitelio cúbico simple formado por células foliculares (tirocitos) que secretan las hormonas tiroideas y rellenos de una sustancia denominada coloide, compuesto principalmente de tiroglobulina y hormonas tiroideas almacenadas. Situadas entre los folículos tiroideos se encuentran las células parafoliculares que secretan calcitonina (Figura 12).

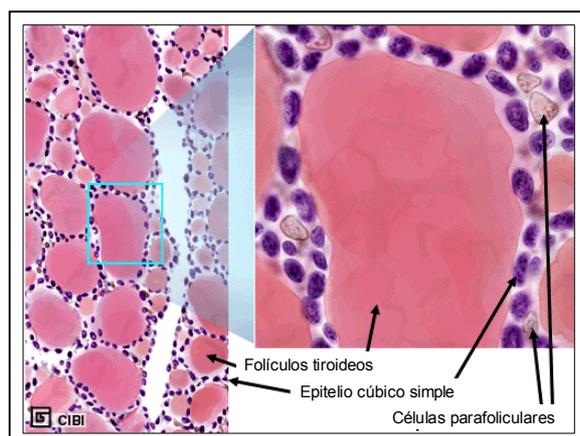


Figura 12: Estructura del tejido tiroideo

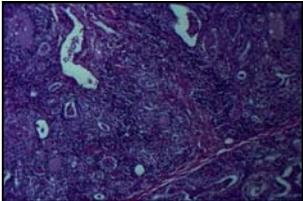
Las hormonas secretadas por el tiroides son la tetrayodotironina o tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3). Normalmente, la hormona T4 se encuentra en cantidades 10 veces superiores a las de T3. Estas hormonas se encuentran almacenadas en el interior del coloide formando parte de la tiroglobulina iodada. La tiroglobulina se sintetiza en el RE y se glicosila en el aparato de Golgi. Las células foliculares además expresan un enzima denominado peroxidasa tiroidea (TPO) que se sitúa en la membrana plasmática de la célula donde oxida el yodo captado. Este yodo se incorpora a los grupos tirosina de la tiroglobulina que se sintetiza en la célula, formando la tiroglobulina yodada que se almacena en el interior del coloide. La función de la glándula tiroide está controlada por la hormona estimuladora del tiroides o tirotrópina (TSH)

secretada por la hipófisis y que se une a los receptores específicos que expresan las células foliculares, estimulando la captación de yodo, la síntesis de tiroglobulina y la liberación de hormonas tiroideas, cuya presencia regula el sistema mediante un *feed-back* negativo. También hay una autoregulación tiroidea ligada a la cantidad de yodo presente en el organismo.

Las células foliculares tiroideas son células polarizadas. Por una parte, las vesículas que contienen la tiroglobulina recién sintetizada se mueven hacia el polo apical y liberan su contenido al coloide por exocitosis. Cuando el tiroides está estimulado aparece el tráfico en la otra dirección, formándose vacuolas que endocitan el coloide almacenado y se funden con los lisosomas de manera que los enzimas lisosomales degradan la tiroglobulina almacenada para liberar las hormonas tiroideas que son liberadas en la base de la célula y transportadas por la sangre unidas a una globulina (TBG).

2.1.2. ENFERMEDAD DE GRAVES-BASEDOW

Graves- Basedow



Infiltración linfocitaria	+ / ++ Infiltrado difuso CD4>CD8 Folículos linfoides secundarios
Autoanticuerpos:	
Anti-tiroglobulina	+
Anti-TPO	+++
Anti-recep.TSH-R	++
Daño del tejido	Hipertrofia e hiperplasia
Predisposición genética	
HLA - clase II	DR3, DQw2
HLA - clase III	TNFβ, hsp70
genes no - MHC	CTLA-4

Figura 13: Características de la enfermedad de Graves-Basedow

Es la enfermedad autoinmune tiroidea más frecuente y afecta principalmente a mujeres de entre 30 y 40 años. Histológicamente, la glándula está aumentada de tamaño y muy vascularizada. Las células foliculares se encuentran aumentadas en número y en tamaño, observándose un aumento de la altura del epitelio y una disminución de la luz del folículo. Esta patología está caracterizada principalmente por la presencia en el suero de los pacientes de anticuerpos anti-receptor de la tirotropina (anti-TSH-R) que estimulan el tiroides hipertrofiando el tejido y sobreestimulando la función tiroidal (Figura 13). También detectan en muchos pacientes autoanticuerpos anti-tiroglobulina y anti-peroxidasa tiroidal (anti-TPO), comunes con otras AITD.

Además, existe una infiltración linfocitaria difusa formada principalmente por células T (CD4>CD8). La presencia de autoanticuerpos y de un infiltrado linfocitario indica que en la patogenia de esta enfermedad interviene tanto la respuesta inmune humoral como la celular.

2.1.3. LAS MOLÉCULAS DE MHC DE CLASE II EN LA AUTOINMUNIDAD TIROIDEA

Se ha demostrado que en células del tiroides de pacientes hay una sobreexpresión de diversas moléculas implicadas en la respuesta inmune entre ellas las moléculas de clase I y de clase II, estas últimas ausentes en las células foliculares de tiroides sanos (Catafamo 1997; Todd 1987), moléculas de adhesión, citocinas y proteínas reguladoras del complemento (Grubeck-Loebenstein 1989; Zheng 1991). También se ha visto que estas células epiteliales pueden presentar complejos MHCII-péptido derivados de proteínas propias que son capaces de activar las células T (Maile 2000). Se ha descrito una posible predisposición genética a la enfermedad de Graves asociada a los alelos de clase II DR3 y DQw2 (Yanagawa 1993) y a otras proteínas codificadas por el MHC como son el TNF β y la HSP70 (Badenhoop 1992; Ratanachaiyavong 1991), y también se ha relacionado esta enfermedad con un polimorfismo en el gen CTLA-4 en los linfocitos T (Braun 1998). Además, se ha observado que la inducción por INF γ de las moléculas de HLA de clase II en células foliculares de tiroides de pacientes de Graves-Basedow era superior a las de tiroides no autoinmunes, sugiriendo la existencia de un polimorfismo en la región reguladora de la expresión de clase II que facilitaría la inducción de la expresión y podría predisponer a la enfermedad (Sospedra 1995).

3. APROXIMACIONES EXPERIMENTALES APLICADAS AL ESTUDIO DE LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA.

Una de las herramientas más utilizadas en el estudio de la presentación antigénica es el uso de líneas celulares o de ratones deficientes en proteínas implicadas en las vías de presentación. Se han realizado numerosos estudios con ratones deficientes en TAP, en Ii o en H2-M (Bikoff 1993; Dani 2004; Fung-Leung 1996; Martin 1996; Rajagopalan 2003; Viville 1993) que han permitido conocer la función de estas proteínas *in vivo*. Los estudios con dobles mutantes han permitido evaluar tanto la función de la proteína en estudio como su comportamiento en presencia o ausencia de otras moléculas (Kenty 1998; Kovats 1998). La función de las moléculas implicadas en la presentación se ha estudiado además utilizando inhibidores de estas proteínas (Lich, Elliot and Blum 2000; Plüger 2002).

Mediante el estudio *in vitro* de los patrones de corte por diferentes proteasas se han caracterizado las actividades enzimáticas involucradas en el procesamiento de las proteínas (Lich 2000; Plüger 2002; Sesma 2003) y se ha demostrado la diferente actividad enzimática del proteasoma 20S en condiciones normales y de activación (inmunoproteasoma) (Tenzer 2004).

También está directamente relacionado con la presentación antigénica el estudio de la conformación y estructura de los complejos MHC-péptido mediante análisis cristalográficos. Gracias a esta técnica se conocen perfectamente las estructuras de numerosas moléculas de MHC, tanto de clase I como de clase II, y la forma en la que estas interactúan con los péptidos presentados (Dessen 1997; Lee 2001; Stern 1994) y se han podido diseñar programas de modelización que permiten el diseño *in silico* de posibles epítomos antigénicos. En el estudio de las interacciones MHC-péptido también se incluyen estrategias basadas en la realización de sustituciones en aminoácidos implicados en la unión, tanto del péptido como de la propia molécula de MHC, y la evaluación de dichas modificaciones sobre la afinidad de la unión (ver I.1.1.2) y sobre el reconocimiento de estos complejos por parte de los linfocitos T (Volz 2004; Zabala-Ruiz 2004).

Entre las aproximaciones experimentales para el estudio de la presentación, las relacionadas con la identificación de los repertorios peptídicos asociados a las moléculas de MHC tienen una especial importancia, ya que estos péptidos son clave en la respuesta inmune y el reconocimiento de antígeno por los linfocitos T. Se han realizado numerosos trabajos de caracterización de repertorios peptídicos, la mayoría a partir de líneas celulares (Dongre 2001; Hunt 1992b; Lippolis 2002; Muntasell 2002). El número de estudios realizados sobre tejidos es sin embargo mucho menor. El primer trabajo de identificación de péptidos de clase II en material *ex vivo* se realizó en bazo: en ese trabajo se partió de 50 gramos de tejido a partir del cual pudieron caracterizarse un total de 17 ligandos peptídicos (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). En esta tesis se reporta, por primera vez, la caracterización de péptidos asociados a HLA-DR en tejido humano afectado por una enfermedad autoinmune (apartado IV.5).

Como ya se indicó en I.1.1.2 los primeros estudios de secuenciación de péptidos de MHC se llevaron a cabo aplicando estrategias de secuenciación en *pool* utilizando la degradación de Edman. Esta técnica permitió la identificación de rasgos comunes a los péptidos asociados a estas moléculas y la caracterización del polimorfismo alélico y su influencia en la especificidad de los ligandos. En 1991 se consiguieron identificar por primera vez péptidos individuales asociados a MHCI (Jardetzky 1991) y MHCII (Rudensky 1991) utilizando la degradación de Edman sobre fracciones obtenidas por separación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del eluido peptídico. A pesar de que estos experimentos se realizaban con cantidades muy altas de células (10^{10} células) la sensibilidad de la técnica permitía detectar únicamente aquellos péptidos de mayor abundancia en el repertorio. Esta situación mejoró de forma importante con la introducción de la espectrometría de masas (EM) como alternativa a la secuenciación de Edman para la caracterización de estos péptidos, siendo esta técnica la más eficiente y ampliamente utilizada hoy en día para este propósito

3.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

La espectrometría de masas es una tecnología que permite producir iones en fase gaseosa a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, clasificarlos en función de su relación masa-carga (m/z) y medir su intensidad. Mediante esta técnica puede determinarse el peso molecular y la abundancia de los componentes de una mezcla. Los iones analizados pueden corresponder a moléculas enteras, aductos o fragmentos de moléculas. El análisis de fragmentos iónicos formados a partir de una determinada molécula provee, además, de información sobre la estructura química de ésta.

Un espectrómetro de masas está formado por tres partes: la fuente de iones, el analizador y el detector. Las muestras a analizar son introducidas en la fuente de iones donde los componentes de la muestra son convertidos en iones en fase gaseosa. Estos iones son transferidos al analizador donde son acelerados y separados según su relación m/z utilizando diferentes principios físicos según el tipo de analizador. Los analizadores se clasifican en cuatro grupos: de sectores (eléctricos y/o magnéticos), de cuadrupolo (Q), de tiempo de vuelo (TOF) y de atrapamiento de iones (analizadores de resonancia ciclotrónica (ICR) y trampas iónicas (IT)).

Tabla V: Técnicas de ionización a partir de moléculas no volátiles utilizadas en EM.

Evaporación e ionización por campos eléctricos		
<i>Muestra</i>	<i>Campo eléctrico</i>	<i>Técnica</i>
Sólida	Débil	Plasma acoplado por inducción (ICP)
"	Fuerte	Ionización de campo (FI) y desorción de campo (FD)
Líquida	Débil	Termospray (TSP)
"	Fuerte	Electrospray (ESI), Ionización química a presión atmosférica (APCI).
Impacto por partículas		
<i>Muestra</i>	<i>Partículas</i>	<i>Técnica</i>
Sólida	Iones de alta energía	Desorción por plasma de ²⁵² Cf (PD)
"	Iones de baja energía	Espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS).
Líquida	Iones/neutro de baja energía	Bombardeo con átomos o iones acelerados (FAB, LSIMS)
Desorción por láser		
Ionización por láser asistida por matriz (MALDI)		

Por otro lado existe una gran variedad de métodos de ionización que se pueden dividir en suaves y duros, según la cantidad de energía que transfieren a las moléculas analizadas (Tabla V). Los métodos suaves generan iones en fase gaseosa con poca energía residual después de la ionización, mientras que los métodos duros depositan un exceso de energía sobre la muestra que origina la producción de múltiples fragmentos iónicos a partir de las moléculas originales.

La aplicación de la EM a la secuenciación de péptidos fue descrita por primera vez por Vilkas y Lederer hace 37 años. Estos autores desarrollaron un método de derivatización que convertía los péptidos en sustancias volátiles y térmicamente estables y los analizaron por introducción directa en una fuente de impacto electrónico utilizando una sonda de sólidos. La cantidad de péptido requerida para este análisis fue de 10-100 nmol (Vilkas 1968). Posteriormente Hunt y col. reportaron la secuenciación de diversos neuropéptidos con longitudes de secuencia entre 7-9 aminoácidos derivatizados a niveles de picomoles utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con una fuente de ionización química (Hunt 1981). En estos análisis, la complejidad de los espectros obtenidos aumentaba con el tamaño del péptido por lo que para obtener espectros con información estructural comprensible debían utilizarse péptidos de pequeño tamaño obtenidos por hidrólisis química o enzimática de la proteína en estudio. Estos péptidos se analizaban mediante ionización electrónica, ionización química o por espectrometría de masas de iones secundarios (FAB) (Hunt 1985; Hunt 1986). De esta forma era posible obtener, en un único experimento, información de secuencia con un recubrimiento del 25-60% a partir de una proteína de 50 kDa en cantidades de 10 nmoles. El peso molecular máximo de los péptidos analizados estaba limitado entre 0.5 kDa (IE) y 1-5 kDa (FAB) debido tanto a las dificultades para ionizar moléculas de gran tamaño y termolábiles como para obtener información de secuencia útil mediante espectrometría de masas en tándem.

La aparición, a finales de los años 80, de la ionización por electrospray (ESI) y la ionización por láser asistida por matriz (MALDI) permitieron solucionar estos problemas (Fenn 1989; Karas 1988). Estas técnicas de ionización suaves permiten la generación de iones a partir de analitos no volátiles y de elevado peso molecular, como son los péptidos y proteínas, sin una fragmentación significativa y son, debido a su eficiencia, las dos técnicas preferidas actualmente para el análisis de estas moléculas. Además, la formación de iones múltiplemente cargados de los péptidos en la ionización por ESI permite su detección y fragmentación en aparatos convencionales (analizadores de baja energía y con rangos de masa limitados) y da lugar a patrones de fragmentación fácilmente interpretables.

La EM se introdujo en el campo de la inmunología en los años 90 cuando los grupos de Hunt y Engelhard realizaron el primer estudio de identificación de péptidos asociados a moléculas de MHC I utilizando la ionización por ESI (Hunt 1992a). En este estudio, a partir de 10^8 células se identificaron 8 péptidos de los cuales 4 pudieron ser asignados a proteínas conocidas. Estos autores separaron los componentes del repertorio utilizando columnas cromatográficas de fase reversa de 75 μm de diámetro interno acopladas directamente a una fuente ESI. Utilizando un analizador de triple cuadrupolo, consiguieron límites de detección del orden de los 30 fmol. Poco después se aplicó esta tecnología al estudio de los péptidos asociados a MHC II (Hunt 1992b). La mayor complejidad de estas muestras hizo necesario un fraccionamiento previo adicional de los extractos peptídicos totales con objeto de simplificar las mezclas analizadas por EM. En este trabajo se identificaron 9 péptidos con una longitud de 16 a 18 aa detectándose la presencia de grupos de secuencias anidadas y confirmándose el carácter abierto del surco de unión en el caso de clase II sugerido por los análisis de secuenciación en *pool*.

Hoy en día, la EM se ha convertido en una de las herramientas más potentes para la caracterización de péptidos y proteínas implicados en este u otros procesos celulares. En este trabajo en concreto utilizaremos métodos de ionización por ESI y MALDI para la identificación de moléculas implicadas en las vías de presentación. Estas técnicas se describen mas detalladamente a continuación.

3.1.1. IONIZACIÓN POR LÁSER ASISTIDA POR MATRIZ (MALDI)

El MALDI (Karas 1990; Karas 1988; Tanaka 1988) utiliza pulsos de luz láser (nanosegundos) en la frecuencia del UV o del IR lejano para desorber e ionizar la muestra previamente cristalizada junto a un compuesto denominado matriz. La matriz que se utiliza para la cristalización tiene dos funciones: la incorporación y dispersión de las moléculas del analito y la absorción de la energía de radiación para producir iones del analito a través de reacciones fotoquímicas. Las matrices

más empleadas para el análisis de péptidos y proteínas son los ácidos sinapínico y α -ciano-4-hidroxicinámico, aunque para cada aplicación se han optimizado matrices que favorecen la formación de iones específicos. La transferencia de energía se realiza preferentemente mediante absorción resonante implicando transiciones electrónicas (láser UV) o cambios en los estados rotacionales o vibracionales (láser IR). La energía absorbida produce una ablación de la superficie de la muestra y la vaporización e ionización de las moléculas de analito.

En MALDI, los iones del analito se forman principalmente por protonación o deprotonación de las moléculas para dar iones monocargados aunque también se observan iones con 2 o más cargas en el caso de proteínas con pesos moleculares superiores a 5000 Da. El peso molecular de las proteínas de mayor tamaño que pueden analizarse mediante esta técnica supera los 400 kDa. El acoplamiento de esta fuente de ionización con analizadores de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) es un método estándar para el análisis de péptidos y proteínas. El método se caracteriza por su robustez, sencillez de manejo y capacidad de automatización, así como por su alta sensibilidad y relativa tolerancia a sales y otras interferencias. Uno de sus principales inconvenientes es que no existen actualmente sistemas que permitan el acoplamiento *on-line* de esta fuente de ionización con técnicas de separación como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la electroforesis capilar (CZE).

Aunque el analizador TOF es el más comúnmente utilizado con fuentes MALDI (Cotter 1999), también se han comercializado sistemas con analizadores de trampa iónica o híbridos como el qTOF. En un espectrómetro MALDI-TOF los iones formados en la fuente se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico. Estos iones adquieren la misma energía cinética durante la aceleración por lo que iones con distinta masa presentan “velocidades de vuelo” distintas, de forma que los iones más pequeños atraviesan más rápidamente el analizador (tubo de vuelo). El tiempo que tarda cada ión en incidir en el detector a la salida del tubo de vuelo depende de su relación masa-carga y de su energía cinética. Considerando constantes la carga y la energía cinética de los iones formados, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones. Desafortunadamente, los iones en la fuente MALDI no surgen de una fuente puntual por lo que aparecen discrepancias entre las energías cinéticas de iones de la misma masa en el momento de entrar en el tubo de vuelo. Este efecto era el responsable de la baja resolución¹ de los primeros analizadores TOF. Los analizadores modernos han compensado estos problemas recurriendo a estrategias denominadas de extracción retardada (*Delay Extraction*) y a la utilización de tubos de vuelo provistos de un reflectrón o espejo de iones. Este dispositivo genera un campo electrostático donde los iones de mayor energía cinética penetran más profundamente que los de menor energía antes de ser

¹ La resolución determina la capacidad de un analizador para separar dos señales de masas similar. Una forma de expresar su valor denominada FWHM (full weight, half mass) es como la razón entre el valor m/z de una señal y la anchura de esta a media altura.

rebotados, de manera que todos llegan al detector al mismo tiempo. Utilizando el reflectrón, los instrumentos MALDI-TOF permiten alcanzar una resolución de 10000 a 15000 (FWHM, a m/z 1300) y caracterizar la masa de los péptidos con un error de 20-100 ppm.

3.1.2. IONIZACIÓN POR ELECTROSPRAY (ESI)

El ESI (Aleksandrov 1985; Fenn 1989; Whitehouse 1985; Yamashita 1984) es una técnica de ionización a presión atmosférica en la que una solución de la muestra es nebulizada a la salida de un tubo capilar por la acción de un fuerte campo eléctrico (Figura 14).

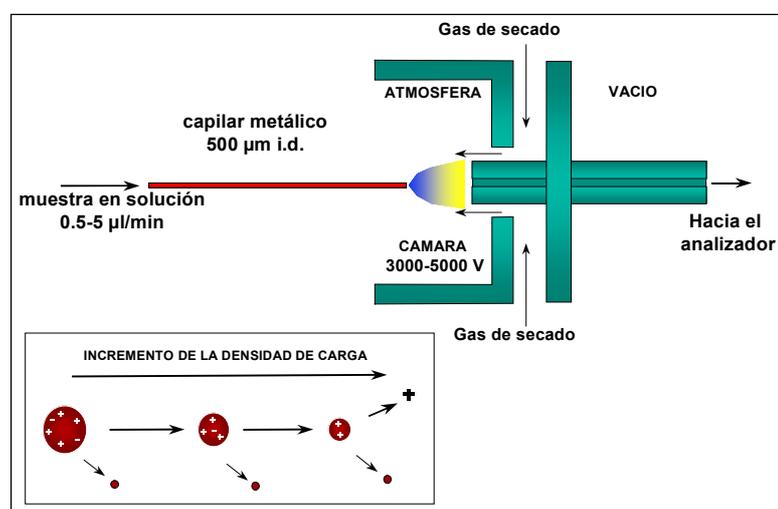


Figura 14: Fuente de electrospray. Las sustancias en solución son introducidas en la fuente a través de un tubo capilar a cuya salida se produce la nebulización gracias a un fuerte campo eléctrico. El electrospray forma gotas cargadas que por evaporación llegan a generar iones policargados del analito en fase gaseosa. Estos iones son introducidos dentro del EM para su análisis (Modif. de Abian 1999).

El spray producido está formado por gotas cargadas conteniendo iones de los analitos. Estos iones pueden pasar a fase gaseosa bien a través de procesos de desolvatación de la gota, bien por desorción directa de iones desde la gota debido a la alta tensión electrostática en el interior de ésta. Este tipo de ionización, que tiene lugar a presión y temperatura ambiental, es extremadamente suave, permitiendo producir no solo iones de la molécula intacta, incluso cuando ésta contiene enlaces lábiles, sino también de complejos formados a través de interacciones no covalentes (Farmer 1998).

La ionización por ESI produce frecuentemente iones multicargados. El tipo y número de iones producidos mediante electrospray reflejan directamente los equilibrios ácido-base existentes en la solución. El grado de carga de un determinado ión depende de su estructura (presencia de grupos básicos o ácidos) y del disolvente utilizado. En el caso de un péptido o proteína el número de cargas de cada ión está directamente relacionado con el número de residuos básicos de la molécula (Arg, Lis, His, Pro y el amino terminal). Dado que al aumentar el tamaño de un péptido aumentan también el número de residuos capaces de adquirir carga, la relación masa-carga de los iones producidos a partir de péptidos y proteínas con importantes diferencias de tamaño suelen encontrarse siempre en el rango de 700 a 2000 de forma prácticamente independiente de la masa (Figura 15). Este fenómeno permite el análisis de iones de compuestos con pesos moleculares muy superiores al límite de barrido de los analizadores comúnmente utilizados con esta técnica. Por ejemplo, el ESI acoplado a un analizador de cuadrupolo (cuya masa límite se encuentra normalmente en 4000 Da) permite determinar el peso molecular de péptidos y proteínas de masas superiores a 100 kDa.

$$m/z = \frac{M + n}{n}$$

Figura 15: Ecuación que describe la distribución de las señales iónicas observadas en un espectro de masas derivadas de una molécula de masa M que puede tomar n protones para generar iones con n cargas.

Las fuentes actuales denominadas de microspray (Emmett 1994; Wilm 1994) son las más parecidas a la fuente original de electrospray desarrollada por Fenn. Existen además otras dos variantes del ESI original que se diferencian en el flujo de solvente que soportan: las denominadas fuentes de electrospray asistido neumáticamente (ionspray, turbospray) (Bruins 1987) capaces de asumir flujos muy elevados (5-500 $\mu\text{l}/\text{min}$) y desarrolladas con objeto de poder acoplar los espectrómetros de masas a sistemas cromatográficos convencionales y las de nanospray (nESI) que trabajan a flujos por debajo del microlitro por minuto.

Esta última variante desarrollada por Wilm y Mann en 1995 (Wilm 1994), es la más sensible y permite llevar a cabo análisis de muestras de las que se dispone de poco volumen o en las cuales los analitos se encuentran en una concentración muy baja (Figura 16).

La diferencia de diseño más importante entre las fuentes ESI y nESI reside en el diámetro interno del capilar que contiene la muestra: en el ESI el capilar tiene un diámetro interno de 500 μm , mientras que en el nESI se utilizan capilares que a la salida tienen un diámetro interno de 1 o 2 μm . Esta diferencia determina las principales características de la fuente de nESI:

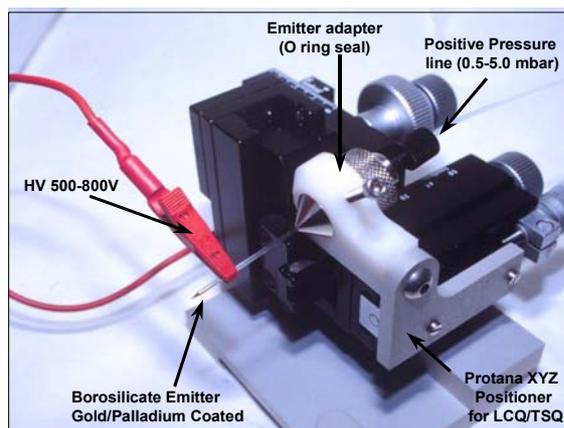


Figura 16: Fuente de nanoelectrospray. Diseño original comercializado por la empresa Protana en 1997 (hoy MSD Proteomics) y utilizado en este trabajo.

- ▶ Flujo de trabajo entre 20-40 nl/min que implica
- ▶ un consumo mínimo de muestra
- ▶ y una mayor eficiencia en la ionización y en el número de iones sometidos al análisis de masas (los iones se producen con más eficiencia a medida que el tamaño medio de las microgotas del spray disminuye. En nESI se generan gotas de tamaño inferior a 200 nm, entre 100 y 1000 veces más pequeñas que las producidas en una fuente ESI. Además, el pequeño tamaño de los sprays formados en nESI permite la introducción de una fracción mayor de los iones hacia el interior del EM).
- ▶ Con relación a una fuente ESI, el nESI es más tolerante con la composición y el pH de los medios analizados y permite pulverizar soluciones conteniendo hasta 0.1M de sales.

Las fuentes de electrospray se pueden combinar con diferentes analizadores de masa. Para los análisis realizados en esta tesis se ha utilizado un analizador de trampa iónica acoplado a fuentes de micro y nanoelectrospray ya que cuando se iniciaron estos estudios esta instrumentación constituía la combinación más sensible y eficiente para este propósito. Aun hoy en día estos sistemas presentan características que les confieren ciertas ventajas frente a otras técnicas para este tipo de análisis.

La trampa iónica (Todd 1991) es el análogo tridimensional del analizador de cuadrupolo, uno de los analizadores de iones más eficientes cuyos principios fueron descritos por Paul y Steinweger en 1953 (Paul 1953). Fruto de estos trabajos, Paul recibió el premio Nobel de física en 1989. La trampa iónica consiste en un recinto definido por tres electrodos: un electrodo anular (*ring electrode*) y dos electrodos de superficie hiperbólica denominados electrodos de cierre (*endcap electrodes*) que se sitúan a modo de tapaderas a cada lado del electrodo anular. Estos electrodos de cierre tienen en el centro un pequeño agujero que permite a los iones pasar dentro o fuera de la cavidad. La aplicación de un voltaje de RF al electrodo anular produce un campo eléctrico tridimensional que es el responsable del atrapamiento de los iones dentro de la

cavidad. En condiciones adecuadas estos iones oscilan en órbitas estables que pueden mantenerlos confinados en interior de la trampa durante un tiempo indefinido. La presencia de un gas inerte (He) en el interior de la trampa “enfría”, a través de procesos de colisión, los iones ayudando a la estabilización de sus órbitas. El potencial RF utilizado para el atrapamiento puede aumentarse hasta el denominado voltaje de resonancia para el cual los iones de una determinada relación masa/carga adquieren oscilaciones inestables y son expulsados en dirección al detector, situado detrás de uno de los electrodos de cierre. A partir del potencial necesario para la expulsión de un determinado ión puede determinarse de forma muy precisa el valor m/z de éste.

3.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (MS/MS)

El análisis por EM mediante las técnicas descritas anteriormente, provee de información molecular muy precisa sobre los péptidos o proteínas analizadas, si bien la información sobre su secuencia es muy limitada o nula. Para obtener este tipo de información debe recurrirse a la espectrometría de masas en tándem o MS/MS. Mediante esta técnica un ión generado en la fuente de ionización es aislado (ión precursor) y sometido a procesos que producen su fragmentación. La información estructural de la molécula se deriva del análisis de la colección de iones fragmento producidos. Este procedimiento puede llevarse a cabo de dos formas: separando las operaciones de selección del precursor y análisis de los fragmentos en el espacio o separándolas en el tiempo.

El primer procedimiento implica la utilización de dos analizadores dispuestos en serie (tándem) (Por ejemplo, dos cuadrupolos, un sector magnético con un cuadrupolo o dos tiempos de vuelo). El ión precursor se selecciona en el primer analizador y se fragmenta mediante procesos de colisión en una cámara de colisión situada entre ambos analizadores. Los iones fragmento se detectan en el segundo analizador. El instrumento más utilizado para esta aplicación ha sido el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo que, como su nombre indica, está formado por tres cuadrupolos colocados consecutivamente: el primero y el tercero (Q1 y Q3 respectivamente) son analizadores y el segundo (Q2) es una cámara de colisión (Figura 17). Otros instrumentos en tándem utilizados más recientemente, principalmente para la fragmentación de péptidos, son el q-TOF y el TOF-TOF.

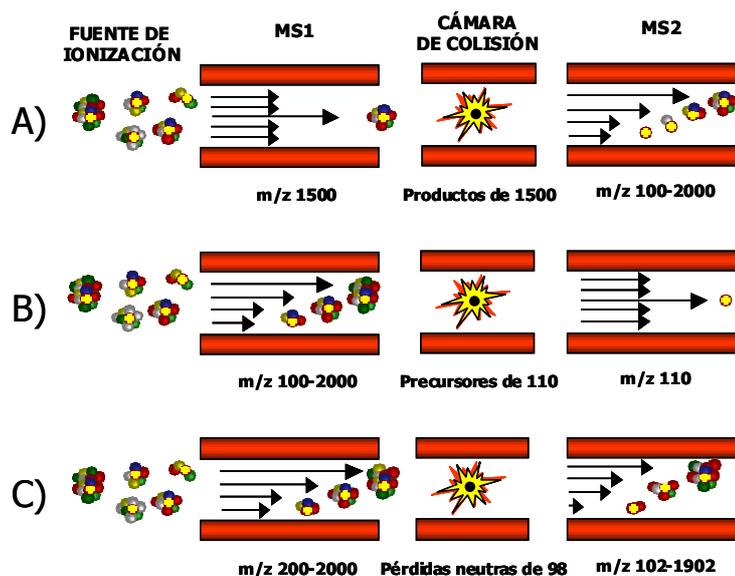


Figura 17: Espectrometría de masas en tándem en un instrumento de triple cuadrupolo. A) Barrido de iones producto: el ion a fragmentar se selecciona en el primer analizador y se fragmenta en la cámara de colisión, detectándose los iones de fragmentación en el tercer cuadrupolo. B) Barrido de precursores: Todos los iones que pasan a través del primer analizador son fragmentados en la cámara de colisión. En el segundo analizador se detectan únicamente aquellos iones que hayan perdido un fragmento con la masa seleccionada (En la figura, 110 Da, pérdida característica de la presencia de histidina en la secuencia). C) Barrido de pérdidas neutras: en este caso, los dos analizadores realizan barridos completos aunque éstos están desplazados en un determinado valor que corresponde con la pérdida de un grupo neutro (En la figura, 98 Da, valor que indica la pérdida de un grupo fosfato).

El segundo procedimiento (separación en el tiempo) utiliza un único analizador donde tiene lugar la selección de los iones precursores, su fragmentación y el análisis de los fragmentos, pero que lleva a cabo estos procesos en momentos diferentes. Las trampas iónicas y los instrumentos ICR funcionan de esta manera. En la trampa, el ion precursor se aísla mediante la aplicación de un voltaje de expulsión que elimina los otros iones en la mezcla. Los iones aislados en la cavidad se fragmentan entonces mediante la aplicación de un voltaje de excitación que promueve la ocurrencia de colisiones energéticas de estos iones con las moléculas de He existentes en el interior de la trampa. Una vez formados los iones producto, se realiza un barrido de RF convencional en el que los iones producto son expulsados secuencialmente en función de su valor de m/z y finalmente son detectados.

Una de las características más interesantes de la trampa iónica es su capacidad para llevar a cabo análisis en tándem múltiple (MS^n). El proceso de aislamiento, excitación y expulsión de los iones puede ser repetido de forma indefinida (n veces en MS^n), seleccionando cada vez un ion

precursor entre los iones producto que se producen durante la fragmentación. Este método es muy específico y proporciona información estructural muy valiosa para la secuenciación de péptidos (ver IV.1).

3.2.1.SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS MEDIANTE MS/MS

El patrón de fragmentación de un péptido analizado mediante MS/MS depende de la energía de colisión, de la presión y el tipo de gas de colisión y de la carga del péptido. Este patrón es además característico de la secuencia aminoacídica específica del péptido, de forma que esta última puede deducirse del análisis del correspondiente espectro MS/MS.

Durante el análisis MS/MS, los péptidos pueden fragmentarse por cualquiera de los enlaces de la cadena lineal generando fragmentos de diferentes tipos (Figura 18). Las series de fragmentos de tipo **a**, **b** y **c** contienen el extremo amino terminal mientras que las de tipo **x**, **y**, y **z** contienen el carboxilo terminal (Roepstorff 1984). Para nombrar los distintos fragmentos se utilizan los símbolos anteriores con un subíndice que indica el número de aminoácidos que contienen. Pueden formarse asimismo fragmentos iónicos derivados de la rotura de dos enlaces denominados fragmentos internos. Los más frecuentes son los iones imonio, que contienen un solo aminoácido. Los iones imonio son característicos de cada aminoácido, siendo normalmente intensos, por lo que permiten un análisis cualitativo de la composición del péptido estudiando la zona de bajo peso molecular del espectro. Estos iones se indican con la letra que identifica al aminoácido correspondiente. Los fragmentos que contienen dos o más aminoácidos internos son menos abundantes y se indican con la serie de caracteres que identifican la secuencia aminoacídica.

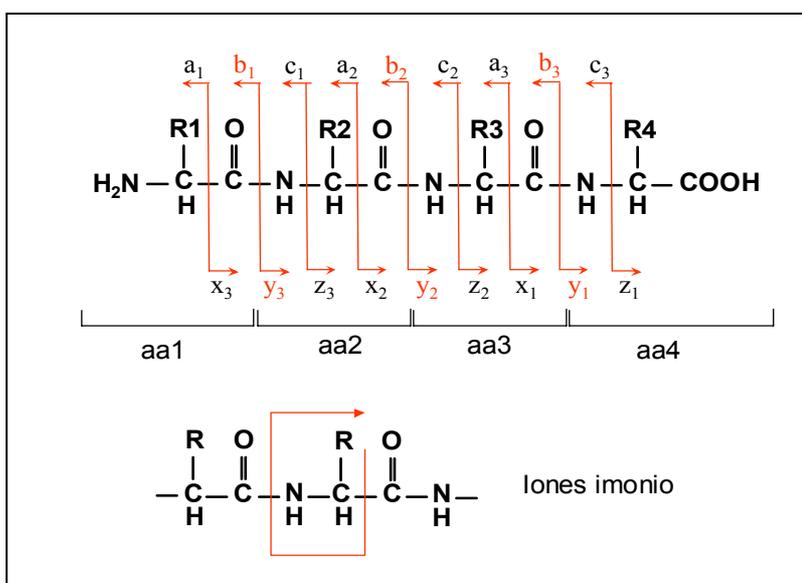


Figura 18: Esquema de fragmentación de péptidos mediante MS/MS con colisiones de baja energía.

Los instrumentos basados en cuadrupolos y trampas iónicas producen la fragmentación mediante colisiones de baja energía que sólo son capaces de romper los enlaces más débiles de la cadena lineal del péptido. En estos casos los iones mayoritarios son los de tipo **y** y **b**. Dependiendo de la composición en aa del péptido, pueden detectarse también fragmentos derivados de pérdidas de agua (S, T, D o E) o pérdidas de amonio (Q, K, R) a partir principalmente de los iones **y** y **b**. En instrumentos donde pueden llevarse a cabo colisiones de alta energía (por ejemplo, los basados en analizadores de sectores o TOF en tándem) el perfil de fragmentación es diferente, produciéndose también roturas en otros lugares de la cadena lineal (para dar lugar a, por ejemplo, iones del tipo **a** o **x**) y en las cadenas laterales de los aminoácidos. La fragmentación de la cadena lateral puede ocurrir implicando o no la fragmentación de la cadena lineal. En el primer caso los fragmentos formados se denominan **v** (pérdida total de la cadena) y **w** y **d** (fragmentación de la cadena lateral por rotura del enlace Cβ-Cγ). En los aminoácidos que tienen un grupo aromático unido al carbono β (His, Phe, Tyr, Trp), los fragmentos de tipo **w** y **d** son muy poco abundantes o no se detectan (Papayannopoulos 1995). Los iones derivados de la fragmentación de estas cadenas laterales permiten distinguir entre los aminoácidos isobáricos Leu/Ile que no pueden diferenciarse en condiciones de baja energía de colisión. Así, la rotura de la cadena lateral de la leucina (ramificada) produce iones fragmentos del tipo **d** o **w** que aparecen 42 unidades por debajo del correspondiente ión **a** o **z**. Sin embargo, la cadena lateral de isoleucina (ramificada en carbono β) puede generar dos iones diferentes a 14 y 28 unidades por debajo de los correspondientes iones **a** o **z** (Johnson 1987).

La intensidad relativa de los iones fragmentos formados viene determinada por el tipo de aminoácidos presentes en la cadena (Tabla VI) y por otros parámetros instrumentales como la energía y la presión de colisión. Así, la presencia de aminoácidos básicos (Arg, Lys, His) en los

extremos amino o carboxilo terminales favorece la observación de fragmentos amino o carboxilo terminales, respectivamente (Gonzalez 1996; Johnson 1988). Algunos enlaces entre aminoácidos son especialmente estables como el caso de las parejas de aminoácidos Gly-Gly o Gly-Ala. Esto provoca que los iones derivados de la rotura de este enlace sean poco abundantes. Esta característica puede dar problemas en el análisis de los espectros de fragmentación ya que las secuencias GlyGly y AlaGly pueden confundirse con la presencia de los aminoácidos Asn y Gln/Lys, respectivamente, ya que éstos tienen pesos moleculares idénticos a los de la pareja correspondiente. Por el contrario, la presencia de prolina determina una rotura preferente en el lado N-terminal de este aminoácido, favoreciendo la formación de iones de tipo **y**. La basicidad de la prolina y el impedimento estérico resultante de su estructura cíclica, que impide la formación de un intermedio oxazolona implicado en la formación de los iones **b**, son los responsables de este fenómeno. En el caso de iones doblemente cargados donde la prolina se encuentra junto a un aminoácido ácido en su extremo amino la fragmentación entre estos dos aminoácidos está especialmente favorecida, generándose espectros MS/MS dominados por el correspondiente ión del tipo **y** (Maux 2002). Otro enlace especialmente sensible a la fragmentación es el situado en el extremo C-terminal del aspártico cuando este aminoácido coincide con la presencia de arginina en la secuencia (Wysocki 2000).

Algunos péptidos pueden presentar otras características estructurales que afectan directamente el perfil de fragmentación y por tanto la calidad de los espectros obtenidos. Por ejemplo, la cisteína puede oxidarse para formar puentes disulfuro intermoleculares con otras cisteínas en la molécula. Estos puentes modifican de forma importante el patrón de fragmentación del péptido. Incluso en el caso de que el puente de cisteína esté situado en un extremo de la secuencia y entre aminoácidos cercanos, las correspondientes series de iones conteniendo estas cisteínas presentarán iones con valores de masa dos unidades inferiores a los esperados. Este fenómeno se observó durante la caracterización de uno de los péptidos más relevantes identificados en esta tesis, el epítipo 726-743 de la tiroglobulina (Apartado IV.5).

En el caso de péptidos derivados de proteínas conocidas, la identificación de su secuencia no implica necesariamente la determinación directa de la secuencia completa. La determinación de secuencias parciales del péptido o *tags* de secuencia permite la búsqueda de la proteína de origen en las bases de datos. Una vez determinada esta proteína, la secuencia completa del péptido puede derivarse fácilmente a partir del *tag*, la secuencia proteica en el entorno del *tag* y el peso molecular del péptido analizado. De esta forma los péptidos pueden identificarse incluso con espectros donde no toda la información necesaria es aparente. Sin embargo, en casos como los citados anteriormente, los péptidos pueden haber perdido el patrón típico de fragmentación en un grado tal que presenten problemas para su secuenciación, tanto por búsqueda en bases de datos como *de novo* (Quin 1995; Tsaprailis 1999). Con objeto de extraer información de secuencia válida en estos casos, puede recurrirse a diversas estrategias entre ellas la utilización

de la espectrometría de masas en tándem múltiple o el tratamiento químico o enzimático de la muestra a analizar. La espectrometría de masas en tándem múltiple (MS^3) permite, por ejemplo, la diferenciación entre los aminoácidos isóbaros Lys y Gln. La presencia de un ión a $[M-45]$ en el espectro de MS^3 del respectivo ión b_n cuando la glutamina está presente y su ausencia en el caso de que sea lisina nos permite discernir entre ambos aminoácidos (Bahr 1998). Únicamente cuando la glutamina está situada en posición dos, se observa un ión diferencial en el espectro de MS/MS, el ión c_1 (Lee 2004). Por otro lado, la acetilación del péptido con anhídrido acético modifica la lisina pero no la glutamina, aumentando el peso molecular 42 Da por cada lisina más 42 Da por el amino terminal. En algunos casos esta misma distinción puede realizarse mediante el uso de enzimas que como la tripsina o endolisina que presentan selectividad por los enlaces en los que interviene la lisina.

La modificación química (p.e. derivatización de cisteínas mediante iodoacetamida) o bioquímica (incluyendo ciertas modificaciones postraduccionales) de los aminoácidos puede implicar la formación de nuevos enlaces de baja energía que favorecerán la formación de fragmentos específicos para estas modificaciones en el análisis por MS/MS (Nemeth-Cawley 2001; Schlosser 2000). Así la presencia de aminoácidos fosforilados puede evidenciarse por la presencia de fragmentos derivados de pérdidas de 98 y 80 Da. Otros iones característicos son los derivados de pérdidas de 71 y 64 Da indicadoras de la presencia de cisteínas carbamidometiladas y de metioninas oxidadas, respectivamente.

Actualmente, la secuenciación peptídica mediante EM es uno de los procedimientos más utilizados en proteómica para la identificación de proteínas en bases de datos. La identificación se lleva a cabo mediante la secuenciación de uno o más péptidos obtenidos por digestión enzimática de la proteína de interés. La digestión se lleva a cabo comúnmente con una enzima específica como la tripsina, que produce péptidos de digestión con unas características de secuencia que producen espectros de fragmentación muy informativos y que facilitan la determinación de la secuencia. Así, la tripsina produce péptidos de un tamaño medio (entre 500 y 1800 Da) muy adecuado para la secuenciación. Además los aminoácidos C-terminales de los péptidos trípticos son siempre Lys o Arg lo que favorece la producción de iones doblemente cargados (en el residuo básico C-terminal y en el moderadamente básico amino terminal) que generan espectros de fragmentación fácilmente interpretables por la presencia de las series de iones complementarias del tipo **b** y **y**. En el caso del análisis de péptidos asociados a la molécula de MHCII estas condiciones no se cumplen y la interpretación de los espectros es más difícil.

Por un lado, los péptidos de clase II tienen longitudes muy superiores a las de los péptidos trípticos. El péptido más largo reportado en esta tesis es el epítipo 180-216 de la GTPasa de rata, un péptido de 37 aminoácidos con un peso molecular de 3959 Da. Estos péptidos generan

iones precursores triple y cuádruplemente cargados. Estos iones multicargados producen espectros de fragmentación en los que se mezclan señales de iones con diferentes estados de carga, aumentando la complejidad de la secuenciación. Actualmente existen programas que deconvolucionan estos espectros de fragmentación con iones de carga múltiple generando espectros virtuales con iones monocargados que son los que se utilizan para la identificación de la secuencia. Sin embargo, estos programas solo se pueden utilizar cuando la resolución del instrumento es suficiente para poder diferenciar los diferentes estados de carga en el modo de barrido completo (por ejemplo con analizadores TOF). Otra solución a este problema consiste en la aplicación de un análisis MS³ (con analizadores de trampa de iones) que permite la fragmentación de iones doblemente cargados, generados a su vez a partir de iones múltiplemente cargados, para obtener espectros más sencillos de interpretar.

Por otro lado, el patrón de generación de los péptidos asociados a MHCII por parte de las proteasas es muy variable por lo que, en principio, no pueden esperarse preferencias en cuanto a los aminoácidos presentes en los extremos de corte o los presentes en la secuencia. Además, y a diferencia de los péptidos trípticos, los péptidos de MHCII pueden presentar lisina y arginina en el interior de la secuencia. La ionización de estos restos fuertemente básicos que compiten con la protonación en los extremos terminales del péptido origina perfiles de MS/MS pobres en fragmentos y por tanto en información de secuencia (Willard 2001).

Tabla VI: Pesos moleculares de los residuos de cada uno de los aa, iones imonio característicos, aa isobáricos, posibles modificaciones y características de estos aa en los espectros de MS/MS.

Aa	Residuo de aa (Da)	Iones Imonio (Da)	Otros iones típicos	Aa Isobárico	Modificación Frecuente	Características MS/MS
Alanina (Ala, A)	71.08	44				
Arginina (Arg, R)	156.19	129	70, 87, 100, 112	GV		Situada cerca del C- o N-terminal dirige la formación de iones y o b respectivamente. Iones abundantes de tipo b _n -17, sobretodo cuando R está en P2
Asparagina (Asn, N)	114.16	87	70	GG	Deamidación	
Aspártico (Asp, D)	115.09	88	70		Esterificación Hidroxilación	Rotura preferencial en el C-terminal del aspártico, generando iones de tipo b. Pérdida de H ₂ S.
Cisteína (Cys, C)	103.15	76			Oxidación Reducción	Si está formando puente disulfuro intramolecular aparecen fragmentos con masa 2 Da inferior a lo esperado.
Fenilalanina (Phe, F)	147.18	120	91			
Glicina (Gly, G)	57.05	30				
Glutámico (Glu, E)	129.12	102	84, 91		Esterificación Formación de piroglutámico	Pérdida de H ₂ O, sobretodo con E en N-terminal debido a la formación de piroglutámico.
Glutamina (Gln, Q)	128.13	101	54, 84, 129	K, GA	Deamidación	Pérdida de amonio. En MS ³ b-45. Fragmento c ₁ cuando está en posición 2.
Histidina (His, H)	137.14	110			Oxidación	Rotura preferente en el lado C-terminal. Ión imonio a 110 abundante.
Ileucina (Ile, I)	113.16	86	44, 72	L		Con alta energía iones de tipo d o w a 14 y 28 Da por debajo del ión a o z.
Leucina (Leu, L)	113.16	86	44, 72	I		Con alta energía ión de tipo d o w 42 Da por debajo del ión a o z.
Lisina (Lys, K)	128.17	101	84, 112, 129	Q, GA	Acilación Hidroxilación	Situada cerca del C- o N-terminal dirige la formación de iones y o b respectivamente. Pérdida de amonio.
Metionina (Met, M)	131.20	104			Oxidación	Pérdida del grupo sulfóxido (CH ₃ SH, -64 Da).
Prolina (Pro, P)	97.12	70			Hidroxilación	Rotura preferente en el lado N-terminal. Poco frecuente rotura en lado C-terminal.
Serina (Ser, S)	87.08	60			Fosforilación Sulfonación	Pérdida de H ₂ O.
Tirosina (Tyr, Y)	163.18	136	91, 107		Fosforilación Sulfonación	
Treonina (Thr, T)	101.11	74			Fosforilación Sulfonación	Pérdida de H ₂ O.
Triptófano (Trp, W)	186.21	159	77, 117, 130, 132	GE, AD, SV	Hidroxilación	
Valina (Val, V)	99.13	72	41, 55, 69			

(*) m: Metionina oxidada

3.3. PROTEÓMICA Y PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS.

El proteoma fue definido por primera vez en 1995 por Wilkins (Wilkins 1995) como el conjunto de proteínas que expresa un organismo en un determinado momento y bajo unas determinadas condiciones, siendo la proteómica la ciencia que estudia el proteoma. Este estudio puede abordarse de diversas maneras y puede implicar estudios globales de las diferencias de expresión proteica observadas en diferentes condiciones o estudios más específicos dirigidos a la caracterización de los componentes de determinados complejos proteicos, la estructura de las redes de interacción proteica o la localización celular de estas proteínas. Muchos de estos estudios utilizan herramientas analíticas comunes que incluyen la separación de proteínas en geles o su identificación mediante EM (Figura 19)

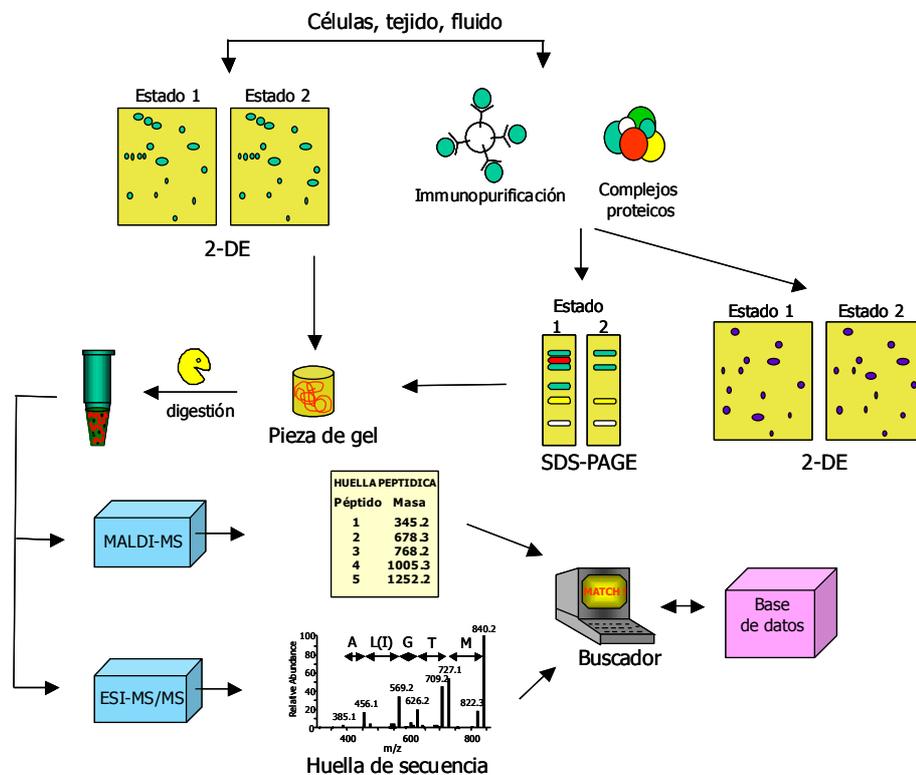


Figura 19: Los extractos procedentes de las células, tejidos o fluidos a comparar se separan directamente por 2DE o se someten a una purificación previa para trabajar con un grupo seleccionado de proteínas (p.e. inmunopurificación o aislamiento de complejos proteicos). En este segundo caso la separación electroforética puede realizarse alternativamente por SDS-PAGE dada la menor complejidad de la muestra. Después de realizar el análisis de imagen e identificar las manchas diferenciales, estas se recortan del gel y se digieren con un enzima (normalmente tripsina). El extracto peptídico obtenido se analiza mediante MALDI-TOF para identificar la proteína por mapeo peptídico o mediante MS/MS para realizar la identificación mediante la secuenciación de uno o más péptidos (Modif. de J.Abián, Tratado de Medicina Interna Rodes Guardia, Ed Massons, 2004).

Los primeros estudios proteómicos utilizaban la electroforesis en gel bidimensional (2DE) para la separación de las proteínas, diversos métodos de tinción del gel para su visualización y la determinación de sus pI y pesos moleculares y métodos inmunológicos (p.e. Western-blot) para su identificación. Estos métodos eran muy sensibles pero estaban limitados por el conocimiento previo de la molécula a identificar y por la disponibilidad de los anticuerpos. Los avances de la EM junto con la enorme cantidad de información aportada por la investigación genómica permite actualmente la identificación de las proteínas separadas en 2DE de forma muy efectiva y, por tanto, ha propiciado el rápido desarrollo de esta ciencia. A diferencia de otros métodos, la EM no requiere un conocimiento previo de la estructura del analito, es un detector universal y su sensibilidad es suficiente para identificar estas proteínas a los niveles encontrados en las muestras biológicas.

Estas aproximaciones están aplicándose cada vez más al estudio de la respuesta inmune. Se ha abordado, por ejemplo, el estudio de la expresión proteica diferencial en células B transformadas con el virus de Epstein-Barr (Toda 2003; Toda 2000) o el de los cambios de estos perfiles de expresión en determinados tipos celulares sometidos a tratamiento por INF (Abogye-Mathiesen 1999; Celis 1987; Nyman 2000). Se ha estudiado asimismo la expresión diferencial de linfocitos T activados (Mascarell 2000), la identificación de proteínas específicas en diferentes poblaciones de linfocitos (Vuadens 2001) o la expresión diferencial en islotes de Langerhans de rata tratadas con IL-1 (Larsen 2001).

Existen diversos estudios proteómicos relacionados más directamente con el procesamiento y la presentación antigénica, si bien su número es bajo. En general se trabaja con extractos purificados que se utilizan para estudiar de forma específica determinadas moléculas o compartimentos relacionados con las vías de presentación.

En 1988, Newell y col. identificaron por primera vez una proteína que copurificaba con la molécula de MHC de clase II en una columna de inmunoafinidad a la que habían unido un anticuerpo anti-I-A^k. La proteína se separó por 2DE y se identificó como la proteína actina mediante secuenciación de Edman (Newell 1988). Posteriormente Lindquist y col. caracterizaron la proteína Erp57 como una nueva chaperona que estaba formando parte del complejo TAP-calnexina-calreticulina utilizando una columna de afinidad por TAP, separando el extracto por 2DE e identificando las proteínas, detectadas mediante tinción de azul de coomassie, por mapeo peptídico (Lindquist 1998).

También se han caracterizado los complejos de tetraspaninas en células B linfoides, realizando inmunoprecipitaciones dirigidas hacia una de las proteínas conocidas del complejo, la molécula CD9, e identificando las proteínas asociadas por MALDI-TOF (Le Naour 2004). Por su parte, el

grupo de Aebersold caracterizó 24 proteínas asociadas al receptor de antígeno de las células T inmunoprecipitando el complejo y separando las proteínas por SDS-PAGE (Heller 2000).

En esta tesis se han utilizado diversas técnicas proteómicas que incluyen la 2DE y la cromatografía líquida multidimensional acoplada *on line* con la EM para la caracterización de nuevas proteínas implicadas en el procesamiento y presentación de antígenos por la molécula de MHCII. Se han realizado asimismo análisis globales de expresión proteica en células epiteliales endocrinas con objeto de determinar el efecto de la expresión de la molécula de clase II y de las chaperonas HLA-DM y Ii en el proteoma de estas células.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

ESTUDIO DE LA VÍA DE PRESENTACIÓN DE PÉPTIDOS POR MOLÉCULAS DE MHC DE CLASE II MEDIANTE ESTRATEGIAS PROTEÓMICAS

Las células epiteliales del timo expresan constitutivamente moléculas de MHCII que presentan péptidos a los linfocitos T en situación fisiológica. En situaciones patológicas, como en el caso de algunos tumores y en autoinmunidad, las células epiteliales de tejidos expresan moléculas de MHCII no constitutivas. Esta expresión no siempre va acompañada de niveles equivalentes de las dos chaperonas principales de clase II, HLA-DM y Cadena Invariante (Ii). Sin embargo, estas células podrían tener capacidad para presentar péptidos a las células T y así influir en el desarrollo y/o mantenimiento de la enfermedad. Nuestra hipótesis es que las células epiteliales, siendo capaces de expresar moléculas estables de MHCII en la superficie, podrían estar presentando péptidos diferentes a las APC profesionales, ya sea por variaciones en el contenido celular o por diferencias en pasos relacionados con la carga de los ligandos de clase II. Para analizar esta hipótesis nos proponemos el estudio de la vía de clase II en células epiteliales a partir de dos puntos de vista diferentes que conforman los siguientes objetivos:

► 1. Caracterización del repertorio de péptidos asociados a moléculas de MHCII mediante espectrometría de masas.

1.1 Evaluación de diversos métodos de secuenciación de péptidos asociados a moléculas de MHCII mediante espectrometría de masas.

1.2. Comparación de los repertorios de péptidos asociados a HLA-DR4 en células epiteliales frente a células de expresión constitutiva del mismo alelo.

1.3. Efecto de las chaperonas de la vía de clase II, Ii y HLA-DM, en los repertorios asociados a DR4 en células epiteliales transfectadas.

1.4. Identificación de ligandos asociados a moléculas de MHCII en tiroides humanos autoinmunes.

► 2. Identificación de nuevas proteínas implicadas en la vía de presentación de clase II en células epiteliales mediante técnicas proteómicas.

2.1. Estudio de expresión proteica diferencial en células epiteliales que expresan moléculas de MHCII y las chaperonas Ii y HLA-DM.

2.2. Identificación de proteínas que interaccionan con moléculas de MHCII en el interior de la célula. Estudio comparativo en presencia o en ausencia de las chaperonas Ii y HLA-DM.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- PURIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A LAS MOLÉCULAS DE MHCII

El aislamiento de los péptidos asociados a las moléculas de MHCII a partir de células en cultivo y de tejido tiroideo autoinmune humano se llevó a cabo mediante cromatografía de inmunoafinidad, elución ácida y ultrafiltración. En este trabajo se ha utilizado el anticuerpo monoclonal L243 que reconoce un epítipo monomórfico específico del complejo α/β de HLA-DR (ATCC, Rockville, MD, USA / Lampson and Levy, 1980) y no reconoce ninguno de los otros isotipos de HLA de clase II, HLA-DP ni HLA-DQ. Como soporte cromatográfico se utilizaron bolas de Sefarosa 4B (Amersham Biosciences, Upsala). Este método, basado en la fuerza y especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo, permite aislar de un extracto proteico complejo la molécula de MHC junto con los péptidos asociados a ella.

1.1. ACOPLAMIENTO DEL ANTICUERPO L243 A BOLAS DE SEFAROSA ACTIVADAS

Las bolas de sefarosa secas se suspendieron en 1 mM HCl obteniéndose aproximadamente 3 ml de bolas hidratadas por cada gramo de bolas secas. Las bolas hidratadas se lavaron con 200 ml de 1 mM HCl por gramo de sefarosa utilizando un filtro de vidrio (Glassfilter 3, Duran R Schott, Mainz, Alemania). Posteriormente, se resuspendieron en tampón de acoplamiento (0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH 8.3), utilizando 3 ml de tampón por cada gramo de bolas secas, y se centrifugaron 2 minutos a 500 xg. Después de eliminar el sobrenadante, las bolas se incubaron con una solución que contenía el anticuerpo L243 en tampón de acoplamiento durante 4 horas a 20°C y con rotación. Las bolas se recuperaron por centrifugación a 500 xg durante 2 minutos y se lavaron tres veces con tampón de bloqueo (Tris-HCl 0.1M pH 8), utilizando 3 ml de tampón por cada gramo de bolas secas. Para bloquear los lugares de unión todavía libres se incubaron con el tampón de bloqueo 2 horas a 20°C. Finalmente, se lavaron en un filtro de vidrio con 9 ml de tampón acetato (0.1M acetato sódico/0.5M NaCl pH 4) por gramo de sefarosa y, seguidamente, con el mismo volumen de 0.1M Tris-HCl/0.5 M NaCl, pH 8. Este proceso se realizó tres veces consecutivas. Las bolas de sefarosa con el anticuerpo unido covalentemente se conservaron a 4°C en tampón de lavado con un 0.02% de azida sódica hasta su utilización.

Se prepararon dos columnas de 5 ml con 25 mg de anticuerpo para el análisis de las líneas DR4 y DR4li y dos columnas de 10 ml con 50 mg de anticuerpo para las líneas DR4DM y DR4liDM. En el caso de las células B-LCL se realizaron varias preparaciones, utilizando una columna de 10 ml con 50 mg de anticuerpo y diversas columnas de 1 ml con 5 mg de anticuerpo. En el caso del tejido tiroideo, se utilizaron 3 columnas de 5 ml con una concentración de anticuerpo de 1 mg/ml (tiroides TB190, TB237 y TB269) y 2 columnas de 1 ml con 5 mg/ml de anticuerpo (tiroides TB270 y TB448).

1.2. PREPARACIÓN Y LISIS DE LAS CÉLULAS

Para la purificación de los péptidos asociados a las moléculas de MHCII se partió de 1.5×10^9 células en las líneas DR4 y DR4li y de 3×10^9 células en las líneas DR4DM, DR4liDM y B-LCL. También se realizaron varias preparaciones de la línea celular B-LCL partiendo de 5×10^8 células.

Las células se lisaron en tampón de lisis a una concentración final de 1.5×10^8 células/ml. El tampón de lisis utilizado fue 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl al que se le añadió 5 mM EDTA, 0.1 mM AEBSF, 1 mM PMSF, 5 mM leupeptina, 1 μ g/ml antipaina, 1 μ g/ml quimostatina, 1 μ g/ml pepstatina A y 0.5% NP-40. La lisis se efectuó a 4°C durante 2 horas con agitación constante. El lisado se centrifugó 10 minutos a 1000 xg y 4°C y el sobrenadante recuperado se centrifugó durante 1 hora a 150000 xg. El sobrenadante obtenido se sometió a una cromatografía de inmunoafinidad para aislar los complejos DR-péptido.

1.3. HOMOGENIZACIÓN Y LISIS DEL TEJIDO TIROIDEO

Las muestras de tejido tiroideo proceden del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol de Badalona y del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona y se obtuvieron a partir de tiroidectomías de enfermos afectados por la enfermedad de Graves-Basedow. La tabla VII muestra algunas de las características de los donantes y de los tejidos utilizados.

Tabla VII: Muestras de tiroides utilizadas para la identificación de péptidos de clase II.

ID	Sexo	Edad	Diagnóstico	Expresión de clase II	Fenotipo para clase II	Cantidad (g)
TB190	♀	35	GB/hiperplasia nodular	++	DRB1*1101, DRB1*1104, DQB1*0301	< 1
TB-269	♀	31	GB	++	DRB1*1101, DRB1*1104,	2
TB-270	♀	30	GB	+++	DRB1*0701, DQB1*0202,	3.3
TB-237	♀	32	GB	+	DRB1*1501, DQB1*0602	1.1
TB-448	♀	26	GB	++	DRB1*0407, DRB1*1501,	8

El tejido había sido cortado en piezas de aproximadamente 1 mm^3 y sumergido en isopentano enfriado previamente en un baño de acetona y hielo seco. Los bloques obtenidos (aproximadamente de 0.5 gr cada uno) se guardaron a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su procesamiento.

Para la disgregación del tejido, uno o más bloques de éste se homogeneizaron en 2 ml de tampón por gramo de tejido en un homogeneizador mecánico a 800 rpm. El tampón de homogeneización utilizado fue 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl que contenía además 5 mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml pepstatina y 10 mM

iodoacetamida. La muestra se mantuvo en hielo durante todo el proceso. El homogeneizado obtenido se centrifugó a 1000 xg durante 20 minutos a 4°C para eliminar el material soluble y recuperar las membranas celulares. Las membranas se solubilizaron resuspendiéndolas en el mismo tampón de homogeneización conteniendo un 0.5% de NP-40 y manteniéndolo en agitación durante 2 horas a 4 °C. Este extracto se centrifugó a 1000 xg durante 10 minutos a 4°C y a 150000 xg durante 1 hora a 4°C y el sobrenadante obtenido se sometió a una cromatografía de inmovilización para aislar los complejos DR-péptido.

1.4. CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD POR HLA-DR

Los extractos proteicos se incubaron con bolas de sefarosa desactivadas (Sepharose R CL-4B, Amersham Biosciences) durante 3 horas a 4°C y con agitación constante para eliminar interacciones inespecíficas. Las bolas se lavaron previamente 3 veces con tampón de lavado (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl), y se añadieron al extracto con una relación de 1 ml de bolas por cada 5 ml de lisado celular. Esta mezcla se centrifugó a 600 xg durante 10 minutos para separar las bolas. El sobrenadante obtenido se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo L243 acoplado a la sefarosa (tal como se describe en el apartado III.1.1). Esta suspensión se introdujo en una columna de polipropileno del volumen adecuado para cada experimento y el líquido se recuperó por gravedad. El eluido recuperado se pasó dos veces a través de la columna utilizando una bomba peristáltica.

Con objeto de eliminar posibles interacciones inespecíficas, restos del detergente NP-40 y un posible exceso de sales, se realizaron lavados secuenciales previos al paso de elución. En los experimentos con líneas celulares las columnas se lavaron utilizando 3 volúmenes de columna de tampón de lisis sin inhibidores de proteasas, 20 volúmenes de tampón de lavado y 10 volúmenes de 5 mM Tris-HCl, pH 7.6. En los experimentos con tejido tiroideo las columnas se lavaron con 50 ml de tampón de lisis sin inhibidores de proteasas, 200 ml de tampón de lavado y 200 ml de 5 mM Tris-HCl pH 7.6. Los complejos DR-péptido se eluyeron con 3 volúmenes de columna de 0.1% TFA en el caso de las columnas de 5 y 10 ml y con 10 volúmenes de columna en el caso de las columnas de 1 ml. En todos los casos se recogieron fracciones de 1 ml. Las columnas se regeneraron lavándolas con tampón de lavado hasta que el pH del eluido fue neutro.

Se midió el pH de las fracciones obtenidas, seleccionándose para el aislamiento de los péptidos unidos a MHCII todas las fracciones ácidas y dos básicas: la última antes de detectar el cambio de pH debido a la llegada del TFA y la primera del tampón de regeneración de la columna.

1.5. AISLAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS MEDIANTE ULTRAFILTRACIÓN

Las fracciones seleccionadas se evaporaron en un evaporador/concentrador (Savant, Holbrook, NY) hasta obtener un volumen total de aproximadamente 2 ml y se filtraron utilizando un filtro *Centricón* con una membrana con un poro de corte de 10 kDa (Millipore, Bedford, MA). Las cadenas α y β de las moléculas de MHCII y otras moléculas de gran tamaño quedan así retenidas en la parte superior mientras que los péptidos se recuperan en la fracción filtrada. La fracción filtrada se concentró en el evaporador/concentrador hasta un volumen final de 0.5 ml y se almacenó a -80°C hasta su fraccionamiento por HPLC. La fracción retenida se recuperó y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

1.6. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO PEPTÍDICO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Los extractos peptídicos de las líneas celulares RIN-DR4, RIN-DR4li, RIN-DR4DM y RIN-DR4liDM se fraccionaron en el laboratorio del Dr. Fritz Koning en el Centro Médico Universitario de Leiden (Immunohaematology Blood Bank Department, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands). La línea celular B-LCL y las muestras de tejido tiroideo se fraccionaron en nuestro laboratorio.

Los extractos correspondientes a las líneas celulares transfectadas se fraccionaron utilizando un sistema SMART (Pharmacia) provisto de una columna $\mu\text{RPC C2/C18 SC 2.1/10}$ utilizando el siguiente gradiente: lavado de 15 min a 0% de B, gradiente lineal de 1 h de 0 a 60% de B y subida en 15 min a 80% de B (A: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN } 95/5$ v/v 0.05% TFA, B: $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O } 80/20$ v/v 0.05% TFA). Durante la separación se recogieron 80 fracciones.

Para el fraccionamiento de los péptidos aislados a partir de las células B-LCL y del tejido tiroideo se utilizó un sistema cromatográfico HP1100 (Agilent Technologies, Barcelona) compuesto por una bomba binaria, un desgasificador de membrana, un detector ultravioleta con una celda para microcromatografía y un inyector manual con un bucle de inyección de 500 μl . La separación se realizó en una columna Vydac Protein&Peptide C-18 de 25 cm de longitud y 2.1 mm de diámetro interno precedida por una precolumna ODS de 1 cm x 2 mm (Upchurch, Tecknokroma, Barcelona). Se trabajó a un flujo de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ utilizándose el mismo gradiente que el descrito arriba para el caso de los extractos de las líneas celulares transfectadas. La separación se monitorizó mediante detección ultravioleta a 214 nm. En el fraccionamiento de las células B-LCL y del tiroides TB448 se recogió una fracción cada minuto. En el tiroides TB190 se recogió una fracción cada dos minutos, en el TB237 y TB270 cada 3 minutos y en el TB269 cada 5 minutos.

Todas las fracciones recogidas se evaporaron a sequedad y se redisolieron en 5 μ l de MeOH/H₂O v/v 1% ácido acético para su posterior análisis por EM (Figura 19).

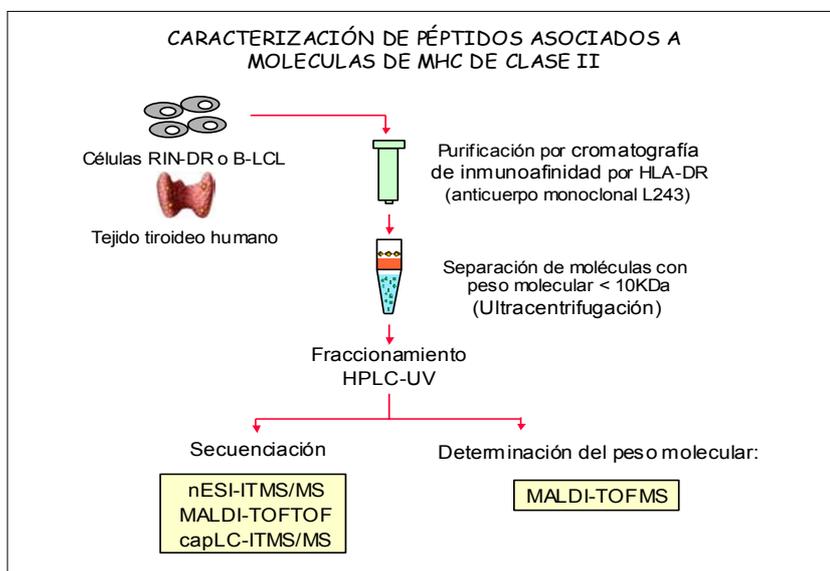


Figura 19: Esquema general del procedimiento de purificación e identificación de los péptidos asociados a la molécula de MHCII en diversas líneas celulares y en tejido tiroideo autoinmune humano.

2.- IDENTIFICACIÓN DE LOS REPERTORIOS DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A MHCII

Todas las secuencias presentadas en esta tesis, excepto las secuencias de los péptidos CLIP100-120 y CLIP98-121, que se determinaron por degradación de Edman utilizando un secuenciador de proteínas Hewlett-Packard G1000A (Palo Alto, CA), han sido obtenidas mediante secuenciación por espectrometría de masas. Las técnicas utilizadas incluyen la espectrometría de masas MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, nESI-ITMS/MS y sistemas combinados capLC- μ ESI-ITMS/MS y capMDLC- μ ESI-ITMS/MS.

2.1. MALDI-TOF

Se utilizó esta técnica para caracterizar el peso molecular de los componentes de las fracciones de HPLC obtenidas a partir de los extractos peptídicos purificados de las líneas celulares y de los tiroides. El instrumento utilizado fue un espectrómetro de masas modelo Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Barcelona) trabajando en modo reflectrón positivo. Un total de 0.5 μ l de cada una de las fracciones se cargaron en una placa de 96 x 2 pocillos, se mezclaron con 0.5 μ l de la matriz (3 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en ACN/H₂O 2/1 v/v 0.1% TFA) y se

dejaron secar. Los análisis se realizaron en modo automático utilizando un valor de láser constante y promediando los espectros obtenidos a partir de 1000 disparos en el rango de m/z de 400 a 8000. Los espectros se calibraron externamente utilizando una mezcla estándar de 5 péptidos (des-Arg1-bradiquinina (Mr 904.46), Glu1-fibrinopéptido B (Mr 1570.68), angiotensina-1, (Mr 1296.69), ACTH 1-17 (Mr 2093.09), ACTH 18-39 (Mr 2465.20) , ACTH 7-38 (Mr 3657.93)).

2.2. MALDI-TOF/TOF

Se utilizó esta técnica para determinar la secuencia de los péptidos en las fracciones de HPLC obtenidas a partir de la línea B-LCL y de los tiroides. El instrumento utilizado fue un espectrómetro de masas modelo AB4700 (Applied Biosystems, Barcelona) trabajando en modo reflectrón positivo. Se cargaron en la placa 0.4 μ l de muestra y 0.4 μ l de matriz de la misma forma que en el análisis por MALDI-TOF. Se programó el instrumento para realizar un espectro de barrido completo en el rango de m/z de 900 a 6000 seguido de 4 espectros de MS/MS (*CID on*) de las 4 señales más abundantes en la zona de m/z 1100-3500 del espectro de barrido completo. Posteriormente se seleccionaron iones intensos no fragmentados en modo automático y se obtuvo del espectro de MS/MS de forma manual.

Los análisis se realizaron en modo automático utilizando un valor de láser de 6000 para los espectros de MS y de 7200 para los de MS/MS. Se promediaron 1000 disparos en los espectros de MS y 1500 en los de MS/MS. Para los experimentos de MS/MS se utilizó una energía de colisión de 1 kV y como gas de colisión aire a una presión de $2-3 \times 10^7$ torr. Los espectros se calibraron externamente utilizando la misma mezcla que en el análisis por MALDI-TOF.

2.3. nESI-ITMS/MS

Se utilizó esta técnica para determinar la secuencia de los péptidos en las fracciones de HPLC preparadas a partir de los extractos de las líneas celulares y de los tiroides. La secuenciación de péptidos por nESI-ITMS/MS se realizó en un espectrómetro de masas de trampa iónica (LCQ, Thermo-Instruments, Barcelona) equipado con una interfase de nanospray (Protana, Odense, Denmark). Los parámetros del instrumento se ajustaron utilizando una mezcla de 5 péptidos estándar con pesos moleculares de 1296 a 2149 (angiotensina I, sustancia P y tres péptidos sintéticos con pesos moleculares 1758, 1911 y 2149 Da). El voltaje aplicado fue de 0.8 kV y la temperatura del capilar se ajustó a 110°C. La anchura de la ventana de selección del ión precursor fue de 3 unidades en los experimentos de MS/MS y de 4 unidades en los de MS³. La energía de colisión relativa se ajustó para cada uno de los iones fragmentados en el rango de 20 a 45% dependiendo del estado de carga del ión precursor. La información obtenida para cada péptido estudiado incluía un espectro de barrido completo, uno de alta resolución (ZoomScan) y uno de fragmentación o espectro MS/MS. En el espectro de barrido completo se detectaron las

señales que correspondían con los diferentes estados de carga de los péptidos presentes en la muestra, en el espectro de alta resolución se detectó con precisión el valor de m/z y el estado de carga de cada uno de los iones a fragmentar y, finalmente, el espectro de MS/MS se utilizó para la identificación de la secuencia o *tag* de secuencia de cada péptido seleccionado.

Generalmente, los iones a fragmentar se seleccionaron en función de los datos de peso molecular obtenidos en el análisis por MALDI-TOF y considerando que los correspondientes iones aparecerían como iones doble o triplemente cargados en los espectros de nESI. Se fragmentaron además todos aquellos iones detectados en el espectro de barrido completo obtenido mediante nESI-ITMS/MS aunque estos no hubieran sido detectados en el espectro de MALDI-TOF.

Una vez identificados los péptidos de los repertorios de las cuatro líneas transfectantes mediante este procedimiento, se realizó un reanálisis de algunas de las fracciones para comprobar que las secuencias identificadas en cada repertorio no estaban presentes en el resto de líneas. Para esto, se analizó de forma sistemática la presencia o ausencia de 49 de las secuencias identificadas en cada una de las líneas transfectantes mediante análisis por ZoomScan y MS/MS de los iones correspondientes. Utilizando este reanálisis se determinó que únicamente 2 de las 49 secuencias no se habían identificado mediante el procedimiento inicial.

2.4. capLC- μ ESI-ITMS/MS

Se utilizó esta técnica para secuenciar los péptidos asociados a MHCII en las células B-LCL. En este caso el extracto peptídico se analizó sin un fraccionamiento previo de la muestra. La metodología empleada se detalla a continuación en el apartado III.3.

3. IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A CÉLULAS B-LCL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (capLC- μ ESI-ITMS/MS)

El sistema para capLC utilizado se construyó a partir de una bomba de HPLC convencional (HP1100 de Agilent) a la que se acopló un divisor de flujo (Figura 20). La bomba de HPLC fue modificada con objeto de reducir al máximo el volumen muerto del sistema.

Para ello se sustituyó el mezclador de gradiente de la bomba por una precolumna de 2 x 0.1 cm y todos los capilares de conexión se cambiaron por capilares de PEEK de 120 μ m ID. Con el mismo objetivo, la columna se conectó directamente al inyector tal como se muestra en la figura 2. Una vez inyectada y transferida la muestra a la columna analítica, el inyector se colocaba en

la posición de carga para eliminar el retraso en el gradiente que se producía por el volumen del bucle de inyección.

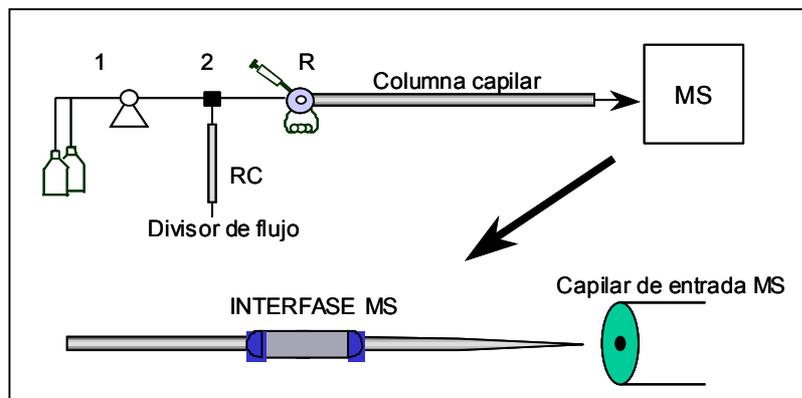


Figura 20: Esquema de un sistema de capLC conectado a un espectrómetro de masas. 1, bomba de gradiente y disolventes, 2, conexión en T para la división de flujo, R, inyector, RC, columna de restricción.

3.1. PREPARACIÓN DE COLUMNAS CAPILARES

En los análisis realizados en esta tesis se utilizaron columnas capilares autoconstruidas de 10 cm de longitud y 180 μm de diámetro interno (ID) rellenas de fase cromatográfica Kromasil C-18. Un protocolo detallado de los métodos de preparación y utilización de columnas capilares se ha publicado como capítulo de libro y se incluye en el anexo I (Carrascal, 2003).

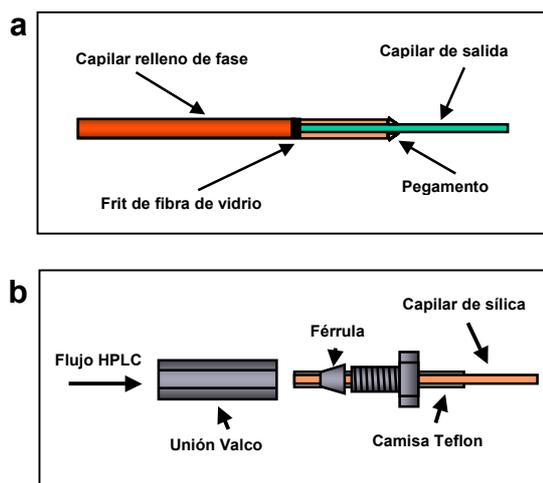


Figura 21: (a) Construcción de una columna capilar (b) Unión de un capilar de sílice a una unión Valco.

El montaje de las microcolumnas se llevó a cabo utilizando capilares de sílice fundida de 180 μm de diámetro interno (ID) x 375 μm de diámetro externo (OD) y de 50 μm ID x 150 μm OD para el cuerpo de columna y capilar de salida, respectivamente. Para ello, se cortaron con una pieza de porcelana, sendos capilares de sílice fundida de 12 cm (columna) y 5 cm de longitud (capilar de salida). Estos capilares se lavaron conectándolos a una bomba de HPLC mediante una unión tipo Valco y pasando a su través 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ de ACN/ H_2O 3/1 v/v. Seguidamente se colocó un filtro de fibra de vidrio entre la columna y el capilar de salida. Para ello se colocó una membrana de fibra de vidrio Whatman GF/A sobre una superficie dura y se atravesó dos veces con uno de los extremos del capilar de columna. Una vez colocado el filtro se pegaron los dos capilares con pegamento (Araldit TM) (Figura 21).

Para rellenar el capilar con fase estacionaria se resuspendieron 0.5 mg de Kromasil C-18 5 μ (Tecknokroma, Barcelona) en 2 ml de ACN/ H_2O 3/1 v/v. Se introdujeron 100 μl de esta suspensión en el interior de una columna vacía de HPLC de 100 x 1 mm de la que se habían eliminado los filtros de entrada y salida y a la que se conectó la microcolumna en uno de sus extremos. El otro extremo se conectó a la bomba de HPLC y se aplicó un flujo de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ para que el soporte cromatográfico se introdujera en el capilar. Una vez rellena la columna, se bajó el flujo hasta aproximadamente 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ con objeto de conseguir una presión constante de entre 1000-1400 psi, manteniéndose en esta forma durante unos 20 minutos para que la fase se compactara homogéneamente. Finalizado este proceso, la columna de sílice rellena se desconectó del sistema, se taparon los extremos clavándolos en sendas piezas de teflón y se almacenó en ACN/ H_2O 3/1 v/v hasta su utilización (Figura 22).

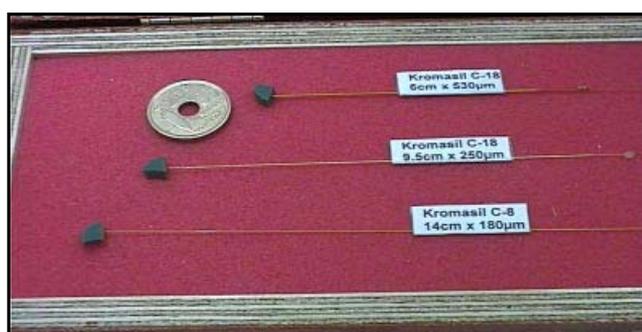


Figura 22: Columnas capilares autoconstruidas.

3.2. PREPARACIÓN DE LA INTERFASE DE MICROELECTROSPRAY

La interfase se construyó utilizando un capilar metálico de 200 μm ID (A-M System, Inc., Carlsborg, WA) y un capilar de sílice de 150 x 30 μm (OD x ID). Para ello, se cortó un trozo de capilar metálico de 1 cm de largo en el que se introdujo un filtro de fibra de vidrio atravesando

con uno de sus extremos una membrana de fibra de vidrio tal como se ha descrito en la sección anterior. Este filtro se situó en el centro del capilar metálico introduciendo un capilar de sílice por cada uno de sus extremos y fijando el conjunto con pegamento. Uno de los capilares de sílice se utilizó como aguja de electrospray mientras que el otro se utilizó como capilar de entrada y se conectó a la columna capilar. El pequeño espacio existente entre los extremos de estos capilares en el interior de la camisa formada por el capilar metálico constituye lo que se denomina unión líquida (*liquid junction*). En esta zona el líquido que atraviesa la interfase entra en contacto con el capilar metálico a través del cual puede aplicarse el voltaje necesario para la formación del spray (la sílice no es conductora). El extremo del capilar utilizado como aguja se estira a la llama con objeto de reducir el diámetro interno de salida a aproximadamente 5 μm . La interfase de microelectrospray se monta en el manipulador X-Y-Z del kit de la fuente de nanospray de Protana. La aguja se sitúa a una distancia de 3-5 mm de la entrada del espectrómetro y el capilar de entrada se conecta directamente a la salida de la columna analítica mediante una unión de Teflón (Figura 23).

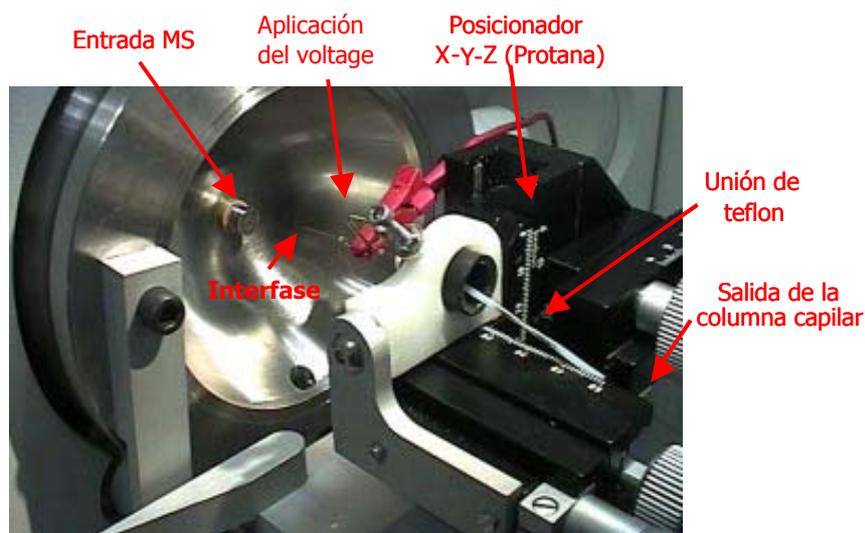


Figura 23: Interfase autoconstruida de microelectrospray colocada sobre un posicionador X-Y-Z de Protana (actualmente MSD Proteomics) y situada en un espectrómetro de masas LCQ (Thermo-Instruments, Barcelona).

3.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y ANÁLISIS

El extracto peptídico obtenido por cromatografía de inmunoafinidad a partir de 5×10^8 millones de células (apartados III.1.4 y 1.5) se concentró hasta un volumen final de 50 μl . Para desalar esta muestra, el extracto se inyectó en una microcolumna de 530 μm ID y 2 cm de largo rellena con Kromasil C18. El flujo de trabajo fue de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ y el gradiente utilizado fue el siguiente:

lavado de 5 minutos a 0% de B y gradiente lineal de 2 minutos de 0 a 60% de B, manteniéndose en este porcentaje de acetonitrilo durante 5 minutos (A: H₂O/ACN 95/5 v/v 0.05% TFA, B: ACN/H₂O 80/20 v/v 0.05 TFA). La señal se monitorizó por detección UV a 214 nm utilizando un detector HP1100 equipado con una celda U-Z de LC-Packings (LC Packings (The Netherlands) BV). La fracción que contenía los péptidos se colectó y se evaporó hasta 10 µl para eliminar el acetonitrilo.

La muestra desalada se inyectó en el sistema de capLC equipado con una columna de 10 cm de longitud y 180 µm ID. La columna analítica trabajó a un flujo de 2 µl/min utilizándose el siguiente gradiente: lavado de 2 min a 0% de B, gradiente lineal de 1 h de 0 a 60% de B y subida en 15 min a 80% de B (A: H₂O/ACN 95/5 v/v 1% ácido acético, B: ACN 1% ácido acético). Se aplicó un voltaje de 2.5 kV para la ionización y se ajustó la temperatura del capilar de entrada a 140°C. Los parámetros de la trampa de iones fueron 20 ms de tiempo máximo de inyección, 8 microbarridos acumulados, control de ganancia automática activado y voltaje del multiplicador a -910 V. Se obtuvieron, de forma automatizada, series de espectros consecutivos conteniendo espectros de barrido y de fragmentación siguiendo la estrategia descrita en el apartado III.2.3. Las señales analizadas por MS/MS fueron seleccionadas automáticamente a partir de las señales más abundantes presentes en los correspondientes espectro de barrido.

4.- ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS EPITELIALES QUE EXPRESAN POR TRANSFECCIÓN HLA-DR, II Y HLA-DM

La 2DE es una técnica de separación que permite el análisis de mezclas proteicas complejas generalmente extraídas de células, tejidos, fluidos u otras muestras biológicas. Mediante esta técnica, las proteínas se separan en base a su punto isoeléctrico en la primera dimensión (isoelectroenfoque, IEF) y según su tamaño molecular en la segunda dimensión (electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE). La 2DE fue descrita simultáneamente por O'Farrell y por Klose en 1975 (Klose 1975, O'Farrell 1975).

Una vez separadas en el gel, las proteínas se tienen que hacer visibles utilizando, generalmente, un método de tinción. Los más utilizados son la tinción visible (plata, azul de coomassie, tinción negativa con zinc-imidazol) y la fluorescente (SYPRO). Otros métodos de visualización como el marcaje radiactivo o el DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*) implican el marcaje de la muestra antes de la separación y su posterior visualización mediante detectores de radioactividad o escáneres de fluorescencia. En la técnica DIGE cada una de las dos muestras a comparar se marcan con un fluorocromo diferente y una mezcla a partes iguales de estas muestras marcadas se analiza mediante 2DE. Este análisis permite determinar muy rápidamente las señales que muestran cambios de expresión mediante la comparación de la intensidad de

fluorescencia producida por cada fluorocromo. Actualmente, el método DIGE utiliza un tercer fluorocromo para marcar una tercera muestra que actúa de patrón interno. El patrón interno está formado por una mezcla de todas las muestras analizadas de manera que las señales que se obtienen se pueden referenciar a este patrón. Esta característica, junto con el elevado rango dinámico de la señal fluorescente, permite una comparación cuantitativa muy precisa entre las muestras en estudio.

El marcaje de las muestras utilizadas en estos experimentos y la preparación de los geles correspondientes fue realizado por Nuria Colome, del Laboratorio de Proteómica del Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron (Dr. F.Canals).

4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se prepararon 4 muestras de cada uno de los tipos celulares. Para evitar desviaciones derivadas de un posible marcaje diferencial con uno de los fluorocromos, dos muestras de cada línea se marcaron con Cy3 y las otras dos con Cy5. Como estándar interno se utilizó una mezcla de las ocho muestras analizadas marcada con el fluorocromo Cy2.

Se cultivaron 4 botellas T75 de cada uno de los tipos celulares de forma simultánea obteniéndose un total de 8 pellets que se lisaron en 200 µl de tampón RIPA (150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% ácido deoxicólico, 0.5% SDS, 50 mM Tris pH 8), 1mM PMSF. El extracto obtenido se centrifugó y las proteínas se precipitaron utilizando el kit *2-D clean up* Amersham Biosciences para eliminar contaminantes que pudieran interferir en la reacción de marcaje. Los precipitados se resuspendieron en 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, ajustándose el pH a 8-9. El extracto obtenido se cuantificó utilizando el kit RC/DR de BioRad. Las muestras se marcaron con los fluorocromos (Amersham Biosciences) en condiciones de marcaje mínimo: 400 pmol de fluorocromo para cada 50 µg de proteína (Tabla VIII).

Tabla VIII: Diseño del marcaje de las muestras con los fluorocromos Cy3, Cy5 y Cy2.

GEL	Marcaje Cy3	Marcaje Cy5	Estándar interno Cy2
1	50 µg RIN-1	50 µg DR4liDM-2	
2	50 µg RIN-2	50 µg DR4liDM-3	50 µg proteína total (6.25 µg / muestra)
3	50 µg DR4liDM-1	50 µg RIN-3	
4	50 µg DR4liDM-4	50 µg RIN-4	

Las muestras marcadas se mezclaron para cargar en cada gel un replicado de cada tipo celular y el estándar interno (Tabla II) y el volumen final se ajustó a 150 µl con una solución que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, 4% (w/v) CHAPS, 2 mg/ml DTT y 2% (v/v) anfolitos.

4.2. SEPARACIÓN 2DE

El IEF se realizó en tiras de poliacrilamida de gradiente inmovilizado de 24 cm de longitud y rango de pI 3-10 (Amersham Biosciences). Se utilizó el sistema de IEF IPGPhor (Amersham Biosciences). Después de rehidratar las tiras durante 12 horas, la muestra se cargó mediante el procedimiento de *cup-loading*. Para evitar la evaporación de la muestra y la precipitación de la urea se aplicaron unas gotas de aceite mineral sobre las tiras (*IPG Cover*, Amersham Biosciences). Seguidamente la muestra se enfocó siguiendo el siguiente programa: 3 h a 300 V (carga de la muestra), subida a 1000 V en 6 h y, posteriormente, a 8000 V en 3 h y enfoque a 8000 V durante 4:40 h para llegar a un total de 56000 Vhr. Las tiras se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de la segunda dimensión.

La separación SDS-PAGE se realizó en el sistema de electroforesis EttanDalt Six de Amersham Biosciences. La aplicación del voltaje se realizó con la fuente de alimentación PowerPac1000 (BioRad) y la temperatura se mantuvo a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando un refrigerador Hetofrig CB (Heto). Los geles se polimerizaron al 12.5% utilizando vidrios de baja fluorescencia.

Previamente a la separación, las tiras del IEF se equilibraron durante 15 minutos en un tubo con 10 ml de un tampón de equilibrado que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% v/v glicerol, 2% w/v SDS, 10 mg/ml DTT y azul de bromofenol, y 15 minutos con el mismo tampón pero sustituyendo el DTT por 25 mg/ml de iodoacetamida. Una vez equilibrada, la tira se situó sobre el gel de poliacrilamida. Seguidamente se colocó junto al extremo básico de la tira un aplicador impregnado con 5 μl de una mezcla de marcadores de peso molecular (*Precision Plus Protein Standards*, BioRad) que se utilizaron como referencia para determinar la movilidad electroforética de las proteínas en el gel, y el conjunto se selló con agarosa al 0.5%. La separación electroforética se realizó en una etapa de 30 minutos a 2.5 W/gel seguida de otra etapa de 5 horas a 12 W/gel. Una vez acabada la separación, se obtuvieron imágenes de fluorescencia para cada uno de los fluorocromos Cy2, Cy3 y Cy5 mediante un instrumento Typhoon 9410 a longitudes de excitación/emisión de 488/520, 532/580 y 633/670, respectivamente. Finalmente, los geles se tñeron con tinción de plata utilizando el protocolo de Moertz (Moertz, 2001).

4.3. ANÁLISIS DE IMAGEN

El análisis de imagen se llevó a cabo con el paquete de software DeCyder 5.02 (Amersham Biosciences). Para la normalización y la triple codetección de las señales Cy2/Cy3/Cy5 de cada mancha resuelta en el gel se utilizó el módulo DIA (*DeCyder Differential In-Gel Analysis*). Seguidamente se calcularon las relaciones de volumen Cy3: Cy2 y Cy5: Cy2 y esta información se procesó mediante el módulo BVA (*DeCyder Biological Variation Analysis*) que

simultáneamente emparejó las manchas detectadas en todos los geles y calculó los cambios en la abundancia relativa.

5.- IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON HLA-DR EN CÉLULAS EPITELIALES ENDOCRINAS

Para aislar las proteínas que se encuentran interaccionando en la célula con la molécula de HLA-DR se utilizó una purificación por cromatografía de afinidad como la realizada para la purificación de los péptidos de clase II, con algunas modificaciones (apartado III.1.2). Los extractos obtenidos se analizaron mediante 2DE con objeto de determinar las diferencias entre los distintos transfectantes. La caracterización de proteínas de interés se llevó a cabo mediante la identificación de las proteínas en estos geles así como mediante el análisis directo de los extractos por MDLC- μ ESI-ITMS/MS.

5.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para cada experimento se partió de 50-200 x 10⁶ células de cada línea celular que se lisaron en un tampón compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 7.4 con 150 mM NaCl, 1% digitonina y 1mM PMSF. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 15000 xg / 4°C durante 20 minutos y los sobrenadantes se incubaron con bolas de sefarosa unidas al anticuerpo L243 durante 30 minutos a 4°C con rotación. Seguidamente se eliminaron las proteínas no retenidas y la columna se lavó con tampón de lisis conteniendo digitonina. Las proteínas retenidas se eluyeron con 1 ml de 0.1% TFA. Como control negativo se utilizaron las células RIN, ya que estas no expresan la molécula de MHC de clase II. Se llevaron a cabo cuatro grupos de experimentos de inmunopurificación (Tabla IX). En los dos primeros experimentos de optimización sólo se purificaron extractos de células RIN y DR4liDM. En los experimentos de comparación se trabajó con todas las líneas disponibles.

Tabla IX: Cantidad de proteína cargada en cada uno de los experimentos de inmunopurificación (optimización del método y comparación de las líneas transfectantes). Entre paréntesis se indica el porcentaje del eluido utilizado para la preparación de los geles 2DE en los experimentos de comparación.

Experimento	Proteína cargada (mg)				
	RIN	DR4	DR4li	DR4DM	DR4liDM
Optimización 1	6	-	-	-	6
Optimización 2	7.8	-	-	-	7.7
Comparación 1	8 (90)	7 (90)	12 (50)	12 (50)	12 (50)
Comparación 2	12 (60)	26 (40)	15 (50)	17 (60)	18 (50)

Para minimizar la degradación de las proteínas y la posible rotura de las interacciones existentes *in vivo*, el extracto se cargó en la columna inmediatamente después de la lisis. Por este motivo, la cantidad de proteína cargada en cada columna, que se calculó a posteriori con el kit RC/DC (BioRad), no fue exactamente la misma en todos los casos. Estas diferencias, junto con el hecho de que cada línea celular expresa cantidades diferentes de moléculas de MHCII, hacen difícil predecir a priori la cantidad de proteína total. En cualquier caso, para realizar un análisis de imagen en buenas condiciones es necesario cargar cantidades de proteína similares en cada una de las condiciones en estudio por lo que, dado que las cantidades de proteína disponibles no permitían su cuantificación por el método colorimétrico convencional, la concentración relativa aproximada de las muestras se evaluó mediante separación en gel y tinción con plata.

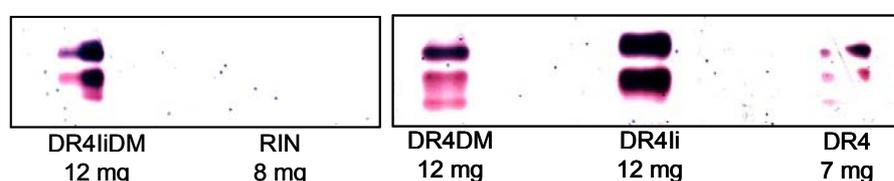


Figura 24: Separación SDS-PAGE del 1% del eluido obtenido en la purificación por inmunoadfinidad de las proteínas que interactúan con HLA-DR *in vivo*. Los gels se revelaron con tinción con plata y las bandas correspondientes a las cadenas α y β de la molécula de MHCII se cuantificaron para poder normalizar la cantidad de proteína separada por 2DE. Para cada extracto celular se indica la cantidad de proteína cargada en la columna.

Para ello, el 1% de cada eluido se cargó en un mini gel SDS-PAGE (sistema Mini-Protean de BioRad, 12% gel separativo, 4% gel concentrador, 75 mm de grosor), se tiñó y la intensidad de las bandas correspondientes a las cadenas alfa y beta de la molécula de MHC se cuantificó por densitometría. Estos valores se utilizaron para ajustar la carga en los gels 2DE (Figura 24 y tabla IX).

5.2. ANÁLISIS MEDIANTE 2DE

La cantidad de eluido adecuada en cada caso se concentró en el evaporador/concentrador hasta aproximadamente 100 μ l y las proteínas se precipitaron con el kit de limpieza de muestra *2D Clean-up* de Amersham Biosciences. El precipitado se solubilizó en 350 μ l del tampón de rehidratación de 2DE (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 40 mM Tris-Cl, 1.2% HED (DeStreak, Amersham Biosciences) y 0.5% anfolitos).

Se utilizó el mismo equipamiento para 2DE descrito en el apartado III.4.2. En este caso, la separación se realizó en tiras de poliacrilamida de gradiente inmovilizado de 18 cm de longitud y un rango de pI 3-10 y la carga de la muestra en las tiras se realizó junto con la rehidratación.

Para ello, se aplicaron 350 μ l de muestra en el centro de un sarcófago donde posteriormente se situó la tira de IEF que se cubrió con unas gotas de aceite mineral. Una vez finalizado el proceso de IEF (Tabla X) las tiras se almacenaron a -80°C hasta el momento de la separación SDS-PAGE. Ésta se llevó a cabo utilizando geles al 11% poliacrilamida y en las mismas condiciones electroforéticas que las descritas en 4.2.

Tabla X: Programa utilizado para el isoelectroenfoco

Paso	Voltage (V)	Duración (h:min)	Voltios-hora (Vh)
1	0	6:30	-
2	50	6:30	-
2	1000	1:00	-
3	4000	1:00	-
4	8000	1:00	-
5	8000	-	50000

* 50 μ A / tira, 20°C

5.2.1. TINCIÓN CON PLATA

El revelado de las proteínas separadas en el gel se realizó mediante tinción con plata. Esta tinción es uno de los métodos clásicos utilizados con este propósito. Los métodos de tinción con plata convencionales utilizan glutaraldehído para la fijación de las proteínas al gel previo a tratamiento con sales de plata. Este procedimiento no es adecuado si posteriormente es necesario digerir la proteína y extraer los péptidos de digestión para su identificación por EM. Por este motivo se han desarrollado protocolos específicos optimizados para su aplicación en proteómica donde, entre otras modificaciones, el glutaraldehído ha sido substituido generalmente por ácido acético.

En este trabajo se ha utilizado el método de Moertz (Moertz, 2001) después de contrastar su eficacia frente a otros métodos de tinción conocidos Blum (Blum, 1987), Vorum (Vorum, 1999) y EMBL (Shevchenko, 1996). La comparación se realizó determinando la sensibilidad obtenida con cada uno de estos métodos en el análisis de mezclas de proteínas mediante SDS-PAGE. Para ello se seleccionaron 8 proteínas estándar de diferente peso molecular, pI y con diferentes patrones de fosforilación y glicosilación y se prepararon dos mezclas diferentes. La mezcla 1 (M1) contenía BSA, Ig G y β -lactoglobina-A y la mezcla 2 (M2) contenía α 1-antitripsina, ovalbúmina y mioglobina. Se prepararon cuatro geles cargando por duplicado cantidades de 1 pmol, 500 fmol y 100 fmol de estas mezclas en cada gel. Cada uno de los geles se reveló utilizando un método de tinción distinto, observándose que el método de Moertz era el más sensible de todos ellos (Figura 25).

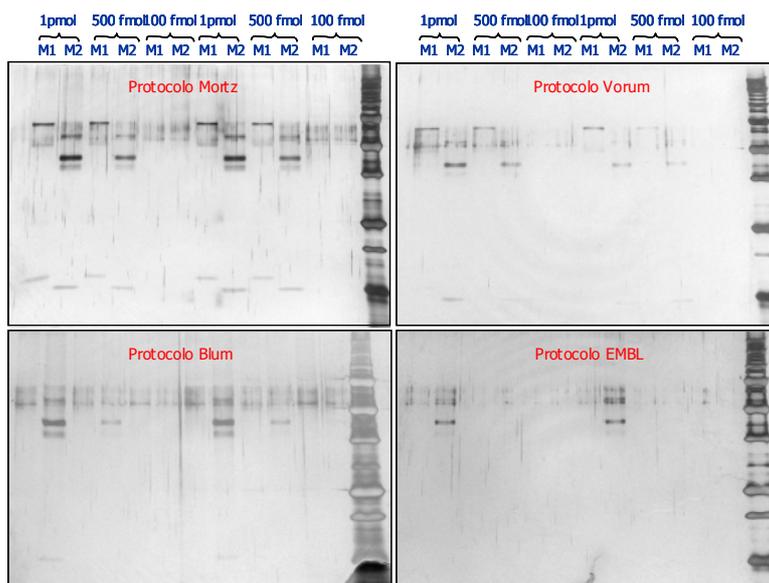


Figura 25: Separación mediante SDS-PAGE de 1 pmol, 500 fmol y 100 fmol de dos mezclas de proteínas (M1 y M2) y revelado del gel mediante tinción con plata utilizando los protocolos de Moertz, Vorum, Blum y EMBL.

5.2.2 ANÁLISIS DE IMAGEN

Una vez revelados los geles, las imágenes se digitalizaron utilizando un escáner Agfa DueScan y el programa Fotolook 3.60.00. Las imágenes se obtuvieron con una resolución de 300 ppi y se almacenaron en formato tiff (Figura 26). Los geles se guardaron en agua a 4°C dentro de un recipiente cerrado para su uso posterior .

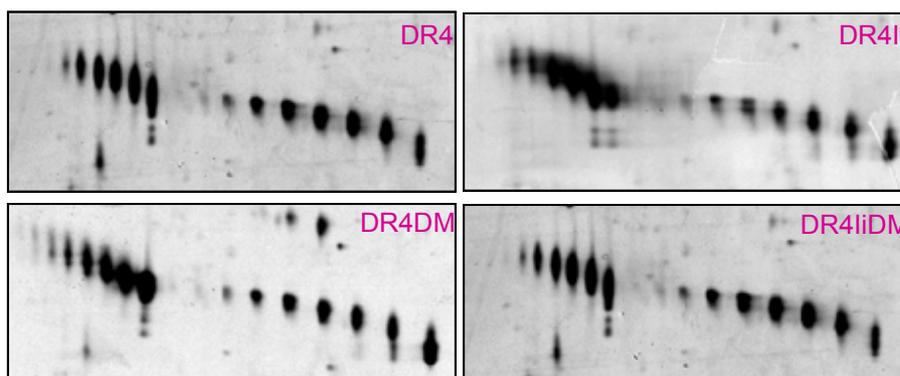


Figura 26: Imágenes de la zona del gel 2DE donde aparecen las manchas correspondientes a las cadenas alfa y beta de la molécula de MHCII, donde se observa que la cantidad cargada en cada uno de los geles es similar.

Para el análisis de imagen se utilizó el software ImageMaster 2D v2003.02. Las imágenes obtenidas se normalizaron respecto a una de las manchas que aparecía en todos los geles. Se realizaron dos análisis de imagen por separado (uno para cada experimento de inmunopurificación), ya que la cantidad de proteína cargada en ambos experimentos era diferente. Las imágenes obtenidas eran similares pero algunas de las manchas solo aparecían en los geles que tenían más proteína (geles del experimento 2). Se tuvieron en cuenta todas las manchas que aparecían en los geles de los dos experimentos y aquellas que únicamente se encontraban en uno de ellos, pero que en el otro no se pudo descartar su presencia, bien porque la zona no estaba bien resuelta, bien porque la cantidad de proteína era menor y la mancha era muy tenue en el gel donde se detectaba.

5.3 ANÁLISIS DE NUEVAS PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON HLA-DR EN CÉLULAS EPITELIALES MEDIANTE MDLC- μ ESI-ITMS/MS

La cromatografía líquida multidimensional (MDLC) es una alternativa eficiente a los métodos de electroforesis en gel para el análisis de los componentes del proteoma (Wagner, 2002; Washburn, 2001). Mediante esta técnica pueden separarse mezclas complejas de péptidos y proteínas utilizando varias etapas cromatográficas consecutivas. La estrategia más utilizada actualmente en el ámbito de la proteómica es la realización de una primera separación mediante intercambio iónico y el posterior reanálisis de las fracciones obtenidas mediante separación en fase reversa. Las ventajas de esta técnica frente a la 2DE son la alta reproducibilidad, la posibilidad de automatización y la capacidad para identificar todo tipo de proteínas independientemente de sus características de peso molecular y punto isoeléctrico. Esta estrategia ha dado lugar al desarrollo de los métodos denominados de *shotgun proteomics* utilizados para la identificación a gran escala de proteínas. Estos métodos implican una digestión enzimática de los extractos proteicos que, a diferencia de los métodos de separación en gel, se realiza previa a la etapa de separación.

En este trabajo se ha utilizado esta estrategia para la caracterización de proteínas que interaccionan con las moléculas HLA-DR4. La información obtenida mediante esta técnica se utilizó para complementar los resultados obtenidos mediante el análisis 2DE. Para llevar a cabo este trabajo, se construyó un sistema MDLC acoplado *on-line* al espectrómetro de masas de trampa iónica LCQ (figura 27 y 28).

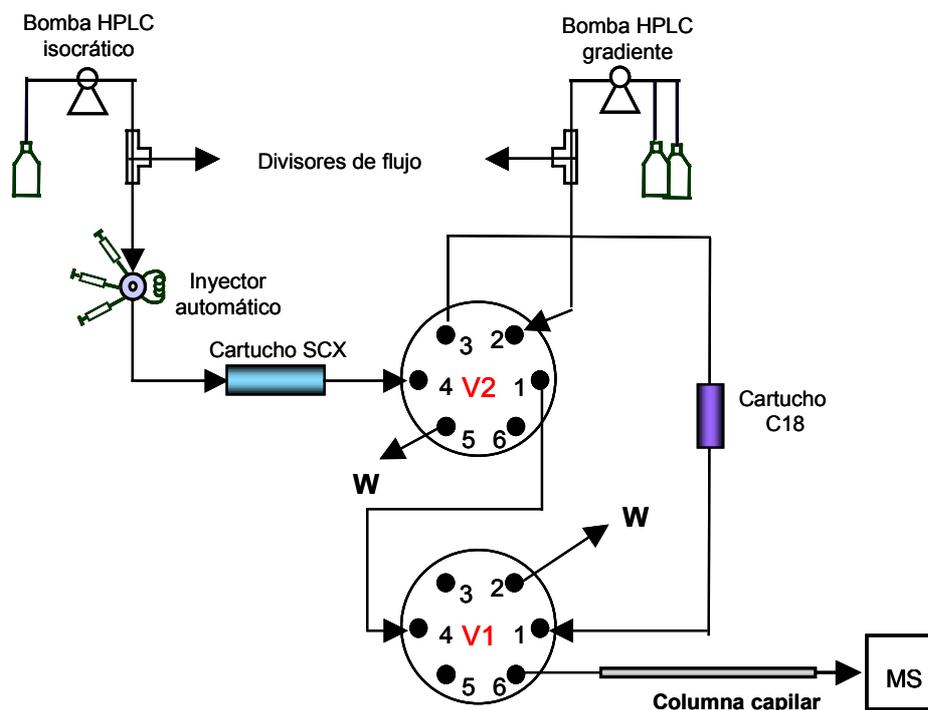


Figura 27: Esquema del sistema MDLC utilizado en este trabajo. La muestra inyectada se absorbe en un cartucho de intercambio iónico (SCX). Este material se eluye de forma fraccionada mediante el paso por la columna de soluciones de sal de concentración creciente. Cada una de estas fracciones es transportada al cartucho de concentración y posteriormente desorbida y separada mediante un gradiente de disolventes en la columna capilar.

Para el análisis, se utilizó la mitad del eluido obtenido en la columna de inmunoafinidad (c.a. 500 μ l) preparada para purificar las proteínas que interaccionan con DR (apartado III.6.1). La muestra se evaporó a sequedad en el evaporador/concentrador, se resuspendió en 50 μ l de 6M urea, 50 mM Tris pH 8, 10 mM DTT y se incubó durante 1 hora a 25°C. Posteriormente se añadieron 6 μ l de 500 mM IAA y se incubó durante 30 minutos a 25°C en la oscuridad. Este extracto se diluyó 3 veces con 25 mM NH_4HCO_3 pH 8, se añadió 1 μ g de tripsina (Promega) y se incubó durante 24 horas a 37°C. Finalmente, se añadieron 5 μ l de TFA al extracto y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

Como paso previo e imprescindible para el análisis por MDLC, el extracto peptídico se desaló en un cartucho de C18 (SPE Varian C18 3 ml, 15 mg de fase) siguiendo el siguiente protocolo: Equilibrado de la fase con 3 x 3 ml de ACN/ H_2O v/v 1/1 y 3 x 3 ml de 0.1% TFA, carga de la muestra (2x), lavado con 1 x 2 ml 0.1% TFA y 3 x 3 ml H_2O y elución con 2 x 0.5 ml ACN/ H_2O

1/1 v/v 0.25 % TFA. El eluido obtenido se evaporó a sequedad y se redisolvió en 40 μ l de 5 mM KH_2PO_4 , 5% ACN, pH 3. Toda la muestra se inyectó en el sistema de MDLC.

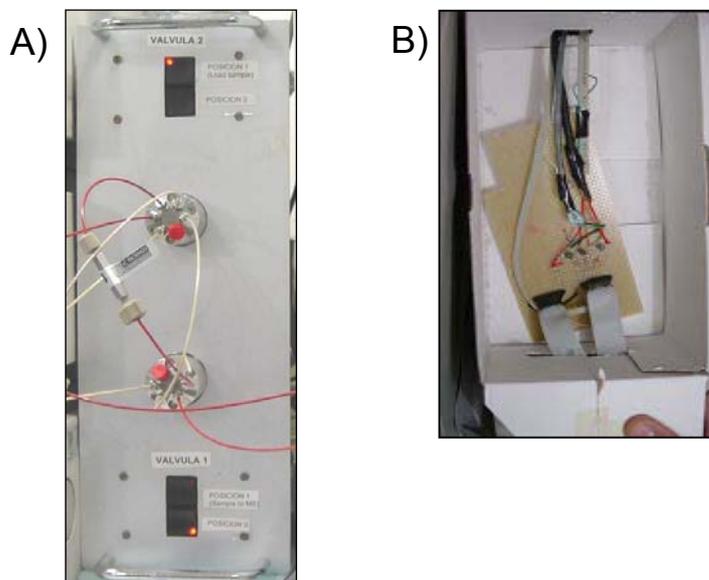


Figura 28: (A) El sistema para MDLC utiliza dos válvulas Valco electromecánicas de seis puertos y dos posiciones (0 y 1) conectadas de forma que en la configuración 0-1 (V1 en pos 0 y V2 en posición 1) la muestra o los saltos de sal se cargan en la precolumna SCX, en la posición 1-1 esta muestra pasa a la precolumna C18 y en la posición 1-0 la muestra se eluye de la precolumna a la columna analítica y al detector arrastrada por el gradiente generado con la bomba HP. (B) Para el control coordinado de todos los elementos se utilizó un ordenador Pentium 100 provisto de una tarjeta I/O y un convertidor de señal externo. La temporización se llevó a cabo mediante un programa de ordenador (lenguaje C+) que permitía el control de hasta 7 dispositivos incluidas las válvulas, el espectrómetro de masas (inicio de adquisición) y de los componentes del sistema cromatográfico (inicio de inyección y parado de la bomba secundaria).

Este sistema utiliza dos bombas cromatográficas. Para la carga de la muestra y de los saltos de sal en el cartucho SCX se utilizó una bomba Kontron 325 System (Kontron Instruments) trabajando en modo isocrático a 0.2 ml/min. La fase móvil utilizada (tampón SCX) fue 5 mM KH_2PO_4 , 5% ACN, pH 3. Se utilizaron 5 etapas de elución mediante la inyección de 20 μ l de soluciones de acetato amónico de concentración creciente (25, 75 y 250 mM, 1 y 2 M de acetato amónico en tampón de SCX). Para el análisis de estas fracciones en la segunda dimensión (fase reversa) se utilizó un sistema HP1100 (Agilent Technologies, Barcelona) que incluía un inyector automático (utilizado para la inyección de la muestra y de los saltos de sal) y un detector UV equipado con una celda en Z para microflujos de LCPackings que se utilizó para la puesta a punto de la separación. Este sistema estaba controlado por el software HP ChemStation.

Para la primera etapa de separación se utilizó un cartucho BioX-SCX 500 μm ID x 15 mm y para la preconcentración un C18 300 μm ID x 5 mm, ambos de LC Packings. Como columna analítica se utilizó una columna autoconstruida de Kromasil C18, 5 μm , 5 cm x 180 μm (apartado III.3.1). La separación en la fase reversa se llevó a cabo utilizando los mismos disolventes y el mismo gradiente que el descrito para el capLC-MS/MS. Las condiciones de adquisición con el espectrómetro de masas fueron también las mismas (apartado III.3.3).

6- IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS SEPARADAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA MEDIANTE TÉCNICAS PROTEÓMICAS

La identificación de proteínas separadas en geles de poliacrilamida consta de varios pasos. En primer lugar las proteínas se digieren *in situ*. Posteriormente, los péptidos formados son extraídos y su masa se determina mediante MALDI-TOF. Esta información permite en muchos casos identificar la proteína problema mediante la utilización de programas de búsqueda que comparan la información experimental con la existente en las bases de datos. Esta técnica se denomina mapeo peptídico o PMF (*Peptide Mass Fingerprinting*). En los casos en que la proteína no puede identificarse mediante PMF, el extracto peptídico se desala utilizando un ZipTip C18 (Millipore) y se analiza por nESI-ITMS/MS con objeto de obtener la secuencia o *tags* de secuencia de uno o más péptidos de la mezcla. Como anteriormente, la proteína puede identificarse a partir de esta información utilizando las correspondientes herramientas de búsqueda en bases de datos. Estas técnicas se describirán a continuación. Las herramientas bioinformáticas utilizadas en estas búsquedas y los métodos de secuenciación *de novo* (independientes de bases de datos) se describirán en el apartado III.7.

6.1. DIGESTIÓN EN GEL

Para la digestión semiautomática de las muestras se utilizó el sistema de Millipore “*Multiscreen vacuum manifold*” y placas para digestión de 96 pocillos (MSD-Proteomics).

Las manchas se recortaron de los geles en una campana de flujo laminar vertical utilizando un bisturí y se introdujeron en la placa de digestión. Los geles se lavaron 3 veces con 50 μl de un tampón de NH_4HCO_3 (25 mM, pH 8) y se deshidrataron lavándolos tres veces más con ACN. Las proteínas del gel se redujeron añadiendo 50 μl de 10 mM DTT en tampón NH_4HCO_3 e incubando durante 1 hora a 25 °C. Posteriormente, las cisteínas reducidas se carbamidometilaron añadiendo el mismo volumen de iodoacetamida (55 mM) en tampón NH_4HCO_3 e incubando durante 30 minutos a 25 °C en oscuridad. Los geles se lavaron una vez con 50 μl de tampón NH_4HCO_3 y se deshidrataron lavándolos tres veces con ACN. Seguidamente, se añadieron 5-15 μl de tripsina (50 ng/ μl) (dependiendo del volumen del gel se añadía más o menos volumen,

intentando que todo el gel se rehidratara con esta solución) y se incubó durante 45 minutos a 4 °C. La tripsina no absorbida se eliminó y el gel se cubrió con el volumen necesario de tampón NH_4HCO_3 . La digestión se realizó a 30 °C durante 16 horas (Carrascal, 2002).

La extracción de los péptidos de digestión se realizó utilizando 3 lavados con ACN/ H_2O 1/1 v/v 0.25% TFA seguidos de 3 lavados con ACN. Una fracción de 0.5 μl del extracto obtenido en el primer lavado se cargó directamente en la placa de MALDI-TOF. El resto del extracto (aprox 80-120 μl) se almacenó a -80°C para análisis posteriores.

6.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE MAPEO PEPTÍDICO

Para la identificación de las muestras mediante mapeo peptídico se utilizó un MALDI-TOF Voyager DE PRO (Applied Biosystems, Barcelona) trabajando en modo reflectrón positivo. Una fracción de 0.5 μl del extracto (ver III. 6.1) se cargó en una placa de 96 x 2 pocillos, se mezcló con 0.5 μl de la matriz (3 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en ACN/ H_2O 2/1 0.1% TFA) y se dejó secar. Los análisis se realizaron en modo automático utilizando un valor de láser de 1800-1900 V y promediando los espectros obtenidos a partir de 450 disparos en el rango de m/z de 750 a 4500. Los espectros se calibraron externamente utilizando una mezcla estándar de 5 péptidos (des-Arg1-bradiquinina (Mr 904.46), Glu1-fibrinopéptido B (Mr 1570.68), angiotensina-1, (Mr 1296.69), ACTH 1-17 (Mr 2093.09), ACTH 18-39 (Mr 2465.20) , ACTH 7-38 (Mr 3657.93)) y, si era posible, internamente utilizando los iones derivados de los péptidos de autodigestión de la tripsina (Mr 842.5100, 1045.5642, 2011.1046, 2807.3145 y 3337.7577).

En los casos en los que no se pudo identificar ninguna proteína en este primer análisis se llevó a cabo un reanálisis del extracto concentrado a partir del total del material disponible. Para ello, el correspondiente extracto (80-120 μl) se evaporó a sequedad y se redisolvió en 5 μl de MeOH/ H_2O 1 / 2 v/v 0.1% TFA, cargándose en la placa de MALDI 0.5 μl de esta disolución.

6.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS

En los casos en los que no se pudo identificar ninguna proteína mediante el método de PMF pero se detectaron señales en el espectro de MALDI-TOF, las muestras se reanalizaron por nESI-ITMS/MS para intentar secuenciar alguno de los péptidos de digestión. Como paso previo a la secuenciación de los péptidos mediante nESI-ITMS/MS las muestras se diluyeron añadiendo 10 μl de H_2O 1% TFA y se desalaron utilizando un ZipTip C-18 siguiendo el siguiente protocolo: lavado y acondicionamiento con 10 μl x 5 de ACN/ H_2O 1/1 y H_2O 0.1% TFA, carga de la muestra 10 x 10 μl , lavado con 3 x H_2O 0.1% TFA y 3 x H_2O y elución de los péptidos con 5 μl de 70% metanol 1% ácido acético. Un volumen de 2-3 μl de estos eluidos se analizaron por

nESI-ITMS/MS de la misma forma que en el análisis de los repertorios peptídicos (apartado III.3).

7.- HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

7.1. BÚSQUEDA EN BASES DE DATOS

Para la identificación de proteínas mediante PMF los espectros obtenidos en el análisis por MALDI-TOF se trataron ajustando la línea de base, eliminando el ruido y realizando un *deisotopado* de los picos para generar un listado de valores que correspondían con los iones monoisotópicos de cada péptido detectado. Posteriormente se realizó la búsqueda en bases de datos utilizando los programas Protein Prospector y MASCOT. Para realizar estas búsquedas se eligió mamíferos como grupo taxonómico, tripsina como enzima de digestión, las cisteínas se consideraron carbamidometiladas y se tuvo en cuenta la oxidación de las metioninas, la formación de piroglutámico y la posible acetilación del extremo N-terminal.

En los análisis mediante MALDI-TOF/TOF de los repertorios peptídicos la identificación de las secuencias a partir de los espectros de fragmentación se realizó utilizando el programa MASCOT. Para realizar las búsquedas no se restringió ni el tamaño ni el pI de las proteínas, se eligió mamíferos como grupo taxonómico, no se utilizó ninguna restricción por enzimas, las cisteínas se consideraron sin modificar y se tuvieron en cuenta modificaciones como la oxidación de metioninas, la presencia de piroglutámico, la fosforilación de serinas, treoninas y tirosinas y la acetilación del extremo N-terminal.

En los análisis mediante nESI-ITMS/MS se utilizó el programa MS-Tag incluido en el software Protein Prospector (UCSF Mass Spectrometry Facility, University of California) para la identificación de los péptidos a partir del espectro de fragmentación. Se utilizaron los mismos parámetros que en los análisis por MALDI-TOF/TOF para la identificación de los péptidos de clase II, realizándose una segunda búsqueda sin restringir el grupo taxonómico en el caso de que no se encontrara ningún posible candidato en la primera. Para la secuenciación de péptidos provenientes de digestión en gel con tripsina, se eligió mamíferos como grupo taxonómico, tripsina como enzima de digestión, las cisteínas se consideraron carbamidometiladas y se tuvo en cuenta la oxidación de las metioninas, la formación de piroglutámico y la posible acetilación del extremos N-terminal

En los análisis por capLC-MS/MS y por MDLC-ITMS/MS se utilizó el programa SEQUEST (Thermo Instruments, Barcelona) para la identificación de las proteínas a partir de los espectros de MS/MS, confirmándose todos los péptidos identificados de forma manual para evitar falsos

positivos. Se utilizó la base de datos NCBI restringiendo únicamente la búsqueda al subgrupo mamíferos. Para la identificación de los repertorios peptídicos se utilizaron los mismos parámetros que en los análisis por MALDI-TOF/TOF. Para la identificación de proteínas asociadas a DR, se eligió tripsina como enzima de digestión, las cisteínas se consideraron carbamidometiladas y se tuvo en cuenta la oxidación de las metioninas, la formación de piroglutámico y la posible acetilación del extremo N-terminal. Se utilizaron los siguientes parámetros: *threshold* 300000, *Group scan* 1, *minimun group count* 1 y *mimimun ion count* 10.

7.2. SECUENCIACIÓN DE NOVO

En el caso de no lograr identificar el péptido mediante búsqueda en bases de datos, se caracterizaron tags de secuencia bien manualmente o mediante secuenciación “*de novo*” utilizando el programa de distribución libre LutefiskXP a través de una interfase de usuario desarrollada en el laboratorio con el lenguaje de programación Xbasic (Figura 30). El código fuente de esta interfase se incluye en el anexo III. Los *tags* obtenidos se utilizaron para buscar la proteína origen por homología realizando una búsqueda en BLAST (*B*asic *L*ocal *A*lignment *T*ools, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/>).

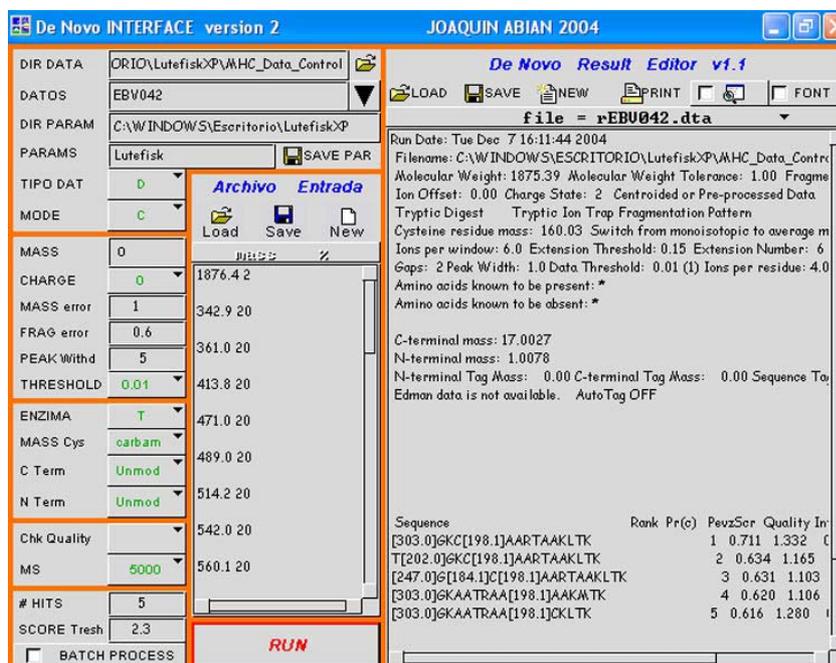


Figura 29: Interfase para la secuenciación *de novo* a partir de espectros de MS/MS utilizando el software LutefiskXP.

7.3. BASES DE DATOS

Se utilizaron las bases de datos de proteínas SwissProt (European Bioinformatics Institute, Heidelberg, Germany), NCBI y Genpept (National Center for Biotechnology Information, WA).

8. LÍNEAS CELULARES

Todas las células utilizadas para la identificación de los repertorios peptídicos habían sido previamente preparadas y cultivadas en el laboratorio de Inmunología de D.Jaraquemada (Serradell 1999). Para el resto de estudios se han realizado nuevos cultivos a gran escala de las distintas líneas transfectantes, RIN y de células B-LCL en colaboración con el Dr Iñaki Alvarez. Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo en un incubador a 37° en presencia de 5% de CO₂, utilizando los medios de cultivo adecuados.

8.1. CÉLULAS RINm5F

La línea celular RINm5F proviene de un insulinoma de rata (Gadzar 1980). Estas células se cultivaron en monocapas en un medio RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, MS, USA) al que se le adicionó 2 mM L-glutamina, 0.1 mg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina y 10% de suero fetal bovino (FSC) previamente descomplementado por calor (56°C durante 30 minutos). Las células se cultivaron en botellas de polipropileno de 225 cm² de área (T175, Costar) y se diluyeron cada 3-4 días por tripsinización con tripsina (Sigma, St.Louis, MO, USA) al 0.0025% en tampón fosfato salino pH 7.2 con 0.02% EDTA.

Las cuatro líneas de transfectantes RINm5F-DRB1*0401 (DR4), RINm5F-DRB1*0401-Cadena invariante (DR4Ii), RINm5F-DRB1*0401-HLA-DM (DR4DM) y RINm5F-DRB1*0401-Cadena invariante- HLA-DM (DR4IiDM) se cultivaron en las mismas condiciones que las células RINm5F añadiendo a cada medio de cultivo el antibiótico de selección correspondiente (Serradell, 1999). Los antibióticos utilizados y su concentración se describen en la tabla I.

Tabla I: Antibióticos de selección utilizados en el cultivo de las 4 líneas de transfectantes

Células	Antibiótico
DR4	Gentamicina 0.25 mg/ml
DR4Ii	Gentamicina 0.25 mg/ml + 0.25 mg/ml xantina, 15µg/ml hipoxantina, 6 µg/ml ácido micofenólico
DR4DM	Gentamicina 0.25 mg/ml + higromicina B 0.3 mg/ml + puromicina 2 µg/ml
DR4IiDM	Gentamicina 0.25 mg/ml + higromicina B 0.3 mg/ml + 2 µg/ml puromicina+ 0.25 mg/ml xantina, 15µg/ml hipoxantina, 6 µg/ml ácido micofenólico

Para el análisis de los péptidos asociados a clase II se obtuvieron 1.5×10^9 células de las líneas DR4 y DR4li y 3×10^9 de las líneas DR4DM y DR4liDM después de aproximadamente 6 meses y 1 año de cultivo, respectivamente.

Para los experimentos de aislamiento e identificación de las proteínas que interaccionan con la molécula HLA-DR4 en las células epiteliales, se cultivaron un total de 8×10^8 células de cada transfectante utilizando botellas T175 sin utilizar antibióticos de restricción.

Para el estudio de expresión proteica diferencial de las células RIN y RIN-DR4liDM se cultivaron 4 botellas T75 de células RIN y DR4liDM de forma paralela para que las condiciones del cultivo fueran exactamente iguales.

8.2 CÉLULAS B LINFOBLASTOIDES (B-LCL)

Las células B-LCL se obtuvieron mediante la transformación por el virus de Epstein-Barr de linfocitos aislados a partir de sangre periférica de un paciente de diabetes de tipo 1, homocigoto para el alelo DRB1*0401 (Costa M 2002, datos no publicados). Estas células se cultivaron en suspensión en medio completo utilizándose botellas T175 y botellas de vidrio con superficie plana incubadas en rotación. Al igual que con las células epiteliales, para llevar a cabo los análisis correspondientes, las células se recogían por centrifugación, se lavaban con PBS, se congelaban en nitrógeno líquido y se almacenaban a -80°C hasta su utilización.

8.3. CITOMETRÍA DE FLUJO

El fenotipado de las líneas celulares se realizó mediante inmunofluorescencia directa por citometría de flujo de células en suspensión. Para el análisis se utilizó un citómetro de flujo FACscan con el software Cellquest (Becton-Dickinson, San Jose, USA). Dependiendo de la molécula a caracterizar se realizó un marcaje de superficie (CLIP y HLA-DR) o un marcaje citoplasmático (li y HLA-DM).

Marcaje de superficie

Aproximadamente $1-3 \times 10^5$ células se resuspendieron en PBS-2% FCS y se centrifugaron 5 minutos a 500 xg. El pellet celular lavado se incubó con 50 μl del anticuerpo primario (anticuerpo contra la molécula que vamos a analizar) 30 minutos a 4°C . Seguidamente, las células se lavaron y se incubaron con 50 μl del anticuerpo secundario (GaM-FITC, anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón marcado con fluoresceína) durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Los anticuerpos utilizados fueron CerCLIP (CLIP, Dr. P. Cresswell / Denzin et al, 1994) y L243 (HLA-DR).

Marcaje citoplasmático

Entre $0.5-1 \times 10^6$ células se fijaron durante 10 minutos en 100 μl de PBS con 1% paraformaldehído. Estas células se lavaron 3 veces y se incubaron 30 minutos en la oscuridad con 50 μl de anticuerpo primario diluido en PBS con 0.05% de saponina (que permite la entrada del anticuerpo dentro de las células). Seguidamente, se realizaron tres lavados y se incubaron con 50 μl de anticuerpo secundario en 0.05% de saponina durante 30 minutos en la oscuridad. Este protocolo es una variación del descrito por Dodi y colaboradores en 1994 (Dodi, 1994). Los anticuerpos utilizados fueron VIC-Y1 (li, Dr. W. Knapp, IFI, Viena, Austria / Quaranta et al, 1984) y 5C1 (HLA-DM α , Dr. P. Morton).

8.4. WESTERN-BLOT

Alrededor de $0.5-1 \times 10^7$ células se lisaron en un tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.4 que contenía 150 mM NaCl, 1 mM Pefabloc, 10 mM iodoacetamida, 5 μM aprotinina, 5 μM leupeptina, 2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ pepstatina y 1% digitonina. El extracto proteico se resuspendió en el tampón de carga (2% SDS, 125 mM Tris, 10% glicerol, 0.1% BFB, pH 6,8) y se desnaturalizó hirviendo la muestra durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en un gel al 12% de poliacrilamida utilizando el sistema Mini-Protean de BioRad. Después de la electroforesis, el gel se transfirió durante 1:45 horas a 0.8 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) utilizando 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 192 mM Glicina, 0.1% SDS y 20% metanol como tampón de transferencia. La inmunodetección se realizó con los anticuerpos primarios DA6.147, LL1, 5C1 y anti- β -tubulina seguidos por el anticuerpo secundario anti-mouse IgG-HRP (Amersham Bioscience). La membrana se reveló con quimioluminiscencia utilizando el kit ECL de Amersham Bioscience.

El western-blot realizado como control en el experimento de aislamiento y purificación de las proteínas que interaccionan con HLA-DR4 se realizó siguiendo este mismo protocolo, sólo que se cargó en el gel el 1% del eluido obtenido en la cromatografía de inmutafinidad y se utilizó el anticuerpo DA6.147 para la detección de la molécula de MHCII.