

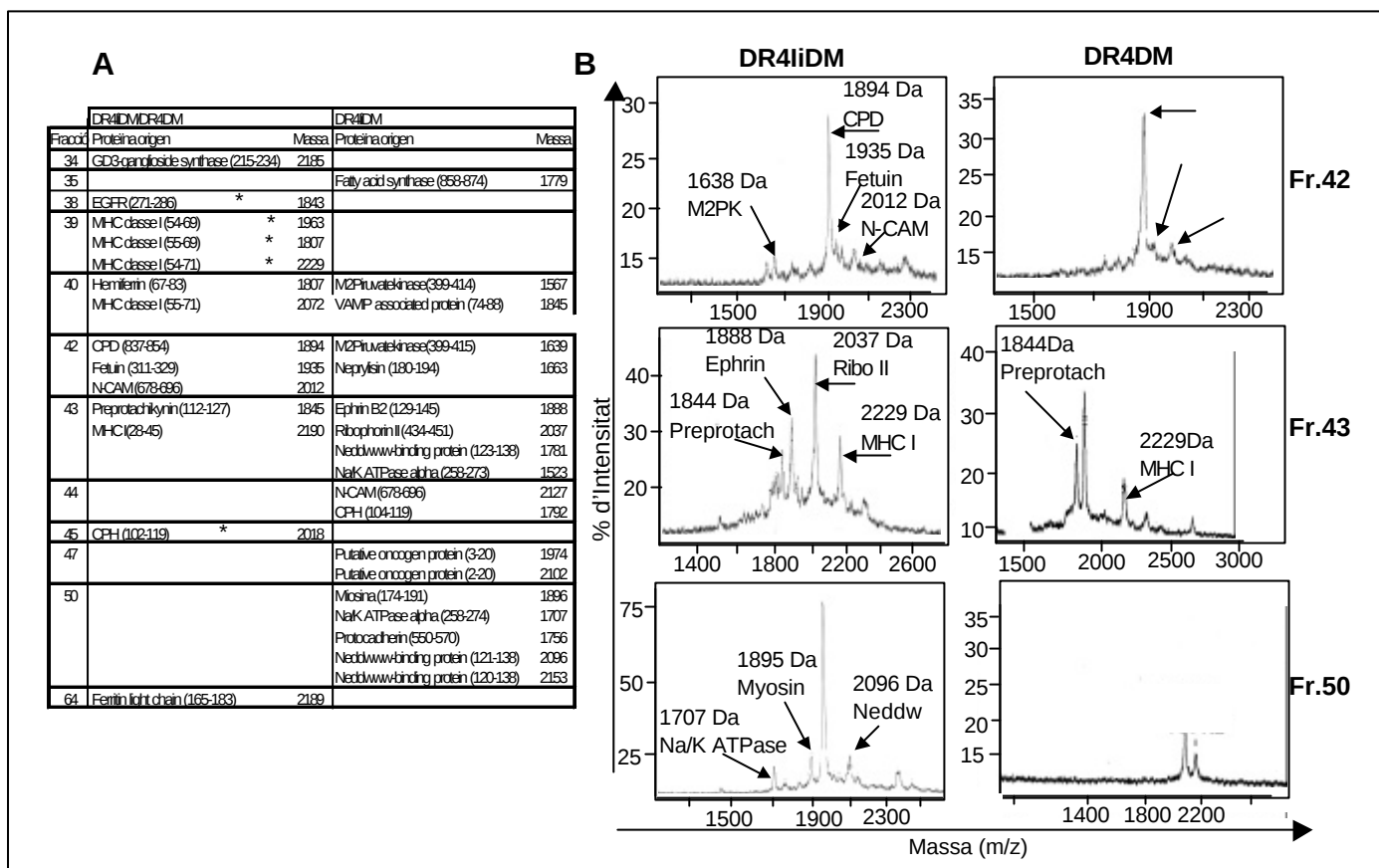


Figura 35. El 40% dels lligands de DR4 en les cèl.lules DR4iDM també s'identifiquen en el repertori de DR4 eluït de les cèl.lules DR4DM. (A) Taula amb els lligands comuns dels repertoris de les cèl.lules DM⁺ i amb els lligands exclusius de les cèl.lules DR4iDM. La identitat dels lligands assenyalats (*) es confirmà mitjançant la seqüenciació per ESI-trampa iònica de l'espècie molecular corresponent de l'eluït de la línia DR4DM. (B) Comparació dels espectres obtinguts per MALDI d'algunes de les fraccions de les cèl.lules DR4iDM i DR4DM que permeten identificar espècies moleculars iguals en els dos repertoris (fraccions 42 i 43) i bé exclusives (fracció 50) de les cèl.lules DR4iDM.

Dels 32 lligands identificats en els espectres obtinguts per MALDI de les fraccions analitzades, el 60% (19) eren exclusius del repertori associat a DR4 en presència de les dues chaperones, mentre que el 40% (13) presentaven espècies moleculars de massa homòloga en el repertori de les cèl.lules DR4DM. La identitat de 5 d'aquestes 13 espècies moleculars es va confirmar per seqüenciació en ESI-trampa iònica. Tots els lligands en com en les dues línies cel·lulars derivaven de proteïnes fàcilment accessibles a la via endocítica, com proteïnes exògenes, de superfície o secretades. Tots els epítops citoplasmàtics i algunes variants en longitud dels pèptids de superfície eren exclusius del repertori associat a DR4 en presència d'ambdues chaperones.

En resum, el repertori de lligands associats a les DR4 en la línia cel·lular RINm5F en presència d'I i HLA-DM, estava format per un conjunt de pèptids derivats majoritàriament de proteïnes autòlogues, amb una diversitat important, incloent tant

l·ligands d'expressió ubiqua com específics de teixit. El 60% dels l·ligands identificats eren exclusius d'aquesta línia cel·lular i per tant dependents de l'expressió d'Ii i d'HLA-DM.

4.2. Descripció dels pèptids identificats del repertori associat a DR4 en les cèl·lules DR4DM

Tal com es mostra a la taula IX, que resumeix les característiques de les 16 seqüències identificades del repertori de les cèl·lules DR4DM, tots els l·ligands menys 2 eren iguals als pèptids identificats en les triple transfectants, tot i que podien presentar diferències de longitud en algun extrem. Aquesta dada confirmava que DM no només reduï a el nombre de l·ligands associats a DR4, sinó que també limitava la composició del repertori. Totes les seqüències respectaven el motiu d'unió a DR4 amb afinitats variables i el rang de longitud estàndard d'entre 15-21 aa. Al igual que en la línia descrita anteriorment, la majoria dels pèptids eren derivats de proteïnes autòlogues (amb l'excepció d'un epítot de l'Apolipoproteïna D). El grup més nombrós de l·ligands s'originava a partir de proteïnes de la superfície cel·lular, però també s'identificà l'epítot de la carboxipeptidasa H de la via secretora i el de la SGP-1, resident en la via endocítica. Els sis pèptids derivats de tres proteïnes citosòliques (ER-60, GAPDH i Nedd4www binding protein), també es trobaven en el repertori anterior i es corresponien amb espècies moleculars no detectables per MALDI. Les altres dues seqüències d'aquest tipus cel·lular deriven de l'Apolipoproteïna D exògena i de la cadena α d'una molècula del MHC no corresponent al cluster RT.1.

Mr	Long	P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9																	Proteina origen	Localització	Nº Id	PS	C- o N-Ter				
1855	17	V	L	N	Q	E	L	R	A	D	G	T	V	N	Q	I	E	G	Apolipoprotein D (77-93)	exògena	P05090	6.5	no				
1962.6	16	R	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K	G	MHC class I (56-69)	superfície	P70527	5.7	no					
2229.6	18	R	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K	G	H	E	MHC class I (54-71)	superfície	P70527	5.7	no			
1806.8	15	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K	G		MHC class I (55-69)	superfície	P70527	5.7	no					
1962.9	16	E	R	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	L	V	A	K	MHC non RT1 alpha 1 chain (77-93)	superfície	P15978	2.3	no					
1967.8	18	E	P	S	V	H	N	Y	F	A	I	D	P	T	T	G	A	I	H	Protocadherin (1815-1833)	superfície	Q9wU10	4.9	no			
2119	18	L	Y	N	P	T	T	Y	Q	M	D	V	N	P	E	G	K	Y	S	Epidermal growth factor receptor (270-287)	superfície	P00533	5.7	no			
1842.8	16	N	P	T	T	Y	Q	M	D	V	N	P	E	G	K	Y	S		Epidermal growth factor receptor (272-287)	superfície	P00533	5.7	no				
2017.9	18	E	P	G	E	P	E	F	K	I	Y	G	N	M	H	G	N	E	A	Carboxipeptidase H (102-119)	secretada	P15087	3.6	no			
2049	17	S	L	Q	E	Y	L	A	E	Q	N	Q	R	Q	L	E	S	N		Sulfated glycoprotein-1 (SGP-1)(141-157)	endocítica	P10960	4.5	no			
1784	16	D	E	F	K	K	F	I	S	D	K	D	A	S	V	V	G		Protein disulfide isomerase ER-60 (143-158)	ER/GA	P11598	4.4	no				
2091.9	17	I	S	W	Y	D	N	E	Y	G	Y	S	N	R	V	V	D	L	GAPDH (308-324)	citosòlica	P04797	0.1	no				
2082	19	G	F	P	K	P	P	S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y	D	E	Nedd4WWW (120-138)	citosòlica	Q9EQHS	5.2	no		
2025	18	F	P	K	P	P	S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y	D	E	Nedd4WWW (121-138)	citosòlica	Q9EQHS	5.2	no			
2299.5	21	E	S	G	F	P	K	P	P	S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y	D	E	Nedd4WWW (118-138)	citosòlica	Q9EQHS	5.2	no
1895.7	17	F	P	K	P	P	S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y	D		Nedd4WWW (121-137)	citosòlica	Q9EQHS	5.2	no			

Taula X. Seqüències identificades del repertori associat a DR4 en les cèl·lules DR4DM. La taula està organitzada seguint el mateix patró que la taula IX

Com es mostra a la figura 36, l'espècie molecular corresponent a l'epítot ApoD₇₇₋₉₃ de 1855 Da es detectava també en les fraccions corresponents de les cèl·lules DR4IiDM i DR4Ii, mentre que l'epítot MHC I₇₇₋₉₃ només es detectava en el repertori de les cèl·lules DR4DM. Curiosament, en el repertori de la línia DR4IiDM, enlloc de l'epítot MHC non RT.1₇₇₋₉₃ es detectava l'epítot MHC I₅₆₋₆₉ amb gairebé la mateixa massa (1962.9 i 1962.6 Da, respectivament).

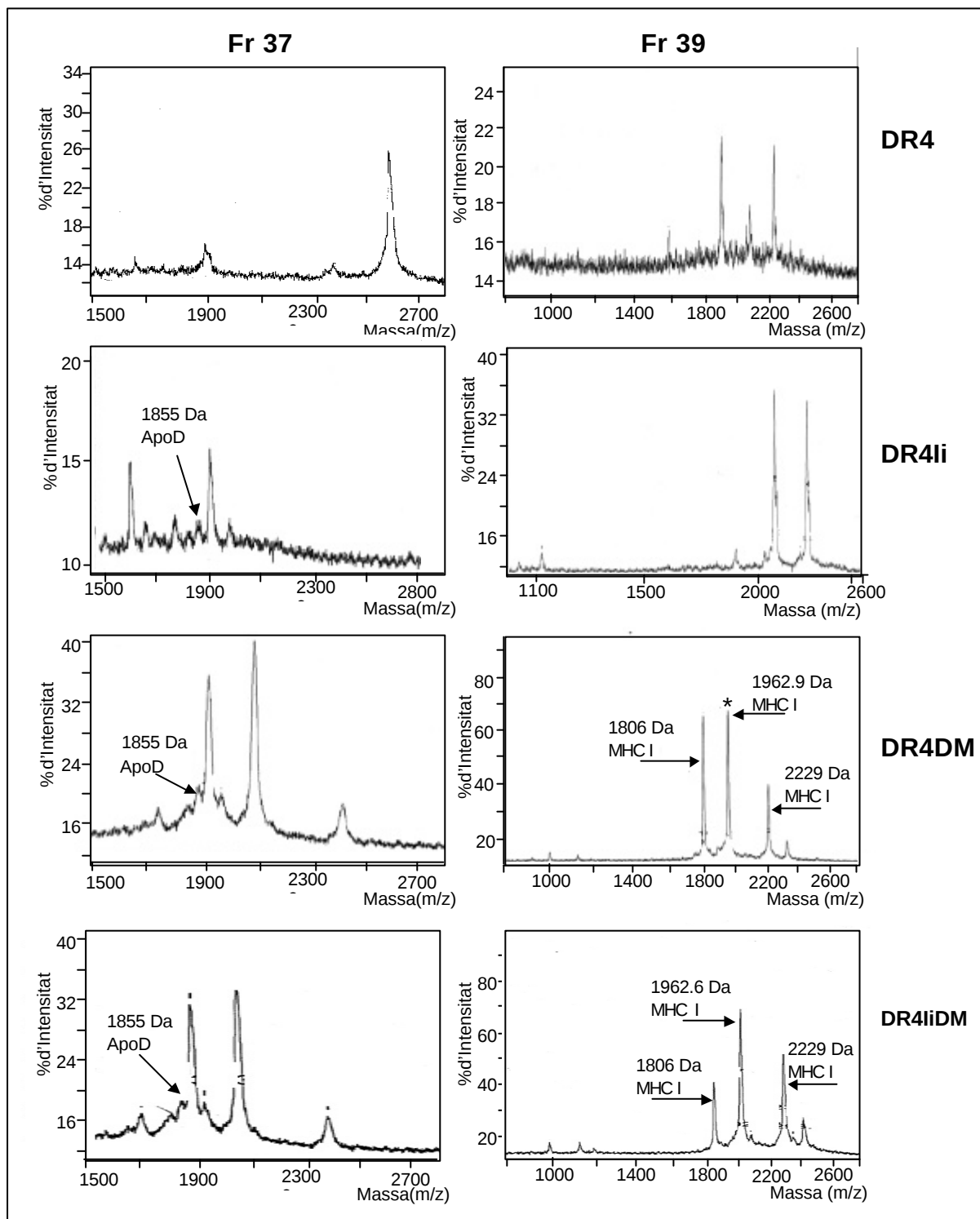


Figura 36 Amb l'excepció de l'epítot MHC I no RT.1 77-93, la majoria dels lligands de DR4 identificats en les cèl.lules DR4DM eren iguals als identificats en la línia DR4IiDM. Comparació dels MALDIS de les fraccions 37 i 39 dels repertoris associats a DR4 de les quatre cèl.lules estudiades. L'espècie molecular de 1855 Da corresponent a l'Apolipoproteïna D (Apo D) era comú en els repertoris de les cèl.lules DR4Ii, DR4DM i DR4IiDM. L'espècie molecular corresponent a l'epítot MHC I no RT.1₇₇₋₉₃ (*) de 1962.9 Da era l'únic lligand específic de la línia DR4DM i que no era present en la fracció 39 de les altres cèl.lules estudiades, tot i que en la línia DR4IiDM s'identificà un lligand corresponent a MHC I₅₆₋₆₉ de massa 1962.6 Da.

En resum, els pèptids identificats associats a DR4 en presència de DM però en absència d'Ii, eren pràcticament igual als detectats en la cèl·lula DR4IiDM.

4.3. Descripció dels pèptids del repertori associat a DR4 en les cèl·lules DR4Ii

Tal com es mostra en el punt 2.1 d'aquest capítol i com ja s'ha publicat en treballs previs, el repertori de lligands associats a DR4 en les cèl·lules DR4Ii era quantitativament dominat per dues seqüències de CLIP. Tot i així, l'intercanvi espontani del CLIP per altres lligands permeté la identificació de 12 pèptids alternatius del repertori d'aquestes cèl·lules. A la taula XI es mostra el resum de les característiques dels lligands naturals de DR4 en l'absència de DM i presència d'Ii. Tres de les seqüències identificades eren variants en longitud d'un únic epítop de la Fetuina exògena (331-347, 332-347, i 325-341) que incloïen una regió contigua a l'extrem C-terminal de la seqüència identificada en la línia DR4IiDM (311-329). El quart lligand exogen corresponia a un altre epítop de la mateixa fetuina₁₈₆₋₂₀₁. La resta de pèptids identificats provenien de proteïnes sintetitzades per la cèl·lula endocrina i amb l'excepció de les seqüències del CLIP, la resta estaven representats per una seqüència única (no es detectaren grups de pèptids retallats). Entre els 3 pèptids derivats de proteïnes de la superfície cel·lular hi havia dos epítops de proteïnes de rata (mannose 6-phosphate growth factor receptor i MHC de classe I) i un epítop corresponent a la cadena β del DR4 transfectat. Els lligands que es podien considerar de localització vesicular eren les seqüències corresponents al CLIP generat en la via endocítica i l'epítop de l'amiloid₄₉₋₆₄ d'expressió restringida a la via secretora de les cèl·lules neuroendocrines. Finalment, els quatre epítops restants derivaven d'enzims citosòlics o residents en l'ER com la Yb4 glutathione S-transferase, la UDP glucuronosyl transferase o la protein tyrosine phosphatase; i de la p58 proteïna que s'associa a un complex multiproteic transductor de senyals, acoblat als microfilaments. Tres dels quatre lligands d'origen citosòlic o de l'ER no respectaven el motiu d'unió a DR4 i per tant no obtingueren un valor d'afinitat en la matriu de Hammer. L'alineament "manual" d'aquestes seqüències es realitzà intentant respectar el màxim de posicions d'ancoratge amb el motiu d'unió amb DR4.

Mr	Long	P1 P2 P3 P4 P5 P6 P7 P8 P9																	Proteïna origen	Localització	Nº Id	PS	C-oN-ter							
1757.4	18	V	G	K	T	P	I	V	G	Q	P	S	I	P	G	G	P	V	R	Fetuin (331-347)	exògen	P12763	4	no						
1658.8	17	G	K	T	P	I	V	G	Q	P	S	I	P	G	G	P	V	R	Fetuin (332-347)	exògen	P12763	4	no							
1709.4	17	S	G	E	A	F	H	V	G	K	T	P	I	V	G	Q	P	S	Fetuin (325-341)	exògen	P12763	2.1	no							
1726.9	16	I	S	R	A	Q	F	V	P	L	P	V	S	V	S	V	E	Fetuin (186-201)	exògen	P12763	4.8	no								
2088.0	19	S	E	Q	H	D	I	A	I	D	L	S	P	L	A	Q	H	E	E	G	Mannose 6-P GFR (324-342)	superfície	Q63002	4.8	no					
1519.8	13	F	Q	T	L	V	M	L	E	T	V	P	R	S						HLA-DRB1* (151-163)	superfície	Q2986	5.4	no						
2074	17	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K	G	H	E	MHC class I (57-71)	superfície	P12763	1.7	no							
2333.3	21	K	P	P	K	P	V	S	K	M	R	M	A	T	P	L	L	M	Q	A	L	P	Invariant chain CLIP (100-120)	endocític	P04233	3.9	no			
2674.5	24	L	P	K	P	P	K	P	V	S	K	M	R	M	A	T	P	L	L	M	Q	A	L	P	Invariant chain CLIP (98-121)	endocític	P04233	3.9	no	
1713	16	L	A	N	F	L	V	R	S	S	N	N	L	G	P	V	L						Islet Amyloid (49-64)	secretada	P12969	5.3	no			
1443.7	13						P	Y	L	I	D	G	S	H	K	V	T	Q	S						Yb4 glutathione S-transferase (61-73)	citosòlic	P08009	6.3	no	
1662.8	14	K	P	L	P	K	E	M	E	E	F	V	Q	T	S						UDP-glucuronosyl transferase (285-298)	ER	P36510	ND	no					
1781.9	16						G	R	P	T	L	L	P	E	E	I	D	D	A	F	P	L				P58 (296-311)	citosòlic	Q62700	ND	no
2053.1	18	D	L	L	S	G	K	K	N	T	V	E	G	L	P	P	L	G	G	M	K				Protein tyrosine phosphatases (823-842)	citosòlic	PR00935	ND	no	

Taula XI. Seqüències identificades del repertori associat a DR4 en les cèl.lules DR4Ii. La taula està organitzada seguint el mateix patró que la taula IX

Amb l'excepció de l'epítóp de la MHC de classe I₅₁₋₇₁, homòleg als identificats en les dues línies anteriors, només 6 dels lligands seqüenciats per ESI-trampa iònica de les cèl.lules DR4Ii es detectaven per MALDI. Com es mostra en els exemples de la figura 37, la comparació dels MALDIs de les fraccions de les cèl.lules DR4Ii que contenien aquestes 6 seqüències amb les fraccions homòlogues de les tres línies cel·lulars restants (DR4, DR4DM i DR4IiDM) no indicava la presència d'aquests lligands en els altres repertoris, ja que no s'hi detectaren espècies moleculars de massa homòloga. Aquest resultat suggeria que la majoria dels epítops identificats en el repertori de DR4Ii eren lligands exclusius d'aquesta línia cel·lular i per tant, dependents de la presència d'Ii i de l'absència de DM.

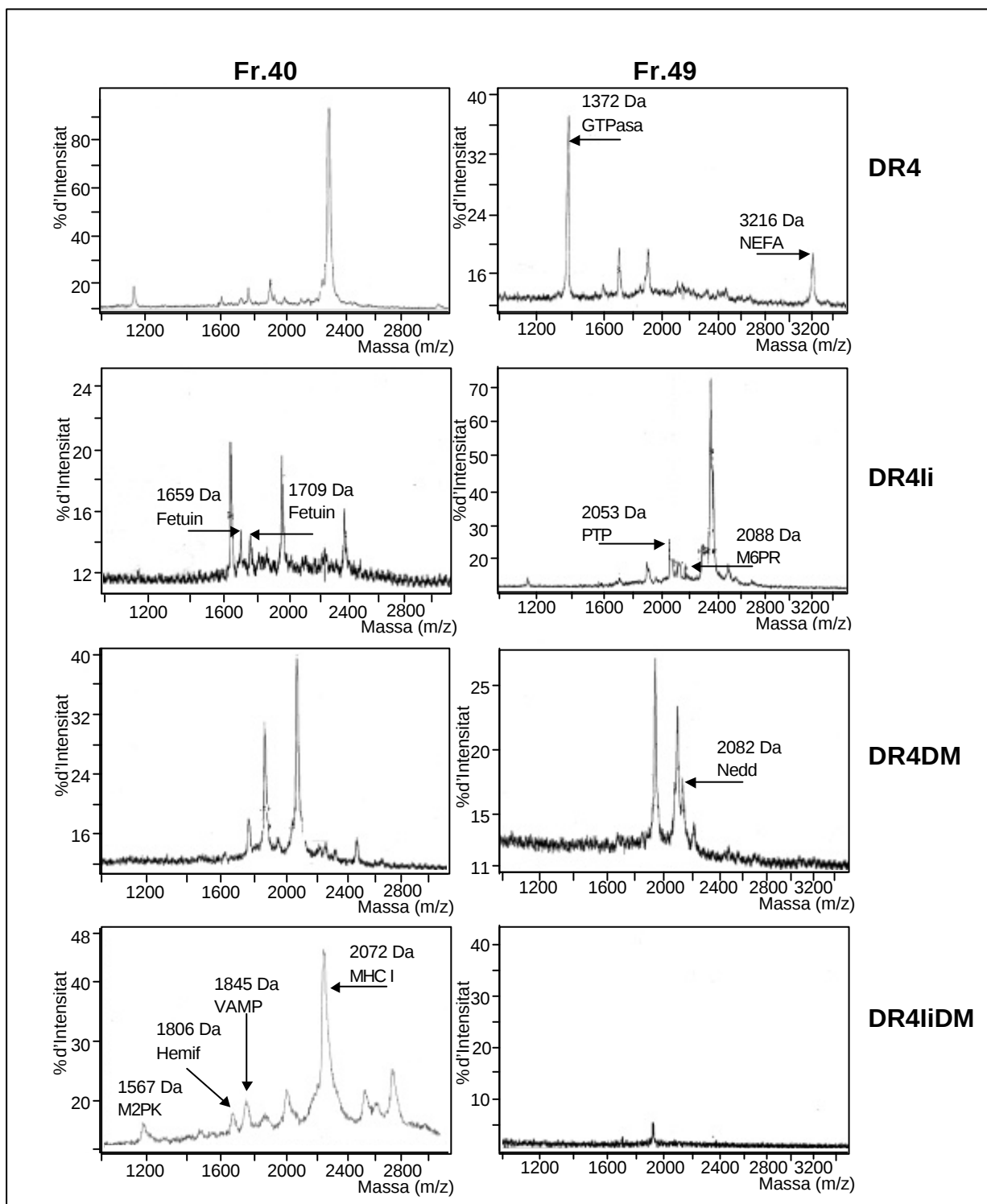


Figura 37. Amb l'excepció de MHC I₅₁₋₇₁, la resta de lligands identificats en el repertori associat a DR4 eren exclusius de les cèl·lules DR4li. Comparació dels espectres obtinguts per MALDI-TOF de les fraccions 40 i 49 de les quatre línies cel·lulars DR4, DR4li, DR4DM i DR4liDM. En les fraccions de l'eluït de la línia DR4li s'identificaren 4 lligands: Fetuin₃₃₂₋₃₄₇ i ₃₂₅₋₃₄₁, PTP: Protein tyrosine phosphatase₈₂₃₋₈₄₂ i M6PR: Mannose-6-phosphate growth factor receptor₃₂₄₋₃₄₂, exclusius d'aquesta línia cel·lular i absents en les fraccions homòlogues de la resta de repertoris. Totes les espècies moleculars identificades en cada fracció estan assenyalades.