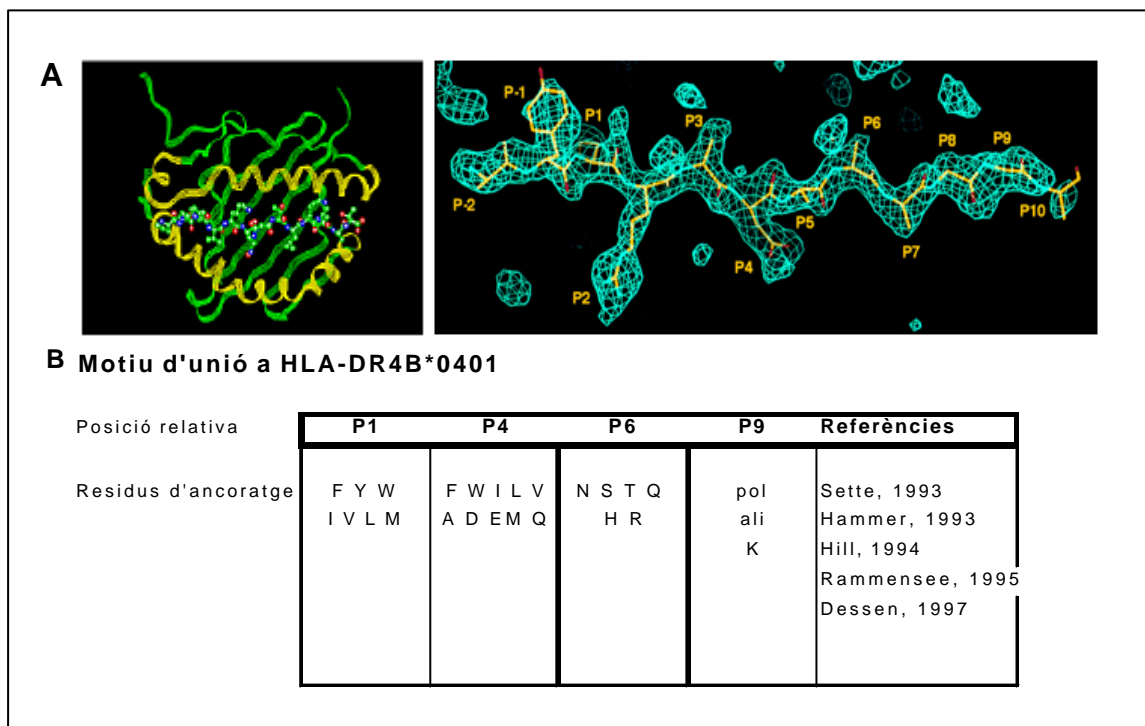




L'heterogeneïtat dels lligands presentats per MHC II ha condicionat el seu estudi i la identificació dels epítops responsables de l'activació de les cèl·lules T CD4<sup>+</sup> específiques d'antigen. L'elevat nombre de lligands expressats ha impedit l'estudi de la seva diversitat mitjançant tècniques clàssiques de bioquímica de proteïnes, i deixant, com a úniques eines capaces de detectar la presència o absència d'un lligand determinat, a les cèl·lules T específiques. A partir de la dècada dels 90 s'iniciaren els estudis de caracterització dels lligands associats a MHC II (Demotz S i col., 1989; Falk K i col., 1991; Rudensky AY i col., 1991) gràcies a l'adaptació de les tècniques d'espectrometria de masses a l'estudi de les biomolècules, que permeté augmentar la sensibilitat i la resolució en la detecció de pèptids de masses semblants presents en una mescla. Els lligands de les MHC II, s'han identificat mitjançant la seqüenciació directa dels pèptids eluïts dels complexos trimoleculars, per espectrometria de masses en tàndem en línies LCL de creixement en suspensió i amb una elevada expressió constitutiva de les MHC II. En els treballs publicats fins al moment s'han identificat més d'una cinquantena de lligands diferents per DR4 generats naturalment per la cèl·lula presentadora (Chicz RM i col., 1993; Friede T i col., 1996; Sette A i col., 1993; Hammer J i col., 1993; Hill CM i col., 1994) tot i que el nombre estimat de lligands per MHC II d'una LCL es calcula entre 650-2000 (Hunt DF i col., 1992; Chicz RM i col., 1992). La majoria dels lligands naturals de DR4 identificats en les LCL, deriven de proteïnes autòlogues de superfície o residents de la via endocítica, mentre que una proporció menor deriven de proteïnes citosòliques o de proteïnes exògenes. Aquests lligands, tenen una longitud estàndard d'entre 13-18 AA i es caracteritzen per formar grups de pèptids retallats que comparteixen una regió central comú amb extrems N- i C-terminal de longitud diferent ("nested peptide sets").

Mitjançant la revisió de les diferents seqüències identificades per espectrometria de masses dels complexos DR4 conjuntament amb els resultats mitjançant la degradació d'Edman o bé l'ús de llibreries peptídiques (Rammensee HG i col., 1995; Hammer J i col., 1993; 1994) s'ha establert un patró de seqüència que conforma el motiu d'unió a DR4 que és respectat per la majoria dels lligands identificats. A la Figura 30 es mostra el motiu d'unió descrit per l'al·lel DR4 en diferents treballs.

**Figura 30 Motiu d'unió a DRB1\*0401.** A les imatges (A) es mostra la disposició del pèptid de la col·lagenasa II en el solc d'unió a antigen de DR4 i s'assenyalen els principals residus d'ancoratge descrits per aquest lligand per Dessen i col., 1997. A la Taula (B) es mostren els residus preferits en les diferents posicions d'ancoratge a DR4 descrits en els treballs referenciats.

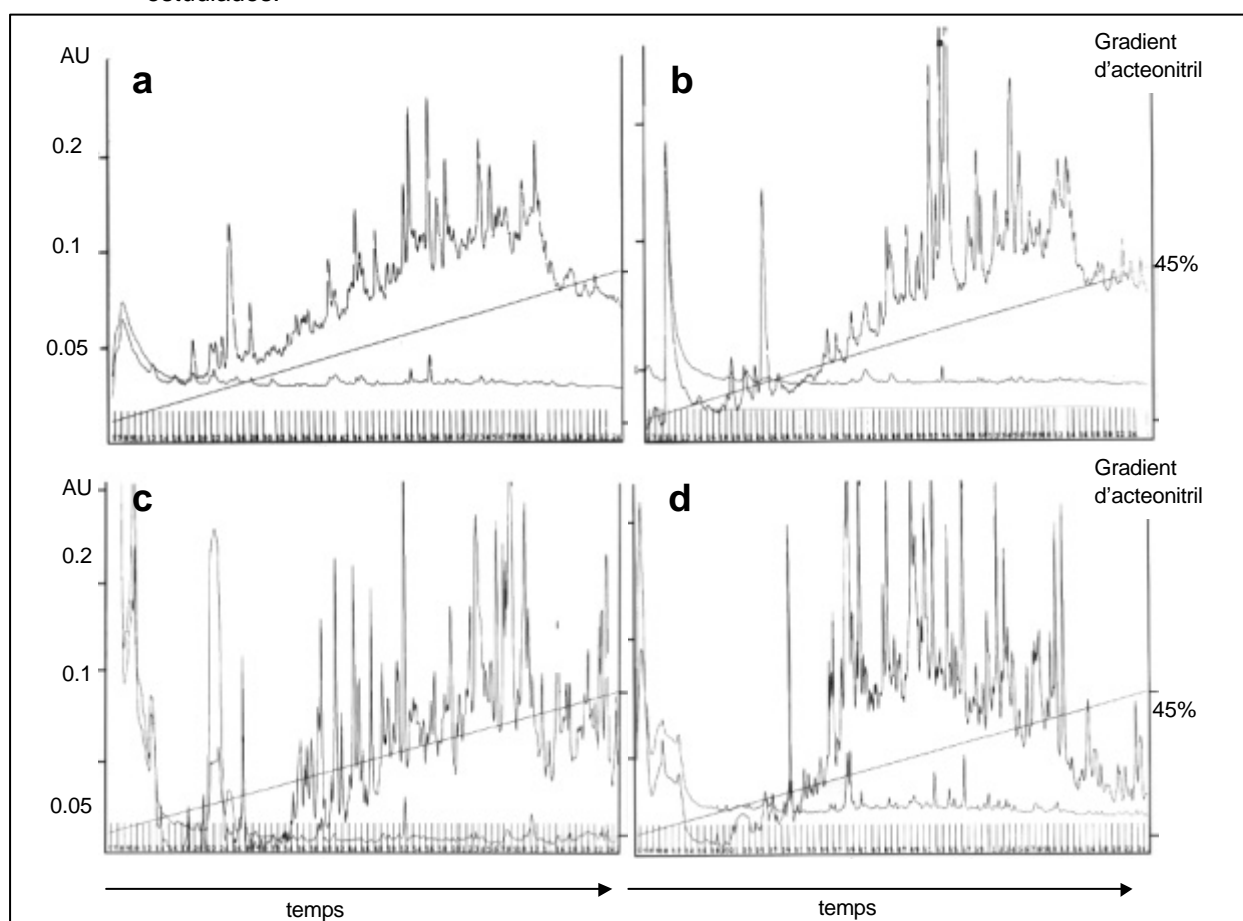


L'elevat nombre de cèl·lules necessàries per a realitzar els estudis de caracterització dels pèptids associats a les MHC II, ha condicionat aquests estudis en altres tipus cel·lulars com cèl·lules dendrítiques, macròfags, i altres cèl·lules que poden expressar MHC II per inducció en situacions d'inflamació, com les cèl·lules endocrines, dianes d'algunes malalties autoimmunitàries. Per tant, cap estudi a afrontat directament la influència de les característiques específiques del llinatge endocrí sobre el repertori d'antigens presentats per les MHC II, tot i que hi ha dades funcionals que suggereixen diferències importants entre els repertoris presentats per aquestes cèl·lules (Quaratino S i col., 1996). Més enllà de les característiques específiques de cada llinatge cel·lular, l'expressió o l'absència de les chaperones Ii i HLA-DM influeix significativament sobre el repertori de lligands associats a MHC II tal com s'ha demostrat en estudis *in vivo*, mitjançant ratolins *knock out* (Viville S i col., 1993; Tourne S i col., 1997; Kovats S i col., 1998; Kenty G i col., 1998) o *in vitro* mitjançant cèl·lules mutades o transfectades (Sant AJ, 1991; Qi L i col., 2000).

En aquest capítol s'ha estudiat el repertori de lligands de DR4 en el model d'APC endocrina i les conseqüències derivades de la presència o absència de les chaperones Ii i HLA-DM, amb l'objectiu d'avaluar la capacitat de les cèl·lules endocrines com a cèl·lules presentadores d'autoantigens per MHC II en situacions d'autoimmunitat.

### 1. Tots els repertoris peptídics associats a DR4 presenten perfils complexos, independentment de la presència d'Ii i d'HLA-DM

Per aïllar els pèptids associats a DR4 expressat en les quatre transfectants endocrines DR4, DR4Ii, DR4DM i DR4IiDM es van fer dos experiments consecutius, seguint el mateix protocol, però doblant el material de partida. En el primer experiment es van processar  $1.5 \times 10^9$  cèl.lules de les línies DR4 i DR4Ii. En el segon experiment es van usar  $3 \times 10^9$  cèl.lules de les línies DR4DM i DR4IiDM. Els complexos DR4-pèptid de cada línia cel.lular es van purificar per cromatografia d'afinitat en columnes de Sefarosa-L243 seguida d'una elució àcida. El material de baix pes molecular eluït es va separar de les cadenes  $\alpha$  i  $\beta$  de DR4 per ultrafiltració amb un *cut-off* de 10.000 Da i es va concentrar fins al volum d'injecció a una microcolumna d'HPLC de fase reversa (rp-HPLC). Les mostres es van fraccionar per rp-HPLC, amb monitorització de l'absorbància a 217 nm. Es va recollir una fracció per minut fins a un total de 80 fraccions per cada mostra. A la figura 31 es mostren els cromatogrames obtinguts del material eluït de les quatre cèl.lules estudiades.

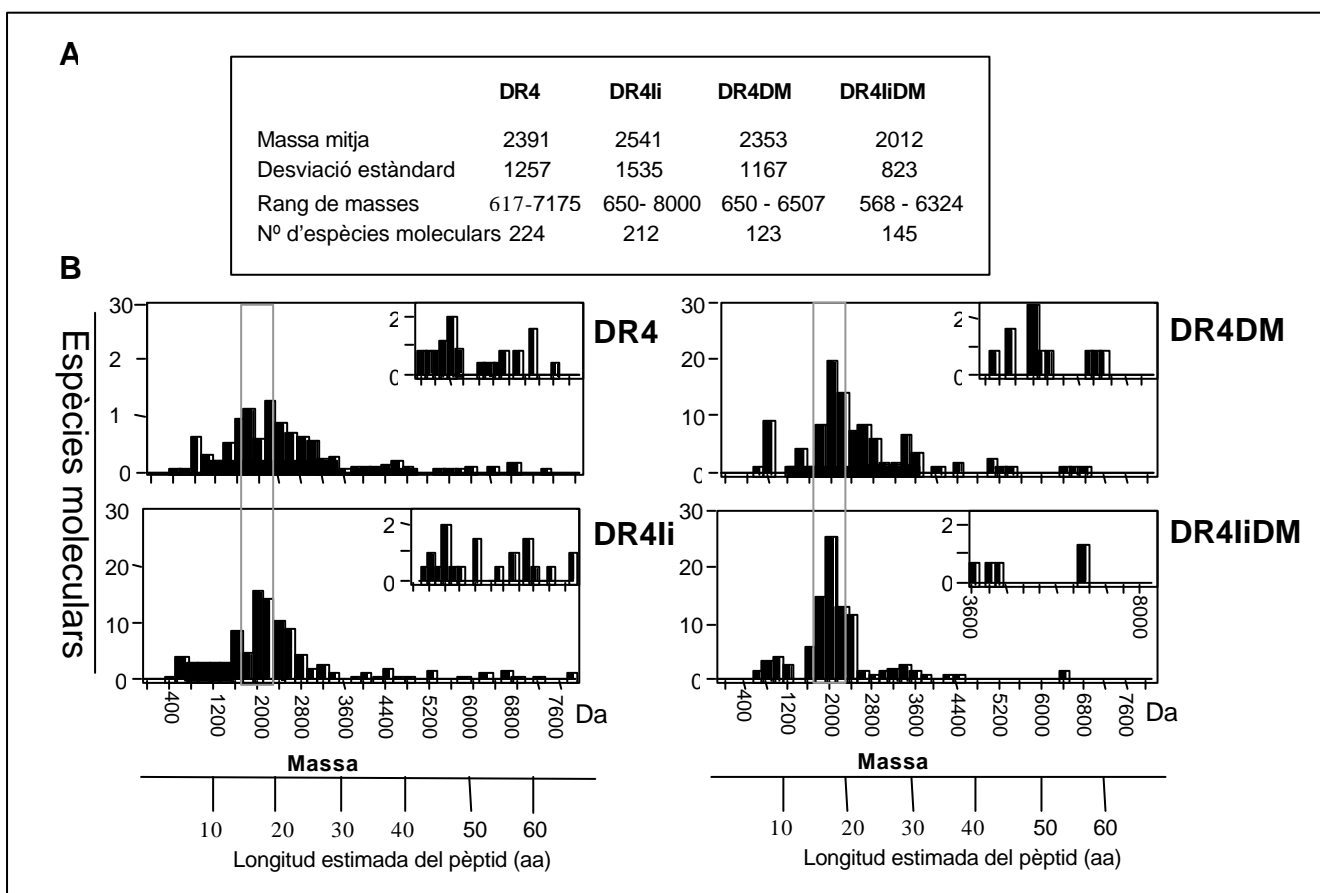


**Figura 31** En la cromatografia dels repertoris de DR4 eluïts de les cèl.lules transfectades s'obtenien perfils complexos en les quatre línies. Perfils dels rp-HPLC a  $\lambda=217$  nm dels pools peptídics eluïts de DRB1\*0401 de les quatre línies epitelials transfectades: a) DR4, b) DR4Ii, c) DR4DM i d) DR4IiDM.

- Totes les mostres eluides de DR4 en les quatre condicions testades presentaven perfils complexos amb la majoria dels pics en el rang 5-45% del gradient d'acetonitril.
- Les OD registrades per la majoria de fraccions de les cèl.lules DR4 i DR4Ii es trobaven per sota de 0.2 AU, mentre que per les cèl.lules DR4DM i DR4IiDM la majoria dels pics estaven per sobre d'aquesta OD, d'acord amb les diferències en les quantitats de cèl.lules usades en els dos experiments ( $1.5 \times 10^9$  en DR4 i DR4Ii,  $3 \times 10^9$  en DR4DM i DR4IiDM).

## 2. Anàlisi de les masses detectades en cada repertori. Influències d'Ii i d' HLA-DM sobre el repertori peptídic associat a DR4

Per identificar les diferents espècies moleculars recuperades dels eluits de les quatre cèl.lules, les fraccions es van analitzar per MALDI-TOFF. Es van quantificar aquells pics corresponents a les espècies moleculars més abundants de totes les fraccions, amb intensitats relatives superiors a 1000, en el rang de masses de 400 i 8000 Da. Els pics corresponents a la matriu d'ionització no es van tenir en compte. A la Figura 32 es mostren els resultats de l'estadística descriptiva de cada repertori analitzat (A) i els histogrammes amb les distribucions de cada repertori a l'agrupar les diferents espècies moleculars en rangs de 400 Da (B).



**Figura 32 Anàlisi de les espècies moleculars més abundants dels quatre repertoris peptídics associats a DR4 en les línies endocrines: DR4, DR4I $\kappa$ I, DR4DM i DR4I $\kappa$ IDM.** A la taula (A) es mostren els valors de l'estadística descriptiva dels pèptids més abundants en les quatre cèl·lules. Els histogrames (B) representen la distribució de les espècies moleculars més abundants agrupades en intervals de 400 Da, en les quatre cèl·lules. El requadre gris enmarca les espècies moleculars de cada repertori que presenten la longitud estàndard dels lligands associats a DR4 (1800-2200 Da, 15-18 AA)

L'anàlisi descriptiu dels pèptids més abundants en els quatre repertoris associats a DR4 mostra que:

- El repertori associat a DR4 en absència d'I $\kappa$ I i de DM (cèl·lules DR4) era el més heterogeni, amb el nombre més gran d'espècies moleculars diferents, cobrint un rang de masses entre 617 i 7175 Da amb una massa mitja de 2391 Da (20 AA).
- Les cèl·lules DR4I $\kappa$ I presentaven un repertori de lligands de DR4 heterogeni (212 espècies moleculars diferents), caracteritzat per una massa mitja (2541 Da, 22 AA) i una desviació estàndard (1535 Da) més elevades. Les masses de les espècies moleculars més abundants es distribuïen en el rang de 650-8000 Da.
- En el repertori associat a DR4 en les cèl·lules DR4DM, el nombre d'espècies moleculars majoritàries disminuï a fins a 123. La massa mitja (2535 Da) i la desviació estàndard (1167 Da) eren semblants o inferiors a les dels repertoris de les cèl·lules DR4 i DR4I $\kappa$ I, respectivament.
- En presència d'ambdues chaperones (cèl·lules DR4I $\kappa$ IDM), es detectaren 145 espècies moleculars abundants en el repertori associat a DR4. La massa mitja del repertori de 2012 Da (17 AA), la desviació estàndard de la mostra (823 Da) i el rang de masses (568-6324 Da) eren menors que les obtingudes en els altres repertoris.

Les dades suggerien una reducció del nombre de pèptids associats a DR4 en la línia RINm5F com a conseqüència de l'expressió de DM. Aquest efecte afectava a les espècies més abundants, i era rellevant si es tenia en compte que el repertori de les línies DM<sup>+</sup> s'obtingué partint del doble de cèl·lules que en les línies DM<sup>-</sup>.

L'anàlisi de la distribució de les masses de cada repertori al llarg del rang de 400 a 8000 Da (Figura 32B) mostrava una distribució normal en totes les mostres, amb proporcions diferents de pèptids en el rang de massa/longitud estàndard dels lligands de MHC II (1800-2200 Da, 15-18 AA):

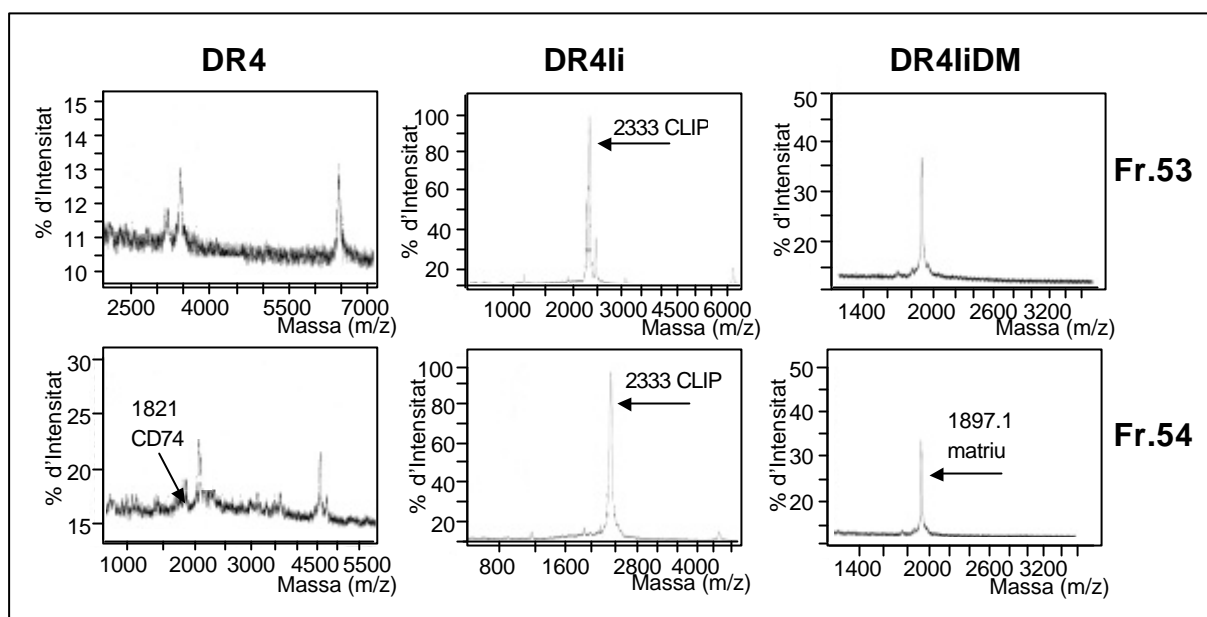
- Els lligands de DR4 presentaven una distribució normal, on un 45% dels pèptids en les cèl·lules DR4 estaven inclosos en el rang estàndard de massa/longitud.

- El repertori de les cèl·lules DR4Ii presentava un 54% dels pèptids dins del rang estàndard de 1800-2200 Da, amb una proporció elevada (15%) de pèptids amb longituds superiors als 30 AA (3600 Da).
- El 53% de les espècies moleculars detectades en el repertori associat a DR4 en les cèl·lules DR4DM presentaven la massa/longitud estàndard.
- En les cèl·lules DR4IiDM, el 70% de les espècies moleculars més abundants del repertori associat a DR4, es trobaven dins del rang estàndard, confirmant la menor desviació estàndard observada en la mostra. Amb l'excepció del 3% dels lligands, que presentaven masses superiors als 4000 Da, la resta de pèptids es distribuï en entre els 600 i 4000 Da.

Les dades indicaven que, en absència de chaperones, les molècules DR4 s'associaven a un repertori més heterogeni en composició i mida. La longitud majoritària era de 20 AA i aproximadament la meitat dels lligands es trobaven en el rang de longituds estàndard. Amb la coexpressió de la cadena invariant no es restringia de manera considerable el nombre d'espècies moleculars associades a DR4, però s'observava un augment en la proporció de lligands d'elevat pes molecular. L'expressió de DM, independentment de la presència o absència de la Ii, induï a una reducció en el nombre d'espècies moleculars associades a DR4, confirmant el rol de DM com a molècula editora dels pèptids units a DR4. D'altra banda era necessària la coexpressió d'ambdues chaperones per aconseguir el repertori més homogeni en longitud i distribució.

#### 2.1. En les cèl·lules DR4Ii, CLIP és el lligand majoritari de DR4.

La comparació dels espectres obtinguts per MALDI-TOFF de cada fracció entre les quatre cèl·lules va permetre detectar dos pics predominants en les fraccions 53, 54, 63 i 64 de l'eluit de les cèl·lules DR4Ii que no es trobaven en els altres repertoris. La seqüenciació d'aquests pics, mitjançant degradació d'Edman, els identificà com dues seqüències de la cadena invariant corresponents al CLIP, darrer intermediari en la degradació de la Ii. En les fraccions 53 i 54 de DR4Ii la seqüència majoritària era el pèptid CLIP<sub>100-120</sub> de 2333 Da mentre que en les fraccions 63 i 64 el pic majoritari corresponia a la variant més llarga CLIP<sub>98-121</sub> de 2674 Da. A la Figura 33 hi ha la comparació dels espectres de les fraccions 53 i 54 de les cèl·lules DR4, DR4Ii i DR4IiDM, on es mostra la dominància dels pics corresponents a CLIP<sub>100-120</sub> en el repertori de les cèl·lules DR4Ii, i la seva absència en les mateixes fraccions del repertori de les cèl·lules DR4 i DR4IiDM. L'absència dels pics corresponents a CLIP en el repertori de les cèl·lules DR4IiDM, demostrava que la coexpressió de DM reduï a la presència, fins impedir la detecció, de les seqüències CLIP en el repertori de lligands associat a DR4.



**Figura 33.** En les cèl.lules DR4li, el repertori associat a DR4 conté dues seqüències del CLIP majoritàries que es troben absents dels altres repertoris. Comparació dels MALDIs obtinguts per les fraccions 53 i 54 dels lligands de DR4 obtinguts en les cèl.lules DR4, DR4li i DR4liDM. A la figura s'assenyalen les espècies moleculars identificades en cada fracció i el percentatge d'intensitat de cada una.

### 3. Seqüenciació, identificació i alineament dels pèptids més abundants en els repertoris peptídics de DR4 en les quatre línies endocrines.

Totes les seqüències (amb l'excepció de les dues corresponents a CLIP) es van obtenir per espectrometria de masses en tàndem per nanoESI-trampa iònica mitjançant el fraccionament dels ions precursors més abundants dels quatre repertoris peptídics, prèviament escol.lits en els espectres de MALDI. El repertori de lligands de DR4 eluït de les cèl.lules DR4liDM era el més homogeni i els pèptids presents eren més abundants. Ambdues característiques permeten la identificació d'un nombre major de seqüències, en comparació amb les altres línies analitzades. Tot i partir del mateix nombre de cèl.lules que en les transfectants DR4liDM, en el repertori eluït de la línia DR4DM els pèptids es trobaven en quantitats menors, fet que dificultà la seva seqüenciació. En el repertori de les cèl.lules DR4li, els lligands més abundants corresponien a les seqüències de CLIP mentre que la resta es trobaven en molt poca quantitat, al igual que la majoria de pèptids identificats en els MALDIs de les cèl.lules DR4. A la taula VIII s'assenyalen les fraccions analitzades per nanoESI-trampa iònica dels repertoris corresponents a les cèl.lules DR4, DR4li, DR4DM, DR4liDM, i el nombre de seqüències obtingudes en cada fracció. Tal com mostra la taula:

- Del repertori associat a DR4 en les cèl.lules DR4liDM es van obtenir 45 seqüències peptídiques de 15 fraccions diferents



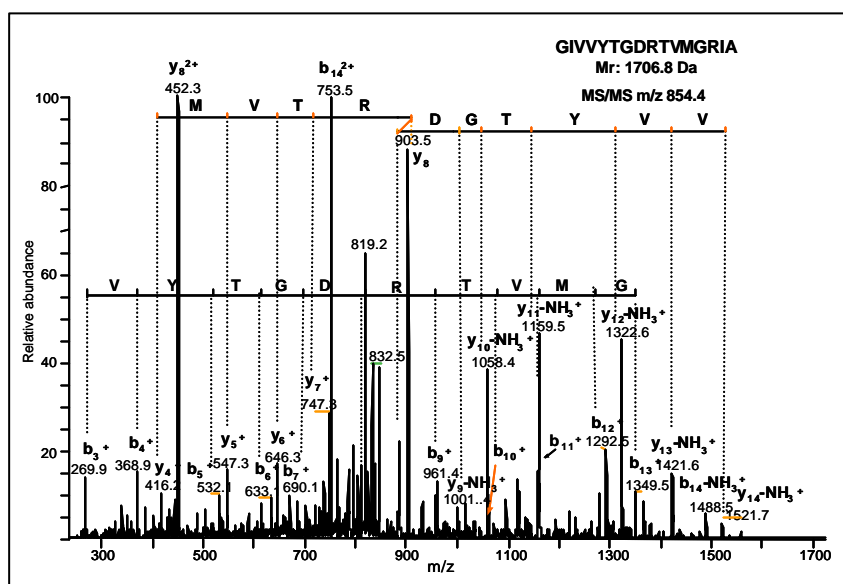
- Del material eluït de les cèl·lules DR4DM es van obtenir 16 seqüències de 6 fraccions diferents
- Dels lligands de DR4 en les cèl·lules DR4li s'identificaren 14 seqüències de 8 fraccions diferents
- En el repertori de les cèl·lules DR4 es van obtenir 14 seqüències de 7 fraccions diferents.

DR4liDM		DR4DM		DR4li		DR4	
Fracció	Seq	Fracció	Seq	Fracció	Seq	Fracció	Seq
34	1	34	0	34	0	34	0
35	1	35	0	35	0	35	0
37	0	37	1	37	0	37	0
38	1	38	0	38	0	38	0
39	3	39	5	39	0	39	2
40	5	40	0	40	3	40	1
41	3	41	0	41	0	41	0
42	5	42	0	42	0	42	0
43	6	43	0	43	0	43	0
44	2	44	0	44	0	44	2
45	1	45	4	45	0	45	0
46	3	46	0	46	0	46	0
47	2	47	0	47	0	47	0
48	4	48	0	48	0	48	0
49	0	49	4	49	3	49	2
50	6	50	0	50	0	50	0
51	0	51	0	51	0	51	3
54	0	54	0	54	0	54	3
55	0	55	0	55	2	55	0
58	0	58	0	58	1	58	0
60	0	60	0	60	1	60	0
62	0	62	0	62	1	62	0
64	1	64	0	64	0	64	0
67	0	67	0	67	0	67	1
Seq totals	44		14		11		14

**Taula VIII:** Fraccions analitzades per espectrometria de masses en tàndem dels repertoris obtinguts de les quatre línies cel·lulars (en gris). A la primera col·umna s'indica el número de les fraccions punxades al LCQ i a la segona col·umna s'indica el número de seqüències identificades en cada fracció.

A la figura 34 es mostra un dels espectres obtinguts per electroesprai-trampa iònica al fragmentar un pic precursor per obtenir-ne la seqüència. La seqüència corresponent a l'espectre de fragmentació era identificada mitjançant el programa MS-Tag o bé mitjançant seqüenciació *de novo*, per comparació en front a les bases de dades públiques de proteïnes. Els pèptids identificats s'alinearen amb el motiu d'unió a DR4 descrit a la Figura 30, en funció de l'índex d'afinitat (peptide score, PS) obtingut en la matriu publicada per Hammer i col·laboradors (Hammer J i col., 1994). Per cada seqüència s'escol·lí l'alineació que presentava l'afinitat més elevada pel motiu de DR4.

**Figura 34. Espectre de fragmentació obtingut per ESI-trampa iònica d'un pèptid associat a DR4.** Espectre de fragmentació per espectrometria de masses en tàndem del pèptid de 1706.8 Da de la fracció 50 de l'eluït de les cèl·lules DR4liDM, corresponent a la seqüència GIVVYTGDRVTMGR1A de la subunitat  $\alpha$  de la bomba ATPasa de Na/K.



#### 4. Descripció dels lligands identificats en els quatre repertoris associats a DR4 en les cèl.lules transfectants DR4, DR4li, DR4DM i DR4liDM. Efectes d'li i DM

##### 4.1. Descripció dels lligands identificats del repertori associat a DR4 en les cèl.lules DR4liDM

A la taula IX es mostren les seqüències identificades de l'eluït de la cèl.lula DR4liDM i un resum de les seves característiques. Es van identificar un total de 45 lligands de longitud entre 9 i 20 AA, que respectaven el motiu d'unió a DR4 encara que amb afinitats diferents.

Quatre dels pèptids identificats provenien de proteïnes exògenes del sèrum boví fetal present en el medi de cultiu: l'epítip de la transferrina<sub>555-571</sub>, factor de creixement i estimulador de la proliferació, l'epítip de la Fetuina<sub>311-329</sub>, que uneix lípids facilitant l'endocitosis d'aquests; i els epítips C-terminals de l' $\alpha$ -1-antiproteïnasa<sub>411-420</sub> i de la cadena lleugera de la ferritina<sub>165-183</sub>.

Menys aquests quatre lligands i 3 pèptids dels quals no es pogué identificar la proteïna originària, els 38 pèptids restants provenien de proteïnes autòlogues, sintetitzades per la mateixa cèl.lula endocrina. Entre aquestes seqüències, 18 dels lligands derivaven de 7 proteïnes de la superfície cel.lular, representatives de les diferents funcions que s'hi desenvolupen, com receptors de factors de creixement (EGFR), molècules presentadores (MHC de classe I), proteïnes implicades en interaccions cèl.lula-cèl.lula (N-CAM, Protocadherin, GD3-ganglyoside synthase), subunitats de la bomba de Na/K o proteases de membrana com la Nephilina. La majoria de proteïnes de la superfície cel.lular es trobaven representades per grups d'entre 2 i 4 seqüències que comprenien una única regió interna de la proteïna i compartien una seqüència central que interaccionava amb DR4 però variaven en longitud, amb diferències d'entre 1-4 residus en un o bé ambdós extrems. Aquests grups s'anomenen "nested peptides sets" o grups de pèptids retallats. La majoria dels lligands de superfície pertanyien a proteïnes

d'expressió ubiqua menys els derivats de N-CAM i Ephrin B2, proteïnes d'expressió restringida a teixits neuroendocrins.

Mr	Long	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Proteïna origen	Localització	Nº Id	C- o N-Ter													
1806.6	17										Transferrin (555-571)	exògen	Q29443	6.9	no												
1935.0	18										Fetuin (311-329)	exògen	P12763	3.6	no												
2233.2	20	Y	D	R	N	T	K	S	P	L	F	V	G	K	V	V	N	P	T	Q	A	Alpha-1-antiproteinase (411-420)	exògen	P34955	3	C-Ter	
2189.2	19																					Ferritin light chain (165-183)	exògen	P02793	0.8	C-Ter	
1842.6	16																					EGFR (271-286)	superfície	Q01279	5.7	no	
2005.8	17																					EGFR (270-286)	superfície	Q01279	5.7	no	
1806.8	15																					MHC class I (55-69)	superfície	P70527	1.7	no	
1962.9	16																					MHC class I (54-69)	superfície	P70527	1.7	no	
2072.0	16																					MHC class I (55-71)	superfície	P70527	1.7	no	
2229.2	18																					MHC class I (54-71)	superfície	P70527	1.7	no	
2189.9	18	Y	V	D	D	T	E	F	V	R	Y	D	S	D	A	E	N	P	R			MHC class I (28-45)	superfície	P70527	2.8	no	
2012.0	18																					N-CAM (679-696)	superfície	P13596	5.1	no	
2127.0	19																					N-CAM (678-696)	superfície	P13596	5.1	no	
1522.8	14																					Na/K ATPase a subunit (258-273)	superfície	P06685	4.5	no	
1649.9	14																					Na/K ATPase a subunit (259-274)	superfície	P06685	4.5	no	
1707.6	15																					Na/K ATPase a subunit (258-274)	superfície	P06685	4.5	no	
1755.6	16																					Protocadherin (553-571)	superfície	Q9WU10	4.9	no	
1967.8	18	E	P	S	V	H	N	Y	F	A	I	D	P	T	G	A	I	H	T			Protocadherin (550-570)	superfície	Q9WU10	4.9	no	
2248	20	V	I	D	E	H	T	P	L	Y	S	A	D	P	N	A	I	D	T	D	Y	Protocadherin (4407-4426)	superfície	Q9WU10	0.9	no	
1887.9	17																					Ephrin B2 precursor (129-145)	superfície	P52800	6.6	no	
1663.0	15																					Neprilysin (180-194)	superfície	P07861	3.3	no	
1847.9	15																					Sulfated glycoprotein 1 (141-155)	endocític	P10960	4.5	no	
1934.9	16																					Sulfated glycoprotein 1(141-156)	endocític	P10960	4.5	no	
1844.9	15																					VAMP-Associated protein A (74-88)	endocític	Q9Z270	5.3	no	
1577.6	13																					VAMP-Associated protein A (74-86)	endocític	Q9Z270	5.3	no	
1844.8	16																					Preprotachykinin (112-127)	secretada	P06767	3.4	C-Ter(-4)	
1894.0	18																					Carboxipeptidase D (837-854)	secretada	O35850	5.6	no	
1791.6	16																					Carboxipeptidase H (104-119)	secretada	P15087	4.7	no	
2017.9	18	E	P	G	E	P	E	F	K	Y	I	G	N	M	H	G	N	E	A			Carboxipeptidase H (102-119)	secretada	P15087	4.7	no	
2184.9	20	D	E	S	G	T	G	D	K	E	F	M	G	N	Q	D	N	N	S	L	K	GD3-ganglioside synthase (215-234)	GA	P70490	3.7	no	
2013.9	18																					ER-60 Protease (142-159)	ER	P11981	4.4	no	
1390.8	11																					Transport protein Sec 61 (86-95)	ER	P38391	0	C-ter	
852.4	9																					Calcitonin receptor (16-24)	ER	Q60755	1.7	N-Ter PS	
2037.0	18																					Ribophorin II (434-451)	ER	P25235	3.1	no	
1895.6	18	A	K	Y	A	H	R	Y	F	A	T	V	G	S	A	S	D	T				Myosin (174-191)	citòsolic	Q60755	0	no	
1778.6	17																					Fatty acid synthase (858-874)	citòsolic	P12785	6.3	no	
1567.4	16																					M2 Piruvate kinase (400-415)	citòsolic	P11981	3.1	no	
1638.6	17																					M2 Piruvate kinase (400-416)	citòsolic	P11981	3.1	no	
2091.9	17																					GAPDH (308-324)	citòsolic	P04797	0.1	C-ter (-8)	
1780.8	16																					Nedd4wwwbinding protein (123-138)	citòsolic	Q9EQHS	5.2	no	
2096	19	F	P	K	P	P	S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y	D	E	A		Nedd4wwwbinding protein (121-138)	citòsolic	Q9EQHS	5.2	no	
2153	20	G	F	P	K	P	P	S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y	D	E	A		Nedd4wwwbinding protein (120-138)	citòsolic	Q9EQHS	5.2	no
1638.4	15																					Unnamed protein product (134-148)	desconegut	Q9NNX8	0	no	
1974.0	17																					Putative oncogen protein (3-20)	desconegut	O14878	3.6	N-Ter	
2102.1	18																					Putative oncogen protein (2-20)	desconegut	O14878	3.6	N-ter	

**Taula IX. Seqüències identificades del repertori associat a DR4 en les cèl.lules DR4IiDM.** A la primera columna (Mr) s'indica la massa real de cada pèptid i a la segona columna (long) s'indica la longitud de cada pèptid en número d'aminoàcids. A les columnes centrals es mostra l'alineament de cada seqüència que presenta l'afinitat per DR4 més alta segons la matriu de Hammer i col., 1994. Els residus ressaltats en negreta representen anclatges adequats segons el motiu d'unió a DR4 descrit per Chizc i col., 1993. A les columnes següents s'indiquen la localització de l'epítip en la proteïna origen i el nom d'aquesta (proteïna origen), la localització de la proteïna origen en la cèl.lula (localització) i la clau d'identificació de cada proteïna en les bases de dades públiques (Id N<sup>o</sup>). Les dues darreres col. umnes de la taula mostren l'afinitat (PS) de cada alineament per l'al.lel DR4 segons la matriu emprada i la localització intermitja, N-terminal o C-terminal de cada epítip en la proteïna nativa.

També s'identificaren dos seqüències retallades derivades de proteïnes de la via endocítica d'expressió ubiqüa, la SGP-1, enzim involucrat en la hidròlisi de glicolípids, i la VAMP-associated protein A, involucrada en el transport vesicular.

Quatre dels lligands identificats pertanyien a proteïnes de la via secretora, d'expressió restringida a cèl·lules endocrines del pàncreas. L'epítop de la preprotachykinin<sub>141-155</sub> correspon a la forma precursora de la proteïna. Aquesta seqüència s'allibera com a conseqüència de la digestió del precursor per endoproteases per donar lloc als tres pèptids de tachykinin que són secretats (Takeda Y i col., 1990). Els altres tres lligands deriven de les proteases: carboxipeptidasa D i carboxipeptidasa H, altament expressades en el pàncreas i involucrades en la regulació de l'activació de les prohormones que secreten les seves cèl·lules endocrines.

Dels quatre lligands residents en l'ER, tres seqüències úniques derivaven de proteïnes residents en aquesta localització i la quarta corresponia a un fragment del pèptid senyal (residus 16-24) del receptor de la calcitonina. L'epítop de la Erp60<sub>142-159</sub> i l'epítop de la ribophorin II<sub>434-451</sub>, eren derivats de dos enzims involucrats en l'oxidoreducció de ponts di-sofre i en la transferència de residus oligosacàrids altament rics en manosa, respectivament. La seqüència de la subunitat  $\beta$  de Sec61<sub>86-95</sub> es localitzava en la zona luminal de la proteïna, que actua com a transposó entre el citosol i l'ER.

El darrer grup de lligands provenien de proteïnes citosòliques entre les que s'identificaren proteïnes estructurals (miosina), enzims involucrats en la glucòlisi com la GAPDH i la Piruvate-kinasa i una proteïna adaptadora involucrada en la ubiquitinació de proteïnes, la Neddwww-binding protein.

La comparació amb els repertoris eluïts de les altres línies cel·lulars es va fer comparant les fraccions homòlogues i les adjacents dels quatre repertoris i buscant les espècies moleculars corresponents als lligands identificats. Els pèptids identificats en les cèl·lules DR4liDM es consideraven presents en els altres repertoris quan els espectres obtinguts per MALDI de les diferents fraccions contenien pics d'igual massa o amb una diferència de  $\pm 5$  Da. Mitjançant aquesta comparació es van quantificar els epítops de l'eluït de DR4liDM que presentaven una espècie molecular de massa homòloga en les fraccions corresponents dels eluïts de DR4DM, DR4li i DR4. Es van excloure de la comparació 13 lligands que no es detectaven en els espectres de MALDI de DR4liDM tot i ser detectats i seqüenciats per ESI-trampa iònica. A la figura 35 es mostra els resultats de la comparació entre DRDM i DRliDM, i els espectres de MALDI corresponents a 3 fraccions.