

4.4. Descripció dels pèptids identificats del repertori associat a DR4 en les cèl. lules DR4

Tal com es mostra a la taula X, els 14 lligands identificats en l'eluit de les molècules DR4 en absència de les chaperones específiques de la via de les MHC II, conformaven el repertori més especial, caracteritzat per seqüències úniques molt poc abundants, i per l'absència d'epítops exògens. De les 14 seqüències endògenes, 10 derivaven de proteïnes citosòliques (Polyadenilate binding protein-1, Small GTPase, L30 ribosomal protein, n-chimarein), nuclears (DNA replication licensing factor) i mitocondrials (NADH-ubiquinona oxidoreductasa). EL 50% d'aquest lligands citoplasmàtics no complien amb el motiu d'unió a DR4 i l'altre meitat ho feien amb afinitats variables. Dels quatre lligands restants tres derivaven de proteïnes de la superfície cel.lular entre les quals l'epítop MHC I₅₆₋₆₉ i el de la Protocadherina₁₈₁₅₋₁₈₃₃, eren iguals que els identificats en els repertoris de les cèl. lules DR4DM i DR4IiDM; mentre que l'epítop derivat de la integrina A-1 no respectava el motiu d'associació amb DR4 i semblava exclusiu d'aquesta línia cel.lular. El darrer epítop identificat derivava de NEFA, una proteïna de la via secretora, respectava el motiu d'associació a DR4 i presentava la longitud màxima identificada de 29 residus.

Mr	Long	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Proteïna origen	Localització	Nº Id	PS	N-o	C-ter																						
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	1,7	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														
1669.4	15	E	A	R	G	A	R	R	G	V	K	K	V	M	V	L			Integrin A-1 precursor (264-278)	superfície	P18614	ND	no															
3216.6	29	V	P	I	D	V	D	K	T	K	V	H	N	V	E	P	V	E	S	A	R	I	E	P	P	D	T	G	L	Y	NEFA Precursor (25-54)	secretada	Q8J185	2,3	N-ter			
1643.9	16		G	F	G	D	L	K	T	P	A	G	L	Q	V	L	N	D															Elongation factor 1-beta (1-16)	citòsolic	5902663	0,3	N-ter	
1558.7	14		Y	V	G	D	L	H	P	D	V	T	E	A	M	L																	Polyadenilate-binding protein-1 (14-27)	citòsolic	P11940	3,5	N-ter	
1371.8	12		A	R	K	L	I	G	D	P	N	L	E	F																			Small GTPASE (158-168)	citòsolic	11BR	3,6	C-ter	
2200.1	20	I	I	D	P	G	D	S	D	I	I	R	S	M	P	E	Q	T	G	E	K												60s Ribosomal protein L30 (95-114)	citòsolic	P04645	3,4	C-ter	
1820.8	15		N	V	W	Q	V	N	T	S	R	T	R	I	T	F	V																DNA Replication Licensing factor (706-719)	nuclear	Q61881	2,9	C-ter	
1652.2	17		G	N	G	G	A	A	T	T	A	E	E	N	G	S	M	M	R															HEMC Hydroxymethylbilane synthase(3-19)	citòsolic	P19356	ND	N-ter
1935	18		M	K	I	F	V	G	N	V	D	G	A	D	T	P	E	E	L															SYT Interacting protein SIP (1-18)	citòsolic	O75932	ND	N-ter
1632.9	17		I	G	A	G	G	T	G	A	A	L	Y	V	M	R	L	A	L															NADH-Ubiquinone oxidoreductase (15-31)	mitocondrial	Q62425	ND	N-ter
1620.8	16		S	A	M	T	E	E	A	A	V	A	I	K	A	M	A	K																Initiation factor 5A (139-153)	citòsolic	P10159	ND	C-ter
924	8		L	E	T	L	H	E	A	L																								n-chimarein (251-258)	citòsolic	P30337	ND	no

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

Curiosament, tal com es mostra a la figura 38, tots els epítops citosòlics i l'epítop derivat de la proteïna secretada amb l'excepció del derivat de la n-chimarein, corresponien a seqüències que es localitzaven en els extrems N-terminal o bé C-terminal de la proteïna origen, independentment de la seva afinitat per DR4.

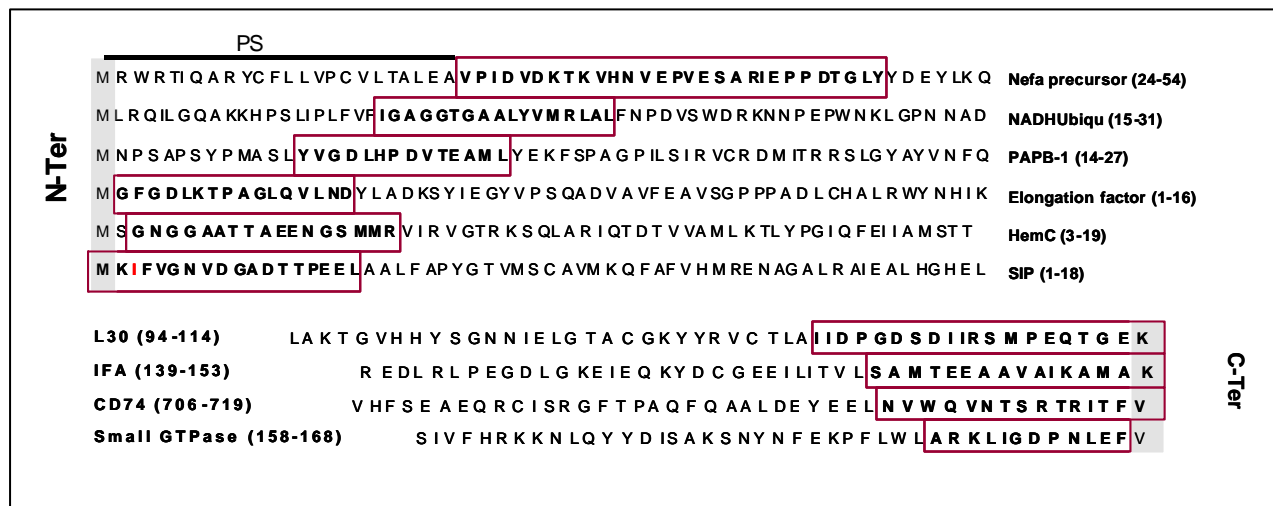


Figura 38 La majoria de pèptids associats a DR4 en ausència d'li i DM eren epítops N- o C-terminal de proteïnes citosòliques. Fragments N-terminal (dalt) o C-terminal (baix) de les proteïnes origen d'alguns pèptids citosòlics associats a DR4 en les cèl.lules RIN-DR4. La seqüència enquadrada és la corresponent al lligand de DR4. La seqüència marcada amb PS és la seqüència senyal de la proteïna NEFA que és secretada

L'elevada heterogeneïtat i l'abundància reduïda de les espècies moleculars detectades en aquest repertori dificultaren l'anàlisi comparatiu inter-cel.lular. Tal com es mostra en les fraccions exemple de la figura 39, només 6 de les espècies moleculars corresponents a les seqüències identificades es pogueren considerar exclusives del repertori associat a DR4 en absència de chaperones, ja que eren detectades en els espectres dels MALDIs de les fraccions 44 (L30 ribosomal proteins de 2200 i 2216 Da), 49 (NEFA de 3216Da, GTPase de 1372 Da), 54 (CD74 de 1820 Da) i 67(NADH-ubiquinona reductasa de 1633 Da) de la línia DR4 i es trobaven absents en les fraccions homòlogues de les altres línies.

Amb l'excepció de les dues seqüències de superfície identificades en d'altres repertoris, i considerades lligands de DR4 independents d'ambdues chaperones, la resta de seqüències d'aquest repertori, s'identificaren per la fragmentació d'ions precursors detectables per nanoESI-trampa iònica però no eren visibles en els espectres de MALDI. La no disponibilitat dels espectres d'ESI-trampa iònica corresponents a les fraccions homòlogues de les altres cèl.lules no permeté assegurar l'exclusivitat d'aquests epítops en el repertori de DR4. Un exemple d'aquesta situació es mostra a la figura 40.

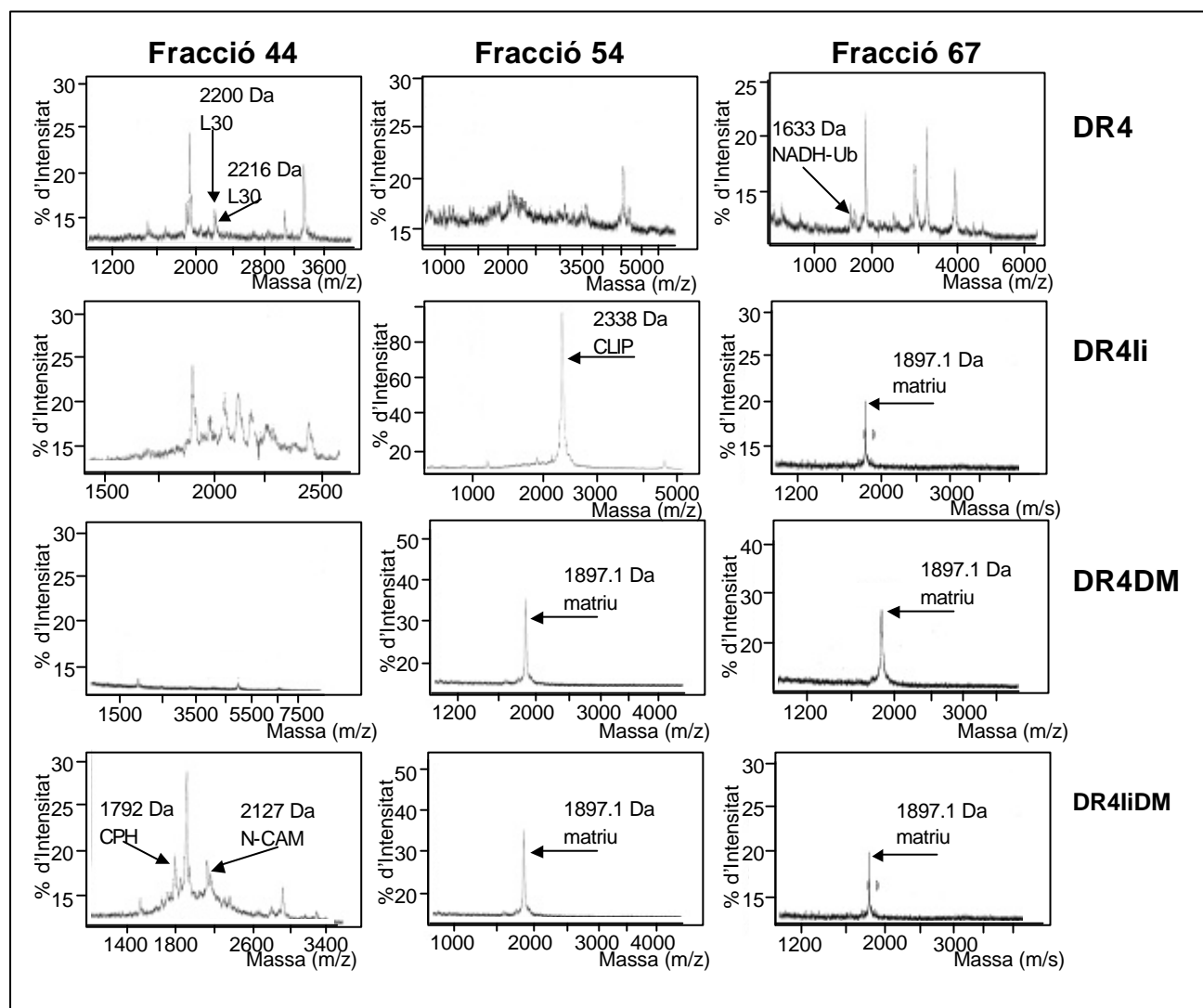


Figura 39. El repertori de les cèl.lules DR4 està constituït per pèptids poc representats i en alguns casos exclusius de la línia i dependents de l'absència d'li i DM. Comparació dels espectres per MALDI de les fraccions 44, 54 i 67 dels repertoris associats a DR4 en les cèl.lules DR4, DR4li, DR4DM i DR4liDM. S'assenyalen les espècies moleculars identificades en cada fracció de la línia DR4 i la seva absència en les fraccions homòlogues de la resta de transfectants.

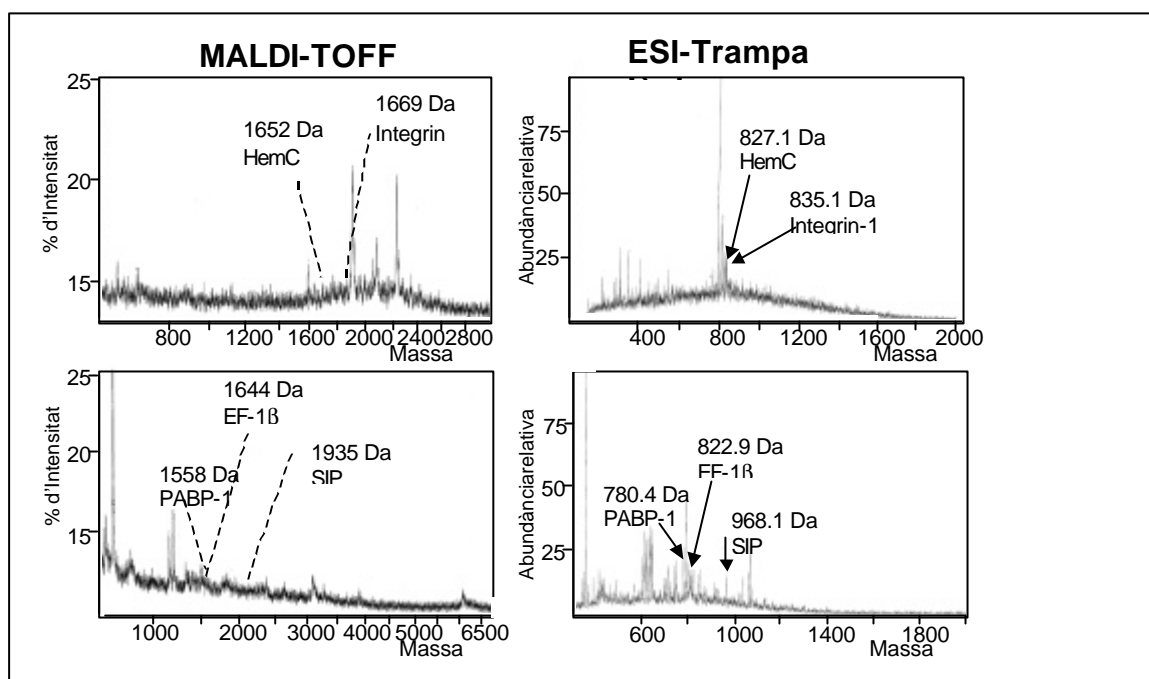


Figura 40. Alguns dels lligands de DR4 menys abundants eren identificats per ESI-trampa iònica en les fraccions de la línia DR4 però no es pogueren identificar en les fraccions corresponents per MALDI. Comparació dels espectres per MALDI i ESI-Trampa iònica obtinguts per les fraccions 39 i 51 del repertori de les cèl·lules DR4. Els ions precursors seqüenciats per ESI-trampa iònica s'assenyalen en els espectres al igual que l'absència de les espècies moleculars corresponents en els espectres obtinguts per MALDI de les mateixes fraccions (----).

En resum, la comparació de seqüències dels quatre repertoris indicava que DR4 en les cèl·lules DR4liDM s'associava a un conjunt de pèptids, el 60% dels quals eren dependents de la presència d'li i DM. Les seqüències de DR4DM indicaven que, en absència d'li, DM seleccionava epítops abundants. La presència d'li en absència de DM, també condicionava els lligands de DR4 tant pel predomini del CLIP com per la resta d'epítops identificats, que semblaven exclusius del repertori d'aquestes cèl·lules. En absència d'ambdues chaperones, el repertori estava format majoritàriament per seqüències d'extrem N- o C-terminal de proteïnes endògenes, la meitat dels quals no respectaven el motiu d'unió a DR4 i eren dependents de l'absència d'li i DM.

5. L'expressió de DM restringeix els residus d'ancoratge dels lligands de DR4

El motiu estructural comú als lligands de DR4 (Chicz RM i col., 1993), es basa en una seqüència lineal de 9 residus (*core*) dins la qual els aminoàcids situats en les posicions 1, 4, 6 i 9, són els principals residus d'ancoratge que determinen l'estabilitat del complex format pel pèptid i el dímer DR4. DM actua com a molècula editora del repertori peptídic associat a les MHC II mitjançant la selecció de pèptids capaços de conferir estabilitat al complex trimolecular. Per determinar la influència de DM en l'elecció de

residus localitzats en les posicions d'ancoratge dels pèptids associats a DR4, es van alinear les seqüències segons l'afinitat resultant amb la matriu de Hammer, i es compararen els aminoàcids localitzats en les posicions d'ancoratge dels lligands de DR4 en les cèl. lules DM⁻ i en les DM⁺. Per aquest anàlisi s'excloueren els lligands que no complien el motiu d'unió a DR4 però s'incloueren totes les variants en longitud identificades de cada epítop. Els resultats de la comparació es mostren a la figura 41, l'histograma representa el percentatge per cada AA en una determinada posició d'ancoratge respecte el total d'AA identificats i a la taula es mostra en valor absolut el número de pèptids que presenten un determinat AA en cada posició. Els resultats indicaven que:

- El 84% dels lligands de les cèl. lules DM⁺, presentaven AA aromàtics en P1(Tyr o Phe), amb predominància de Tyr (59%). La resta d'aminoàcids hidrofòbics (alifàtics), descrits com a adequats, no eren afavorits per l'expressió de DM.
- En les cèl. lules DM⁻, els AA hidrofòbics també eren els més abundants en P1, però no es detectava la dominància dels AA aromàtics per sobre dels alifàtics.
- En la posició 4 d'ancoratge (P4) els residus Asp i Glu, dominaven en les cèl. lules DM⁺ (72%) mentre que les cèl. lules DM⁻ presentaven un rang més ampli d'AA en aquesta posició.
- En P6, el 67% dels lligands de les cèl. lules DM⁺, presentaven Thr i Asn com a AA preferents, mentre que en els lligands de les línies DM⁻ es perdia la dominància i s'inclouï en altres AA com Ser, Pro i Val en aquesta posició d' ancoratge.
- L'expressió de DM no influeix a massa en P9 ja que les cèl. lules DM⁺ i DM⁻ presentaven un rang ampli d'AA en aquest punt d'ancoratge, sense dominàncies significatives.

Resumint, les dades indicaven que l'expressió de DM a més de reduir el nombre de lligands associats a DR4 també en limitava la seqüència core, afavorint la presència d'epítops portadors de determinats AA en cada posició d'ancoratge, especialment aromàtics en P1, i AA carregats negativament en P4.

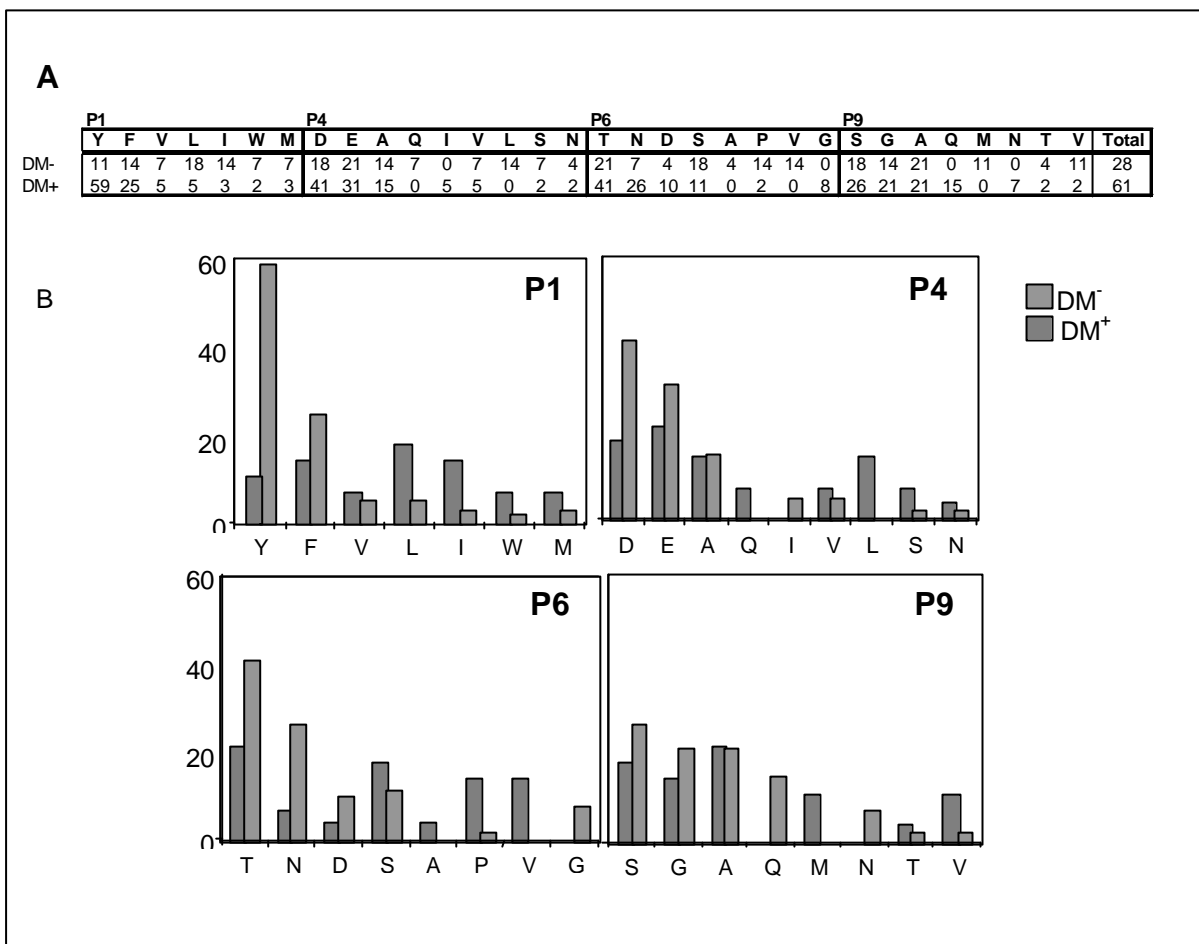


Figura 41. Anàlisi dels AA preferits en les diferents posicions d'ancoratge dels lligands identificats en els repertoris de le cèl.lules DM⁻ i DM⁺. A la taula (A) es mostra les vegades en que cada AA es troba en una determinada posició en valors absoluts. El total indica el nombre de seqüències incloses en l'anàlisi. Als histogrames (B) es representa el percentatge en que cada AA es troba en una determinada posició

Es va fer un segon anàlisi dels AA preferits en cada posició d'ancoratge comptant cada grup de pèptids retallats com a una única seqüència. Aquest segon anàlisi confirmava les dades obtingudes en l'anàlisi anterior i només es perdia la dominància de Thr en P6. Els resultats d'aquests segon anàlisi es mostren a la taula XIII.

	P1							P4							P6							P9							Total			
	Y	F	V	L	I	W	M	D	E	A	Q	I	V	L	S	T	N	D	S	A	P	V	G	S	G	A	Q	M	N	T	V	
DM-	17	23	11	23	17	6	0	29	29	0	6	0	6	17	12	21	24	14	21	0	3	0	14	24	17	10	21	0	10	3	0	29
DM+	43	32	8	8	3	3	3	40	36	6	0	6	10	0	0	24	8	4	16	4	12	16	0	20	12	24	0	8	0	4	12	25

Taula XIII Anàlisi dels AA preferits en les diferents posicions d'ancoratge dels lligands identificats en els repertoris de les cèl.lules DM⁻ i DM⁺. A la taula es mostra el percentatge de preferència per cada AA en les posicions d'ancoratge amb DR4: P1, P4, P6 i P9. A la darrera columna hi ha el nombre de seqüències diferents incloses en l'anàlisi.

Per estudiar la relació entre la presència de complexos DR4-pèptid compactes en les cèl·lules DM⁺ (Serradell L i col., 1999) i les afinitats dels lligands identificats en els diferents repertoris per DR4, s'analitzà l'índex d'afinitat atribuït per la matriu de Hammer a cada seqüència. Com es mostra a la taula XIV, l'afinitat mitja dels lligands de DR4 en absència de chaperones era menor que l'afinitat mitja en presència d'li o DM o ambdues. A la taula XV es mostra que la significació de les diferències entre els índexs d'afinitat de les cèl·lules DR4 envers les altres línies cel·lulars eren les més significatives (0.051 vs DR4li, 0.073 vs DR4DM, 0.046 vs DR4liDM, test t de student). No hi havia una correlació entre l'expressió de DM i la presència de lligands d'elevada afinitat teòrica per DR4 en el repertori, tot i la restricció induïda per l'expressió de DM sobre els residus preferents en les principals posicions d'ancoratge. Tal com es mostra a les taules XIV i XV, l'afinitat per DR4 dels lligands de les cèl·lules DM⁺ (4.7 i 4.5 en DR4DM i DR4liDM, respectivament) era superior però no significativament a la presentada pels lligands de les cèl·lules DR4li (4.1).

Taula XIV	Afinitat mitja	Desv. Stand	Taula XV	T student índex d'afinitat
DR4	2.9	1.3	DR4/DR4li	0,051
DR4li	4.1	1.5	DR4/DR4DM	0,073
DR4DM	4.7	1.9	DR4/DR4liDM	0,046
DR4liDM	4.5	1.8	DR4li/DR4DM	0,85
			DR4li/DR4liDM	0,69
			DR4DM/DR4liDM	0,87

Taules XIV i XV. Estudis comparatius entre les afinitats per DR4 dels lligands identificats en les quatre cèl.lules. A la taula XIV es mostra l'afinitat mitja i la desviació presentada sobre aquesta, dels lligands de cada repertori segons el millor PS obtingut amb la matriu de Hammer i col.laboradors, 1994. A la taula XV es mostren els valors de significació de la comparació de les afinitats entre els diferents repertoris segons el test t de student.

6. Influència de l'expressió d'li i HLA-DM en l'origen dels lligands associats a DR4.

Per estudiar si l'expressió d'li i HLA-DM, influenciava en l'origen dels pèptids associats a DR4, es va comparar la localització subcel·lular de les proteïnes que generaven els lligands de DR4, agrupant-les segons la seva localització subcel·lular i l'accessibilitat a la ruta de biosíntesi de DR4. Les proteïnes exògenes formaven el primer grup, independentment de la via usada per accedir a la via endocítica (pinocitosis, endocitosis facilitada per receptor...). Les proteïnes de la superfície cel·lular i les residents a la via endocítica es van agrupar en la segona categoria ja que presenten un accés fàcil i similar a la via endocítica. Els dos grups restants estaven formats per les proteïnes de la

via secretora, i el grup de proteïnes citoplasmàtiques que agrupava les proteïnes citosòliques i les proteïnes de l'ER i de l'AG. A la figura 42 es representa el percentatge de pèptids de les quatre categories de lligands en cada repertori analitzat. Tot i el baix nombre de pèptids seqüenciats en els repertoris de les cèl·lules DR4, DR4Ii i DR4DM, s'observaren algunes tendències:

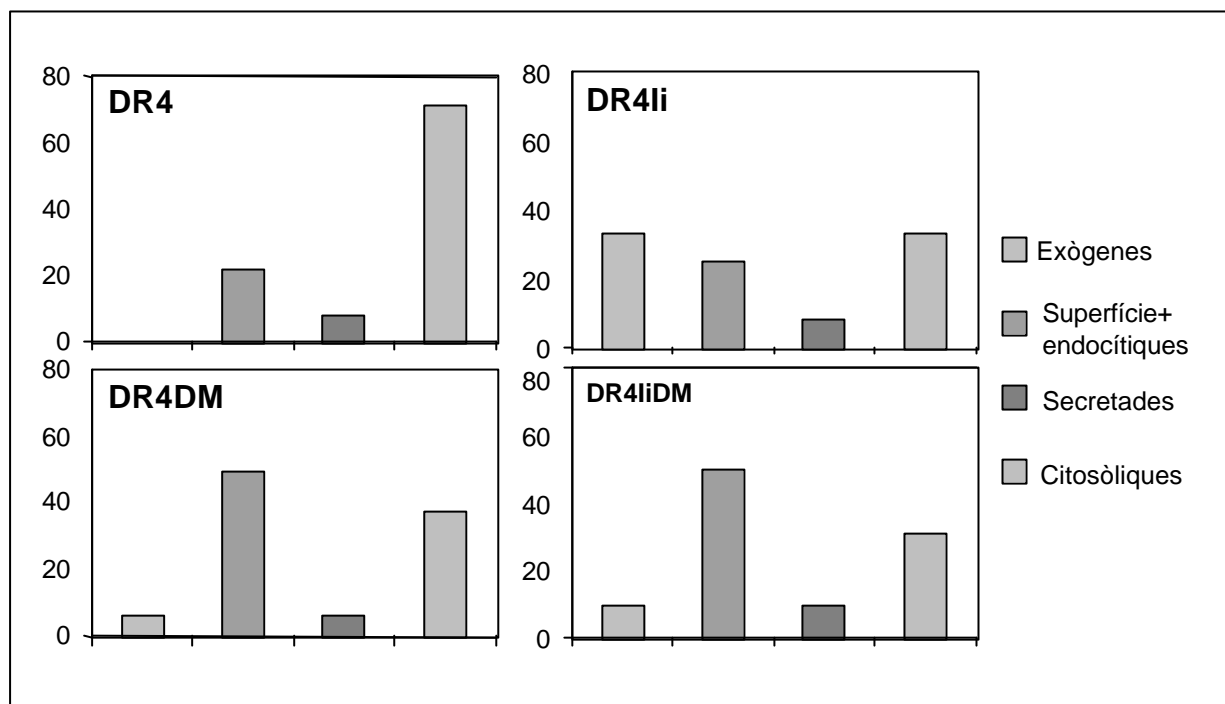


Figura 42. Comparació de la localització subcel·lular de les proteïnes origen dels lligands identificats en els quatre repertoris de DR4. Les seqüències identificades en les cèl·lules DR4, DR4Ii, DR4DM i DR4IiDM, es van classificar en proteïnes exògenes (gris clar), de superfície o endocítiques (barrat), secretades (gris fosc) o proteïnes citoplasmàtiques (ondulat).

Una característica comú era la dominància de les seqüències de proteïnes autòlogues respecte els lligands exògens en els quatre repertoris. En el repertori associat a DR4 en absència de chaperones no s'identificà cap lligand exogen. En aquestes cèl·lules el 71% (10/14) de les seqüències identificades derivaven de proteïnes citoplasmàtiques no endocítiques d'expressió ubíqua. Dels pèptids restants, el 21% (3/14) derivaven de proteïnes superficials, i 1 (7%) d'una proteïna secretada.

Els lligands diferents de CLIP identificats en el repertori de les cèl·lules DR4Ii inclouen en una proporció important (33%, 4/12) de lligands exògens derivats de proteïnes del sèrum, concretament de la Fetuïna. Comparat amb la línia DR4, l'increment en pèptids exògens contrastava amb la reducció dels lligands citoplasmàtics (33%, 4/12) mentre que la proporció de lligands derivats de proteïnes de superfície i secretades es mantenia.

Els lligands identificats en el repertori de les cèl·lules DR4DM derivaven de proteïnes autòlogues amb l'excepció d'un epítop. Amb l'expressió de DM els pèptids derivats de proteïnes de superfície o residents en la via endocítica, van augmentar fins el 50% (8/16), mentre disminuïa la proporció d'epítops citoplasmàtics (37% en DR4DM vs 70% en DR4).

Els lligands de DR4 en la cèl·lula DR4liDM derivats de proteïnes de la superfície cel·lular o residents a la via endocítica representaven la proporció més gran (51%) mentre que els lligands d'origen citoplasmàtic es reduïen al 29% del total.

Per tant, els dímers DR4 expressats en la línia endocrina RINm5F s'associaven majoritàriament a pèptids derivats de proteïnes citoplasmàtiques. La coexpressió de la li en absència de DM afavoria l'associació de DR4 amb pèptids exògens i de la superfície cel·lular mentre que la presència de DM independentment de l'expressió de la li afavoria l'associació amb lligands endògens derivats de proteïnes de la superfície cel·lular o de la via endocítica. Els pèptids derivats de les proteïnes secretades específiques de teixit es trobaven representats en una proporció similar en els quatre repertoris analitzats.

Els resultats d'aquest capítol han permès caracteritzar a nivell global el repertori de pèptids associats a DR4 generats per la línia endocrina RINm5F i aprofundir en la identificació d'una part dels lligands més abundants. Les dades presentades demostren que ambdues molècules afecten de manera diferent les característiques específiques dels repertoris associats a DR4 en les diferents cèl·lules, tal com suggerien les diferències obtingudes per reactivitat de cèl·lules T davant de cèl·lules transfectades que expressaven una o dues de les chaperones específiques o mitjançant l'ús d'APCs aïllades dels ratolins KO per Ii, DM o ambdues molècules (Viville S i col., 1993; Tourne S i col., 1997; Kovats S i col., 1998; Kenty G i col., 1998; Lightstone L i col., 1997).

Les molècules DR4 expressades en les cèl·lules endocrines en absència d'Ii i DM estan associades al repertori de pèptids més heterogeni en contingut i en el rang de masses. D'acord amb la manca d'estabilitat dels complexos DR4-pèptid presentats a la superfície de les cèl·lules DR4 (Serradell L i col., 1999), totes les espècies moleculars que conformen el repertori es troben en molt baixa concentració i no es detecten lligands dominants. Els pèptids identificats es poden dividir en dos grups de característiques diferents: els derivats de proteïnes citoplasmàtiques i els de proteïnes de superfície. El 70% dels pèptids deriven de proteïnes citoplasmàtiques i es localitzen en els extrems N- o C-terminal de la proteïna origen. La meitat dels pèptids citoplasmàtics no respecten el motiu d'unió a DR4, i l'altre meitat s'associen a DR4 amb una afinitat teòrica baixa (Hammer J i col., 1994). Aquest conjunt de característiques suggereix que l'absència de chaperones permet que una fracció dels dímers DR4 uneixi els pèptids en una localització diferent dels MIIC, on la presència d'un altre ambient físico-químic juntament amb d'altres possibles chaperones i proteases condicionaria els pèptids generats i els requeriments de la seva interacció amb DR4. Tal com mostra l'acumulació de DR4 observada en l'ER per microscòpia confocal (veure resultats I), DR en absència d'Ii és inestable i les cadenes sintetitzades romanen agregades en l'ER presumiblement acomplexades amb chaperones com la BIP, la grp94 i la p72 (Bonnerot C i col., 1994; Schaiff WT i col., 1992). L'origen citosòlic o nuclear de molts dels pèptids, obre la possibilitat que s'uneixin a DR4 en l'ER, permetent una estabilització suficient del complex trimolecular, que seria exportat de l'ER cap a la superfície cel·lular per mecanismes d'exocitosi constitutiva. Els pèptids generats al citosol pel proteasoma o altres proteases com les calpaïnes poden ser translocats a l'ER mitjançant canals proteics com el TAP o el transposó Sec61. L'exclusivitat de part del repertori identificat en aquestes cèl·lules indica que la unió de DR4 a la majoria d'aquests pèptids s'aboleix per l'expressió d'Ii i DM. El segon grup, el formen un terç dels lligands de DR4 que deriven de proteïnes de superfície i respecten majoritàriament el motiu d'unió a DR4. Aquestes seqüències podrien ser generades en la via endocítica i unir-se als dímers DR4 recirculants des de la superfície en un medi que permetés la seva associació estable, presumiblement endosomes de Ph àcid. La identificació dels mateixos lligands (MHC I i protocadherina) en la resta de repertoris

estudiats suggereix que l'abundància d'aquestes seqüències en la via endocítica les converteix en possibles lligands de DR4 independents de l'expressió d'Ii i HLA-DM.

La coexpressió de DR4 i Ii en la línia RINm5F dona lloc a un repertori de lligands de DR4 dominat per les seqüències CLIP, tal com s'havia demostrat en altres cèl.lules (Denzin LK i Cresswell P, 1995). Els dos epítops identificats derivats de la degradació de la Ii, contenen els residus 81-89: LPKPPKPV, que interaccionen amb el dímer DR4 fora del solc d'unió a antigen i permeten l'alliberació espontània del CLIP a pH àcid (Kropshofer H i col., 1995). En les cèl.lules DR4Ii, l'alliberació espontània del CLIP permet l'associació de DR4 a un ampli rang d'espècies moleculars poc abundants amb una proporció més alta de lligands de pes molecular elevat. Entre els lligands alternatius a CLIP, s'han identificat epítops de proteïnes de superfície i citoplasmàtiques, així com derivats de proteïnes exògenes. Encara que alguns dels lligands citoplasmàtics no respecten el motiu d'unió a DR4, l'afinitat teòrica per DR4 de la resta dels lligands és semblant o superior a la del CLIP. En les cèl.lules DR4Ii, com a conseqüència del bloqueig del solc d'unió a antigen dels dímers DR4 en l'ER per la Ii, els pèptids s'han d'adquirir en la via endocítica després de la degradació de la Ii. La comparació amb el repertori de DR4 en absència d'Ii i DM (cèl.lules DR4), recolza la maduració dels complexos DR4-pèptid en la via endocítica per l'increment en la proporció de pèptids exògens i de superfície i l'eliminació dels pèptids citosòlics dels extrems N-i C-terminal.

La detecció d'un nombre menor d'espècies moleculars en el repertori de les cèl.lules DR4DM i DR4IiDM confirma el rol de DM com a editora de pèptids independent d'Ii, prèviament suggerit per la presència de complexos DR4-pèptid estables a la superfície d'aquestes cèl.lules (Serradell L i col., 1999). L'expressió de DM restringeix el número d'espècies moleculars detectades per MALDI però permet la identificació de més seqüències per nanoESI-trampa iònica ja que els pèptids eluïts estan més concentrats. A més, l'expressió de DM augmenta l'associació de DR4 a grups de pèptids retallats, mentre que els lligands de DR4 eluïts de les cèl.lules DM són principalment seqüències úniques.

L'anàlisi dels residus d'ancoratge, mostra que DM restringeix els lligands de DR4 seleccionant AA preferents, mentre que l'expressió d'Ii no exerceix cap efecte. L'expressió de DM en les cèl.lules RINm5F selecciona amb més astringència els residus N-terminal del pèptid (P1 i P4) i més feblement els residus C-terminal P6 i P9, suggerint que la interacció de DM induïx un canvi en la conformació de DR4 que condiciona els requeriments en la seqüència dels lligands (Kropshofer H i col., 1996; Verrek FA i col., 2001). El solc d'unió a antigen de les MHC II conviu en equilibri entre un estat conformacional "obert" o receptiu afavorit a pH àcid i un estat conformacional tancat, estabilitzat per l'ocupació del solc d'unió dels dímers (Kropshofer H i col., 1996). Les nostres dades suggereixen que DM podria estar mantenint la conformació oberta de DR4 en la via endocítica, permetent l'allotjament de residus amb anells aromàtics en P1 i de residus grans carregats negativament en P4. La reducció d'aquests residus en P1 i P4

dels pèptids eluits de les cèl·lules DM⁻, es deuria a la dificultat de DR4 per mantenir la conformació oberta en absència de DM ja que aquest al·lel presenta una estabilitat intrínseca baixa a pH àcid (Kropshofer H i col., 1997).

Tots menys dos dels lligands identificats en les cèl·lules DR4DM també es troben en el repertori eluït de la línia DR4IiDM, indicant la capacitat de DM de seleccionar els pèptids, inclús en absència d'Ii. La identitat dels repertoris de DR4DM i DR4IiDM, indica que la interacció dels dímers DR4 amb els pèptids es produiria en ambdós casos en els MIIC. Tot i així, la unió de DR4 a lligands en altres compartiments com l'ER o la superfície cel·lular, no es pot descartar en les cèl·lules DR4DM, tant per la presència de complexes DR4-pèptid inestables en SDS a la superfície (Serradell L i col., 1999), com per la detecció d'espècies moleculars de longituds superiors al estàndard en el seu repertori. L'elevada homogeneïtat en la longitud dels pèptids en les cèl·lules DR4IiDM indica que la presència d'Ii i DM facilita una selecció més astringent dels lligands, possiblement facilitant la localització de la interacció DR4-pèptid-DM en el compartiment més eficient en la generació de lligands de longitud adequada. Tant les dades obtingudes per FACS com els resultats de la quantificació de molècules DM per microscòpia electrònica en les cèl·lules DM⁺, demostren que l'expressió de DM es menor en la línia DR4IiDM que en DR4DM, descartant la possibilitat de que la diferència en l'astringència de la selecció del repertori sigui deguda a un nivell menor d'expressió de DM en les cèl·lules DR4DM. A més, l'absència d'espècies moleculars d'elevat pes molecular en el repertori de DR4IiDM suggereix que DM no afavoriria l'associació a DR4 de pèptids generats en compartiments primerencs de la via endocítica en els quals les condicions proteolítiques encara són febles. La reducció per DM de pèptids llargs en el repertori de DR4IiDM podria ser mediada per l'intercanvi d'aquests lligands per d'altres de longitud adequada, o per la retenció dels complexes DR4-polipèptid en la via endocítica fins que les exoproteases n'eliminassin els residus sobresortints. En canvi, en les cèl·lules DR4Ii, l'elevada proporció de pèptids de més de 30 AA suggereix que la degradació de la Ii nativa s'inicia en aquest compartiment primerenc, permetent l'associació de pèptids generats en condicions proteolítiques febles.

La presència d'un 40% de lligands exclusius en DR4IiDM suggereix que la unió de DR4 amb aquests pèptids és dependent de DM i de la Ii. Els pèptids quantitativament dominants del repertori de les cèl·lules DM⁺ deriven principalment de proteïnes autòlogues localitzades a la superfície cel·lular i en la via endocítica mentre que en les cèl·lules DM⁻ es detecta una major proporció de lligands d'origen citoplasmàtic. En conclusió, les molècules DR4 expressades en cèl·lules endocrines s'associaven a un repertori ampli de lligands autòlegs, postulant-les com a cèl·lules amb una elevada capacitat per la presentació d'autoantigens per MHC II en situacions d'inflamació. D'altra banda, el nivell d'expressió de les dues chaperones específiques de la via de biosíntesis de les MHC II, Ii i DM, es revelava crucial en la determinació dels lligands .