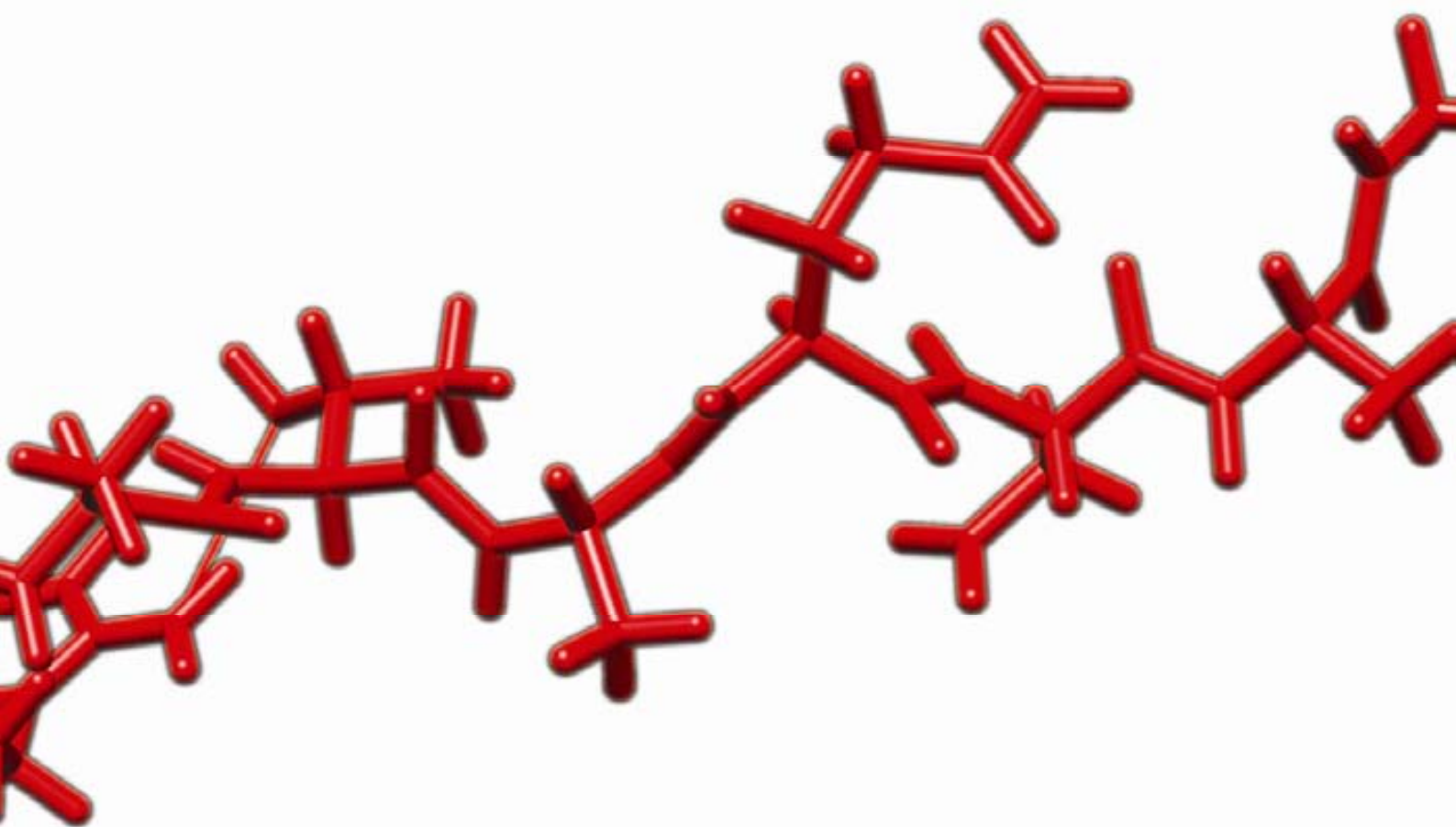


ANÀLISI DELS PÈPTIDS ASSOCIATS A HLA-DR EN TEIXIT HUMÀ AUTOIMMUNE

Laia Muixí Ponsà



*Memòria de tesis presentada per obtenir el grau de Doctor en Immunologia
per la Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra, Juliol 2009*



DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLGIA
FACULTAD DE BIOCIÈNCIES

Memòria presentada per

LAIA MUIXÍ PONSÀ

Per optar al grau de

DOCTORA EN IMMUNOLOGIA

Tesis realitzada a la Unitat d'immunologia de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció de la Dra. Dolores Jaraquemada

La doctoranda

La directora

LAIA MUIXÍ

DOLORES JARAQUEMADA
Catedràtica d'Immunologia, UAB

Bellaterra, Juliol del 2009

ABREVIATURES:

aa: aminoàcid

AcMo: anticòs monoclonal

Ag: antigen

AITD: malalties autoimmunitàries de la tiroide

APC: cèl·lula presentadora d'antigen

b2m: beta2-microglobulina

BSA: sèrum d'albúmina bovina

DC: cèl·lules dendrítiques

CFT: cèl·lula fol·licular tiroïdal

CMV: citomegalovirus

Da: Dalton

DC: cèl·lula dendrítica

DIT: diiodetirosina

DMSO: dimetil sulfòxid

DO: densitat òptica

EBV: Epstein-Barr virus

EC: epítot compartit

GD: Malaltia de Graves

GO: oftalmopatia infiltrativa associada al GD

HT: Tiroïditis de Hashimoto

Ig: immunoglobulina

ITL: limfòcits T infiltrants intratiroïdals

LCL: línies limfoblàstiques

MHC: complex principal d'histocompatibilitat

MIT: moniodetirosina

MNG: Goll multinodular

MS: espectrometria de masses

nESI ITMS/MS: espectròmetre de masses de trampa iònica LCQ unit a una font de ionització per nanoesprai

NL: Nòduls limfàtics

PBL: limfòcits de sang perifèrica

PBS: tampó fosfat salí

pDC: cèl·lules dendrítiques plasmacitoides

REP: reticle endoplasmàtic

rpm: revolucions per minut

SFB: Sèrum boví fetal

T1D: Diabetis de tipus 1

TA: temperatura ambient

Tg: tiroglobulina

TLR: Receptor Toll-like

TPO: peroxidasa tiroïdal

TSH: tiotropina

TSH-R: receptor de la TSH

DR4: dímer format pels al·lels DRA1*0101 i qualsevol de les cadenes β de DRB1*04

DR401: DRA1*0101/DRB1*0401

DR402: DRA1*0101/DRB1*0402

DR403: DRA1*0101/DRB1*0403

DR404: DRA1*0101/DRB1*0404

DR405: DRA1*0101/DRB1*0405

DR407: DRA1*0101/DRB1*0407

DR8: DRA1*0101/DRB1*0801

DR3 (DR17): DRA1*0101/DRB1*0301

Haplotip DR2: DR15, DR51

DR15 (DR2): DRA1*0101/DRB1*1501, també anomenat DR2b

DR51: DRA1*0101/DRB5*0101, també anomenat DR2a

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	1
1. LA GLÀNDULA TIROIDE	3
1.1. Síntesi i secreció de les hormones tiroïdals	4
1.1.1. Regulació de la secreció hormonal	6
2. TOLERÀNCIA	6
2.1. Tolerància central i perifèrica	6
2.2. Trencament de la tolerància.....	7
3. AUTOIMUNITAT I MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES.....	8
4. MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES DE LA TIROIDE	8
4.1. Factors genètics de les malalties autoimmunitàries de la tiroides	9
4.2. Malaltia de Graves-Basedow (GD)	12
5. AUTOANTÍGENS DE LA RESPOSTA IMMUNOLÒGICA A LES AITD	12
5.1. Tiroglobulina (Tg)	13
5.2. Peroxidasa tiroïdal (TPO)	15
5.3. Receptor de la tirotropina (TSH-R)	16
5.4. Transportador de iode (sodium iodine symporter Na ⁺ /I ⁻ (NIS))	17
5.5. Autoantigen 64KD.....	17
6. CÈL·LULES FOLICULARS COM A PRESENTADORES D'ANTIGEN.....	18
7. EL COMPLEX MAJOR D'HISTOCOMPATIBILITAT.....	18
7.1. Organització gènica del MHC	18
7.2. Les molècules d'HLA com a presentadores d'antigen	19
7.2.1. Unió MHC-peptid	20
7.3. Les molècules d'HLA de classe II	22
7.4. Generació de lligands peptídics per les molècules de MHC de classe II	23
7.4.1. Motius d'unio de les molècules de MHC II	25
HIPÒTESI I OBJECTIUS	29
MATERIAL I MÈTODES	33
1. MATERIAL.....	35
2. PROCESSAMENT DEL TEIXIT	36
2.1. Obtenció de blocs de teixit congelats.....	36
2.2. Obtenció de limfòcits infiltrants i cèl·lules fol·liculars tiroïdals	36
3. PROTOCOLS DE TINCIÓ	36
3.1. Tincions de seccions de teixit.....	36
3.2. Tincions de cèl·lules en suspensió per citometria	37
4. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES DE SANG PERIFÈRICA.....	37
4.1. Obtenció dels limfòcits de sang perifèrica o PBL	37
5. EXTRACCIÓ DE DNA	37
6. ELUCIÓ DELS LLIGANDS NATURALS DE MHC DE CLASSE II DE TIROIDES DE PACIENTS AMB LA MALATIA DE GRAVES-BASEDOW	38
6.1. Construcció de les columnes per la cromatografia d'afinitat	38
6.1.1. Producció dels anticossos L243 i B8.11.2	38
6.1.2. Purificació dels anticossos monoclonal L243 i B8.11.2	39

6.1.3. Acoblament covalent d'anticossos a boles de sefarosa activades	39
6.2. Elució de pèptids a partir de blocs de teixit congelat	40
7. ELUCIÓ DELS pèptids DE MHC DE CLASSE II DE LÍNEES CEL·LULARS.....	41
7.1. Protocol de dessalat amb cartutxos SPE C18.....	42
8. FRACCIONAMENT DE L'EXTRACTE PEPTÍDIC PER CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ EN FASE REVERSA (RP-HPLC)	42
9. IDENTIFICACIÓ PER ESPECTROMETRIA DE MASSES DELS REPERTORIS PEPTÍDICS ASSOCIATS A MHC II	43
9.1. MALDI-TOF; anàlisi de la composició peptídica de les fraccions d'HPLC	43
9.2. MALDI-TOF/TOF; anàlisi de la composició peptídica i seqüenciació dels 4 pics majoritaris de les fraccions d'HPLC.....	44
9.3. vMALDI; seqüenciació dels pèptids de les fraccions d'HPLC	44
9.4. nESI-ITIMS/MS; seqüenciació dels pèptids de les fraccions d'HPLC.....	44
9.5. LC- μ ESIMS/MS capil·lar o MDLC- μ ESIMS/MS	45
10. EINES BIOINFORMÀTIQUES	46
10.1. Seqüenciació i identificació dels espectres obtinguts	46
10.2. Bases de dades	48
10.3. Càlcul de l'afinitat teòrica dels pèptids amb les molècules d'HLA-II corresponent.....	48
10.4. Motius d'ancoratge dels al·lels d'HLA-DR	48
11. DEFINICIÓ DE MOTIUS D'ANCORATGE D'HLA-DR A PARTIR DE LLIGANDS NATURALS	48
11.1. Anàlisi estadística	49
12. GELS DE PROTEINES I WESTERN BLOTS	49
13. SÍNTESI DE PÈPTIDS	50
14. LÍNIES CEL·LULARS	52
14.1. Producció de línies limfoblastoides transformades amb el virus d'Epstein Barr.....	52
15. ASSAIGS D'UNIÓ PEPTÍDICA	53
15.1. Assaig d'unió sobre extractes cel·lulars	53
15.2. Assaig d'unió directe	54
15.3. Assaig d'unió peptídica REVEAL TM	54
RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	57
Capítol 1.....	59
ANTECEDENTS.....	61
Motiu d'ancoratge de la molècula DR407 (DRA1*0101 DRB1*0407)	63
1. ESTUDI DE L'AL·LEL DRB1*0407	63
2. DESCRIPCIÓ DEL REPERTORI DE PÈPTIDS ASSOCIATS A HLA-DR407 (DRA1*0101; B1*0407)	64
2.1. Processament de les mostres i identificació dels espectres del repertori de pèptids associats a HLA-DR407 (DRA1*0101; B1*0407)	64
2.2. Anàlisi del repertori peptídic de DR407	65

3. DESCRIPCIÓ DEL MOTIU D'ANCORATGE DE DR407 (DRA1*0101; B1*0407) DR407 (DRA1*0101; B1*0407)	71
3.1. Identificació dels nonàmers d'unió a DRB1*0407	71
3.1.1. Comparació de les seqüències de les cadenes b dels diferents al·lels	71
3.1.2. Selecció dels nonàmers	72
3.2. Generació de les matrius per la caracterització del motiu d'unió a DR407	74
3.2.1. Control del sistema de generació de les matrius	77
3.3. Comparació dels resultats amb les dades prèviament publicades	77
4. UNIÓ TEÒRICA DELS LLIGANDS NATURALS DE DRB1*0401 A ALTRES VARIANTS DE DR407, ASSOCIADES O NO AMB AR, I COMPARACIÓ DELS REPERTORIS	80
Motiu d'ancoratge de la molècula DR8 (DRA1*0101 DRB1*0801).....	81
Discussió Capítol 1.....	129
Capítol 2.....	135
ANTECEDENTS	137
1. SELECCIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL TEIXIT TIROÏDAL	138
2. POSADA A PUNT DEL PROTOCOL.....	139
3. PERFILS D'HPLC DELS PÈPTIDS ELUÏTS DE LES DIFERENTS MOSTRES DE TIROIDES	139
4. ANALISI DE LES MASSES DETECTADES EN CADA REPERTORI	141
5. METODOLOGIA UTILITZADA PER LA IDENTIFICACIÓ DELS PÈPTIDS.....	142
6. IDENTIFICACIÓ I ANALISI DELS PÈPTIDS AÏLLATS DE LES MOSTRES DE TIROIDES ...	145
6.1. Identificació dels pèptids aïllats de les mostres de tiroides de menys de 5 grams	146
6.2. Identificació dels repertoris de pèptids associats a HLA-DR en tiroides autoimmunes.....	151
6.2.1. Pèptids generats a la via endocítica	151
6.2.2. Pèptids generats per degradació al citosol	152
6.3. Pèptids de tiroglobulina	153
6.4. Assignació de cadascun dels pèptids a un dels al·lels d'HLA-DR expressat pel donant de la mostra	157
6.4.1. Assignacions en base al programa ProPred	157
6.4.2. Assignacions en base als motius d'ancoratge de DR4 i DR8	158
7. ASSAJOS D'UNIÓ PEPTÍDICA.....	163
7.1. Assaig d'unió peptídica per competició.....	163
7.2. Assaig d'unió directa	164
7.2.1. Pèptid Tg(726-743), obtingut de la mostra TB448 (DRB1*1501, B5*0101, B1*0407, B4*0103)	165
7.2.2. Pèptid Tg(2098-2112), obtingut de la mostra TB449 (DRB1*1501, B5*0101, B1*0301, B3*0101)	165
7.3. Anàlisis d'unió peptídica en absència de cèl·lules (Proimmune)	166
7.4. Comparació dels resultats dels assajos d'unió peptídica	168
8. PATRONS DE PROCESSAMENT DELS PÈPTIDS NATURALS EN TIROIDES AUTOIMMUNES	171
Discussió Capítol 2.....	233
DISCUSSIÓ FINAL.....	237

CONCLUSIONS.....	243
REFERÈNCIES.....	247
Annex: CARACTERITZACIÓ DEL REPERTORI PRESENTAT PER MHC DE CLASSE II EN CÈL·LULES DE LIMFA DE BENS EN CONDICIONS D'HOMEOSTASIS	I

INTRODUCCIÓ

1. LA GLÀNDULA TIROIDE

La glàndula tiroide és un glàndula endocrina bilobulada, situada a la part anterior del coll. Pesa entre 20 i 25 grams en l'adult sà. Està envoltada per una càpsula de teixit connectiu, des de la qual s'estenen unes invaginacions cap a l'interior que divideixen la glàndula en lobulets.



La glàndula tiroide produeix dos tipus d'hormones:

- La **triiodotironina** (T_3) i **tiroxina** (T_4) contenen iode i tenen un ampli efecte sobre el desenvolupament i el metabolisme; La T_3 és molt més potent que la T_4 i es creu que és la forma metabòlicament activa. Tenen dos efectes principals: l'alteració de la síntesis i degradació de les proteïnes, hidrats de carboni i grasses i l'augment del consum d'oxigen mitjançant l'augment de l'activitat de la sodi-potassi ATPasa. A nivell fisiològic regulen la velocitat del metabolisme basal i tenen una influència important en el creixement i maduració dels teixits, particularment del teixit nerviós, tenen una acció termoreguladora, intervenen en els processos de contracció muscular i en la motilitat intestinal. La secreció d'aquestes hormones està regulada per l'eix hipotàlem hipofisari.

- La **Calcitonina** regula els nivells sanguinis de calci. Disminueix els nivells de calci en sang inhibint la descalcificació òssia. El control de la secreció de calcitonina depèn dels nivells sanguinis de calci.

Les unitats funcionals de la glàndula són els fol·licles tiroïdals, formats per un epiteli cúbic simple, que descansa sobre una làmina basal (Figura 1). Les cèl·lules fol·liculars (CFT) o tiròcits estan polaritzades cap a la llum dels fol·licles la qual està plena d'una substància semi líquida; el col·loide. La T_3 i la T_4 , són secretades per aquestes cèl·lules cuboides fol·liculars i emmagatzemades en el col·loide formant part d'un complex glicoprotèic anomenat tiroglobulina (Tg). La glàndula tiroide és la única glàndula endocrina que emmagatzema grans quantitats d'hormona en forma inactiva a l'interior de compartiments extracel·lulars. Junt amb aquestes cèl·lules fol·liculars trobem les cèl·lules C o parafol·liculars, que són les secretores de calcitonina.

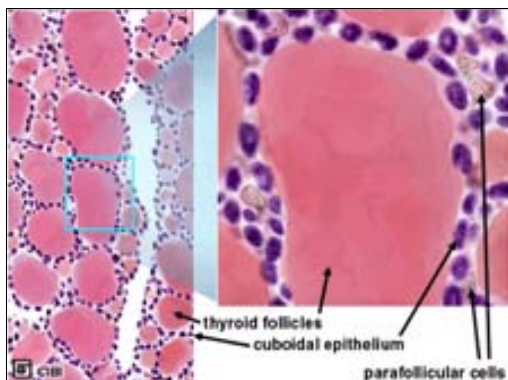


Figura 1: Histologia dels fol·licles tiroïdals. Les cèl·lules endocrines de la tiroide s'estructuren en fol·licles a l'interior dels quals hi ha el col·loide on s'emmagatzema la tiroglobulina.

Els tiròcits són cèl·lules molt polaritzades i especialitzades que duen a terme molts processos d'endocitosi i exocitosi durant la síntesi i l'alliberament de les hormones tiroïdals (Figura 2).

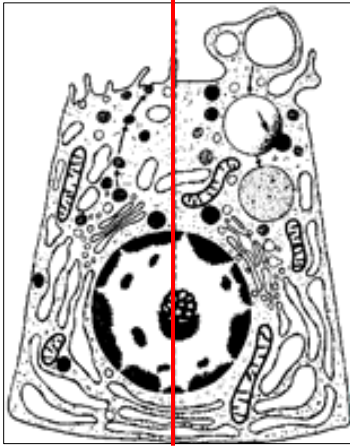


Figura 2: Estructura d'un tiròcit. Esquerra: captació del col·loide en una situació normal. Dreta: post estimulació amb TSH, captació del col·loide per macro pinocitosi

1.1. Síntesi i secreció de les hormones tiroïdals

Les cèl·lules encarregades de la síntesi de les hormones tiroïdals T3 i T4 són els tiròcits, que les produeixen dins una proteïna precursora, la tiroglobulina. Per la síntesi de les hormones tiroïdals es necessari el iode, el qual és captat mitjançant bombes situades a la membrana basal dels tiròcits i posteriorment és alliberat a l'interior de la llum fol·licular (Figura 3). La glicoproteïna tiroglobulina es sintetitza al reticle endoplasmàtic (REP), el polipèptid passa al Golgi i s'allibera per exocitosis constitutiva a la llum del fol·licle. A la membrana de la superfície apical de les cèl·lules fol·liculars l'enzim peroxidasa tiroïdal (TPO) combina el iode amb determinades tirosines (Tyr) de la tiroglobulina. La incorporació de

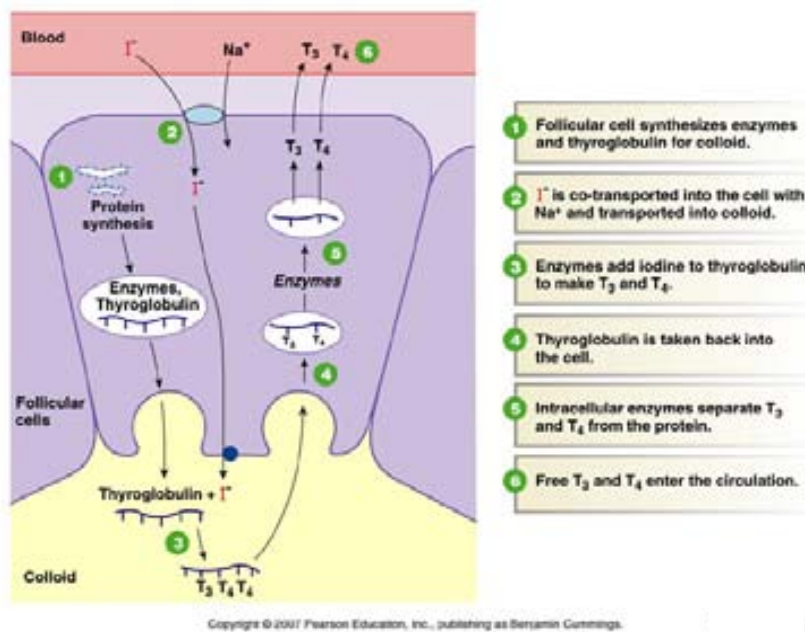


Figura 3: Esquema de la síntesi de les hormones tiroïdals

iode dona lloc a la monoiode tirosina (MIT) i diiode tirosina (DIT), la combinació de les quals tindrà com a resultat les hormones triiode tironina o T3 (combinació de una MIT i una DIT) i la tiroxina o T4 (dues DIT). Les tirosines iodades que formen les hormones, romanen associades de forma inactiva a la tiroglobulina en el col·loide. Les Tyr hormonogèniques es troben a les posicions 5, 1290, 2553 i 2746. La Tyr 5 localitzada a l'extrem N-

terminal de la molècula és el principal lloc hormonogènic i constitueix el 40% de la hormona T₄. La Tyr 2553 és el segon lloc hormonogènic, formant un 25% de total de T₄.

Les molècules de Tg recent sintetitzades són solubles i romanen prop del pol apical dels tiròcits. Aquestes són per tant les primeres molècules captades pels tiròcits. Les molècules que no són internalitzades romanen dins el col·loide on formen multímers insolubles units covalentment (Berndorfer, Wilms et al. 1996). La naturalesa d'aquests enllaços sembla ser que depèn de l'espècie, i en el cas dels humans els glòbuls de Tg estan units per ponts disulfur (Berndorfer, Wilms et al. 1996; Klein, Gestmann et al. 2000). Aquests multímers insolubles només s'internalitzaran sota determinades circumstàncies com manca de iode o una estimulació intensa amb TSH (Marino and McCluskey 2000).

La secreció de les hormones es fa per endocitosi del complex tiroglobulina-hormona per part del tiròcit, per micropinocitosi o per macropinocitosi, quan la glàndula és estimulada per la TSH. Les vesícules macro o micropinocítiques es fusionen amb lisosomes i els enzims hidrolítics alliberen la T₃ i T₄ de la tiroglobulina. En tot aquest procés proteolític de degradació de la Tg intervenen diferents cisteïno-proteases, com les catèpsines B, K i L, i cadascuna intervé en uns passos determinats (Figura 4). Les hormones són transportades per via sanguínia per on circulen unides a una proteïna transportadora, la majoria unides a una globulina (TBG) i una petita part a l'albumina, i una fracció molt petita circula de forma lliure.

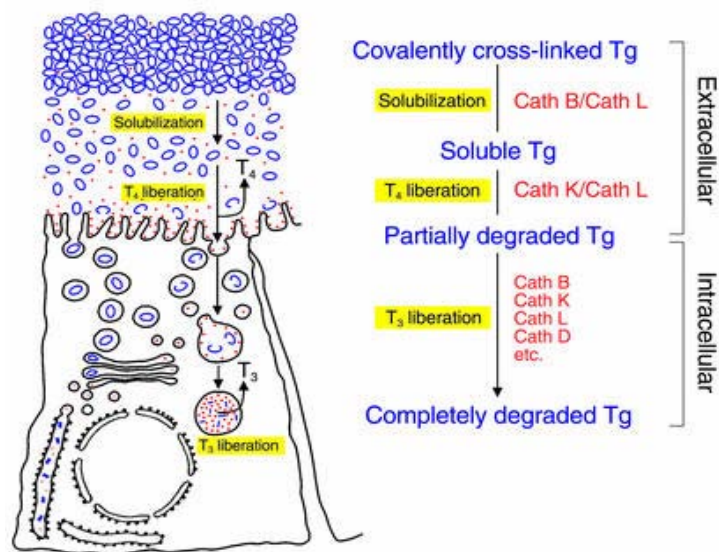


Figura 4: Esquema dels passos de proteòlisis que condueixen a la degradació de la Tg a la tiroides dels ratolins. (Friedrichs, Tepel et al. 2003)

1.1.1 Regulació de la secreció hormonal

La glàndula tiroide forma part de l'eix hipotàlem-hipofisari i està regulada per un *feedback* negatiu. Quan el nivell d'hormones tiroïdals en sang és baix, l'hipotàlem estimula la hipòfisi a través de la TRH (tirotròpin releasing hormone) i aquesta augmenta la producció de TSH que estimula la tiroide perquè produeixi i alliberi més hormones tiroïdals (Figura 5). La TSH secretada per la pituitària estimula l'entrada de iode, la síntesi de tiroglobulina (Scherberg, Vassart et al. 1981) i peroxidases, la secreció de la Tg dins el lumen dels fol·licles (Ekholm, Engstrom et al. 1975), l'endocitosis del col·loide i el pas als lisosomes (Bernier-Valentin, Kostrouch et al. 1991) per la seva degradació i, com a conseqüència, l'alliberament de T3 i T4.

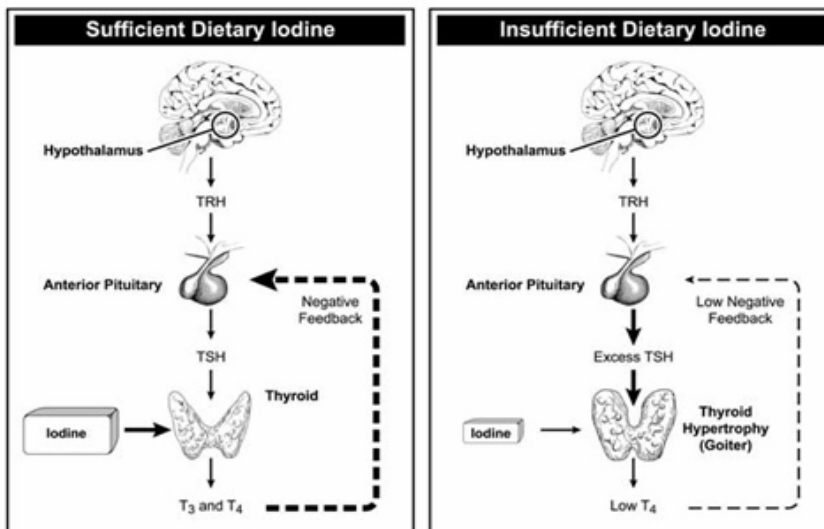


Figura 5: Regulació de la secreció hormonal de la tiroides

2. TOLERÀNCIA

La tolerància immunològica és la manca de resposta per part del sistema immunitari en front a antígens propis (autoantígens). Hi ha diversos mecanismes per induir i mantenir la tolerància a allò que és propi: els que actuen a nivell central (tolerància central) i els perifèrics (tolerància perifèrica).

2.1. Tolerància central i perifèrica

La tolerància central és el principal mecanisme d'eliminació de limfòcits autoreactius. Per les cèl·lules T, consisteix en l'eliminació en el timus, dels limfòcits immadurs que reconeixen complexos MHC/pèptid autòleg amb elevada o mitjana afinitat; aquest procés es coneix amb el nom de selecció negativa. L'expressió en el timus d'antígens perifèrics específics de teixit (Egwuagu, Charukamnoetkanok et al. 1997; Sospedra, Ferrer-Francesch et al. 1998; Liu, MacKenzie-Graham et al. 2001) juga un paper clau a l'hora de modelar el repertori de cèl·lules T autoreactives, ja que s'ha vist que els nivells d'expressió de determinats antígens correlacionen amb la susceptibilitat a patir malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan (Egwuagu, Charukamnoetkanok et al. 1997; Liu, MacKenzie-Graham et al. 2001). També les

característiques de la unió de pèptids específica de cada al·lel determinarà el repertori de cèl·lules T a la perifèria (Gebe, Swanson et al. 2002)

Tot i la seva efectivitat per alguns antígens el procés de selecció negativa permet que surtin a la perifèria cèl·lules T madures que reconeixen antígens propis amb baixa afinitat. D'altra banda, al llarg de la vida, s'ha de generar tolerància a molts antígens ambientals i a organismes comensals del sistema respiratori i digestiu. Aquestes limitacions de la tolerància central fa necessari un sistema eficient de manteniment de la tolerància en perifèria. Els principals mecanismes de tolerància perifèrica són la delecció, l'anèrgia i la regulació de la resposta immunitària per cèl·lules reguladores.

2.2. Trencament de la tolerància

El fracàs de la tolerància genera una resposta autoimmunitària i quan aquesta resposta autoimmunitària és patològica, produeix malalties autoimmunitàries. No es coneix encara el perquè i el com de la ruptura de la tolerància en la majoria dels casos, però s'han proposat diversos mecanismes que poden donar lloc a l'activació de les cèl·lules T autoreactives i per tant a l'inici d'una resposta autoimmunitària: (i) **Mimetisme molecular**; els limfòcits podrien reconèixer un antígen no propi que fos semblant en estructura o seqüència a un antígen propi de manera que la resposta inicial contra el patògen desencadenaria una resposta autoimmunitària per reacció creuada (Conant and Swanborg 2003) (ii) **Regulació anòmla de citocines**; citocines alliberades en grans quantitats a la perifèria com a resultat d'una infecció podrien activar cèl·lules T autoreactives (iii) **Epítops críptics**; epítops que no es generen en condicions normals o que no estan a la vista del sistema immunitari, però que podrien presentar-se en condicions favorables i iniciar una resposta de les cèl·lules T específiques.

Hi ha evidències que indiquen que el manteniment de les malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan poden ser conseqüència de la presentació inadequada d'autoantígens en el teixit diana (Bottazzo, Pujol-Borrell et al. 1983; Hanafusa, Pujol-Borrell et al. 1983). El fet que les cèl·lules T verges convencionals no entrin als teixits (Zinkernagel, Ehl et al. 1997) va suggerir que el primer contacte entre l'autoantigen i la cèl·lula T havia de tenir lloc en un gangli limfàtic i de la mà de cèl·lules presentadores d'antigen professionals (APC). Una resposta desencadenada per lesions locals (infecció vírica, canvi de la dieta, ...) iniciaria un procés inflamatori inespecífic que permetria que les APCs captessin els autoantígens i es dirigissin al gangli limfàtic. En aquest context el paper de l'òrgan diana seria l'expansió i manteniment de la resposta a través de l'expressió de molècules de MHC-II i la presentació d'antigen a les cèl·lules T i fins i tot la formació d'estructures de fol·licles limfàtics en el propi teixit diana (Armengol, Juan et al. 2001).

3. AUTOIMMUNITAT I MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES

Les malalties autoimmunitàries són multi factorials. Existeixen factors genètics de predisposició, la majoria gens del MHC o gens relacionats. S'ha observat una tendència a l'augment de la incidència d'algunes malalties amb l'edat i sovint són més comuns en les dones que en els homes, indicant la influència de factors hormonals. La incidència de les malalties autoimmunitàries també és diferent entre els diferents grups ètnics i també influeixen factors ambientals com la localització geogràfica o determinats elements de la dieta.

Les respostes autoimmunitàries són processos lents que acaben sent crònics. Durant el desenvolupament d'aquestes respostes es produeix una diversificació de l'especificitat i el ventall de determinants reconeguts per les cèl·lules T autoreactives augmenta i canvia amb el temps. Aquesta ampliació de la resposta s'anomena expansió d'epítops i s'ha vist dins d'un mateix autoantigen o bé cap a altres autoantígens (Thrasyvoulides and Lymberi 2003).

Les malalties autoimmunitàries es poden classificar en dos grans grups:

1. *Malalties específiques d'òrgan*, en les quals la resposta autoimmunitària va dirigida contra antígens que s'expressen en un determinat òrgan, teixit o tipus cel·lular. Aquestes malalties s'associen a la producció d'autoanticossos específics i a la presència de cèl·lules T específiques d'antígens de l'òrgan diana;
2. *Malalties sistèmiques* en les quals l'antigen contra el qual va dirigida la resposta es troba distribuït àmpliament per tot l'organisme. Aquestes malalties s'associen generalment a una elevada producció d'anticossos i a la formació d'immunocomplexes circulants.

Les malalties autoimmunitàries conegudes formen un ampli espectre entre aquests dos extrems.

4. MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES DE LA TIROIDE

Les malalties autoimmunitàries de la tiroide, AITD (autoimmune thyroid disease) són malalties autoimmunitàries endocrines específiques d'òrgan a les quals la resposta immunològica va dirigida contra antígens propis de la glàndula. Aquestes malalties s'associen a la producció d'autoanticossos específics (anti-tiroglobulina, anti-TPO i anti-receptor de la TSH) i a la presència de cèl·lules T i B infiltrants, reactives contra antígens de la tiroide. Tot i que la presència d'autoanticossos és un tret característic d'aquestes malalties està demostrada la seva presència en la població sana. La prevalença d'autoanticossos de tiroide varia en funció de l'ètnia, la regió i de factors ambientals (Prentice, Phillips et al. 1990; Hollowell, Staehling et al. 2002; O'Leary, Feddema et al. 2006).

Les AITD afecten a més d'un 5% de la població i representen més del 30% de les malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan. Els tipus de malalties autoimmunitàries que afecten més freqüentment a la glàndula tiroide són: la Tiroiditis de Hashimoto (HT) i el Mixedema primari, que donen

lloc a hipofunció de la glàndula i la malaltia de Graves-Basedow (GD) que causa la hiperfunció de la tiroide (Taula 1).

	Graves-Basedow	Tiroiditis de Hashimoto	Mixedema primari
	+/++	++++	+/-
Infiltració limfocitària	infiltració difusa CD4>CD8 fol·licles secundaris	infiltració massiva CD8>CD4 fol·licles limfoides secundaris	
Autoanticossos			
anti-tiroglobulina	+	++/++	++
anti-peroxidasa	+++	+++	+++
anti-receptor TSH	++	+/-	+/-
	estimulen funció i trofisme	estimulen funció i trofisme	bloquegen funció i/o trofisme
Lesió tissular	hipertrofia hiperplàsia	atròfia i fibrosi	atròfia i fibrosi
Predisposició genètica			
associació HLA II	DR3 , DQw2	DR5	DR3
associació HLA III	TNFβ, hsp70		
associació no MHC	CTLA-4		

Taula 1: Característiques de les malalties autoimmunitàries de la tiroide

Tot i que la etiologia d'aquestes malalties no es coneix, existeixen evidències que indiquen una influència important de la genètica en el desenvolupament de les AITDs. Està acceptat que les AITD es desenvolupen en individus genèticament predisposats, en conjunció amb exposicions a determinats factors mediambientals.

4.1. Factors genètics de les malalties autoimmunitàries de la tiroides

Durant l'última dècada hi ha hagut grans progressos per entendre la contribució de factors genètics a l'etiologia de les AITDs. S'ha identificat i caracteritzat gens de susceptibilitat a les AITD, alguns específics per GD o HT i d'altres que confereixen susceptibilitat a ambdues malalties. El primer gen de susceptibilitat identificat va ser el locus HLA-DR i posteriorment es van identificar altres gens com CTLA-4, CD40, PTPN22, tiroglobulina i el receptor de la TSH (TSHR) (Jacobson and Tomer 2007). També s'ha relacionat amb la susceptibilitat a la malaltia de GD polimorfismes d'altres gens codificats a la regió intermèdia de l'MHC, que intervien en la resposta immunològica, com la proteïna d'estrès tèrmic hsp70 (Ratanachaiyavong, Demaine et al. 1991) o citocines com TNFβ (Badenhoop, Schwarz et al. 1992) (Taula 2).

<i>Gene</i>	<i>AITD phenotype associated with gene</i>	<i>Associated variants</i>	<i>Putative causative variant</i>	<i>Populations showing association</i>	<i>Potential mechanisms</i>
HLA-DR	GD	DR3	DR β -Arg74	Caucasians	Alterations of immunogenic peptide presentation to T cells
CTLA-4	GD, HT, TAb	A/G49 SNP, CT60 SNP, 3' UTR AT microsatellite	Unknown	Caucasians, Japanese, Koreans, Chinese	Reduced suppression of T cell activation
CD40	GD	-1 CT (Kozak) SNP	-1 CT (Kozak) SNP	Caucasians, Japanese, Koreans	Decreased CD40 expression on B cells, APCs, and thyrocytes
PTPN22	GD, HT	R620W SNP	R620W SNP	Caucasians	Inhibition of T cell activation; resulting in escape from thymic deletion?
Thyroglobulin	GD, HT	S734A SNP, T2334C SNP, M1028V SNP, R1999W SNP	Unknown	Caucasians, Japanese	Alterations in thyroglobulin peptide presentation by HLA-DR to T cells
TSHR	GD	Several SNPs in introns 1 and 7	Unknown	Caucasians, Japanese	Alterations in TSHR alternative splicing? Alterations in TSHR peptide presentation by HLA-DR to T cells?

Taula 2: Gens de susceptibilitat a AITD. SNP: polimorfisme d'un únic nucleòtid; TAb: anticòs tiroïdal; (Jacobson et al. 2007)

- HLA-DR: s'ha establert associació de GD amb l'al·lel HLA-DR3 (Tomer and Davies 2003). La freqüència de DR3 entre els pacients amb GD és del 40-50%. Altres treballs però indiquen que aquesta associació amb DR3 és secundària, i demostren que és la presència d'Arg a la posició 74 de la cadena β 1 (Arg β 74) del DR el que s'associa significativament amb la susceptibilitat a GD, ja que moltes variants de DR3 contenen Arg β 74 (Ban, Davies et al. 2004). Dins la població caucàsica l'al·lel HLA-DQA1*0501, en desequilibri de lligament amb DR3, també està associat a GD (Yanagawa, Manglabruks et al. 1993; Barlow, Wheatcroft et al. 1996). Altres estudis demostren que la presència d'aquest al·lel per sí sol també confereix susceptibilitat en pacients que no expressen DR3 (Yanagawa, Manglabruks et al. 1993). L'associació genètica amb HT és menys clara. Alguns estudis mostren certa associació amb HLA-DR5 i una dèbil associació amb DR3 en caucàsics (Moens, Farid et al. 1978; Farid, Sampson et al. 1981). S'ha identificat també al·lells de resistència a tiroïditis com HLA-DRB1*1502 (HLA-DR2) i HLA-DRB1*0401 (HLA-DR4) (Kong, Lomo et al. 1996; Wan, Shah et al. 2002; Simmonds and Gough 2004). Un treball realitzat en el nostre laboratori va demostrar que la inducció de molècules HLA-II per IFN γ era superior a les CFT de pacients amb GD que a individus control (Sospedra, Obiols et al. 1995). Aquesta dada suggeria l'existència d'un polimorfisme en la regió reguladora dels gens de les molècules de classe II, que facilitaria la inducció de l'expressió i per tant predisposaria a la malaltia.
- CD40: és un membre de la família de receptors de TNF i s'expressa principalment en cèl·lules B i altres APC. Juga un paper important en l'activació de cèl·lules B, induint proliferació, canvi d'isotip de les immunoglobulines, secreció d'anticossos, maduració d'afinitat i generació de cèl·lules de memòria. Altres APC com les DC i els macròfags també necessiten la senyalització via CD40 per activar-se. S'ha descrit certa associació entre CD40 i GD (Tomer, Barbesino et al.

1998; Tomer, Concepcion et al. 2002). A la regió UTR 5' del gen de CD40 existeix un polimorfisme C/T, el genotip CC del qual, està fortament associat amb GD (Tomer, Concepcion et al. 2002). Jacobson et al. proposen que l'augment de l'expressió de CD40 és el factor associat amb la malaltia. El genotip CC correlaciona amb nivells d'expressió de CD40 majors, per tant una cèl·lula B autoreactiva amb aquest fenotip tindria una llindar d'activació més baix, facilitant el desencadenament l'autoimmunitat tiroïdal. Aquest fenotip també podria facilitar la traducció de la proteïna en altres teixits incloent la glàndula tiroïdes. S'ha demostrat que CD40 s'expressa i és funcional en tiròcits i que aquesta expressió augmenta en pacients amb GD. Així es poden postular 2 mecanismes que ajudarien a iniciar o potenciar la malaltia de GD: 1) L'activació de la via del CD40 en els tiròcits per una cèl·lula T CD4⁺, provocant la sobreexpressió de citocines inflamatòries. 2) La sobreexpressió de CD40 en els tiròcits que expressen MHC II, augmenta la coestimulació de les cèl·lules T, dirigint-les cap a una resposta Th2 per secretar citocines que activarien les cèl·lules B.

- *CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated factor 4)*: factor regulador negatiu de la resposta immune duta a terme per cèl·lules T. Nombrosos treballs mostren l'associació entre el gen del CTLA-4 i les AITD (Yanagawa, Hidaka et al. 1995; Kotsa, Watson et al. 1997; Braun, Donner et al. 1998; Kouki, Gardine et al. 2002; Ueda, Howson et al. 2003). No se sap molt bé quines variants ni per quin mecanisme els polimorfismes de CTLA-4 confereixen susceptibilitat a l'autoimmunitat. Una possible explicació seria que les variants que disminueixen l'expressió de CTLA-4 (Anjos, Nguyen et al. 2002), podrien augmentar l'activació de les cèl·lules T efectores o disminuir la de cèl·lules T reguladores, conduint al desenvolupament d'autoimmunitat.
- *Tirosina fosfatasa-22 (PTPN22)*: com el CTLA-4, és un potent inhibidor de l'activació de les cèl·lules T. Estudis en AITDs mostren associació de SNP en PTPN22 amb GD (Velaga, Wilson et al. 2004) i HT (Criswell, Pfeiffer et al. 2005).
- *Tiroglobulina*: S'han fet estudis de microsatèl·lits i SNP del gen de la Tg que suggereixen associació amb les AITDs tot i que hi ha certa controvèrsia (Tomer, Greenberg et al. 2002; Ban, Greenberg et al. 2003). El mecanisme de predisposició però no es coneix. Determinades variants de la Tg podrien iniciar una resposta immune alterant la presentació de pèptids de la Tg per les APC. Podria ser que el repertori de pèptids generats pels al·lels de susceptibilitat de la Tg fossin patogènics o que determinats al·lels d'HLA-DR com els al·lels que presenten Arg74 fossin més capaços de presentar aquests pèptids de manera òptima.
- *Receptor de la TSH (TSH-R)*: el tret distintiu de la malaltia de GD és la presència d'autoanticossos activadors contra el receptor de la TSH, per tant el gen del TSH-R és un candidat obvi per la malaltia de GD. Fins al moment s'ha estudiat tres SNP i la seva associació amb GD (Cuddihy, Dutton et al. 1995; Kotsa, Watson et al. 1997; Tonacchera and Pinchera 2000). Recentment, s'ha relacionat el baix nivell d'expressió del gen de TSH-R en el timus amb la susceptibilitat a la malaltia, suggerint que la susceptibilitat està estretament lligada al nivell de tolerància central en front a aquesta molècula (Colobran, R et al, manuscrit en preparació).

4.2. Malaltia de Graves-Basedow (GD)

És la tiroïdopatia més freqüent, té una incidència aproximadament de 4/10000 per any (Vanderpump, Tunbridge et al. 1995; Hollowell, Staehling et al. 2002). Afecta principalment dones entre 30 i 40 anys amb una relació de 3:1 respecte els homes. Es caracteritza per una hiperplàsia difusa de la glàndula amb hiperfunció i tirotoxicosis. Les manifestacions clíniques de la malaltia són pèrdua de pes, taquicàrdia, hiperquinesia (falta d'atenció, inquietud), goll difós, i nivells elevats de T4 i/o T3.

Histològicament s'observa hipertròfia i hiperplàsia de l'epiteli fol·licular, els fol·licles augmenten de mida i les cèl·lules fol·liculars es fan més altes. La llum del fol·licle disminueix i conté menys col·loide. En el pol apical de les cèl·lules fol·liculars s'observen vacuoles de reabsorció. Destaca la presència d'un infiltrat difús format per cèl·lules T ($CD4^+ > CD8^+$), B i cèl·lules plasmàtiques. L'hipertiroidisme es degut a la presència d'anticossos agonistes anti-receptor de la TSH (TSH-R) que estimulen les CFT mimetitzant l'efecte de la TSH i provocant una secreció excessiva d'hormones tiroïdals (Rees Smith, McLachlan et al. 1988; Rapoport, Chazenbalk et al. 1998). Un percentatge elevat de pacients, aproximadament un 75%, també tenen autoanticossos anti-tiroglobulina i anti-peroxidasa tiroïdal (TPO).

Poden produir-se també manifestacions extratiroïdals, sent la més freqüent l'oftalmopatia infiltrativa (GO) que afecta entre un 25-50% dels pacients amb GD (Ludgate and Baker 2002), però també poden haver-hi afectacions cardiovasculars, gastrointestinals, dèrmiques, neuromusculars i reproductives que li poden conferir a la malaltia un caràcter sistèmic. L'etiologia d'aquestes manifestacions extratiroïdals no es coneix gaire bé, se suposa que l'oftalmopatia es desenvolupa com a conseqüència d'una reacció creuada entre els autoantígens tiroïdals i els orbitals. Cada cop hi ha més evidències que el TSHR també juga un paper important: els nivells d'anticossos anti-TSHR correlacionen amb la clínica de GO (Gerding, van der Meer et al. 2000) i amb l'expressió de TSH-R en teixits orbitals de pacients amb GD. Aquestes dades fan pensar que les cèl·lules T TSHR-específiques podrien ser reclutades a l'òrbita on s'activarien i secretarien citocines capaces d'induir la proliferació de fibroblasts i la producció de glicosaminoglicans.

5. AUTOANTÍGENS DE LA RESPOSTA IMMUNOLÒGICA A LES AITD

Els principals autoantígens descrits en les malalties autoimmunitàries de la tiroide són la tiroglobulina (Tg), la peroxidasa tiroïdal (TPO) i el receptor de la TSH (TSH-R). També hi ha autoanticossos contra altres autoantígens com el transportador Na^+/I^- i contra una proteïna de 64kDa. A la tiroide de pacients amb GD hi ha presents de manera simultània cèl·lules T infiltrants i autoanticossos específics per la Tg, la TPO i el TSH-R (Dayan, Londei et al. 1991). La presència d'autoanticossos i d'infiltració limfocitària a les glàndules tiroïdals de pacients amb AITDs indica que en la patogènia intervenen tant la resposta autoimmunitària humoral com la cel·lular.

5.1. Tiroglobulina (Tg)

Els models animals han aportat evidències de la importància de la Tg en el desenvolupament de la tiroïditis autoimmunitària. Es pot induir tiroïditis autoimmunitària experimental (EAT) sensibilitzant models animals genèticament susceptibles amb un extracte tiroïdal i adjuvants (Rose and Witebsky 1956; Anderson and Rose 1971; Rose, Twarog et al. 1971) o amb Tg humana o de ratolí (Balasa and Carayanniotis 1993). La EAT es caracteritza per un infiltrat cel·lular de la glàndula, i per nivells elevats d'autoanticossos anti-Tg. Recentment s'ha creat un model animal de GD immunitzant ratolins AKR/N amb Tg bovina (Endo and Kobayashi 2009).

La Tg no és un antigen segrestat, ja que està present en la circulació, majoritàriament en la forma pobrament iodada (Schneider, Ikekubo et al. 1983), en humans en concentracions entre 3-40 ng/ml i amb una vida mitja aproximada de 65 hores (Hocevar, Auersperg et al. 1997).

Estructura proteica. És una glicoproteïna homodimèrica formada per dues subunitats de 330 kD. Representa aproximadament entre el 75-80% del contingut proteic total de la tiroïdes. És el principal component del col·loide. Hi ha un 71.8% d'homologia entre la Tg humana i la de ratolí (Rao and Carayanniotis 1997; Vali, Rose et al. 2000)

La regió carboxi-terminal comparteix homologia de seqüència i patró de plegament (28% i en algunes zones arriba al 64%) amb el lloc catalític de l'acetilcolinesterassa (AChE), un enzim de la sinapsis colinèrgica del sistema nerviós central i perifèric. S'especula que a la GO els autoanticossos crossreaccionen amb la Tg i l'AChE dels músculs orbitals, degut a la seva homologia estructural (Thrasyvoulides, Sakarellos-Daitsiotis et al. 2001).

Processament de la Tg i modificacions post-traduccionals. Durant la producció hormonal es generen espècies reactives d'oxigen (ROS) que modifiquen els autoantígens tiroïdals i activen el complement, i per tant podrien iniciar un procés inflamatori. La tiroglobulina es trenca en molts pèptids, un d'ells de 40kDa (p40) (Duthoit, Estienne et al. 2001). El p40, un pèptid iodat de l'extrem c-terminal, conté dos llocs hormonogènics i és el pèptid més petit reconegut per anticossos de ratolins immunitzats amb hTg (Estienne, McIntosh et al. 1998). També es coneixen 5 epítops T de p40 capaços d'induir EAT en animals susceptibles (Verginis, Stanford et al. 2002). S'ha vist que p40 és endocitat pels tiròcits molt més fàcilment que la Tg sencera (Duthoit, Estienne et al. 2000) i que el sèrum de pacients amb GD i HT reacciona més amb la regió p40 iodada que no iodada (El Hassani, Estienne et al. 2004).

Les molècules de tiroglobulina pateixen modificacions post-traduccionals, incloent iodacions (Kondo and Ui 1961), glicosilacions (Godelaine, Spiro et al. 1981), i fosforilacions (Consiglio, Acquaviva et al. 1987). La iodació és la més estudiada i es creu que contribueix al desenvolupament de la malaltia (Rose, Bonita et al. 2002; Papanastasiou, Vatalas et al. 2007). En els últims anys s'estan fent molts estudis sobre la influència de la iodació en la patogenicitat de la Tg i s'ha comprovat que en alguns casos la iodació de tirosines confereix potencial patogènic a determinants peptídics. Així en pèptids d'estructura nativa no

patogènica, la iodació pot facilitar la unió amb les molècules de MHC o bé el reconeixement per part de les cèl·lules T (Li and Carayanniotis 2006). També s'ha vist que la iodació pot afectar el processament de la Tg per les APC, facilitant la generació de pèptids patogènics no iodats. En aquests casos, la iodació afectaria la seva degradació proteolítica (Li and Carayanniotis 2006; Li, Jiang et al. 2007). S'ha establert certa relació causal entre la ingesta de iode i la tiroïditis autoimmune en humans (Foley 1992; Konno, Makita et al. 1994; Rose, Rasooly et al. 1999) i s'ha vist en diferents models animals, com els ratolins NOD.H2^{h4} (Rasooly, Burek et al. 1996; Barin, Talor et al. 2005), en rates BUF (Allen and Braverman 1990), en models de gallines (Sundick, Herdegen et al. 1987), que el iode accelera el debut de la malaltia i la prevalença i severitat d'aquesta. Per tant el iode és el prototip de factor ambiental de risc que estimula la malaltia en individus genèticament predisposats. També la glicosilació es creu que pot jugar un paper en la antigenicitat (Fenouillet, Fayet et al. 1986).

Epítops B de la tiroglobulina. L'anàlisi dels autoanticossos d'individus amb autoimmunitat tiroïdal, va indicar que tot i ser una proteïna gran, hi havia pocs epítops reconeguts i la majoria es trobaven a la regió C-terminal. S'ha demostrat que els autoanticossos naturals reconeixen epítops conformationals i per tant dependents de l'estructura secundària de la proteïna (Saboori, Rose et al. 1999; Thrasyvoulides, Sakarellos-Daitsiotis et al. 2001). D'altra banda, s'ha trobat anticossos anti-Tg a individus sans que reconeixen regions conservades de la proteïna (Saboori, Rose et al. 1999).

És habitual trobar una "expansió" dels epítops de la tiroglobulina, que pot ser el resultat de l'activació de cèl·lules T "helper" capaces d'estimular cèl·lules B específiques per diferents epítops de la proteïna. Les cèl·lules B específiques per un determinat epítop poden internalitzar la Tg via immunoglobulines de superfície i un cop processada presentar nous determinants a les cèl·lules T (Thrasyvoulides and Lymberi 2003).

Epítops T de la tiroglobulina. S'ha identificat més de 20 epítops T diferents dins la Tg (Carayanniotis and Rao 1997; Carayanniotis 2007) (veure taula de l'article de Muixi, Alvarez et al. 2008 inclòs en aquesta tesis) molts d'ells descrits en models de ratolins. La seva patogenicitat varia considerablement depenent de l'hoste i el mètode d'estimulació escollit, però tots comparteixen la característica de ser subdominants o críptics segons el criteri de Sercarz et al. (Sercarz, Lehmann et al. 1993).

Existeixen diferents tipus d'epítops T dins la Tg: a) epítops que contenen tiroxina (T4), on els àtoms de iode són part integrant del lligand del TCR (Hutchings, Cooke et al. 1992; Kong, McCormick et al. 1995; Dawe, Hutchings et al. 1996; Dai, Eliades et al. 2005); b) determinants que es tornen immunogènics després de la incorporació de iode en els residus de tirosina (Li and Carayanniotis 2006); c) epítops no iodats (Carayanniotis 2003).

5.2. Peroxidasa tiroïdal (TPO)

És el principal enzim involucrat en la síntesi de les hormones tiroïdals. En presència de H_2O_2 catalitza la iodació de la tiroglobulina i l'assemblatge de residus de iodetirosina per la síntesi de MIT i DIT. Tot i que la TPO catalitza el procés d'hormonosíntesis a la superfície apical de la CFT, només una petita fracció de l'enzim es troba situat a la membrana apical, la majoria es localitza al reticle endoplasmàtic (Fayadat, Niccoli-Sire et al. 1998).

Estructura proteica. És una glicoproteïna homodimèrica situada a la superfície apical de les CFT. El domini extracitoplasmàtic, orientat cap a l'interior del fol·licle, conté el lloc catalític. Està formada per tres dominis, un domini EGF-like (Bresson, Cerutti et al. 2003), un amb homologia amb la mieloperoxidasa (MPO) (42%) i l'altre amb una proteïna de control del complement (CCP-like) (McLachlan and Rapoport 2007) (Figura 5b). La proseqüència de la MPO es absent a la proteïna madura.

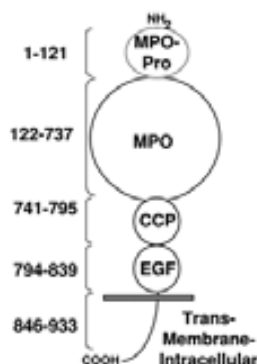


Figura 5b: Representació esquemàtica de la TPO en base a la seva homologia amb altres proteïnes. MPO: mieloperoxidasa; CCP: proteïna de control del complement; EGF: factor de creixement epidèrmic

Epítops B de la TPO. Tot i que algun anticòs anti-TPO (TPOAbs) interacciona amb pèptids lineals, la majoria d'epítops B de la TPO són conformacionals (Banga, Barnett et al. 1991; Bresson, Cerutti et al. 2003; McLachlan and Rapoport 2007). Els TPOAbs interaccionen amb una zona restringida de la TPO, la regió amb homologia amb la MPO i amb la CCP. En humans els TPOAbs defineixen una regió immunodominant reconeguda pel sèrum de tots els individus i que compren >80% dels Ab anti TPO del sèrum d'un pacient individual (Chazenbalk, Costante et al. 1993).

Epítops T de la TPO. Diferents treballs demostren 14 pèptids de la TPO que indueixen resposta proliferativa en cèl·lules T de pacients amb HT o GD (Fukuma, McLachlan et al. 1990; Dayan, Londei et al. 1991; Ewins, Barnett et al. 1992; Kawakami, Fisfalen et al. 1992; Fisfalen, Soliman et al. 1995). En humans no s'han trobat epítops T a la regió amino terminal de la TPO (eliminada de la proteïna madura), ni a la regió homòloga a CCP o EGF.

S'ha vist que TPOAbs monoclonals en humans poden modular el processament de la TPO per generar pèptids per ser presentats a les cèl·lules T. Algunes cèl·lules T TPO específiques i la majoria dels autoanticossos en humans es desenvolupen en resposta a la TPO presentada per les cèl·lules tiroïdals, més que per la TPO alliberada dels tiròcits danyats (McLachlan and Rapoport 2007).

5.3. Receptor de la tirotropina (TSH-R)

El receptor de la TSH pertany a la família de receptors acoblats a proteïna G i interacciona amb diferents membres d'aquesta exercint les diferents funcions (Laugwitz, Allgeier et al. 1996). L'expressió del TSH-R no està confinada a la glàndula tiroide. La presència de TSH-R biològicament actiu s'ha confirmat en diferents cèl·lules humanes, influint adipòcits, fibroblasts, cèl·lules del moll de l'os, osteoclasts i osteoblasts i d'altres (Michalek, Morshed et al. 2009). A la tiroides s'expressa amb baixa densitat a la membrana basal de les cèl·lules fol·liculars tiroïdals (10^3 - 10^4 molècules per cèl·lula).

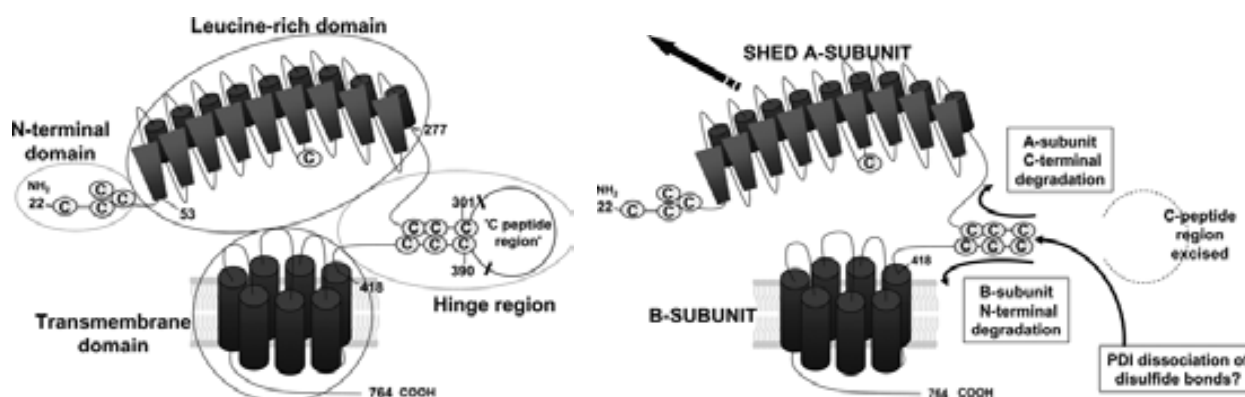


Figura 6: Estructures del TSH-R. Dreta, trencament i alliberament de la subunitat A. El trencament intramolecular dins la regió bisagra allibera el pèptid C deixant les subunitats A o B unides per ponts disulfurs. Després del trencament algunes subunitats A s'alliberen.

Estructura proteica. És una glicoproteïna de 764 aa formada per diferents dominis: un domini extracel·lular ric en leucines, una regió formada per 7 dominis transmembrana i una regió bisagra important per definir la relació espacial entre els dos dominis (Rapoport and McLachlan 2007) (Figura 6). Una característica distintiva d'aquest receptor són les complexes modificacions post-traduccionals que pateix: N-glicosilacions en 6 punts definits de l'ectodomini i un cop és transportat a la superfície el TSH-R és subjecte a un trencament intramolecular. Com a resultat d'aquest trencament el receptor consta de dues subunitats unides per ponts disulfur: la **subunitat A** que és la regió extracel·lular on hi ha el lloc d'unió de la TSH i la **subunitat B** formada pel domini transmembrana i per una cua citoplasmàtica (Furmaniak and Smith 1990; Loosfelt, Pichon et al. 1992). El trencament produeix l'escissió d'una regió "pèptid C" i a vegades s'allibera la subunitat A. Existeix certa controvèrsia respecte a si tots els TSH-R de la superfície de les CFT es presenten amb les dues subunitats separades o no. Hi ha indicis que la subunitat A podria estar implicada en la generació d'anticossos estimuladors (TSAb) (Nagayama, Wadsworth et al. 1991). De fet, els autoanticossos anti-TSH-R del sèrum de pacients amb GD reconeixen preferentment la subunitat A lliure, més que l'holoreceptor (Chazenbalk, Pichurin et al. 2002; Schwarz-Lauer, Chazenbalk et al. 2002). També s'ha vist que la immunització de ratolins BALB/c amb adenovirus amb la subunitat A induïx hipertiroidisme al 70 % dels animals a diferència del 10% quan

s'utilitzen adenovirus que codifiquen un TSHR mutat per evitar el trencament (Chen, Pichurin et al. 2003; McLachlan, Nagayama et al. 2005).

Epítops B del TSH-R. S'ha descrit anticossos bloquejants (antagonistes) (TBAb), que eviten la unió de la TSH, estimuladors (agonistes) (TSAb) que produeixen la estimulació de la funció tiroïdal (Rees Smith, McLachlan et al. 1988) i neutrals, que no afecten la unió del TSH ni l'activació del receptor. La majoria dels autoanticossos estimuladors i bloquejants reconeixen epítops conformacionals (Nagayama, Wadsworth et al. 1991; Nagayama, Wadsworth et al. 1991) mentre que els neutrals estan restringits a pèptids lineals (Michalek, Morshed et al. 2009).

Epítops T del TSH-R. Algunes seqüències dins el TSH-R (145-163, 158-176, 207-222, 248-263, 272-291 i 343-362) s'han descrit com a epítops reconeguts per cèl·lules T de pacients amb GD (Soliman, Kaplan et al. 1995; Soliman, Kaplan et al. 1995; Soliman, Kaplan et al. 1995; Soliman, Kaplan et al. 1996; Fisfalen, Palmer et al. 1997). Martin et al. (Martin, Nakashima et al. 1997) van observar que els pèptids 52-71, 142-161, 202-221 i 247-266 eren els principals epítops reconeguts per cèl·lules T CD4⁺ de pacients amb GD.

5.4. Transportador de iode (sodium iodine symporter Na⁺/I⁻ (NIS))

És la proteïna encarregada de la captació i entrada de iode a les CFT i s'ha proposat com a possible autoantigen (Raspe, Costagliola et al. 1995; Caillou, Troalen et al. 1998). S'expressa a la membrana basolateral de les cèl·lules fol·liculars de la tiroide (CFT). A la malaltia de GD s'expressa a la majoria de les CFT, però al HT el nivell d'expressió és inferior i associat sobretot a les CFT en contacte amb l'infiltrat limfocitari.

5.5. Autoantigen 64KD

Autoanticossos de pacients amb autoimmunitat tiroïdal i oftalmopatia associada reconeixen una proteïna de 64kD (D1) que s'expressa al múscul de l'ull i a la tiroide. S'ha definit com autoantigen a l'oftalmopatia associada a les AITDs, però encara no s'ha identificat la proteïna (Boucher, Bernard et al. 1992; Zhang, Dong et al. 1992).

6. CÈL·LULES FOLICULARS COM A PRESENTADORES D'ANTIGEN

En situació d'autoimmunitat, les CFT expressen HLA-II (Bottazzo, Pujol-Borrell et al. 1983), molècules d'adhesió (Zheng, Abney et al. 1990; Tolosa, Roura et al. 1992) i citokines (Grubeck-Loebenstein, Buchan et al. 1989; Grubeck-Loebenstein, Buchan et al. 1989), totes necessàries per la presentació d'antígens a cèl·lules T. Igualment les CFT poden expressar algunes molècules coestimuladores com ara CD40 (Faure, Bensoussan-Lejzerowicz et al. 1997), però no CD80 ni CD86 (Battifora, Pesce et al. 1998). L'expressió d'aquestes molècules en els tiròcits pot ser induïda per IFN- γ i la seva acció modulada per la TSH. Diferents articles evidencien que les CFT poden formar complexos MHC-pèptid derivats d'antígens propis en quantitat suficient com per activar cèl·lules T (Maile, Elsegood et al. 2000).

En el nostre laboratori s'ha demostrat que les CFT classe II⁺ expressen HLA-DM i cadena invariant, xaperones que intervenen en el processament i presentació d'antigen per classe II, de manera que la majoria dels complexos HLA-II-pèptid expressats per les CFT són estables (Catalfamo, Serradell et al. 1999). La identificació d'aquests pèptids i l'estudi de la seva possible funció en la patologia és un dels objectius d'aquest treball.

7. EL COMPLEX MAJOR D'HISTOCOMPATIBILITAT

7.1. Organització gènica del MHC

El complex major d'histocompatibilitat, HLA en humans, és un complex poligènic, amb gens polimòrfics i codominants, localitzat en el braç curt del cromosoma 6. Aquest complex gènic és el més polimòrfic del genoma humà i dels més de 220 gens que s'ha identificat, un alt percentatge tenen funció directa en la resposta immunitària. El MHC humà es divideix en 3 regions, les de classe I i II que contenen gens involucrats en el processament i presentació d'antigen i la regió de classe III que conté gens molt variats, alguns d'ells relacionats amb la resposta immunitària tals com factors de complement o citokines (Figura 7). Les regions de classe I i II contenen múltiples loci que codifiquen per varies molècules presentadores d'antigen (MHC-I i MHC-II). Les molècules de MHC-I es troben codificades en els loci HLA-A, B i C i les de MHC II en tres subregions del locus D (HLA-DP, DQ i DR). El gran polimorfisme de les molècules d'HLA reflexa la pressió evolutiva que han patit aquests gens en resposta als diferents patògens.

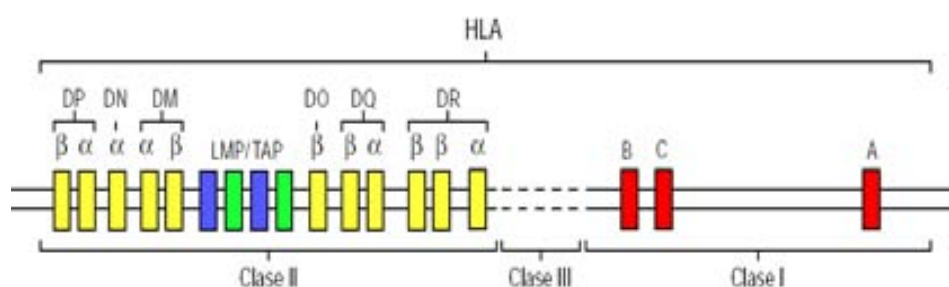


Figura 7: Estructura gènica de l'HLA humà. Janeway et al.: Immunobiología. © Masson, Barcelona, 2000

7.2. Les molècules d'HLA com a presentadores d'antigen

Els grups de gens polimòrfics del MHC de classe I i II, codifiquen dos grups de proteïnes estructuralment homòlogues, les molècules de MHC de classe I i II. Estudis de resolució d'estructures cristal·lines han permès determinar les característiques estructurals i funcionals d'aquestes molècules, en línies generals tenen una estructura semblant que els permet realitzar la seva funció essencial de presentació de pèptids a les cèl·lules T, les de classe I a les cèl·lules T CD8⁺ i les de classe II a les cèl·lules T CD4⁺. Ambdues tenen un solc extracel·lular format per dues hèlix α i 8 fulles β plegades dins el qual es disposa el pèptid, un parell de dominis tipus immunoglobulina (Ig) que contenen llocs d'unió pels coreceptors CD4 i CD8, i estan ancorades a la cèl·lula mitjançant uns dominis transmembrana i citoplasmàtics (Bjorkman, Saper et al. 1987; Brown, Jardetzky et al. 1993; Engelhard 1994; Stern, Brown et al. 1994; Ghosh, Amaya et al. 1995) (Figura 8).

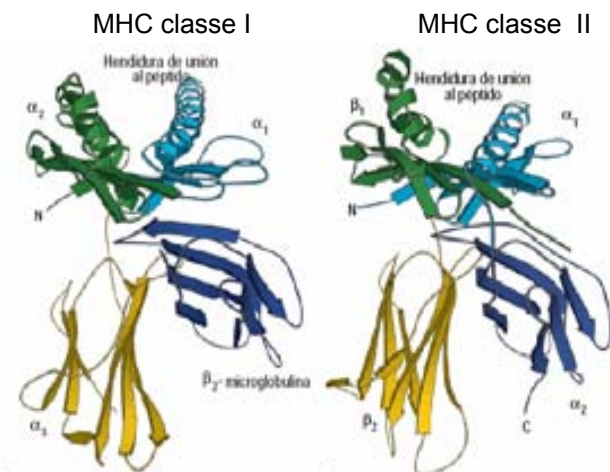


Figura 8: Estructura tridimensional de les molècules de MHC I i MHC II. L'heterodímer de classe I consisteixen en una cadena pesada α que travessa la membrana, associada de manera no covalent a la β_2 -microglobulina (blava). El solc d'unió a l'antigen està format pels dominis α_1 i α_2 de la cadena pesada. La molècula de classe II està formada per dues cadenes, α i β formades cada una per dos dominis globulars. Els dominis α_1 i β_1 formen el solc d'unió a l'antigen. Janeway et al.: Immunobiología © Masson, Barcelona, 2000

A ambdós tipus de molècules les regions més polimòrfiques es troben en el solc d'unió al pèptid i pròxims a aquest i són les responsables de les diferents especificitats peptídiques. D'aquesta manera la gran variabilitat d'aminoàcids d'aquesta regió fa que diferents molècules de MHC uneixin i presentin pèptids diferents i siguin reconeguts per diferents TCR (Figura 9). Els pèptids que s'uneixen són de longitud variable en funció de si es presenten per classe I o per classe II i la unió amb aquests es fa durant el procés de biosíntesi i plegament tridimensional de les molècules de MHC. Ambdós molècules són inestables quan no tenen un pèptid unit.

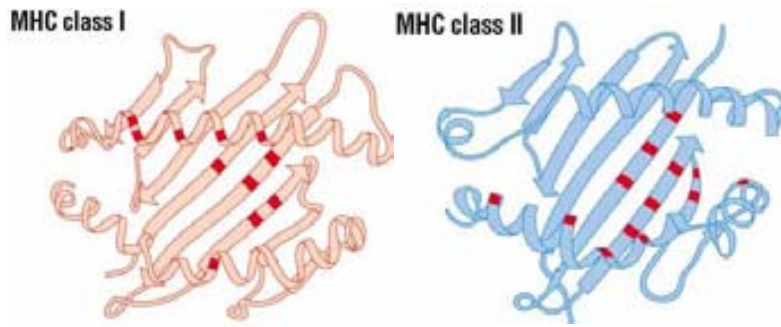


Figura 9: Distribució dels aminoàcids polimòrfics dins el solc d'unió al pèptid

7.2.1 Unió MHC-pèptid

Dins el solc, el pèptid adopta una conformació estesa, d'hèlix de poliprolina tipus II, amb les cadenes laterals d'alguns residus encarades cap al solc d'unió i d'altres exposades a l'exterior per ser reconegudes pel TCR. Existeixen dos tipus d'interaccions que contribueixen a l'estabilitat del complex MHC-pèptid: els ponts d'hidrogen entre la cadena lineal del pèptid i els residus conservats del solc d'unió (Stern, Brown et al. 1994) i les interaccions de les cadenes laterals dels residus d'ancoratge amb unes cavitats, anomenades butxaques (pockets), de la molècula de MHC que es troben a les zones més polimòrfiques (Figura 11). S'anomenen residus d'ancoratge aquells aminoàcids que s'uneixen específicament als residus polimòrfics del solc d'unió.

La unió del pèptid amb les molècules de classe I s'estabilitza principalment per interaccions entre els extrems N i C-terminal del pèptid amb butxaques conservades dels extrems del solc d'unió, i mitjançant residus d'ancoratge que s'uneixen a butxaques polimòrfiques del solc d'unió, aquestes butxaques són les que determinen l'especificitat al·lèlica. La posició i característiques dels residus d'ancoratge varien segons l'al·lel (Matsumura, Fremont et al. 1992) (Figura 10).

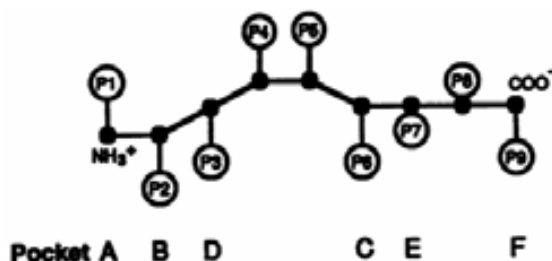


Figura 10: Representació esquemàtica de l'orientació d'un pèptid de 9aa unit a MHC I. Les cadenes laterals de P1, P4 i P5 surten cap enfora i poden ser reconegudes pel TCR. Les cadenes laterals de P2, P3, P6 i P9 s'encaren dins el solc i s'acomoden a les butxaques corresponents. Els grups amino i carboxi del pèptid interaccionen amb les butxaques A i F respectivament. L'estructura d'aquestes està bastant conservada entre els diferents al·lells de classe I, però les butxaques B a E són molts diferents entre les diferents molècules en quant a mida i naturalesa química.

Les molècules de MHC II en canvi, estableixen ponts d'hidrogen amb residus localitzats al llarg de tota la cadena del pèptid. Els pèptids tenen una regió central d'unió a MHC o "core" (Jardetzky, Brown et al. 1996) i uns residus a ambdós extrems del core que sobresurten del solc d'unió a l'antigen. Aquestes regions laterals poden interaccionar amb l'heterodímer $\alpha\beta$ i augmentar l'afinitat de la unió, estabilitzant la conformació del complex (Sant'Angelo, Robinson et al. 2002; Lovitch, Pu et al. 2006) o poden ser reconegudes per les cèl·lules T, tot i que hi ha certa controvèrsia sobre el tema (Carson, Vignali et al. 1997; Godkin, Smith et al. 2001). Les posicions relatives P1, 4, 6, 7 i 9 dels pèptids són les que habitualment interaccionen amb els residus de les butxaques dels solcs d'unió. El conjunt de residus d'ancoratge de cada variant al·lèlica és diferent i s'anomena motiu d'unió (Figura 11).

Mínimes variacions del solc d'unió poden provocar canvis en el repertori peptídic presentat. En un treball de Suri i col. demostraven que molècules de classe II que només es diferenciaven en un únic aa de la cadena beta presentaven repertoris diferents i específics per cada al·lel, tot i que les proteïnes disponibles pel processament eren les mateixes (Suri, Walters et al. 2003).

Característiques de la interacció MHC-pèptid

- L'associació de pèptids antigènics amb les molècules de MHC és un interacció saturable i de baixa afinitat, amb una velocitat d'associació lenta i una velocitat de dissociació molt lenta.
- Cada molècula de classe I o de classe II s'uneix amb un sol pèptid
- Una molècula de MHC pot unir múltiples pèptids diferents, però no alhora
- Tots els pèptids que s'uneixen a un determinat al·lel de MHC tenen certes característiques comuns

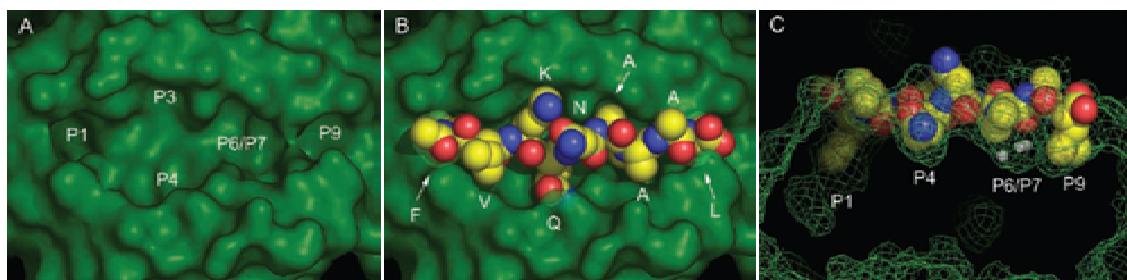


Figura 11: "Pockets" del solc d'unió d'HLA-DR1. A, Superfície del solc d'unió. B, Solc d'unió amb el pèptid FVKQNAAAL unit. C, vista lateral del solc d'unió al pèptid (Zavala-Ruiz, Sundberg et al. 2003)

La forma d'unió i el repertori de lligands peptídics units a MHC II s'ha analitzat per diferents mètodes, tan bioquímics com per cristal·lografia de raigs X (Brown, Jardetzky et al. 1993; Falk, Rotzschke et al. 1994; Rammensee 1995; Fremont, Hendrickson et al. 1996; Scott, Peterson et al. 1998; Reinherz, Tan et al. 1999). Com ja s'ha comentat anteriorment, els residus 1, 4, 6 i 9 del pèptid interaccionen amb les butxaques donant especificitat al·lèlica (Rammensee 1995). S'ha suggerit que la unió a les molècules de MHC de classe II és més promiscua que la unió a classe I, degut a la major longitud dels pèptids i a la presència d'extrems lliures. Per cada al·lel, cada una de les 4 butxaques principals tindrà característiques pròpies depenent dels residus que la formen, que determinaran l'especificitat pels diferents aa i l'afinitat d'unió pels diferents pèptids (Rammensee, Friede et al. 1995).

7.4. Generació de lligands peptídics per les molècules de MHC de classe II

Les molècules de classe II adquireixen els pèptids per una via diferent a la de classe I. Un cop sintetitzades en el reticle, les cadenes α i β de classe II s'associen formant un heterodímer inestable. Per estabilitzar la unió, el dímer $\alpha\beta$ s'associa amb una xaperona, la cadena invariant (Ii), que a més a més evita la unió prematura de pèptids residents al reticle endoplàsmic (Cresswell 1996) i facilita la formació d'un complex multimèric format per tres heterodímers $Ii_3(\alpha\beta)_3$. El nonàmer format es dirigeix a la via endocítica, però actualment està en debat si passa directament de la xarxa trans-golgi als lisosomes o si primer passa per la membrana i s'internalitza gracies a una seqüència senyal n-terminal de Ii (Bakke and Dobberstein 1990; Berger and Roche 2009). Un cop a la via endocítica la cadena invariant és degradada seqüencialment deixant només un fragment anomenat CLIP (residus 81-104) unit al MHC. L'intercanvi del pèptid CLIP per un pèptid antigènic es dona gracies a la molècula HLA-DM, que estabilitza el complex, permet l'alliberament de CLIP i fa d'editor peptídic determinant la qualitat i quantitat dels pèptids seleccionats (Lovitch, Petzold et al. 2003; Muntasell, Carrascal et al. 2004). Un cop format, el complex MHC-pèptid és transportat a la superfície (Figura 12).

La via de presentació de classe II està especialitzada en la presentació de patògens extracel·lulars o residents en vesícules intracel·lulars. Tot i que els pèptids presentats per MHC-II provenen de material extern, en absència d'infecció la gran majoria procedeixen de proteïnes de membrana o residents als endosomes o lisosomes. Els pèptids de proteïnes exògenes provenen de proteïnes molt abundants en el medi extracel·lular o per les quals hi ha receptors específics a la membrana per internalitzar-les.

Tot i que la via endocítica és majoritària, existeixen 2 rutes addicionals. En una d'elles les proteïnes extracel·lulars són degradades a l'exterior de la cèl·lula per proteases solubles o de membrana (Larsen, Pedersen et al. 1996; Santambrogio, Sato et al. 1999) i els pèptids generats poden unir-se o bé directament desplaçant pèptids de menor afinitat de les MHC-II de la superfície cel·lular, o bé poden internalitzar-se per endocitosis i incorporant-se a la via clàssica d'unió a antigen. L'altre via té lloc al citosol on el proteasoma i les calpaines generen pèptids antigènics que posteriorment seran transportats cap a la via endocítica mitjançant un mecanisme desconegut (Lich, Elliott et al. 2000).

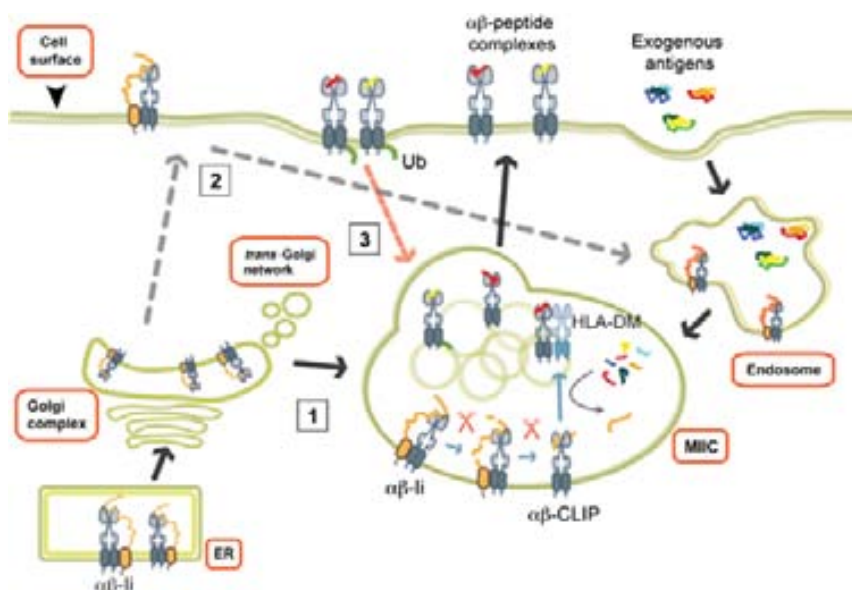


Figura 12: Via de processament d'antigen per MHC de classe II. (Rocha and Neefjes 2008)

Característiques dels pèptids naturals seleccionats per les molècules de classe II (Suri, Lovitch et al. 2006)

- Els pèptids naturals són de longitud variable, normalment entre 12-26 aminoàcids
- Els pèptids naturals es seleccionen en famílies on tots els membres comparteixen una regió central (core) de 9 aminoàcids, junt amb uns residus laterals variables.
- La regió "core" de 9aa del pèptid interacciona amb el solc d'unió de la molècula de MHC de classe II, que consisteix en 4 butxaques d'unió: p1, p4, p6 i p9
- La majoria de diferències al·lèliques entre les molècules de MHC-II es troben en els aa que formen les butxaques d'unió. Aquests determinen la selecció d'epítops amb motius d'unió al·lèl-específics
- Les cadenes laterals dels residus dels pèptids naturals incrementen l'afinitat de la unió amb les molècules de MHC II o poden servir com a residus d'interacció directa amb el TCR
- L'heterogeneïtat dels residus laterals dels pèptids naturals reflecteix els passos del processament d'antigen, on molts enzims de diferents especificitats participen en la proteòlisi
- Els pèptids naturals que s'uneixen a MHC-II són seleccionats de proteïnes de diferents compartiments, incloent el medi extracel·lular, la membrana plasmàtica, compartiments vesiculars i el citosol

7.4.1 *Motius d'unió de les molècules de MHC II*

L'existència de motius d'unió específics d'al·lel es va fer evident a principis dels anys 90 a partir de la caracterització dels repertoris peptídics naturals de MHC (Falk, Rotzschke et al. 1991; Corr, Boyd et al. 1992; Corr, Boyd et al. 1993; Falk, Rotzschke et al. 1994). Usaven una estratègia basada en la seqüenciació en "pool" d'Edman la qual cosa implicava la seqüenciació directa de barreges de pèptids. Els complexos MHC-pèptid es purificaven per immunoprecipitació i mitjançant elució àcida i ultracentrifugació es separaven els pèptids de les molècules d'MHC. Per disminuir la complexitat de la mostra es fraccionaven els pèptids per cromatografia líquida HPLC. Els diferents cicles de la seqüenciació d'Edman permetia determinar els aminoàcids més freqüents en cada una de les posicions de la seqüència peptídica, caracteritzant així la presència de residus específics en aquestes posicions. Aquests estudis són més eficients amb els pèptids de classe I que amb els de classe II degut a la major homogeneïtat de mida d'aquests (8-11aa), però tot i així la seqüenciació d'Edman també s'ha utilitzat per identificar lligands de classe II molt abundants (Rudensky, Preston-Hurlburt et al. 1991; Chiciz, Urban et al. 1992; Falk, Rotzschke et al. 1994; Verreck, van de Poel et al. 1994).

Un avenç molt important en l'estudi dels repertoris peptídics va ser l'ús de l'espectrometria de masses (MS), que va permetre augmentar la sensibilitat i la resolució en la detecció de pèptids de masses semblants presents en una mescla. La gran majoria dels pèptids aïllats provenen de línees B limfoblastoides (B-LCLs) i fins al moment s'ha caracteritzat els pèptids de I-A^d (Hunt, Michel et al. 1992), I-A^b (Rudensky, Preston-Hurlburt et al. 1991; Dongre, Kovats et al. 2001) i I-A^k (Nelson, Roof et al. 1992) de ratolins i també d'alguns al·lells humans d'HLA-DR, DQ o DP (Taula 4). Mitjançant alineació d'aquestes seqüències s'ha pogut determinar el motiu d'unió de molts al·lells, tot i que aquestes dades poden ser esbiaixades si el nombre de seqüències és insuficient. Molts dels articles emfatitzen la presència de pèptids capaços d'unir-se a diferents al·lells (promiscus).

La informació corresponent a cada motiu d'unió pot presentar-se en forma de matriu d'afinitat, on s'indica la importància relativa de la presència dels diferents aminoàcids a cada una de les posicions. Aquestes matrius permeten calcular l'afinitat teòrica d'un pèptid per un determinat al·lel de MHC. Per calcular l'índex d'afinitat teòric d'un determinat pèptid s'assignen valors a cadascun dels residus de la seqüència i la suma d'aquests valors determina l'afinitat d'unió a MHC d'aquest pèptid (Taula 5). Aquest càlcul es basa en la hipòtesis que la unió d'un pèptid a MHC correlaciona amb el resultat net de tots els efectes de les cadenes laterals d'aquest, i té en compte que els efectes de les cadenes laterals depenen de la seva posició relativa a l'aminoàcid ancorat a P1, més que de la seva posició absoluta (Hammer, Bono et al. 1994). La importància de les matrius com a eina de predicció de lligands d'HLA ha estat demostrada per diferents grups (Hammer, Bono et al. 1994; Marshall, Wilson et al. 1995; Marshall, Wilson et al. 1995), i s'ha demostrat que els valors numèrics ("peptide scores") correlacionen almenys parcialment amb l'afinitat d'unió dels lligands a HLA-DR. Això converteix les matrius en una eina important alhora de predir possibles epítops de cèl·lules T (Hammer 1995) (Taula 5).

Al·lel (referència)	P1	P2	P3	Motiu d'unió			P7	P8	P9
	P4	P5	P6						
DRB1*0101 (Hammer, Takacs et al. 1992; Falk, Rotzschke et al. 1994; Stern, Brown et al. 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 (Hammer 1993; Sette, Sidney et al. 1993; Hammer, Gallazzi et al. 1995; Friede, Gnau et al. 1996)	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 carregat alifàtic		Polar alifàtic K
DRB1*0407 (Davenport, Godkin et al. 1997)	F, Y, W			A,V,K		N,T,D,S			Q, N
DRB1*1501 (Vogt, Kropshofer et al. 1994; Wucherpfenning, Sette et al. 1994)	L,V,I			F,Y,I		I,L,V,M, F			
DRB1*0701 (Chicz, Urba et al. 1993; Gelder, Davenport et al. 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, van de Poel et al. 1996)	I,L,V			L,V,M,A F,Y		R,K,H			A,G,S,P
DRB1*1101 (Hammer 1993; Newcomb and Cressweel 1993; Verreck, van de Poel et al. 1996)	W,Y,F			M,L,V		R,K,H			A,G,S,P

Taula 4: Alguns exemples de motius d'ancoratge identificats

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

Taula 5: Matriu d'afinitat per l'al·lel HLA-DRB1*0401 (Sturniolo, 1999)

Una altra eina molt utilitzada per la caracterització dels motius d'ancoratge són els assajos d'unió amb llibreries peptídiques o de fags (Hammer, Takacs et al. 1992; Hammer, Valsasnini et al. 1993). Actualment existeixen nombroses bases de dades de pèptids, programes de predicció d'epítops i programes de càlculs d'afinitats teòriques. Un d'aquests programes de predicció, és el que hem utilitzat

en aquest treball, per predir les unions dels pèptids obtinguts amb les diferents molècules de DR. Aquest programa es basa en un treball on demostraven que els perfils d'especificitat de les butxaques eren independents de la resta del solc d'HLA-DR (Hammer, Gallazzi et al. 1995). Això té importants aplicacions en la determinació dels perfils de les butxaques, ja que aquests poden ser compartits entre al·lels sempre i quan s'hagi demostrat que tenen topografies idèntiques (Sturniolo, Bono et al. 1999) (Figura 13). El fet que els perfils de les butxaques siguin independents d'al·lel permet generar matrius virtualment, i per tant amb un petit nombre de perfils es poden construir un gran nombre de matrius. Així es va desenvolupar el programa informàtic TEPITOPE. A partir del programa TEPITOPE, que conté matrius per 25 al·lels i valors llindar per 26 al·lels més, obtinguts de la base de dades PIR, es va generar el programa ProPred (Singh and Raghava 2001), que és el que hem utilitzat en aquest estudi.

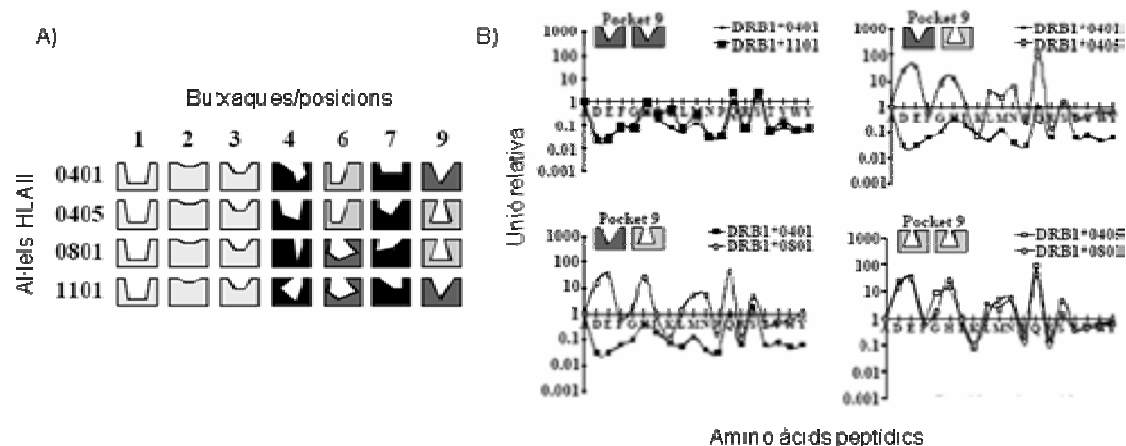


Figura 13: Independència al·lèlica dels perfils de les butxaques. A) Esquema del solc d'unió a HLA-DR on es comparen les butxaques de 4 al·lels d'HLA-DR. Les butxaques 1-3 estan constituïdes per residus monomòrfics que provenen de la cadena DR α (excepte un residu dimòrfic de la cadena DR β (Gly/Val86) que forma la butxaca 1). Les cadenes laterals de les posicions 5 i 8 s'han exclòs ja que estan orientades cap a fora del solc d'unió. B) Comparació del perfil d'especificitat obtingut per la butxaca 9 de diferents al·lels d'HLA-DR. Les butxaques de diferents al·lels que comparteixen els mateixos residus polimòrfics mostren especificitats similars.

HiPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI

En les malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan, com ara les malalties autoimmunitàries de la tiroide, les dianes del dany tissular són les cèl·lules epitelials endocrines del propi teixit. Aquestes cèl·lules, altament diferenciades, sobreexpressen HLA-I i expressen ectòpicament HLA-II.

El treball que es presenta en aquesta tesi es basa en dos resultats previs del nostre laboratori: primer, la presentació d'autoantígens per les molècules d'HLA-II en cèl·lules fol·liculars de la Tiroïde (CFT) és possible, ja que les molècules són estables i per tant estan associades a pèptids (Catalfamo, Serradell et al. 1999); i segon, el repertori de pèptids associats a HLA-DR4 en cèl·lules epitelials neuroendocrines és autòleg, heterogeni i generat a partir de proteïnes de la via endocítica i també citosòlica (Muntasell, Carrascal et al. 2002).

S'ha postulat que les cèl·lules epitelials en les malalties autoimmunitàries podrien presentar autoantígens a les cèl·lules T CD4+ infiltrants, i ser així les responsables de la inducció o del manteniment de la resposta immunitària *in situ*. Així, l'estudi dels autoantígens presentats per les cèl·lules epitelials de la tiroide pot aportar elements importants per arribar a entendre el procés autoimmunitari involucrat. La identificació dels lligands de classe II serà un pas essencial per la caracterització de les cèl·lules T específiques i del seu paper en la patologia.

OBJECTIUS:

Objectiu General: Identificació dels lligands específics de teixit que s'associen a les molècules d'HLA de classe II expressades ectòpicament per les cèl·lules fol·liculars de la tiroide en la malaltia de Graves-Basedow

Objectiu I:

- ▶ Definició del motiu d'ancoratge de l'al·lel HLA-DRB1*0407 i comparació del motiu d'ancoratge de DR407 amb altres variants de DR4
- ▶ Definició del motiu d'ancoratge de l'al·lel HLA-DRB1*0801 en el context de la seva associació amb la malaltia autoimmunitària diabetis mellitus de tipus 1

Objectiu II:

- ▶ Caracterització dels lligands naturals associats a molècules d'HLA-DR en glàndules tiroides afectades per la malaltia de Graves-Basedow. Anàlisi de la seqüència i de la seva capacitat d'unió a HLA-DR

MATERIAL I MÈTODES

1. MATERIAL

Com que l'objectiu d'aquest treball era l'estudi de pèptids presentats per molècules de classe II en cèl·lules epitelials de la tiroide de pacients amb una malaltia autoimmunitària, es necessitava utilitzar glàndules que mantinguessin al màxim la seva estructura. És per aquest motiu que es va decidir utilitzar glàndules afectades per la malaltia de Graves-Basedow (GD), ja que en aquesta malaltia l'estructura fol·licular del teixit es manté íntegra, mentre que en el cas de la tiroïditis de Hashimoto (HT) l'infiltrat acaba ocupant gran part de la glàndula on hi ha una destrucció important del teixit tiroïdal. Així totes les mostres de tiroides i de sang utilitzades en aquest estudi provenen de pacients afectats per la malaltia de Graves–Basedow.

El diagnòstic clínic dels pacients es va fer basant-se en els paràmetres clínics i les dades analítiques habituals. Presència de dos o més dels paràmetres clínics següents: simptomatologia d'hipertiroïdisme (sudoració, nerviosisme, pèrdua de pes), presència de goll difús i oftalmopatia. Les dades analítiques es basaven en la determinació per RIA dels nivells en plasma de T3, T4, T4 lliure i TSH i en la detecció d'autoanticossos tiroïdals sèrics (autoanticossos anti-microsoma (peroxidasa tiroïdal o TPO) i anti-tiroglobulina (Tg)). Els diagnòstics clínics es van confirmar amb l'anàlisi histopatològica de les biòpsies.

Les mostres quirúrgiques de tiroides amb GD es seleccionaven en funció de l'expressió de classe II per les CFTs. Per aquest fi es feien tincions d'immunofluorescència sobre seccions criostàtiques de teixit o s'analitzaven les cèl·lules per citometria de flux (veure punt 3). Les dades de les mostres utilitzades en l'estudi es mostren a la taula 6.

Mostra	Sexe	Edat	Expressió	Pes	HLA classe II
			classe II	mostra	
TB190	F	35	++	1 g	DRB1*1101,1104 DQB1*0301
TB 237	F	41	+	1,1 g	DRB1*1501 DQB1*0602
TB269	F	30	++	2 g	DRB1* 1101,1104 DQB1*0301
TB 270	F	32	+++	3,31 g	DRB1*0701 DQB1*0202,0303
TB448	F	26	++	8 g	DRB1*0407,1501 DQB1*0301,0602
TB449	F	35	++	25,5 g	DRB1*0301,1501 DQB1*0201,0602
TB471	F	28	++	14,8 g	DRB1*0301,0801; DQB1*0201,0402.

Taula 6: Llistat de les mostres de tiroides utilitzades en aquest estudi Els nivells d'expressió d'HLA-II en les cèl·lules fol·liculars de la tiroide es van obtenir per citometria i/o per immunofluorescència. Els valors s'indiquen com es descriu a continuació: +, tinció positiva en <10% dels fol·licles, marcatge focal, ++, entre un 10-50% de fol·licles positius, tinció multifocal; +++, >50% de fol·licles positius, tinció generalitzada. El tipatge d'HLA-II el va dur a terme el Dr. E. Palou (LIRAD, BST, Hospital Germans Trias i Pujol) per seqüenciació de l'exó 2.

2. PROCESSAMENT DEL TEIXIT

2.1. Obtenció de blocs de teixit congelats

Es van tallar peces de teixit d'aproximadament $0,5 \text{ cm}^3$ i es van submergir en isopentà refredat prèviament en un bany d'acetona i gel sec. Els blocs obtinguts es guardaven a -80°C . D'aquests blocs alguns es reservaven per fer seccions criostàtiques i la resta s'utilitzaven per l'aïllament per immunoafinitat dels pèptids presentats per HLA-DR.

2.2. Obtenció de limfòcits infiltrants i cèl·lules fol·liculars tiroïdals

El processament de les glàndules es va realitzar seguint un protocol prèviament descrit (Pujo-Borrell, Hanafusa et al. 1983). Un cop pesat el teixit, després d'eliminar el greix i el teixit conjuntiu, es tallava en daus d'aproximadament 3 mm^3 . Els fragments es rentaven durant 5 min amb medi HBSS (Hank's balanced salt solution; Life Technologies, Gaithersburg, USA) amb un suplement de L-glutamina 2 mM, estreptomicina 0,1 mg/ml i penicil·lina 100 U/ml. A continuació els blocs s'afegien a la solució de digestió que consistia en medi RPMI 1640 (Life Technologies) amb un suplement de tripsina 2,5 mg/ml (Sigma), col·lagenasa 0,2 mg/ml tipus P (act. esp 2,7 U/mg; Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemanya) i DNAsa 0,05 mg/ml (Sigma). La digestió es feia a 37°C en agitació contínua i cada 20 min es recollia el material digerit i s'afegia solució de digestió nova. El procés de digestió es repetia fins que s'aconseguia digerir totalment el teixit. El material digerit obtingut es diluïa amb medi RPMI complet amb un suplement de L-glutamina 2 mM, estreptomicina 0,1mg/ml, penicil·lina 100 U/ml i 10%FCS a 4°C per tal d'inactivar els enzims. Posteriorment es filtrava amb una malla de niló de 500 μm de diàmetre de porus i es feien tres rentats per centrifugació 10 min a 500 g.

La suspensió cel·lular obtinguda, formada principalment per cèl·lules fol·liculars (CFT) i limfòcits infiltrants (ITL), es criopreservava a una concentració aproximada de 5×10^6 cèl·lules per ml en vapors de N_2 líquid en FCS amb 10% DMSO (dimetil sulfòxid). Aquestes cèl·lules s'utilitzaven per fer assajos funcionals.

3. PROTOCOLS DE TINCIÓ

3.1. Tincions de seccions de teixit

A partir dels blocs de teixit congelats es feien seccions de 4 μm de gruix amb un criostat (Frigocut, Reichert-Jung, Heidelberg, Alemanya). Les seccions es disposaven en portaobjectes recoberts de tefló on s'assecaven durant 20 min a TA amb aire sec i es mantenien a -70°C . Abans de començar la tinció, les seccions de teixit s'assecaven 15-20 min a TA.

Tinció: les seccions s'incubaven 30 min a TA amb 50 μl d'anticòs (Ab) primari o Ab monoclonal directament marcat segons els casos, en una cambra humida i fosca. Després de la incubació es feien dos rentats amb PBS + 0,01%BSA de 5 min en un agitador orbital. S'assecava la resta de tampó

evitant la formació de ponts d'anticòs entre les mostres i o bé s'afegia l'Ab secundari (IgG de cabra anti-ratolí, G α M, marcades amb FITC) o bé es muntaven directament les preparacions amb medi de muntatge i es segellaven les preparacions. Les seccions de criostat es van analitzar amb un microscopi Axioplan (Zeiss III, Oberkochen, Alemanya) equipat amb filtres de fluorescència.

3.2. Tincions de cèl·lules en suspensió per citometria

Es ressuspenien unes 10^5 cèl·lules per tub i s'incubaven durant 30 min a 4°C amb 50 μ l d'anticòs primari o anticòs directament marcat (FITC, PE o PerCP) a la dilució adient. Després de la incubació s'eliminava l'excés d'anticòs i les restes cel·lulars amb dues centrifugacions a 500xg durant 5 min. Si la tinció era directa es ressuspenia el pellet amb 300 μ l de PBS i s'analitzava directament amb el citòmetre de flux. Si la tinció era indirecta, les cèl·lules es ressuspenien amb 50 μ l d'anticòs secundari i s'incubaven 30 min a 4°C a la foscor. Passat aquest temps es feien dos rentats i es ressuspenien en 300 μ l de PBS. L'adquisició i anàlisi de les cèl·lules es van realitzar en un citòmetre de flux FACScan utilitzant el software Cellquest (Becton Dickinson, San José, USA).

4. PROCESSAMENT DE LES MOSTRES DE SANG PERIFÈRICA

D'alguns dels pacients es van obtenir dues mostres de sang perifèrica en el moment de la intervenció o poques hores després, una per recuperar el sèrum i l'altre per obtenir els limfòcits de sang perifèrica.

4.1. Obtenció dels limfòcits de sang perifèrica o PBL

Es recollien 20-50 ml de sang perifèrica en un tub estèril amb heparina sòdica. Es feia una dilució amb un volum igual de sèrum fisiològic o PBS i es separaven els limfòcits per gradient de densitat amb Ficoll, centrifugant 30 min a 600 g a temperatura ambient (TA). Les cèl·lules recuperades de la interfase es rentaven dues vegades amb medi RPMI complet i es criopreservaven amb una solució de FCS i 10% DMSO.

5. EXTRACCIÓ DE DNA

Per determinar el tipatge d'HLA-II de les mostres de tiroides i d'algunes línees cel·lulars es va extreure el DNA genòmic.

L'extracció de DNA de les mostres de tiroides es va fer o bé a partir de teixit fent seccions amb el criostat d'unes 20 micres, a partir de cèl·lules sanguínies o de cèl·lules en suspensió de línies cel·lulars.

Les cèl·lules o el teixit s'incubava durant 1h a 56°C amb la solució d'extracció de DNA (0,1 M NaCl, 0,01 M TrisHCl, 0,025 M EDTA, 0,5%SDS) on s'hi afegia a l'últim moment proteïnasa K (50 μ g/ml, 12 U/mg). Després d'aquesta hora s'afegia el mateix volum de fenol/cloroform/isoamil-alcohol i es

barrejava per inversió, es centrifugava a 14000 rpm durant 4 minuts i es recuperava la fase superior, posteriorment es feia el mateix amb cloroform i un cop recuperada la fase de dalt es passava a un tub net. El pas següent era la precipitació del DNA: s'afegia un 10% del volum d'acetat sòdic 3 M i un volum d'isopropanol i es barrejava per inversió, un cop s'observava la xarxa de DNA, aquesta es passava a un tub net amb l'ajuda d'una punta de pipeta, es rentava el DNA dues vegades amb etanol fred al 70% i després de l'últim rentat es deixava assecar el pellet. Un cop sec es dissolia el DNA amb uns 30 µl d'aigua.

6. ELUCIÓ DELS LLIGANDS NATURALS DE MHC DE CLASSE II DE TIROIDES DE PACIENTS AMB LA MALATIA DE GRAVES-BASEDOW

L'aïllament de pèptids a partir de blocs de teixit tiroïdal autoimmune es va fer mitjançant cromatografia d'afinitat, elució àcida i ultrafiltració. Posteriorment les fraccions peptídiques es fraccionaven per cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa i a continuació s'analitzaven per espectrometria de masses en el laboratori del Dr. Joaquin Abián, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona.

El protocol que es va utilitzar per la purificació i fraccionament dels pèptids va ser semblant al que es feia servir en el nostre laboratori per les línies en cultiu (Muntasell, Carrascal et al. 2002; Muntasell, Carrascal et al. 2004) però amb algunes modificacions.

6.1. Construcció de les columnes per la cromatografia d'afinitat

Per purificar les molècules d'HLA-DR del teixit tiroïdal es va utilitzar columnes de sefarosa acoblades a l'anticòs L243 de ratolí (IgG2a). Aquest Ab reconeix un epítop monomòrfic d'HLA-DR depenent de la formació del dímer α/β (Lampson and Levy 1980). Per la mostra de tiroides TB449 es va utilitzar també una columna d'immunoafinitat amb l'anticòs de ratolí B8.11.2 (IgG2b), específic per DR β , ja que l'afinitat del L243 per l'HLA-DR3 és baixa. Aquest anticòs va ser cedit pel Dr F. Koning del departament d'Immunohematologia, Leiden University, The Netherlands.

6.1.1 Producció dels anticossos L243 i B8.11.2

L'hibridoma HB55, productor de l'anticòs L243 i el B8.11.2, es van créixer amb medi RPMI al 10% FCS a 37°C i 5% CO₂. Les cèl·lules es creixien fins a obtenir un volum de 500 ml per flascó i quan aproximadament el 80% de les cèl·lules havien mort es centrifugaven a 600xg durant 6 minuts per eliminar les restes cel·lulars i les cèl·lules restants. A continuació el sobrenedant es filtrava amb un filtre de millipore de 0,45 µm i es guardava a -20°C fins el moment de la purificació.

També es va utilitzar l'anticòs L243 a partir d'ascitis de ratolí injectat amb l'hibridoma HB55 (cedit per la Dr.Gema Ruiz del departament de Microbiologia de la Facultat de Farmàcia de la Universitat Complutense de Madrid). En aquest cas es centrifugava el líquid ascític a 2700 rpm durant 10' a 4°C, es recuperava el sobrenedant, es centrifugava a 12000 rpm durant 20' a 4°C, es recollia el

sobrenedant i es diluïa amb un volum igual de PBS, a continuació es filtrava amb un filtre de millipore de 0,45 µm i es guardava a -20°C fins el moment de la purificació.

6.1.2 *Purificació dels anticossos monoclonal L243 i B8.11.2*

Per la purificació dels anticossos s'utilitzaven columnes de proteïna A sefarosa (Protein A SepharoseTM 4 Fast Flow, Amersham Biosciences) o columnes HiTrap (HiTrapTM Protein G HP, Amersham Biosciences). El sobrenedant es diluïa amb la mateixa quantitat de tampó d'acoblament (tampó fosfat 0,1 M pH 7,0). Es feia passar el sobrenedant o el líquid ascític per la columna a 4°C, un cop passat es feia un rentat amb 30 ml de tampó fosfat i s'eluïa l'anticòs amb 3-5 volums de columna d'àcid cítric 0,1 M pH 3,0. Es recollien alíquotes d'1 ml controlant el moment en el que el pH de l'eluït de la columna virava a àcid. Aquestes fraccions es neutralitzaven amb TrisHCl 1,5 M pH 8 i aquelles que presentaven una DO a $\lambda=280$ nm entre 1,5 i 3 s'agrupaven. Per regenerar la columna es feia un rentat amb tampó fosfat 0,1 M pH 7,0 i es guardava en tampó d'acoblament amb 0,05% d'azida sòdica per evitar contaminacions o amb etanol al 20%.

Per eliminar els grups amino del tampó TRIS, que evitarien la unió de l'anticòs a la sefarosa, es dialitzaven l'anticòs en front del tampó d'acoblament (NaHCO₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3). Posteriorment es determinava la concentració de l'Ab amb el mètode BCA (Pierce), es mirava la integritat d'aquest amb un gel de SDS-PAGE i es comprovava la seva funcionalitat biològica per citometria de flux sobre cèl·lules HLA-DR positives. Un cop fetes totes les comprovacions es guardava a -20°C fins el moment de construir la columna.

6.1.3 *Acoblament covalent d'anticossos a boles de sefarosa activades*

Per construir les columnes d'afinitat es va utilitzar sefarosa CL-4B activada per CNBr (CNBr-activated sepharoseTM 4B, Amersham Biosciences). Per les primers mostres (TB190, TB237 i TB269) es van construir columnes de 5 ml amb una concentració d'anticòs d'1 mg/ml i per les últimes mostres (TB270, TB448 i TB449) es va utilitzar columnes d'1 ml amb 5 mg/ml d'anticòs. Es pesaven les boles de sefarosa necessàries en cada cas i es ressuspenien en HCl 1 mM, desfent els possibles agregats que s'haguessin pogut formar. El volum total de les boles hidratades era de 5 ml o d'1 ml en cada cas. Les boles es netejaven en un filtre de vidre (Glassfilter 3, Duran R Schott, Mainz, Alemanya) amb HCl 1 mM durant uns 20 minuts, a continuació es ressuspenien amb tampó d'acoblament (NaHCO₃ 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3) i es centrifugaven 2 minuts a 500xg. S'eliminava el sobrenedant i es ressuspenien les boles amb la solució d'immunoglobulines que anteriorment s'havia dialitzat i que teníem en solució amb tampó d'acoblament. S'incubava la barreja durant 4 hores a TA en rotació. Un cop passades les quatre hores es centrifugaven les boles i per comprovar que l'anticòs s'havia unit, es mirava la concentració proteica del sobrenedant mesurant l'absorbància a 280nm. Es rentaven tres vegades les boles amb tampó de bloqueig (TrisHCl 0,1 M pH 8) i s'incubaven durant 2 hores en rotació a TA, amb aquest mateix tampó, per bloquejar els possibles llocs d'unió de la sefarosa que podrien haver quedat

lliures. Es rentaven amb el filtre de vidre amb 30 ml de tampó de rentat pH 4 (NaAC 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4) i tot seguit amb tampó de rentat pH 8 (TrisHCl 0,1 M, NaCl 0,5M) i aquest procés es repetia tres cops més. Les boles de sefarosa acoblades covalentment a l'anticòs es guardaven a 4°C amb tampó de rentat a pH 8 amb 0,02% d'azida sòdica fins a la seva utilització.

6.2. Elució de pèptids a partir de blocs de teixit congelat

A la figura 14 es mostra esquematitzat el protocol que es va seguir per aïllar i seqüenciar els pèptids associats a molècules de DR de tiroides de pacients afectats per la malaltia de Graves-Basedow

Es partia de blocs congelats de tiroide obtinguts tal com s'indica en el punt 2.1. Per disgregar el teixit s'utilitzava un homogenitzador a 800 rpm. Per cada dos blocs de teixit s'afegien 2 ml de tampó d'homogenització (50 Mm TrisHCl ph 7,6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Pepsatina, Iodoacetamida). Durant el procés es mantenia el tub en gel per evitar augments de temperatura. S'ultracentrifugava per recuperar les membranes a 25000 rpm 20 minuts a 4°C. Per solubilitzar les proteïnes de membrana es ressuspensia el botó cel·lular amb tampó de lisi (50Mm TrisHCl ph 7,6, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinina, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Pepsatina, Iodoacetamida, 0,5% Nonidet P40 (Surfact-Amps NP40)) i es passava tot a un vas de precipitats, on es deixava lisant durant 2 hores a 4°C amb agitació (en un volum final de 20-30 ml). Un cop les cèl·lules s'havien lisat es centrifugava a 2500 rpm, 10 min a 4°C per eliminar les restes cel·lulars i posteriorment s'ultracentrifugava a 25000 rpm, 1h 4°C.

Per eliminar les possibles unions inespecífiques entre el lisat i la sefarosa de la columna, s'incubava el lisat amb boles de sefarosa activades (Sephacrose® CL-4B, Pharmacia Biotech) durant 3h a 4°C en rotació (1 ml de boles per cada 5 ml de lisat). Un cop transcorregut el temps d'incubació s'eliminaven les boles de sefarosa per centrifugació, i el lisat s'incubava durant tota la nit a 4°C en rotació amb les boles de sefarosa unides a l'anticòs anti-DR. L'endemà s'empaquetava la columna deixant que les boles es dipositessin per gravetat i el lisat es tornava a passar dues vegades per la columna.

Un cop passat el lisat es feien tres rentats: el primer, el més agressiu (ja que contenia detergent), es feia amb 50 ml tampó de lisi sense inhibidors de proteases, el segon amb 200 ml de tampó de rentat (50 Mm TrisHCl ph 7,6, 150 mM NaCl), aquest rentat es feia per eliminar el detergent que després podria donar problemes en el MALDI, i l'últim rentat es realitzava amb 200 ml de TrisHCl 5 mM pH 7,6, per reduir la concentració de sals. En les dues primeres mostres que es van analitzar (TB190 i TB269) els volums dels tampons de rentat van ser de 15 ml, 80 ml i 40 ml per cadascun dels tampons però es va variar el protocol per millorar la qualitat de la mostra.

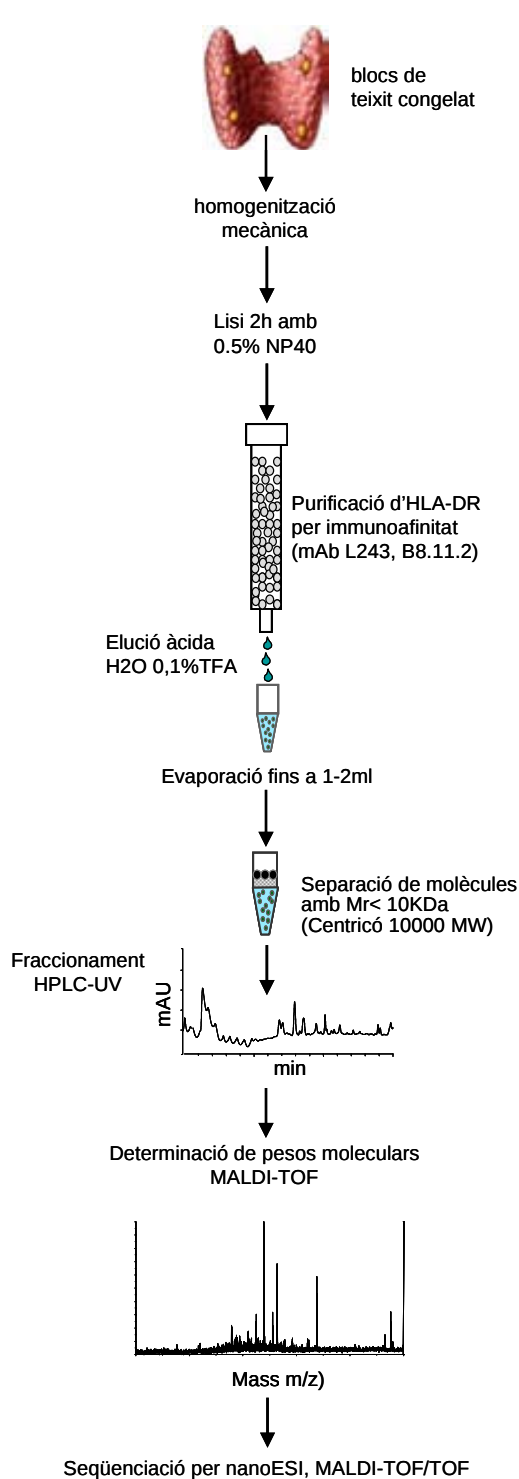


Figura 14: Protocol de purificació i identificació de pèptids associats a HLA-DR en teixit tiroïdal

L'elució de les molècules de MHC de classe II es feia amb 10 ml d'àcid trifluoroacètic (TFA) 0,1% (Sigma). Es recollien fraccions d'1 ml fins que el pH de l'eluït tornava a ser bàsic, la qual cosa indicava que ja estava sortint el tampó de rentat. Les fraccions recollides es posaven ràpidament en gel. Es passaven uns 20 ml de tampó de rentat per tornar a equilibrar la columna i es guardava a 4°C amb azida sòdica al 0,02%. Les fraccions amb pH àcid (entre 2-4) s'evaporaven fins a un volum total de 1-2 ml amb un evaporador/concentrador (Savant, Holbrook, NY) i un cop es tenia aquest volum es filtrava amb un Centricó 10 (Centriprep 10, Millipore Laboratories, Bedford, MA, USA) per eliminar les molècules de pes superior a 10000 Da. Les cadenes α i β de les molècules d'HLA-DR quedaven retingudes en el filtre mentre que els pèptids es recuperaven en la fracció filtrada. Els filtrats es concentraven fins a 500 μ l que era el volum que carregàvem al bucle d'injecció de l'HPLC. La fracció retinguda es recuperava i es guardava a -80°C pel seu anàlisi.

Tot el material de vidre i plàstic que es feia servir durant tots els passos es rentava abans del seu ús amb aigua destil·lada, aigua miliQ i per últim amb metanol i en cap cas s'utilitzava material autoclavat.

7. ELUCIÓ DELS PÈPTIDS ASSOCIATS A HLA-DR DE LÍNEES CEL·LULARS

Es va partir de 10^9 cèl·lules de les línies cel·lulars homozigotes per HLA-DR JHAF (DRB1*0407) i FN-86 (DRB1*0801), la descripció de les quals es troba en el punt 14.

El protocol d'elució utilitzat era el mateix que per les tiroïdes amb excepció del primer pas d'homogenització, que al partir de cèl·lules no s'havia de realitzar, i directament es ressuspenien els pellets secs amb el tampó de lisat i es deixava 2 hores amb agitació a 4°C.

L'anàlisi d'aquestes mostres es va fer per LC- μ ESIMS/MS capil·lar. Un cop evaporat l'eluït del centricó, es dessalava la mostra amb unes columnes SPE C18, i posteriorment s'evaporaven i es ressuspenien amb 40 μ l d'àcid fòrmic al 1%.

7.1. Protocol de dessalat amb cartutxos SPE C18

S'equilibraven les columnes amb 3ml d' $\text{H}_2\text{O}/\text{AcN}$ 1:1 tres vegades, i posteriorment tres cops amb 0,1%TFA en H_2O miliQ. La mostra es carregava diluïda en 1,8 ml de 1%TFA en H_2O miliQ. Es feien tres rentats de la columna amb 2 ml 0,1% TFA H_2O miliQ i tres amb 3 ml H_2O miliQ. Per eluir els pèptids s'afegia 1 ml 60%Acn 40% H_2O miliQ.

8. FRACCIONAMENT DE L'EXTRACTE PEPTÍDIC PER CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ EN FASE REVERSA (RP-HPLC)

En la rp-HPLC, la retenció d'un compost és deguda a fenòmens d'adsorció de la substància a la superfície d'una fase estacionària apolar. La fase estacionària està formada per un gel porós de silici on s'ha unit químicament cadenes carbonades C18. Aquesta tècnica es basa en la separació dels compostos en funció de les seves característiques d'hidrofobicitat.

Les solucions utilitzades van ser: solució A: $\text{H}_2\text{O}+0,05\%\text{TFA}$ i solució B: $\text{AcN}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20)+0,05%TFA. La separació dels pèptids s'aconseguia sotmetent la columna a un gradient lineal creixent d'acetonitril fins arribar al 90% de l'eluent B. La mostra (500 μ l) s'injectava en fase A i es feia un gradient amb un augment d'acetonitril de un 1% d'acetonitril/minut. En el moment en que un pèptid tenia la mateixa hidrofobicitat que el gradient passava de la fase estacionària a la mòbil i sortia de la columna. Un espectrofotòmetre acoblat a la sortida de la columna permetia la detecció dels pèptids mesurant l'absorbància a 214 nm i es visualitzava en forma de pic.

Pel fraccionament dels pèptids es va utilitzar un sistema cromatogràfic HP1100 (Agilent Technologies, Barcelona) format per una bomba binària, un desgasificador de membrana, un detector d'ultraviolat amb una cel·la per microcromatografia i un injector manual amb un bucle d'injecció de 500 μ l. La separació es va realitzar amb una columna Vydac Protein & Peptide C-18 de 25 cm de longitud i 2,1 mm de diàmetre intern precedida per una precolumna ODS d'1 cm x 2 mm (Upchurch, Tecknokroma, Barcelona). El flux de treball va ser de 200 μ l/min i el gradient utilitzat (especificat a la taula 7) va ser el següent: 15 min de rentat a 0% de B, gradient lineal de 75 min de 0 a 60% de B i una pujada en 15 min fins a 90% de B.

El protocol estandarditzat consistia en recollir 80 fraccions, des del minut 20 fins el 100, una fracció cada minut. Aquestes fraccions s'evaporaven completament amb un evaporador/concentrador i després es ressuspenien amb 5 μ l de metanol/ H_2O (1:1) 1% àcid acètic pel seu posterior estudi per MS (d'aquests 5 μ l: 0,5 μ l s'utilitzaven pel MALDI i la resta pel LCQ).

Pas	Temps	%B	Flux
1	0	0	0,2 ml/min
2	15	0	0,2 ml/min
3	75	60	0,2 ml/min
4	90	90	0,2 ml/min
5	95	90	0,2 ml/min
6	100	0	0,2 ml/min

Taula 7: Protocol de separació d'HPLC. Per les mostres de tiroides TB448, TB449 i TB471 es va fer un rentat inicial més llarg de 30 min a 0% de B

Per posar a punt la tècnica, amb les primeres mostres de tiroides de les quals teníem molts pocs grams de teixit, es van recollir menys de 80 fraccions (TB190, 37 fraccions, 1 fracció/2 min; TB269, 18 fraccions 1 fracció/5 min. i TB237 i TB270, 26 fraccions 1 fracció/3 minuts).

9. IDENTIFICACIÓ PER ESPECTROMETRIA DE MASSES DELS REPERTORIS PEPTIDICS ASSOCIATS A MHC II

L'anàlisi de les masses de les espècies moleculars de les diferents fraccions i la seqüenciació d'aquestes es va realitzar per tècniques d'espectrometria de masses.

En les tècniques d'espectrometria de masses, la massa de les molècules es mesura en funció de la relació massa-càrrega (m/z). La mesura dels pesos es fa basant-se en la producció, separació i detecció dels ions moleculars.

L'anàlisi per MALDI-TOF, vMALDI, nESI-ITIMS/MS i LC- μ ESIMS/MS capil·lar es va dur a terme en el laboratori de proteòmica de l'IIBB-IDIBAPS, CSIC, UAB. L'anàlisi per MALDI-TOF/TOF es realitzà a la plataforma de proteòmica del Parc Científic de la UB.

9.1. MALDI-TOF; anàlisi de la composició peptídica de les fraccions d'HPLC

El MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight) es va utilitzar per la caracterització dels components peptídics de les fraccions obtingudes per HPLC. Aquesta tècnica es va fer servir per les mostres de tiroides TB190, TB237, TB269, TB270 i TB448.

L'instrument utilitzat va ser un Voyager-DETMPRO Biospectrometry Workstation (Applied Biosystems) en mode reflectró positiu, calibrat externament amb una barreja estàndard de 5 pèptids (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)). En una placa de 96 x 2 pouets es carregaven 0,5 μ l de la mostra i 0,5 μ l de matriu (Àcid α -ciano-4hidroxicinàmic (CHCA) a 3 mg/ml dissolta en AcN/ H₂O(1:1) 0,1%TFA) i es deixava assecar abans d'analitzar-la. Les mostres es van

analitzar en mode automàtic amb una intensitat fixada del làser i fent un promig dels espectres obtinguts a partir de 1000 trets en el rang de m/z de 400 a 8000.

9.2. MALDI-TOF/TOF; anàlisi de la composició peptídica i seqüenciació dels 4 pics majoritaris de les fraccions d'HPLC

Es va utilitzar aquesta tècnica per les mostres de tiroides TB448, TB449 i TB471. Aquesta metodologia ens permetia no només caracteritzar les espècies peptídiques de cada una de les fraccions d'HPLC sinó també determinar la seqüència dels 4 pics majoritaris dins la fracció.

L'espectròmetre de masses utilitzat va ser un model AB4700 (Applied Biosystems, Barcelona) treballant en mode reflectró positiu. Es van carregar a la placa 0,4 μ l de mostra i 0,4 μ l de matriu de la mateixa manera que en l'anàlisi per MALDI-TOF. L'instrument es va programar per realitzar un espectre de mostreig complet en el rang de m/z de 900 a 6000 seguits de 4 espectres de MS/MS (*CID on*) de les 4 senyals més abundants a la zona de m/z 1100-3500 de l'espectre de mostreig complet. Posteriorment es van seleccionar ions intensos no fragmentats en el mode automàtic i es van obtenir els espectres de MS/MS de forma manual.

Els anàlisis es van realitzar en mode automàtic utilitzant un valor de làser de 6000 pels espectres de MS i de 7200 pels de MS/MS. Es va fer el promig de 1000 dispars en els espectres de MS i 1500 en els de MS/MS. Pels experiments de MS/MS es va utilitzar una energia de col·lisió de 1 kV i com a gas de col·lisió aire a una pressió de $2-3 \times 10^{-7}$ torr. Els espectres es van calibrar externament utilitzant la mateixa barreja de pèptids que en l'anàlisi per MALDI-TOF.

9.3. vMALDI; seqüenciació dels pèptids de les fraccions d'HPLC

Les fraccions de la mostra TB471 també es van analitzar per vMALDI-MS/MS. Aquesta metodologia ens permetia obtenir seqüències dels pèptids de les diferents fraccions de manera molt ràpida ja que és un sistema molt automatitzable.

Es va utilitzar un sistema FinniganTM vMALDI (Thermo) que utilitza un font de ionització vMALDI unit a un detector Finnigan LTQ MS. Es carregaven 0,5 μ l de cada mostra i es punxaven de manera automàtica en el mode CPS. Els paràmetres ASF es van restringir en el rang de 1200-2500, s'adquirien 5 MS/MS per cada full MS i es va establir un sistema d'exclusió dinàmic de 1.

9.4. nESI-ITIMS/MS; seqüenciació dels pèptids de les fraccions d'HPLC

Aquesta tècnica es va emprar per determinar la seqüència dels pèptids de les fraccions d'HPLC de totes les mostres de tiroides. La seqüenciació es va realitzar utilitzant un espectròmetre de trampa iònica (LCQ, Thermo-Instruments, Barcelona) equipat amb una font de ionització per nanoesprai de (Protana, Odense, Dinamarca). Els paràmetres de l'instrument es van ajustar utilitzant una barreja de 5 pèptids estàndard: Angiotensina I (1296 Da), substància P (2149 Da) i tres pèptids sintètics de pesos

moleculars 1758, 1911 i 2149 Da. El voltatge aplicat va ser de 0,8 kV i la temperatura del capil·lar s'ajustava a 110°C. L'amplada de la finestra d'adquisició de l'ió precursor era de 3 unitats en els experiments de MS/MS i de 4 en els de MS³. Les energies de col·lisió es van ajustar per cada un dels ions fragmentats en funció de la càrrega de l'ió precursor, així pels ions precursors bicarregats s'utilitzava una energia de col·lisió del 30% i pels monocarregats del 35%.

La informació obtinguda per cada pèptid incloïa un espectre de rastreig complet, un d'alta resolució (ZoomScan) i un de fragmentació (MS/MS). L'espectre de rastreig complet permetia la detecció de senyals corresponents a pèptids presents a la mostra, el d'alta resolució permetia detectar amb precisió el valor de m/z i l'estat de càrrega de cada un dels ions a fragmentar i finalment l'espectre de MS/MS concentrava l'ió que estàvem analitzant, deixant escapar la resta d'ions, i posteriorment el trencava i els fragments eren detectats pels detectors, aquest espectre servia per identificar la seqüència dels pèptids seleccionats.

Mentre que en el MALDI els ions dels analits que es formen són normalment monocarregats, la ionització per ESI produeix majoritàriament ions doblement carregats, així els diferents pics dels isòtops es diferencien en 0,5 unitats de massa. També s'obtenien tot i que en menor quantitat pics amb càrrega +3, on els diferents pics isotòpics es diferencien en 0,3 unitats de massa. El grau de càrrega d'un determinat ió depèn de la seva estructura (presència de grups bàsics o àcids), en el cas d'un pèptid el número de càrregues de cada ió està directament relacionat amb el número de residus bàsics de la molècula (Arg, Lis, Hi Pro i el grup amino terminal). Com que al augmentar la mida dels pèptids també augmenta el número de residus capaços d'adquirir càrrega, la relació massa/càrrega dels ions produïts sempre sol estar en el rang de 700 a 2000 Da, de forma gairebé independent de la massa.

Els precursors iònics que es fraccionaven es seleccionaven en funció de les dades de pes molecular obtingudes dels espectres del MALDI-TOF, tenint en compte que els corresponents ions apareixerien com a ions doble o triplement carregats en els espectres de nESI. També es fragmentaven aquells ions detectats a l'espectre de rastreig complet obtinguts per nESI-ITIMS/MS encara que no s'haguessin pogut detectar a l'espectre de MALDI-TOF.

9.5. LC- μ ESIMS/MS capil·lar o MDLC- μ ESIMS/MS

Les mostres JHAF i FN-86 es van analitzar per LC- μ ESIMS/MS i MDLC- μ ESIMS/MS respectivament. Per la mostra FN-86 (DRB1*0801), es va usar un sistema multidimensional per resoldre millor els pèptids i obtenir un major nombre de seqüències.

El sistema tàndem líquid masses consistia en un sistema *online* format per una trampa iònica LTQ i una font d'ionització microESI (ThermoFisher, San Jose, CA). Per la separació peptídica s'usava un sistema d'HPLC Agilent 1200 format per una bomba capil·lar, una bomba binària, un microinjector termostàtic i una vàlvula *microswitch*. Les mostres dessalades s'evaporaven fins a 5 μ l, es diluïen amb

40 µl d'àcid fòrmic a 1% i es carregaven en el sistema cromatogràfic, que consistia en una precolumna de concentració (Agilent Technologies, Barcelona, Spain), connectada a una columna C18 de 10 cm de llarg i 150 µm de diàmetre intern (Vydac, IL, USA). La separació es feia a un flux d'1 µl/min en un gradient d'acetonitril de 30 minuts, des de 0 a 40% (solvent A: 0,1% àcid fòrmic, solvent B: acetonitril 0,1% àcid fòrmic). Pel sistema multidimensional es va fer servir un columna d'intercanvi iònic Zorbax Bio-SCX II (3,5 µm, 35 x 3 mm) per la primera dimensió. Els pèptids absorbits s'el·luïen usant 7 salts de sal de 0, 10, 25, 50, 100, 500 i 2000 mM d'acetat d'amoni. Abans de la segona dimensió LC s'usava un cartutx Zorbax 300SB-C18 (5 µm, 5x0,3 mm, Agilent Technologies, Barcelona, Spain) per concentrar i dessalar cada fracció peptídica. El LTQ funcionava amb el mode de ió positiu, amb un voltatge de l'esprai de 2 kV. El rang de masses de cada full MS era de 400-2000 m/z. L'anàlisi espectromètric es va fer en mode automàtic, adquirint un full scan i 8 MS/MS de les senyals més abundants. Per evitar la selecció d'ions precursors redundants es va establir una exclusió dinàmica d'1.

10. EINES BIOINFORMÀTIQUES

10.1. Seqüenciació i identificació dels espectres obtinguts

En els anàlisis de MALDI-TOF/TOF la identificació de les seqüències a partir dels espectres de fragmentació es va fer amb el programa MASCOT. Per fer les cerques no es va restringir la mida de la proteïna, ni es va utilitzar cap restricció enzimàtica, les cisteïnes es van considerar sense modificar i es van tenir en compte modificacions com la oxidació de les metionines i la acetilació dels extrems N-terminals. Les cerques es van fer dins el grup taxonòmic dels mamífers.

Per la identificació dels pèptids a partir dels espectres de fragmentació obtinguts per nESI-ITIMS/MS es va fer servir el programa Ms-Tag inclòs en el software Protein Prospector (UCSF Mass Spectrometry Facility, University of California). Es van fer servir els mateixos paràmetres que en l'anàlisi per MALDI-TOF/TOF, fent una segona cerca sense restringir el grup taxonòmic en cas de no trobar cap possible candidat en la primera.

Per identificar les proteïnes a partir dels espectres de MS/MS del vMALDI-MS/MS i del LTQ es van utilitzar els softwares SEQUEST (Bioworks v3.3, ThermoFisher, San Jose, CA) i Peaks fent servir els paràmetres anteriorment descrits per les altres tècniques. El programa SEQUEST utilitza els espectres obtinguts per MS en tàndem per identificar proteïnes, correlacionant les dades de MS/MS dels pèptids amb els patrons de fragmentació *in silico* predits a les bases de dades. Un cop obtingudes les seqüències, per evitar falsos positius, es comparava manualment l'espectre de fragmentació teòric de la seqüència amb millor puntuació amb l'espectre de fragmentació experimental.

El paquet d'anàlisis de dades PEAKS, utilitza un algorisme per fer seqüenciació *de novo* a partir dels espectres de MS. Determina les seqüències peptídiques basant-se en el patró de fragmentació sense referir-se a les bases de dades de seqüències. El programa també conté un algorisme per fer cerques

a les bases de dades per identificar els pèptids, aquest usa la seqüenciació *de novo* i l'espectre de fragmentació.

Per validar les identifikacions dels espectres del LTQ es va usar un sistema *target/decoy*, tal i com s'havia descrit anteriorment (Carrascal, Ovelleiro et al. 2008). Es van fer les cerques amb el SEQUEST utilitzant una base de dades humana combinada *target/decoy*. La base de dades *target* és la base de dades on s'espera trobar les proteïnes origen del pèptid identificat, en aquest cas vam utilitzar les bases de dades de proteïnes humanes Swiss-Prot i Trembl, sense digestió enzimàtica. La base de dades *decoy* es va construir invertint les seqüències de les bases de dades Swiss-Prot i Trembl. Aquesta estratègia *target/decoy* es basa en el principi de que les identifikacions incorrectes tenen la mateixa probabilitat de trobar-se a la base de dades *target* com a la *decoy* (Elias, Haas et al. 2005; Elias and Gygi 2007), mentre que els espectres assignats correctament donaran valors elevats amb la seva seqüència corresponent de la base de dades *target* però no amb la base de dades *decoy*. Els paràmetres de cerca van ser els següents: una tolerància de 2 Da per la massa peptídica i de 0.8 Da pels fragments, cap restricció enzimàtica i com a possibles modificacions dinàmiques, metionines oxidades (+16 Da). Les cerques es feien amb una càrrega màxima de +3 per l'ió precursor. Les identifikacions es van valorar usant els paràmetres Xcorr del SEQUEST i el valor D, calculat tal i com es descriu (Keller, Nesvizhskii et al. 2002; Carrascal, Ovelleiro et al. 2008). Xcorr: (cross-correlation score) correlació del pèptid candidat amb l'arxiu aportat com a resultat, com més gran és el valor millor és la identificació. Es representaven en una gràfica els valors de Xcorr en vers el valor D per tots els espectres identificats. Les identifikacions correctes eren aquelles amb valors inclosos dins l'àrea que descriu un rang de falsedat (FDR: false discovery rate) menor de l'1% (Figura 15).

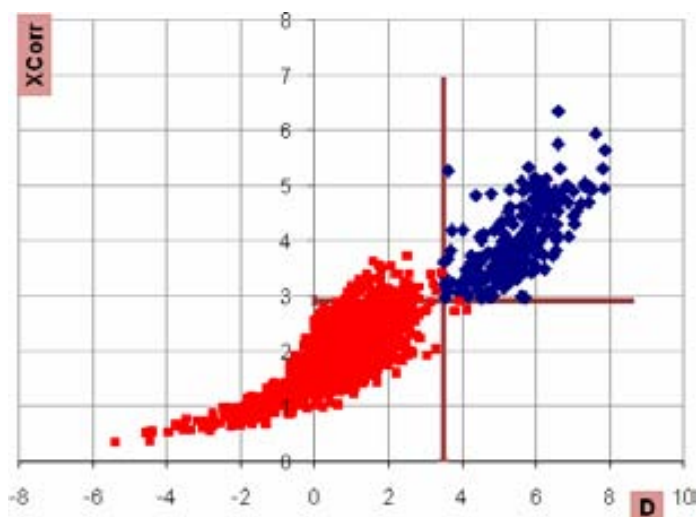


Figura 15: Valor D vers Xcorr. En vermell les identifikacions a la base de dades *decoy* i en blau a la *target*. La línia marró delimita l'àrea que descriu un rang de falsedat menor de 1%

10.2. Bases de dades

Les bases de dades que es van emprar van ser bases de dades de proteïnes com NCBItr, Genpept (National Center for Biotechnology Information, WA) i SwissProt (European Bioinformatics Institute, Heidelberg, Germany).

10.3. Càlcul de l'afinitat teòrica dels pèptids amb les molècules d'HLA-II corresponents

L'afinitat teòrica dels pèptids obtinguts amb les molècules de DR de cada tiroides es van calcular amb el programa ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>). Aquest programa prediu els índex d'afinitat teòrics utilitzant matrius quantitatives publicades per Sturniolo (Sturniolo, Bono et al. 1999). El mateix programa es va utilitzar per l'anàlisi de la promiscuïtat dels pèptids, fent una relació entre els al·lels d'HLA-DR pels quals el pèptid tenia capacitat teòrica d'unir-se, entre el total d'al·lels disponibles en el programa (Singh and Raghava 2001).

10.4. Motius d'ancoratge dels al·lels d'HLA-DR

Pels al·lels de DR dels quals no hi havia matriu descrita en el programa informàtic ProPred, per estudiar la possible associació dels pèptids amb aquests es mirava el motiu d'ancoratge descrit a la base de dades SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>) (Rammensee, Bachmann et al. 1999). En aquesta base de dades només hi ha introduïdes seqüències confirmades, d'aquesta manera s'asseguren que només es llisten els lligands naturals rellevants per la molècula de MHC.

11. DEFINICIÓ DE MOTIUS D'ANCORATGE D'HLA-DR A PARTIR DE LLIGANDS NATURALS

Per determinar els motius d'ancoratge dels al·lels DRB1*0407 i DRB1*0801 un cop es tenien totes les seqüències peptídiques validades es seleccionaven les seqüències úniques i s'establí la seqüència comú de cada família peptídica, per tal de no esbiaixar els resultats degut a la presència de gran nombre de pèptids en famílies peptídiques (nested sets). Aquestes seqüències seleccionades eren les que s'utilitzaven per identificar els nonàmers que formaven els *cores* i generar les matrius de freqüència de cada aminoàcid a cadascuna de les 9 posicions dels *cores*.

Per determinar els *cores* dins de cada seqüència es va fer un programa *ad hoc*. Aquest programa, **motifs v9**, va ser creat pel Dr Joaquin Abián, de la Unitat de proteòmica CSIC-UAB i està disponible a la web (<http://code.google.com/p/mhc-laia-motifs/>) (Figura 16). El programa permet identificar dins de cada seqüència tots els nonàmers que podien constituir el *core*, fixant els residus permesos en P1. A partir de la llista de possibles *cores*, es genera una matriu de freqüències de cada aa a cadascuna de les 9 posicions, que després es corregeix generant una segona matriu normalitzant les freqüències respecte a la freqüència de cadascun dels aa en el proteoma humà (<http://www.ebi.ac.uk/integr8/StatsAminoPage.do?orgProteomeId=25>). Una vegada s'havia obtingut aquesta matriu, s'anaven limitant el nombre de *cores* fixant característiques específiques de cada al·lel.

D'aquesta manera s'escollien els *cores* més probables de cada pèptid i la matriu final s'obtenia a partir d'un sol *core* per seqüència.

Una descripció més detallada dels passos realitzats per determinar els motius d'ancoratge concrets pels al·lels DR407 i DR8, es troba a la secció de resultats 1.



Figura 16: Programa Motifs v0.9. Definint els possibles P1 (anchor aa) i la mida, el programa selecciona els possibles cores dins un grup de seqüències. El programa també permet definir un segon residu d'ancoratge en una altra posició

11.1. Anàlisi estadística

Un cop teníem la matriu final, generada amb un sol *core* per seqüència, amb els percentatges de cada aminoàcid per cadascuna de les 9 posicions es realitzava un tests estadístic tal i com s'havia descrit prèviament (Lopez de Castro, Alvarez et al. 2004). La freqüència de cada aminoàcid es normalitzava respecte la freqüència mitja de l'aminoàcid dins el proteoma utilitzant una distribució Xi-quadrat i fent una correcció de Yates. Després s'aplicava la correcció de Bonferroni (valor $P \times 20$). Valors de P menors de 0,01 després i abans de la correcció de Bonferroni eren considerats significatius.

12. GELS DE PROTEINES I WESTERN BLOTS

Per comprovar que teníem suficient material per poder seqüenciar els pèptids es feien gels de proteïnes dels retintuts del centricó i en alguns casos western blots revelats amb DA6 (Ab anti-cadena α del MHC-II).

Els gels de proteïnes es feien al 12% de poliacrilamida i després es tenyien amb blau de coomassie. Per fer els western blots es feia un gel de poliacrilamida com l'anterior per separar les proteïnes i posteriorment es transferien a una membrana de nitrocel·lulosa aplicant un camp elèctric perpendicular. Un cop teníem les proteïnes a la membrana aquesta es bloquejava amb PBS-Tween (PBS-T) amb 5% de llet desnatada, posteriorment es feien tres rentats i després s'incubava amb l'anticòs DA6 durant 2 hores a TA en agitació. Després de 3 rentats amb PBS-T s'incubava l'anticòs

secundari marcat amb HRP durant 1 hora a TA. Es feien tres rentats i es procedia a la detecció amb el sistema luminescent ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

13. SÍNTESI DE PÈPTIDS

Un total de 16 pèptids van ser seqüenciats per fer assajos d'unió a MHC. Els pèptids que es van sintetitzar (Taula 7) corresponen a pèptids seqüenciats de la mostra de tiroides TB448. La síntesi es va dur a terme al Torrey Pines Institute for Molecular Studies (TPIMS) de La Jolla, San Diego, USA, amb la col·laboració de la Dra. Clemencia Pinilla. El procés de síntesi es va realitzar seguint un protocol prèviament descrit (Houghten 1985) de síntesi simultània de múltiples pèptids anomenat mètode de les “bosses de te”, ja que la síntesi es realitza en unes bosses de malla de niló. La malla permet fluir per l'interior els solvents i els aminoàcids, però manté les boles de resina a l'interior. Això permet que es puguin sintetitzar un gran nombre de pèptids alhora ja que la majoria de passos es poden fer en comú en un mateix recipient i només es separen les bosses en els passos d'acoblament.

Seqüència	Nº aa	Pm	Pm real	Rendiment (mg)	Proteïna
IRASYAQQAESRVSG	16	1718.88	1718.94	193	Proteoglicà heparan sulfat (1089-1104)
DVGAVYRAVTPQGRPD	15	1628.8	1629.19	218.9	DQB1*0602 cadena beta (75-89)
GGELRFTVTQRSQPG	15	1631.79	1632	172.9	Proteoglicà heparan sulfat (1006-1020)
RPKDYEVDTLKSLLN	16	1862.07	1862.13	254.3	Col·lagen cadena α 2 (I) (1129-1144)
KPGQFIRSVDPDSPA	15	1612.8	1613.23	217.6	NHERF (174-188)
EDFRDGLKLMLL	12	1448.73	1449.98	125.1	α Actinina 1(57-68) o α Actinina 4 (76-87)
CPTPCQLQAEQAFRLTVQ	18	2032.35	1016.45 (+2)	246.2	Tiroglobulina (726-743)
DIPELVNMGQWKIRA	15	1769.08	1769.29	211.5	Complement C3 (194-208)
NIFSFLSRDPDAQPG	16	1825.98	1826.35	198.6	Catepsina D (227-241)
RLPIIDVAPLDVGAPD	16	1659.94	1660.47	218.5	Col·lagen cadena α 1 (I) (1436-1451)
AAGLLSTYRAFLSSH	15	1592.81	1593.07	191.1	Col·lagen cadena α 1 (XV) (1243-1257)
LKKLYEIAARRHP	13	1686.04	1687.2	226.8	Human Serum Albumin (159-171)
YDHNFKAINAIQK	14	1659.89	1659.99	218.5	Cathepsina C (170-183)
YPKSLHMYANRLDHR	16	2013.36	1008.08(+2)	250.9	Apolipoproteïna B (1200-1215)
AGLLSTYRAFLSSH	14	1521.73	1522.1	203.2	Col·lagen cadena α 1 (XV) (1244-1257)
YGELRFTVTQRSQPG	16	1794.97	1795.2	206.4	Heparan Sulfat Proteoglican (1005-1020)

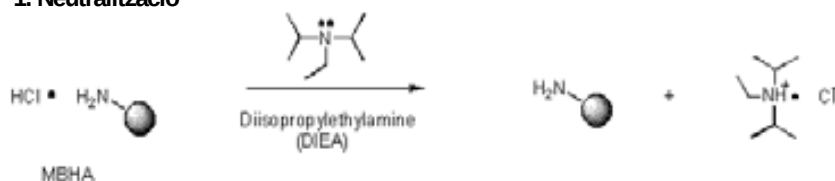
Taula 7: Llistat dels pèptids sintetitzats en el TPIMS pel mètode de les bosses de te

Per la síntesi es va utilitzar la resina 4-methylbenzhydrylamina hydrachloride, MBHA-HCl (Chem Impex Internacional, Substitució= 1,15mmol/7g) i L-aminoàcids protegits per un grup t-butiloxycarbonil (t-BOC). A cadascuna de les bosses de niló s'afegien 100mg de resina. La resina es rentava amb DCM (CH_2Cl_2 Diclorometà) durant 1min. El DCM el que fa es obrir la resina i fer-la més accessible.

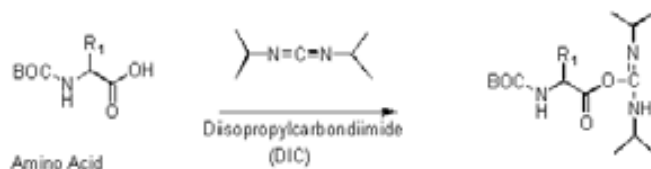
Posteriorment es neutralitzava la resina amb 5% DIEA (Diisopropilietilamina)/ CH_2Cl_2 . Un cop fets aquests dos primers passos es procedia a la síntesi dels pèptids. Els passos de la síntesi eren els següents: acoblament, rentat, desprotecció i neutralització (Figura 17). Aquests passos es repetien les

vegades necessàries fins a finalitzar la síntesis dels pèptids. En primer lloc es ressuspenien els aminoàcids amb CH_2Cl_2 o DMF (Dimetilformamida) en funció de la seva solubilitat. La Asn i la Gln es ressuspenien amb DMF, la His, Lys, Arg, Trp amb 10% DMF/ CH_2Cl_2 , la resta amb CH_2Cl_2 . Els aminoàcids s'activaven amb DIC (Diisopropilcarbodiimide) que s'afegia a continuació. Per saber la quantitat que se n'havia d'afegir es seguia la formula següent: $1,15 \text{ mmol/g} \times 0,1 \text{ g/bag} \times 1 \text{ bag} \times 6 \text{ excés} \times 126,2 \text{ mg/mol} \times \text{ml}/0,806 \text{ mg} \times 1 \text{ ml}/1000 \mu\text{l} = 0,108 \text{ ml}$. Per tant, per saber els ml que havíem d'afegir es multiplicava aquest valor pel número de bosses que s'introduïen a cada una de les botelles dels aminoàcids (aa).

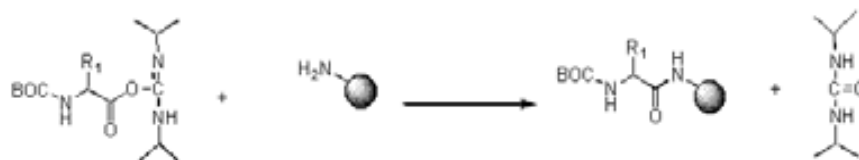
1. Neutralització



2. Activació dels aminoàcids



3. Acoplament dels aa a les boles de la resina MBHA



4. Desprotecció

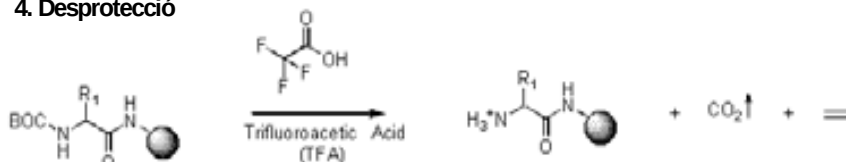


Figura 17: Passos de la síntesis dels pèptids

En el pas d'acoblament cada una de les bosses es posava dins la botella de l'aminoàcid que tocava i es deixava incubant almenys durant una hora, després d'aquest pas es feien dos rentats d'un minut primer amb DMF i després amb DMC. El pas posterior de desprotecció es feia perquè els aa estan bloquejats per un grup BOC i s'havia d'eliminar abans del posterior pas d'acoblament. Aquest pas consistia en un rentat d'un minut amb DCM i una incubació durant 30 min amb 55% TFA /45% CH_2Cl_2 .

Per parar la desprotecció es feien un seguit de rentats: 1 min DCM, 1 min Isopropanol, 1min Isopropanol, 1 min DCM, 1 min DCM, 3X 2 min 5%DIEA/ CH₂Cl₂, 2X 1 min DCM.

Molts dels aminoàcids tenien cadenes laterals protegides perquè no competissin pel lligand. Un cop acabada la síntesi i abans del procés de separació de la resina, aquests grups havien de ser eliminats. Posteriorment els pèptids eren liofilitzats i la identitat i puresa de cada pèptid es verificava per espectrometria de masses amb una interfase HPLC de fase reversa.

14. LINIES CEL·LULARS

BLS (Bare lymphocyte syndrome): Cèl·lules limfoblastoides d'un pacient amb BLS (HLA classe II negatiu) transfectades amb les molècules DR15 (DR2b, DRA1*0101/DRB1*1501) o DR51 (DR2a, DRA1*0101/DRB5*0101) de l'haplotip DR2 (Norrby-Teglund, Nepom et al. 2002). Aquestes cèl·lules es van obtenir de la Dra. Clemencia Pinilla del TPIMS de san Diego, California i es van utilitzar pels assaigs d'unió peptídica a MHC. Les cèl·lules es creixien amb medi RPMI suplementat amb 10% FCS.

721.127: línia limfoblastoide de cèl·lules B hemizigotes per DR3 (DeMars, Chang et al. 1983). Aquesta cèl·lula expressa només un haplotipo d'HLA (A1; B8; Cw7; DR3; DQ2; DP4). Es va utilitzar pels assajos d'unió peptídica per citometria de flux. Les cèl·lules es creixien amb medi RPMI suplementat amb 10% FCS.

JHAF: Línia cel·lular limfoblastoide B (B-LCL) del banc de cèl·lules i gens International Histocompatibility Working Group (IHWG) (Jaraquemada, Ollier et al. 1983). Aquesta línia es va utilitzar per l'estudi dels pèptids presentats per l'al·lel DRB1*0407, ja que és homozigota per DRB1*0407. Les cèl·lules es creixien amb medi RPMI suplementat amb 10% FCS.

FN-86: Cèl·lules limfoblastoides generades en el nostre laboratori a partir de PBL d'un donant homozigot per l'al·lel DRB1*0801. El tipatge complet del donant és: HLA-A*0301,*1101; B*0702,*4402; Cw*0102,*0702; DRB1*0801; DQB1*0402. Es van utilitzar per l'anàlisi dels pèptids presentats per HLA-DR8 (DRA1*0101/DRB1*0801). Les cèl·lules es creixien amb medi RPMI amb 10% FCS.

14.1. Producció de línies limfoblastoides transformades amb el virus d'Epstein Barr

La línia limfoblastoide (LCL) FN-86 es va obtenir transformant PBL de sang perifèrica d'un donant amb el virus d'Epstein Barr. Es va buscar un donant homozigot per l'al·lel DRB1*0801, es va separar la població limfocitària fent un gradient de densitat amb ficoll hypaque, i els PBL obtinguts van ser els que es van transformar.

El virus es va obtenir del sobrenedant del cultiu de la línia cel·lular B95.8 (marmoset cell line) que es creixia fins a la saturació durant 8-10 dies en medi RPMI complet a 37°C i en atmosfera rica en CO₂.

(5%). El sobrenedant dels cultius es centrifugava, es filtrava (0,45 µm de porus) i es mantenia amb N₂ líquid. Aquest sobrenedant ric en EBV s'anomena "soup".

Transformació: En un tub cònic (per afavorir el màxim contacte cel·lular) en el qual teníem un botó cel·lular d'aproximadament 10⁷ PBLs s'afegia 1 ml de "soup" intentant no desfer el botó cel·lular. S'incubava durant 1h a 37°C en atmosfera rica en CO₂ (5%) i posteriorment, sense desfer el botó s'afegien 9 ml de medi RPMI complet complementat amb 20% de FCS i 4 µg/ml de ciclosporina A purificada cedida per Sandoz. Es deixava en cultiu durant tres setmanes canviant la meitat del medi cada 7 dies evitant sempre ressuspensar el botó cel·lular. La tercera setmana es ressuspensien les cèl·lules i es cultivaven en plaques de 24 pous per tal d'expandir les línies obtingudes que, a partir d'aquest moment, es cultivaven en medi RPMI complementat amb 10% de FCS.

15. ASSAIGS D'UNIÓ PEPTÍDICA

15.1. Assaig d'unió sobre extractes cel·lulars

El mètode utilitzat per mesura la capacitat d'unió de pèptids sintètics a les molècules de MHC es va establir basant-se en un protocol desenvolupat anteriorment (Arndt, Vogt et al. 2000). Aquests assaigs es van realitzar en el TPIMS. Es van utilitzar cèl·lules BLS (Bare lymphocyte syndrome) transfectades amb un al·lel de DR, HLA-DR15 (DRA1*0101/DRB1*1501) o HLA-DR51 (DRA1*0101/DRB5*0101), ambdós part de l'haplotip DR2. L'assaig es duia a terme en plaques de polipropilè de 96 pous.

Aquest assaig de competència consistia en la incubació dels pèptids que es volien testar en presència d'un pèptid biotinilat (pèptid "reporter") que s'unia de manera específica a les molècules HLA-DR51 o HLA-DR15 expressades a la superfície de les cèl·lules BLS. Els pèptids "reporter" que es van fer servir per aquests haplotips eren MBP(83-99) i MBP(85-98) per DR15 i DR51, respectivament. S'incubaven un milió de cèl·lules per pou, a 37°C, durant tres hores amb el pèptid "reporter" a 15 µM, 50 µl/pou i amb el pèptid competidor a una concentració final de 100 µg/ml (aproximadament 90 µM, unes 6 vegades més de pèptid competidor). Com a control positiu s'incubaven les cèl·lules amb el pèptid biotinilat sense competidors i com a control negatiu les cèl·lules sense pèptids.

Després de dos rentats amb PBS les cèl·lules es lisaven amb tampó Tris 1% IGEPAL, amb inhibidors de proteases (*cocktail* complet, Roche). Un cop lisades, el sobrenedant, que contenia els complexos HLA-DR-pèptid, es recuperava per centrifugació. Un cop arribat a aquest pas es podia parar, guardant el sobrenedant en plaques de polipropilè a 4°C fins a 48 hores.

Els complexos HLA-DR-pèptid biotinilat es quantificaven per ELISA fent servir un marcatge amb Europium-streptavidin per fluorimetria resolta per temps (time-resolved fluorometry). El sobrenedant del lisat s'incubava en plaques de polietilè de 96 pous incubades la nit anterior amb L243 (50 µl/pou d'anticòs a 3 µg/ml, en PBS a 4°C). Es bloquejava la placa durant 1 hora a 37°C amb BSA al 3% (100

µl/pou) i després s'afegien 30 µl del sobrenedant amb 20 µl de PBS 1% BSA i s'incubava durant 3 hores a temperatura ambient. Per la detecció es feien 6 rentats amb PBS/tween amb un rentador automàtic de plaques i després s'afegien 50 µl d'estreptavidina-Eu (1:1000) (Perkin-Elmer), diluïda amb el tampó d'assaig inclòs també dins el sistema DELFIA de Perkin-Elmer. S'incubava 45 minuts a TA d'acord amb el protocol del fabricant. Per revelar es feien 9 rentats amb PBS/tween amb el rentador de plaques i després s'afegia 75 µl de solució d'augment de fluorescència es deixava 10 minuts i un cop passat aquest temps i abans d'una hora es quantificava la fluorescència amb el contador Victor² 1420 multilabel HTS (Perkin Elmer). La capacitat d'unió de cada pèptid es mesurava com el percentatge d'inhibició de la unió del pèptid control, seguint la fórmula: % inhibició= valor mostra-control negatiu/control positiu-control negatiu

15.2. Assaig d'unió directe

L'assaig d'unió directa es feia per desplaçament dels pèptids ja units a les molècules de MHC de la superfície cel·lular amb un pèptid problema biotinilat.

Un cop teníem les cèl·lules necessàries per cada experiment, aquestes es rentaven dues vegades amb PBS amb 1% de FCS. Les cèl·lules que es van utilitzar per aquests assajos van ser les BLS transfectades amb HLA-DR15 o HLA-DR51 o sense transfectar, i la línia 721.127 hemizigota per DR3. Les cèl·lules es ressuspenien en medi RPMI 1640 1%FCS i s'incubaven amb diferents concentracions de pèptid biotinilat durant 4 hores a 37°C en plaques de 96 pouets a raó de 5×10^5 cèl·lules/pouet. Les incubacions dels pèptids es feien a pH5,5 o pH7 per estudiar quin era el pH més adequat per produir-se l'intercanvi entre el pèptid biotinilat i els pèptids units de manera natural a les molècules de MHC. Els pèptids s'incubaven a concentracions seriades diluïdes a la meitat començant per 0,1 µg/µl (aproximadament 50 µM) fins a 0,003125 µg/µl. A continuació, es feien un parell de rentats amb PBS 1%FCS i s'incubaven durant 30 minuts a 4°C amb 0,005 mg/ml Streptavidin-R-Phycoeritrin. Posteriorment es feien dos rentats amb PBS 1%FCS i es ressuspenien en 300 µl de PBS amb 0,005% de ioduro de propidi (Sigma), per excloure les cèl·lules mortes de l'anàlisi. La fluorescència es detectava i s'analitzava per citometria de flux amb un FACScalibur. Com a control negatiu s'utilitzaven cèl·lules incubades en les mateixes condicions però sense el pèptid i la línia BLS-1, que al no estar transfectada no expressa cap molècula de DR.

15.3. Assaig d'unió peptídica REVEALTM

El sistema de Proimmune REVEALTM, és un assaig d'unió peptídica lliure de cèl·lules que ja s'ha usat en altres publicacions (Blancou, Mallone et al. 2007). Es van testar un total de 25 pèptids, 7 pèptids de tiroglobulina i la resta pèptids control. Aquests controls eren pèptids associats a DR en tiroides autoimmunes i es van escollir tenint en compte que eren seqüències que s'havien pogut assignar a un al·lel d'HLA-DR mitjançant el programa ProPred, i per tant podríem valorar si les assignacions del programa eren fiables o no. Els pèptids més llargs de 17 aminoàcids es sintetitzaven com a pèptids

solapats, ja que 17 aa és la mida màxima permesa pel sistema. Aquest va ser el cas de dos dels pèptids de la tiroglobulina el Tg(2224-2241) i el Tg(726-743).

L'assaig es va fer en dues tandes, una primera amb les molècules DR15 i DR3, i una segona amb DR407, DR8 i DR51. Es va haver de fer així ja que quan vam començar a realitzar aquests assajos, els al·lells DRB1*0407, *0801 i *DRB5*0101 no estaven disponibles.

Com a controls interns del sistema s'inclouïen un epítot T amb capacitat d'unió baixa (afinitat límit o borderline), que ens donava el valor de *pass/fail*; un control negatiu, que no donava cap senyal (aquests valors no es mostren en els resultats); i un control positiu per cada al·lel testat, hCMV pp65(109-123) (MSIYVYALPLKMLNI) per DR15, M. tuberculosis Ab 85B(14-27), (PSPSMGRDIKVQFQ) per DR3 i Hemaglutinina(307-319) (PKYVKQNTLKLAT) per DR407 i DRB5*0101. L'assaig es duia a terme amb molècules de DR solubles i buides, que s'incubaven amb cadascun dels pèptids que es testaven. La capacitat d'unió del pèptid es mesurava en funció de la seva capacitat d'estabilitzar la molècula de classe II. La detecció dels complexos estables pHLA-DR es feia mitjançant un anticòs monoclonal conformacional, que només reconeix complexos estables. L'anàlisi es va fer per comparació entre el valor d'unió de cadascun dels pèptids a cadascun dels al·lells amb el pèptid límit (valor 100), anomenat pèptid *pass/fail*. Cada experiment es va dur a terme dues vegades i amb dues dilucions diferents, d'aquesta manera s'obtenien 4 dades per cada reacció (pèptid/al·lel). Els valors fins a 0 eren negatius, els valors entre 0 i 100, per sota el nivell de *pass/fail*, eren considerats de baixa unió i valors per sobre del 100 es consideraven positius.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1:

DEFINICIÓ DELS MOTIUS D'ANCORATGE DELS PÈPTIDS DELS AL·LELS HLA-DRB1*0407 I DRB1*0801

OBJECTIUS:

- Definició del motiu d'ancoratge de l'al·lel HLA-DRB1*0407 i comparació del motiu d'ancoratge de DR407 amb altres variants de DR4
- Definició del motiu d'ancoratge de l'al·lel HLA-DRB1*0801 en el context de la seva associació amb la malaltia autoimmunitària diabetis mellitus de tipus 1

ARTICLES:

- Muixí et al. Use of naturally processed peptides for the identification of the binding motif of HLA-DRB1*0407 (manuscrit en preparació)
- Muixí et al. The binding motif of HLA-DR8 shares structural features with other type 1 diabetes-associated alleles (enviat a Diabetologia juny del 2009)

ANTECEDENTS

La immunitat cel·lular duta a terme per cèl·lules T depèn del reconeixement específic de pèptids immunogènics presentats per les molècules de MHC a la superfície de les APC. En el cas de les molècules de MHC de classe II els pèptids que presenten tenen longituds variables i s'uneixen via interaccions de diferents tipus (hidrofòbiques, ponts d'hidrogen, ponts salins), amb diferents "butxaques" del solc d'unió. Aquestes butxaques estan formades per residus polimòrfics, que fan que cada al·lel acomodi un grup de residus específics a cada una de les butxaques determinant l'afinitat pels diferents pèptids (Bondinas, Moustakas et al. 2007). Així cada al·lel de classe II uneix i presenta un grup diferent de pèptids en funció dels residus aminoacídics que conformen les butxaques d'unió al pèptid. Fins el moment hi ha descrits els motius d'ancoratge d'algunes molècules d'HLA-DR i HLA-DQ, però encara n'hi ha molts que es desconeixen. Aquest és el cas de les molècules DR407 (DRA1*0101 DRB1*0407) i DR8 (DRA1*0101 DRB1*0801).

Els mètodes de predicció de la unió d'un pèptid a una determinada molècula de MHC són importants per poder identificar aquells segments d'una proteïna que seran presentats a les cèl·lules T, i per tant són útils a l'hora de generar vacunes peptídiques o pel desenvolupament de teràpies antígen específiques. S'ha desenvolupat molts mètodes computacionals diferents per predir la unió MHC-pèptid, des de anàlisi simple de seqüències (Hammer 1995; Rammensee, Bachmann et al. 1999; Sturniolo, Bono et al. 1999), a matrius quantitatives (Marshall, Wilson et al. 1995), o matrius virtuals (Sturniolo, Bono et al. 1999) etc. L'ús de llibreries peptídiques expressades per fags (Hammer, Valsasnini et al. 1993; Hammer, Bono et al. 1994), juntament amb l'estudi estructural dels complexos HLA-DR-pèptid aporten també una base per la caracterització de les interaccions MHC/pèptid. Aquest treball s'ha realitzat a partir de lligands naturals de les dues molècules estudiades. L'ús de lligands naturals és preferible a l'ús de llibreries peptídiques ja que els pèptids usats seran sempre productes fisiològics del processament i presentació d'antígens. Fa un parell d'anys E. Unanue va crear un programa computacional per predir epítops peptídics presentats per molècules de MHC-II diabetogèniques, a partir d'una base de dades de pèptids naturals (Chang, Suri et al. 2007), que els permetia assignar valors d'unió alts i baixos a pèptids que s'unien amb alta o baixa afinitat respectivament. Aquests algorismes, generats a partir de pèptids naturals de classe II, poden ser també una eina molt potent per futurs anàlisis d'epítops d'antígens diana desconeguts, en malalties immunitàries.

La generació de programes de predicció d'epítops de classe I va començar molt abans que els de classe II ja que la seva caracterització és més senzilla. Això és degut a que les molècules de classe I uneixen pèptids més petits, normalment de entre 8-10 aa de longitud, ja que el solc d'unió al pèptid està tancat i no permet que els lligands penguin pels extrems. La unió del pèptid s'estabilitza mitjançant la interacció dels seus extrems N i C-terminals amb els extrems invariants del solc d'unió al pèptid de les molècules de MHC de classe I. D'aquesta manera predir els motius d'ancoratge es pot aconseguir simplement alineant les seqüències (Engelhard 1994; Rammensee 1995). Per contra, les molècules de classe II presenten pèptids de longituds variables i molts es seleccionen com a famílies de pèptids (nested sets). Aquests

l·ligands tan llargs dificulten molt el procés d'identificació del segment de 9 residus que fa de *core* o de zona central del pèptid que interacciona amb ell lloc d'unió al pèptid de les molècules de MHC-II.

L'objectiu d'aquest capítol de la tesis era estudiar els motius d'ancoratge de les molècules HLA-DR407 (DRA1*0101 DRB1*0407) i DR8 (DRA1*0101 DRB1*0801), al·lels expressats en dues de les mostres de tiroides estudiades, i de les quals no hi havia dades clares. Conèixer els motius d'ancoratge d'aquestes molècules ens permetria l'assignació d'al·lel als pèptids eluïts d'aquestes mostres. Un altre dels motius per estudiar aquests dos al·lels era la seva associació amb determinades malalties. DRB1*0801 es troba associat a la susceptibilitat a artritis juvenil idiopàtica (Van Kerckhove, Melin-Aldana et al. 1990; Runstadler, Saila et al. 2003), cirrosis biliar primària (Charatcharoenwittaya and Lindor 2005; Mullarkey, Stevens et al. 2005) i l'haplotip DRB1*0801-DQB1*0401-DQB1*040 s'ha vist que després dels haplotips DR3 i DR4 és el que més predisposa a diabetis de tipus 1 (Erich, Valdes et al. 2008). L'al·lel DRB1*0407, per altra banda, és un al·lel de resistència a artritis reumatoide (AR). El motiu de DR407 s'havia descrit en un treball previ. En aquest treball (Davenport, Godkin et al. 1997) feien seqüenciació en pool i per tant la predicció del motiu d'ancoratge era poc acurada. A més a més en el nostre laboratori, en una publicació anterior ja s'havia caracteritzat el motiu d'ancoratge de l'al·lel DRB1*1001 associat a AR.

MOTIU D'ANCORATGE DE LA MOLÈCULA DR407 (DRA1*0101 DRB1*0407)

1. ESTUDI DE L'AL·LEL DRB1*0407

HLA-DR4 i els seus diferents subtipus estan ben estudiats, ja que inclouen molts al·lells associats amb la susceptibilitat a artritis reumatoide (AR), com HLA-DRB1*0401, *0404 i *0405, i d'altres com *0402, 0403 i 0407 que no estan relacionats amb la malaltia (Wordsworth, Lanchbury et al. 1989). La comparació de les seqüències d'aquests al·lells i dels altres al·lells associats a AR, DRB1*0101 i *1001 va descriure l'existència d'un epítot compartit (EC) entre les molècules associades a la malaltia. Es va postular que els aminoàcids de les posicions 67, 70, 71 i 74 de la cadena β de l'HLA-DR jugaven un paper crucial en la susceptibilitat a la malaltia (Taula 8), suggerint que la càrrega de l'aminoàcid DR β 71, o β 74 era crítica per la discriminació entre les molècules lligades a la susceptibilitat a la malaltia. L'estructura cristal·logràfica de la molècula DR4 (DRB1*0401) unida al pèptid de col·lagen, CII263-270 (GIAGFKGEQGPKEGEB), mostrava la formació d'un pont salí entre la Lys β 71 i l'Asp del pèptid en P4 (Dessen, Lawrence et al. 1997), això indicava que aquesta posició era crítica en la selecció dels pèptids que s'unien a DR4, i permetia unir-se pèptids amb residus carregats negativament (Asp i Glu) en aquesta posició. L'al·lel no associat *0402 no permet la unió d'Asp o Glu en aquesta posició ja que conté dues càrregues negatives a la posició β 70 i β 71 (Figura 18). Aquest també seria el cas de *0407, un altre dels al·lells no associats amb l'AR, que conté un Asp en posició β 74, també dins de la butxaca on es situa P4.

Al·lel DRB1	Presència de EC	Susceptibilitat a AR	Epítot Reumatoide Compartit				
			P7 β 67*	β 70*	P4 β 71*	β 74*	P1 β 86*
DR*0401	+	++++	L	Q	K	A	G
DR*0402	-	-	I	D	E	A	V
DR*0403	-	-	L	Q	R	E	V
DR*0404	+	+++	L	Q	R	A	V
DR*0405	+	+++	L	Q	R	A	G
DR*0407	-	-	L	Q	R	E	G

Taula 8: Comparació de seqüències de DR4. *Posicions dins la cadena β de l'HLA-DR

Assajos d'unió peptídica i de mutagènesis dirigida (Hammer, Gallazzi et al. 1995) suggereixen que la càrrega electrostàtica de β 71 té una forta influència en l'especificitat d'unió peptídica. Pèptids amb la posició P4 carregada positivament s'uniran molt millor a subtipus de DR4 no associats a AR (DRB1*0402), que als associats a AR (DRB1*0401,*0404), presumiblement degut a una complementarietat de càrrega entre la càrrega positiva de P4 i el Glu β 71.

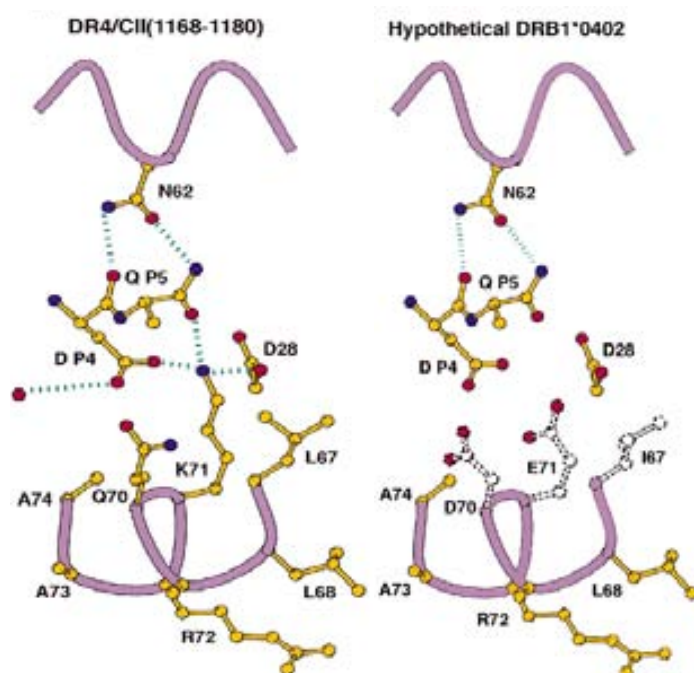


Figura 18: Interacció de la butxaca P4 de HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401 i DRB1*0402. A. Contactes interatòmics entre DR4/CI(1168-1180). Es formen sis ponts d'hidrogen; B. Model hipotètic del P4 de DRB1*0402 (adaptat de Dessen et al, 1997).

La posició P6 no varia entre les diferents variants al·lèliques de DR4, la butxaca que es forma és més profunda que la de DR1 degut a la menor cadena lateral de la posició β 11, que és una Val a DR4 mentre que a DR1 és una Leu (Dessen, Lawrence et al. 1997). Aquesta butxaca per tant uneix preferentment, en tots els subtipus, els residus Ser, Thr, Asn i Val, tot i que accepta altres aminoàcids com la Gln i l'Arg.

2. DESCRIPCIÓ DEL REPERTORI DE PÈPTIDS ASSOCIATS A HLA-DR407 (DRA1*0101; B1*0407)

2.1. Processament de les mostres i identificació dels espectres del repertori de pèptids associats a HLA-DR407 (DRA1*0101; B1*0407)

L'anàlisi del repertori peptídic de DR4 es va fer per seqüenciació dels pèptids eluïts de la línia HLA homozigota JHAF, de la qual es van créixer 10^9 cèl·lules. L'estudi es va fer mitjançant LC- μ ESI-ITMSⁿ, utilitzant un espectròmetre de masses de trampa iònica LTQ. Els espectres generats, uns 4700, es van identificar mitjançant la cerca en una base de dades humanes *target/decoy* utilitzant el programa de cerca en bases de dades SEQUEST (Bioworks v3.3, ThermoFisher, San Jose, CA). La validació de les assignacions s'explica detalladament a l'apartat 10.1 del material i mètodes. Com a control de qualitat es van comprovar manualment almenys un espectre de cada família de pèptids i tots els espectres de seqüències úniques. Després de tot aquest procés es van obtenir un total de 151 lligands naturals de DR407 (Taula 9).

2.2. Anàlisi del repertori peptídic de DR407

Es van confirmar un total de 151 seqüències. La gran majoria formaven part de famílies de pèptids, tret característic dels pèptids presentats per les molècules de classe II (Falk, Rotzschke et al. 1991; Rammensee, Friede et al. 1995). La mida dels pèptids presentava una distribució normal, dins un rang de entre 11 i 27 aminoàcids, la gran majoria (96%) amb la mida estàndard dels pèptids de classe II, entre 12 i 20 aminoàcids (Rudensky, Preston-Hurlburt et al. 1991; Chiciz, Urban et al. 1992; Chiciz, Urban et al. 1993) (Figura 19).

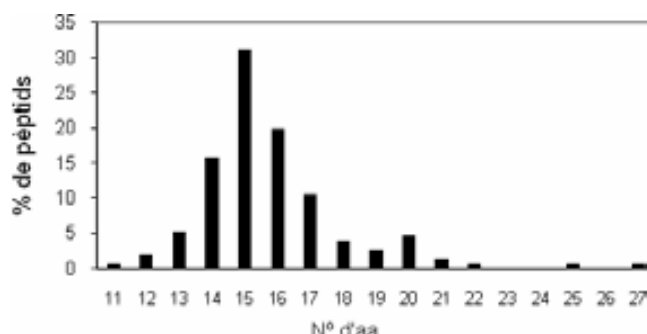


Figura 19: Distribució de mides dels pèptids aïllats de DR407

Els pèptids provenien de 59 proteïnes diferents, de diferents compartiments cel·lulars. Per evitar redundàncies, s'usava la localització més comú per aquelles proteïnes que es podien trobar en diferents compartiments. Tal i com era d'esperar, les proteïnes font seguien un patró comú a altres repertoris de pèptids de cèl·lules B: la majoria de pèptids provenien de proteïnes exògenes, de membrana o residents a la via endocítica, però també trobàvem casi un 20%, de proteïnes del citosol (Muntasell, Carrascal et al. 2002; Alvarez, Collado et al. 2008), així com nuclears o d'altres organel·les (Figura 20).

Com a molts altres repertoris peptídics, es van identificar moltes seqüències de molècules del MHC i d'altres proteïnes de membrana, així com també catepsines. Un fet a destacar va ser la presència d'un nombre elevat de pèptids de la cadena invariant (14/151), fet que ja s'havia observat en el repertori de DRB1*0402, l'altre al·lel no associat a AR (Kirschmann, Duffin et al. 1995).

Referència	L*	Nº Id	Scan	Pèptid	Nº aa	MH+	DeltaM	z	P (pep)	XC	Delta Cn	Sp	RSp	Ions	D
40S ribosomal protein S17	C	P08708	2303	LDFGSLSNLQVTQPTVGMNFKTPRGPV	27	2903.51	0.81	3	5.65E-12	6.3	0.4	2421.0	1	42/104	6.62
60 kDa heat shock protein	m	P10809	2419	DARALMLQGVDLLAD	15	1600.84	0.34	2	3.96E-07	4.2	0.3	1276.2	1	20/28	5.87
60 kDa heat shock protein	m	P10809	2663	DARALMLQGVDLLADA	16	1671.87	-0.15	2	6.92E-08	4.7	0.4	1780.0	1	22/30	6.30
60 kDa heat shock protein	m	P10809	2942	DARALMLQGVDLLADAV	17	1770.94	0.24	2	1.12E-09	4.8	0.3	1514.3	1	22/32	6.13
60S ribosomal protein L31	C	P62899	1947	VTYVPVTTFKNLQTVNVDEN	20	2281.17	0.12	2	5.66E-10	4.1	0.4	743.6	1	21/38	5.93
60S ribosomal protein L6	C	Q02878	1245	HQKFVIATSTKID	13	1487.82	0.48	2	8.31E-06	3.4	0.4	747.7	1	17/24	5.68
60S ribosomal protein L6	C	Q02878	1248,1239	THQKFVIATSTKID	14	1588.87	-0.36	2	9.79E-08	4.3	0.5	1187.7	1	19/26	7.05
Actin	C	P62736	2422	GSILASLSTFQQM	13	1382.70	-0.27	2	7.47E-07	3.7	0.4	1928.4	1	21/24	6.47
Actin	C	P62736	2558	IGGSILASLSTFQQM	15	1552.80	1.00	2	1.11E-01	3.1	0.3	822.5	1	20/28	
Actin	C	P62736	2918	GSILASLSTFQQMW	14	1568.78	-0.38	2	1.37E-07	3.5	0.4	498.3	1	17/26	6.02
Actin	C	P60709	1009	EQEMATAASSSSLEK	15	1568.71	0.20	2	2.09E-08	4.9	0.4	2647.4	1	25/28	7.03
Adipocyte-derived leucine aminopeptidase	ER	Q9NZ08	1210	KYQFSLSTEKSQ	13	1532.76	0.35	2	1.26E-06	4.4	0.3	1486.5	1	20/24	6.35
Adipocyte-derived leucine aminopeptidase	ER	Q9NZ08	1449	KYQFSLSTEKSQIE	15	1774.89	1.31	2	4.57E-09	5.0	0.3	1454.0	1	22/28	5.98
Apolipoprotein B-100	E	Q13787	2551	TPDFIVPLTDLRIPS	15	1683.93	0.30	2	3.65E-06	4.3	0.4	1199.9	1	22/28	6.57
Beta-1,4-galactosyltransferase 1	g	P15291	2002	LNSLTQVLDVQRYP	15	1808.95	0.32	2	1.48E-10	4.6	0.2	950.3	1	21/28	5.31
Beta-1,4-galactosyltransferase 1	g	P15291	2414	GLNSLTQVLDVQRYPL	17	1979.06	1.28	2	2.42E-07	3.4	0.3	802.6	1	20/32	4.46
Beta-1,4-galactosyltransferase 1	g	P15291	2529	DGLNSLTQVLDVQRYPL	18	2094.09	0.37	2	1.46E-07	4.9	0.4	1016.6	1	22/34	6.18
Beta-hexosaminidase alpha chain	Lys	P06865	2029	SDQRYVLYPNNFQFYD	17	2197.00	0.23	2	2.14E-09	3.7	0.4	820.7	1	21/32	5.62
Beta-hexosaminidase alpha chain	Lys	P06865	2102	SDQRYVLYPNNFQFY	16	2081.97	1.88	2	6.32E-10	4.9	0.4	739.8	1	20/30	6.05
Calmodulin	N	Q96HK3	2167	IAEFKEAFSLFDKD	14	1659.83	0.99	2	1.61E-07	3.3	0.3	913.5	1	18/26	4.55
Calsyntenin-1	ER	O94985	1359,1350	KATVHIQVNDVNEY	14	1629.82	0.34	2	4.74E-13	3.6	0.3	866.5	1	18/26	5.20
Carboxypeptidase D	M	O75976	1127	RNKFVLSGNLHGGs	14	1485.79	0.28	2	5.35E-10	3.7	0.2	1041.2	1	19/26	4.87
Carboxypeptidase D	M	O75976	1140	RNKFVLSGNLHGG	13	1398.76	0.25	2	1.25E-03	3.3	0.2	627.0	2	16/24	4.23
Carboxypeptidase D	M	O75976	1189,1294	VPGTYKITASARGYN	15	1597.83	0.28	2	5.24E-04	3.8	0.4	575.9	1	19/28	5.89
Carboxypeptidase D	M	O75976	1299,1309	VPGTYKITASARGYNP	16	1694.89	0.29	2	5.34E-09	4.0	0.3	1009.4	1	20/30	5.65
Carboxypeptidase D	M	O75976	1321,1330	RNKFVLSGNLHGGSV	15	1584.86	1.36	2	3.72E-09	3.6	0.2	926.1	1	19/28	4.38
Carboxypeptidase D	M	O75976	1434,1440	VPGTYKITASARGYNPV	17	1793.95	-0.31	2	2.43E-09	4.7	0.4	1402.0	1	22/32	4.82
Cathepsin D	Lys	P07339	2168	NIFSFYLSRDPDAQPGGE	18	2012.93	1.43	2	2.06E-06	3.7	0.2	915.1	1	22/34	3.62
Cathepsin H	Lys	P09668	2139	GIPYWIVKNSWGPQ	14	1644.85	1.41	2	5.16E-05	4.1	0.2	1286.1	1	20/26	4.48
Cathepsin H	Lys	P09668	2420	GIPYWIVKNSWGPQWG	16	1887.95	-0.486	2	3.8225E-09	3.7	0.2	1099.2	1	18/30	4.44
Cathepsin H	Lys	P09668	2487	GIPYWIVKNSWGPQW	15	1887.95	0.49	2	3.82E-09	3.7	0.2	1099.2	1	18/30	3.56
Cathepsin Z	Lys	Q9UBR2	2302	GTEYWIVRNSWGEPW	15	1830.93	0.44	2	1.11E-03	3.2	0.1	915.7	1	16/28	6.00
Cathepsin Z	Lys	Q9UBR2	2341	DGTEYWIVRNSWGEPWG	17	2051.92	-0.06	2	6.49E-07	3.5	0.4	664.9	1	19/32	5.62
Cathepsin Z	Lys	Q9UBR2	2392	DGTEYWIVRNSWGEPW	16	1879.88	-0.53	2	3.72E-07	4.0	0.4	682.0	1	18/28	6.85

CD109 antigen	M	Q8TDJ2	1182	KAYFLGSKSSMAVH	14	1525.78	0.29	2	7.11E-09	3.9	0.4	1111.8	1	22/26	5.98
CD109 antigen	M	Q8TDJ2	1200, 1209	KAYFLGSKSSMAVHS	15	1612.82	0.35	2	1.26E-09	4.3	0.4	903.9	1	21/28	5.69
Ceramide glucosyltransferase	ER	Q16739	1236	HPRYYISANVTG	12	1377.69	0.17	2	2.27E-05	2.3	0.1	361.2	3	13/22	
Ceramide glucosyltransferase	ER	Q16739	1459	HPRYYISANVTGFK	14	1652.85	1.24	2	4.24E-05	4.0	0.3	877.4	1	19/26	5.59
Ceramide glucosyltransferase	ER	Q16739	1462	SHPRYYISANVTGFK	15	1739.89	0.04	2	3.94E-10	4.1	0.3	1530.7	1	21/28	5.68
Cochlin	EM	O43405	2023	SPNKNFLVIVTDGQSYDDVQ	20	2239.09	0.34	2	2.58E-06	5.0	0.5	1441.9	1	23/38	6.85
Cytochrome c oxidase subunit 5A	m	P20674	2192	VIQELRPTLNELGISTP	17	1880.05	0.10	2	5.14E-06	3.8	0.3	448.4	1	19/32	4.93
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53634	1552	KKVVVYLQKLDTAYD	15	1783.00	1.33	2	2.33E-10	4.9	0.5	1194.5	1	21/28	7.44
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53637	1811	GPQEKVVVYLQKLDTAYD	19	2194.18	-0.17	3	1.22E-06	3.5	0.5	1141.9	1	32/72	6.24
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53638	1819	GPQEKVVVYLQKLDTAYDD	20	2309.20	1.03	3	1.55E-07	4.6	0.4	1359.5	1	32/76	6.16
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53639	1858	KKVVVYLQKLDTAYDDL	18	2068.13	1.37	3	3.18E-08	3.3	0.3	441.4	1	28/68	4.41
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53640	1993	KVVVYLQKLDTAYDDL	17	1940.04	0.33	2	7.44E-14	4.7	0.4	1401.0	1	23/32	6.70
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53641	2021	GMDYWIVKNSWGTG	14	1613.74	0.40	2	2.61E-06	3.7	0.4	1355.6	1	19/26	6.21
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53642	2040	SGMDYWIVKNSWGTG	15	1700.77	1.08	2	2.22E-05	3.4	0.4	667.4	2	16/28	5.39
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53643	2049	KVVVYLQKLDTAYDDL	16	1883.02	0.77	3	1.05E-08	4.0	0.3	1192.5	1	32/60	5.16
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53644	2057	YDHNFKVAINAIKSW	16	1933.99	1.40	3	1.43E-05	5.7	0.4	3347.0	1	37/60	6.61
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53648	2363	SGMDYWIVKNSWGTGWG	17	1943.87	1.58	2	1.64E-06	4.4	0.4	1546.7	1	23/32	5.89
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53635	1682,1755	KVVVYLQKLDTAYDD	15	1769.93	1.49	3	2.94E-07	3.1	0.3	944.9	1	29/56	4.53
Dipeptidyl-peptidase 1	Lys	P53646	2087,2073	GPQEKVVVYLQKLDTAYDDL	22	2479.31	0.03	2	2.33E-14	5.3	0.4	1017.9	1	22/42	6.66
Elongation factor 1-alpha 1	C	P68104	1567	INIVIGHVDSGKSTT	16	1639.90	1.07	2	7.58E-04	3.7	0.4	530.2	1	17/30	5.76
Elongation factor 1-alpha 1	C	P68104	1533,1535	INIVIGHVDSGKS	14	1437.81	0.63	2	4.35E-10	4.7	0.5	2206.3	1	21/26	4.25
Elongation factor 1-alpha 1	C	P68104	1532,1531	INIVIGHVDSGKST	15	1538.85	-0.18	2	1.95E-10	4.9	0.5	2441.0	1	22/28	7.03
Flotillin-1.	M	O75955	1113	EEQRVQVQVVERAQQ	15	1825.95	0.22	2	1.03E-10	3.2	0.3	214.4	41	13/28	4.00
Flotillin-1.	M	O75955	1297	TKQQIEEQRVQVQVVE	16	1941.04	1.15	2	1.14E-08	4.6	0.3	714.9	1	19/30	5.63
Flotillin-1.	M	O75955	1317	TKQQIEEQRVQVQVV	15	1812.00	0.37	2	1.94E-04	2.8	0.2	327.6	9	14/28	
Flotillin-1.	M	O75955	1377	EEQRVQVQVVERAQQV	16	1925.02	0.22	2	5.77E-05	2.5	0.1	234.9	105	13/30	
Fructose-bisphosphate aldolase A	C	P04075	1367	KGGVVGIVDKGVVP	15	1451.89	1.63	2	5.05E-04	3.5	0.2	692.6	1	22/28	
Heat shock cognate 71 kDa protein	C	P11142	1442	GILNVSVDKSTG	13	1260.68	0.48	2	6.10E-04	3.4	0.3	726.5	1	19/24	5.36
Heat shock cognate 71 kDa protein	C	P11142	1324,1332	GILNVSVDKSTGK	14	1388.77	-0.09	2	5.20E-08	3.8	0.4	1024.3	1	19/26	4.88
Heat shock cognate 71 kDa protein	C	P11142	1348,1358	GILNVSVDKSTGKE	15	1517.82	-1.17	2	4.32E-08	4.7	0.4	1400.6	1	22/28	6.41
HLA class I, A-1 alpha chain	M	P30443	1431	KDYIALNEDLRS	12	1436.74	0.00	2	2.10E-06	3.9	0.2	1544.4	1	19/22	5.18
HLA class I, A-1 alpha chain	M	P30443	2050	EPRFIAGYVDDTQF	15	1756.85	1.35	2	9.87E-05	3.7	0.3	840.1	1	18/28	5.21
HLA class I, A-1 alpha chain	M	P30443	2148	EPRFIAGYVDDTQFV	16	1855.92	0.32	2	8.76E-02	4.4	0.3	1408.5	1	23/30	
HLA class I, A-1 alpha chain	M	P30443	1910,1911	KDYIALNEDLRSW	13	1622.82	1.54	3	1.08E-05	5.1	0.3	2743.7	1	30/48	6.29
HLA class I, A-1 alpha chain	M	P30443	2047,2051	DGKDYIALNEDLRSWTA	17	1966.95	1.14	2	1.94E-08	5.3	0.4	1654.0	1	22/32	3.62
HLA class I, A-2 alpha chain	M	Q9TQH5	1409	DDTQFVRFDSDAASQR	16	1857.84	-1.28	2	2.32E-06	3.1	0.1	421.2	4	17/30	
HLA class I, A-1 alpha chain	M	P30443	1974	GKDYIALNEDLRSWTA	16	1851.92	0.47	2	6.10E-09	4.5	0.2	1640.1	1	21/30	

HLA class I, alpha chain E	M	P13747	1640	LRSWTAVDTAAQISE	15	1647.83	-0.30	2	1.41E-05	3.3	0.4	764.3	1	17/28	5.48
HLA class I, B-7 alpha chain	M	P01889	1513	LRSWTAADTAAQIT	14	1504.78	0.32	2	4.72E-06	3.6	0.3	895.6	1	19/26	5.31
HLA class I, B-7 alpha chain	M	P01889	1534	LRSWTAADTAAQITQ	15	1632.83	1.44	2	1.13E-07	4.3	0.4	2329.0	1	25/28	5.88
Invariant chain	M	P04233	2445	ATPLLMQALPMGALPQ	16	1651.89	1.45	2	8.35E-06	3.7	0.2	909.5	2	20/30	4.25
Invariant chain	M	P04233	2524	ATPLLMQALPMGALPQGPMQ	20	2065.06	-0.07	2	1.75E-10	4.1	0.5	1111.1	1	26/38	6.50
Invariant chain	M	P04233	2564	MATPLLMQALPMGALPQ	17	1782.93	0.21	2	2.91E-06	3.8	0.3	1113.8	1	22/32	5.44
Invariant chain	M	P04233	2575	ATPLLMQALPMGAL	14	1426.78	-0.09	2	4.75E-07	3.5	0.4	1353.6	1	20/26	5.97
Invariant chain	M	P04233	2577	ATPLLMQALPMGALP	15	1523.83	1.50	2	1.97E-05	3.4	0.2	749.3	14	18/28	
Invariant chain	M	P04233	2741	MATPLLMQALPMGALP	16	1654.87	0.29	2	2.74E-05	3.3	0.3	935.4	1	21/30	5.05
Invariant chain	M	P04233	2753	MATPLLMQALPMGAL	15	1557.82	0.74	2	9.75E-05	2.6	0.2	632.2	10	16/28	
Invariant chain	M	P04233	2508,2494	ATPLLMQALPMGALPQGP	18	1805.97	0.52	3	2.16E-03	4.2	0.3	1080.4	4	30/68	4.88
Invariant chain	M	P04233	2656,2646	MATPLLMQALPMGALPQGPMQ	21	2196.10	0.24	2	5.83E-11	4.8	0.4	1418.1	1	28/40	6.42
Invariant chain	M	P04233	2736,2739	MATPLLMQALPMGALPQGPM	20	2068.05	0.33	2	1.48E-08	5.3	0.3	1443.6	1	28/38	5.65
Invariant chain	M	P04233	2609,2610	MATPLLMQALPMGALPQGP	19	1937.01	0.92	2	1.05E-08	4.5	0.3	1474.0	1	26/36	5.25
Invariant chain	M	P04233	2429	TPLLMQALPMGALPQ	15	1580.85	0.54	2	6.05E-05	3.1	0.2	829.3	4	22/28	3.90
Invariant chain	M	P01903	1279	AQGALANIAVDKAN	14	1355.73	1.20	2	8.46E-05	3.8	0.2	1058.2	1	18/26	4.70
Invariant chain	M	P01903	2096	EAQGALANIAVDKANLEIMT	20	2072.07	1.05	2	6.69E-10	4.9	0.3	643.0	1	21/38	5.76
Invariant chain	M	Q9MY13	1481	EEYVRFSDSDVGEYR	14	1763.79	1.31	2	1.46E-06	3.4	0.3	934.5	1	18/26	4.69
Invariant chain	M	Q9MY13	1540	HQEEYVRFSDSDVGEY	15	1872.80	0.39	2	6.44E-09	3.8	0.3	1027.4	1	20/28	5.28
Invariant chain	M	Q9MY13	1415,1405	HQEEYVRFSDSDVGEYR	16	2028.90	1.19	2	3.44E-11	3.5	0.3	1115.0	1	22/30	4.90
Interleukin-21 receptor	M	Q9HBE5	1914	EDPAFYMLKGKLQYE	15	1831.89	0.47	2	5.16E-04	4.3	0.2	779.4	1	19/28	5.03
Interleukin-21 receptor	M	Q9HBE5	2107	EDPAFYMLKGKLQYELQ	17	2073.04	0.14	2	9.48E-05	3.6	0.3	517.1	1	16/32	5.09
Interleukin-21 receptor	M	Q9HBE5	2212	EDPAFYMLKGKLQYEL	16	1944.98	0.53	2	5.29E-06	3.8	0.1	498.1	1	17/30	3.69
Interleukin-6 receptor subunit beta	M	P40189	2403	IEVWVEAENALGKVT	15	1657.88	1.30	2	2.12E-08	3.7	0.2	883.9	1	21/28	4.56
Interleukin-6 receptor subunit beta	M	P40189	2406	IEVWVEAENALGKVTS	16	1744.91	-0.47	2	8.06E-09	3.5	0.4	896.2	1	19/30	5.58
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	1583	EQQRLKSQDLELSWN	15	1873.94	0.43	2	1.10E-06	4.0	0.3	475.5	1	18/28	5.33
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	1827	EQQRLKSQDLELSWNLN	17	2101.07	0.43	2	2.18E-06	4.0	0.3	344.4	2	17/32	5.09
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	1828	AEQQRLKSQDLELSWNLN	18	2172.10	-0.39	2	2.09E-10	4.0	0.4	563.3	1	17/34	6.08
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	1840	AEQQRLKSQDLELSWNLNG	19	2229.13	0.14	2	2.03E-09	4.1	0.4	746.3	1	17/36	5.89
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	1976	EQQRLKSQDLELSWNL	16	1987.02	1.63	2	1.89E-07	4.1	0.3	806.2	1	18/30	5.15
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	1996	LRAEQRLKSQDLELSWNLNGLQAD	25	2925.52	1.39	3	3.56E-10	4.4	0.4	1526.7	1	35/96	5.31
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	2035	AEQQRLKSQDLELSWNLNGLQ	21	2470.27	0.05	2	8.91E-09	3.4	0.4	584.4	1	18/40	5.18
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	2044	RLKSQDLELSWNLNGLQAD	19	2200.14	-0.04	2	8.41E-12	4.7	0.4	1314.5	1	23/36	6.67
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	2085	KSQDLELSWNLNGLQ	15	1744.89	0.32	2	6.86E-09	4.8	0.4	1940.3	1	20/28	6.69
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	2098	KSQDLELSWNLNGLQAD	17	1930.95	1.17	2	5.66E-10	4.7	0.4	1860.0	1	22/32	6.05
Low affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor	M	P06734	2153	KSQDLELSWNLNGLQA	16	1815.92	1.47	2	1.11E-07	4.4	0.3	1272.4	1	19/30	5.08
Lysosomal alpha-mannosidase	Lys	O00754	2030	VDYFLNVATAQGRIYY	15	1779.87	1.42	2	1.08E-09	4.1	0.4	1944.0	1	23/28	6.24

Lysosomal-associated transmembrane protein 5	Lys	Q13571	3134,3141	FPLMTLQLLDF	11	1337.72	-0.01	2	1.37E-05	2.8	0.3	877.6	1	17/20	
Major vault protein (MVP)	C	Q14764	1504	TDVITETADHARLQ	15	1682.87	0.88	2	2.43E-08	4.5	0.4	1618.0	1	20/28	6.07
Neural cell adhesion molecule L1-like protein	M	O00533	2105	VPTIIKQSKVQVAFFP	16	1802.06	1.08	2	1.01E-04	3.2	0.2	547.9	1	19/30	3.99
Niban protein	C	Q9BZQ8	1401	WKERYVVVKNDYAVES	16	1985.01	1.19	2	9.77E-10	3.0	0.2	601.5	1	16/30	
Niban protein	C	Q9BZQ8	1156	KERYVVVKNDYAVE	14	1711.90	1.33	2	4.81E-09	3.7	0.3	694.5	1	17/26	5.00
Nuclear pore membrane glycoprotein 210	N	Q8TEM1	1853	SPELEKIQALDSEGN	15	1613.84	1.22	2	1.83E-08	4.7	0.4	2122.2	1	23/28	6.11
Nuclear pore membrane glycoprotein 210	N	Q8TEM1	1891	SPELEKIQALDSEG	14	1499.80	-0.18	2	2.26E-06	2.9	0.4	1248.9	1	18/26	
Pleckstrin, Platelet p47 protein	C	Q9H8W4	1775	MFVFKITTTKQQDHF	15	1870.95	0.87	3	7.51E-07	4.0	0.3	846.9	1	25/56	5.55
Protein disulfide-isomerase	M	P07237	1208	GSEIRLAKVDATEE	14	1517.78	0.36	2	1.29E-03	3.0	0.3	481.3	1	16/26	4.74
Protein disulfide-isomerase	M	P07237	1249	EGSEIRLAKVDATEE	15	1646.82	1.26	2	6.82E-05	2.8	0.2	378.5	1	16/28	
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	C	P14618	1021	GAIIVLTSGRSAH	14	1409.82	0.24	2	1.78E-04	3.9	0.3	1345.2	1	18/26	5.46
Rab GTPase-activating protein 1	C	Q9Y3P9	1343	VGKISVSSDSVSTLN	15	1492.79	1.43	2	1.06E-06	3.4	0.4	1274.8	1	20/28	5.05
Ras-related protein Rab-9	end	P51151	2211	FPFVILGNKIDISERQ	16	1876.03	1.44	3	2.87E-11	5.1	0.3	2224.2	1	34/60	5.98
Ras-related protein Rab-9	end	P51151	2247	FPFVILGNKIDISER	15	1747.97	0.72	3	5.75E-09	4.9	0.3	1922.9	1	33/56	6.29
Ras-related protein Rab-9	end	P51151	2248	PFVILGNKIDISER	14	1600.91	1.02	3	3.12E-08	4.8	0.4	1970.0	1	32/52	6.64
Ras-related protein Rab-9	end	P51151	2320	FPFVILGNKIDISERQV	17	1975.10	1.21	3	1.02E-08	5.1	0.3	2090.7	1	33/64	5.62
Ras-related protein Rab-9	end	P51151	2327	FPFVILGNKIDISERQV	17	1975.10	0.18	2	1.23E-08	3.5	0.4	1058.6	1	20/32	5.47
Semaphorin-7A	M	O75326	1394	ESELYTSDTVMQNPQ	15	1741.76	-0.19	2	1.63E-03	3.5	0.3	1101.4	1	20/28	5.32
Semaphorin-7A	M	O75326	1329,1323	NPQFIKATIVHQDQ	14	1638.86	1.35	2	5.30E-09	4.8	0.3	1493.4	1	19/26	6.07
Semaphorin-7A	M	O75326	1357,1365	NPQFIKATIVHQDQA	15	1709.90	1.43	2	3.90E-09	4.4	0.4	1420.5	1	18/28	6.03
Serum albumin	E	Q9P1I7	1773	RHPDYSVVLRLR	12	1467.84	1.19	3	1.27E-05	4.7	0.3	2204.1	2	30/44	5.91
Signal transducing adapter molecule 1	M	Q92783	1380,1372	GPPPSGAYLVAGNAQMSH	18	1753.83	1.22	2	9.44E-14	5.9	0.5	1977.0	1	26/34	7.63
Heat shock 70 kDa protein 13	ER	P48723	2250	LPLPTPKVIGIDLGT	16	1634.97	0.65	2	2.48E-05	2.8	0.4	428.3	1	15/30	
TNF receptor-associated factor 1	C	Q13077	1148	ASHLALATSIHQSQ	14	1463.76	1.19	2	2.14E-06	5.0	0.5	2343.0	1	21/26	7.47
TNF receptor-associated factor 1	C	Q13077	1195	EASHLALATSIHQSQ	15	1592.80	0.27	2	2.39E-04	3.2	0.4	511.8	1	16/28	5.13
Toll-like receptor 7	M	Q9NYK1	2219	LEELDISKNLSFLPS	16	1791.94	0.29	2	1.35E-04	3.6	0.4	542.9	1	18/30	5.47
Transcobalamin-2	E	P20062	1710	LPPYRQSISVLAGST	15	1588.87	-0.43	2	2.77E-06	3.0	0.3	956.6	1	17/28	4.82
Transferrin receptor protein 1	M	P02786	1458	GGYVAYSKAATVTGKL	16	1585.86	0.29	2	4.91E-08	4.5	0.5	2406.7	1	24/30	7.12
Transferrin receptor protein 1	M	P02786	1487	YVAYSKAATVTGKLV	15	1570.88	0.00	2	3.97E-05	4.0	0.3	1077.9	1	19/28	5.54
Transferrin receptor protein 1	M	P02786	1548	NPGGYVAYSKAATVTGKLVH	20	2033.08	0.61	3	1.09E-05	5.1	0.4	1574.6	1	35/76	6.14
Transferrin receptor protein 1	M	P02786	2120	LKAFTYINLDKAVLG	15	1665.96	0.42	2	5.53E-06	3.8	0.3	454.2	1	18/28	5.24
Transferrin receptor protein 1	M	P02786	2304	SQLLSFVRDLNQY	13	1582.82	0.71	2	1.74E-08	3.8	0.3	1088.0	1	17/24	5.69
Transferrin receptor protein 1	M	P02786	2334	ATWTIQGAANALSGDV	16	1574.78	0.55	2	8.15E-05	3.8	0.4	1262.5	1	21/30	6.16
Transferrin receptor protein 1	M	P02786	1351,1360	YVAYSKAATVTGKL	14	1471.82	1.33	2	1.18E-10	4.6	0.4	2504.7	1	22/26	6.32
Transthyretin (Prealbumin)	E	P02766	1728	EGIYKVEIDTKSYWK	15	1858.96	0.89	3	4.88E-07	3.7	0.3	1176.7	1	30/56	5.04
Uncharacterized protein C19orf10	C	Q969H8	1095	KTEEFVTKTAVAH RPG	17	1899.99	0.13	2	1.01E-09	4.3	0.4	1635.1	1	21/32	6.33
Uncharacterized protein C19orf10	C	Q969H8	1183	TEEFVTKTAVAH RPG	16	1771.90	1.23	2	1.41E-10	4.1	0.4	1385.4	1	20/30	5.62

Vacuolar ATP synthase subunit d 1	End	P61421	1436	DLKLHLQSTDYGN	13	1503.74	0.31	2	4.88E-07	2.7	0.3	678.2	1	16/24	
Vacuolar ATP synthase subunit d 1	End	P61421	2038	EDLKLHLQSTDYGNFL	16	1892.94	1.11	2	7.73E-07	4.6	0.4	783.1	1	17/30	6.02
Vacuolar ATP synthase subunit d 1	End	P61421	2110	DLKLHLQSTDYGNFL	15	1763.90	1.36	2	6.33E-08	3.9	0.4	1244.5	1	19/28	5.83
Vacuolar protein sorting-associated protein 13C	End	Q709C8	2267	IAEIKIQGLDSSLSL	15	1586.90	-0.41	2	1.25E-07	3.5	0.5	1236.6	1	19/28	6.24
WD repeat-containing protein 1	C	O75083	1817	APSGFYIASGDVSGKL	16	1568.80	0.45	2	4.61E-10	5.3	0.5	2808.1	1	25/30	7.83
Zinc finger CCCH type antiviral protein 1	C	Q7Z2W4	1240,1250	SQEFLASASASAER	14	1453.69	1.25	2	2.00E-07	5.0	0.5	2733.7	1	23/26	7.34

Taula 9: Llistat dels pèptids aïllats de DR407. L*: Localització de la proteïna font. DeltaM: és l'error que hi ha en la mesura de l'ió precursor, és a dir la diferència entre el que s'ha mesurat en el espectròmetre i la massa teòrica de la seqüència identificada; Z: càrrega del pèptid; P (pep): probabilitat del pèptid/proteïna que representa estadísticament la probabilitat de trobar un altre identificació bona per atzar; XC (cross-correlation score): correlació del pèptid candidat per l'arxiu aportat com a resultat, com més gran és el valor millor és la identificació; Delta Cn: És una mesura de com de semblants són les identifications (hits), indica quant millor és el primer hit respecte el segon. Sp (preliminary score): Valor preliminar del pèptid candidat, com més elevat és el valor millor. RSp; (Ranking Sp) Classificació del valor preliminar entre els pèptids candidats per una determinada identificació. Ions: mostra el nombre de ions que s'ajusten per cada arxiu .dta; D: Calculat seguint la fórmula descrita a l'article de Carrascal M et al. 2008

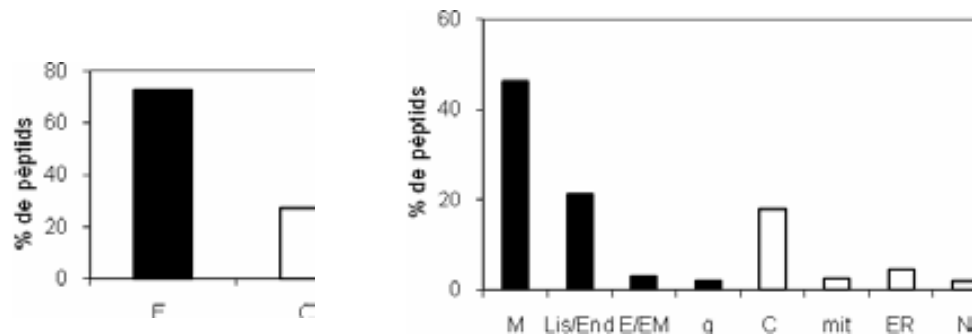


Figura 20: Localització de les proteïnes origen dels pèptids aïllats de DR407 en la línia homozigota JHAF. Distribució cel·lular de les fonts proteiques en funció de la seva via de processament, E: via endocítica (barres negres); C: via citosòlica (barres blanques). Aquests dos grups es separen en el gràfic de la dreta en funció de la seva localització cel·lular. M, membrana plasmàtica; Lis/End, lisosomes o endosomes; E, exògenes; EM, matriu extracel·lular; g, Golgi; C, citosol; mit, mitocondria; ER, reticle endoplàsmic; N, nuclear.

3. DESCRIPCIÓ DEL MOTIU D'ANCORATGE DE DR407 (DRA1*0101; B1*0407)

3.1. Identificació dels nonàmers d'unió a DRB1*0407

3.1.1 Comparació de les seqüències de les cadenes β dels diferents al·lells

El mètode que hem utilitzat per determinar els motius d'ancoratge de la molècula d'HLA-DR, es basa en la idea que els perfils de les butxaques són gairebé independents de la resta del solc d'unió del pèptid (Hammer, Gallazzi et al. 1995). Així, un cop s'ha determinat el perfil d'unió d'una butxaca in vitro, aquest pot ser compartit per altres al·lells sempre i quan els aminoàcids que formen part de la butxaca siguin idèntics (Sturniolo, Bono et al. 1999). Existeixen una gran varietat d'al·lells de DRB1, fins al moment n'hi ha descrits 453 (Holdsworth, Hurley et al. 2009), amb només 2 al·lells de DRA. És important remarcar però que tot i el gran polimorfisme d'aquests gens, hi ha regions que no presenten gaire variació i per tant si aquestes zones més conservades formen part d'alguna butxaca d'unió al pèptid, es pot assumir que aquells al·lells idèntics uniran en aquella posició els mateixos tipus d'aminoàcids. Aquest és el cas de la regió de l'HLA-DR que conté els residus on es situa la posició 1 del pèptid, que està molt conservada entre els diferents al·lells. Aquest mateix sistema ja es va utilitzar en un treball previ del nostre laboratori per la descripció del motiu d'ancoratge de l'al·lel HLA-DR10 associat a AR (Alvarez, Collado et al. 2008).

Així el primer que es va fer va ser analitzar quins eren els aminoàcids de la cadena beta de la molècula de MHC de classe II implicats en la formació de les butxaques d'unió al pèptid, i per fer això es va revisar la bibliografia que hi havia publicada fins al moment, i les estructures cristal·logràfiques de les diferents molècules de DR. A la figura 21 es mostren en diferents colors els aminoàcids que formen

les diferents butxaques d'interacció amb els pèptids. La butxaca on es col·loca la posició 1 del pèptid (P1), del residu 80 al 91, com ja hem comentat, és una zona comú a molts al·lells, i aquest és el cas de l'al·lel DR B1*0407 (Figura 21) que té exactament la mateixa seqüència que DRB1*0101 i *0401 dos al·lells molt estudiats i del qual es coneixen perfectament els motius d'ancoratge. Per tant vam assumir que DRB1*0407 unia a P1 els mateixos residus que DRB1*0101 i que altres variants de DR4, és a dir aminoàcids amb cadenes laterals hidrofòbiques o aromàtiques, preferentment Phe, Ile, Leu, Val, Tyr, Trp, tot i que també acceptaven Ala i Met (<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/FindYourMotif.htm>).

També es va comparar DRB1*0407 amb les altres variants de DR4 (Figura 22). El que es va veure és que DRB1*0407 presentava molt poques variacions respecte a les altres variants de DR4. Entre *0407 i *0403 només hi havia un aminoàcid diferent i aquest es trobava formant part de la butxaca P1, les diferències amb els al·lells B1*0401 i B1*0405 eren de dos residus, que en el cas de *0401 es trobaven formant part de la regió que forma la butxaca P4 i en el cas de *0405 les diferències es trobaven a P9 i P4. Val a dir que l'al·lel amb el qual es diferenciava més era B1*0402, l'altre al·lel no associat a AR, amb el qual hi havia 5 residus de diferència.

3.1.2 Selecció dels nonàmers

Abans de seleccionar els nonàmers s'eliminaven les seqüències repetides, és a dir, dels grups de famílies peptídiques ens quedàvem només amb la regió comú entre tots els pèptids que la formaven. D'aquesta manera dels 151 lligands identificats es van definir 68 seqüències centrals diferents.

Un cop sabíem els aminoàcids que podien localitzar-se a la posició P1 del solc d'unió, fixant aquesta posició, es definien tots els possibles nonàmers dins de cada seqüència. Per fer això de forma automàtica es va dissenyar una eina informàtica (*motifs v0.9*) que seleccionava tots els possibles nonàmers d'un conjunt de seqüències, definint els residus de la posició 1. Aquest programa va ser dissenyat pel Dr. Joaquin Abián del laboratori de Proteòmica CSIC-UAB, i està disponible a <http://code.google.com/p/mhc-laia-motifs/>. El programa motifs v0.9, calculava també una matriu de freqüències i una segona matriu de freqüències normalitzades respecte la freqüència mitja de cada aminoàcid dins el proteoma humà. Els resultats es podien visualitzar en una fulla d'excel, i també gràficament. En funció del nombre de residus aromàtics i hidrofòbics i de la longitud, cada un dels pèptids podien generar diferent nombre de *cores* de 9 aminoàcids. Només 3 dels 68 pèptids no tenien un possible residu P1. Seguint aquest model es van obtenir 223 nonàmers.

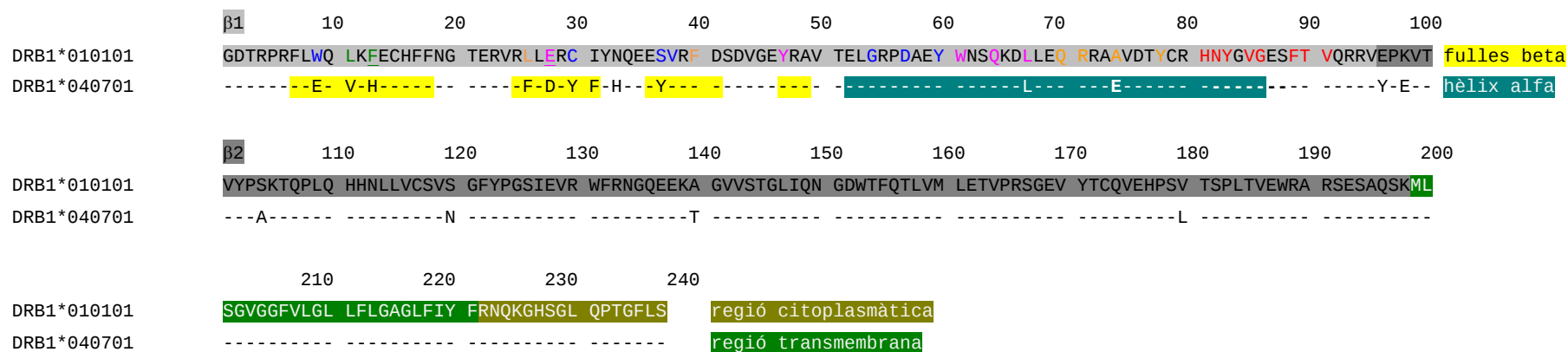


Figura 21: Seqüències de les cadenes β dels al·lels DRB1*0101, *0407. Amb diferents colors s'indiquen els aminoàcids implicats en la formació de les butxaques P1 (vermell), P4 (en taronja o subratllat), P6 (verd), P7 (rosa) i P9 (blau), implicades en la unió amb el pèptid.

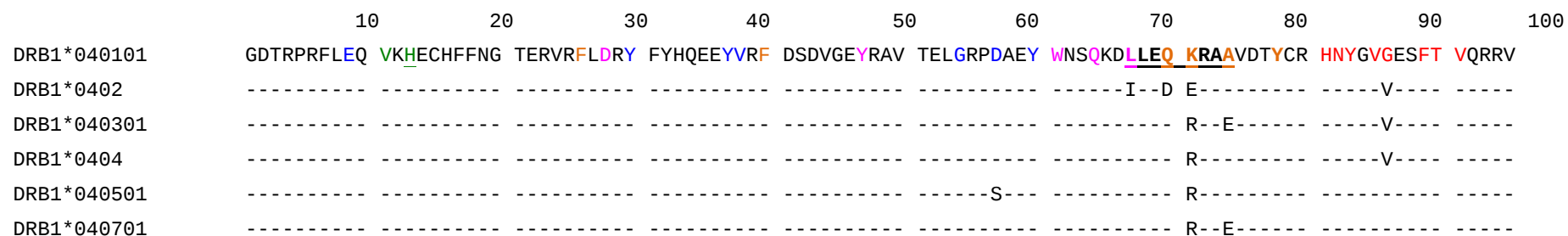


Figura 22: Seqüències del domini β1 de les variants de DR4. Subratllat, l'epítot reumatoide compartit. Codi de colors com a la figura 21.

3.2. Generació de les matrius per la caracterització del motiu d'unió a DR407

A partir dels 223 possibles nonàmers es generava la primera matriu de freqüències, calculant la freqüència de cada un dels 20 aminoàcids a cadascuna de les 9 posicions. Les matrius es corregien per la freqüència dels aminoàcids dins el conjunt de proteïnes humanes (<http://www.ebi.ac.uk/integr8/StatsAminoPage.do?orgProteomeld=25>). A partir d'aquí, s'anaven generant matrius cada vegada més restringides en funció dels resultats que s'anaven obtenint, o de dades prèviament publicades sobre altres subtipus de DR4.

Comparant les seqüències dels diferents al·lels de DR4, es va veure que la posició 6 era comú per totes les variants. Per tant, per restringir el nombre de nonàmers i generar la segona matriu es van seleccionar els *cores* que contenien en P6 els residus comuns per aquesta posició: Ser, Thr, Asn, Gln, Arg o Val (<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/FindYourMotif.htm>). Així, quan una seqüència generava més d'un possible nonàmer però entre aquests només un presentava un P6 correcte, es seleccionava aquest i s'eliminaven els altres. D'aquesta manera es va limitar el nombre de nonàmers a 159 (Figura 23).

Per fer la següent selecció ens vam basar en les dades descrites per Davenport (Davenport, Godkin et al. 1997), que demostraven que a la posició P4 es veuen desfavorits els aminoàcids amb càrrega negativa, tal i com passava també en els altres al·lels no associats a AR (DRB1*0402 i *0403). Per tant la següent selecció va ser d'aquells *cores* que no contenien Asp ni Glu en posició 4, quedant-nos amb 147 nonàmers per fer la tercera matriu. En aquesta matriu observàvem un afavoriment evident d'Asp en posició 7, i aquest va ser el criteri que vam seguir per fer la quarta matriu, vam seleccionar els *cores* amb Asp en P7, així ens quedàvem amb 131 nonàmers (Figura 23). A la quarta matriu es feia evident la presència de Gln en posició 9. Aquest afavoriment ja s'havia observat anteriorment (Davenport, Godkin et al. 1997). Seleccionant els *cores* amb Gln en P9 ens vam quedar amb 124 seqüències per construir la cinquena matriu. I la última matriu la vam fer seleccionant un únic *core* per seqüència, aquesta selecció la vam fer valorant, a partir de la última matriu realitzada, quin dels nonàmers donava un valor més elevat d'unió. Aquesta última matriu definia el motiu d'ancoratge de DR407.

Un cop teníem la matriu de freqüències final, es normalitzava respecte la freqüència mitja de l'aminoàcid dins el proteoma utilitzant una distribució Xi-quadrat i s'aplicava la correcció de Bonferroni. A la figura 24 es mostra la freqüència de cada aminoàcid en cada una de les posicions i el seu augment o disminució respecte a l'abundància relativa dins el proteoma humà. A continuació es comenten els residus augmentats o disminuïts de manera significativa en cadascuna de les posicions: La posició 1 (P1) estava ocupada principalment per Phe i Tyr (incrementades més de 7 vegades respecte al proteoma humà), en aquesta posició també trobàvem augmentades significativament la Leu i Ile (2.5 i 3.5 vegades respectivament). A la posició 3 trobàvem augmentada la presència de Ile 3.5 vegades més que en el conjunt de proteïnes humanes. La butxaca P6 semblava ser, juntament

amb P1 una de les més restringides, s'observava un augment significatiu d'Asn Thr i Val amb augments de 7.2, 3.6 i 3.5 vegades respectivament. L'Asp en la posició 7 estava augmentat 5.4 vegades i en P9 la Gly es veia incrementada 3.4 vegades. A part d'aquests augments significatius, hi havia aminoàcids que es veien incrementats però només abans de fer la correcció de Bonferroni, aquests residus es van considerar residus d'ancoratge secundaris. D'aquesta manera s'observava un augment significatiu de Val en P2, Ala en P4 i P7, Ser en P6, Trp en P8 i Gln en P9.

M1	1 2 3 4 5 6 7 8 9
A	8 6 7 8 7 6 9 7 8
C	0 0 0 0 0 0 0 0 0
D	0 3 1 6 12 10 14 8 8
E	0 3 3 2 2 2 1 2 3
F	14 4 6 6 3 2 3 4 3
G	0 3 5 4 5 3 6 6 8
H	0 2 3 3 1 4 3 5 3
I	18 11 12 6 9 5 4 4 3
K	0 5 6 6 10 6 7 5 4
L	9 5 5 6 4 4 4 4 4
M	6 4 4 2 1 1 4 5 3
N	0 5 8 11 10 13 3 5 7
P	0 4 2 2 2 2 1 1 3
Q	0 5 3 5 4 6 8 9 10
R	0 3 2 1 2 2 2 3 4
S	0 4 5 6 7 7 8 5 8
T	0 7 6 7 10 8 7 8 6
V	14 10 10 8 5 9 7 5 4
W	10 7 2 7 2 6 6 7 8
Y	21 9 10 6 3 4 2 7 6

M2	1 2 3 4 5 6 7 8 9
A	6 5 6 9 8 3 7 6 8
C	0 0 0 0 0 0 0 0 0
D	0 3 1 4 8 4 14 6 8
E	0 2 3 1 1 0 1 2 2
F	15 5 5 5 5 3 4 3 3
G	0 2 4 4 7 3 7 5 8
H	0 2 2 4 1 1 1 5 5
I	18 9 13 7 11 4 4 3 2
K	0 5 6 6 10 5 7 6 4
L	8 4 6 5 5 2 3 5 3
M	7 6 5 3 0 2 6 7 4
N	0 5 7 9 8 17 3 6 7
P	0 4 2 2 2 2 1 1 3
Q	0 6 4 5 5 8 8 9 10
R	0 2 2 1 2 3 2 2 3
S	0 3 4 8 8 10 9 5 7
T	0 8 7 8 10 11 8 8 5
V	13 12 12 7 4 13 5 4 3
W	13 5 3 5 3 8 8 8 8
Y	22 11 9 6 3 1 1 9 8

M3	1 2 3 4 5 6 7 8 9
A	6 6 5 9 8 3 8 6 7
C	0 0 0 0 0 0 0 0 0
D	0 3 1 1 9 2 14 7 9
E	0 1 2 0 2 0 1 2 2
F	15 5 6 6 4 3 4 4 3
G	0 2 4 4 6 3 8 6 9
H	0 3 3 4 1 1 1 5 5
I	18 8 13 7 10 3 3 3 2
K	0 5 7 6 11 4 7 5 4
L	8 4 6 5 5 2 3 5 3
M	8 6 5 3 0 2 5 8 5
N	0 5 8 10 8 18 3 6 6
P	0 4 2 2 2 2 1 2 3
Q	0 6 4 5 5 9 8 9 11
R	0 2 2 1 1 2 2 2 4
S	0 2 3 7 7 11 8 5 6
T	0 8 8 9 9 12 7 7 5
V	13 13 12 8 4 13 5 3 3
W	14 5 3 6 3 9 9 8 6
Y	20 10 9 7 3 0 1 9 9

M4	1 2 3 4 5 6 7 8 9
A	6 6 6 10 9 3 9 7 8
C	0 0 0 0 0 0 0 0 0
D	0 4 0 1 7 1 16 6 7
E	0 2 2 0 2 0 2 2 2
F	18 8 8 6 5 2 3 4 2
G	0 2 4 4 6 3 7 6 10
H	0 3 1 0 2 0 2 4 8
I	14 8 13 7 11 3 4 3 3
K	0 4 7 7 12 5 8 4 4
L	9 4 6 5 6 3 3 5 3
M	9 7 6 4 0 2 6 9 5
N	0 4 8 10 9 20 2 4 5
P	0 3 2 2 1 2 1 2 3
Q	0 6 4 6 4 7 8 9 12
R	0 3 2 1 1 3 3 2 4
S	0 3 3 9 8 11 8 5 6
T	0 6 7 9 8 12 7 6 5
V	11 12 10 5 3 13 3 3 2
W	15 6 3 7 4 10 10 9 6
Y	21 11 9 8 3 0 0 8 7

M5	1 2 3 4 5 6 7 8 9
A	5 7 6 10 10 3 9 7 9
C	0 0 0 0 0 0 0 0 0
D	0 3 0 1 8 1 17 7 8
E	0 2 2 0 2 0 2 2 2
F	17 6 7 6 3 0 1 3 1
G	0 2 4 4 6 3 7 6 11
H	0 3 0 0 2 0 2 4 8
I	14 7 14 7 11 3 3 4 2
K	0 4 8 7 13 5 7 5 4
L	9 4 6 6 6 3 3 5 3
M	9 7 6 4 0 2 6 9 4
N	0 4 6 7 6 20 2 4 6
P	0 3 1 2 1 2 1 2 3
Q	0 6 4 6 5 6 7 6 12
R	0 3 2 1 2 3 3 2 4
S	0 2 3 9 9 12 9 5 7
T	0 6 8 9 8 13 8 6 5
V	10 12 11 6 3 13 4 3 2
W	16 6 3 7 4 10 11 10 4
Y	20 10 8 8 3 0 0 9 6

M6	1 2 3 4 5 6 7 8 9
A	1 5 6 14 13 0 15 3 11
C	0 0 0 0 0 0 0 0 0
D	0 1 0 2 15 0 32 6 12
E	0 2 4 0 4 0 2 1 0
F	29 2 2 7 2 0 0 6 0
G	0 2 5 4 7 1 1 4 18
H	0 5 0 0 3 0 3 5 3
I	14 5 18 10 10 2 4 5 2
K	0 6 8 3 17 1 6 5 4
L	10 6 10 5 5 2 4 8 2
M	3 10 8 4 0 0 4 10 4
N	0 4 5 0 2 36 2 0 7
P	0 2 1 3 1 1 1 0 1
Q	0 7 5 7 0 2 5 8 15
R	0 4 3 0 2 3 2 4 1
S	0 2 3 11 5 13 9 3 7
T	0 1 10 11 5 20 2 4 5
V	6 13 12 9 4 19 6 5 1
W	10 12 0 0 0 0 0 17 0
Y	28 11 0 10 3 0 0 8 6

Figura 23: Matrius seqüencials obtingudes en la generació del motiu d'ancoratge de DR407. M1: Matriu amb els 223 nonàmers possibles; M2: Matriu seleccionant la posició 6 (159 nonàmers); M3: Matriu generada eliminant els cores amb una residu àcid en posició 4 (147 nonàmers); M4: Selecció dels cores amb Asp en posició 7 (131 nonàmers); M5: Matriu generada afavorint la presència de Gln en P9; M6: Matriu final generada seleccionant un únic nonàmer per pèptid.

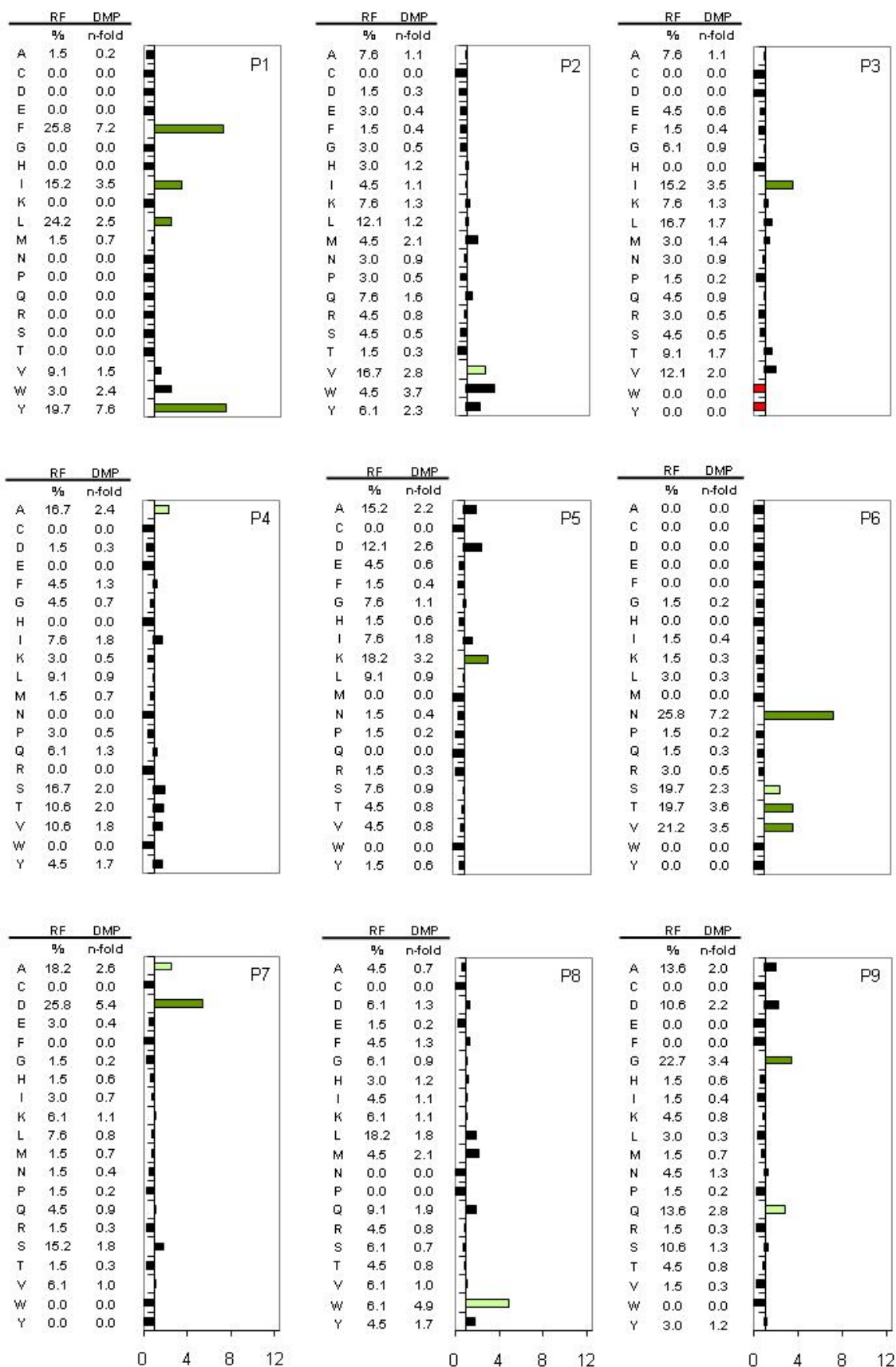


Figura 24: Descripció del motiu d'ancoratge d'HLA-DR407. Per cadascuna de les posicions del *core* del pèptid (P), s'ha calculat el percentatge de freqüència de cada aminoàcid (RF: Freqüència del Residu). Els valors normalitzats s'han calculat com el nombre de vegades que cada RF estava incrementada o disminuïda en relació amb la freqüència mitja del corresponent residu dins el proteoma humà (desviació respecte a la mitja del proteoma:DMP). Els valors de DMP es mostren representats en histogrames. Les barres verdes mostren els valors incrementats i les vermelles disminuïts significativament després de la correcció de Bonferroni, en verd fluix es mostren els valors augmentats significativament abans de la correcció de Bonferroni.

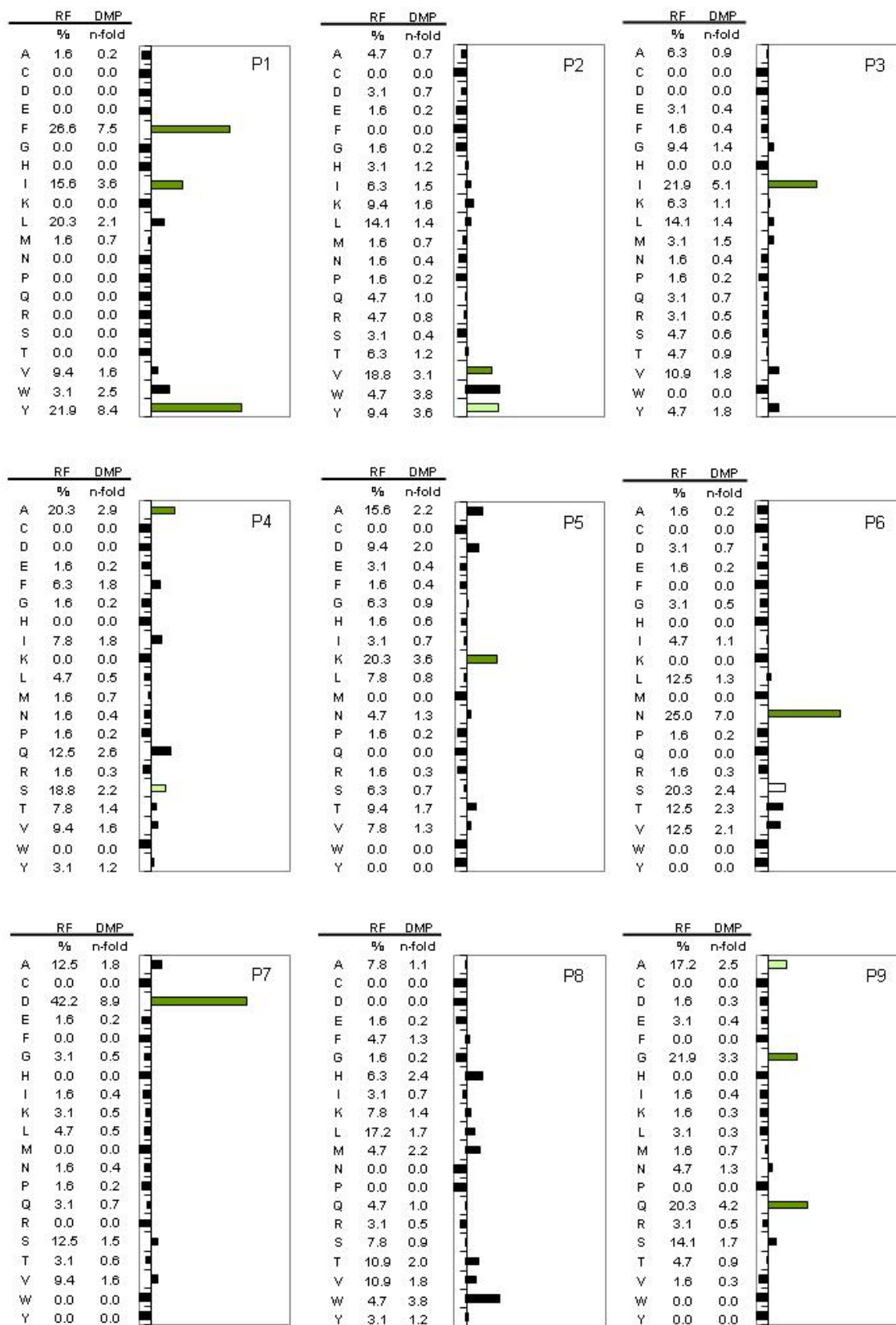
3.2.1 Control del sistema de generació de les matrius

Per comprovar que el sistema per generar les matrius no era massa subjectiu i que el fet de seleccionar determinades posicions des d'un principi no esbiaixava els resultats obtinguts vam generar les matrius seguint diferents criteris i els resultats que es van obtenir van ser molt semblants en tots els casos. La majoria dels cores seleccionats a la matriu final eren els mateixos, seguint el criteri que seguíssim.

Com a exemple es mostren els resultats obtinguts fent les seleccions basant-nos exclusivament en els resultats que anàvem obtenint. D'aquesta manera després de la primera matriu el primer que es feia evident era l'elevada presència d'Asp en P7 i aquesta era la primera selecció que fèiem. Després s'evidenciava un enriquiment d'Asn en P6 i de Gln en P9, per últim en tots els casos estudiats es seleccionava un *core* per seqüència valorant en funció de la última matriu obtinguda quin dels possibles *cores* donava un valor d'unió més alt. Els resultats de la freqüència de cada aminoàcid per cada posició seguint aquest criteri, es mostren a la figura 25. Tot i que sí que s'observa un increment de la importància de la posició seleccionada en primer lloc, en conjunt els residus que es veuen significativament incrementats, són els mateixos. Altres combinacions, com la no restricció a la posició 6 o a la posició 4, donaven els mateixos resultats (dades no mostrades).

3.3. Comparació dels resultats amb les dades prèviament publicades

El motiu d'ancoratge descrit per DRB1*0407 en aquest treball (figura 26) es compara amb el motiu publicat al 1997 per Davenport et al. (Davenport, Godkin et al. 1997). Aquest treball es va realitzar mitjançant anàlisi de seqüències en pool i amb 10 pèptids individuals, entre els quals tres pertanyien a una família de pèptids (taula 10). Aquest motiu es pot trobar on line a la base de dades SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>). En el programa ProPred, encara no hi ha matriu descrita per aquest al·lel.



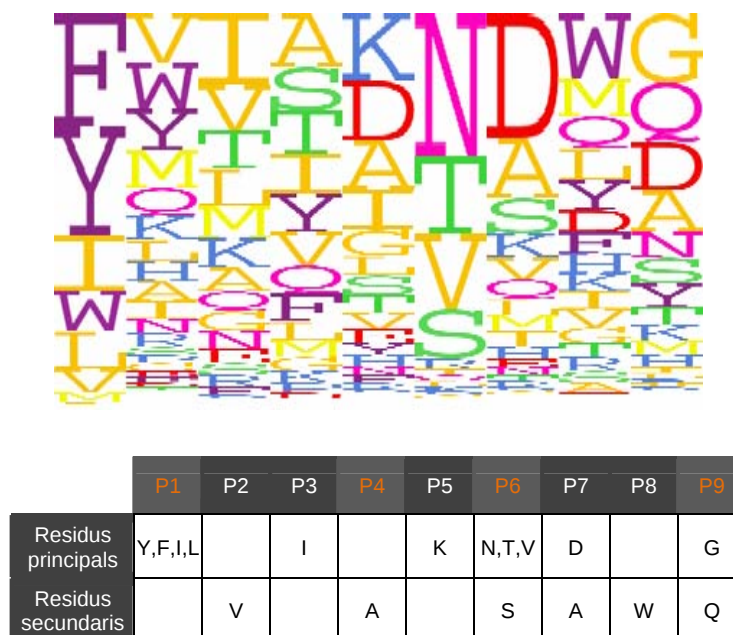


Figura 26: Motiu d'ancoratge de DR407. Representació esquemàtica dels percentatges de cada aminoàcid en cada una de les posicions, de P1 a P9, normalitzats respecte la freqüència de cada aminoàcid dins el conjunt del proteoma. A baix, motiu d'ancoratge de DR4, els residus principals són aquells que es veien incrementats significativament després de la correcció de Bonferroni. Els residus secundaris eren aquells que estaven augmentats significativament únicament abans de la correcció de Bonferroni.

Butxaca 1 (P1): Els resultats per aquesta posició concorden. Tot i això a l'article de Davenport et al. (Davenport, Godkin et al. 1997) deien que en P1 es veien afavorits els residus aromàtics per sobre dels hidrofòbics degut a la presència d'una Gly a la posició 86 de la cadena β de l'HLA-DR, i els nostres resultats mostren una major presència de Tyr i Phe, però la Leu i Ile també estan significativament incrementades respecte al proteoma. Aquesta butxaca està molt conservada entre les diferents molècules de DR, tot i això, existeix un dimorfisme a la posició β 86 pel qual alguns al·lels entre ells DRB1*0402, *0403 i *0404 presenten Val enlloc de Gly. La presència de Val si que s'ha vist que modifica els residus acceptats en aquesta posició, ja que té una cadena lateral més gran que la Gly i per tant la mida de la butxaca disminueix i aminoàcids amb cadenes laterals grans com els aromàtics no hi caben.

Butxaca 4 (P4): Els nostres resultats no mostren preferència clara per cap residu en aquesta posició. La Ala només està augmentada significativament abans de la correcció de Bonferroni, per tant és un residu secundari. En el motiu descrit en el SYFPEITHI, mostren en P4 preferència per Ala, Val i Lys. Tots els treballs de caracterització de motius d'ancoratge de variants de DR4 descriuen la posició 4 com una de les més importants. En canvi, els nostres resultats indiquen que aquest no és el cas de DR407. Aquesta diferència podria ser important en la manca d'associació d'aquest al·lel amb RA.

Butxaca 6 (P6): Els nostres resultats i els de la bibliografia coincideixen en la presència afavorida en P6 de Asn, Thr, Ser i Val. Segons les nostres dades, la presència d'Asp en posició 6 a la matriu definida per Davenport podria ser conseqüència de la seqüenciació en pool, i realment aquest afavoriment d'Asp en P6 que ells observen, correspondria a la que nosaltres detectem en P7.

Butxaca 7 (P7): Davenport et al. descriuen que en aquesta posició es localitzen residus polars, alifàtics i carregats, i que per tant molts aminoàcids són acceptats, de manera semblant al que passa amb els al·lèls de DR4 associats a AR. A la seva matriu, la posició 7 sembla ser irrellevant. Els nostres resultats són més restrictius per aquesta posició i s'observa dominància significativa d'Asp o Ala.

Butxaca 9 (P9): En aquesta posició els nostres resultats mostren com a residu principal la Gly i com a residu secundari la Gln. D'acord amb els nostres resultats, la bibliografia diu que en P9 s'afavoreixen la Gln i l'Asn. L'Asn a les nostres dades també es veu augmentada, però no de manera significativa.

DRB1*0407										Seqüència	Referencia
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9			
F			A		N			Q	YDHN F V K A I N A I Q KS	Cathepsin C 146-160	
Y			V		T			N	VDDT Q F V R F D S D A A	HLA-B*1501 28-41	
W			K		D				DLRS W T A A D T A A Q I	HLA-Cw*1402 129-143	
					S				DLRS W T A A D T A A Q IT Q	HLA-Cw*1402 129-144	
									LRS W T A A D T A A Q IT	HLA-Cw*1402 130-143	
									MRY F Y T A V S R P G	HLA-Cw*17 5-16	
									SGTD F TL T I S R L E P E	Ig kappa chain precursor 88-102	
									GPTTY K V T S S L Q I K E	IgM heavy chain 173-187	
									LPSY E E A L S L P S K T	LAMP 236-249	
									YPTQRARY Q W V R C N P D S N S	PGSG 1-19	

Taula 10: Motiu d'ancoratge i llista de les seqüències que es troben a la base de dades de SYFPEITHI

4. UNIÓ TEÒRICA DELS LLIGANDS NATURALS DE DRB1*0401 A ALTRES VARIANTS DE DR407, ASSOCIADES O NO AMB AR, I COMPARACIÓ DELS REPERTORIS

Utilitzant el programa ProPred (veure material i mètodes) vam voler definir de manera teòrica, quants dels lligands de DR407 podrien unir-se a les altres variants al·lèliques de DR4. Gairebé un 42% dels lligands podien unir-se a DRB1*0401, més d'un 27% a *0404 i gairebé un 36% a *0405. Un 25% dels lligands podia unir-se teòricament a l'altre al·lel de DR4 no associats amb AR, DRB1*0402.

Per estudiar els solapaments de repertoris entre els diferents al·lèls de DR4, associats o no a AR, es va comprovar si algun dels lligands que havíem seqüenciat, s'havia vist associat a alguna altra variant en publicacions prèvies. Així, dels 151 lligands naturals de DRB1*0407 identificats, 33 eren idèntics o variants de longitud de lligands de DRB1*0401 (Lippolis, White et al. 2002; Muntasell, Carrascal et al. 2004; Dengjel, Rammensee et al. 2005; Dengjel, Schoor et al. 2005), 3 de *0404 (Kirschmann, Duffin et al. 1995) i 4 de *0405 (Kinouchi, Kobayasi et al. 1994), en canvi no es va trobar cap lligand igual que els prèviament publicats per *0402. Val a dir que el nombre de lligands publicats per *0401 és deu vegades més alt que el de qualsevol de les altres variants.

MOTIU D'ANCORATGE DE LA MOLÈCULA DR8 (DRA1*0101 DRB1*0801)

Els resultats obtinguts en aquest apartat es presenten en forma d'article enviat a publicació el juny a la revista Diabetologia.

L'al·lel DR8 és un al·lel relativament poc freqüent a la majoria de poblacions, encara que està associat amb algunes malalties autoimmunitàries com la cirrosi biliar (Mullarkey, Stevens et al. 2005; Donaldson, Baragiotta et al. 2006) o l'artritis juvenil idiopàtica (Runstadler, Saila et al. 2003). També s'ha demostrat recentment que l'haplotip DRB1*0801-DQA1*0401-DQB1*0402 està associat amb la susceptibilitat a diabetis de tipus 1 (T1D) (Erich, Valdes et al. 2008). Aquesta associació fa particularment important la definició del seu motiu d'ancoratge peptídic, ja que els seu coneixement podria afegir informació a la recerca d'epítops diabetogènics dels autoantígens. L'haplotip DR8 té una peculiaritat respecte als altres haplotips de DR, ja que només un dels gens de DRB (DRB1) està expressat i per tant no hi ha interferència d'altres molècules de DR al estudiar els pèptids associats, sempre que s'utilitzi una cèl·lula homozigota. El nostre treball utilitza una línia cel·lular generada a partir de la sang d'un donant DR8 homozigot. A més hem pogut utilitzar una tecnologia multidimensional que ens ha permès obtenir un gran nombre de seqüències identificables a la base de dades. El resultat demostra que el motiu d'unió de pèptids a DR8 és molt restringit i té semblances importants amb els motius d'unió de dos dels al·lells del MHC associats a diabetis, HLA-DQ8 en humans i I-A⁹⁷ en el ratolí NOD. Aquesta molècula podria ser, per tant, la que dins l'haplotip confereix associació amb T1D.

**The Peptide binding motif of HLA-DR8 shares structural features with other type 1
diabetes-associated alleles**

Short Title: **HLADRB1* 0801 binding motif**

Laia Muixí^{*}, Montserrat Carrascal[†], Pau Marc Muñoz[¶], Carol Guitart^{*}, Juan Cedano[¶], Joaquin
Abian[†], Iñaki Alvarez^{*}, Dolores Jaraquemada^{*}

^{*}Immunology Unit, Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de
Barcelona (UAB), Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain; [†]CSIC-UAB Proteomics
Facility, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona,
Spain; [¶]Bioinformatics Unit, Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB), Universitat
Autònoma de Barcelona (UAB), Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

Corresponding author: Dolores Jaraquemada, Ph.D.

Institut de Biotecnologia i Biomedicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

Phone: +3493 5813084 Fax: +3493 5812011

E-mail: dolores.jaraquemada@uab.es

Number of tables: 0

Number of figures: 5

ABSTRACT

Objective. The aim of this study was to characterize the binding motif of the MHC class II DR8 molecule included in the type 1 diabetes (T1D)-associated haplotype DR8-DQ4, and compare it with that of other T1D-associated MHC class II alleles.

Research Design and Methods. The DR8-bound peptides were eluted from an HLA-DR homozygous lymphoblastoid cell line. Characterization of the repertoire was done by peptide sequencing using a LTQ ion trap mass spectrometer coupled to a multidimensional liquid chromatography system. The software SEQUEST was used to determine the peptide sequences from the MS/MS data.

Results. A total of 486 natural HLA-DR8 peptide ligands were identified that permitted the definition of the HLA-DR8 binding motif by analyzing the data on the bases of serial alignments of all possible cores. The DR8 motif showed a strong similarity to the peptide binding motifs of DQ8 and I-A^{G7}. Some DR8 peptides were identical to peptides previously identified as DQ8- or I-A^{G7} ligands.

Conclusions. The data show that DR8 is likely the susceptibility molecule of the DRB1*0801 (DR8)-DQA1*0401/DQB1*0402 (DQ4) haplotype, since, like other MHC class II T1D-associated alleles HLA-DQ8 and mouse I-A^{G7}, preferentially bind peptides with an acidic residue at position P9 of the binding core, indicating possible sharing of their repertoires.

MHC class II (human HLA-II) molecules are transmembrane glycoproteins that bind mostly exogenous peptides to be presented to CD4⁺ T lymphocytes and are composed of an α and a β chain, where α is essentially monomorphic, but the β chain is highly polymorphic.

Peptides bound to MHC-II are of variable length and interact with different pockets within the binding groove of the molecule. These pockets contain most polymorphic residues, making different alleles to bind a specific group of residues in each pocket (1). Peptides bind with the corresponding pocket residues of the binding groove, via specific interactions of the core residues at relative positions P1, 4, 6 and 9 (anchor residues). For every MHC class II allele, each pocket has a specificity for different residues, determining the binding affinity of the peptides (2).

HLA-DR8 has been associated with the susceptibility to some autoimmune diseases (3-5) and the DRB1*0801 (DR8)-DQA1*0401/DQB1*0402 (DQ4) haplotype is after the high-risk DR3 and DR4 the next most predisposing haplotype to type 1 diabetes (T1D) (6). The major susceptibility alleles are HLA-DQ2 and DQ8, of the DR3 and DR4 haplotypes, respectively, as well as their homologous in NOD mice I-A^{g7} (7; 8). The mouse I-A^{g7} and the human DQ2 and DQ8 diabetogenic class II MHC molecules all share the expression of a non-Asp amino acid at position 57 of the beta chain, whereas most other MHC class II alleles contain a conserved Asp residue at this position (9). The absence of Asp at β 57 is related to the preference of these alleles for the binding of acid residues in the P9 pocket (10-13). This common feature, known to be involved in clinical disease (14; 15), is also found in HLA-DR8, with Ser at β 57 but not in the DQ4 (DQA1*0401/DQB1*0402) molecule of the DR8 haplotype, that has an Asp at β 57.

The crystal structure of I-A^{g7} (16), DQ8 (17) and DQ2 (18), together with peptide binding data and studies of naturally processed peptides selected by these T1D associated molecules (12; 19), permitted the description of the peptide binding motifs for these alleles. However, the HLA-DR8 peptide repertoire has only been partially described (20) and the binding motif remains unknown.

In the present report, we define the DR8 peptide binding motif from the analysis of 486 unique natural ligands, that are the physiological products of antigen processing and presentation (11). Knowing if a peptide would bind to a specific MHC molecule is useful for vaccine or antigen-specific therapy development to rapidly point those most likely MHC-binding peptides and to screen out those peptides that won't bind. Similar to other diabetogenic class II molecules, the main feature of the HLA-DR8 peptide binding motif is that it binds peptides with acidic residues at the P9 pocket.

RESEARCH DESIGN AND METHODS:

Cell lines and antibodies. FN86 is a HLA-DR8 homozygous lymphoblastoid cell line. It was generated in our laboratory by Epstein-Barr virus transformation of B lymphocytes from fresh blood of a DRB1*0801 homozygous donor, following standard procedure (21). The complete HLA typing for the FN86 cells was: HLA-A*0301,*1101; B*0702,*4402; Cw*0102,*0702; DRB1*0801; DQB1*0402. Transformed cells were grown in roller bottles in RPMI (Sigma-Aldrich, ST Louis, MO) with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA), washed twice in cold phosphate buffered saline, and stored as frozen pellets at -80°C until use.

Anti-HLA-DR β mouse IgG2b mAb B8.11.2 (kindly provided by Dr F. Koning, Immunohaematology Dept, Leiden University, The Netherlands), was used for affinity chromatography.

Immunoaffinity purification of HLA-DR-peptide complexes. Peptide-HLA-DR complexes were purified as described (22; 23), with some modifications. Briefly, 10⁹ cells were lysed in 50mM TrisHCl pH 7.6, 150mM NaCl, 0.5% Nonidet P40 (Surfact-Amps NP40) with protease inhibitors (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics, Germany) at 4°C for 1 hour. Lysates were centrifuged for 15 minutes at 1,500g, and supernatants ultracentrifuged for 1 hour at

100,000g and precleared using Tris-blocked sepharose beads. HLA-II-peptide complexes from the lysate were purified by affinity chromatography using 1ml sepharose bead columns with 5 mg purified mAb B8.11.3.

HLA-II-peptide complexes were eluted with trifluoroacetic acid (TFA) 0.1%, following standard procedures (24). Eluted class II-peptide mixtures were spun through 10,000 Da cut-off ultrafiltration filters (Centriprep 10; Amicon, Beverly, MA) and collected from the flow-through.

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MSn) Analysis. Samples were evaporated to dryness, redissolved in 1 ml 1% TFA and desalted using C18 solid phase extraction cartridges (3 ml, 15 mg support, Varian, Lake Forest, USA). The desalted mixtures were concentrated to 5 μ l and diluted to 40 μ l with 1% formic acid. Samples were analyzed by multidimensional liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry (MDLC- μ ESI-ITMS/MS), using a linear LTQ ion trap equipped with a microESI ion source (ThermoFisher, San Jose, CA). Peptide separations were performed on an Agilent 1200 HPLC system composed of a capillary pump, a binary pump, a thermostated microinjector and a microswitch valve. An ion exchange Zorbax Bio-SCX II column (3.5 μ m, 35 x 3 mm) was used for the first LC dimension. Absorbed peptides were eluted using seven salt steps of 0, 10, 25, 50, 100, 500 and 2000 mM ammonium acetate. A Zorbax 300SB-C18 preconcentration cartridge (5 μ m, 5x0.3 mm, Agilent Technologies, Barcelona, Spain) was used to concentrate and desalt each peptide fraction prior to the second LC dimension. Capillary reversed-phase liquid chromatography was performed using a 10-cm long, 150- μ m i.d. Vydac C18 column (Vydac, IL, USA). Separation was done at 1 μ l/min using a linear acetonitrile gradient from 3 to 40% in 120 minutes (solvent A: 0.1% formic acid, solvent B: acetonitrile with 0.1% formic acid). The scan range for full MS was m/z 400-2000. A full scan followed by 8 MS/MS for the most abundant signals were acquired using the automatic

data-dependent mode of the instrument. In order to minimize the redundant selection of precursor ions, dynamic exclusion was set to 1 MS/MS scan for each time window of 5 min.

Database search. MS/MS fragmentation spectra were searched using SEQUEST (Bioworks v3.3, ThermoFisher, San Jose, CA) against a combined target/decoy database consisting of the Human UniProt database (SwissProt release 08/04/2008), to which its reversed or pseudo reversed copy was appended. The decoy database was constructed by reversing the sequence of the proteins in the human SwissProt databases. Search parameters were: peptide mass tolerance, 2 Da; fragment tolerance, 0.8 Da; no enzyme restriction; static modifications, carbamidomethylated cysteine (+57 Da); dynamic modifications, methionine oxidation (+16 Da). Correct peptide sequence identifications were evaluated using both the Xcorr score from SEQUEST and the D value, which was calculated as described (25). Correct identifications were those with scores within the area defining a false discovery rate (FDR) of less than 1%.

Matrix generation. The core sequences of the peptides were identified using the software program *Motifs* 09, created by Dr. Joaquin Abian (software available online at <http://code.google.com/p/mhc-laia-motifs/>). Fixing the amino acids at P1 (based on the similarity of the P1 pocket of most DR alleles), the software identified all the possible cores within the peptide list. The aligned core sequences generated a 20x9 matrix with the percentage of every amino acid at each position. A statistical analysis was then performed as previously described (26). Briefly, the frequency of each amino acid residue in a given peptide position was normalized against the mean frequency of that residue among human proteins (<http://www.ebi.ac.uk/integr8/StatsAminoPage.do?orgProteomeId=25>), using the chi-square test with Yates' correction. Bonferroni correction (P value $\times 20$) was then applied. P values of less than 0.01 before and after correction were considered significant.

Modeling of HLA-DR8 with human peptide IFTVYGLLDKAQDLFG. The interaction between HLA-DQ8 and the melanotransferrin 635-650 peptide (IFTVYGLLDKAQDLFG) was modeled by means of the software Modeller (27), using as template the crystal structure of H-2I-A^b complexed with the CLIP (PVSKMRMATPLLMQA) peptide (1muj) (28). Our peptide sequence was generated by single residue substitutions of the CLIP sequence (29) and then its interaction with the peptide binding groove of HLA-DR8 was simulated. The quality of the resultant complexes was then evaluated with the Verify3d program (30). The best solution of a docking performed with ArgusLab 4.0.1 (Mark A. Thompson, Planaria Software LLC, Seattle, WA. www.arguslab.com) was selected according to the interaction energy. The detailed interactions of the modeled complex and the original template (1muj) were directly calculated using PIC (31). At the end, both interaction tables were compared to assure the reliability of the model. Graphical representation of the complex was done using the Chimera software (32) and the electrostatic potential surface of the DR8 molecule was generated by APBS (33).

RESULTS

*Description of the repertoire of peptides bound to HLA-DR8 (DRA1*0101/B1*0801).* Analysis of the DR8 peptide repertoire was done by sequencing of the bound peptides by MDLC-μESI-ITMS/MS, using a LTQ ion trap mass spectrometer. Over 40,000 MS/MS spectra were acquired from 2 samples and the data were searched against a protein target/decoy human database (25). The target/decoy strategy is based on the principle that incorrect matches have an equal probability of being derived from either the target or the decoy database (34; 35). In contrast, spectra with relevant sequence information will match their corresponding sequence in the target database but not in the decoy database. As quality control, manual checking of at least one spectrum from each peptide family and all single spectra was done, after which a total of 486

different natural DR8 ligands were identified (see Table 1, supplementary Table). Most peptides were present as “peptide families” or “nested sets”, where all the members share a common sequence with varying flanking residues along the C- and the N-termini, as is usual for MHC class II peptides (4; 35). Thus, peptides eluted from DR8 were grouped into 230 different sets, of which 124 were composed by a single peptide and 106 contained 2-34 different peptides. The peptide size showed a normal distribution (figure 1) with sizes ranging from 9 to 43 amino acid length, most (88.7%) within the standard class II size range, 12 to 22 aa (20; 36). Peptides derived from 192 different proteins localized to several cell compartments. To avoid redundancy, the most common localization was assigned to peptides belonging to several compartments. As expected, the proteins followed a pattern common to other B cell line repertoires (24; 37), most were exogenous, membrane proteins or residents of the endocytic pathway, but there were also a significant number of proteins from the cytosol (30.7%), as well as the nucleus and other cellular organelles (figure 1).

Definition of the HLA-DR8 binding motif. Our method to predict the DR8 binding motif was based on the hypothesis that the different pockets are independent from the rest of the peptide binding groove (38; 39). Thus, once the binding affinity of a pocket has been determined, this can be common to other HLA-DR alleles as long as identical residues contribute to the pocket (37; 38).

As shown in figure 2, the β 1 domain sequences of HLA-DR8 and -DR1 differ in 15 residues, none in the region where position 1 (P1) of the peptide is anchored. Consequently, peptides bound to DR1 and DR8 should contain the same aromatic or hydrophobic residues at P1 (Tyr, Phe, Trp, Leu, Ile, Ala, Val or Met) (<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/FindYourMotif.htm>). Thus we defined the peptide cores assigning an aromatic or hydrophobic residue to P1 so that, depending on the

number of these residues and on the sequence length, each peptide could have different cores. According to this model, only 4/228 sequences analyzed did not have a permitted P1 residue.

A frequency analysis of the amino acid residues occupying each of the 9 core positions was performed, defining a frequency matrix that included all possible cores for each sequence without repeated sequences. Thus from 486 peptides, 228 different central sequences were defined (always using the common sequence within a family of peptides). From these central sequences, 789 different P1-P9 cores (nonamers) were obtained to build the frequency matrix. This experimental frequency was normalized over the mean frequency of the same residue among human proteins.

This first matrix showed a clear preference for acid residues in P9 (28% of the nonamers) (see supplementary figure 1). Therefore, when more than one core was defined for a single sequence and only one had Asp or Glu at P9, this was selected and a new matrix was generated, limiting the number of nonamers to 512. A clear preference for Lys in position P6 or P4 was then observed, and cores with this feature were then selected in peptides with more than one core, to produce a new matrix. The remaining multiple-core peptides were then narrowed down on the basis of their best match to the previous matrix. At the end, a final matrix was generated with one possible core for each sequence (figure 3).

Figure 4 shows the frequency of each amino acid residue for each position and their relative increase or decrease respect to their abundance in the human proteome. The data showed that the main significantly increased frequencies corresponded to positions P1, P4, P6 and P9. P1 was mainly occupied by Phe and Tyr (7.2 and 10-fold increase), Lys was preferred in P4 and P6 (3.6 and 4.3-fold increase), and Asp and Glu in P9 (9.3 and 3.8-fold increase). In addition, some residues were increased in other positions: Ile was increased 2.2-fold in P3 and Ala in P7 (2.5-fold increase), indicating preferred residues for non anchor positions. Some amino acids were significantly decreased such as Ser in P4, Leu in P6 and Ala, Lys and Leu in P9. Residues only

significantly increased before Bonferroni correction (figure 3) were considered secondary residues.

Our results also showed that the main restrictive position of the DR8 binding groove was the pocket that harbored the P9 residue. Of the total sequences analyzed, 71% had a core with the correct P1 and an acidic residue at P9, as observed for other T1D-associated MHC alleles, I-A^{g7} (10) and DQ8 (12). As for I-A^{g7} and DQ8, this pocket also accepted Gln, Asn and Gly (12; 38). The decrease of Arg, Lys and Pro at P9 confirmed previous data for non-Asp β57 alleles (38), suggesting that these amino acids at P9 would negatively interfere on the peptide binding to DR8. An interesting result concerned positions P4 and P6, with a clear preference for Lys: 46% of the peptides had Lys in P4 or P6. Of these, 45% (21% of the total) had Lys at P4 and 55% (25% of the total) had Lys at P6. Interestingly, the presence of Lys at one of the two positions excluded the presence of Lys at the other position: no peptide with Lys at both P4 and P6 was identified.

Modeling results. Figure 5 shows the model of DR8 complexed with the melanotransferrin peptide (IFTVYGLLDKAQDLF). This peptide was selected because it was relatively small, fitted the DR8 binding motif (Tyr at P1, Leu at P4, Lys at P6 and Asp at P9) and should therefore be a good binder.

A docking was performed to automatically calculate the possible unions of DR8 with the peptide, confirming our hypothesis, i.e. the most stable union that localized the peptide inside the binding groove had the predicted P1-P9 residues.

The interactions between the peptide and the DR8 molecule were calculated with the PIC (protein interaction calculator) software. Hydrogen bonds were detected but not enough to stabilize the binding. Other hydrophobic and ionic interactions were also detected that would maintain the peptide bound (data not shown).

DISCUSSION

This study provides the first characterization of the peptide binding motif for HLA-DR8 (DRA1*0101/DRB1*0801), part of an HLA haplotype associated to susceptibility to T1D (DRB1*0801(DR8)-DQA1*0401/DQB1*0402(DQ4)). Although it has not been established which of the alleles gives susceptibility to this haplotype, our results suggest that rather than DQ4, the most likely is DR8. Indeed the HLA-DR8 sequence contains a structural feature common to other T1D-associated human (DQ8, DQ2) or mouse (I-A^{g7}) alleles, the absence of Asp at position 57 of the β chain, not found in the DQ4 molecule. In addition, the results show a striking similarity between the peptide binding motif for HLA-DR8 and that of the other T1D alleles, the dominance of acidic residues at the P9 position of the peptide core. This feature is also absent from the HLA-DQ4 peptide binding motif (40).

An immortalized homozygous HLA-DR8 cell line carrying the T1D-associated haplotype HLA-DR8-DQ4 (6) was used for the analysis. There is little information about peptides binding DR8 and no solid information about the peptide binding motif. So far only 50 sequences including nested set groups (20) and two T cell epitopes have been published (41; 42). The use of naturally processed peptides instead of synthetic peptides or phage display libraries for the identification of peptide binding motifs to MHC II molecules has the main advantage that the peptides had been selected by the antigen presenting cells during the antigen processing, where a number of cellular events influence peptide selection (43). We sequenced 486 unique naturally processed DR8-bound peptides by MDLC- μ ESI-ITMS/MS. As expected, most proteins generating the ligands were from membrane compartments, including plasma membrane, Golgi apparatus, endosomes, lysosomes, endoplasmic reticulum, and secretion vesicles. Several peptides arose from cytosolic proteins, consistent with previous findings for other alleles (24; 37).

Despite the high polymorphism of the β chain of the MHC class II molecules, the region comprising β 81- β 92 is common between most HLA-DR alleles, including DR8. This region

forms the pocket where position P1 of the peptide is anchored, permitting the assumption that DR8 will bind hydrophobic and uncharged residues in this position, as all alleles sharing this region do. All but 4 of the sequences contained at least 1 hydrophobic or aromatic residue that could be selected as P1. Thus, this feature was used to define the peptide core, as in the previous definition of the peptide binding motif of RA-associated HLA-DR10 (37).

Class II molecules have a dimorphism that has been conserved through evolution, defined by the presence or absence of Asp at position 57 of the DR or DQ β chain. This dimorphism has been demonstrated to play a major role in the molecule's binding to particular peptides, showing a preference for acid residues in P9 by non-Asp57 alleles, including DR8 (44). Three of the T1D-associated alleles in mice and human, H-2I-A^{g7}, DQ2 and DQ8, share this polymorphism, with Ser or Ala substituting Asp at β 57, as in HLA-DR8 (see supplementary table 2). Thus, the characteristics of the P9 pocket of DR8, DQ8 and its mouse homolog I-A^{g7} are similar and, as a consequence, all preferentially bind peptides with acidic residues at this position. As for DQ8 and I-A^{g7}, no positively charged amino acids at P9 were found in the DR8 peptides. HLA-DQ2, also associated to T1D, contains a highly positively charged binding groove where acid residues are favored not only at P9 but at virtually all positions (19). On the other hand, the DQ4 molecule (DQA*0401/DQB*0402) of the DR8 haplotype has Asp β 57, so we can assume that it will not have acid residue preference at P9, so the susceptibility to T1D of the DR8-DQ4 haplotype is likely given by the DR molecule. Another interesting feature of the DR8 binding motif was the preference for Lys at the P4 or P6 positions, not shared by other T1D associated alleles. The preference was however restricted, since the presence of Lys in one of the positions appeared to prevent the location of the same amino acid in the other. Thus, only one Lys was allowed in the center of the groove, relating pockets 4 and 6. In a previous report, the binding affinity of peptides to DQ8 was shown to be decreased if there was a Lys in position 6 or 4 (12) indicating that this is a specific feature of DR8 peptides that may limit a possible repertoire sharing.

MHC accounts for approximately 50% of the familiar risk for T1D (45). The identity of the $\beta 57$ residue is important both for disease susceptibility and protection: Ala, Ser or Val at $\beta 57$ defines predisposing alleles such as DQ2, DQ8, I-A^{g7} and DR8, whereas Asp is found in protective allele DQ6. The structural explanation for the importance of $\beta 57$ was obtained from the crystal structure of I-A^k and I-A^d, where it was shown that Asp at $\beta 57$ forms a salt bridge with an Arg at position 76 of the α chain (homologous to position 79 on the DQ α chain). This interaction was important for stabilizing the $\alpha\beta$ chain complex and contributed to the integrity of the class II peptide-binding groove (46). The absence of Asp at $\beta 57$ resulted in the loss of the $\beta 57$ - $\alpha 76$ salt bridge, modifying the hydrogen bond network. Without the acid residue, the Arg at $\alpha 76$ shifted slightly to form a hydrogen bond with Leu at $\beta 53$ and Ser at $\beta 57$ via a buried water molecule. The result was the formation of a wider P9 pocket, permitting greater lateral freedom to the side chain of peptide residues. The lack of Asp57 not only gives the potential to interact with peptides containing acidic residues at P9, but also with TCRs with a negatively charged CDR3 β loop (47). The relationship between DR8 and these alleles was further confirmed by the analysis of DR8 peptides and their theoretical capacity to binding DQ8, I-A^{g7} and also DQ2, using the MHC2Pred tool for prediction of promiscuous MHC class II binders (<http://www.imtech.res.in/cgibin/mhc2pred/mhc2pred.p>). Of 216 sequences analyzed, 59 and 51%, respectively, were potential good binders to DQ8 and I-A^{g7}, using a very stringent threshold of 1. No theoretical binding of any peptide to DQ2 was found (data not shown). In addition, we analyzed a number (n=30) of well defined peptides from T1D autoantigens GAD65, HSP60, Proinsulin and ICA69, restricted by I-A^{g7}, DQ8 and DR4 (B1*0401). Half the peptides (15/30), including 6/12 restricted by DR4, showed a perfect fitting to the DR8 motif (see supplementary table 2). On the other hand, some of the peptides isolated from DR8 had previously been identified as DQ8 or I-A^{g7} ligands (5/486, see Table 1, supplementary data).

The polymorphism at $\beta 57$ applies both to DR, DQ and mouse Class II beta chains, but its relationship to T1D risk in humans is more evident within the DQ allele series. A dose effect of this polymorphism in relation to the risk of T1D has not been established, although the highest association corresponds to a haplotype without Asp57 in both DR and DQ β chains (DRB1*0405/DQA1*0301-DQB1*0302) (6) and the highest protection to the DR15 haplotypes, with Asp57 in both DR and DQ β chains (DRB1*15/DQA1*0102-DQB1*06). However, the presence of only one DQ allele lacking Asp57 appears to be enough for susceptibility, as it is the case for DR3 and the other associated DR4 haplotypes (see supplementary table 2). In addition, two protective haplotypes (DRB1*0701/DQA1*0201-DQB1*0303 and DRB1*1401/DQA1*0101-DQB1*0503) carry a non-Asp DR and an Asp DQ. The HLA-DR8 haplotype associated with the disease, DR8-DQ4, behaves differently. Here, the absence of Asp at position 57 of the DR molecule appears to be sufficient for disease risk. The relative importance of DR vs. DQ for peptide presentation in each haplotype is not known, but the two non-Asp protective DR alleles have a totally different P9 pocket, whereas the DR8 P9 pocket is virtually identical to DQ8. Therefore, the specific sequence of peptides bound to these molecules appear to have a very important role in defining the disease risk, resulting from the unique capacity of some non-Asp DQ and DR alleles to bind peptides with such highly specific sequence motif. No other structural evidence common to risk haplotypes and absent in protective ones was found within P9 pocket residues.

These data stress the importance of the peptides presented by Class II molecules in autoimmune disease associations and suggest that the same peptides could be presented by the different T1D associated alleles to be recognized by disease-related T cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Spanish Ministry of Education grant SAF2006-08928, to DJ. We thank J. L. Vicario from the Transfusion Center (Madrid) for sending us the sample from a DR8 homozygous blood donor, and also the donor for accepting to donate for research purposes. P.M.M. acknowledges funding from the Spanish MICINN/FEDER BIO2007-62954. The CSIC/UAB Proteomics Laboratory is a member of ProteoRed, funded by Genoma Spain and follows the quality criteria set up by ProteoRed standards.

REFERENCES

1. Bondinas GP, Moustakas AK, Papadopoulos GK: The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. *Immunogenetics* 59:539-553, 2007
2. Rammensee HG, Friede T, Stevanović S: MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178-228, 1995
3. Runstadler JA, Saila H, Savolainen A, Leirisalo-Repo M, Aho K, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Seldin MF: Analysis of MHC region genetics in Finnish patients with juvenile idiopathic arthritis: evidence for different locus-specific effects in polyarticular vs pauciarticular subsets and a shared DRB1 epitope. *Genes Immun* 4:326-335, 2003
4. Mullarkey ME, Stevens AM, McDonnell WM, Loubiere LS, Brackensick JA, Pang JM, Porter AJ, Galloway DA, Nelson JL: Human leukocyte antigen class II alleles in Caucasian women with primary biliary cirrhosis. *Tissue Antigens* 65:199-205, 2005
5. Donaldson PT, Baragiotta A, Heneghan MA, Floreani A, Venturi C, Underhill JA, Jones DE, James OF, Bassendine MF: HLA class II alleles, genotypes, haplotypes, and amino acids in primary biliary cirrhosis: a large-scale study. *Hepatology* 44:667-674, 2006
6. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, Mychaleckyj JC, Todd JA, Bonella P, Fear AL, Lavant E, Louey A, Moonsamy P: HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 57:1084-1092, 2008
7. Wong FS, Janeway CA, Jr.: Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. *Curr Opin Immunol* 11:643-647, 1999
8. Castano L, Eisenbarth GS: Type-I diabetes: a chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. *Annu Rev Immunol* 8:647-679, 1990
9. Acha-Orbea H, McDevitt HO: The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2435-2439, 1987
10. Suri A, Vidavsky I, van der Drift K, Kanagawa O, Gross ML, Unanue ER: In APCs, the autologous peptides selected by the diabetogenic I-Ag7 molecule are unique and determined by the amino acid changes in the P9 pocket. *J Immunol* 168:1235-1243, 2002

11. Suri A, Unanue ER: The Murine Diabetogenic Class II Histocompatibility Molecule I-A(g7): Structural and Functional Properties and Specificity of Peptide Selection. *Adv Immunol* 88:235-265, 2005
12. Suri A, Walters JJ, Gross ML, Unanue ER: Natural peptides selected by diabetogenic DQ8 and murine I-A(g7) molecules show common sequence specificity. *J Clin Invest* 115:2268-2276, 2005
13. Kwok WW, Domeier ME, Johnson ML, Nepom GT, Koelle DM: HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. *J Exp Med* 183:1253-1258, 1996
14. Morel PA, Dorman JS, Todd JA, McDevitt HO, Trucco M: Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: a family study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8111-8115, 1988
15. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO: HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329:599-604, 1987
16. Latek RR, Suri A, Petzold SJ, Nelson CA, Kanagawa O, Unanue ER, Fremont DH: Structural basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice. *Immunity* 12:699-710, 2000
17. Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC: Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2:501-507, 2001
18. Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM: Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4175-4179, 2004
19. Stepniak D, Wiesner M, de Ru AH, Moustakas AK, Drijfhout JW, Papadopoulos GK, van Veelen PA, Koning F: Large-scale characterization of natural ligands explains the unique gluten-binding properties of HLA-DQ2. *J Immunol* 180:3268-3278, 2008
20. Chicz RM, Urban RG, Gorga JC, Vignali DA, Lane WS, Strominger JL: Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* 178:27-47, 1993
21. De la Fuente MA, Egile C, Pereira A, Juan M, Vivanco F, Roelcke D, Dighiero G, Gallart T: Characterization of a monoclonal IgMK (IgMGAS) anti-Gd cold agglutinin (CA). Its coexistence with a monoclonal IgG3K (IgGGAS) without CA activity that might be clonally related to IgMGAS. *Blood* 83:1310-1322, 1994

22. Alvarez I, Marti M, Vazquez J, Camafeita E, Ogueta S, Lopez de Castro JA: The Cys-67 residue of HLA-B27 influences cell surface stability, peptide specificity, and T-cell antigen presentation. *J Biol Chem* 276:48740-48747, 2001
23. Muixi L, Carrascal M, Alvarez I, Daura X, Marti M, Armengol MP, Pinilla C, Abian J, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D: Thyroglobulin peptides associate in vivo to HLA-DR in autoimmune thyroid glands. *J Immunol* 181:795-807, 2008
24. Muntasell A, Carrascal M, Serradell L, Veelen Pv P, Verreck F, Koning F, Raposo G, Abian J, Jaraquemada D: HLA-DR4 molecules in neuroendocrine epithelial cells associate to a heterogeneous repertoire of cytoplasmic and surface self peptides. *J Immunol* 169:5052-5060, 2002
25. Carrascal M, Ovelheiro D, Casas V, Gay M, Abian J: Phosphorylation Analysis of Primary Human T Lymphocytes Using Sequential IMAC and Titanium Oxide Enrichment. *J Proteome Res*, 2008
26. Lopez de Castro JA, Alvarez I, Marcilla M, Paradela A, Ramos M, Sesma L, Vazquez M: HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens* 63:424-445, 2004
27. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A: Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 5:Unit 5 6, 2006
28. Zhu Y, Rudensky AY, Corper AL, Teyton L, Wilson IA: Crystal structure of MHC class II I-Ab in complex with a human CLIP peptide: prediction of an I-Ab peptide-binding motif. *J Mol Biol* 326:1157-1174, 2003
29. Guex N, Peitsch MC: SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723, 1997
30. Eisenberg D, Luthy R, Bowie JU: VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol* 277:396-404, 1997
31. Tina KG, Bhadra R, Srinivasan N: PIC: Protein Interactions Calculator. *Nucleic Acids Res* 35:W473-476, 2007
32. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE: UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605-1612, 2004

33. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA: Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10037-10041, 2001
34. Elias JE, Haas W, Faherty BK, Gygi SP: Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations. *Nat Methods* 2:667-675, 2005
35. Elias JE, Gygi SP: Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 4:207-214, 2007
36. Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DA, Strominger JL: Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 358:764-768, 1992
37. Alvarez I, Collado J, Daura X, Colome N, Rodriguez-Garcia M, Gallart T, Canals F, Jaraquemada D: The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*1001) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). *Arthritis Rheum* 58:1630-1639, 2008
38. Sturniolo T, Bono E, Ding J, Raddrizzani L, Tuereci O, Sahin U, Braxenthaler M, Gallazzi F, Protti MP, Sinigaglia F, Hammer J: Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. *Nat Biotechnol* 17:555-561, 1999
39. Hammer J: New methods to predict MHC-binding sequences within protein antigens. *Curr Opin Immunol* 7:263-269, 1995
40. Volz T, Schwarz G, Fleckenstein B, Schepp CP, Haug M, Roth J, Wiesmuller KH, Dannecker GE: Determination of the peptide binding motif and high-affinity ligands for HLA-DQ4 using synthetic peptide libraries. *Hum Immunol* 65:594-601, 2004
41. Calvo-Calle JM, Hammer J, Sinigaglia F, Clavijo P, Moya-Castro ZR, Nardin EH: Binding of malaria T cell epitopes to DR and DQ molecules in vitro correlates with immunogenicity in vivo: identification of a universal T cell epitope in the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein. *J Immunol* 159:1362-1373, 1997
42. Gautier N, Chavant E, Prieur E, Monsarrat B, Mazarguil H, Davrinche C, Gairin JE, Davignon JL: Characterization of an epitope of the human cytomegalovirus protein IE1 recognized by a CD4+ T cell clone. *Eur J Immunol* 26:1110-1117, 1996

43. Chang KY, Suri A, Unanue ER: Predicting peptides bound to I-Ag7 class II histocompatibility molecules using a novel expectation-maximization alignment algorithm. *Proteomics* 7:367-377, 2007
44. Nepom BS, Nepom GT, Coleman M, Kwok WW: Critical contribution of beta chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA-DR and -DQ molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7202-7206, 1996
45. Redondo MJ, Eisenbarth GS: Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia* 45:605-622, 2002
46. Scott CA, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA: Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues. *Immunity* 8:319-329, 1998
47. Baker FJ, Lee M, Chien YH, Davis MM: Restricted islet-cell reactive T cell repertoire of early pancreatic islet infiltrates in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9374-9379, 2002

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Localization and size analysis of peptides sequenced from a homozygous DR8 cell line. (A) Peptide size (aa number) distribution of all peptides; (B) Cellular distribution of the peptides' source proteins, according to their processing pathway, E: endocytic pathway (black bars); C: cytosolic pathway (empty bars); (C) Each of the two groups on B were separated, according to their intracellular localization. Black bars, E peptides; empty bars, C peptides. M, cellular membrane; Lys/End, lysosomes or endosomes; E, exogenous; EM, extracellular matrix; g, Golgi; C, cytosol; mit, mitochondria; ER, endoplasmic reticulum; N, nuclear.

Figure 2: A) Sequence comparison of the β 1 domains of HLA-DRB1*0101 and *0801. Variable residues are shown for the DR8 sequence and amino acids participating in each of the peptide binding pockets are shown in colors: P1 (red), P4 (orange), P6 (green) and P9 (blue). **B) Ribbon representation of the DR8 molecule.** Backbone structure in green and localization of the residues in the peptide binding groove that harbors the P1 (red), P4 (orange), P6 (green) and P9 (blue) positions of the peptide.

Figure 3: Peptide binding motif of DR8 (A) Final matrix (see text); (B) Schematic representation of the percentage of each amino acid in each P1 to P9 positions, normalized against the frequency of each residue in the human proteome; (C) DR8 peptide binding motif. Main anchor residues were those significantly increased after Bonferroni correction. Also shown are secondary residues, significantly increased only before Bonferroni correction.

Figure 4. Description of the HLA-DR8 peptide anchor motif. For each of the peptide core positions (P), the percent frequency of each amino acid (residue frequency [RF]) was calculated. Normalized values were calculated as the number of times that each RF was increased or decreased relative to the mean frequency of the corresponding residue among human proteins (deviation from the mean in the proteome [DMP]). DMP values are also presented as histograms. Green bars show DMP values that were significantly increased or red bars decreased ($P < 0.01$) after Bonferroni correction, light green bars show DMP values that were significantly increased before, but not after, the correction, and black bars show non significant DMP values.

Figure 5: Model of DR8 with the melanotransferrin peptide IFTVYGLLDKAQDLF. A) Electrostatic potential surface of DR8 (red region, negative; blue region positive) with the melanotransferrin peptide IFTVYGLLDKAQDLF (magenta). Underlined, the anchor residues. B) Putative hydrogen-bonding network (orange) between the peptide (magenta) and the residues composing the peptide binding groove of HLA-DR8.

FIGURES

Figure 1

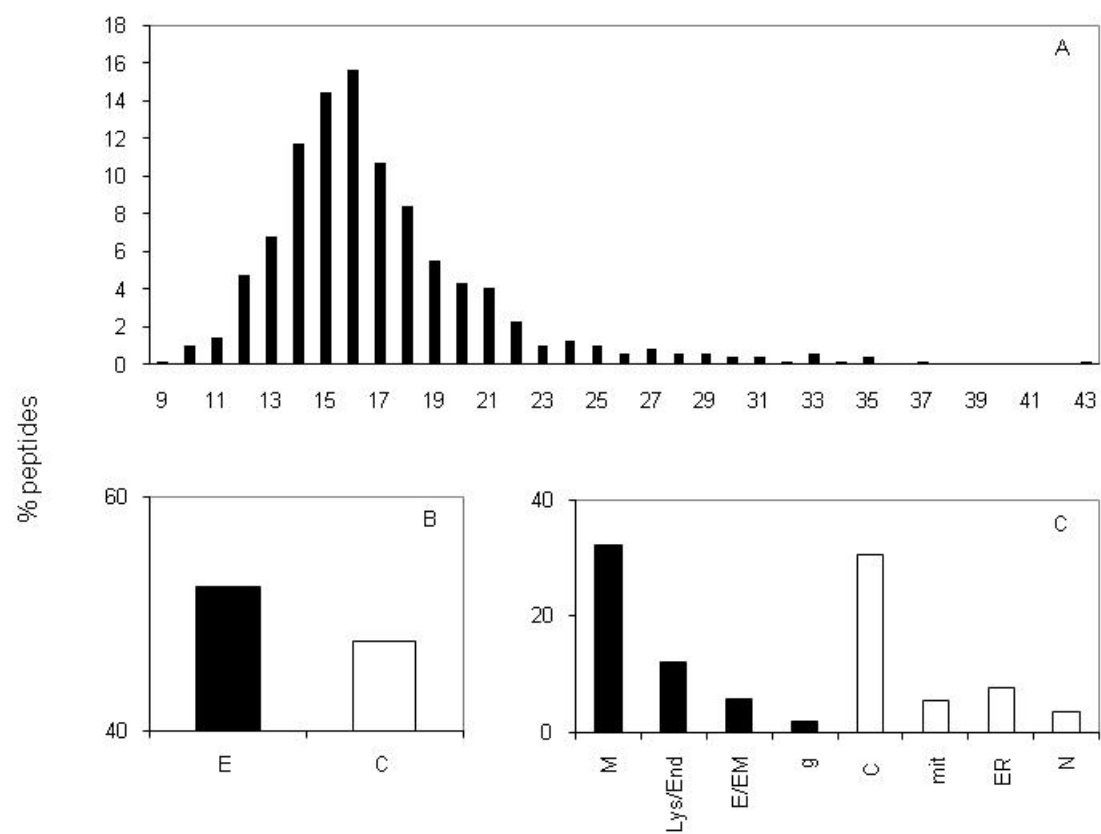


Figure 2:

A

	10	20	30
DRB1*010101	GDTRPRFLWQ LKFECHFFNG	TERVRL	LLERC
DRB1*080101	-----EY STG--Y----	-----F-D-Y	
	40	50	60
DRB1*010101	IYNQEE SVRF DSDVGEYRAV	TELGR	PDAEY
DRB1*080101	F-----Y-----		S---
	70	80	90
DRB1*010101	WNSQKDLLEQ RRAAVDTYCR	HNYGVGES	FT VQRRV
DRB1*080101	-----F--D--L-----		

B



Figure 3:

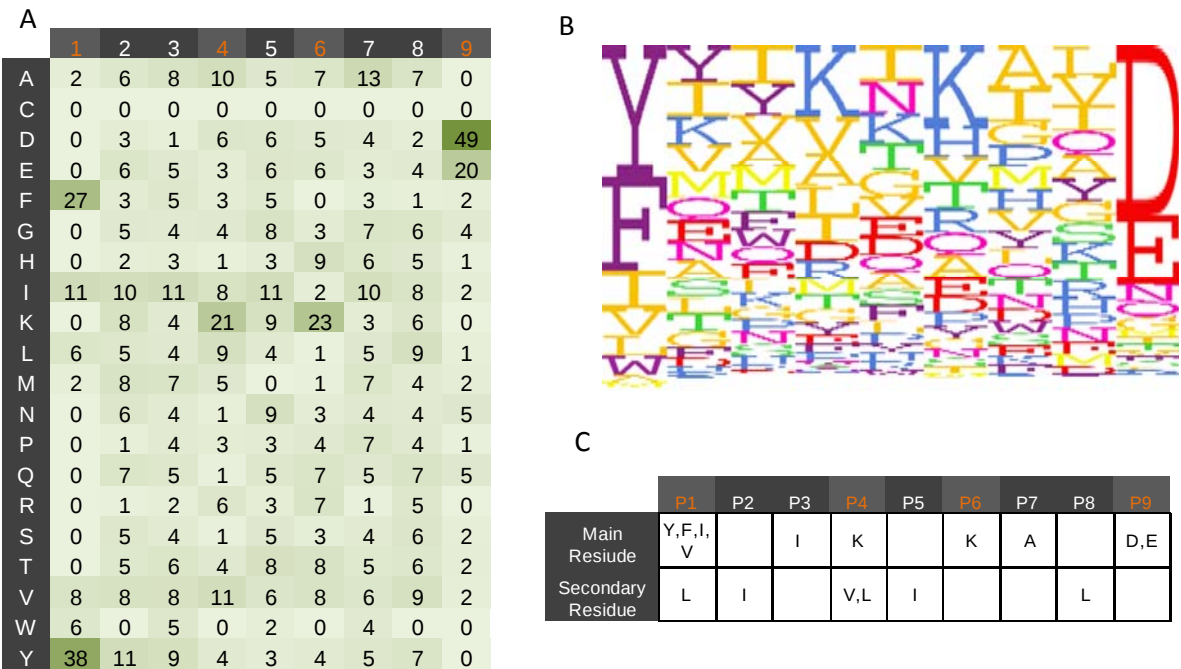


Figure 4:

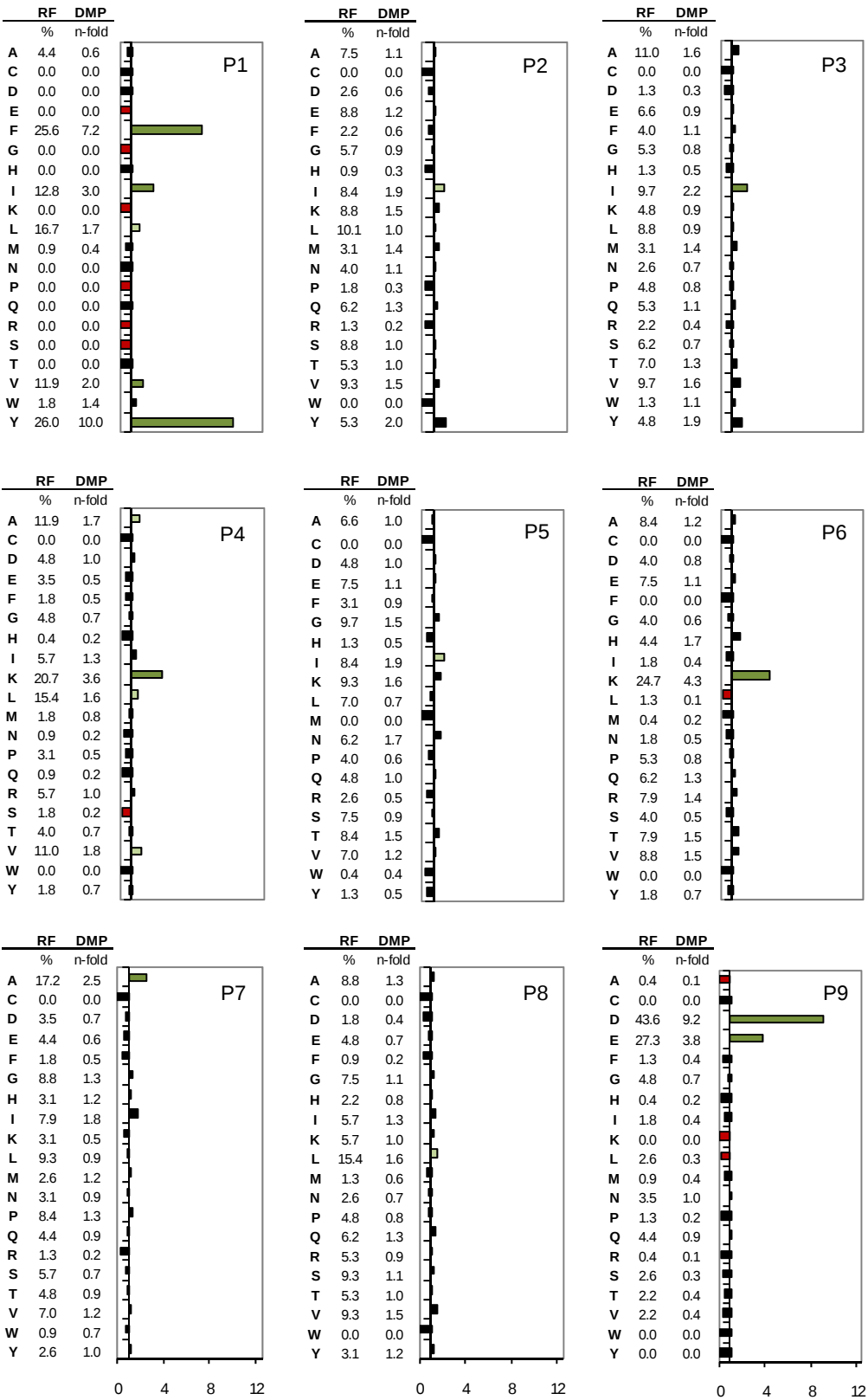
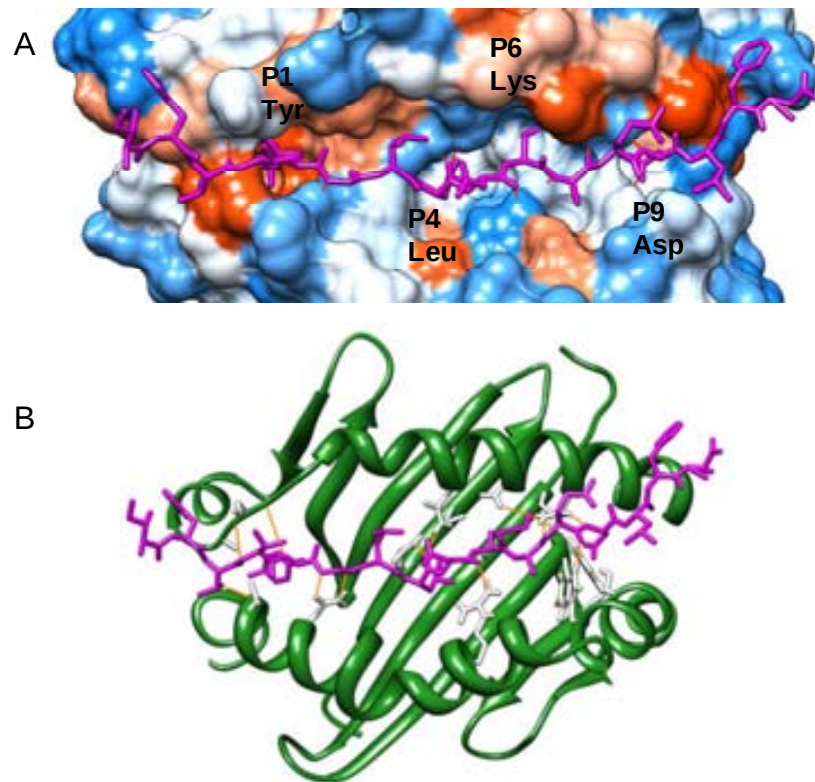


Figure 5:



Scan	Reference	MH+	DeltaM (abs)	z	Peptide	log(Prob)	XC	Delta Cn	Sp	R Sp	Ions	D
661	1433Z_HUMAN 14-3-3 protein zeta/delta	1504.79	0.116	2	VVSSIEQKTEGAEK	2.43E-08	2.84	0.20	1089.04	1	18/26	3.84
3650	1A01_HUMAN HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain	1666.81	-0.66	2	GEPRFIAVGYYDDTQ	4.79E-08	3.040	0.4	775	1	17/28	5.7
619	1B07_HUMAN HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain	1752.85	0.607	2	NTQIYKAQAQTDRES	1.47E-04	3.06	0.20	549.98	1	15/28	3.80
2631	2DOB_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DO beta chain	1491.79	-1.69	2	VGmFVALTKLGQPD	1.05E-05	4.099	0.4	1127	1	20/26	6.6
2631	A26CA_HUMAN ANKRD26-like family C member 1A	2059.91	-0.54	2	FQQMWISKQEYDESGPS	1.59E-03	3.845	0.3	682	1	19/32	5.8
1265	A26CA_HUMAN ANKRD26-like family C member 1A	1339.60	0.31	2	ISKQEYDESGPS	3.47E-07	3.694	0.3	2089	1	19/22	5.7
2089	A26CA_HUMAN ANKRD26-like family C member 1A	1912.84	-0.75	2	QQMWISKQEYDESGPS	1.89E-03	4.727	0.4	1255	1	20/30	6.7
1864	A26CA_HUMAN ANKRD26-like family C member 1A	1525.68	0.18	2	WISKQEYDESGPS	8.78E-06	3.311	0.3	1592	1	20/24	5.5
1844	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	1614.81	0.01	2	IQHFQEKVESLEQ	2.51E-06	3.310	0.3	1173	1	20/24	4.9
1956	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	1743.85	-0.48	2	IQHFQEKVESLEQE	3.42E-07	3.473	0.2	1542	1	20/26	4.4
3067	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	2765.48	-0.40	3	LPKADKKAVIQHFQEKVESLEQEA	3.15E-06	3.360	0.4	1081	1	36/92	5.0
3078	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	2836.52	0.63	3	LPKADKKAVIQHFQEKVESLEQEAA	2.33E-14	4.307	0.4	810	1	34/96	5.8
3066	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	2950.56	-0.25	3	LPKADKKAVIQHFQEKVESLEQEAA	1.34E-05	4.728	0.4	602	1	33/100	5.8
2022	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	1713.88	-0.48	2	VIQHFQEKVESLEQ	4.50E-03	3.761	0.2	1624	1	19/26	4.9
2149	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	1842.92	0.55	2	VIQHFQEKVESLEQE	8.08E-08	3.511	0.2	1498	1	19/28	4.0
2480	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	1913.96	0.52	2	VIQHFQEKVESLEQEA	2.34E-07	3.736	0.2	1512	1	21/30	4.4
2521	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein	1985.00	-0.36	2	VIQHFQEKVESLEQEAA	3.38E-11	3.425	0.2	1094	1	21/32	4.5
1169	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein precursor (APP)	1814.89	-0.057	2	IQHFQEKVESLEQEA	5.80E-08	3.18	0.24	829.95	1	19/28	4.39
1430	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein precursor (APP)	1985.00	-0.762	2	AVIQHFQEKVESLEQEA	5.98E-10	3.23	0.27	1315.10	1	19/32	4.31
1515	A4_HUMAN Amyloid beta A4 protein precursor (APP)	2356.21	-0.445	3	DKKAVIQHFQEKVESLEQEA	4.41E-06	3.56	0.28	663.29	1	30/76	4.56
3847	ABCAC_HUMAN ATP-binding cassette sub-family A member 12	1491.82	0.11	2	VSGAYLSLLRALDN	3.85E-04	3.228	0.4	1246	1	19/26	5.5
3829	ABCAC_HUMAN ATP-binding cassette sub-family A member 12	1752.89	0.20	2	VSGAYLSLLRALDNGmG	6.97E-05	4.110	0.3	921	1	20/32	5.6
3876	ABCAC_HUMAN ATP-binding cassette sub-family A member 12	1305.72	-0.05	2	GAYLSLLRALDN	3.43E-03	3.579	0.2	936	3	17/22	5.0
1507 - 1509	ACTBL_HUMAN Protein beta-actin-like	1545.68	0.42	2	YASGRTTGIVmDSGD	1.01E-05	3.157	0.2	1228	1	19/28	4.2
2113	AMD_HUMAN Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	1287.64	0.24	2	AFYPVGHPVDVS	2.99E-03	2.495	0.4	424	1	14/22	4.9
2558	AMD_HUMAN Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	1625.83	-0.06	2	LPQAFYPVGHPVDVS	3.03E-09	3.752	0.4	1062	1	18/28	6.1
3171	AMD_HUMAN Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	1829.92	-0.82	2	LPQAFYPVGHPVDVSFG	4.03E-11	3.990	0.3	905	1	20/32	5.9
2712	AMD_HUMAN Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	1751.88	0.06	2	SPQLPQAFYPVGHPVD	1.89E-05	3.208	0.3	647	1	17/30	5.0
3645	AMD_HUMAN Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	2142.07	-0.60	2	SPQLPQAFYPVGHPVDVSFG	5.16E-03	3.110	0.3	422	1	14/38	4.5
2142	AMPL_HUMAN Cytosol aminopeptidase	1390.68	0.28	2	GSFLSVAKGSDEPP	3.61E-06	3.436	0.4	751	1	19/26	5.6
2145	AMPL_HUMAN Cytosol aminopeptidase	1537.72	0.09	2	mGSFLSVAKGSDEPP	1.62E-02	2.939	0.3	626	1	19/28	4.6
2421	AMPL_HUMAN Cytosol aminopeptidase	1636.79	-0.19	2	mGSFLSVAKGSDEPPV	1.40E-04	3.658	0.2	859	1	20/30	4.4
1902	ANX11_HUMAN Annexin A11	1601.79	0.34	2	PPTQFGSRGTITDAPG	4.31E-08	3.101	0.5	451	1	19/30	5.8
1901	ANX11_HUMAN Annexin A11	1700.86	0.72	2	VPPTQFGSRGTITDAPG	7.48E-09	3.663	0.4	697	1	21/32	5.8
1511	AP1M1_HUMAN AP-1 complex subunit mu-1	1436.71	0.44	2	ITQNGDYQLRTQ	9.71E-04	3.536	0.3	1681	1	18/22	5.7

2365	AP2B1_HUMAN AP-2 complex subunit beta-1	1834.90	-0.56	2	NNVYTIAKRNVGQD	4.83E-11	3.247	0.2	350	3	13/30	3.9
1701	AP2B1_HUMAN AP-2 complex subunit beta-1	1720.86	-0.28	2	NNVYTIAKRNVGQD	1.54E-07	3.029	0.3	495	1	15/28	4.8
2884	APLP2_HUMAN Amyloid-like protein 2	1742.93	-0.57	2	IQHFQAMVKALEKEA	3.00E-06	3.258	0.3	1248	1	21/28	5.3
2924	APLP2_HUMAN Amyloid-like protein 2	1813.96	-0.56	2	IQHFQAMVKALEKEAA	4.16E-03	3.412	0.3	611	1	19/30	5.0
3284	APLP2_HUMAN Amyloid-like protein 2	1927.05	-1.15	3	LIQHFQAMVKALEKEAA	1.00E+00	3.545	0.2	830	1	27/64	5.0
1636	ARL8B_HUMAN ADP-ribosylation factor-like protein 8B	1707.87	-1.327	2	VNAIVYMIDAADREK	3.54E-09	4.11	0.34	1512.33	1	21/28	5.53
1745	ARL8B_HUMAN ADP-ribosylation factor-like protein 8B	1950.00	-1.109	2	VNAIVYMIDAADREKIE	6.81E-09	3.70	0.33	1451.31	1	21/32	5.04
1785	ARL8B_HUMAN ADP-ribosylation factor-like protein 8B	2007.02	0.032	2	GVNAIVYMIDAADREKIE	3.28E-05	2.84	0.30	1272.38	1	21/34	4.27
4072	AT5F1_HUMAN ATP synthase subunit b, mitochondrial	2109.20	-1.53	2	FLYPKTGVTGPYVLGTGLIL	9.71E-01	3.166	0.2	343	6	16/38	3.9
4676	AT5F1_HUMAN ATP synthase subunit b, mitochondrial	2384.33	0.51	2	FQFLYPKTGVTGPYVLGTGLIL	1.00E+00	3.064	0.4	534	1	19/42	4.7
608	ATAD1_HUMAN ATPase family AAA domain-containing protein 1	1358.80	0.036	2	GKTLIAKATAKEAG	1.52E-04	2.55	0.23	486.02	1	15/26	3.72
3409	ATP5I_HUMAN ATP synthase subunit e, mitochondrial	1838.09	-1.53	2	PPVQVSPLIKLGRYSAL	1.15E-09	4.169	0.3	1638	1	22/32	5.8
4080	ATP5I_HUMAN ATP synthase subunit e, mitochondrial	1985.16	-0.04	3	PPVQVSPLIKLGRYSALF	1.28E-10	4.175	0.3	1245	1	31/68	5.6
3408	ATP5I_HUMAN ATP synthase subunit e, mitochondrial	1937.16	-0.51	2	VPPVQVSPLIKLGRYSAL	3.74E-07	4.347	0.3	1049	1	22/34	5.5
3704	ATP5L_HUMAN ATP synthase subunit g, mitochondrial	1899.04	0.42	2	FYVGEIIGKRGIGYDV	2.99E-09	3.358	0.3	663	1	19/32	4.5
2897	ATP5L_HUMAN ATP synthase subunit g, mitochondrial	1751.97	0.40	2	YVGEIIGKRGIGYDV	1.77E-02	3.254	0.2	546	1	17/30	4.1
3384	ATPB_HUMAN ATP synthase subunit beta, mitochondrial	2390.15	0.93	3	YmVGPIEEAVAKADKLAEHSS	1.40E-01	3.199	0.3	740	1	33/84	4.0
4165	ATPD_HUMAN ATP synthase subunit delta, mitochondrial	2189.17	-0.46	2	FNGANVRQVDVPTLTGAFGIL	9.99E-01	3.364	0.3	429	1	17/40	4.7
3058	ATPO_HUMAN ATP synthase subunit O, mitochondrial	2448.38	-0.29	3	FAKLVRPPVQVYGIEGRYATAL	2.38E-10	4.506	0.4	1592	1	34/84	6.2
1786	ATPO_HUMAN ATP synthase subunit O, mitochondrial	1615.84	-0.62	2	LAENGRLSNTQGVVSA	5.28E-04	3.832	0.3	972	1	20/30	5.7
2553	B2MG_HUMAN Beta-2-microglobulin	1619.78	-1.41	2	LLYYTEFTPTTEKD	3.06E-05	3.762	0.4	1357	1	17/24	6.7
1877	B2MG_HUMAN Beta-2-microglobulin	1522.66	-0.88	2	YYTEFTPTTEKDE	1.57E-04	3.069	0.2	957	1	16/22	4.9
2146	B2MG_HUMAN Beta-2-microglobulin	1756.76	-0.95	2	YYTEFTPTTEKDEYA	2.94E-06	3.615	0.4	658	1	16/26	6.5
4248	CAB45_HUMAN 45 kDa calcium-binding protein	3448.69	1.49	3	LEPEEVLKYSEFFTGSKLVDYARSVHEEF	2.72E-05	3.097	0.3	260	1	29/112	4.0
2798	CAB45_HUMAN 45 kDa calcium-binding protein	1782.87	-0.62	2	YSEFFTGSKLVDYAR	1.56E-09	3.388	0.3	1534	1	20/28	5.5
3197	CADH2_HUMAN Cadherin-2	2330.16	-0.77	3	DPNSNDGLVTVVKPIDFETNR	1.00E+00	3.525	0.3	881	1	29/80	5.1
3335	CALM_HUMAN Calmodulin	1831.87	0.37	2	IAEFKEAFSLFDKDG	6.69E-07	3.038	0.3	1111	1	20/30	4.6
1734	CALM_HUMAN Calmodulin (CaM)	1659.83	-0.317	2	IAEFKEAFSLFDKD	4.17E-09	3.04	0.34	1485.55	1	20/26	5.02
2826	CALR_HUMAN Calreticulin	1417.66	0.11	2	VYFKEQFLDGDG	1.00E+00	3.095	0.3	620	14	14/22	4.2
3544	CALR_HUMAN Calreticulin	1441.71	-0.96	2	WQVKSQTIFDNF	5.35E-05	2.872	0.2	1559	1	18/22	4.6
3089	CALX_HUMAN Calnexin	1722.71	-0.73	2	HDGHDDDDVIDIEDDL	1.31E-05	3.149	0.3	1174	1	21/28	4.8
4071	CALX_HUMAN Calnexin	1837.74	-1.47	2	HDGHDDDDVIDIEDDL	5.46E-06	2.802	0.3	511	1	16/30	4.7
4380	CALX_HUMAN Calnexin	1952.76	-0.52	2	HDGHDDDDVIDIEDDLDD	2.29E-03	3.009	0.3	748	1	17/32	4.6
4144	CALX_HUMAN Calnexin	2423.00	0.61	2	HDGHDDDDVIDIEDDLDDVIEE	1.88E-11	3.956	0.4	1090	1	22/40	5.6
5850	CAN1_HUMAN Calpain-1 catalytic subunit	1787.01	-0.53	3	APSDLYQIILKALERG	1.08E-04	3.238	0.2	558	1	26/60	4.1
4809	CAN1_HUMAN Calpain-1 catalytic subunit	1987.12	-0.05	3	APSDLYQIILKALERGSL	1.02E-02	3.210	0.3	506	1	27/68	5.0
2760	CATC_HUMAN Dipeptidyl-peptidase 1	1385.71	-0.74	2	FPYLIAGKYAQD	4.94E-04	3.642	0.2	1127	1	17/22	5.3

1045	CATH_HUMAN Cathepsin H	2258.21	-1.439	2	GPYPPSVDWRKKGNFVSPVK	1.89E-07	4.47	0.33	930.39	1	23/38	5.23
1288	CATH_HUMAN Cathepsin H	1572.77	-1.245	2	MNGYFLIERGKNM	9.37E-06	2.52	0.32	414.35	1	14/24	4.04
2494	CATH_HUMAN Cathepsin H	2130.11	-0.48	2	GPYPPSVDWRKKGNFVSPV	7.75E-05	3.061	0.4	310	1	17/36	5.3
3866	CATH_HUMAN Cathepsin H	1886.97	-0.35	2	LPSQAFEYILYNKGIM	1.59E-03	3.642	0.3	1079	1	19/30	5.4
3407	CATH_HUMAN Cathepsin H	1959.99	-0.31	2	LPSQAFEYILYNKGImG	7.63E-04	4.106	0.4	693	1	17/32	6.1
3702	CATH_HUMAN Cathepsin H	2204.06	-0.40	2	LPSQAFEYILYNKGImGED	9.04E-01	3.872	0.4	603	1	18/36	5.6
3513	CATH_HUMAN Cathepsin H	2468.17	-1.61	2	LPSQAFEYILYNKGImGEDTY	1.55E-09	4.061	0.4	1321	1	22/40	6.5
2319	CATH_HUMAN Cathepsin H	1976.04	0.51	2	YPPSVDWRKKGNFVSPV	9.46E-04	3.240	0.3	876	1	17/32	4.6
1216	CATS_HUMAN Cathepsin S	1756.84	0.174	2	AFQYIIDNKGIDSDAS	3.35E-10	3.65	0.39	1417.68	1	22/30	5.81
1251	CATS_HUMAN Cathepsin S	1669.81	-0.470	2	AFQYIIDNKGIDSDA	4.91E-08	3.95	0.20	1147.93	1	20/28	4.63
2457	CATS_HUMAN Cathepsin S	1598.77	0.09	2	AFQYIIDNKGIDSD	2.90E-04	3.062	0.2	1358	1	19/26	4.2
2825	CATS_HUMAN Cathepsin S	2016.95	-0.99	2	AFQYIIDNKGIDSDASYP	1.97E-02	3.978	0.3	633	1	18/34	5.3
2344	CATS_HUMAN Cathepsin S	1685.80	-1.78	2	FQYIIDNKGIDSDAS	1.04E-08	4.387	0.4	1820	1	20/28	6.8
2884	CATS_HUMAN Cathepsin S	2108.98	0.22	2	FQYIIDNKGIDSDASYPY	4.17E-05	4.521	0.5	1137	1	25/34	7.0
1886	CATS_HUMAN Cathepsin S	1507.73	-0.74	2	IIDNKGIDSDASYP	5.82E-02	2.909	0.3	545	5	16/26	4.3
2744	CATS_HUMAN Cathepsin S	1497.76	-1.07	2	TAFQYIIDNKGID	9.64E-06	3.723	0.3	1419	1	20/24	5.9
2752	CATS_HUMAN Cathepsin S	1770.85	0.10	2	TAFQYIIDNKGIDSDA	1.04E-07	4.503	0.4	1673	1	22/30	6.3
3243	CATS_HUMAN Cathepsin S	1857.89	-0.80	2	TAFQYIIDNKGIDSDAS	9.64E-01	3.095	0.2	509	1	15/32	4.0
3099	CATS_HUMAN Cathepsin S	2118.00	-1.46	2	TAFQYIIDNKGIDSDASYP	2.56E-07	3.682	0.4	352	1	19/36	6.1
3236	CATS_HUMAN Cathepsin S	2281.07	-0.89	2	TAFQYIIDNKGIDSDASYPY	4.01E-06	3.881	0.3	1192	1	22/38	5.3
3052	CATS_HUMAN Cathepsin S	2409.16	-1.60	3	TAFQYIIDNKGIDSDASYPYK	2.42E-08	5.040	0.4	2278	1	34/80	7.3
1837	CATS_HUMAN Cathepsin S	1252.61	0.20	2	YIIDNKGIDSD	1.78E-06	3.306	0.3	797	8	16/20	4.8
2002	CATS_HUMAN Cathepsin S	1323.64	0.20	2	YIIDNKGIDSDA	5.36E-06	3.718	0.4	1135	1	18/22	6.2
1850	CATS_HUMAN Cathepsin S	1410.67	0.10	2	YIIDNKGIDSDAS	2.96E-02	3.633	0.4	1324	1	19/24	6.3
2169	CATS_HUMAN Cathepsin S	1573.74	-0.01	2	YIIDNKGIDSDASY	4.50E-05	3.910	0.4	1141	1	20/26	6.4
810	CD166_HUMAN CD166 antigen	1598.83	-0.093	2	TSTLEYKTTKADIQ	5.95E-05	3.53	0.35	1450.43	1	18/26	5.61
1155	CD166_HUMAN CD166 antigen	1826.92	-1.038	2	TSTLEYKTTKADIQMP	5.22E-02	2.87	0.21	389.40	1	15/30	3.49
1144	CD19_HUMAN B-lymphocyte antigen CD19	1674.92	-0.175	3	TGLLPRATAQDAGKY	1.53E-07	2.91	0.25	734.49	1	29/60	4.10
2024	CD19_HUMAN B-lymphocyte antigen CD19	1255.70	-1.83	2	TGLLPRATAQD	1.77E-06	3.122	0.1	743	1	18/22	4.2
1723	CD19_HUMAN B-lymphocyte antigen CD19	1511.85	-0.58	2	TGLLPRATAQDAGK	1.75E-04	3.311	0.2	947	1	17/28	4.6
2014	CD22_HUMAN B-cell receptor CD22	1786.87	-0.81	2	IQFGVGERPQAQENV	4.52E-05	4.273	0.3	441	2	16/30	5.6
2627	CD22_HUMAN B-cell receptor CD22	1610.94	-0.45	2	TPKLEIKVTPSDAIV	2.24E-05	3.314	0.2	609	1	18/28	4.5
2231	CD22_HUMAN B-cell receptor CD22	1767.04	-0.71	2	TPKLEIKVTPSDAIVR	6.97E-07	3.343	0.2	857	1	17/30	4.6
2262	CD48_HUMAN CD48 antigen	1891.94	0.11	2	DPQSGALYISKVQKEDN	2.52E-11	3.976	0.3	368	1	18/32	5.3
2589	CD48_HUMAN CD48 antigen	2243.08	-0.54	2	DPQSGALYISKVQKEDNSTY	2.23E-07	3.893	0.3	247	1	18/38	5.6
3101	CD48_HUMAN CD48 antigen	2356.17	-0.15	3	DPQSGALYISKVQKEDNSTYI	2.91E-02	3.158	0.2	804	1	29/80	4.0
2635	CD48_HUMAN CD48 antigen	2195.13	0.43	2	DPVPKPKVIEKIEDMDDN	7.36E-06	3.177	0.3	191	5	16/36	3.9

2263	CD97_HUMAN CD97 antigen	1612.92	-1.226	2	EVTIQNVIKLVDEL	1.01E-07	3.17	0.21	658.38	1	17/26	3.91
5246	CD97_HUMAN CD97 antigen	1768.95	0.43	2	IQNVIKLVDELMEAPG	3.46E-02	3.041	0.3	603	1	19/30	4.8
1316	CEGT_HUMAN Ceramide glucosyltransferase	1670.82	-0.127	2	IAEDYFMAKAIADRG	1.71E-09	2.73	0.24	1166.28	1	19/28	3.89
727	CHSTB_HUMAN Carbohydrate sulfotransferase 11	1663.76	0.069	2	FPTYAKSTRITDEm	1.27E-08	2.59	0.28	420.46	1	16/26	4.08
1805	COX5B_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial	1902.87	0.24	2	ASGGGVPTDEEQATGLERE	1.73E-04	4.017	0.4	812	1	23/36	6.2
2342	COX7C_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial	1622.97	-0.38	2	ATPFLVVRHQLLKT	4.32E-07	3.649	0.3	539	6	16/26	5.0
3965	COX7C_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial	2132.20	0.15	2	FGSAFATPFLVVRHQLLKT	3.28E-07	3.598	0.2	556	1	18/36	4.3
3506	COX7C_HUMAN Cytochrome c oxidase subunit 7C, mitochondrial	2531.26	0.25	3	SHYEEGPGKNLPFSVENKWSLL	1.02E-04	4.135	0.3	1469	1	33/84	5.1
5041	CPSF5_HUMAN Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	2308.20	0.68	2	YDNAPGYGPIISLPQLLSRF	2.04E-09	3.669	0.4	445	1	18/40	5.2
4361	CR019_HUMAN Uncharacterized protein C18orf19	2531.37	-0.88	2	IGLPDSVVSILKNSQSGNALTAYAL	1.16E-06	4.165	0.4	1103	1	22/48	5.8
1994	DLDH_HUMAN Dihydropolyl dehydrogenase, mitochondrial	1202.65	0.01	2	GPGGYVAAIKAAQ	5.47E-04	3.464	0.2	1317	1	18/24	4.8
2514	DLDH_HUMAN Dihydropolyl dehydrogenase, mitochondrial	1372.76	-0.14	2	GPGGYVAAIKAAQLG	6.85E-09	4.029	0.3	1831	1	21/28	5.7
2297	DOCK2_HUMAN Dedicator of cytokinesis protein 2	1688.96	-0.659	2	SVENFVNLVKGLLEK	3.27E-07	3.16	0.12	1219.47	1	18/28	3.30
1612	DSC3_HUMAN Desmocollin-3	2225.12	-1.481	3	HPSTGVITTVSHYLDREVVD	8.18E-05	3.00	0.36	749.67	1	28/76	4.30
3314	DSC3_HUMAN Desmocollin-3	2110.09	0.40	3	HPSTGVITTVSHYLDREV V	6.70E-09	3.806	0.4	602	1	26/72	5.6
2898	DSC3_HUMAN Desmocollin-3	1590.81	-0.52	2	TGVITTVSHYLDRE	2.06E-05	3.138	0.3	1043	1	18/26	5.2
3417	DSC3_HUMAN Desmocollin-3	1903.98	0.36	2	TGVITTVSHYLDREVVD	4.68E-09	3.070	0.3	483	1	18/32	4.4
3481	DYN2_HUMAN Dynamin-2	2650.40	0.89	3	IDLPGITKVPVGDQPPDIEYQIKD	9.53E-09	3.968	0.3	926	1	33/92	4.7
1160	ECE1_HUMAN Endothelin-converting enzyme 1	1744.91	-1.127	2	EELIYHKVTAAELQT	2.66E-05	3.57	0.32	589.04	1	18/28	5.04
1246	ECE1_HUMAN Endothelin-converting enzyme 1	1758.89	-0.119	2	DEELIYHKVTAAELQ	1.09E-06	3.97	0.29	1361.83	1	20/28	5.42
1908	ECE1_HUMAN Endothelin-converting enzyme 1	1720.94	-0.283	2	ATEIILEIKKAFFES	4.00E-06	2.98	0.16	945.56	1	16/28	3.50
3126	ECE1_HUMAN Endothelin-converting enzyme 1	1859.94	0.52	2	DEELIYHKVTAAELQT	4.40E-07	3.417	0.2	1075	1	19/30	3.9
3376	ECE1_HUMAN Endothelin-converting enzyme 1	1548.85	-0.46	2	EIILEIKKAFFES	8.17E-06	3.520	0.2	1096	1	17/24	4.7
3137	EF1B_HUMAN Elongation factor 1-beta	1401.77	0.16	2	GFGDLKSPAGLQVL	5.55E-03	2.980	0.3	1208	1	19/26	4.6
2897	EF1B_HUMAN Elongation factor 1-beta	1630.84	0.22	2	GFGDLKSPAGLQVLND	4.22E-05	4.187	0.3	1733	1	20/30	5.7
4057	EF1B_HUMAN Elongation factor 1-beta	2471.25	-1.15	3	GFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSY	1.05E-05	3.940	0.3	771	1	30/88	5.2
4218	EF1B_HUMAN Elongation factor 1-beta	2770.39	-1.47	3	GFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIEG	2.79E-05	3.208	0.3	527	1	30/100	4.8
4404	EF1B_HUMAN Elongation factor 1-beta	3530.73	1.31	3	GFGDLKSPAGLQVLNDYLADKSYIEGYVPSQAD	1.30E-08	3.936	0.4	432	1	32/128	5.0
3447	EFR3A_HUMAN Protein EFR3 homolog A	1898.94	0.43	2	EEITFEALKKAIDTSGm	6.36E-03	3.487	0.2	460	1	18/32	4.2
2858	EHD1_HUMAN EH domain-containing protein 1	1769.01	-0.64	2	ANHLIKVKLEGHELPA	9.99E-01	4.250	0.2	590	1	20/30	5.4
3502	ENO1B_HUMAN Alpha-enolase, lung specific	2180.05	-0.68	2	SPDDPSRYISPDQLADLYK	4.05E-06	3.335	0.3	205	9	14/36	4.7
1003	ENOA_HUMAN Alpha-enolase	1486.67	0.609	2	SGKYDLDFKSPDD	7.13E-04	2.67	0.29	1127.08	1	17/24	4.20
1039	ENOA_HUMAN Alpha-enolase	1670.75	0.541	2	SGKYDLDFKSPDDPS	5.20E-06	3.56	0.42	1008.53	1	20/28	5.93
2636	ENOA_HUMAN Alpha-enolase	1826.86	0.45	2	SGKYDLDFKSPDDPSR	7.01E-04	3.415	0.3	1474	1	21/30	4.5
1572	ENPL_HUMAN Endoplasmin	2042.98	1.122	2	FPIYVWSSKTETVEPM	4.09E-05	3.04	0.26	1279.99	1	23/32	3.91
744	ENPL_HUMAN Endoplasmin	1551.73	-0.014	2	KAFYKSFSKESDD	1.64E-04	2.37	0.26	287.83	1	15/24	3.78
963	ENPL_HUMAN Endoplasmin	1779.83	0.003	2	KAFYKSFSKESDDPM	4.18E-11	3.05	0.38	689.41	1	20/28	5.32

2426	ENPL_HUMAN Endoplasmic	2325.01	0.25	2	DVGTDEEEETAKESTAEKDEL	3.27E-10	4.322	0.2	971	1	23/40	4.7
2125	ENPL_HUMAN Endoplasmic	2209.98	0.70	3	VGTDDEEEETAKESTAEKDEL	5.67E-03	4.206	0.4	1003	1	31/76	5.5
967	ENTP1_HUMAN Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	1608.81	-0.199	2	EHIHFIGKIQGS DAG	1.00E+00	3.90	0.37	931.68	2	17/28	5.77
1681	ERP29_HUMAN Endoplasmic reticulum protein ERp29	1950.98	-1.736	2	AEQYLKIMGKILDQGED	2.44E-07	3.57	0.22	1219.15	1	21/32	3.94
4173	F1142_HUMAN Protein FAM114A2	2368.22	-1.58	2	STISTAVQSTGKSVISGGLDALEF	3.00E-08	4.354	0.5	1236	1	26/46	7.2
2160	F134C_HUMAN Protein FAM134C	1756.81	1.03	2	DQSELSQLDPASSRSH	6.24E-11	3.562	0.2	981	1	22/30	4.4
2428	F134C_HUMAN Protein FAM134C	1869.89	0.06	2	LDQSELSQLDPASSRSH	2.84E-09	4.126	0.3	682	1	20/32	5.7
900	FAIM3_HUMAN Fas apoptotic inhibitory molecule 3	1794.03	-0.190	2	IKAEYKGRVTLKQYP	7.55E-11	3.07	0.13	415.45	1	18/28	3.41
1873	FCG2B_HUMAN Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b	1908.88	-0.56	2	LmHPDALEEPDDQNRI	1.81E-07	4.190	0.4	998	1	21/30	6.4
815	FLOT1_HUMAN Flotillin-1	1698.80	0.036	2	LSEIEmAKAQRDYE	3.60E-03	3.13	0.36	227.55	1	15/26	5.25
1780	FLOT1_HUMAN Flotillin-1	1812.91	-0.40	2	AQRDYELKKAAYDIE	1.33E-05	3.333	0.3	762	1	18/28	5.0
2013	FLOT1_HUMAN Flotillin-1	2026.02	-0.54	2	AQRDYELKKAAYDIEVN	1.37E-10	3.335	0.3	633	1	17/32	4.7
2002	FLOT1_HUMAN Flotillin-1	1826.93	0.39	2	RDYELKKAAYDIEVN	1.48E-05	3.361	0.3	889	1	20/28	5.1
711	FLVC1_HUMAN Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1	1697.85	0.950	2	SPPEEYSYKKSIRN	9.17E-05	3.13	0.21	321.70	2	14/26	3.78
1108	FLVC1_HUMAN Feline leukemia virus subgroup C receptor-related protein 1	1958.00	-1.479	2	SPPEEYSYKKSIRNLF	5.07E-07	3.19	0.34	715.93	1	19/30	4.61
2931	FOXK2_HUMAN Forkhead box protein K2	1568.77	-1.62	2	GSSGYKVGSRVmpSDL	1.00E+00	3.205	0.2	346	4	15/28	3.9
1566	FRIH_HUMAN Ferritin heavy chain	1847.92	-0.842	3	APESGLAEYLFDKHTLG	4.40E-11	3.67	0.40	985.61	1	33/64	5.59
3114	FRIH_HUMAN Ferritin heavy chain	1463.75	-0.76	2	GLAEYLFDKHTLG	7.76E-05	3.041	0.3	615	1	17/24	5.1
1669	FUBP1_HUMAN Far upstream element-binding protein 1	2019.93	0.26	2	YAQTSPQGMPQHPPAPQGQ	4.07E-07	3.538	0.4	624	1	19/36	5.7
1798	FUBP1_HUMAN Far upstream element-binding protein 1	2183.00	0.20	2	YYAQTSPQGMPQHPPAPQGQ	1.99E-13	4.007	0.4	641	1	20/38	6.1
1783	FUBP3_HUMAN Far upstream element-binding protein 3	1792.82	0.19	2	FYGQTLGQAQHSQEQ	2.42E-07	4.227	0.4	1142	1	21/30	6.7
1365	FUBP3_HUMAN Far upstream element-binding protein 3	1645.76	1.05	2	YGQTLGQAQHSQEQ	1.70E-04	3.174	0.3	1165	1	19/28	4.9
1085	FUCO_HUMAN Tissue alpha-L-fucosidase	1894.94	0.005	2	KTQHfVSAKTmPELYD	6.04E-05	2.78	0.29	750.38	1	20/30	4.28
2605	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1527.71	0.39	2	DNEFGYSNRVVDL	1.28E-04	3.838	0.4	960	1	18/24	6.6
2978	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1658.75	0.07	2	DNEFGYSNRVVDLM	2.08E-05	3.563	0.4	942	1	19/26	6.1
2569	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1745.78	0.70	2	DNEFGYSNRVVDLmA	4.73E-06	3.120	0.4	1249	1	20/28	5.0
2696	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1882.84	-0.91	3	DNEFGYSNRVVDLmA	7.58E-04	3.160	0.2	852	1	25/60	4.5
2805	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1298.64	0.06	2	EFGYSNRVVDL	3.77E-02	2.931	0.3	620	1	15/20	4.9
2668	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1169.59	0.06	2	FGYSNRVVDL	6.45E-03	2.548	0.3	756	1	15/18	4.5
3097	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1963.88	-0.03	2	ISWYDNEFGYSNRVVD	1.47E-09	3.414	0.3	951	1	17/30	4.9
3488	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2076.97	1.10	2	ISWYDNEFGYSNRVVDL	1.16E-08	4.281	0.5	914	1	18/32	6.7
3400	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2295.04	-1.58	2	ISWYDNEFGYSNRVVDLmA	1.41E-05	4.240	0.3	1112	1	21/36	5.7
3839	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2978.34	-0.83	3	ISWYDNEFGYSNRVVDLMAHmASKE	4.83E-06	4.906	0.1	768	1	30/96	4.2
2072	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1299.60	0.29	2	NEFGYSNRVVD	8.61E-04	3.291	0.3	541	14	13/20	4.5
2808	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1412.68	0.24	2	NEFGYSNRVVDL	4.83E-04	3.175	0.3	720	12	14/22	4.5
3503	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1963.88	0.00	2	SWYDNEFGYSNRVVDL	1.07E-09	3.696	0.4	1211	1	19/30	6.0
3426	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2181.95	0.50	2	SWYDNEFGYSNRVVDLmA	2.11E-07	3.564	0.3	526	1	17/34	4.7

2731	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1763.77	0.61	2	WYDNEFGYSNRVVD	5.90E-11	3.798	0.4	1749	1	21/26	6.4
3287	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1876.85	0.47	2	WYDNEFGYSNRVVDL	1.57E-12	4.225	0.3	1079	1	18/28	5.9
3059	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2023.89	-0.71	2	WYDNEFGYSNRVVDLm	2.67E-11	4.239	0.4	894	1	19/30	6.5
3257	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2094.92	0.84	2	WYDNEFGYSNRVVDLmA	2.70E-07	3.915	0.4	1930	1	24/32	5.6
2972	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2231.98	-0.56	2	WYDNEFGYSNRVVDLmAH	1.84E-04	3.721	0.2	417	2	18/34	4.5
2040	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1577.69	-0.75	2	YDNEFGYSNRVVD	3.60E-03	3.231	0.2	734	1	16/24	4.8
2690	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1690.77	-1.16	2	YDNEFGYSNRVVDL	1.44E-08	3.892	0.4	987	1	18/26	6.5
3242	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1821.81	0.53	2	YDNEFGYSNRVVDLm	2.87E-05	3.697	0.2	1205	1	20/28	4.7
2650	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1908.84	-1.04	2	YDNEFGYSNRVVDLmA	8.95E-08	4.307	0.5	929	1	19/30	7.2
2505	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2045.90	0.38	2	YDNEFGYSNRVVDLmAH	3.52E-04	3.439	0.2	458	3	17/32	3.7
1345	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	1462.74	0.360	2	TGVFTTMEKAG AHL	3.94E-04	2.82	0.38	390.84	1	16/26	5.02
1747	G3P_HUMAN Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	2190.05	0.138	2	LISWYDNEFGYSNRVVDL	2.17E-04	3.10	0.22	1076.32	1	19/34	3.94
1047	GALT1_HUMAN Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1	1839.96	-1.046	2	LPAGDVLEPVQKPHEGPG	4.70E-09	3.70	0.34	697.81	1	20/34	5.04
2347	GALT1_HUMAN Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 acetylgalactosaminyltrans	2116.04	-0.01	3	LPAGDVLEPVQKPHEGPGEm	1.09E-05	3.918	0.4	1093	1	33/76	5.7
4222	GBF1_HUMAN Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchangefactor 1	3446.91	-0.78	3	PIILNPALIEATSPVPLLATPRPTDPIPTSEVN	1.34E-06	5.084	0.4	977	1	36/128	6.0
3990	GBRL2_HUMAN Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	2202.22	-1.56	3	PSDITVAQFMWIIRKRIQ	2.01E-05	3.574	0.3	811	1	27/68	5.2
1833	GLNA_HUMAN Glutamine synthetase	1554.71	0.08	2	LNETGDEFPFYKN	1.23E-04	3.730	0.3	1531	1	19/24	5.6
2291	GLU2B_HUMAN Glucosidase 2 subunit beta	2154.94	-1.87	2	QTHPELDTDGDGALSEAEAAQA	2.10E-04	4.145	0.4	1234	1	24/40	6.2
1238	GNAI1_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-1 subunit	1557.85	0.017	2	DAVTDVVIKNNLKD	1.93E-05	3.21	0.25	1313.26	1	19/26	4.61
1533	GOLI4_HUMAN Golgi integral membrane protein 4	1811.91	0.137	2	EDFLVYKLEAQETLN	6.88E-07	3.45	0.24	1980.36	1	22/28	4.64
2323	GRN_HUMAN Granulins	1084.59	-0.80	1	TFLARSPHVG	1.00E+00	2.507	0.4	422	1	13/18	5.4
1721	GRP78_HUMAN 78 kDa glucose-regulated protein	1872.93	0.67	2	ESYAYSLKNQIGDKEK	2.67E-05	3.546	0.2	651	1	19/30	4.4
1950	GRP78_HUMAN 78 kDa glucose-regulated protein	1914.00	-0.69	3	SYAYSLKNQIGDKEKLG	7.28E-04	3.029	0.3	682	1	25/64	4.7
2065	GSLG1_HUMAN Golgi apparatus protein 1	1235.61	-0.52	2	WSYAAKVAPADG	5.90E-04	2.710	0.3	1027	1	18/22	4.6
4307	H32_HUMAN Histone H3.2	2016.97	0.26	2	RFQSSAVmALQEASEAYL	1.82E-05	3.547	0.4	490	1	17/34	5.3
2742	HA22_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DQ(2) alpha chain	1601.78	0.56	2	EDIVADHVASYGVNL	1.30E-04	3.139	0.3	1673	1	22/28	4.3
3127	HA23_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) alpha chain	1870.88	-0.61	2	DGDEQFYVDLGRKETV	1.10E-11	3.573	0.4	741	1	18/30	5.8
3722	HA23_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) alpha chain	3790.64	-0.37	3	EDIVADHVASYGVNLYQSYGPSGQYTHEFDGDEQ	4.66E-14	7.356	0.6	2961	1	46/132	8.0
4000	HA23_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) alpha chain	3937.71	0.57	3	EDIVADHVASYGVNLYQSYGPSGQYTHEFDGDEQF	1.00E-30	7.519	0.6	2882	1	47/136	8.1
2298	HA23_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) alpha chain	1835.75	-1.14	2	YQSYGPSGQYTHEFDG	7.36E-06	2.952	0.3	586	1	16/30	5.0
2094	HA23_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) alpha chain	2207.88	0.19	2	YQSYGPSGQYTHEFDGDEQ	1.11E-14	4.793	0.5	1675	1	23/36	7.0
2541	HA23_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) alpha chain	2354.95	-0.92	2	YQSYGPSGQYTHEFDGDEQF	2.32E-09	4.866	0.4	767	1	17/38	6.8
2891	HA23_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DQ(3) alpha chain	2518.01	-1.35	2	YQSYGPSGQYTHEFDGDEQFY	8.14E-04	3.568	0.3	369	1	14/40	5.4
3940	HA2Q_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha chain	1572.74	-1.52	2	FHYLTFVPSAEDF	7.54E-08	3.272	0.4	1127	1	20/24	6.6
3849	HA2Q_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha chain	1735.80	-0.57	2	FHYLTFVPSAEDFY	1.31E-09	3.445	0.3	666	1	19/26	5.6
3853	HA2Q_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha chain	1850.83	-0.32	2	FHYLTFVPSAEDFYD	8.77E-11	4.101	0.4	852	1	20/28	6.5
3651	HA2Q_HUMAN HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha chain	1978.92	0.38	2	KFHYLTFVPSAEDFYD	7.11E-14	4.090	0.4	1201	1	24/30	6.4

2204	HCK_HUMAN Tyrosine-protein kinase HCK	1858.89	-0.342	2	ERPTFEYIQSVLDDF	3.94E-05	2.78	0.25	845.95	1	18/28	3.98
4499	HS71L_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1L	1858.92	-0.45	2	IDDGIFEVKATAGDTHLG	4.29E-13	3.184	0.4	858	1	20/34	5.3
5138	HS71L_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1L	1915.94	0.38	3	IDDGIFEVKATAGDTHLGG	6.82E-04	3.466	0.3	1113	1	32/72	4.6
1344	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	2291.07	-1.657	2	TIEDGIFEVKSTAGDTHLGGED	5.90E-05	3.372	0.380	878.8	1	19/42	4.66
893	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1361.67	-0.638	2	GIFEVKSTAGDTH	8.27E-06	2.72	0.32	1070.92	1	18/24	4.52
2215	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1476.70	-1.79	2	DGIFEVKSTAGDTH	8.49E-10	3.871	0.4	1926	1	21/26	6.8
2917	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1589.78	-0.59	2	DGIFEVKSTAGDTHL	2.18E-08	3.144	0.4	1120	1	20/28	5.4
2572	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1646.80	-0.75	2	DGIFEVKSTAGDTHLG	3.35E-04	3.235	0.4	1120	1	20/30	5.8
2686	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1703.82	-0.29	3	DGIFEVKSTAGDTHLGG	3.76E-01	3.053	0.2	574	1	29/64	4.2
3175	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	2209.99	-1.48	2	DGIFEVKSTAGDTHLGGEDFD	3.09E-05	3.264	0.3	519	1	18/40	5.0
2478	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1605.74	-0.44	2	EDGIFEVKSTAGDTH	9.08E-05	2.622	0.3	841	1	18/28	4.6
2288	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1775.84	0.46	2	EDGIFEVKSTAGDTHLG	9.91E-06	3.196	0.3	1192	1	20/32	4.9
2740	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1832.87	-0.62	2	EDGIFEVKSTAGDTHLGG	1.13E-05	2.894	0.3	482	4	18/34	4.3
2732	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	2076.94	-0.77	2	EDGIFEVKSTAGDTHLGGED	1.31E-04	3.082	0.2	754	1	19/38	4.3
1889	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1224.61	0.56	2	GIFEVKSTAGDT	5.63E-05	2.788	0.4	1666	1	17/22	5.2
2170	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1474.75	0.46	2	GIFEVKSTAGDTHL	6.99E-03	3.019	0.3	1576	1	19/26	4.8
2075	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1531.78	0.62	2	GIFEVKSTAGDTHLG	1.30E-04	2.814	0.3	1558	1	19/28	4.3
2362	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1718.82	-0.49	2	IEDGIFEVKSTAGDTH	3.87E-06	3.273	0.3	841	1	19/30	5.2
2509	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1888.93	0.46	2	IEDGIFEVKSTAGDTHLG	4.56E-12	3.798	0.4	1413	1	23/34	5.4
2973	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	1945.95	-0.28	3	IEDGIFEVKSTAGDTHLGG	1.31E-08	3.717	0.4	800	1	32/72	5.7
2974	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	2074.99	-1.91	3	IEDGIFEVKSTAGDTHLGGE	1.05E-06	4.302	0.4	651	1	30/76	6.4
2906	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	2190.02	0.82	3	IEDGIFEVKSTAGDTHLGGED	1.05E-09	4.260	0.2	1071	1	34/80	4.4
3596	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	2337.09	-1.22	2	IEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDF	6.09E-03	3.170	0.3	606	1	18/42	4.5
3330	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	2452.12	0.47	3	IEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFD	3.41E-11	4.331	0.3	1491	1	38/88	4.9
3466	HSP72_HUMAN Heat shock-related 70 kDa protein 2	2566.16	0.08	3	IEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDN	1.00E-03	3.962	0.3	1059	1	32/92	4.5
3802	HSP7C_HUMAN Heat shock cognate 71 kDa protein	2948.55	-1.99	3	VVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLV	6.56E-07	3.588	0.4	727	1	35/108	5.5
1452	HYOU1_HUMAN Hypoxia up-regulated protein 1	1964.15	-0.202	2	VPRVQEVLLKAVGKEELG	2.34E-07	3.10	0.34	385.51	1	15/34	4.77
1061	HYOU1_HUMAN Hypoxia up-regulated protein 1	1441.83	-1.230	2	VQEVLLKAVGKEE	1.00E+00	3.08	0.32	224.03	3	15/24	4.50
4149	HYOU1_HUMAN Hypoxia up-regulated protein 1	2103.05	-1.54	2	FERVPGPVQQALQSAEmSL	1.33E-09	4.555	0.5	1294	1	22/36	7.2
3198	ICAM1_HUMAN Intercellular adhesion molecule 1	1928.00	-0.51	2	FPAPNVILTKPEVSEGTE	1.00E+00	3.739	0.4	773	1	19/34	5.9
3372	IDUA_HUMAN Alpha-L-iduronidase	1563.82	0.62	2	PGPGLVYVTRYLDN	1.00E+00	2.781	0.5	641	1	17/26	5.7
4327	IF4G1_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	3336.68	-1.56	3	ESTPISRETGEPYRLSPEPTPLAEPILEVE	8.47E-01	3.636	0.2	660	1	28/116	4.2
2204	IFM1_HUMAN Interferon-induced transmembrane protein 1	1465.84	0.66	2	APPSTILPRSTVIN	6.32E-07	3.751	0.3	955	1	18/26	5.5
3041	IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region	2313.07	-0.13	2	GQPENNYKTTPPVLDSDGSFF	1.07E-05	4.059	0.4	644	1	20/40	6.0
1778	IGHG1_HUMAN Ig gamma-1 chain C region	1463.70	-0.90	2	NNYKTTTPVLDSD	2.11E-06	3.260	0.3	1162	1	19/24	5.4
1045	IGSF8_HUMAN Immunoglobulin superfamily member 8	1552.85	0.075	2	YAVFKSRVVAGEVQ	1.15E-09	2.69	0.31	1221.45	1	20/26	4.43
1763	IL3RA_HUMAN Interleukin-3 receptor subunit alpha	1148.61	0.20	2	NPGTYTVQIR	8.91E-01	2.694	0.3	706	1	16/18	4.8

1896	IMA4_HUMAN Importin subunit alpha-4	1726.85	0.222	2	NEDIYKLAYEIIDQ	4.97E-02	3.15	0.21	478.61	3	18/26	3.96
4434	IMA4_HUMAN Importin subunit alpha-4	1612.81	-0.74	2	EDIYKLAYEIIDQ	3.08E-05	3.337	0.2	1485	1	19/24	4.3
4599	IMB1_HUMAN Importin subunit beta-1	3742.04	-1.51	3	ITILEKTVSPDRLELEAAQKFLERAAVENLPTF	1.00E-30	6.346	0.5	922	1	41/128	7.5
1032	IMB3_HUMAN Importin subunit beta-3	1650.83	-0.380	2	DQQSFGIKTAGLEEK	4.93E-01	3.44	0.21	959.09	1	20/28	4.29
3618	INGR1_HUMAN Interferon-gamma receptor alpha chain	1707.88	-1.92	2	MPQVPVFTVEVKNYG	6.96E-07	3.354	0.4	599	1	16/28	6.1
3475	INGR1_HUMAN Interferon-gamma receptor alpha chain	1351.73	-0.31	2	VPVFTVEVKNYG	1.40E-06	3.617	0.4	1740	1	19/22	6.2
3111	IQGA1_HUMAN Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1	1735.87	-1.66	2	DDKSLNIKTDPVDIY	2.80E-10	2.764	0.3	629	1	16/28	4.7
3546	ITCH_HUMAN E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog	1984.01	0.62	2	LPQQYLQYFDAKELEV	4.19E-05	2.816	0.4	496	1	16/30	4.7
3039	K1109_HUMAN Uncharacterized protein KIAA1109	1791.83	-0.66	2	DVNALEmVAHISEHPN	1.62E-05	3.417	0.3	588	1	17/30	5.0
1758	KAD4_HUMAN Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial	1625.85	-0.25	2	FSNKITIQSKEAY	9.18E-01	3.550	0.3	825	1	16/26	5.3
1183	KAP0_HUMAN cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	2005.12	-0.140	3	IPKDYKTMAALAKAIEKN	4.75E-06	4.09	0.31	891.32	1	30/68	5.38
3593	KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2112.13	0.62	3	ASDPILYRPVAALDTKGPE	8.39E-10	4.697	0.3	1697	1	34/76	5.8
3455	KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1670.95	-0.23	3	DPILYRPVAALDTK	1.33E-04	2.940	0.4	792	1	27/56	5.4
3527	KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1825.02	-0.39	2	DPILYRPVAALDTKGP	6.88E-06	3.773	0.3	806	1	20/32	5.1
3619 - 3620	KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2	1954.06	-0.32	2	DPILYRPVAALDTKGPE	4.38E-06	3.556	0.3	932	1	22/34	4.8
3601	KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2936.66	1.51	3	DPILYRPVAALDTKGPEIRTGLIKGSG	1.13E-03	3.887	0.2	305	3	26/108	3.3
3575	KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2041.10	0.42	3	SDPILYRPVAALDTKGPE	7.96E-06	4.427	0.2	2067	1	37/72	4.5
4345	KPYM_HUMAN Pyruvate kinase isozymes M1/M2	2861.49	-0.25	3	TATESFASDPILYRPVAALDTKGPEI	2.66E-05	4.067	0.3	821	1	30/104	5.2
2116	LAMP2_HUMAN Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	1798.02	-1.169	3	DELLAIRIPLNDLFR	2.53E-06	3.26	0.15	977.95	1	26/56	3.44
2270	LAMP2_HUMAN Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	1740.99	0.553	2	VDELLAIRIPLNDLF	6.48E-08	3.04	0.27	666.08	1	19/28	4.36
1308	LAP4A_HUMAN Lysosomal-associated transmembrane protein 4A	2153.10	-0.167	2	VLPTYEMAVKMPEKEPPPP	5.33E-10	3.29	0.22	1423.15	1	23/36	3.99
2838	LAP4A_HUMAN Lysosomal-associated transmembrane protein 4A	2741.36	-1.86	3	APPQYVLPTYEmAVKmPEKEPPPP	1.06E-05	4.727	0.4	399	4	25/92	6.4
1926	LAP4A_HUMAN Lysosomal-associated transmembrane protein 4A	2086.02	-0.14	3	LPTYEmAVKmPEKEPPPP	6.59E-04	3.545	0.3	1190	1	31/68	4.7
4256 - 4257	LDHA_HUMAN L-lactate dehydrogenase A chain	1644.98	0.38	2	NVNIFKFIIPNVVK	1.38E-01	3.129	0.2	1313	1	19/26	4.4
4132	LDHA_HUMAN L-lactate dehydrogenase A chain	1530.94	0.46	2	VNIFKFIIPNVVK	2.25E-08	3.480	0.2	1546	1	19/24	4.4
2089	LDHB_HUMAN L-lactate dehydrogenase B chain	1419.70	0.79	2	DDEVAQLKKSADT	3.03E-07	3.033	0.3	750	1	17/24	4.7
4178	LDHB_HUMAN L-lactate dehydrogenase B chain	1659.00	0.38	2	NVNVFKFIIPQIVK	2.35E-08	3.615	0.3	1806	1	20/26	5.3
3199	LGMN_HUMAN Legumain	1671.96	-0.38	2	SVRKIVSLLAASEAEV	1.86E-06	2.708	0.3	618	1	15/30	4.4
1523	LICH_HUMAN Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	1394.63	-1.57	2	QEQQYVVGHSQG	9.81E-01	2.604	0.3	407	6	13/22	4.6
3799	LIPH_HUMAN Lipase member H	1687.84	-1.81	2	YDGWLGRITGLDPAGP	1.71E-04	2.988	0.2	758	1	19/30	4.1
2794	LPXN_HUMAN Leupaxin	2886.40	-1.69	3	NVYSEAQEPKESPPPSKTSAAAQLDEL	6.46E-07	3.690	0.4	940	1	31/104	5.5
3863	LRC32_HUMAN Leucine-rich repeat-containing protein 32	1790.94	0.47	2	SPLGFYTALRHLDLST	2.92E-08	3.367	0.4	832	1	18/30	5.9
3789	LRC32_HUMAN Leucine-rich repeat-containing protein 32	1904.99	-0.58	2	SPLGFYTALRHLDLSTN	7.40E-09	3.187	0.3	527	1	19/32	5.0
4300	LRC33_HUMAN Leucine-rich repeat-containing protein 33	2147.10	-0.87	3	LDDSVFEGLERLRELDLQ	1.46E-05	3.111	0.2	882	1	29/68	4.0
3759	LYN_HUMAN Tyrosine-protein kinase Lyn	1697.80	-0.88	2	ERPTFDYLSVLDD	1.57E-04	3.461	0.4	1004	1	18/26	6.0
3635	LYN_HUMAN Tyrosine-protein kinase Lyn	1858.00	-1.45	2	IITEYmAKGSLDLFLK	5.70E-04	3.725	0.1	479	1	20/30	4.2
2045	LYN_HUMAN Tyrosine-protein kinase Lyn	1844.87	0.666	2	ERPTFDYLSVLDDF	1.49E-05	2.73	0.26	1189.72	1	20/28	3.85

2222	LYN_HUMAN Tyrosine-protein kinase Lyn	2108.98	-1.328	2	ERPTFDYLQSVLDDFYT	1.05E-06	3.51	0.23	911.76	1	18/32	4.10
1475	M6BPB_HUMAN Mannose-6-phosphate receptor-binding protein 1	1665.78	-0.49	2	DVASVQQRQEQSY	1.65E-05	3.986	0.3	1114	1	19/26	5.5
4549	MDHM_HUMAN Malate dehydrogenase, mitochondrial	3072.85	-0.35	3	AKVAVLGASGGIGQLSLLKNSPLVSRLTL	2.07E-11	6.278	0.5	1080	1	40/120	7.0
1079	MIF_HUMAN Macrophage migration inhibitory factor	1590.86	0.293	2	KPPQYIAVHVVPDQ	7.78E-07	2.36	0.32	576.84	2	19/26	3.93
3766	MIF_HUMAN Macrophage migration inhibitory factor	2028.08	0.30	2	IVNTNVPRASVPDGFLSEL	6.85E-10	3.831	0.4	962	1	26/36	5.9
4602	MIF_HUMAN Macrophage migration inhibitory factor	4611.46	-1.92	3	IVNTNVPRASVPDGFLSELTQQLAQATGKPPQYIAVHVVPDQL	1.61E-09	4.043	0.4	778	1	36/168	5.9
2577	MIF_HUMAN Macrophage migration inhibitory factor	1703.95	-0.47	2	KPPQYIAVHVVPDQL	8.90E-07	3.450	0.4	603	1	19/28	5.6
2473	MIF_HUMAN Macrophage migration inhibitory factor	1850.98	-0.41	2	KPPQYIAVHVVPDQLm	5.07E-07	3.652	0.3	783	1	19/30	5.4
1818	MOES_HUMAN Moesin	1705.79	-0.65	2	AVEWQKKAQmVQED	3.18E-07	4.023	0.3	961	1	17/26	5.6
2205	MOES_HUMAN Moesin	1519.72	0.07	2	WQKKAQmVQEDL	3.90E-03	3.186	0.2	969	1	17/22	4.3
2229	MOES_HUMAN Moesin	1648.76	0.31	2	WQKKAQmVQEDLE	1.26E-04	3.532	0.3	1104	1	19/24	5.1
1531	MOXD1_HUMAN DBH-like monooxygenase protein 1	2123.04	0.675	2	TPLDPHYVLLLEVHYDNPT	1.81E-13	3.24	0.32	876.26	1	20/34	4.65
1575	MOXD1_HUMAN DBH-like monooxygenase protein 1	2415.15	-0.737	2	TPLDPHYVLLLEVHYDNPTYE	4.00E-10	3.58	0.16	1352.18	1	22/38	3.60
1675	MPRD_HUMAN Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	1525.74	-0.189	2	SNWIMLIYKGGDE	5.28E-07	3.63	0.15	1711.93	1	19/24	4.30
868	MPRD_HUMAN Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	1448.74	-0.599	2	GAYKVETKKYDF	2.14E-07	2.80	0.33	553.81	1	16/22	4.79
1252	MPRD_HUMAN Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	1724.89	-1.067	2	GAYKVETKKYDFYI	1.00E-09	3.31	0.32	615.16	1	16/26	4.87
1072	MPRD_HUMAN Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	2081.07	0.055	2	KNGAYKVETKKYDFYIN	3.48E-07	2.97	0.25	420.93	1	18/32	4.14
1144	MPRD_HUMAN Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	1838.93	-0.916	2	GAYKVETKKYDFYIN	1.67E-09	3.12	0.29	470.76	1	18/28	4.41
4979	MX2_HUMAN Interferon-induced GTP-binding protein Mx2	1800.96	-0.48	2	VEPALSMQLKAMEIIQ	5.17E-04	3.958	0.2	687	15	20/30	4.3
1581	NDUS1_HUMAN NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial	1322.63	0.34	2	PTAGAGTDLRSNY	1.11E-05	3.141	0.3	1053	1	19/24	4.6
3095	NICA_HUMAN Nicastatin	1710.85	-0.60	2	DTGVIHVVEKEEDLQ	1.69E-06	3.706	0.3	1007	1	18/28	5.2
871	NID1_HUMAN Nidogen-1	1514.72	-1.066	3	DLHSYVVMNHGRS	4.66E-05	2.79	0.22	899.70	1	25/48	3.74
915	NID1_HUMAN Nidogen-1	1693.78	-0.072	2	DLHSYVVMNHGRSY	1.97E-07	2.83	0.37	865.11	1	19/26	4.98
1871	NID1_HUMAN Nidogen-1	1778.83	0.39	2	DLHSYVVMNHGRSYT	1.14E-04	3.132	0.3	1294	1	20/28	4.9
1671	NMD3_HUMAN 60S ribosomal export protein NMD3	1662.73	0.43	2	HISQDATGEEGASmLT	7.40E-12	3.599	0.3	1963	1	23/30	5.1
1507	NOTC1_HUMAN Neurogenic locus notch homolog protein 1	1793.87	-0.970	2	EGSYETAKVLLDHFAN	5.12E-04	3.08	0.26	193.16	23	17/30	3.45
1076	NOTC1_HUMAN Neurogenic locus notch homolog protein 1	1461.72	-0.205	2	EGSYETAKVLLDH	3.10E-06	2.91	0.23	740.48	1	17/24	4.21
1577	NOTC1_HUMAN Neurogenic locus notch homolog protein 1	1679.83	-0.374	2	EGSYETAKVLLDHFA	5.27E-04	2.83	0.36	692.78	1	18/28	4.78
1498	NPC1_HUMAN Niemann-Pick C1 protein	1809.83	0.230	2	GPPVYFVLEEGHDYTS	3.51E-11	2.45	0.33	709.70	1	18/30	4.12
2227	NPC1_HUMAN Niemann-Pick C1 protein	2142.20	-0.616	2	VFPGPPLDIQLHQVLDLQ	1.89E-10	3.39	0.32	634.24	1	19/36	4.69
3087	NPC1_HUMAN Niemann-Pick C1 protein	1621.75	-0.11	2	GPPVYFVLEEGHDY	8.32E-04	3.008	0.3	628	1	15/26	5.0
2068	OBRG_HUMAN Leptin receptor gene-related protein	1845.95	0.44	2	SPIPHFIAKRVTYDSD	2.15E-03	3.033	0.3	417	1	16/30	4.2
2120 - 2122	OBRG_HUMAN Leptin receptor gene-related protein	2018.03	-0.05	2	SPIPHFIAKRVTYDSDAT	7.95E-11	3.863	0.4	694	1	18/34	6.1
3029	P4K2A_HUMAN Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	1762.83	-0.21	2	FPEDPEFEAVVRQAE	7.41E-08	3.709	0.4	1128	1	20/28	5.8
3584	P4K2A_HUMAN Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	1875.91	-1.31	2	FPEDPEFEAVVRQAE	9.46E-08	4.105	0.2	1477	1	23/30	5.4
3670	P4K2A_HUMAN Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	1946.95	-1.15	2	FPEDPEFEAVVRQAELA	1.41E-10	4.404	0.4	1169	1	22/32	6.4
4405	P4K2A_HUMAN Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	2060.03	0.08	2	FPEDPEFEAVVRQAELAI	1.91E-05	3.648	0.3	678	3	18/34	4.6

4726	P4K2A_HUMAN Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	2189.08	-0.46	2	FPEDPEFEAVVRQAEIAIE	8.03E-07	3.625	0.2	850	1	20/36	4.1
1727	P4K2B_HUMAN Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta	1718.88	-0.244	2	IDDEEFLIKIAAIDN	7.03E-07	3.15	0.29	1684.61	1	21/28	4.70
1658	P4K2B_HUMAN Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-beta	1605.80	0.187	2	DDEEFLIKIAAIDN	1.21E-07	3.03	0.26	1519.70	1	22/26	4.42
2979 - 2981	PARK7_HUMAN Protein DJ-1	2376.39	-0.64	3	AIVEALNGKEVAAQVKAPLVLKD	1.00E+00	4.168	0.1	653	2	27/88	3.8
1247	PCBP2_HUMAN Poly(rC)-binding protein 2	1283.59	0.85	2	VRLSSETGGmGSS	9.19E-05	2.951	0.5	1377	1	19/24	5.6
1538	PCDGH_HUMAN Protocadherin gamma-B5	1776.99	-0.037	2	VPGTLIALIKIHDQDSG	2.36E-11	3.60	0.40	1303.63	1	19/32	5.82
1549	PCDGH_HUMAN Protocadherin gamma-B5	1632.93	0.607	2	VPGTLIALIKIHDQD	4.58E-06	3.36	0.32	1779.11	1	20/28	4.96
2173	PDIA1_HUMAN Protein disulfide-isomerase	2480.01	-0.69	2	EEAEEPdmeEDDDQKAVKDEL	4.80E-05	3.901	0.3	998	1	22/40	5.2
1473	PDIA3_HUMAN Protein disulfide-isomerase A3	1339.62	0.23	2	ESRISDTGSAGLm	7.50E-04	3.202	0.4	1375	1	21/24	5.6
835	PDIA4_HUMAN Protein disulfide-isomerase A4	1561.89	0.774	2	IKILKKGQAVDYEG	1.58E-05	2.43	0.29	578.45	1	18/26	3.77
2127	PDIA4_HUMAN Protein disulfide-isomerase A4	1866.04	0.32	2	YPTIKILKKGQAVDYE	5.56E-06	3.756	0.3	753	1	20/30	5.1
2150	PDIA4_HUMAN Protein disulfide-isomerase A4	1923.06	0.69	2	YPTIKILKKGQAVDYEG	1.33E-11	4.039	0.3	915	1	20/32	5.1
2154	PDIA4_HUMAN Protein disulfide-isomerase A4	2010.09	0.74	2	YPTIKILKKGQAVDYEGS	8.88E-15	4.150	0.3	1012	1	20/34	5.1
2871	PDIA6_HUMAN Protein disulfide-isomerase A6	1705.92	-0.54	2	FPTIKIFQKGESPVD	1.89E-05	3.317	0.2	839	1	17/28	4.2
3192	PDIA6_HUMAN Protein disulfide-isomerase A6	1984.01	-0.63	2	FPTIKIFQKGESPVDYD	1.79E-08	3.917	0.3	875	1	19/32	5.3
3001	PDIA6_HUMAN Protein disulfide-isomerase A6	1762.94	-0.45	2	GFPTIKIFQKGESPVD	1.04E-08	3.660	0.3	1199	1	19/30	5.0
3273	PDIA6_HUMAN Protein disulfide-isomerase A6	2041.03	0.43	2	GFPTIKIFQKGESPVDYD	8.01E-05	3.517	0.3	752	1	18/34	5.1
3167	PLOD1_HUMAN Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	1399.74	0.16	2	AQFFNYKIQALG	7.05E-05	2.941	0.3	437	1	14/22	4.8
3651	PLOD1_HUMAN Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	1569.84	-0.89	2	AQFFNYKIQALGLG	5.32E-09	3.416	0.3	851	1	19/26	5.3
1836	PLSL_HUMAN Plastin-2	1908.91	-0.381	2	YAFVNWINKALENDPD	2.39E-07	3.63	0.36	1543.97	1	22/30	5.52
3569	PPGB_HUMAN Lysosomal protective protein	1770.97	-0.62	3	KPLAAFTMFSRFLNK	4.26E-04	3.312	0.3	364	2	24/56	5.2
3891	PPGB_HUMAN Lysosomal protective protein	2084.10	0.28	3	PTDKPLAAFTMFSRFLNK	2.95E-05	3.438	0.4	1204	1	32/68	5.3
3884	PPGB_HUMAN Lysosomal protective protein	2183.17	-1.69	3	VPTDKPLAAFTMFSRFLNK	8.93E-07	3.609	0.2	842	1	30/72	4.6
961	PROF1_HUMAN Profilin-1	1579.83	0.070	2	GAPTfNVTVTkTDKT	6.41E-05	3.37	0.29	692.41	1	19/28	4.90
3592	PSMD1_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	3089.46	0.29	3	LVEPVAAHGPKIEEEEQEPEPPEPFEY	3.12E-04	3.858	0.4	901	1	35/104	5.3
3860	PSMD1_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	3432.60	-0.21	3	LVEPVAAHGPKIEEEEQEPEPPEPFEYIDD	3.34E-09	4.042	0.4	677	1	36/116	5.2
4987	PSMD3_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	2174.10	0.13	2	DSPEDAEFIVAKAIRDGVIE	2.10E-08	3.533	0.3	724	1	19/38	4.7
4204 - 4206	PSMD3_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	1930.03	0.55	3	SPEDAEFIVAKAIRDGV I	2.75E-09	4.275	0.2	1502	1	34/68	4.4
3950	PSMD3_HUMAN 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	2059.07	0.33	2	SPEDAEFIVAKAIRDGVIE	6.21E-09	5.208	0.4	1765	1	25/36	6.9
2486	PTBP1_HUMAN Polypyrimidine tract-binding protein 1	1666.91	0.87	2	LVSNLNPERVTPQSL	6.93E-07	3.008	0.4	669	1	19/28	4.9
4094	PTH2_HUMAN Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochondrial	3800.07	-1.79	3	IQDAGRTQIAPGSQTVLGIGPGADLIDKVTGHLKLY	1.24E-09	6.237	0.4	2055	1	45/144	6.9
1963	PTPRS_HUMAN Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	1264.64	0.17	2	GPYQIKEDITT	1.00E+00	3.005	0.3	513	9	14/20	4.4
1401	PYR1_HUMAN CAD protein	1550.90	-0.138	2	APALALAQLKLAEAGAR	5.34E-07	3.19	0.41	2343.62	1	23/30	5.56
3936	PYR1_HUMAN CAD protein	2242.30	0.26	3	RPPIIDAPALALAQLKLAEAGAR	6.85E-09	4.569	0.3	2920	1	38/84	5.5
3043	RAB7A_HUMAN Ras-related protein Rab-7a	1766.90	-1.69	2	ADFLTKEVmVDDRLV	9.91E-01	3.137	0.3	441	3	15/28	4.7
3960	RAB7A_HUMAN Ras-related protein Rab-7a	2060.03	-0.88	2	DPENFPFVVLGNKIDLEN	1.22E-06	3.569	0.2	760	1	19/34	4.5
4925	RAB7A_HUMAN Ras-related protein Rab-7a	1604.87	-1.55	2	FPFVVLGNKIDLEN	1.00E+00	3.325	0.2	847	1	18/26	4.9

1791	RAB9A_HUMAN Ras-related protein Rab-9A	1835.01	-0.736	2	SFPFVILGNKIDISER	2.84E-09	4.49	0.46	1586.29	1	22/30	6.80
2025	RAB9A_HUMAN Ras-related protein Rab-9A	2034.04	-0.444	2	EPESFPFVILGNKIDISE	1.04E-03	3.32	0.42	950.95	1	20/34	5.47
3716	RAB9A_HUMAN Ras-related protein Rab-9A	2190.14	0.19	2	EPESFPFVILGNKIDISER	1.25E-08	3.032	0.3	675	1	19/36	4.4
4039	RAN_HUMAN GTP-binding nuclear protein Ran	2648.31	-1.06	2	VAMPALAPPEVVM DPALAAQYEHDL	1.25E-10	4.798	0.5	604	1	25/48	6.9
4118	RAN_HUMAN GTP-binding nuclear protein Ran	2947.46	-1.66	2	VAMPALAPPEVVM DPALAAQYEHDL	8.37E-13	4.584	0.4	881	1	23/54	6.6
3813	RAP2A_HUMAN Ras-related protein Rap-2a	2140.01	-1.33	2	DPTIEDFYRKEIEVDSSP	5.15E-07	2.927	0.2	214	1	15/34	4.2
3607	RAP2A_HUMAN Ras-related protein Rap-2a	2227.04	-0.03	2	DPTIEDFYRKEIEVDSSPS	1.07E-04	3.622	0.3	325	1	18/36	5.1
2066	RBGP1_HUMAN Rab GTPase-activating protein 1	1549.75	-1.23	2	DFVLVSRQGDETPS	3.59E-06	3.362	0.3	724	1	19/26	5.2
2119	RBGP1_HUMAN Rab GTPase-activating protein 1	1879.87	0.59	2	NSEDFVLVSRQGDETPS	1.04E-10	4.502	0.4	1455	1	23/32	6.3
2114	RBGP1_HUMAN Rab GTPase-activating protein 1	1765.82	0.31	2	SEDFVLVSRQGDETPS	1.11E-05	3.269	0.3	483	1	16/30	4.8
2385	RL30_HUMAN 60S ribosomal protein L30	2288.11	0.27	2	AIIDPGDSDIIRSmPEQTGEK	3.54E-04	3.227	0.3	404	1	21/40	4.2
1474	RL31_HUMAN 60S ribosomal protein L31	1273.64	-0.74	2	KNLQTVNVN DEN	1.35E-03	3.265	0.1	1490	1	17/20	4.3
2836	RL31_HUMAN 60S ribosomal protein L31	1381.77	0.34	2	VTYVPVTTFKNL	1.86E-02	3.329	0.3	740	2	17/22	4.8
2275	RL7_HUMAN 60S ribosomal protein L7	1405.78	-0.41	2	NGTFVKLNKASIN	1.20E-04	2.993	0.2	718	1	16/24	4.1
5826	RM12_HUMAN 39S ribosomal protein L12, mitochondrial	3103.70	-1.09	3	LAGAPLDNAPKEYPPKIQQLVQDIASLTL	1.06E-05	4.108	0.4	476	1	31/112	5.9
3370	RM49_HUMAN Mitochondrial 39S ribosomal protein L49	2489.13	-0.35	2	SQTQGPPDYPRFVESVDEYQF	1.28E-06	3.287	0.4	248	17	13/40	4.6
1300	RS13_HUMAN 40S ribosomal protein S13	2046.16	-1.140	3	DVKEQIYKLAKKGLTPSQ	1.17E-05	3.62	0.36	1018.19	1	30/68	5.10
3296	RS13_HUMAN 40S ribosomal protein S13	2274.27	-0.53	3	DDVKEQIYKLAKKGLTPSQI	2.95E-07	3.996	0.2	973	1	32/76	4.8
3173	RS13_HUMAN 40S ribosomal protein S13	2331.29	-1.55	3	DDVKEQIYKLAKKGLTPSQIG	9.03E-03	3.183	0.3	701	1	28/80	5.2
1698	RS13_HUMAN 40S ribosomal protein S13	1575.91	0.50	2	EQIYKLAKKGLTPS	3.33E-03	3.157	0.2	671	1	17/26	4.0
2792	RS13_HUMAN 40S ribosomal protein S13	2248.22	0.34	3	SDDVKEQIYKLAKKGLTPSQ	7.60E-05	3.719	0.2	1031	1	29/76	4.4
3110	RS13_HUMAN 40S ribosomal protein S13	2418.32	0.63	2	SDDVKEQIYKLAKKGLTPSQIG	6.92E-10	4.028	0.3	1340	1	22/42	4.5
3199	RT31_HUMAN 28S ribosomal protein S31, mitochondrial	2276.16	0.59	2	FAKQLATVNEQPLQNGFEEL	6.53E-05	3.375	0.2	599	1	18/38	4.0
1761	RTN4_HUMAN Reticulon-4	2296.87	0.26	2	FVREPEDEEEEEEEEEED	1.26E-06	4.409	0.2	1582	1	22/34	4.9
4915	S35F4_HUMAN Solute carrier family 35 member F4	1814.05	-1.20	2	AAVDLLKQEVIFNVVR	9.93E-01	3.082	0.2	871	2	16/30	4.1
4080	S38A5_HUMAN Sodium-coupled neutral amino acid transporter 5	1859.03	-0.65	2	LPSIFYLRIVPSEVEP	7.94E-07	3.547	0.2	437	1	18/30	4.3
3740	S39AE_HUMAN Zinc transporter ZIP14	1718.00	-0.92	2	LQQLKALLNHLDVGVG	9.54E-08	3.236	0.3	445	1	17/30	5.3
2771	SAM50_HUMAN Sorting and assembly machinery component 50 homolog	2144.01	-0.89	2	RSLEPLPSSGPDFGGLGEEAE	2.55E-14	4.676	0.5	2305	1	29/40	7.3
3714	SC61G_HUMAN Protein transport protein Sec61 subunit gamma	1747.06	-0.51	2	FVKLIHIPINNIIVGG	4.36E-07	3.159	0.2	509	1	17/30	4.1
1008	SEM7A_HUMAN Semaphorin-7A	1638.86	-1.141	2	NPQFIKATIVHQDQ	2.60E-06	3.11	0.24	434.97	1	15/26	4.10
1031	SEM7A_HUMAN Semaphorin-7A	1709.90	0.726	2	NPQFIKATIVHQDQA	1.91E-05	2.86	0.22	998.60	1	17/28	3.73
1131	SEM7A_HUMAN Semaphorin-7A	1987.99	-0.160	2	NPQFIKATIVHQDQAYD	3.31E-12	3.90	0.34	1503.13	1	21/32	5.52
2894	SEM7A_HUMAN Semaphorin-7A	2488.25	-1.31	3	LPDQQPIPTETTFQVADRHPEVA	7.48E-03	3.785	0.3	528	2	29/84	5.0
2792	SEM7A_HUMAN Semaphorin-7A	2616.31	0.65	3	LPDQQPIPTETTFQVADRHPEVAQ	3.92E-03	3.720	0.3	608	1	31/88	4.5
2358	SEPT9_HUMAN Septin-9	1736.98	1.30	2	IPKTIEKSITHDIE	4.58E-10	3.863	0.3	901	1	20/28	4.8
2458	SEPT9_HUMAN Septin-9	1866.02	-0.45	3	IPKTIEKSITHDIEE	1.50E-03	3.550	0.1	908	1	26/60	3.7
1257	SEPT9_HUMAN Septin-9	1994.12	-0.346	2	IPKTIEKSITHDIEEK	5.12E-08	3.94	0.40	1562.38	1	24/32	5.98

3768	SFXN2_HUMAN Sideroflexin-2	2502.30	-0.05	3	PPGTQVEQLLYAKKLYDSAFHP	8.35E-08	3.529	0.4	911	1	35/84	5.4
4000	SMD1_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1	1343.75	-0.52	2	FILPDSLPLDTL	1.00E+00	2.957	0.3	806	4	18/22	4.7
3880	SNX17_HUMAN Sorting nexin-17	1801.88	-0.76	2	EDGAFSfVRKLQEF	2.05E-05	3.459	0.3	308	41	14/28	4.4
1623	SORL_HUMAN Sortilin-related receptor	1621.88	-0.214	2	DKYMFATKVVHLLG	3.58E-09	2.70	0.22	595.67	1	18/26	3.75
2020	SORL_HUMAN Sortilin-related receptor	1708.84	0.39	2	AAQFVTRHPINEYY	5.98E-07	3.286	0.4	932	1	19/26	5.6
2404 - 2406	SORL_HUMAN Sortilin-related receptor	1821.93	-1.50	2	AAQFVTRHPINEYYI	8.72E-06	2.918	0.3	332	8	14/28	4.4
2293	SORL_HUMAN Sortilin-related receptor	1892.97	0.65	2	AAQFVTRHPINEYYIA	7.17E-10	3.024	0.4	499	1	19/30	4.8
3168	SORL_HUMAN Sortilin-related receptor	1564.86	-1.41	2	DKYMFATKVVHLL	1.25E-09	3.117	0.3	1124	1	19/24	5.3
3391	SORL_HUMAN Sortilin-related receptor	1867.85	0.13	2	EPSGYSTVFRSTDFFQ	1.00E+00	3.057	0.4	526	1	15/30	5.5
2432	SORL_HUMAN Sortilin-related receptor	1764.77	-0.49	2	HPINEYYIADASEDQ	1.06E-05	3.564	0.4	2094	1	23/28	5.9
3473	SORL_HUMAN Sortilin-related receptor	2010.91	-1.34	2	HPINEYYIADASEDQVF	5.81E-13	4.070	0.4	887	1	18/32	6.7
2588	STML2_HUMAN Stomatin-like protein 2	2986.46	0.73	3	GALTKAPVPGTPDSLSSGSSRDVQGTDSL	3.13E-04	4.198	0.3	779	1	34/120	4.9
3038	STML2_HUMAN Stomatin-like protein 2	3472.66	-0.89	3	GALTKAPVPGTPDSLSSGSSRDVQGTDSLDEELD	2.11E-14	5.578	0.5	1087	1	42/136	7.3
2986	STML2_HUMAN Stomatin-like protein 2	3231.51	0.28	3	TKAPVPGTPDSLSSGSSRDVQGTDSLDEELD	1.61E-03	3.582	0.3	648	1	32/124	4.2
1943	SUCA_HUMAN Succinyl-CoA ligase	1660.89	-0.31	2	LPVFTVKEAKEQTG	1.00E+00	3.382	0.2	537	1	17/28	4.2
4905	SUGT1_HUMAN Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	1881.00	-0.68	2	DPQAALIELTKALEQKP	9.38E-04	3.602	0.2	960	1	21/32	4.2
4683	SUGT1_HUMAN Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	1996.02	-1.39	2	DPQAALIELTKALEQKPD	6.93E-09	3.693	0.2	1166	1	24/34	4.9
4974	SYCC_HUMAN Cysteinyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1891.00	-0.93	2	VPEIVNFVQKIVDNGYG	2.25E-09	3.870	0.4	1010	1	20/32	6.2
5017	SYV_HUMAN Valyl-tRNA synthetase	1515.73	-1.82	2	LVSFAYKVQGSDD	1.00E+00	2.480	0.3	357	1	15/26	4.8
1746	TAXB1_HUMAN Tax1-binding protein 1	1676.86	0.58	2	DNYKELKRSLENPA	7.62E-06	3.713	0.3	618	1	17/26	5.3
1852	TAXB1_HUMAN Tax1-binding protein 1	1903.99	0.49	2	VQDNYKELKRSLENPA	7.89E-03	3.732	0.3	450	1	17/30	4.9
1962	TCPD_HUMAN T-complex protein 1 subunit delta	1244.67	-1.35	2	LVELSKAQDIE	1.00E+00	3.283	0.2	992	1	16/20	5.0
4940	TCPD_HUMAN T-complex protein 1 subunit delta	2800.58	-0.16	3	VVSALTATETVRSILKIDVVNTR	1.94E-10	3.855	0.3	1566	1	34/100	4.5
1641	TCTP_HUMAN Translationally-controlled tumor protein	1203.55	0.19	2	QETSFTKEAY	1.00E+00	2.850	0.4	478	1	14/18	5.8
2058	TERA_HUMAN Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1809.98	-0.44	2	GPPGTGKTLIARAVANETG	3.18E-11	4.540	0.3	1628	1	24/36	5.5
2209	TERA_HUMAN Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1881.02	0.48	2	GPPGTGKTLIARAVANETGA	1.89E-14	3.920	0.2	1641	1	26/38	4.4
888	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	2049.95	-0.091	2	NENSYPVREAGSQKDENL	3.98E-08	3.96	0.34	900.26	1	20/34	5.55
1658	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1668.93	-1.458	2	VAGQFVIKLTHTDVEL	1.46E-06	3.09	0.27	674.53	2	17/28	3.96
1132	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1952.92	-0.050	2	EPDHYVVVGAQRDAWGPG	5.73E-03	2.70	0.33	889.49	1	22/34	4.33
625	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1822.82	-0.085	2	ENSYVPREAGSQKDEN	6.13E-02	2.78	0.35	250.49	1	15/30	4.68
1473	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	2112.03	-0.128	2	NDRVMRVEYHFLSPYVS	3.19E-02	3.16	0.33	189.77	2	15/32	4.72
1521	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	2209.09	0.038	2	NDRVMRVEYHFLSPYVSP	8.93E-04	3.12	0.38	242.93	1	17/34	5.15
1949	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1627.80	0.13	2	ENPGGYVAYSKAATVT	1.38E-02	2.928	0.3	611	1	17/30	4.4
1966	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1684.82	0.33	2	ENPGGYVAYSKAATVTG	3.37E-06	3.846	0.4	588	1	17/32	5.7
1783	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1822.82	-0.56	2	NENSYPVREAGSQKDE	9.94E-09	2.794	0.3	424	2	16/30	4.4
1715	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1936.86	-1.69	2	NENSYPVREAGSQKDEN	9.89E-06	2.971	0.2	337	1	16/32	4.4
1644	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1298.64	-0.71	2	NPGGYVAYSKAAT	3.68E-08	3.113	0.3	1053	1	20/24	5.1

1836	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1498.75	-0.72	2	NPGGYVAYSKAATVT	4.50E-07	3.866	0.4	984	1	22/28	6.4
1852	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1555.78	-0.02	2	NPGGYVAYSKAATVTG	4.88E-03	3.319	0.4	686	1	19/30	5.5
1828	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1441.73	0.20	2	PGGYVAYSKAATVTG	5.41E-03	3.935	0.4	2422	1	22/28	6.2
3563	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1666.87	-1.34	2	SPLLYTLIEKtMQN	4.82E-04	3.519	0.3	944	1	16/26	5.3
4608	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	1555.85	-0.66	2	VAGQFVIKLTHDVE	1.21E-03	3.352	0.3	938	1	18/26	5.2
3545	TFR1_HUMAN Transferrin receptor protein 1	2224.21	0.15	3	VARAAAEVAGQFVIKLTHDVE	5.57E-02	3.638	0.2	670	1	29/80	4.0
3600	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1319.68	-1.41	1	EEFLIAGKLQDG	3.95E-05	2.897	0.2	540	1	15/22	4.7
4700	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1416.81	-0.93	2	EFLIAGKLQDGLL	6.56E-02	3.226	0.2	497	6	17/24	4.1
4130	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1287.77	0.27	2	FLIAGKLQDGLL	4.00E-05	3.545	0.2	1745	2	19/22	4.4
1791	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	914.53	0.26	2	IAGKLQDGL	1.60E-04	2.597	0.3	842	1	14/16	4.6
2135	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1027.61	-0.05	2	LIAGKLQDGL	1.53E-05	2.940	0.2	616	1	16/18	4.4
2604	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1140.70	0.49	2	LIAGKLQDGLL	3.11E-01	3.080	0.3	1030	1	18/20	5.2
6399	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1788.99	-1.68	2	RSEFLIAGKLQDGLL	2.13E-04	2.919	0.2	882	1	20/30	4.3
3650	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1406.72	-1.45	1	SEEFLLIAGKLQDG	7.03E-07	3.068	0.3	551	1	14/24	5.3
4379 - 4381	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1519.80	-0.40	2	SEEFLLIAGKLQDGL	2.36E-07	3.625	0.2	1548	1	20/26	4.8
4097	TIMP1_HUMAN Metalloproteinase inhibitor 1	1632.88	-0.74	2	SEEFLLIAGKLQDGLL	7.60E-05	3.621	0.1	946	2	19/28	3.9
4753	TM87B_HUMAN Transmembrane protein 87B	1837.93	-0.52	2	IFIVSIKTENTDASWN	9.99E-01	3.591	0.4	501	1	16/30	5.7
2268	TNAP3_HUMAN Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1877.94	0.39	2	DSHFVPLVTLKDSGPE	2.08E-07	3.683	0.4	991	1	21/32	6.1
3541	TNF11_HUMAN Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11	2072.96	0.16	3	DPDQDATYFGAFKVRDID	2.40E-02	4.026	0.3	865	2	28/68	5.3
2816	TNIP1_HUMAN TNFAIP3-interacting protein 1	1670.91	-0.25	2	EKEIQLNKALEEA	1.00E+00	3.228	0.2	423	2	17/26	4.2
2236	TNR8_HUMAN Tumor necrosis factor receptor superfamily member 8	1956.98	0.00	3	LSVEEGKEDPLPTAASGK	2.54E-05	4.020	0.3	960	1	31/72	5.1
1950	TNR8_HUMAN Tumor necrosis factor receptor superfamily member 8	1843.89	-0.05	2	SVEEGKEDPLPTAASGK	5.08E-08	4.070	0.3	1456	1	24/34	5.6
4257	TR10B_HUMAN Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	2054.07	0.67	3	DTLYTMLIKWVNKTGRD	1.00E+00	2.957	0.3	656	1	25/64	4.3
2185	TRFM_HUMAN Melanotransferrin	1799.96	-0.377	2	IFTVYGLLDKAQDLFG	7.92E-05	2.82	0.29	260.49	1	15/30	4.18
2172	TRFM_HUMAN Melanotransferrin	2030.01	0.136	2	IFTVYGLLDKAQDLFGDD	6.86E-07	3.42	0.35	1148.87	1	20/34	5.17
2191	TRFM_HUMAN Melanotransferrin	1914.98	-1.877	2	IFTVYGLLDKAQDLFGD	1.28E-07	3.53	0.31	1193.87	1	22/32	4.48
2056	TRFM_HUMAN Melanotransferrin	1801.90	-0.927	2	FTVYGLLDKAQDLFGD	9.51E-07	2.81	0.29	631.40	1	16/30	4.07
2091	TXND4_HUMAN Thioredoxin domain-containing protein 4	1918.96	-0.271	2	EGLPFLILFHMKEDTE	1.31E-06	2.84	0.31	958.99	1	19/30	4.42
1289	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	1863.05	0.028	2	FVKTLTGKTITLEVEPS	4.18E-08	3.43	0.15	753.37	1	22/32	3.82
2441	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	1968.05	-0.62	2	IPPDQQLIFAGKQLED	1.30E-06	3.568	0.3	471	1	17/32	5.0
2475	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	2025.08	-0.50	2	IPPDQQLIFAGKQLEDG	3.67E-13	4.147	0.4	703	1	19/34	6.0
2250	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	2181.18	-0.75	3	IPPDQQLIFAGKQLEDGR	5.10E-08	3.752	0.3	777	1	30/72	5.4
2285	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	2282.23	0.73	3	IPPDQQLIFAGKQLEDGRT	1.56E-06	4.494	0.4	1058	1	33/76	5.7
2738	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	2395.31	0.11	2	IPPDQQLIFAGKQLEDGRTL	6.49E-05	3.589	0.3	357	8	17/40	4.0
2609	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	2482.34	0.63	3	IPPDQQLIFAGKQLEDGRTLS	2.41E-04	3.415	0.3	689	1	27/84	4.2
2663	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	2597.37	0.46	3	IPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSD	1.53E-06	3.756	0.3	1042	1	33/88	4.8
2991	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	2760.43	-0.10	3	IPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDY	6.02E-03	4.197	0.3	1137	1	32/92	5.0

2849	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	2874.47	0.30	3	IPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYN	6.38E-03	5.014	0.4	1657	1	39/96	5.8
3141	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	3115.62	-0.20	3	IPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQ	6.53E-10	5.360	0.3	1241	1	37/104	5.8
2958	UBIQ_HUMAN Ubiquitin	3372.75	-0.01	3	IPPDQQLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKE	1.24E-03	4.074	0.3	581	1	29/112	4.9
1158	VA0D1_HUMAN Vacuolar proton pump subunit d 1	2074.94	-0.828	2	RADDYEQVKNVADYYPE	3.10E-09	3.53	0.40	1545.11	1	22/32	5.48
2200	VCAM1_HUMAN Vascular cell adhesion protein 1	1929.07	0.49	2	VPETWILKKKAETGDT	3.36E-09	4.016	0.3	756	1	22/32	5.0
1013	VPS4A_HUMAN Vacuolar protein sorting-associating protein 4A	1831.95	-0.960	2	GPPGTGKSYLAKAVATEAN	1.59E-05	2.78	0.32	237.80	3	16/36	3.81
2174	YKT6_HUMAN Synaptobrevin homolog YKT6	1440.76	-0.213	2	FTLLEKVLDEFS	9.53E-07	2.64	0.23	1217.71	1	19/22	3.96

Table 1: Sequences of peptides eluted from HLA-DR8 molecules. The sequences in red are identical to peptides previously isolated from DQ8, DQ2 or I-A^{g7}

Susceptibility haplotypes

DRB1*0405	Ser β 57	DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8)	Ala β 57
DRB1*0401	Asp β 57	DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8)	Ala β 57
DRB1*0301	Asp β 57	DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2)	Ala β 57
DRB1*0402	Asp β 57	DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8)	Ala β 57
DRB1*0404	Asp β 57	DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8)	Ala β 57
DRB1*0801	Ser β 57	DQA1*0401-DQB1*0402 (DQ4.2)	Asp β 57

Protective haplotypes

DRB1*0701	Val β 57	DQA1*0201-DQB1*0303 (DQ9.2)	Asp β 57
DRB1*1401	Ala β 57	DQA1*0101-DQB1*0503 (DQ5)	Asp β 57
DRB1*1501	Asp β 57	DQA1*0102-DQB1*0602 (DQ6.2)	Asp β 57
DRB1*1104	Asp β 57	DQA1*0501-DQB1*0301 (DQ7)	Asp β 57
DRB1*1303	Asp β 57	DQA1*0501-DQB1*0301 (DQ7)	Asp β 57

Table 2: Susceptibility or protective T1D haplotypes and their relation with the presence or absence of Asp in position 57 of the beta chain

Peptide	Restriction	Sequence	Reference
Proinsulin 73-90	B1*0401	GAGSLQPLALEGSLQKRG	(Durinovic-Bello, Rosinger et al. 2006)
GAD65 206 - 220	I-A ^{g7}	TYE IAPVFLLE YVT	(Lieberman and DiLorenzo 2003; Kim, Tarbell et al. 2004)
GAD65 221 - 235	I-A ^{g7}	LKKMREIIGWPGGSG	(Chao, Sytwu et al. 1999; Lieberman and DiLorenzo 2003)
GAD65 286 - 300	I-A ^{g7}	KKG AAALGIGT DSVI	(Chao, Sytwu et al. 1999; Lieberman and DiLorenzo 2003)
GAD65 401-415	I-A ^{g7}	PLQCSALLVREEGLM	(Chao, Sytwu et al. 1999; Lieberman and DiLorenzo 2003)
GAD65 561-575	I-A ^{g7}	ISNPAATHQDIDFLI	(Chao, Sytwu et al. 1999; Lieberman and DiLorenzo 2003)
GAD65 116-130	DRB1*0401	MNIL LQYVVKSF DRST	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 271-285	DRB1*0401	PRLIAFTSEHSFSL	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 356-370	DRB1*0401	KYKIWMHVDAAWGGG	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 376-390	DRB1*0401	KHKWKLSGVERANSV	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 481-495	DRB1*0401	LYN IKNREGY EMVF	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 511-525	DRB1*0401, I-A ^{g7}	PS LRTLEDNE ERMSR	(Patel, Cope et al. 1997; Lieberman and DiLorenzo 2003)
GAD65 546-560	DRB1*0401	SYQPLGDKVNFFRMV	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 551-565	DRB1*0401	GDKVNFFRMVISNPA	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 556-570	DRB1*0401	FFRMVISNPAATHQD	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 566-580	DRB1*0401	ATHQD IDFLIEE IER	(Patel, Cope et al. 1997)
GAD65 274-286	DRB1*0401	IAFTSEHSFSLK	(Wicker, Chen et al. 1996)
GAD65 115-127	DRB1*0401	MNIL LQYVVKSF D	(Wicker, Chen et al. 1996)
PI-1(47-64)	I-A ^{g7}	SPGDLQTLALEVARQKRG	(Levisetti, Lewis et al. 2008)
GAD65 524-543	I-A ^{g7}	SRLSKVAPVIKARMMEYGT	(Dai, Jensen et al. 2008)
INSULIN 9-23	I-A ^{g7}	PHLVEALYLVCGERG	(Lieberman and DiLorenzo 2003)
ProinsulinB24-C36	DR0301	FFYTPKTR EAED	(Oling, Marttila et al. 2005)
GAD65 121-140	DQ8	YVVKSFDRSTK VIDFHYPNE	(Liu, Purdy et al. 1999)
GAD65 201-220	DQ8	NTNMFTYE IAPVFLLE YVT	(Liu, Purdy et al. 1999)
GAD65 231-250	DQ8	PGGSGDGIFSPGGAISNMYA	(Liu, Purdy et al. 1999)
GAD65 471-490	DQ8	VDKCLELAELY LYNIKNREG	(Liu, Purdy et al. 1999)
GAD65 247.266	I-A ^{g7}	NMYAML IARYKMSPE VKEKG	(Lieberman and DiLorenzo 2003)
HSP-60 164-183	I-A ^{g7}	TPEEIAQ VATISANGD KDIG	(Lieberman and DiLorenzo 2003)
HSP-60 437-460	I-A ^{g7}	VLGGGCALL RCPALD SLKPANED	(Lieberman and DiLorenzo 2003)
ICA69 36.47	I-A ^{g7}	AFIKATGKKE DE	(Lieberman and DiLorenzo 2003)

Table 3: Autoantigenic peptides described as good binders to the T1D-associated alleles. In red, possible cores of the peptides that could theoretically bind to HLA-DRB1*0801



Figure 1: Sequence of intermediate and final matrixes obtained in the four steps of the HLA-DR8 matrix generation. A) Matrix done with all the 789 possible nonamers; B) Matrix done by selecting cores with Asp or Glu in P9 within all possible cores of each single sequence (512 nonamers); C) Matrix obtained after selection of cores with Lys in P4 or P6 within all possible cores of each single sequence (421 nonamers); D) Final matrix: obtained by selecting just one core within each sequence (224 nonamers).

DISCUSSIÓ CAPÍTOL 1

Aquest estudi ha permès caracteritzar acuradament el motiu d'ancoratge de la molècula d'HLA-DR407 (DRA1*0101/DRB1*0407) i fer una primera descripció del d'HLA-DR8 (DRA1*0101/DRB1*0801). En aquests dos treballs s'ha usat pèptids naturals enlloc de pèptids sintètics o de llibreries peptídiques. Aquesta aproximació té l'avantatge que els pèptids han estat seleccionats per les cèl·lules presentadors d'antigen durant el seu processament, on un gran nombre de fenòmens influencien la selecció dels lligands que seran presentats (Chang, Suri et al. 2007). S'ha seqüenciat 151 pèptids naturals de DR4 mitjançant LC- μ ESI-ITMS/MS de la línia HLA-homozigota JHAF del banc de cèl·lules i gens IHWG, i 486 de DR8 per MDLC- μ ESI-ITMS/MS, de la línia limfoblastoide HLA-DR8 homozigota FN-86, generada en el nostre laboratori. Els lligands d'ambdues cèl·lules provenien majoritàriament de proteïnes de membrana o de compartiments membranosos com endosomes, lisosomes, el reticle endoplasmàtic o l'aparell de Golgi. També es van identificar pèptids de proteïnes citosòliques, la qual cosa ja havia estat descrita per altres al·lels (Muntasell, Carrascal et al. 2002; Alvarez, Collado et al. 2008). Comparant els dos repertoris, el de DR8 presentava major freqüència de pèptids de proteïnes citosòliques (48% dels pèptids) que el de DR4 (27%) i la mida dels pèptids també era més heterogènia, presentant pèptids de entre 9 i 43 residus, mentre que DR4 presentava pèptids de entre 11 i 27 aminoàcids. Actualment s'està realitzant en el nostre laboratori, un treball de caracterització dels pèptids presentats per HLA-DR en melsa humana. Aquest treball, dut a terme per Javier Collado, està aportant informació sobre els tipus de pèptids que es presenten en condicions fisiològiques i no en condicions d'hiperactivació de l'expressió de MHC com passa a les cèl·lules transformades. Els 2/3 del total de pèptids eluïts d'una melsa DR3/DR8 eren clars lligands de DR8 (n=104) ja que complien exactament el motiu descrit. És interessant remarcar que el rang de mida d'aquests pèptids era més limitat, de 12-20 aminoàcids, que el rang de 9-43 observat en els pèptids eluïts de la línia cel·lular FN-86. Aquestes dades afegeixen evidència en favor de la idea que la presentació fisiològica de pèptids per classe II no és tan permissiva alhora de seleccionar els pèptids presentats, com la presentació en cèl·lules EBV.

Tot i l'elevat polimorfisme de la cadena β de l'HLA-DR, la regió compresa entre els residus β 81- β 92 que uneix la posició 1 del pèptid no presenta gaires variacions i és comú a molts al·lels, entre ells DR407 i DR8. Per tant vam poder assumir que aquestes dues molècules unien residus hidrofòbics o aromàtics en posició 1, igual que DR1 i moltes altres molècules d'HLA-DR. Aquesta característica es va utilitzar per determinar els *cores* dels pèptids, tal i com s'havia fet en un treball anterior del nostre grup, on es definia el motiu d'ancoratge de la molècula associada a AR, HLA-DR10 (Alvarez, Collado et al. 2008). Només 3 de les 68 seqüències obtingudes de DR407 i 4 de 228 en el cas de DR8 no tenien un residu hidrofòbic o aromàtic que es pogués seleccionar com a possible P1.

L'artritis reumatoide és una malaltia inflamatòria crònica de les articulacions caracteritzada per la inflamació sinovial i l'erosió de l'os i el cartílag. S'ha vist que hi ha certs al·lels de MHC de classe II que

confereixen susceptibilitat a la malaltia (Winchester 1994). El rol específic de les molècules de classe II en la patologia es desconeix, però es creu que ha d'estar relacionat amb la presentació d'antígens, durant la selecció tímica o a la perifèria. HLA-DR407(DRA1*0101/DRB1*0407) no està associat a AR, a diferència d'altres variants de DR4. Hi ha poca informació sobre el repertori peptídic d'aquest al·lel, encara que s'ha descrit parcialment el motiu d'ancoratge d'aquesta molècula per seqüenciació de pèptids en pool. Aquesta tècnica és útil per caracteritzar els motius d'ancoratge de les molècules de classe I, ja que els pèptids que presenten tenen una mida limitada de entre 9-11 residus, però pels de MHC de classe II no és prou precisa, doncs les longituds dels pèptids són molt variables (Davenport, Godkin et al. 1997). Els nostres resultats no contradiuen els anteriorment publicats, però hem definit més acuradament la importància de posicions dins els solc d'unió no descrites abans. Aquest és el cas de la posició 7 del pèptid, on es mostra preferència per Asp. Per tot el que hi ha publicat fins al moment sembla que la posició més crítica per l'associació amb l'AR és la posició 4 del pèptid ja que és la que més varia entre els al·lells associats i no associats. Aquest no és el cas de *0407, ja que no semblava tenir preferència clara per cap residu i a diferència de *0402, no uneix residus carregats positivament. Els nostres resultats fan pensar que per *0407, P4 no és una posició restrictiva.

A la butxaca P1 de les molècules d'HLA-DR existeix un dimorfisme a la posició DRβ86, distribuïda igualment entre els al·lells associats i els no associats a AR. DR1, DRB1*0401, *0407 i *0405 presenten Gly en aquesta posició, i uneixen pèptids amb cadenes laterals grans, aromàtiques i no polars en P1, mentre que altres variants de DR4 com DRB1*0402 i *0404 al expressar Valβ86, la mida de la butxaca disminueix i no permet que s'uneixin residus aromàtics (Hammer, Gallazzi et al. 1995). Per tant, si hi ha d'haver un conjunt de pèptids compartits pels diferents DR associats a la malaltia, aquests no haurien de tenir Trp ni Tyr en P1. La posició 6 del motiu d'ancoratge també és comú a totes les variants de DR4, no existeixen variacions en la seqüència de la cadena β i diversos treballs avalen que el tipus de residus que s'uneixen en aquesta posició són bàsicament Ser, Thr, Asn i Val. Els nostres resultats ho confirmen.

Els al·lells associats a AR (DRB1*0401, *0404, *0405, *0101, *1001) comparteixen la seqüència d'aminoàcids LLEQ[K/R]RAA a les posicions 67-74 de la cadena DRβ, constituint l'anomenat *epítot compartit* (EC) (Gregersen, Silver et al. 1987). S'ha proposat que tots els al·lells que comparteixen aquest epítot indueixen l'activació dels limfòcits T autorreactius. Estudis cristal·logràfics demostren que la Glu70 i l'Arg o Lys de la posició 71 de la cadena β interaccionen directament amb el TCR, seleccionant una població específica de limfòcits T (Dessen, Lawrence et al. 1997). Altres estudis han demostrat a través de mutagènesis dirigida, que modificacions en els residus β70-74 dels al·lells amb l'epítot compartit poden generar canvis en el conjunt de pèptids presentats i en el reconeixement per cèl·lules T i per tant, en la resposta immunitària (Fu, Bono et al. 1995; McNicholl, Whitworth et al. 1995). Les diferències entre les variants de DR4 associades i no associades a AR, estan restringides a aquesta regió, fent encara més evident la importància de l'*epítot compartit* en l'associació amb la malaltia.

Estudis d'unió peptídica confirmen la influència de la presència o no de l'EC sobre la selecció de lligands. DR402 presenta variacions a les posicions $\beta 70$ (Gln a Asp) i $\beta 71$ (Lys a Glu), que modifiquen la càrrega electrostàtica de la butxaca que uneix P4, fent que es localitzin preferentment en aquesta posició aminoàcids carregats positivament com Lys o Arg (Hammer, Gallazzi et al. 1995). Contràriament, els al·lells associats a AR uneixen favorablement pèptids amb Asp o Glu en P4 i dels al·lells associats, s'ha vist que DR401 uneix de 20-50 vegades millor els pèptids amb Asp o Glu en P4 que DR404. Mutant la Lys $\beta 71$ de DR401 a Arg (com DR404 i 407), la unió disminueix fins a nivells comparables als de DR404 (Hammer, Gallazzi et al. 1995). Tot això fa pensar que DR407, al tenir Arg $\beta 71$ i una modificació en $\beta 74$ (Ala a Glu) que introdueix un residu àcid a la cadena β , com DR402, no unirà residus àcids en aquesta posició. Aquesta hipòtesis es confirma amb les nostres dades. Els resultats no mostren preferència per cap aminoàcid en P4, només per Ala, com a residu secundari. Altres residus com Ile, Ser, Thr, Val i Tyr són acceptats, i s'observa una tendència negativa vers l'acceptació de residus àcids, Asp i Glu, en P4, encara que no sigui significativa. A diferència de DR402, no hi ha preferència per residus carregats positivament.

Un fet destacable de les nostres dades és que la posició 7 també és una posició d'ancoratge, ocupada preferentment per Asp (un 26% de les seqüències presentaven aquest residu en P7). Les publicacions anteriors no veien cap restricció important per aquesta posició i indicaven que tant DR407 com els subtipus de DR4 associats a AR (*0401, *0404 i *0405) acceptaven residus polars, carregats i alifàtics en posició 7. Tanmateix, les nostres dades suggereixen que la diferència entre els pèptids associats a DR407 comparats a altres subtipus podria estar precisament en la presència d'un residu àcid a P7. Caldria obtenir dades de unió de pèptids als diferents al·lells per poder confirmar aquesta hipòtesi. Finalment, les nostres dades mostren una posició 9 ben definida amb preferència significativa per Gly i Gln, i Asp i Ala com a residus secundaris.

Saber si un determinat pèptid pot unir-se a un molècula de MHC específica és important alhora de generar vacunes basades en epítops o teràpies específiques d'antigen (Melief, Offringa et al. 1996; Toes, Offringa et al. 1996; Wang, Charoenvit et al. 1996). D'aquesta manera es poden dirigir els esforços cap a aquells pèptids que amb més probabilitat s'unirien a les molècules desitjades i descartar aquells que no s'hi unirien. Les vacunes basades en epítops ofereixen la possibilitat de modular la potencia d'aquests pèptids, alterant els residus d'ancoratge, els que contacten amb el TCR o ambdós. Per aquest motiu és necessari conèixer els motius d'ancoratge de cada molècula presentadora i quins residus estan afavorits o limitats en cada posició. L'obstacle principal és, però, l'elevat grau de polimorfisme de les molècules de MHC expressades a la població humana, tot i que està demostrat que existeixen pèptids capaços d'unir-se a diferents molècules de MHC. En el cas de les molècules d'HLA de classe I, més del 60% es poden agrupar en 4 grans grups caracteritzats per les seves especificitats peptídiques similars (supermotius HLA) (Sidney, del Guercio et al. 1995; Sidney, Grey et al. 1996; Sidney, Grey et al. 1996) i per les molècules de classe II s'ha descrit pèptids capaços de ser presentats per diferents al·lells d'HLA i generar resposta (Roche and Cresswell 1990; Ferrari, Bertoletti et al. 1991; O'Sullivan, Arrhenius et al. 1991;

Southwood, Sidney et al. 1998). Molts dels lligands d'HLA-DR407 podrien presentar-se per altres al·lels que alhora comparteixen part del seu repertori amb altres al·lels. Aquest elevat grau de promiscuitat entre els pèptids presentats per MHC-II ja estava descrit (Chicz, Urban et al. 1993; Kirschmann, Duffin et al. 1995). Aquest fet però no contradiu la hipòtesis que l'associació d'alguns al·lels amb determinades patologies es deu a la unió selectiva de pèptids amb aquestes molècules, ja que: a) s'ha vist que tot i l'existència de repertoris peptídics solapats, existeixen pèptids específics d'al·lel (O'Sullivan, Arrhenius et al. 1991; Southwood, Sidney et al. 1998); b) els residus carregats en dues posicions clau de la cadena β ($\beta 71$ i $\beta 57$) controlen les càrregues permeses a les posicions P4 ($\beta 71$) i P9 ($\beta 57$) del pèptid. Així, pèptids amb càrrega a P4 o P9 només podran unir-se si una càrrega oposada o la manca de càrrega està present a les respectives posicions de la cadena β del MHC (Wucherpfennig and Strominger 1995). Això explicaria perquè tot i el solapament de seqüències entre els lligands de DR407 i les variants de DR4 associades amb AR, no es pot descartar que pèptids relacionats amb la malaltia no poguessin presentar-se per DR407 ni DR402 però sí per les variants associades. Els motius d'ancoratge de les variants de DR4 són molt semblants a P1 i P6 i accepten residus comuns a P9, per això es troben seqüències comunes i molts lligands que poden unir-se teòricament a les diferents variants de DR4. S'hauria de comprovar empíricament si els antígens que s'ha postulat com potencials iniciadors de la malaltia com alguns antígens del CMV o de l'EBV, o proteïnes autòlogues presents a les articulacions com els proteoglicans, la gp39 i el col·lagen tipus II podrien presentar-se per DR407. Si agafem dos pèptids de l'autoantigen més estudiat en AR, el col·lagen tipus II: CII(1168-1180) (QYMRADQAAGGLR) i CII(261-273) (AGFKGEQGPKGEP), i estudiem les seves posicions d'ancoratge, segons els nostres resultats i el que ja hi ha publicat podríem predir que tot i el compliment del motiu en les altres posicions, els residus àcids en P4 d'aquests dos pèptids no afavoriria la seva presentació per DR402 ni per DR407. Encara que les nostres dades no mostraven cap lligand amb un residu àcid en aquesta posició, caldrà fer assajos d'unió peptídica abans d'assegurar que la presència d'aa àcids dificulta la unió.

El motiu d'ancoratge de DR8, comparat amb el de DR407, presenta un grau més elevat de restricció, resultant molt més evident, sense ambigüitats i amb posicions molt ben definides. La posició P9 és la més restrictiva, de manera molt similar al motiu dels altres al·lels associats a diabetis de tipus 1, DQ8 i DQ2 en humans i I-A^{g7} en ratolins. S'ha vist que tot i l'existència de diferències en els motius d'ancoratge dels al·lels associats a T1D tots presenten una forta restricció per residus àcids en P9 i certes coincidències a les altres posicions P4 i P6, la qual cosa permet, en alguns casos, cert solapament dels repertoris. L'afavoriment d'una única Lys en posició 4 o 6 representa una restricció específica de DR8 que no es troba als altres al·lels associats a T1D. Aquesta Lys inclús disminueix l'afinitat dels pèptids pels altres al·lels. Això fa pensar que el solapament de repertoris a part de ser limitat, es podria restringir a pèptids de mitjana o baixa afinitat.

A diferència de DR8, un fet a remarcar del repertori de DR407 és la identificació d'un nombre important de pèptids de la cadena invariant. Per DR8, tot i el major nombre de pèptids, no se n'ha identificat cap. Aquest fet ja s'havia observat en un altre treball (Kirschmann, Duffin et al. 1995) sobre els repertoris

peptídics de les diferents variants de DR4, on destacaven el fet que DR402 a diferència dels al·lels associats a AR presentava molts pèptids provinents de la cadena invariant i postulaven que una major afinitat per CLIP d'aquests al·lels impediria l'associació de pèptids de baixa afinitat. Aquests pèptids de baixa afinitat estarien presumiblement involucrats en la etiologia o cronicitat de la malaltia. De fet, s'ha demostrat que els al·lels associats a AR DR401, 404 i 405 formen complexos DR-CLIP relativament inestables, mentre que DR402 i 403 formen complexos de vida llarga (Patil, Pashine et al. 2001). En aquest estudi avaluen diferents característiques dels complexos DR-CLIP com la seva abundància a la superfície cel·lular, l'estabilitat en SDS i l'estabilitat cinètica *in vitro* i *in vivo*. És possible que, al menys en el context de DR4, una baixa afinitat per CLIP predisposi a la presentació d'antígens propis usant vies que per altres al·lels més estretament regulats degut a l'elevada afinitat per CLIP, no estan disponibles. La importància de li sobre l'habilitat de les APC per presentar antigen està àmpliament documentada (Bodmer, Viville et al. 1994; Long, LaVaute et al. 1994; Hitzel, van Endert et al. 1995; Muntasell, Carrascal et al. 2004).

Aquests dos treballs de caracterització dels motius d'ancoratge de DR4 i DR8 indiquen que tot i el gran solapament de repertoris entre al·lels semblants existeixen posicions determinants dins la cadena β on la presència d'aminoàcids amb càrrega generaran butxaques amb especificitats concretes que restringiran la unió de pèptids amb determinats residus en aquestes posicions.

CAPÍTOL 2:

IDENTIFICACIÓ DELS LLIGANDS NATURALS ASSOCIATS A MOLÈCULES D'HLA-DR EN TIROIDES HUMANES AUTOIMMUNES

OBJECTIUS:

- Caracterització dels lligands naturals associats a molècules d'HLA-DR en glàndules tiroides afectades per la malaltia de Graves-Basedow. Anàlisi de la seqüència i de la seva capacitat d'unió a HLA-DR

ARTICLES:

- Muixí et al. Thyroglobulin peptides associate in vivo to HLA-DR in autoimmune thyroid glands (J Immunol. 2008 Jul 1;181(1):795-807)
- Muixí et al. Peptides presented *in vivo* by HLA-DR thyroid autoimmunity (review) (Adv Immunol. 2008;99:165-209)

ANTECEDENTS

En les malalties autoimmunitàries òrgan específiques, com ara les malalties autoimmunitàries de la tiroide, les dianes del dany tissular són les cèl·lules epitelials endocrines del propi teixit. S'ha vist que aquestes cèl·lules sobre expressen HLA-I i expressen de manera ectòpica molècules d'HLA de classe II (Hanafusa, Pujol-Borrell et al. 1983; Lucas-Martin, Foz-Sala et al. 1988). En treballs previs del nostre grup observàrem que les molècules de classe II expressades a les cèl·lules tiroïdals tenien una conformació estable (Catalfamo, Serradell et al. 1999), i per tant estaven associades a pèptids autòlegs amb suficient afinitat per poder estabilitzar-se a la membrana cel·lular. Aquests complexos MHC-pèptid autòleg poden ser reconeguts per cèl·lules T CD4⁺ infiltrants. D'aquesta manera les cèl·lules fol·liculars tiroïdals (CFT) podrien estar jugant un paper important en el manteniment i/o regulació de la resposta immune que s'està duent a terme *in situ*.

Les CFT són cèl·lules molt especialitzades que sintetitzen y secreten molècules específiques del teixit com les hormones tiroïdals. Per tant poden haver-hi diferències importants en les vies endocítiques i secretores entre aquestes cèl·lules i les APC convencionals. Aquestes característiques, que inclouen l'expressió diferencial de proteases, condicionaran el repertori peptídic presentat per les molècules de MHC-II en les CFT (Sercarz, Lehmann et al. 1993; Lanzavecchia 1995). En el nostre laboratori, mitjançant un model experimental amb cèl·lules epitelials endocrines (RINm5F, amb característiques de cèl·lules beta) transfectades amb HLA-DR, es va comparar el repertori peptídic presentat per aquestes cèl·lules epitelials, i per les cèl·lules limfoides. Els resultats suggerien possibles diferències en els mecanismes de generació dels pèptids per la seva presentació via classe II (Muntasell, Carrascal et al. 2002). La presència o absència de les principals xaperones de la via de classe II, HLA-DM i la cadena invariant (Ii), també afectaven al repertori (Muntasell, Carrascal et al. 2004).

En treballs anteriors del nostre grup on s'estudiava la població de cèl·lules T infiltrants de la tiroide de pacients amb GD o HT, després de caracteritzar més de 100 clons autoreactius es va poder concloure que la majoria de cèl·lules infiltrants de l'òrgan diana, que presumiblement estaven involucrades en el procés autoimmunitari, tenien un TCR de baixa afinitat, la qual cosa dificultava molt la identificació de la seva especificitat (Roura-Mir, Catalfamo et al. 1997).

Normalment l'estudi dels limfòcits T que participen en la resposta *in situ* requereix de la identificació dels limfòcits autoreactius i posteriorment de la caracterització de la seva especificitat. Les dificultats d'aquesta aproximació, ens va fer optar per una estratègia contrària, utilitzant el concepte de "reverse immunology" (Paradela, Garcia-Peydro et al. 1998; Dengjel, Nastke et al. 2006; Viatte, Alves et al. 2006): primer identificar els pèptids presentats *in situ* units a molècules d'HLA-DR de tiroïdes de pacients amb GD per després caracteritzar les cèl·lules T específiques per aquests i el seu possible rol *in situ*.

1. SELECCIÓ I CARACTERITZACIÓ DEL TEIXIT TIROÏDAL

Al plantejar-nos l'estudi dels pèptids presentats per MHC-II en cèl·lules epitelials de tiroides afectats per la malaltia de Graves es va descartar la idea de separar la població cel·lular abans de fer l'elució del pool peptídic. En estudis previs del nostre grup on s'estudiava l'expressió de classe II per les cèl·lules tiroïdals (Sospedra, Obiols et al. 1995; Roura-Mir, Catalfamo et al. 1997; Catalfamo, Serradell et al. 1999), el teixit es digeriria segons el protocol descrit a l'apartat 2.2 dels materials i mètodes i posteriorment es posava en cultiu durant tota la nit per separar les cèl·lules adherents (cèl·lules fol·liculars tiroïdals), de les mononuclears no adherents. Tot i que la viabilitat cel·lular era del 85%, tenint en compte que d'algunes de les mostres només disposàvem d'un gram de teixit, el nombre de cèl·lules totals no hauria estat suficient per poder caracteritzar els lligands d'HLA-II per MS. A més a més, durant el procés de cultiu, les cèl·lules epitelials perden l'expressió de MHC-II i s'indueix la degradació proteica i per tant el repertori peptídic es pot modificar. Tenint en compte aquestes limitacions es va decidir processar el teixit directament, partint dels blocs congelats.

Amb aquesta aproximació no podíem saber quin dels tipus cel·lulars presents a la glàndula presentaven els pèptids aïllats, ja que, tot i que la població més abundant a la tiroides són els tiròcits, dins de l'infiltrat també hi trobem cèl·lules B, macròfags, cèl·lules dendrítiques i cèl·lules T activades que com a cèl·lules que expressen MHC-II, podrien estar presentant els pèptids. En qualsevol cas, la caracterització dels pèptids presentats *in situ* per alguna d'aquestes cèl·lules pot ser rellevant per entendre la resposta que s'està duent a terme.

Una de les limitacions inherents d'aquest treball és la manca de teixit disponible, ja que cada cop es realitzen menys tiroïdectomies i per tant es disposa de poques mostres. Les tiroides que es van utilitzar provenien del banc de teixits del laboratori d'immunologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol i del departament d'endocrinologia de l'Hospital Vall d'Hebron. Es van seleccionar les mostres de pacients amb la malaltia de Graves-Basedow amb cèl·lules tiroïdals positives per l'expressió de molècules de classe II. Un cop escollides les mostres es van tipificar per conèixer les variants al·lèliques d'HLA-DR i DQ que expressaven. Les característiques de les mostres es detallen a la taula 6 dels materials i mètodes. Les primeres mostres de tiroides que es van processar, TB190, TB269, TB237 i TB270 van servir per posar a punt la tècnica. Tot i que aquesta metodologia ja es duia a terme en el nostre laboratori, sempre s'havia realitzat a partir de un nombre elevat de cèl·lules en cultiu i per tant s'havia d'adaptar la tecnologia al treball amb teixit. A més a més d'aquestes mostres disposàvem de molt poca quantitat de teixit i suposàvem que no aconseguiríem identificar gaires seqüències peptídiques. La resta de mostres TB448, TB449 i TB471, de volum superior, es van processar per caracteritzar el màxim nombre de lligands peptídics un cop el protocol estava optimitzat.

2. POSADA A PUNT DEL PROTOCOL

El protocol que es va utilitzar per la purificació i fraccionament dels pèptids va ser semblant al que es feia servir per les línies en cultiu (Muntasell, Carrascal et al. 2002; Muntasell, Carrascal et al. 2004) però amb algunes modificacions (veure materials i mètodes).

Com que el material de partida era molt limitat, s'havia d'optimitzar el protocol al màxim per obtenir el major nombre possible de seqüències. Era important, per tant, eliminar totes les interferències que poguessin dificultar la purificació i la posterior identificació dels pèptids. Les millores del protocol que es van anar fent a mesura que s'anaven processant les mostres, es citen a continuació:

- Rentats posteriors al pas del lisat: en un inici es feien rentats amb 80 i 40 ml de cadascun dels tampons (tampó de rentat i Tris-HCl). Al comprovar que sortien moltes sals i que degut a la poca abundància de pèptids s'observaven molts ions del detergent NP40, al final es van fer rentats amb volums de 300-400 ml de cadascun dels tampons. D'aquesta manera es va millorar molt la qualitat de la mostra.

- Mida de les columnes: en un principi s'usaven columnes de 5ml amb 5mg d'anticòs, però posteriorment com que sempre partíem de poc material es van fer servir columnes d'1ml amb 5mg d'anticòs. Així disminuïem la superfície de contacte on els complexos es podien adsorbir.

- Ultracentrifugació després de l'homogeneïtzació: amb les primeres mostres, un cop homogeneïtzat el teixit, es feia una ultracentrifugació per recuperar les membranes. Aquest pas és important quan la quantitat de teixit de la que es disposa és molt gran, com s'ha vist en el nostre laboratori en treballs posteriors amb melsa, ja que s'aconsegueix netejar molt la mostra, però amb els tiroides on la quantitat màxima de teixit va ser d'uns 25 grams, es va decidir eliminar aquest pas per no perdre res de material.

- Fraccions recollides de l'HPLC: del TB190 es van recollir 40 fraccions, una fracció cada 2 min, del TB269 16 fraccions d'1 ml, recollides cada 5 min. i dels TB237 i TB270 26, una fracció cada 3 minuts. Les següents mostres, de les quals ja disposàvem de més quantitat de teixit, es van estandarditzar totes i es recollien 80 fraccions, una fracció per minut.

3. PERFILS D'HPLC DELS PÈPTIDS ELUÏTS DE LES DIFERENTS MOSTRES DE TIROIDES

Els complexos DR-pèptid es van purificar per cromatografia d'afinitat en columnes de Sefarosa-L243 o B8.11.2, seguida d'elució àcida. El material eluït de baix pes molecular es va separar de les cadenes α i β de DR per ultrafiltració amb un punt de tall de 10.000 Da, i es va concentrar fins al volum d'injecció de la microcolumna d'HPLC de fase reversa (rp-HPLC). Les mostres es van fraccionar per rp-HPLC, amb monitorització de l'absorbància a 214 nm. Es recollien fraccions des del minut 20 fins al minut 100.

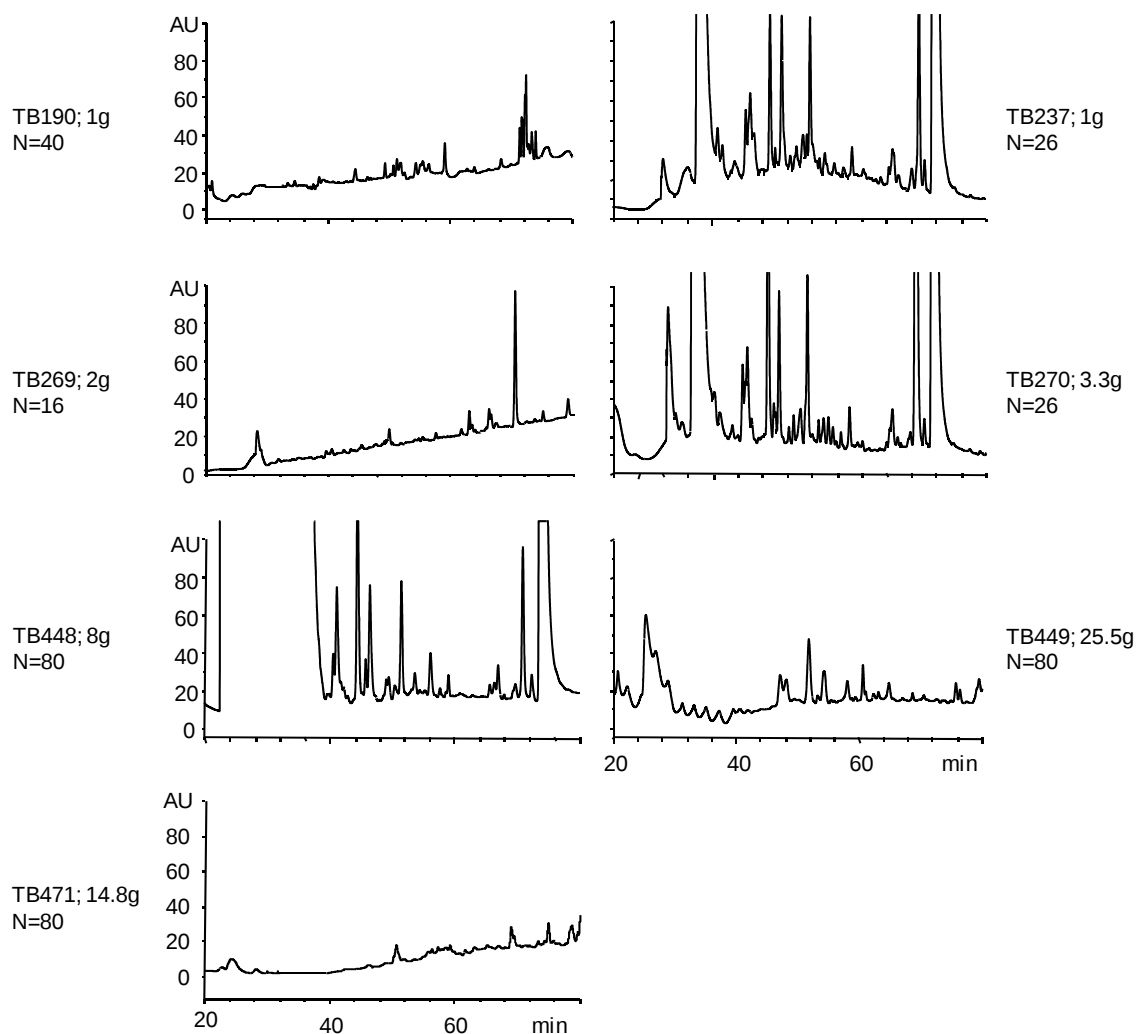
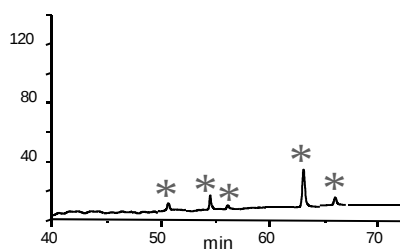


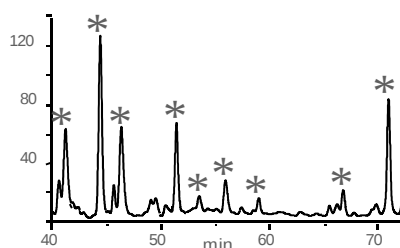
Figura 27: Perfils d'HPLC-UV de les mostres de tiroides. Al costat de cada figura s'indica el codi de la mostra i la quantitat de material processat. N= número de fraccions recollides. En el cromatograma de la mostra TB448 el primer pic que es veu, que té una base molt ampla i elevada intensitat, és degut a l'entrada de bombolles d'aire al sistema.

A la figura 27 es mostren els cromatograms obtinguts del material eluït de les tiroides. Tot els cromatograms mostraven perfils relativament pobres en quant al nivell de pèptids presents, ja que tot i que s'observaven pics en el cromatograma aquests tenien una intensitat massa elevada per correspondre a pèptids. Tal com es pot veure a la figura 28, aquestes senyals equivaldrien a nanomols de pèptids, concentracions molt més altes que les que s'espera trobar en els repertoris associats a MHC-II en el teixit tiroïdal.

Anàlisis posteriors per espectrometria de masses van revelar que els pics majoritaris que s'observen a partir del minut 70 corresponien a restes del detergent NP-40 utilitzat a la purificació.

a) Pèptids estàndards, 30 pmol/pèptid

Rt (min)	Àrea	Altura
50.8	111	6
54.7	133	8
56.3	44	3
63.2	464	23
66.2	102	5
Promig	171	9

b) Tiroides TB448

Rt (min)	Àrea	Altura
41.2	3584	73
44.4	4547	137
46.3	3151	74
51.5	2885	77
53.5	2075	29
55.9	2198	39
59	2012	28
66.8	1316	33
70.9	3327	94
Promig	2788	65

Figura 28 Comparació dels cromatogrames d'HPLC-UV d'una barreja de 5 pèptids estàndards i d'un extracte de tiroides: a) Cromatograma d'una barreja de 5 pèptids diferents (30pmol per pèptid). b) Cromatograma de l'extracte de pèptids obtinguts de la purificació per immunoafinitat de la mostra de tiroides TB448 (des del minut 40 al 70). Els pics dels 30pmols dels pèptids estàndard tenen una àrea promig de 171, mentre que els pics de la mostra de tiroides tenen un promig d'àrea 16 vegades major.

4. ANALISI DE LES MASSES DETECTADES EN CADA REPERTORI

Per identificar les diferents espècies moleculars recuperades dels eluïts de les mostres de tiroides, les fraccions recollides de l'HPLC es van analitzar per MALDI-TOF o per MALDI TOF/TOF. El rang de masses analitzat anava de 400 Da fins a 6000 Da. La majoria de lligands de les molècules de MHC II es trobaven entre els 1800-2100 Da, confirmant la qualitat de la mostra, ja que la longitud estàndard dels pèptids va dels 15 als 18aa.

En els espectres de MALDI de les primeres tiroides processades hi havia molt soroll de fons i la relació senyal-soroll no era bona. Per aquest motiu es van anar ampliant els passos de rentat que es realitzaven abans de l'elució àcida dels pèptids (veure secció 3).

A les fraccions obtingudes per MALDI (veure exemple de la figura 29) s'observaven molts més pics dels que realment després es podien identificar, ja que o bé eren polímers, o la senyal no era prou intensa, o en el nanoESI aquestes masses no ionitzaven bé.

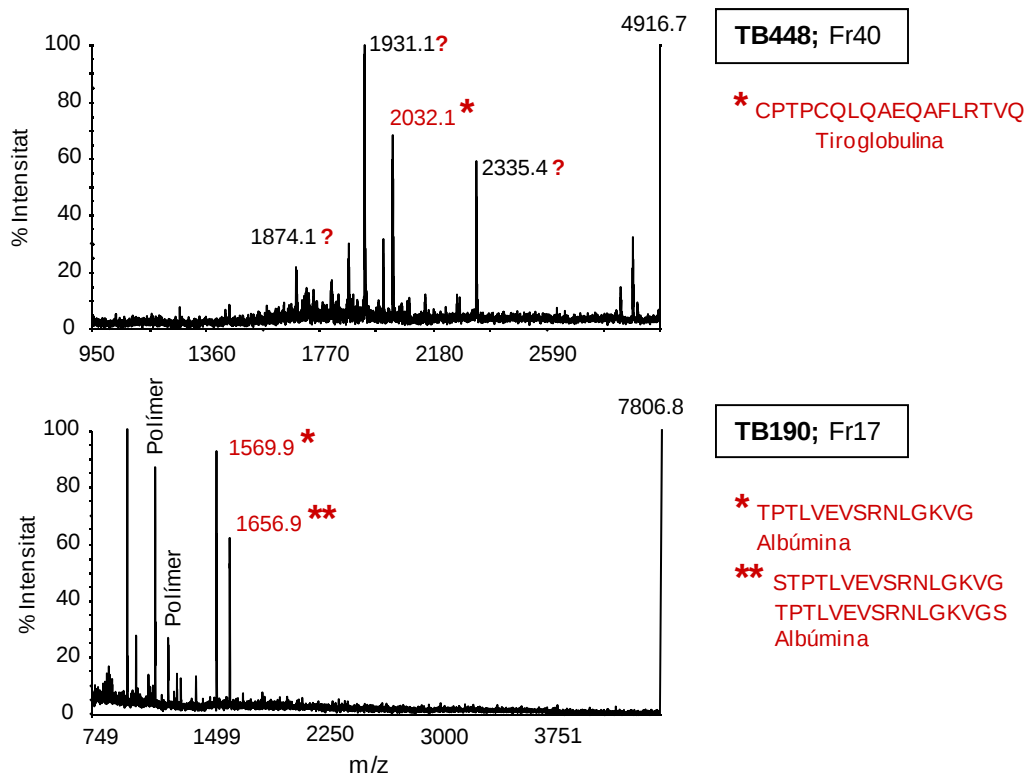


Figura 29: Espectres del MALDI-TOF de dues fraccions de tiroides. A la figura s'indiquen amb una estrella les espècies moleculars que s'han pogut identificar a cada fracció. Les masses amb un interrogant son senyals que no s'han pogut identificar. El valor de l'eix de la dreta indica la intensitat màxima obtinguda a la mostra.

5. METODOLOGIA UTILITZADA PER LA IDENTIFICACIÓ DELS PÈPTIDS

La gran majoria de les seqüències peptídiques aïllades de les mostres de tiroides autoimmunes es van obtenir per nESI-ITMS/MS. Aquesta tècnica és va utilitzar per totes les mostres analitzades. De cada fracció obteníem tres espectres: un espectre de rastreig complet (full ms) on es mostraven totes les masses presents a la mostra, un espectre d'alta resolució (zoom scan) on es seleccionava la massa que es volia fraccionar i es comprovava la càrrega del pic, i per últim es fraccionava la massa seleccionada i s'obtenia un espectre de fragmentació (Full ms2) (Figura 30).

Les masses que es fraccionaven eren ions que prèviament s'havien identificat en els espectres de MALDI o pics que s'observaven en el full ms. Al fer l'espectre d'alta resolució dels ions precursors, si es veien les masses isotòpiques podíem saber la càrrega del pèptid i en funció d'això a l'hora de fraccionar-lo utilitzàvem una intensitat d'energia o una altra. En molts casos però, al fer el zoom scan d'un pic del MALDI, no es veia la massa degut a que moltes de les senyals generades pels pèptids eren de baixa intensitat. Quan això passava es fraccionava igualment l'ió a cegues.

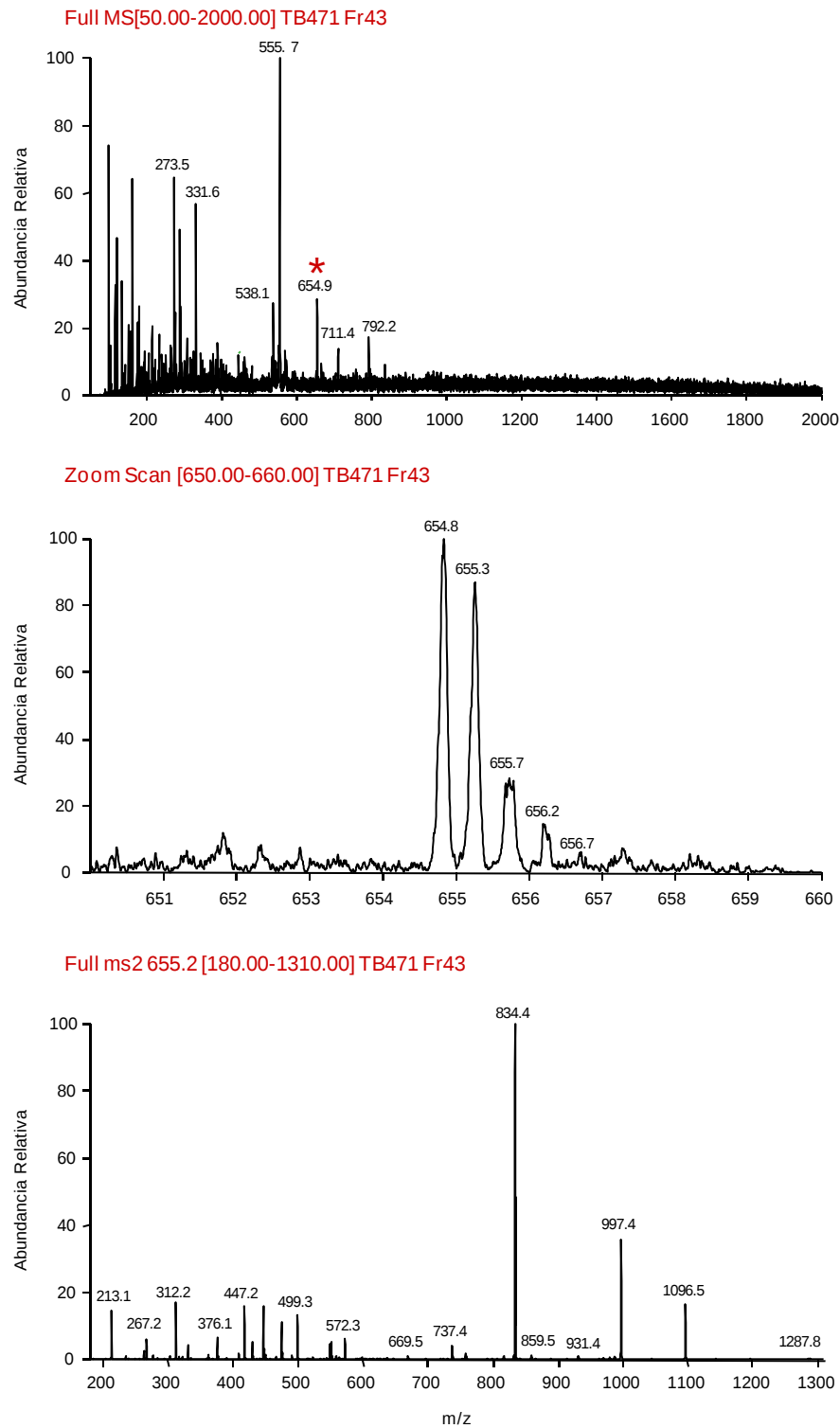


Figura 30: Espectres obtinguts amb l'LCQ. A) Full ms, espectre de rastreig de totes les masses presents a la fracció 43 de la mostra de tiroides TB471. L'asterisc mostra la massa seleccionada per fraccionar. B) Zoom Scan: espectre d'alta resolució de la zona entre 650 i 660 Da, on es troba el pèptid 654,8 Da. C) Full ms2, espectre de fragmentació del pèptid de massa 654,8 Da.

Per les mostres TB448, TB449 i TB471, les fraccions obtingudes per HPLC es van passar per un MALDI TOF/TOF que, a part de donar-nos informació sobre les espècies moleculars que contenia cada una de les fraccions, generava espectres de fragmentació. Amb l'anàlisi per MALDI TOF/TOF, es seleccionaven els 4 pics majoritaris de cada fracció, per fragmentar-los. Mitjançant aquesta tecnologia també es van identificar les seqüències d'alguns pèptids. La mostra de tiroides TB471 es va analitzar a més a més amb un vMALDI, (que és una font de MALDI acoblada a un detector LTQ MS).

Les primeres mostres (TB190 [1g], TB237 [1,1g], TB269 [2g], TB270 [3,3g]) es van analitzar mitjançant nESI-ITMS/MS, però per la resta de mostres es van obtenir seqüències mitjançant nESI-ITMS/MS i MALDI TOF/TOF, així, de les 19 seqüències identificades de TB448 [8g], 11 van ser seqüenciades per nESI, 6 per MALDI-TOF/TOF i 2 mitjançant les dues tècniques. De manera semblant, es van obtenir 47 dels 61 pèptids de TB449 per nESI, 5 per MALDI-TOF/TOF i 9 amb ambdues. L'última mostra processada, TB471, es va poder analitzar a més a més un vMALDI, així dels 70 pèptids identificats, 49 es van obtenir per nESI, 7 per MALDI-TOF/TOF i 10 per vMALDI. La resta, 22 pèptids, es van poder detectar amb dues o les tres tècniques utilitzades (veure figura 31). Les característiques de les seqüències obtingudes es mostren a les taules 11 i 12.

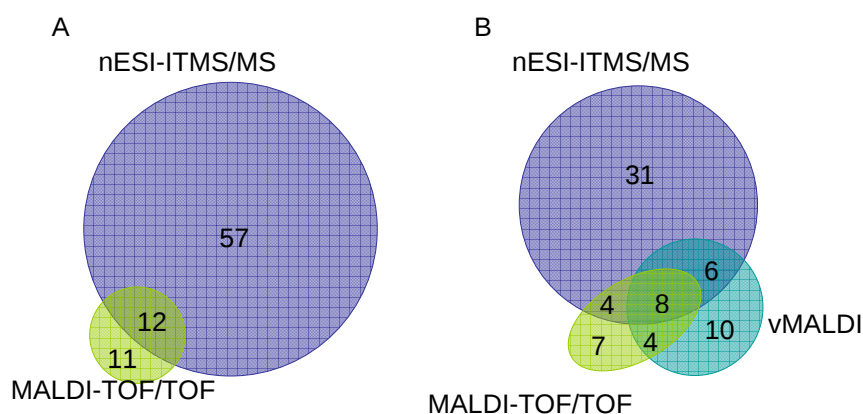


Figura 31: Número de pèptids identificats mitjançant cada tècnica: A. Pèptids identificats a les mostres TB448 i TB449; B. Pèptids identificats a la mostra TB471.

Observant les nostres dades podríem dir que la tècnica més resolutiva alhora d'obtenir seqüències va ser el nESI-ITMS/MS. Aquesta tècnica és molt eficient, altament sensible i permet un continu feedback entre l'usuari i la mostra, però d'altra banda també és el mètode menys automatitzable i el més lent. D'altra banda el MALDI-TOF/TOF és menys eficient a l'hora de generar espectres interpretables però és una tècnica molt ràpida, es poden analitzar moltes mostres a la vegada a partir de molt poca quantitat de mostra, tot i que es gasta ràpid (4-5 fragmentacions MS/MS per pou). El vMALDI-ITMS/MS també utilitza molt poca quantitat de mostra però a més a més la consumeix molt lentament

permetent realitzar més de 25 MS/MS per cada pou i és molt automatitzable. Tot i això, també és menys eficient que el nESI-ITMS/MS.

És important tenir en compte que no tots els pèptids responen igual als mètodes de ionització, de tal manera que alguns es poden detectar amb unes tècniques i amb d'altres no. Per tant es va comprovar que, com ja estava demostrat, per tal d'obtenir un repertori ampli que representi de manera acurada el repertori peptídic real, és convenient combinar diferents metodologies.

6. IDENTIFICACIÓ I ANALISI DELS PÈPTIDS AÏLLATS DE LES MOSTRES DE TIROIDES

En total es van aïllar 162 pèptids presentats per molècules de DR de 6 mostres de tiroides de pacients amb GD: 4 seqüències de la mostra TB190 [1 g], 1 de la TB237 [1.1 g] 3 de la TB269 [2 g], 4 de la TB270 [3,3 g], 19 de la TB448 [8 g], 61 de la TB449 [25,5 g] i 70 de la TB471 [15 g]. Totes els pèptids eren autòlegs tal i com s'esperava i confirmant la manca de contaminació d'altres fonts.

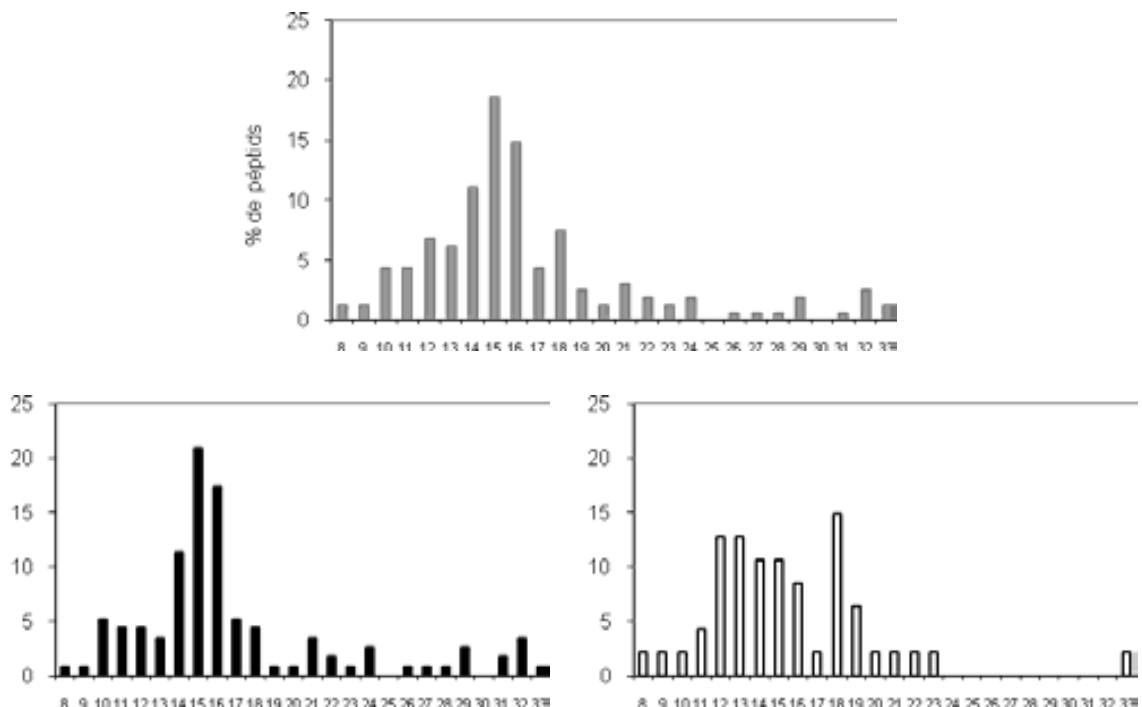


Figura 32: Anàlisi de la mida dels pèptids obtinguts de les 6 mostres de tiroides analitzades. Distribució de la mida dels pèptids: de tots els pèptids (barres grises), dels pèptids presumiblement generats a la via endocítica (barres negres) i els generats a la via citosòlica (barres blanques)

La mida dels pèptids anava dels 8 als 33 aminoàcids, sent la majoria (77.6%) d'entre 12 i 22 aa, longitud que es considera estàndard pels pèptids presentats per MHC-II (Figura 32). El pes mig era de 1824.76 Da (952.4–3473.6 Da). A la figura 32 es mostra la distribució de les mides dels pèptids en

funció de la seva possible via de generació, considerant la via endocítica i la via citosòlica de degradació proteica. La longitud dels pèptids possiblement generats a la via endocítica estava dins de l'estàndard, tot i que s'observaven pèptids molt grans, de fins a 33 aminoàcids. Els pèptids generats a la via citosòlica presentaven una distribució més heterogènia. De totes maneres tot i que es deixava entreveure una tendència, no es podien treure conclusions ja que el nombre de pèptids, sobretot citosòlics, no era suficient per tenir dades estadísticament vàlides.

Un fet a destacar era el nombre de pèptids llargs de la mostra TB471. Aquest fet podia estar relacionat amb l'al·lel expressat per aquest donant, HLA-DR8 (DRB1*0801), ja que també es van identificar pèptids llargs quan es va fer la descripció del motiu d'ancoratge de DR8 (Muixí et al, 2009; veure Resultats I) i en un treball anterior de Chiciz et al. (Chicz, Urban et al. 1993).

La distribució cel·lular de les proteïnes de les quals derivaven els pèptids, mostrava una major presència de pèptids generats per degradació a la via endocítica. Tot i així gairebé un 30% dels pèptids s'havien generat a partir de proteïnes citosòliques. Dels pèptids generats a la via endocítica la gran majoria provenien de proteïnes exògenes, incloent un gran nombre de pèptids de proteïnes de la matriu extracel·lular, del col·loide i de la membrana cel·lular (Figura 33).

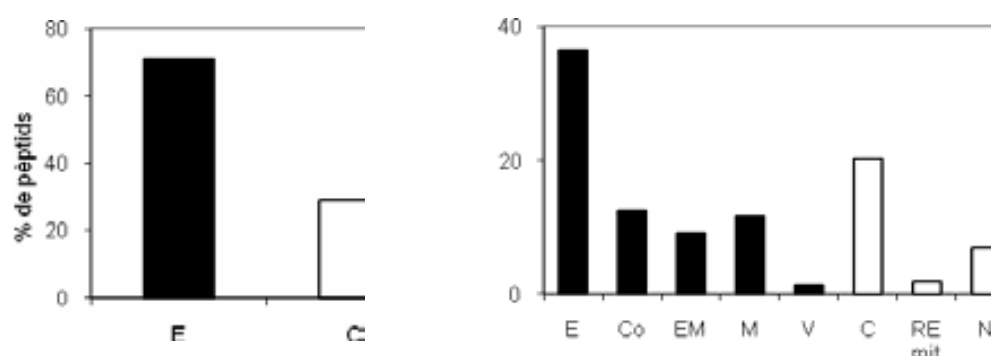


Figura 33: Anàlisi de la localització de les proteïnes font dels pèptids seqüenciats. Esquerra: Distribució cel·lular de les fonts proteiques dels pèptids; E: pèptids generats per degradació a la via endocítica, C: a la via citosòlica. Dreta: Anàlisi de la localització cel·lular. Barres negres: pèptids generats a la via endocítica; E, exògens; Co, col·loïdals; EM, de matriu extracel·lular; M, de membrana; V, vesiculars. Barres blanques: pèptids generats a la via citosòlica; C, citosòlics; RE/mit, reticle endoplasmàtic o mitocondrial; N, nuclear

6.1. Identificació dels pèptids aïllats de les mostres de tiroides de menys de 5 grams

El processament d'aquestes mostres ens va servir per posar a punt el protocol d'elució de pèptids a partir de teixit. Es van utilitzar 4 mostres: TB270 (3,3 g), TB269 (2 g), TB237 (1,1 g) i TB190 (1 g). Tot i la poca quantitat de mostra processada es van poder seqüenciar 12 pèptids per nESI-ITMS/MS (Taula 11). De la mostra TB270 es van obtenir 4 seqüències, 3 de l'albumina i una provinent d'una proteïna de la matriu extracel·lular, la fibronectina. Els tres pèptids de l'albumina formaven una família de seqüències solapades (nested sets). De les mostres TB269 i TB190 es van seqüenciar un grup de

nested sets iguals de l'albumina; aquestes dues mostres expressen les mateixes molècules d'HLA-DR (DRB1*1101 i 1104), per tant es pot esperar que presentin els mateixos pèptids. Per altra banda aquests pèptids d'albumina eren diferents dels de la mostra TB270, amb un tipatge d'HLA diferent. Es va identificar una seqüència de la cadena β de la molècula DQB1*0602 de la mostra TB237. Aquesta seqüència procedeix d'un al·lel d'HLA-DQ expressat per la mateixa mostra, per tant és un control de qualitat de la correcta identificació de seqüències. Aquest mateix pèptid també el vam trobar dins del repertori de la mostra TB448 que com TB237 també és DR15⁺ però no al d'una altra mostra DR15⁺, TB449. S'ha vist en altres estudis de repertoris de línies cel·lulars transformades per l'EBV que aquest pèptid és un dels més presentats per les molècules DR15 i DR51 (Vogt, Kropshofer et al. 1994). Amb l'estudi d'aquestes mostres de menys de 5 grams, es va poder comprovar que fins i tot a partir d'un gram de teixit, seguint el nostre protocol, es podien identificar pèptids. Tot i així el rendiment obtingut era molt baix.

Fenotip	Pm (Da)	Nº aa	P P P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9									Al·lel assignat	% unió teòrica	Prom	Proteïna	Nº Id	L.											
TB270 (3.3g)																												
DRB1*0701	1600.9	15	A	P	S	N	L	R	F	L	A	T	T	P	N	S	L	DRB1*0701	57.76	31/51	Fibronectina (1905-1919)	P02751	EM					
	1814.0	15					L	G	E	Y	K	F	Q	N	A	L	L	V	R	Y	T	DRB1*0701	39.66	17/51	Albúmina sèrica (422-436)	P02768	Co	
	1925.1	16					Q	L	G	E	Y	K	F	Q	N	A	L	L	V	R	Y	T	DRB1*0701	39.66	17/51	Albúmina sèrica (421-436)	P02768	Co
	2053.2	17					Q	L	G	E	Y	K	F	Q	N	A	L	L	V	R	Y	T	K	DRB1*0701	39.66	17/51	Albúmina sèrica (421-437)	P02768
TB190 (1g)																												
DRB1*1101	1569.6	15			T	P	T	L	V	E	V	S	R	N	L	G	K	V	G			NA		0/51	Albúmina sèrica (444-458)	P02768	Co	
DRB1*1104	1656.6	16		S	T	P	T	L	V	E	V	S	R	N	L	G	K	V	G			NA		0/51	Albúmina sèrica (443-458)	P02768	Co	
DRB3*0101	1656.7	16			T	P	T	L	V	E	V	S	R	N	L	G	K	V	G	S		NA		0/51	Albúmina sèrica (444-459)	P02768	Co	
	1755.1	17	V	S	T	P	T	L	V	E	V	S	R	N	L	G	K	V	G			NA		7/51	Albúmina sèrica (442-458)	P02768	Co	
TB269 (2g)																												
DRB1*1101	1569.6	15			T	P	T	L	V	E	V	S	R	N	L	G	K	V	G			NA		0/51	Albúmina sèrica (444-458)	P02768	Co	
DRB1*1104	1656.7	16			T	P	T	L	V	E	V	S	R	N	L	G	K	V	G	S		NA		0/51	Albúmina sèrica (444-459)	P02768	Co	
DRB3*0101	1656.6	16		S	T	P	T	L	V	E	V	S	R	N	L	G	K	V	G			NA		0/51	Albúmina sèrica (443-458)	P02768	Co	
TB237 (1g)																												
DRB1*1501	1628.9	15					D	V	G	V	Y	R	A	V	T	P	Q	G	R	P	D	DRB5*0101	27.55	0/51	DQB1*0602 β-ch.(75-89)	P03992	M	
DRB5*0101																												

Taula 11: Seqüències obtingudes de les mostres de tiroides de menys de 5 grams de teixit. Fenotip: tipatge HLA-DR de les mostres; Pm: pes molecular en Da; Nºaa: número d'aminoàcids del pèptid. 4ª columna: seqüències del pèptids alineades en funció de la posició d'ancoratge P1, les posicions d'ancoratge estan marcades en negreta. Les seqüències en cursiva no estan alineades en funció del P1, ja que no s'han pogut assignar amb certesa a cap al·lel d'HLA-DR. Les dues columnes següents indiquen l'al·lel al qual s'ha assignat el pèptid i l'índex d'afinitat teòric calculat amb el programa ProPred; NA: no s'ha pogut assignar a cap al·lel; Prom: Promiscuïtat, és la relació entre el nombre d'al·lells als quals s'uneix bé el pèptid i el total de molècules d'HLA analitzades. Considerem bons lligands els pèptids amb un P1 adequat per l'al·lel corresponent i amb un índex d'afinitat teòrica superior al 25%. 8ª columna: proteïna d'origen i la posició del pèptid dins la proteïna. NºId: número d'identificació de la proteïna; L: localització de la proteïna font, EM: matriu extracel·lular; Co, col·loïd; M, membrana

Mostra	Fenotip	Pm (Da)	Nº aa	P P P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Al-lel assignat	% Index afinitat	Prom.	Proteïna	Nº Id	L.
TB448	DRB1*1501	1770.0	15	D I P E L V N M G Q W K I R A	DRB1*1501	41.84	27/51	Complement C3 (194-208)	P01024	E
	DRB5*0101	1594.0	15	A A G L L S T Y R A F L S S H	DRB1*1501	33.67	2/51	Col-lagen cadena α 1 (XV) (1243-1257)	P39059	ME
	DRB1*0407	1522.8	14	A G L L S T Y R A F L S S H	DRB1*1501	33.67	2/51	Col-lagen cadena α 1 (XV) (1244-1257)	P39059	ME
	DRB4*0103	1687.0	13	L K K Y L Y E I A R R H P	DRB1*1501	33.67	6/51	Albúmina sèrica (159-171)	P02768	Co
		2014.2	16	Y P K S L H M Y A N R L L D H R	DRB1*1501	55.10	19/51	Apolipoproteïna B (1200-1215)	P04114	E
		1629.8	15	D V G V Y R A V T O Q G R P D	DRB5*0101	68.37	7/51	DQB1*0602 cadena beta (75-89)	P03992	M
		1676.8	15	D V G E Y R A V T E L G R P D	DRB5*0101	44.90	3/51	HLA II cadena beta DRB1*4 (72-86)	P13760	M
		1633.0	15	G G E L R F T V T Q R S Q P G	DRB5*0101	29.59	39/51	Proteoglicà heparan sulfat (1006-1020)	P98160	ME
		1795.0	16	Y G G E L R F T V T Q R S Q P G	DRB5*0101	29.59	39/51	Proteoglicà heparan sulfat (1005-1020)	P98160	ME
		1660.8	14	Y D H N F V K A I N A I Q K	DRB5*0101	54.08	19/51	Catepsina C (170-183)	P53634	V
		1661.0	16	R L P I I D V A P L D V G A P D	DRB5*0101	13.27 (LB)	7/51	Col-lagen cadena α 1 (I) C-term Propeptide (1436-1451)	P02452	ME
		2030.0	18	C P T P C Q L Q A E Q A F L R T V Q	DRB5*0101	29.59	2/51	Tiroglobulina (726-743)	P01266	Co
		1678.9	12	R E I F N M A R Q R S R	DRB5*0101	46.94	30/51	Apolipoproteïna B (427-439)	P04114	E
		1720.0	16	I R A S Y A Q Q P A E S R V S G	NA		0/51	Proteoglicà heparan sulfat (1089-1104)	P98160	ME
		1827.0	16	N I F S F Y L S R D P D A Q P G	DRB1*0407	ND	3/51	Catepsina D (227-241)	P07339	V
		1863.0	16	R P K D Y E V D A T L K S L N N	DRB1*0407	ND	15/51	Col-lagen cadena α 2 (I) C-term propèptid (1129-1144)	P08123	ME
		1613.8	15	K P G Q F I R S V D P D S P A	DRB1*0407	ND	0/51	NHERF (174-188)	O14745	C
		1449.8	12	E D F R D G L K L M L L	NA		3/51	α Actinina 1(57-68) o α Actinina 4 (76-87)	P12814	C
		1895.1	16	D V P K W I S I M T E R S V P H	DRB1*0407	ND	19/51	Anexina II (208-223)	P07335	M
TB449	DRB1*1501	1362.7	12	V V D L M A H M A S K E	DRB1*1501	19.39 (LB)	5/51	GAPDH (324-335)	NP00203;	C
	DRB5*0101	1763.8	14	L I S W Y D N E F G Y S N R	DRB1*1501	16.33 (LB)	0/51	GAPDH (310-323)	NP00203;	C
	DRB1*0301	1650.2	13	I S W Y D N E F G Y S N R	DRB1*1501	16.33 (LB)	0/51	GAPDH (311-323)	NP00203;	C
	DRB3*0101	1779.2	14	L I S W Y D N E F G Y S N R	DRB1*1501	16.33 (LB)	0/51	GAPDH (310-323)	NP00203;	C
		1274.6	10	L L V V Y P W T Q R	DRB1*1501	39.80	21/51	Hemoglobina cadena δ (31-40)	P02042	E
		1308.2	10	L V V Y P W T Q R F	DRB1*1501	39.80	21/51	Hemoglobina cadena δ (32-41)	P02042	E
		1421.8	11	L L V V Y P W T Q R F	DRB1*1501	39.80	21/51	Hemoglobina cadena δ (31-41)	P02042	E
		2301.3	22	L V T L A A H L T A E F T P A V H A S L D K	DRB1*1501	24.49 (LB)	7/51	Hemoglobina cadena α (106-127)	P69905	E
		1687.0	13	L K K Y L Y E I A R R H P	DRB1*1501	33.67	6/51	Albúmina sèrica (159-171)	P02768	Co
		1567.0	15	T N V P P E V T V L T N S P V	DRB1*1501	23.47 (LB)	3/51	HLA class II, DR cadena α (108-122)	P01903	M
		1690.9	15	G N R I A Q W Q S F Q L E G G	DRB1*1501	29.60	1/51	Alfa-2-macroglobulina (172-186)	P01023	E
		1633.9	14	G N R I A Q W Q S F Q L E G	DRB1*1501	29.60	1/51	Alfa-2-macroglobulina (172-185)	P01023	E
		1522.8	14	A G L S T Y R A F L S S H	DRB1*1501	33.67	2/51	Col-lagen cadena α 1 (XV)(1244-1257)	P39059	ME
		1593.6	15	A A G L S T Y R A F L S S H	DRB1*1501	33.67	2/51	Col-lagen cadena α 1 (XV) (1243-1257)	P39059	ME
		1521.0	13	D G V I K V F N D M K V R	DRB1*1501	57.10	3/51	Cofilin-1 (8-20)	P23528	C
		1310.8	10	W R L E E F G R F A	DRB5*0101	20.41 (LB)	0/51	HLA classe II, DR cadena α (68-76)	P01903	M
		1409.8	11	V W R L E E F G R F A	DRB5*0101	22.45 (LB)	1/51	HLA classe II, DR cadena α (67-76)	P01903	M
		1687.1	16	R V M T I A P G L F G T P L L T	DRB5*0101	34.69	4/51	3 hidroxiacil CoA deshidrogenassa tipus II (192-207)	Q99714	C
		1815.0	16	D K F L A S V S T V L P S K Y R	DRB5*0101	16.33 (LB)	4/51	Hemoglobina cadena α (126-141)	P69905	E
		1571.6	14	F L A S V S T V L P S K Y R	DRB5*0101	16.33 (LB)	4/51	Hemoglobina cadena α (128-141)	P69905	E
		1600.9	14	R G N S I I M L E A L E R V	DRB5*0101	53.06	29/51	ribonucleoproteïna nuclear petita G (63-76)	Q15357	N
		1857.0	16	I G S S Y F P E H G Y F R A P E	DRB5*0101	32.7	2/51	Multimerina 2 (851-866)	Q9H8L6	ME
		1728.1	15	Q L Q P D N S T L T W V K P T	DRB1*0301	32.63	7/51	Fosfolipassa C (883-897)	Q9HBX6	M
		2245.3	21	L A Q A T G K P Q Y I A V H V V P D Q L	DRB1*0301	23.16 (LB)	11/51	Factor inhibidor de migració de macròfags (MIF) (27-47)	P14174	E
		1914.4	18	I V N T N V P R A S V P D G F L S E	DRB1*0301	36.84	23/51	Factor inhibidor de migració de macròfags (MIF) (5-22)	P14174	E
		2305.6	21	P m F I V N T N V P R A S V P D G F L S E	DRB1*0301	36.84	32/51	Factor inhibidor de migració de macròfags (MIF) (2-22)	P14174	E
		2089.6	19	P m F I V N T N V P R A S V P D G F L	DRB1*0301	36.84	32/51	Factor inhibidor de migració de macròfags (MIF) (2-20)	P14174	E
		2384.6	22	I V N T N V P R A S V P D G F L S E L T Q Q	DRB1*0301	36.84	23/51	Factor inhibidor de migració de macròfags (MIF) (5-26)	P14174	E
		1362.4	12	m L L I P T S F S P L K	DRB1*0301	47.05	30/51	proteïna NipSnap4 (236-247)	Q9UFN0	C
		1744.0	16	W L R N G K P V T T G V S E T V	DRB1*0301	35.79	12/51	HLA class II DR cadena α (146-161)	P01903	M
		1845.1	17	T W L R N G K P V T T G V S E T V	DRB1*0301	35.79	12/51	HLA class II, DR cadena α (145-161)	P01903	M
		1489.0	14	E D I V A D H V A S Y G V N	DRB1*0301	62.11	12/51	HLA class II , DQ(2,6,3) cadena α (24-37)	P04226	M

Mostra	Fenotip	Pm (Da)	Nº aa	P P P P P P P P P P									Al·lel assignat	% Index afinitat	Prom.	Proteïna	Nº Id	L.						
				1	2	3	4	5	6	7	8	9												
TB449	DRB1*1501	1937.1	15	E	Q	F	Y	V	D	L	D	K	K	E	T	V	WH	DRB1*0301	35.76	10/51	MHC class II (61-75)	Q95HB9	M	
	DRB5*0101	1730.9	15	F	D	P	I	I	E	D	R	H	G	G	Y	K	P	DRB1*0301	26.30	0/51	Creatine kinase, cadena B (89-103)	P12277	C	
	DRB1*0301	1643.8	14	F	D	P	I	I	E	D	R	H	G	G	Y	K	P	DRB1*0301	26.30	0/51	Creatine kinase, cadena B (B-CK) (89-102)	P12277	C	
	DRB3*0101	1919.3	18		R	L	L	L	P	G	E	L	A	K	H	A	V	DRB1*0301	17.58 (LB)	0/51	Histona H2B K (99-116)	P62807	N	
		1416.9	13		R	L	L	L	P	G	E	L	A	K	H	A	V	DRB1*0301	17.58 (LB)	0/51	Histona H2B. (99-111)	P62807	N	
		2031.2	19	A	F	T	P	E	G	E	R	L	I	G	D	A	A	DRB1*0301	26.32	5/51	BIP (67-85)	P11021	ER	
		1670.0	15		L	S	S	V	V	V	D	P	S	I	R	H	F	DRB1*0301	49.47	16/51	Tiroglobulina (2098-2112)	P01266	Co	
		2043.2	23	T	G	G	A	S	G	L	G	L	A	T	A	E	R	DRB1*0301	28.11	4/51	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (16-38)	Q99714	C	
		1530.4	14		G	T	L	I	I	R	D	V	K	E	S	D	Q	DRB1*0301	48.42	34/51	Proteoglicà heparan sulfat (462-475)	P98160	ME	
		1626.9	14		K	E	Y	F	A	I	D	N	S	G	R	I	I	DRB1*0301	35.79	10/51	Cadherin-5(197-210)	P33151	M	
		1684.0	15		G	K	E	Y	F	A	I	D	N	S	G	R	I	I	DRB1*0301	35.79	10/51	Cadherin-5 (196-210)	P33151	M
		1171.6	11		V	L	S	P	A	D	K	T	N	V				DRB1*0301	15.79 (LB)	0/51	Hemoglobin a cadena (1-11)	P69905	E	
		1504.9	13		R	Y	S	V	D	I	P	L	D	K	T	V	V	DRB1*0301	21.05 (LB)	6/51	60s Ribosomal protein L27	P61353	C	
		1175.7	10		F	L	E	N	V	I	R	D	A	V				NA	0/51	Histona H4 (61-70)	P62805	N		
		1442.8	14		S	R	A	G	L	E	L	G	A	E	P	E	T	I	NA	0/51	Nidogen-2 (NID-2) (1167-1180)	Q14112	ME	
		1733.9	15		G	E	L	E	K	E	E	A	Q	P	I	V	T	K	NA	0/51	hnRNP U-like 2 (611-625)	Q1KMD3	N	
		1397.7	12		R	F	D	S	D	V	G	E	F	R	A	V		NA	0/51	HLA class II, DR, DP DQ cadena H (68-79)	P01911	M		
		1257.6	11		F	D	S	D	V	G	E	Y	R	A	V			NA	0/51	HLA class II, DRB3-1 cadena H (69-79)	P79483	M		
		1807.0	18		I	Y	T	R	N	T	K	G	G	D	A	P	A	NA	6/51	Proteïna ribosomal S25 (108-125)	P62851	C		
		1714.4	16		A	V	P	S	P	P	P	A	S	P	R	S	Q	NA	0/51	Serin Proteasa(134-149)	O43464	C		
		2013.4	19		A	V	P	S	P	P	P	A	S	P	R	S	Q	NA	0/51	Serin Proteasa (134-152)	O43464	C		
		1311.6	12		A	S	V	S	T	V	L	P	S	K	Y	R		NA	4/51	Hemoglobina cadena H (130-141)	P69905	E		
		1735.8	14		S	W	Y	D	N	E	F	G	Y	S	N	R	V	NA	0/51	GAPDH (312-325)	P04406	C		
		1631.9	16		S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	NA	0/51	Ig gamma-1 cadena C (40-55)	P08157	E		
		1637.6	18		A	K	V	A	V	L	G	A	S	G	G	I	G	NA	0/51	Malat deshidrogenasa (25-42)	P40926	mit		
		2167.3	19		L	L	T	E	A	P	L	N	P	K	A	N	R	NA	3/51	Actina (106-124)	P63261	C		
		1296.7	10		D	R	V	Y	I	H	P	F	H	L				NA	0/51	Angiotensina (34-43)	ANHU	E		
		1543.8	13		D	T	N	A	D	K	Q	L	S	F	E	E	F	NA	0/51	Calgranulina B (67-79)	P06702	C		
		1004.6	9		I	K	E	E	S	K	T	A	V					NA		Proteïna del cinetocor CENP-F (2346-2354)	P49454	N		
	TB471	DRB1*0301	3274.66	31	V	H	L	T	P	E	E	K	S	A	V	T	A	L	DRB1*0301	48.42	3/51	Hemoglobina cadena H (1-31)	P68871	E
DRB3*0101		3387.83	32	V	H	L	T	P	E	E	K	S	A	V	T	A	L	DRB1*0301	48.42	3/51	Hemoglobina cadena H (1-32)	P68871	E	
DRB1*0801		1308.63	10		L	V	Y	P	W	T	Q	R	F					DRB1*0301	36.84	12/51	Hemoglobina cadena H (32-41)	P68871	E	
		1956.92	18		Q	V	T	Q	P	T	V	G	M	N	F	K	T	DRB1*0301	40	18/51	Proteïna ribosomal 40S S17 (107-134)	P08708	C	
		1470.73	12		Y	Y	K	V	D	E	N	G	K	I	S	R		DRB1*0301	31.58	8/51	Proteïna ribosomal 40S 27 (29-40)	P62979	C	
		1905.95	16		A	H	L	L	I	L	R	D	T	K	T	Y	M	DRB1*0301	66.32	26/51	Glicoproteïna àcida H-1 (117-132)	P02763	E	
		1758.92	15		A	H	L	L	I	L	R	D	T	K	T	Y	M	DRB1*0301	66.32	26/51	Glicoproteïna àcida H-1 (117-131)	P02763	E	
		1374.6	13		K	A	V	L	T	I	D	E	K	G	T	E	A	DRB1*0301	51.58	5/51	Antitripsina alfa-1 (359-371)	P01009	E	
		1501.8	15		K	A	V	L	T	I	D	E	K	G	T	E	A	DRB1*0301	51.58	5/51	Antitripsina alfa-1 (359-373)	P01009	E	
		1737.6	17		V	H	K	A	V	L	T	I	D	E	K	G	T	DRB1*0301	51.58	5/51	Antitripsina alfa-1 (357-373)	P01009	E	
		1774.09	15		K	V	K	K	I	Y	L	D	E	K	R	L	L	DRB1*0301	48	12/51	proteïna SPARC-like 1 (556-570)	Q14515	E	
		1683.87	15		G	K	E	Y	F	A	I	D	N	S	G	R	I	DRB1*0301	35.79	11/51	VE-Cadherina (196-210)	P33151	M	
		1915.05	18		D	P	S	P	S	P	V	L	G	Y	K	I	V	DRB1*0301	42.11	23/51	Col·lagen cadena H-1 (XII) (2137-2154)	Q5VYK1	ME	
		1448.71	14		V	V	A	G	A	P	I	I	D	V	R	S	G	DRB1*0301	26 (LB)	9/51	Hemoglobina cadena beta (133-146)	P68871	E	
		2582.24	24	V	G	A	H	A	G	E	Y	G	A	E	A	L	E	DRB1*0301	28.42 (LB)	6/51	Hemoglobina cadena alfa (17-40)	P01922	E	
		1324.49	12		L	I	T	P	A	V	V	S	E	R	L	K		DRB1*0301	21.79 (LB)	0/51	Proteïna ribosomal 40S S25 (67-78)	P62851	C	
		1925.95	18		G	R	M	H	A	P	G	K	G	L	S	Q	S	DRB1*0301	24.21 (LB)	0/51	Proteïna ribosomal 40S S13 (1-18)	P62277	C	
		1709.88	16		T	G	A	A	P	I	I	D	V	R	S	G	Y	DRB1*0301	12.32 (LB)	0/51	Proteïna ribosomal 60S L27a (94-109)	P46776	C	
		1688.6	16		A	S	G	N	Y	A	T	V	I	S	H	N	P	DRB1*0301	14.74 (LB)	0/51	Proteïna ribosomal 60S L8 (128-143)	P62917	C	
		1457.6	15		A	G	N	L	G	G	G	V	V	T	I	E	R	DRB1*0301	21.05 (LB)	0/51	Proteïna ribosomal 60S L22 (52-66)	P35268	C	
	2094.02	18		S	Y	E	L	P	D	G	Q	V	I	T	I	G	DRB1*0301	17.89 (LB)	2/51	Actina (alpha,beta, gamma) (239-256)	P60709	C		
	1161.4	11		E	I	T	A	L	A	P	S	T	M	K			DRB1*0301	17.58 (LB)	0/51	Actina (alpha,beta, gamma)(316-326)	P60709	C		
	1886.93	17		G	T	Q	G	K	I	V	D	L	V	K	E	L	DRB1*0301	13.68 (LB)	0/51	Antitripsina alfa-1 (188-204)	P01009	E		

Mostra	Fenotip	Pm (Da)	Nº aa	P P P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Al·lel assignat	% Index afinitat	Prom.	Proteïna	Nº Id	L.
TB471	DRB1*0301	1829.9	16	T Q G K I V D L V K E L D R D T	DRB1*0301	13.68 (LB)	0/51	Antitripsina alfa-1 (189-204)	P01009	E
	DRB3*0101	1613.86	14	T Q G K I V D L V K E L D R	DRB1*0301	13.68 (LB)	0/51	Antitripsina alfa-1 (189-202)	P01009	E
	DRB1*0801	2953.23	33	S G N F G G S R N M G G P Y G G G N Y G P G S G G S G G Y G G R	DRB1*0301	14.74 (LB)	4/51	hnRNP A2/B1(318-350)	P22626	N
		1739.83	18	D G R G A L Q N I I P A S T G A A K	DRB1*0301	24.21 (LB)	2/51	GAPDH (197-214)	P04406	C
		3196.9	31	V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R	DRB1*0301	15.79 (LB)	2/51	Hemoglobina cadena alfa (1-31)	P01922	E
		3327.44	32	V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M	DRB1*0301	15.79 (LB)	2/51	Hemoglobina cadena alfa (1-32)	P01922	E
		3344.8	32	V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R m	DRB1*0301	15.79 (LB)	2/51	Hemoglobina cadena alfa (1-32)	P01922	E
		3473.61	33	V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M F	DRB1*0301	15.79 (LB)	2/51	Hemoglobina cadena alfa (1-33)	P01922	E
		1765.8	15	E G L T F Q M K K N A E E L K	DRB1*0801	65.1	17/51	Apolipoproteïna A-IV (239-253)	P06727	E
		1636.78	14	G L T F Q M K K N A E E L K	DRB1*0801	65.1	17/51	Apolipoproteïna A-IV (240-253)	P06727	E
		1395.6	12	G L T F Q M K K N A E E	DRB1*0801	65.1	17/51	Apolipoproteïna A-IV (240-251)	P06727	E
		1893.97	17	A Y V R L A P D Y D A L D V A N K	DRB1*0801	30.23	8/51	Proteïna ribosomal 60S L23a (136-152)	P62750	C
		1609.8	14	S V P R Y L P R P A N P D E	DRB1*0801	38.37	7/51	Cadherina epitelial (E-Cadherin) (793-806)	P12830	M
		3095.54	29	A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M F L S F P T T K	DRB1*0801	28.42 (LB)	7/51	Hemoglobina cadena alfa (12-40)	P01922	E
		1970.94	18	Q V D Q F L G V P Y A A P P L A E R	DRB1*0301	15.79 (LB)	0/51	Tiroglobulina (2224-2241)	P01266	Co
		1059.4	10	L S L Q E P G S K T	DRB1*0301	11.58 (LB)	2/51	Tiroglobulina (2756-2765)	P01266	Co
		1683.91	16	V L S P A D K T N V K A A W G K	DRB1*0301	15.79 (LB)	0/51	Hemoglobina cadena alfa (1-16)	P01922	E
		2690.51	23	A V T E L G R P D A E Y W N S Q K D L L E Q K	NA		0/51	MHC class II (78-100)	P13760	M
		2846.44	24	A V T E L G R P D A E Y W N S Q K D L L E Q K R	NA		0/51	HLA-II , DRB1-4 cadena beta (78-101)	P13760	M
		2744.39	26	K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M	NA		2/51	Hemoglobina cadena alfa (7-32)	P01922	E
		2174.04	21	A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M	NA		2/51	Hemoglobina cadena alfa (12-32)	P01922	E
		2755.38	24	F L S F P T T K T Y F P H F D L S H G S A Q V K	NA		6/51	Hemoglobina cadena alfa (33-56)	P01922	E
		3262.68	29	F L S F P T T K T Y F P H F D L S H G S A Q V K G H G K K	NA		6/51	Hemoglobina cadena alfa (33-61)	P01922	E
		3134.58	28	F L S F P T T K T Y F P H F D L S H G S A Q V K G H G K	NA		6/51	Hemoglobina cadena alfa (33-60)	P01922	E
		1833.69	16	T Y F P H F D L S H G S A Q V K	NA		0/51	Hemoglobina cadena alfa (41-56)	P01922	E
		2341.18	21	T Y F P H F D L S H G S A Q V K G H G K K	NA		0/51	Hemoglobina cadena alfa (41-61)	P01922	E
		2996.49	29	V A D A L T N A V A H V D N M P N A L S A L S D L H A H K	NA		3/51	Hemoglobina cadena alfa (62-90)	P01922	E
		3427.86	32	A A H L P A E F T P A V H A S L D K F L A S V S T V L T S K Y R	NA		3/51	Hemoglobina cadena alfa (110-141)	P01922	E
		2792.50	27	A A H L P A E F T P A V H A S L D K F L A S V S T V L	NA		3/51	Hemoglobina cadena alfa (110-136)	P01922	E
		1699.97	15	K F L A S V S T V L T S K Y R	NA		4/51	Hemoglobina cadena alfa (127-141)	P01922	E
		1998.98	20	P A A P A A A P P A E K A P V K K K A R	NA		0/51	Histona H1.4 (Histona H1b) (5-24)	P10412	N
		2044	21	S E T A P A A P A A A P P A E K A P V K K K	NA		0/51	Histona H1.2 (1-21)	P16403	N
		2171.8	22	S E T A P A A P A A A P P A E K A P V K K K	NA		0/51	Histona H1.2 (1-22)	P16403	N
		1331.73	15	G A P A A A T A P A P T A H K	NA		0/51	Histona H1 (129-143)	Q92522	N
		1511.66	12	A K F E E L N M D L F R	NA		0/51	BIP Protein (325-336)	P11021	ER
		1274.4	12	I G S S Q D D G L I N R	NA		0/51	Tiroglobulina (2508-2519)	P01266	Co
		1220.52	11	S R T S G L L S S W K	NA		0/51	Tiroglobulina (1080-1090)	P01266	Co
		1880.78	17	A K A V K Q F E E S Q G R T S S K	NA		0/51	Tiroglobulina (2520-2536)	P01266	Co
		1477.69	13	A K A V K Q F E E S Q G R	NA		0/51	Tiroglobulina (2520-2532)	P01266	Co
		952.4	8	V H L T P E E K	NA		0/51	Hemoglobina cadena beta (1-8)	P68871	E
		2139.11	20	F E S F G D L S T P D A V M G N P K V K	NA		1/51	Hemoglobina cadena beta (42-61)	P68871	E
		1910.88	18	F E S F G D L S T P D A V M G N P K	NA		1/51	Hemoglobina cadena beta (42-59)	P68871	E
		1528.2	15	V G A H A G E Y G A E A L E R	NA		0/51	Hemoglobina cadena alfa (17-31)	P01922	E
		1214.6	11	T V D G P S G K L W R	NA		0/51	GAPDH (186-196)	P04406	C
		1087.5	9	L R V D P V N F K	NA		4/51	Hemoglobina cadena alfa (91-99)	P01922	E
		1059.51	8	I P D W F L N R	NA		0/51	Proteïna ribosomal 40S S18 (79-86)	P62269	C
		1699.85	13	T G K N K W F F Q K L R F	NA		0/51	Proteïna ribosomal 60S L27 (123-135)	P61353	C

Taula 12: Seqüències obtingudes de les mostres de tiroides de més de 5 grams de teixit. Veure la llegenda de la taula 1. ND: no s'ha pogut calcular el % d'índex d'afinitat ja que no hi ha la matriu en el PorPred; NA: no assignat; LB: lligands febles; E, exògena; C, citoplàsmica; ER, Reticle endoplasmàtic; N, nucli; mit, mitocondrial; V, vesicular

6.2. Identificació dels repertoris de pèptids associats a HLA-DR en tiroides autoimmunes

S'ha aconseguit seqüenciar un total de 150 pèptids, aïllats de tres mostres de tiroides de pacients amb GD; TB448 (8 g), 19 seqüències, TB449 (25,5 g), 61 seqüències i TB471 (15 g), 70 seqüències. Les seqüències peptídiques es mostren a la Taula 1.

6.2.1 Pèptids generats a la via endocítica

Dels 150 pèptids identificats, 103 eren pèptids generats a la via endocítica, la majoria exògens. D'aquests, 10 derivaven de components del col·loide, 13 de la matriu extracel·lular i 59 provenien de proteïnes exògenes d'altres orígens. A més, 19 provenien de proteïnes de membrana i dos de vesiculars. Dels pèptids col·loïdals, 8 pertanyien a pèptids de la tiroglobulina, un de la mostra TB448, un de TB449 i sis diferents de TB471. Aquests pèptids s'analitzen amb més detall en el punt següent degut a la seva rellevància. També es van trobar diferents pèptids de l'albumina. L'albumina és una proteïna ubíqua però també és la segona proteïna més abundant del col·loide, després de la tiroglobulina (Anderberg, Enestrom et al. 1981; Baggio, Medeiros-Neto et al. 1996) i en molts desordres de la tiroides, augmenten el nivell d'albumina extravascular que es troba dins el fol·licle (Netto and Rosenthal 1982).

Un nombre elevat de pèptids exògens provenien de proteïnes de la matriu extracel·lular: proteoglicans, diferents molècules de col·lagen, nidogen-2 i multimerin. Diversos estudis demostren que els pacients amb GD amb manifestacions extratiroidals, on hi ha una remodelació dels teixits orbitals i dèrmics, presenten alteracions estructurals i funcionals de la matriu extracel·lular (Prabhakar, Bahn et al. 2003). S'ha vist que en pacients sense complicacions extratiroidals el contingut total de glicosaminoglicans en el sèrum és més alt que en controls, en concret la concentració d'heparan sulfat que normalment es baixa en el sèrum d'individus sans, es troba significativament augmentada en pacients amb GD (Komosinska-Vassev, Winsz-Szczotka et al. 2006). La presència d'autoanticossos contra proteïnes de la matriu extracel·lular s'ha estudiat en diferents malalties autoimmunitàries que afecten els teixits connectius. S'ha detectat autoanticossos i cèl·lules T específiques per proteïnes de la matriu com col·lagen, laminina, fibronectina en pacients amb oftalmopatia associada a GD (Kiljanski, Peele et al. 1997; Bednarczuk, Kiljanski et al. 1998). De les nostres mostres, només al pacient TB449 se li havia diagnosticat oftalmopatia associada a GD. Moltes proteïnes de la matriu extracel·lular com fibronectina, laminina i proteïnases involucrades en la seva degradació són dependents de la producció d'hormones tiroïdals (Damjanovski, Puzianowska-Kuznicka et al. 2000; Ribeiro-Carvalho, Farias-de-Oliveira et al. 2002; Trentin, De Aguiar et al. 2003). D'aquesta manera l'estimulació crònica característica de GD, amb sobreproducció hormonal, podria comportar un augment de les proteïnes de la matriu extracel·lular i de les metaloproteases i, conseqüentment, una major presència de pèptids d'aquestes proteïnes presentats per les molècules de HLA-DR en tiroides.

Un gran nombre de pèptids exògens provenien de l'hemoglobina. S'ha vist que en tiroides hiperplàsics els nivells d'hemoglobina glicosilada són significativament superiors respecte als dels controls (Kuhn,

Rieu et al. 1983; Ford, Lim et al. 1987; Ribeiro-Carvalho, Farias-de-Oliveira et al. 2002; Mohan Kumar, Bobby et al. 2004). Entre la resta de pèptids de proteïnes sèriques trobem diferents apolipoproteïnes, proteïnes del complement i immunoglobulines.

També es van trobar diferents pèptids del factor inhibidor de la migració dels macròfags (MIF). MIF es una citocina produïda per diferents poblacions cel·lulars entre elles cèl·lules epitelials, endotelials i del sistema immunitari i el seu receptor es troba en molts tipus cel·lulars, depenent la seva funció del tipus cel·lular sobre el qual actua. La sobreproducció de MIF pot potenciar la inflamació i l'activació de cèl·lules T autoreactives, i s'ha demostrat el seu paper mediador de diferents mecanismes patogènics en malalties autoimmunitàries sistèmiques i òrgan específiques (Santos, Hall et al. 2001; Bojunga, Kusterer et al. 2003; Foote, Briganti et al. 2004; Powell, Papenfuss et al. 2005; Radstake, Sweep et al. 2005; Sanchez, Gomez et al. 2006; Stosic-Grujicic, Stojanovic et al. 2008). De fet, l'ús d'anticossos anti-MIF o d'altres químics inhibidors de MIF s'està estudiant com a possible teràpia en inflamació (Stosic-Grujicic, Stojanovic et al. 2008). Els pèptids restants són dos grups de nested sets de l'alfa-1 antitripsina, un pèptid de l'angiotensina, 2 de la glicoproteïna àcida alfa-1, 2 de l'alfa-2 macroglobulina i d'una proteïna tipus SPARC.

Es van seqüenciar també dos pèptids de catepsines. Les catepsines són proteases molt abundants als endosomes de les CFT, ja que son indispensables per l'alliberament de les hormones de la tiroglobulina (Dunn, Crutchfield et al. 1991; Friedrichs, Tepel et al. 2003), de fet en els tiroides humans la catepsina D s'ha descrit com el principal enzim involucrat en la proteòlisi de la Tg (Dunn and Dunn 1982; Yoshinari and Taurog 1985). Alguns treballs mostren un augment dels nivells de catepsina D en el teixit tiroïdal de pacients amb GD (Metaye, Millet et al. 1993; Metaye, Kraimps et al. 1997).

La majoria dels pèptids de proteïnes de membrana provenien de molècules d'HLA de classe II, tant HLA-DR com HLA-DQ, dos en la mostra TB448, 9/12 en la TB449 i 2/4 en la TB471. També es van obtenir pèptids de diferents cadherines, un de la fosfolipasa C i un de l'anexina II,

6.2.2 *Pèptids generats per degradació al citosol*

Els pèptids presumiblement generats per la via citosòlica de degradació eren 47: 11 de proteïnes nuclears, 2 del reticle endoplasmàtic, una mitocondrial i 33 citosòliques. Els pèptids que derivaven de proteïnes nuclears provenien sobre tot d'histones (7/11), tres de diferents ribonucleoproteïnes i una proteïna del cinetocor, CENP-F. S'han fet estudis de la presència d'anticossos circulants contra antígens relacionats amb el DNA en pacients amb Graves y s'observa que una petita proporció dels pacients tenen ANA (antinuclear antibodies), anticossos contra DNAds o ss, i contra histones (Katakura, Yamada et al. 1987; Loviselli, Velluzzi et al. 1992; Pedro, Romaldini et al. 2006). Els dos pèptids de proteïnes del reticle provenien de la xaperona BIP. En els tiròcits, BIP s'associa de manera transitòria amb la Tg durant les primeres etapes de maduració conformacional (Kim, Bole et al. 1992) i també es proposa que fa de control de qualitat en el reticle endoplasmàtic, així un augment de la unió de la Tg amb BIP retarda la maduració conformacional i l'exportació de la Tg des del reticle

endoplasmàtic (Muresan and Arvan 1998). La degradació de BIP podria també tenir lloc a la via endocítica. L'únic pèptid provinent d'una proteïna mitocondrial era un pèptid de la malat-deshidrogenasa. La resta de pèptids generats per degradació al citosol, provenien de proteïnes citosòliques com la GAPDH, el factor regulador de l'intercanviador Na^+/H^+ NHERF, un gran nombre de proteïnes ribosomals, una serin proteasa, l'enzim creatin cinasa, la 3-hydroxyacyl-CoA deshidrogenasa tipus II, la calgranulina B, NipSnap4, l'actina, la proteïna d'unió a actina cofilin-1 i l'alfa-actinina.

Resumint, les molècules de DR expressades a la glàndula tiroides uneixen pèptids autòlegs de mida estàndard, reclutats de proteïnes abundants en el col·loide i d'altres compartiments cel·lulars, inclòs el citosol. Dins d'aquest repertori, proteïnes específiques de teixit com la tiroglobulina poden generar pèptids capaços d'unir-se a les molècules d'HLA-DR.

6.3. Pèptids de tiroglobulina

Les seqüències més rellevants obtingudes en aquest estudi van ser de pèptids de tiroglobulina. La tiroglobulina és el component majoritari de la glàndula tiroide, representa el 75% del contingut proteic d'aquesta i s'ha descrit com un dels principals autoantígens, comú a totes les malalties autoimmunitàries tiroïdals (Carayanniotis and Rao 1997; Rose and Burek 2000). Fins al moment no s'havia identificat cap pèptid de tiroglobulina presentat *in situ* per molècules de classe II.

S'ha obtingut un total de 8 seqüències, dues d'elles formen grups de seqüències solapades i les 6 restants són pèptids únics. Els pèptids de tiroglobulina Tg(726-743) i Tg(2098-2112) es van seqüenciar de les mostres TB448 i TB449 respectivament i els pèptids Tg(1080-1090), (2224-2241), (2508-2519), (2520-2532), (2520-2536) i (2756-2765) de TB471. Totes les seqüències es van obtenir per nESI-ITMS/MS excepte el pèptid Tg(2224-2241) que es va obtenir per MALDI TOF/TOF i per vMALDI (Taula 13).

El pèptid de tiroglobulina Tg(726-743) es va seqüenciar manualment ja que al tenir un pont disulfur entre les dues cisteïnes de l'extrem N-terminal el patró de fragmentació del pèptid estava modificat, i els fragments que contenen el pont disulfur eren dues unitats de massa més petits que els de les bases de dades.

Per assegurar que l'assignació de la seqüència havia estat correcta es van sintetitzar els pèptids i es van comparar els espectres de MS dels pèptids sintètics amb els obtinguts de les mostres de tiroides (Figura 34). Els pèptids sintètics es van analitzar a una concentració de 2.45 pmol/ μl . Els espectres del pèptid Tg(2224-2241) no es van poder comparar ja que l'vMALDI genera pèptids monocarregats a diferència del nESI que genera majoritàriament pèptids doblement carregats i per tant els dos mètodes generaven espectres de fragmentació diferents.

Mostra	Fenotip	Pm (Da)	Seqüència	Nº aa	Pèptid*	sense seq. Senyal**	Fr.	Metod.
TB448	DRB1*1501 DRB1*0407	2031	CPTPCQLQAEQAFLRTVQ	18	Tiroglobulina (726-743)	(707-724)	Fr40	LCQ
TB449	DRB1*0301 DRB1*1501	1670	LSSVVVDPSIRHFDV	15	Tiroglobulina (2098-2108)	(2079-2089)	Fr39	LCQ
TB471	DRB1*0301 DRB1*0801	1477,7	AKAVKQFEESQGR	13	Tiroglobulina (2520-2532)	(2501-2513)	Fr22	TOFTOF, LCQ
		1880,8	AKAVKQFEESQGRTSSK	17	Tiroglobulina (2520-2536)	(2501-2517)	Fr22	LCQ
		1970,9	QVDQFLGVPYAAPPLAER	18	Tiroglobulina (2224-2241)	(2205-2222)	Fr42	TOFTOF, vMALDI
		1274,4	IGSSQDDGLINR	12	Tiroglobulina (2508-2519)	(2489-2500)	Fr26	LCQ
		1220,5	SRTSGLLSSWK	11	Tiroglobulina (1080-1090)	(1061-1071)	Fr35	LCQ
		1059,4	LSLQEPGSKT	10	Tiroglobulina (2756-2765)	(2737-2746)	Fr26	LCQ

Taula 13: Seqüències de tiroglobulina obtingudes de les mostres de tiroides analitzades. *Posició del pèptid dins la proteïna; **localització del pèptid dins la tiroglobulina sense tenir en compte la seqüència senyal; Fr: Fracció d'HPLC de la qual s'ha seqüenciat el pèptid, Metod: Metodologia amb la qual s'ha obtingut la seqüència, LCQ: nESI-ITMS/MS, TOFTOF: MALDI TOF/TOF.

Amb aquest sistema no podíem assegurar quina cèl·lula del teixit presentava aquests pèptids de Tg via HLA-DR, ja que a part de les cèl·lules epitelials que expressen classe II, dins l'infiltrat de la tiroides hi ha cèl·lules presentadores d'antigen (cèl·lules B, macròfags i cèl·lules dendrítiques) que també podrien estar presentant-los. De totes maneres, diversos motius afavoreixen la hipòtesis que aquests pèptids estan associats a les CFT. En primer lloc, la malaltia de Graves no genera gaire destrucció del teixit, i per tant les APC no tenen gaire accessibilitat a la Tg, i en segon lloc, el fet que les CFT estiguin hiperactivades per la presència d'anticossos agonistes anti-TSH-R, fa que produeixin hormones contínuament, la qual cosa implica una continua endocitosis de Tg i d'altres components de la col·loide. No obstant això, caldrà fer experiments *in vitro* amb els diferents tipus cel·lulars per poder confirmar-ho.

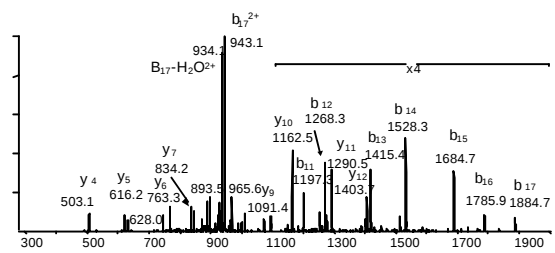
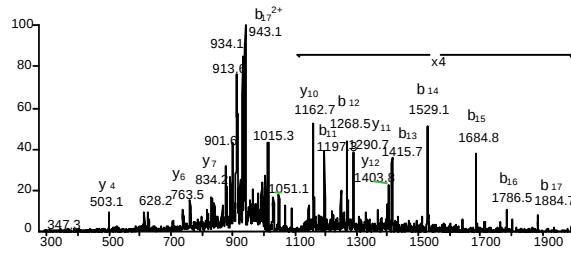
Molts estudis han demostrat l'expressió "promiscua" de Tg en el timus (Sospedra, Ferrer-Francesch et al. 1998; Spitzweg, Joba et al. 1999) i per tant s'espera un alt nivell de tolerància cap a aquesta molècula en perifèria. La identificació de pèptids de Tg com a lligands naturals dins el repertori indica que els complexos DR-Tg deuen ser relativament abundants a les tiroides afectades per tiroïditis. Aquesta elevada densitat de lligands en el lloc d'inflamació podria estar relacionada amb l'estimulació de cèl·lules T que en altres circumstàncies ignorarien aquests complexos.

Pèptids naturals

Pèptids sintètics

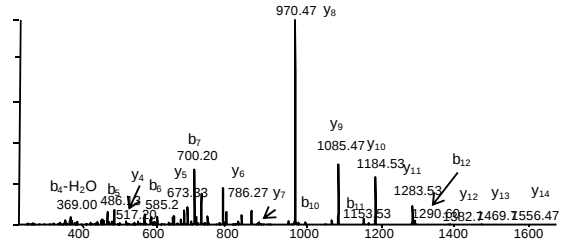
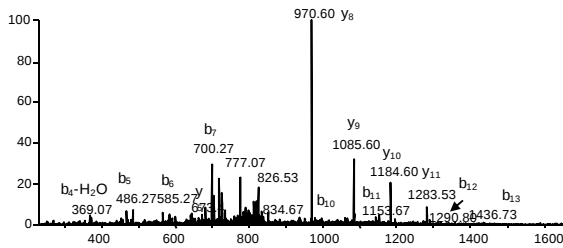
Tg 726-743 (CPTPCQLQAEQAFRLRTVQ)

Mr: 2030 Da



Tg 2098-2112 (LSSVVVDPSIRHFDV)

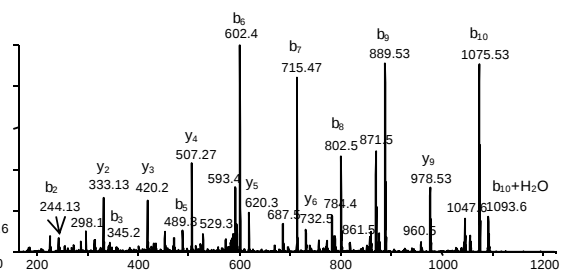
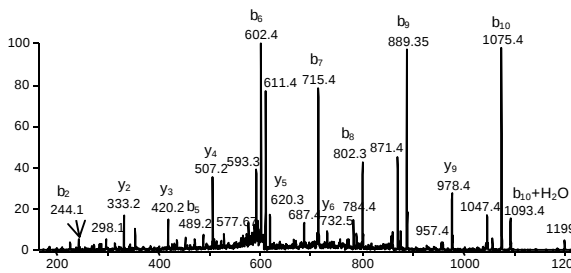
Mr: 1670 Da



Tg 1080-1090 (SRTSGLLSSWK)

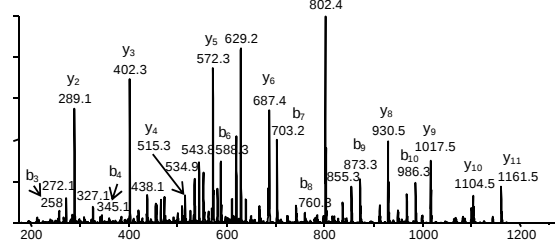
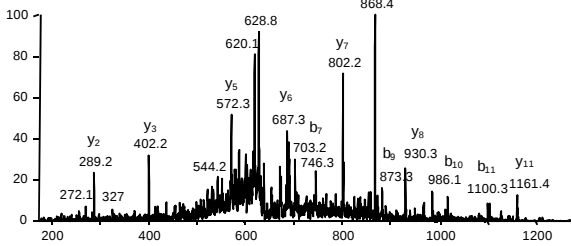
Mr: 1220.6 Da

Abundància Relativa



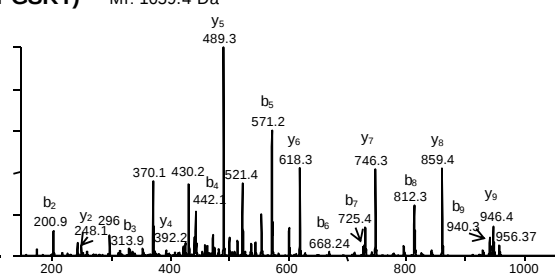
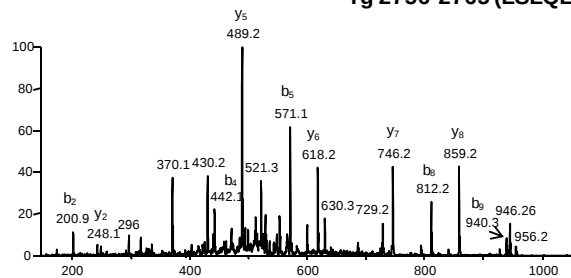
Tg 2508-2519 (IGSSQDDGLINR)

Mr: 1274.4 Da



Tg 2756-2765 (LSLQEPGSKT)

Mr: 1059.4 Da



m/z

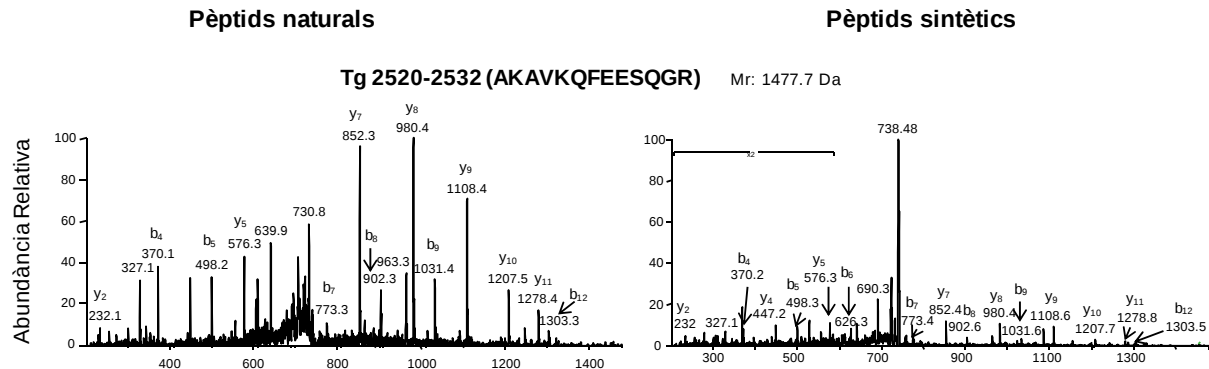


Figura 34: Espectres de fragmentació dels pèptids de tiroglobulina obtinguts de les mostres de tiroides TB448, TB449 i TB471 (esquerra) i dels corresponents pèptids sintètics (dreta). Tots els espectres es van obtenir mitjançant nESI-ITMS/MS.

Tot i que no coneixem la rellevància patològica dels pèptids de Tg identificats. Dades d'un altre grup han demostrat la patogenicitat del pèptid Tg(2098-2112) en un model animal de ratolí transgènic per HLA-DR3 al qual s'indueix una EAT per immunització amb Tg humana (Flynn, McCormick et al. 2004). En aquest treball utilitzaven 39 pèptids sintètics de Tg identificats informàticament com a potencials lligands de DR3, i testaven la seva capacitat d'estimular cèl·lules T del ratolí transgènic EAT-DR3⁺. Només 4 dels pèptids generaven resposta. Un d'ells, amb seqüència LSSVVDPISRHFVDV, era idèntic al pèptid Tg(2098-2112), associat a DR3, que nosaltres vam aïllar de la mostra TB449. Aquest pèptid podia induir la malaltia per immunització directa i també per transferència passiva de cèl·lules T específiques del pèptid d'un ratolí malalt. Aquestes dades demostren la patogenicitat d'aquest pèptid al menys en el model de ratolí humanitzat. Per tant un pèptid patogènic de Tg es genera *in vivo* i també es presenta per molècules de DR3 en tiroides humanes afectades per Graves. Això demostra que les prediccions amb algoritmes computacionals poden identificar pèptids de mida i seqüència idèntics a pèptids processats de manera natural. Encara falta demostrar si la resta de pèptids identificats podrien ser igualment patogènics o si podrien estar regulant la resposta autoimmunitària.

El pèptid Tg(2756-2765) de la mostra TB471 és un pèptid petit (LSLQEPGSKT) que no es va poder assignar a cap del al·lel de DR analitzats. La seva seqüència és part d'un epítot T immunogènic compartit entre la hTg i la hTPO, que està relacionat amb el desenvolupament d'EAT en ratolins H-2^k (Hoshioka, Kohno et al. 1993). La seqüència de l'epítot és GLREDLLSLQEPGS i està localitzat a la regió C terminal de la Tg al costat d'un residu de Tyr hormonogènic.

La Tg és una proteïna molt gran, de 2749 aa, que pateix modificacions post-traduccionals, iodacions, glicosilacions i fosforilacions. En animals s'ha demostrat que la iodació influeix la antigenicitat de la Tg (Bagchi, Brown et al. 1985; Sundick, Herdegen et al. 1987; Dai, Rao et al. 2002) i es proposa que la iodació pot intervenir en el desenvolupament de les AITD, tot i que existeix certa controvèrsia respecte

aquest tema (Kong, McCormick et al. 1995; Papanastasiou, Vatalas et al. 2007). S'ha proposat que la iodació podria modificar el processament de la Tg per les APC, generant epítops patogènics (Carayanniotis 2003), i de fet està demostrat que la degradació proteolítica de la Tg es veu afectada pel seu contingut en iode (Lamas and Ingbar 1978; Fouchier, Mego et al. 1983). Dades recents demostren que la iodació dels residus de Tyr de la Tg generen determinants antigènics nous (críptics) que causen tiroïditis. Aquests pèptids no són immunopatogènics en la seva forma nativa, però la iodació dels residus de tirosina facilita o bé la unió amb l'MHC o bé el seu reconeixement per part de les cèl·lules T (Li and Carayanniotis 2006). L'alteració del processament de la I-Tg per les APC fins i tot permet la generació de determinants patogènics no iodats com el p2494, que no es genera d'una Tg no iodada (Dai, Rao et al. 2002). Dos dels pèptids identificats a les nostres mostres, Tg(2508-2519) i Tg(2520-2532), formen part d'una regió de la molècula que correspon a aquest pèptid críptic, que només es genera en ratolins immunitzats amb Tg altament iodada (Figura 35).

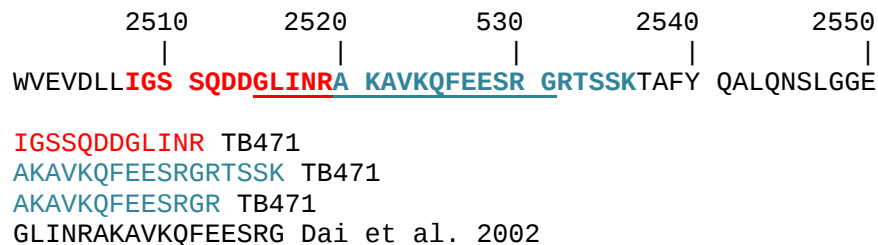


Figura 35: Regió de la seqüència de la tiroglobulina on es localitzen els pèptids Tg(2508-2519) i Tg(2520-2532). El pèptid descrit a l'article de Dai et al 2002, està subratllat.

6.4. Assignació de cadascun dels pèptids a un dels al·lels d'HLA-DR expressat pel donant de la mostra

6.4.1 Assignacions en base al programa ProPred

Les assignacions a un o altre al·lel d'HLA de les taules 11 i 12, es basen en el programa d'anàlisi ProPred www.imtech.res.in/raghava/propred/ (Singh and Raghava 2001), que utilitza les matrius quantitatives publicades per Sturniolo (Sturniolo, Bono et al. 1999). El programa ProPred conté una base de dades amb matrius d'unió per 51 al·lels, i permet calcular l'índex d'afinitat teòrica per cada pèptid amb cada un dels al·lels. Per poder comparar entre els diferents al·lels s'utilitza el % de l'índex d'afinitat que es calcula dividint l'índex d'afinitat teòric de la seqüència entre l'índex d'afinitat teòric màxim de l'al·lel. En base a aquests anàlisis, vam considerar "bons lligands" aquells pèptids que tenien el residu P1 correcte pel corresponent al·lel i mostraven un índex d'afinitat teòric > 25%. Els pèptids que presentaven la posició P1, però tenien un % de l'índex d'afinitat < 25%, els anomenavem "ligands febles". Per a l'assignació a l'al·lel DRB1*0407, no inclòs al Propred, però amb un motiu d'ancoratge

descriu a la base de dades SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/>), vam considerar suficient un P1 correcte i almenys un dels altres residus d'ancoratge (Muntasell, Carrascal et al. 2004). En aquests casos però, no podíem calcular l'índex d'afinitat teòric. Altres al·lels com DRB3*0101 o DRB4*0103, no es van poder assignar al no haver-hi matriu en el ProPred ni definició del motiu d'ancoratge en SYFPEITHI. Més tard vam poder revisar aquest anàlisi a partir de les matrius per DRB1*0407 i DR8 definides per nosaltres mateixos (veure més endavant).

Mitjançant aquest sistema vam poder assignar un 65% dels pèptids a un dels al·lels expressat pel donant, tot i que la majoria de les mostres eren heterozigotes per HLA-DR. Les afinitats teòriques oscil·laven entre el 5 i 58%. Del total de seqüències, 16 eren considerats lligands dèbils. Aquestes assignacions són només teòriques i necessiten ser confirmades per assajos d'unió.

Tot i que dos dels donants compartien l'haplotip DR2, els pèptids de Tg del seu repertori aparentment s'unien a diferents al·lels de DR: Tg(726-743) a DR51 de l'haplotip DR2 i Tg(2098-2112) a DR3 (DR17). A més, només un dels 6 pèptids de Tg de la mostra TB471 Tg(2224-2241) mostrava capacitat teòrica d'unió a DR3. Cap d'aquests pèptids era idèntic al pèptid del donant TB448, Tg(2098-2112), que s'unia a DR3.

Altres cops utilitzant el programa ProPred, es va analitzar la capacitat teòrica d'unió de totes les seqüències als 51 al·lels disponibles a la base de dades. L'índex de promiscuïtat de cada pèptid (taules 11 i 12) indicava a quants dels 51 al·lels analitzats podia unir-se potencialment el pèptid amb un índex d'afinitat superior al 25%. Dels 150 pèptids identificats, 36 (24%) mostraven un índex de promiscuïtat superior a 10/51. Només un dels pèptids de Tg, Tg(2098-2112), mostrava promiscuïtat (16/51).

6.4.2 Assignacions en base als motius d'ancoratge de DR4 i DR8

Vam tornar a estudiar els pèptids de les mostres que expressaven DR407 (TB448) i DR8 (TB471) per identificar els possibles lligands d'aquestes molècules, basant-nos en els motius d'ancoratge descrits a l'apartat de resultats 1 (Taules 14 i 15). Per fer això es van analitzar totes les seqüències individuals i el pèptid més llarg dins els grups de famílies peptídiques. Vam identificar tots els *cores* o nonàmers possibles fixant la posició P1 i després marcàvem la resta de posicions que contenien residus principals (en verd) o residus secundaris (vermell). Aquells *cores* que contenien residus d'ancoratge adequats a tres o més posicions (almenys dos de residus principals (verd)) és marcaven amb un requadre, indicant que aquests pèptids amb molta probabilitat eren presentats per DR4 o DR8.

Seqüència	Cores	Al·lel assignat	P P P P P P P P P								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
DIPELVNMGQWKIRA	IPELVNMGQ	DRB1*1501	I	P	E	L	V	N	M	G	Q
DIPELVNMGQWKIRA	LVNMGQWKI		L	V	N	M	G	Q	W	K	I
DIPELVNMGQWKIRA	VNMGQWKIR		V	N	M	G	Q	W	K	I	R
AAGLLSTYRAFLSSH	LLSTYRAFL	DRB1*1501	L	L	S	T	Y	R	A	F	L
AAGLLSTYRAFLSSH	LSTYRAFLS		L	S	T	Y	R	A	F	L	S
AGLLSTYRAFLSSH	LLSTYRAFL	DRB1*1501	L	L	S	T	Y	R	A	F	L
AGLLSTYRAFLSSH	LSTYRAFLS		L	S	T	Y	R	A	F	L	S
LKKYLYEIAARRHP	LYEIAARRH	DRB1*1501	Y	L	Y	E	I	A	R	R	H
LKKYLYEIAARRHP	LKKYLYEIA		L	K	K	Y	L	Y	E	I	A
LKKYLYEIAARRHP	LYEIAARRHP		L	Y	E	I	A	R	R	H	P
YPKSLHMYANRLDHR	YPKSLHMYA	DRB1*1501	Y	P	K	S	L	H	M	Y	A
YPKSLHMYANRLDHR	YANRLDHR		Y	A	N	R	L	L	D	H	R
YPKSLHMYANRLDHR	LHMYANRL		L	H	M	Y	A	N	R	L	L
YPKSLHMYANRLDHR	MYANRLDH		M	Y	A	N	R	L	L	D	H
DVG VYRAVTPQGRPD	YRAVTPQGR	DRB5*0101	Y	R	A	V	T	P	Q	G	R
DVG VYRAVTPQGRPD	VG VYRAVTP		V	G	V	Y	R	A	V	T	P
DVG VYRAVTPQGRPD	VYRAVTPQG		V	Y	R	A	V	T	P	Q	G
DVG EYRAVTELGRPD	YRAVTELGR		Y	R	A	V	T	E	L	G	R
DVG EYRAVTELGRPD	VEYRAVTE		V	G	E	Y	R	A	V	T	E
GGELRFTVTQRSQPG	FTVTQRSQP	DRB5*0101	F	T	V	T	Q	R	S	Q	P
GGELRFTVTQRSQPG	LRFTVTQRS		L	R	F	T	V	T	Q	R	S
YGGELRFTVTQRSQPG	FTVTQRSQP	DRB5*0101	F	T	V	T	Q	R	S	Q	P
YGGELRFTVTQRSQPG	YGGELRFTV		Y	G	G	E	L	R	F	T	V
YGGELRFTVTQRSQPG	LRFTVTQRS		L	R	F	T	V	T	Q	R	S
YDHN FVKAINAIQK	FVKAINAIQ	DRB5*0101	F	V	K	A	I	N	A	I	Q
YDHN FVKAINAIQK	YDHN FVKAI		Y	D	H	N	F	V	K	A	I
YDHN FVKAINAIQK	VKAINAIQK		V	K	A	I	N	A	I	Q	K
RLPIIDVAPLDVGAPD	IIDVAPLDV	DRB5*0101	I	I	D	V	A	P	L	D	V
RLPIIDVAPLDVGAPD	IDVAPLDVG		I	D	V	A	P	L	D	V	G
RLPIIDVAPLDVGAPD	LPIIDVAPL		L	P	I	I	D	V	A	P	L
RLPIIDVAPLDVGAPD	VAPLDVGAP		V	A	P	L	D	V	G	A	P
CPTPQQLQAEQAFLRTVQ	LQAEQAFLR	DRB5*0101	L	Q	A	E	Q	A	F	L	R
REIFNMARQRSR	FNMARQRSR	DRB5*0101	F	N	M	A	R	Q	R	S	R
REIFNMARQRSR	IFNMARQRSR		I	F	N	M	A	R	Q	R	S
IRASYAQQPAESRVSG	YAQQPAESR	DRB1*0407	Y	A	Q	Q	P	A	E	S	R
IRASYAQQPAESRVSG	IRASYAQQP		I	R	A	S	Y	A	Q	Q	P
NIFS FYLSRDPDAQPG	FS FYLSRDP	DRB1*0407	F	S	F	Y	L	S	R	D	P
NIFS FYLSRDPDAQPG	FYLSRDPDA		F	Y	L	S	R	D	P	D	A
NIFS FYLSRDPDAQPG	YLSRDPDAQ		Y	L	S	R	D	P	D	A	Q
NIFS FYLSRDPDAQPG	IFS FYLSRD		I	F	S	F	Y	L	S	R	D
NIFS FYLSRDPDAQPG	LSRDPDAQP		L	S	R	D	P	D	A	Q	P
RPKDYEVDATLKSLNN	YEVDATLKS	DRB1*0407	Y	E	V	D	A	T	L	K	S
RPKDYEVDATLKSLNN	VDATLKSLN		V	D	A	T	L	K	S	L	N
KPGQFIRSVDPDSPA	FIRSVDPDS	DRB1*0407	F	I	R	S	V	D	P	D	S
KPGQFIRSVDPDSPA	IRSVDPDSP		I	R	S	V	D	P	D	S	P
EDFRDGLKLMLL	FRDGLKLML	DRB1*0407	F	R	D	G	L	K	L	M	L
DVPKWISIMTERSVPH	WISIMTERS	DRB1*0407	W	I	S	I	M	T	E	R	S
DVPKWISIMTERSVPH	ISIMTERSV		I	S	I	M	T	E	R	S	V
DVPKWISIMTERSVPH	IMTERSVPH		I	M	T	E	R	S	V	P	H
DVPKWISIMTERSVPH	VPKWISIMT		V	P	K	W	I	S	I	M	T

Taula 14: Estudi dels possibles lligands de DR407 entre el conjunt de pèptids eluïts de la mostra TB448 (DRB1*1501, *0407, DRB5*0101, DRB4*0103). Seqüències dels pèptids eluïts de TB448. En vermell, pèptids de Tg. 2na columna, tots els possibles nonàmers per cada pèptid en funció de P1. 3ra columna, al·lel assignat amb ProPred, en vermell els de baixa afinitat. En cursiva, assignats amb SYFPEITHI. A l'última fila, l'assignació a DR4 en funció dels nostres resultats (emmarcats). Els residus marcats en verd indiquen residus principals i en vermell residus secundaris.

Estudi dels pèptids de la mostra TB448: Dels pèptids 6 que no s'havien pogut assignar amb ProPred, només un semblava ser un lligand eficient de DR407, coincidint amb l'assignació feta amb el motiu descrit a la base de dades del SYFPEITHI. La resta només presentaven dos o menys posicions amb residus principals o secundaris. Aquests pèptids podrien ser lligands de l'altra molècula expressada a la mostra DRB4*0103, de la qual no hi ha motiu d'ancoratge descrit. En canvi hi havia lligands, assignats amb ProPred a altres molècules, que segons els nostres resultats també podrien unir-se amb alta afinitat a DR407. Per exemple, el pèptid de col·lagen(1436-1451) (RLPIIDVAPLDVGAPD), que s'havia assignat a DRB5*0101 com a lligand de baixa afinitat, segurament es presentava per DR407 ja que segons els nostres resultats s'unia favorablement a aquesta molècula (Taula 14). Altres pèptids amb suficients residus d'ancoratge com per ser bons lligands de DR4 eren el complement C3(194-208), el DQB1*0602(75-89) i catepsina(170-183).

Estudi dels pèptids de la mostra TB471: Dels 13 pèptids que no s'havien pogut assignar amb ProPred, 2 presentaven característiques pròpies de bons lligands de DR8 i la resta no es van poder assignar segons els nostres criteris. De totes maneres algunes de les seqüències podrien unir-se amb baixa afinitat, ja que presentaven dos residus d'ancoratge adequats. Aquests pèptids podien ser lligands dèbils de DR8 o de DRB3*0101.

Un dels pèptids de la tiroglobulina, el Tg(2224-2241), presentava tres posicions d'ancoratge correctes i per tant el podíem catalogar com a bon lligand de DR8. Tot i això, no presentava un residu àcid en P9, tret característic dels lligands de DR8.

El mètode utilitzat per Propred semblava que, al menys per DR8, donava resultats globalment semblants als nostres, ja que els pèptids assignats coincidien amb els nostres resultats, tots presentaven un residu àcid en P9. De la resta de seqüències, algunes que s'havien assignat a DR3 semblaven també bons lligands de DR8 i dels lligands febles de DR3 almenys dos s'unien a DR8 amb alta afinitat, amb 4 i 5 residus d'ancoratge adequats (Taula 15), el pèptid d'Hemoglobina(133-146) i el de l'antitripsina α 1(188-204).

Seqüència	Cores	Al·lel assignat	P								
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	WGKVNDEV	DRB1*0301	W	G	K	V	N	V	D	E	V
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	LTPEEKSAV		L	T	P	E	E	K	S	A	V
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	LWGKVNDE		L	W	G	K	V	N	V	D	E
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	VHLTPEEK		V	H	L	T	P	E	E	K	S
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	VTALWGKVN		V	T	A	L	W	G	K	V	N
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	VNVDEVGGE		V	N	V	D	E	V	G	G	E
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	VDEVGGEAL		V	D	E	V	G	G	E	A	L
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	VGGEALGRL		V	G	G	E	A	L	G	R	L
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	AVTALWGKV		A	V	T	A	L	W	G	K	V
VHLTPEEKSAVTALWGKVNDEVGGEALGRLL	ALWGKVNVD		A	L	W	G	K	V	N	V	D
LVVYPWTQRF	LVVYPWTQR	DRB1*0301	L	V	V	Y	P	W	T	Q	R
LVVYPWTQRF	VVYPWTQRF		V	V	Y	P	W	T	Q	R	F
QVTQPTVGMNFKTTPRGPV	VTQPTVGMN	DRB1*0301	V	T	Q	P	T	V	G	M	N
QVTQPTVGMNFKTTPRGPV	VGMNFKTTPR		V	G	M	N	F	K	T	P	R
YYKVDENGKISR	YYKVDENGK	DRB1*0301	Y	Y	K	V	D	E	N	G	K
YYKVDENGKISR	YKVDENGKI		Y	K	V	D	E	N	G	K	I
YYKVDENGKISR	VDENGKISR		V	D	E	N	G	K	I	S	R
AHLLILRDTKTYMLAF	ILRDTKTYM	DRB1*0301	I	L	R	D	T	K	T	Y	M
AHLLILRDTKTYMLAF	LLILRDTKT		L	L	I	L	R	D	T	K	T
AHLLILRDTKTYMLAF	LILRDTKTY		L	I	L	R	D	T	K	T	Y
AHLLILRDTKTYMLAF	LRDTKTYML		L	R	D	T	K	T	Y	M	L
AHLLILRDTKTYMLAF	AHLLILRDT		A	H	L	L	I	L	R	D	T
VHKAULTIDEKGTEAAG	IDEGKTEAA	DRB1*0301	I	D	E	K	G	T	E	A	A
VHKAULTIDEKGTEAAG	LTIDEKGTE		L	T	I	D	E	K	G	T	E
VHKAULTIDEKGTEAAG	VHKAULTID		V	H	K	A	V	L	T	I	D
VHKAULTIDEKGTEAAG	VLTIDEKGT		V	L	T	I	D	E	K	G	T
VHKAULTIDEKGTEAAG	AVLTIDEKG		A	V	L	T	I	D	E	K	G
KVKKIYLDEKRLLAG	YLDEKRLLA	DRB1*0301	Y	L	D	E	K	R	L	L	A
KVKKIYLDEKRLLAG	IYLDKRLL		I	Y	L	D	E	K	R	L	L
KVKKIYLDEKRLLAG	LDEKRLLAG		L	D	E	K	R	L	L	A	G
KVKKIYLDEKRLLAG	VKKIYLDEK		V	K	K	I	Y	L	D	E	K
GKEYFAIDNSGRIIT	FAIDNSGRI	DRB1*0301	F	A	I	D	N	S	G	R	I
GKEYFAIDNSGRIIT	YFAIDNSGR		Y	F	A	I	D	N	S	G	R
GKEYFAIDNSGRIIT	IDNSGRIIT		I	D	N	S	G	R	I	I	T
GKEYFAIDNSGRIIT	AIDNSGRII		A	I	D	N	S	G	R	I	I
DPSPSPVLGYKIVYKPVG	YKIVYKPVG	DRB1*0301	Y	K	I	V	Y	K	P	V	G
DPSPSPVLGYKIVYKPVG	LGYKIVYKP		L	G	Y	K	I	V	Y	K	P
DPSPSPVLGYKIVYKPVG	VLGYKIVYK		V	L	G	Y	K	I	V	Y	K
VVAGVANALAHKYH	VVAGVANAL	DRB1*0301	V	V	A	G	V	A	N	A	L
VVAGVANALAHKYH	VAGVANALA		V	A	G	V	A	N	A	L	A
VVAGVANALAHKYH	VANALAHKY		V	A	N	A	L	A	H	K	Y
VVAGVANALAHKYH	AGVANALAH		A	G	V	A	N	A	L	A	H
VVAGVANALAHKYH	ANALAHKYH		A	N	A	L	A	H	K	Y	H
LITPAVVSERLK	ITPAVVSER	DRB1*0301	I	T	P	A	V	V	S	E	R
LITPAVVSERLK	LITPAVVSE		L	I	T	P	A	V	V	S	E
GRMHAPGKGLSQSALPYR	LSQSALPYR	DRB1*0301	L	S	Q	S	A	L	P	Y	R
GRMHAPGKGLSQSALPYR	APGKGLSQS		A	P	G	K	G	L	S	Q	S
TGAAPIIDVVRSGYYK	IIDVVRSGY	DRB1*0301	I	I	D	V	V	R	S	G	Y
TGAAPIIDVVRSGYYK	IDVVRSGYY		I	D	V	V	R	S	G	Y	Y
TGAAPIIDVVRSGYYK	AAPIIDVVR		A	A	P	I	I	D	V	V	R
TGAAPIIDVVRSGYYK	APIIDVVR		A	P	I	I	D	V	V	R	S
ASGNYATVISHNPETK	YATVISHNP	DRB1*0301	Y	A	T	V	I	S	H	N	P
ASGNYATVISHNPETK	VISHNPETK		V	I	S	H	N	P	E	T	K
ASGNYATVISHNPETK	ASGNYATVI		A	S	G	N	Y	A	T	V	I
ASGNYATVISHNPETK	ATVISHNPE		A	T	V	I	S	H	N	P	E
AGNLGGGVVTIERSK	LGGGVVTIE	DRB1*0301	L	G	G	G	V	V	T	I	E
AGNLGGGVVTIERSK	AGNLGGGVV		A	G	N	L	G	G	G	V	V
SYELPDGQVITIGNERFR	YELPDGQVI	DRB1*0301	Y	E	L	P	D	G	Q	V	I
SYELPDGQVITIGNERFR	ITIGNERFR		I	T	I	G	N	E	R	F	R
SYELPDGQVITIGNERFR	LPDGQVITI		L	P	D	G	Q	V	I	T	I
SYELPDGQVITIGNERFR	VITIGNERF		V	I	T	I	G	N	E	R	F
EITALAPSTMK	ITALAPSTM	DRB1*0301	I	T	A	L	A	P	S	T	M
GTQGKIVDLVKELDRDT	IVDLVKELD	DRB1*0301	I	V	D	L	V	K	E	L	D
GTQGKIVDLVKELDRDT	LVKELDRDT		L	V	K	E	L	D	R	D	T
GTQGKIVDLVKELDRDT	VDLVKELDR		V	D	L	V	K	E	L	D	R
SGNFGGSRNMGGPYGGGNYGPGGSGGSGGYGGR	FGGSRNMGG	DRB1*0301	F	G	G	S	R	N	M	G	G
SGNFGGSRNMGGPYGGGNYGPGGSGGSGGYGGR	YGGGNYGPG		Y	G	G	G	N	Y	G	P	G
SGNFGGSRNMGGPYGGGNYGPGGSGGSGGYGGR	YGPGGSGGS		Y	G	P	G	G	S	G	G	S
DGRGALQNIIPASTGAAK	IIPASTGAA	DRB1*0301	I	I	P	A	S	T	G	A	A
DGRGALQNIIPASTGAAK	IPASTGAAK		I	P	A	S	T	G	A	A	K

DGRGALQNIIPASTGAAK	LQNIIPAST		L Q N I I P A S T
DGRGALQNIIPASTGAAK	ALQNIIPAS		A L Q N I I P A S
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	YGAELERM	DRB1*0301	Y G A E A L E R M
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	WGKVGAG		W G K V G A H A G
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	LSPADKTNV		L S P A D K T N V
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	VLSPADKTN		V L S P A D K T N
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	VKAAWGKVG		V K A A W G K V G
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	VGAHAGEYG		V G A H A G E Y G
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	ADKTNVKAA		A D K T N V K A A
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	AAWGKVGGAH		A A W G K V G A H
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	AWGKVGGAH		A W G K V G A H A
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	AHAGEYGAE		A H A G E Y G A E
VLSPADKTNVKAAWGKVGGAHAGEYGAEALERMF	AGEYGAEAL		A G E Y G A E A L
EGLTFQMKNNAEELK	FQMKNNAEE	DRB1*0801	F Q M K K N A E E
EGLTFQMKNNAEELK	LTQMKNNA		L T F Q M K K N A
AYVRLAPDYDALDVANK	YVRLAPDYD	DRB1*0801	Y V R L A P D Y D
AYVRLAPDYDALDVANK	YDALDVANK		Y D A L D V A N K
AYVRLAPDYDALDVANK	LAPDYDALD		L A P D Y D A L D
AYVRLAPDYDALDVANK	VRLAPDYDA		V R L A P D Y D A
AYVRLAPDYDALDVANK	AYVRLAPDY		A Y V R L A P D Y
AYVRLAPDYDALDVANK	APDYDALDV		A P D Y D A L D V
SVPRYLPRPANPDE	YLPRPANPD	DRB1*0801	Y L P R P A N P D
SVPRYLPRPANPDE	LPRPANPDE		L P R P A N P D E
SVPRYLPRPANPDE	VPRYLPRPA		V P R Y L P R P A
QVDQFLGVPIYAAPLAER	FLGVPIYAAP	DRB1*0301	F L G V P Y A A P
QVDQFLGVPIYAAPLAER	YAAPLAER		Y A A P P L A E R
QVDQFLGVPIYAAPLAER	LGVPIYAAP		L G V P Y A A P P
QVDQFLGVPIYAAPLAER	VDQFLGVPIY		V D Q F L G V P Y
QVDQFLGVPIYAAPLAER	VPYAAPLA		V P Y A A P P L A
LSLQEGSKT	LSLQEGSKT	DRB1*0301	L S L Q E G S K T
AVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKR	YWNSQKDLL	NA	Y W N S Q K D L L
AVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKR	WNSQKDLLE		W N S Q K D L L E
AVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKR	LGRPDAEYW		L G R P D A E Y W
AVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKR	VTELGRPDA		V T E L G R P D A
AVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKR	AVTELGRPDA		A V T E L G R P D
AVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKR	AEYWNSQKD		A E Y W N S Q K D
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	FLSFPTTKT		F L S F P T T K T
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	FPTTKTYFP	NA	F P T T K T Y F P
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	FPHFDLSHG		F P H F D L S H G
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	FDLSHGSAQ		F D L S H G S A Q
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	YFPHFDLSH		Y F P H F D L S H
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	LSFPTTKTY		L S F P T T K T Y
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	LSHGSAQVK		L S H G S A Q V K
FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	AQVKGHGKK		A Q V K G H G K K
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	LTNAVAHVD	NA	L T N A V A H V D
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	LSALSDLHA		L S A L S D L H A
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	VADALTNVA		V A D A L T N A V
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	VAHVNDNMPN		V A H V D N M P N
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	VDNMPNALS		V D N M P N A L S
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	ADALTNVA		A D A L T N A V A
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	ALTNAVAHV		A L T N A V A H V
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	AVAHVDNMP		A V A H V D N M P
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	AHVNDNMPNA		A H V D N M P N A
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	ALSALSDLH		A L S A L S D L H
VADALTNVAHVNDNMPNALSALSDLHAHK	ALSDLHAHK		A L S D L H A H K
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	FTPAVHASL	NA	F T P A V H A S L
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	FLASVSTVL		F L A S V S T V L
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	LPAEFTPAV		L P A E F T P A V
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	LDKFLASVS		L D K F L A S V S
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	LASVSTVLT		L A S V S T V L T
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	VHASLDKFL		V H A S L D K F L
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	VSTVLT SKY		V S T V L T S K Y
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	AAHLPAEFT		A A H L P A E F T
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	AHLPAEFTP		A H L P A E F T P
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	AEFTPAVHA		A E F T P A V H A
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	AVHASLDKF		A V H A S L D K F
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	ASLDKFLAS		A S L D K F L A S
AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKYR	ASVSTVLT S		A S V S T V L T S
PAAPAAPAPAEKTPVKKKAR	AAPAAPAPA	NA	A A P A A P A P A
PAAPAAPAPAEKTPVKKKAR	APAAPAPAE		A P A A P A P A E
PAAPAAPAPAEKTPVKKKAR	AAPAPAEKT		A A P A A E K T
PAAPAAPAPAEKTPVKKKAR	APAPAEKTP		A P A P A E K T P
PAAPAAPAPAEKTPVKKKAR	APAEKTPVK		A P A E K T P V K

PAAPAAPAPAEKTPVKKKAR	AEKTPVKKK		A E K T P V K K K
SETAPAAPAAPAEKEVKKK	APAAPAAP NA		A P A A P A A P
SETAPAAPAAPAEKEVKKK	AAPAAPPA		A A P A A A P P A
SETAPAAPAAPAEKEVKKK	APAAPPAE		A P A A A P P A E
SETAPAAPAAPAEKEVKKK	AAAPPAEKE		A A A P P A E K E
SETAPAAPAAPAEKEVKKK	AAPPAEKEV		A A P P A E K E V
SETAPAAPAAPAEKEVKKK	APPAEKEVK		A P P A E K E V K
GAPAAATAPAPTAHK	ATAPAPTAH NA		A T A P A P T A H
GAPAAATAPAPTAHK	APAAATAPA		A P A A A T A P A
GAPAAATAPAPTAHK	AAATAPAPT		A A A T A P A P T
GAPAAATAPAPTAHK	AATAPAPTA		A A T A P A P T A
AKFEELNMDLFR	FEELNMDLF NA		F E E L N M D L F
AKFEELNMDLFR	AKFEELNMD		A K F E E L N M D
IGSSQDDGLINR	IGSSQDDGL NA		I G S S Q D D G L
AKAVKQFEESQGRSSK	FEESQGRS NA		F E E S Q G R T S
AKAVKQFEESQGRSSK	VKQFEESQG		V K Q F E E S Q G
AKAVKQFEESQGRSSK	AKAVKQFEE		A K A V K Q F E E
AKAVKQFEESQGRSSK	AVKQFEESQ		A V K Q F E E S Q
FESFGDLSTPDVAVMGNPKVK	FESFGDLST NA		F E S F G D L S T
FESFGDLSTPDVAVMGNPKVK	FGDLSTPDA		F G D L S T P D A
FESFGDLSTPDVAVMGNPKVK	LSTPDVAVM		L S T P D A V M G
FESFGDLSTPDVAVMGNPKVK	AVMGNPKVK		A V M G N P K V K
TVDGPSGKLWR	VDGPSGKLW NA		V D G P S G K L W
LRVDPVNFK	LRVDPVNFK NA		L R V D P V N F K

Taula 15: Estudi dels possibles lligands de DR8 entre el conjunt de pèptids eluïts de la mostra TB471 (DRB1*0301, *0801, DRB3*0101). Veure llegenda de la Taula

7. ASSAJOS D'UNIO PEPTÍDICA

A continuació vam voler confirmar experimentalment quines de les molècules de DR expressades a les mostres de tiroides presentaven els pèptids de tiroglobulina. Per tal de determinar-ho es van fer diferents assajos d'unió peptídica, alguns però sense resultats reproduïbles. A continuació s'expliquen els resultats obtinguts amb tres tècniques diferents d'unió de pèptids a HLA-DR.

7.1. Assaig d'unió peptídica per competició

Es van sintetitzar 16 dels pèptids de la mostra TB448 (veure materials i mètodes), els que s'havia seqüenciat fins a aquell moment, i es van fer assajos d'unió a MHC per competència amb pèptids control.

L'assaig es realitzava amb cèl·lules HLA-II negatives transfectades amb DR15 o DR51 (DRB1*1501 i DRB5*1010 respectivament, de l'haplotip DR15) i la capacitat d'unió es mesurava com a capacitat d'inhibició de la unió d'un pèptid control (MBP83-99 i MBP85-98 per DR15 i DR51 respectivament). La síntesis dels pèptids i els assajos d'unió a MHC es van fer en el laboratori de la Dra. Clemencia Pinilla del TPIMS a La Jolla, Califòrnia. Els resultats es mostren a la taula 16. La majoria dels pèptids es van poder assignar a un o altre al·lel, o a ambdós, i els que no, es van poder assignar, de manera teòrica, a l'altre al·lel expressat pel donant DRB1*0407, pel qual no hi havia transfectants disponibles. Els resultats mostren que el pèptid Tg(726-743) té una capacitat d'unió moderada a ambdós al·lells DR15 i DR51. De la resta de pèptids alguns mostraven una unió considerable per DR15 i alguns eren positius per DR51, però amb nivells baixos. Aquells que presentaven un índex d'unió baix per ambdós al·lells mostraven unió teòrica amb DR407(DRB1*0407). Només un dels pèptids (Col·lagen alfa 1436-1451) no mostrava unió per cap dels al·lells.

Seqüència	Proteïna	% inhib DR15	ProPred Score	Core	% inhib DR51	ProPred Score	Core**	Unió teòrica DR407
GGELRFTVTQRSQPG	Heparan sulfat (1006-1020)	59	21.02	LRFTVTQRS	16	29.59	LRFTVTQRS	NO
DIPELVNMGQWKIRA	Complement C3 (194-208)	96	41.84	LVNMGQWKI	6	35.71	LVNMGQWKI	NO
YGGELRFTVTQRSQPG	Heparan Sulfate (1005-1020)	35	21.02	LRFTVTQRS	26	29.59	LRFTVTQRS	NO
DVGVYRAVTPQGRPD	DQB1*0602 b chain (75-89)	30	27.55	VG VYRAVTP	19	68.4	YRAVTPQGR	NO
AAGLLSTYRAFLSSH	Collagen α 1 (XV) (1243-1257)	97	33.67	LSTYRAFLS	20	5.1	LLSTYRAFL	NO
AGLLSTYRAFLSSH	Collagen α 1 (XV) (1244-1257)	91	33.67	LSTYRAFLS	43	5.1	LLSTYRAFL	NO
CPTPCQLQAEQAFLRTVQ	Thyroglobulin (726-743)	40	10.2	LQAEQAFLR	32	29.59	LQAEQAFLR	NO
YPKSLHMYANRLLDHR	Apolipoprotein B (1200-1215)	93	55.1	LHMYANRLL	22	19.39	LHMYANRLL	NO
IRASYAQQPAESRVSG	Heparan sulfate (1089-1104)	10	5.1	IRASYAQQP	23	9.18	YAAQPAESR	NO
EDFRDGLKLMLL	a actinin 1/4 (57-68) (76-87)	-25	20.41	FRDGLKLML	31	0	FRDGLKLML	NO
YDHNFKVAINAIQK	Cathepsin C (170-183)	-5	15.31	VKAINAIQK	43	54.08	VKAINAIQK	FVKAINAIQ
KPGQFIRSVDPDSPA	NHERF (174-188)	7	6.12	IRSVDPDSP	9	4.08	IRSVDPDSP	FIRSVDPDS
RPKDYEVDTLKLNN	Collagen α 2 (I) (1129-1144)	15	7.76	YEVDTLKS	13	0	YEVDTLKS	YEVDTLKS
NIFSFLSRDPDAQPG	Cathepsin D (227-241)	2	20.41	IFSFLSRD	-4	0	IFSFLSRD	FYLSRDPDA
LKKYLYEIARRHP	Serum Albumin (159-171)	-18	33.67	LKKYLYEIA	16	28.57	YLYEIARRH	YLYEIARRH
RLPIIDVAPLDVGAPD	Collagen α 1 (I) (1436-1451)	11	20.41	IIDVAPLDV	-12	13.27	LPIIDVAPL	NO

Taula 16: Assaig d'unió peptídica per competició. Core: nonàmer definit per ProPred, Unió teòrica a DR407 definida mitjançant el motiu d'ancoratge de SYFPEITHI; Ombrejat fosc: bons lligands, ombrejat clar: bons lligands teòrics

Cal dir però que la interpretació d'aquests resultats s'ha de fer amb certes reserves, com vam poder demostrar més tard. Per ser del tot fiable s'haurien d'haver provat diferents concentracions per tal d'establir el 50% de la dosis inhibidora (IC_{50}). Degut a que aquesta metodologia estava molt estandarditzada en el laboratori de la Dr Pinilla (Arndt, Vogt et al. 2000), ens vam limitar a provar una sola concentració.

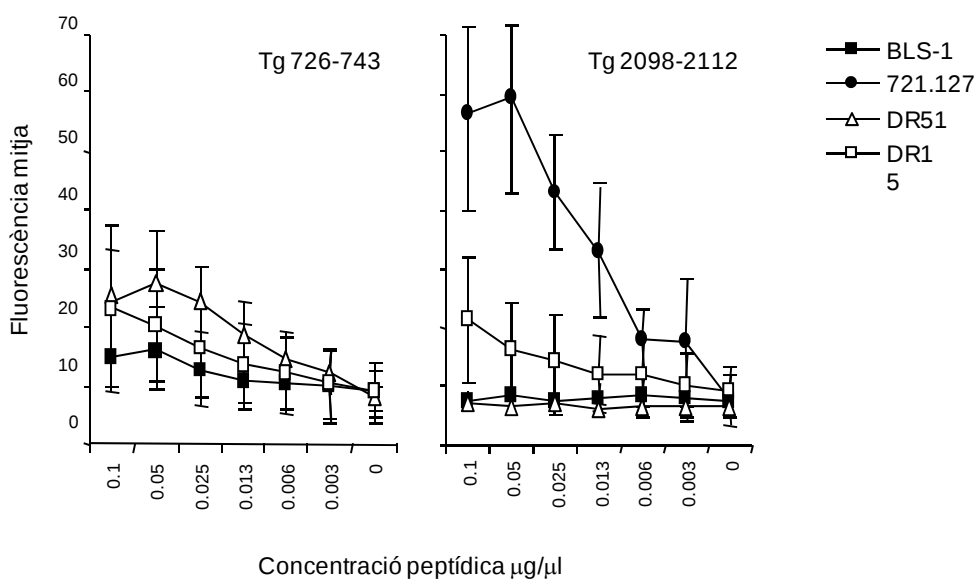
En qualsevol cas, és probable que el mètode de competició no sigui el més adequat per l'anàlisi de pèptids autòlegs, ja que aquests s'associen a les molècules d'HLA-DR amb molt baixa afinitat.

7.2. Assaig d'unió directa

Per provar la capacitat d'unió dels pèptids es va provar un segon assaig, mitjançant la detecció dels complexos HLA-DR a la superfície de cèl·lules intactes. Es van testar dos pèptids de tiroglobulina, Tg(726 -743) i Tg(2098-2112). Aquests assajos es feien amb cèl·lules vives incubades amb els pèptids biotinilats, un cop feta la incubació es revelava amb estreptavidina i s'analitzava la unió per FACS. Les incubacions es feien a pH5 i 7.4 per veure si hi havia influència del pH en la unió dels pèptids, però no es van observar diferències importants, així que es va decidir fer la resta d'assajos a pH7.4.

7.2.1 Pèptid Tg(726-743), obtingut de la mostra TB448 (DRB1*1501, B5*0101, B1*0407, B4*0103)

Utilitzant els transfectants de DR15 i de DR51, les dades d'unió directa suggerien que Tg(726-743) era millor lligand de DR51 (Figura 36). Si observàvem l'índex d'unió teòric del programa ProPred, els valors confirmaven les dades (10.2 per l'al·lel DR15 i 29.59 pel DR51). Els assajos de competició en canvi mostraven una major unió amb DR15, tot i que els valors eren positius per ambdós al·lells i no gaire diferents. D'altra banda, el pèptid Tg(726-743) segons les dades del ProPred no semblava ser un bon lligand de DRB1*0407 i mostrava una promiscuïtat baixa (2/51) (Taula 12).



Haplotips de DR:

DRB1	DRB6	DRB5	DRB9	DRA	DR2: DRB1*1501(DR15), DRB5*0101 (DR51)
DRB1	DRB2	DRB3	DRB9	DRA	DR3: DRB1*0301 (DR17), DRB3*0101 (DR52)

Figura 36: Assaig d'unió directe. Les cèl·lules que es van usar per l'assaig eren: BLS-1 no transfectades, o transfectades amb DR51 o DR15, i la línia hemizigota per DR3, 721.127. Els resultats es mostren com a la mitja $\pm$ std de 8 experiments fets per triplicat. A la part de baix es mostra l'estructura de la regió DR dels dos haplotips involucrats, DR2 i DR3. Les regions ombrejades representen pseudogènes.

7.2.2 Pèptid Tg(2098-2112), obtingut de la mostra TB449 (DRB1*1501, B5*0101, B1*0301, B3*0101)

El pèptid Tg(2098-2112) s'unia favorablement a les cèl·lules HLA-DR3 (DR17). Per aquest assaig es van usar cèl·lules hemizigotes 721.127 que expressaven l'haplotip HLA-A1*0101; B1*0801; DRB1*03 (DR3); DRB3*0101 (DR52), enlloc de transfectants simples. Per aquest motiu no podíem saber realment quina de les dues molècules de l'haplotip DR3 (DR52 o DR3) estava involucrada (Figura 36). Respecte l'haplotip DR2, la unió amb DR51 era comparable a la del control negatiu (cèl·lules BLS),

però en canvi s'observava una baixa capacitat d'unió a DR15. La unió teòrica mostrava igualment preferència per l'al·lel DR3 (49.47) seguit de DR15 (32.65). Aquest pèptid mostrava un valor de promiscuitat relativament elevat, sent teòricament capaç d'unir 16 dels 51 al·lells analitzats (Taula 12).

Per confirmar les dades anteriors, vam portar a terme assajos de bloqueig de la unió amb anticossos anti-DR, encara que mai van ser concloents, ja que sempre s'observava una disminució de la unió del pèptid menor del 50%. Així que tot i que els resultats eren coherents, no podíem estar del tot segurs que la unió fos específica.

7.3. Anàlisis d'unió peptídica en absència de cèl·lules (Proimmune)

El sistema d'unió directa sobre cèl·lules no tenia la sensibilitat adequada per l'anàlisi de pèptids autòlegs i d'altra banda era difícil aconseguir línies homozigotes per testar cada al·lel per separat. Per això vam buscar un mètode de major sensibilitat, utilitzant molècules solubles d'HLA-DR. El primer assaig es va fer amb les molècules DR15 (DRA1*0101/DRB1*1501) i DR3 (DRA1*0101/DRB1*0301) i posteriorment amb DR4 (DRA1*0101/DRB1*0407) i DR51 (DRA1*0101/DRB5*0101). A més dels pèptids de tiroglobulina, es van testar pèptids controls que s'havien pogut assignar de manera teòrica a un o altre al·lel amb el programa ProPred (Taula 17). La majoria dels pèptids de tiroglobulina no s'havien pogut assignar a cap al·lel amb ProPred, excepte Tg(2098-2112) que s'unia a DR3, i Tg(726-743) que semblava associar-se preferentment a DR51, però que també s'unia amb menor afinitat a DR15 i DR3. En el segon assaig es van testar els mateixos pèptids que en el primer però es van afegir controls per DR4 i DR51.

Dels dos pèptids de Tg que s'havien pogut assignar per ProPred, Tg(2098-2112) es va confirmar que s'unia a DR3, i el pèptid Tg(726-743) mostrava baixa unió amb DR51 i cap amb DR15 (Taula 17). A diferència del que havíem deduït per la seva seqüència, aquest pèptid s'unia molt favorablement a DR407. De la resta de pèptids de Tg dos, Tg(2520-2532) i Tg(1080-1090) s'unien amb valors molt baixos a DR3, per sota la línia acceptada com a bon lligand. Dos dels pèptids Tg(2508-2519) i Tg(2756-2765) no mostraven capacitat d'unió per DR3, l'al·lel expressat per la mostra, i per tant era possible que es presentessin per DR8, tot i que no s'ha pogut testar encara, però segons el motiu d'ancoratge no s'unirien bé. Resumint, la majoria dels pèptids de Tg presentaven valors d'unió baixos (Figura 37 i Taula 17).

I.D	Seqüència	Nº aa	Proteïna	Glàndula Tiroide	SAI-lel Assignat	Unió a DR			
						*1501	*0301	*0407	DR51 [†]
1	AKAVKQFEESQGR	13	Tiroglobulina (2520-2532)	TB471	NA	41	16.4	24.92	6.87
2	QVDQFLGVPIYAAPPLAE	17	Tiroglobulina (2224-2240)	TB471	NA	104.4	0	52.45	14.30
3	VDQFLGVPIYAAPPLAER	17	Tiroglobulina (2225-2241)	TB471	NA	143	0		
4	IGSSQDDGLINR	12	Tiroglobulina (2508-2519)	TB471	NA	0	0	403.24	14.41
5	SRTSGLLSSWK	11	Tiroglobulina (1080-1090)	TB471	NA	216.7	75.1	303.81	63.86
6	LSLQEPGSKT	10	Tiroglobulina (2756-2765)	TB471	NA	0	0	8.53	15.63
7	CPTPCQLQAEQAFRLTV	17	Tiroglobulina (726-742)	TB448	DRB5*0101	0	270.8	796.49	28.82
8	PTPCQLQAEQAFRLTVQ	17	Tiroglobulina (727-743)	TB448	DRB5*0101	13.6	101.9		
9	LSSVVDPISRHFVDV	15	Tiroglobulina (2098-2112)	TB449	DRB1*0301	0	353.3	383.79	14.97
10	GKEYFAIDNSGRIIT	15	VE-Caderina (196-210)	TB449	DRB1*0301	0.4	975.7	447.76	6.32
11	LLVVYPWTQRF	11	Hemoglobina cadena β (31-41)	TB449	DRB1*1501	1399.2	33.2	362.06	4.43
12	DVGVRVAVTPQGRPD	15	DQB1*0602 cadena β (75-89)	TB448,237	DRB5*0101	128.8	0	1976.1	16.74
13	AAGLLSTYRAFLSSH	15	Col·lagen α1 (XV) (1243-1257)	TB449	DRB1*1501	1644.3	138.1	1580.9	35.14
+ve	MSIYVYALPLKMLNI	15	hCMV pp65 (109-123)	-	DRB1*1501	1192.2	-	-	-
+ve	PSPSMGRDIKVQFQ	14	M. tuberculosis Ab 85B (14-27)	-	DRB1*0301	-	1428.7	-	-
14	EGLTFQMKNNAEELK	15	Apolipoproteïna A-IV (239-253)	TB471	DRB1*0801			557.65	17.96
15	SVPRYLPRPANPDE	14	Caderina epitelial (793-806)	TB471	DRB1*0801			36.718	11.09
16	AYVRLAPDYDALDVANK	17	Proteïna riboso. 60S L23a (136-152)	TB471	DRB1*0801			294.88	19.51
17	RPKDYEVDATLKSLLN	16	Col·lagen α2 (I) (1129-1144)	TB448	DRB1*0407			68.137	6.21
18	NIFSFLSRDPDAQPG	16	Catepsina D (227-241)	TB448	DRB1*0407			49.325	5.76
19	IRASYAQQPAESRVSG	16	Heparan sulfat (1089-1104)	TB448	DRB1*0407			106.25	62.97
20	DVGEYRAVTELGRPD	15	HLA II cadena β DRB1*4 (72-86)	TB448	DRB5*0101			233.26	0.00
21	RVMTIAPGLFGTPLL	16	3 hidroxiacil CoA DH tipus II (192-207)	TB449	DRB5*0101			174.28	0.00
22	RGNSIIMLEALERV	14	RNP nuclear petita G (63-76)	TB449	DRB5*0101			118.33	0.00
23	DKFLASVSTVLTSKYR	16	Hemoglobina cadena α (126-141)	TB449	DRB5*0101			31.781	16.30
24	AKFEELNMDLFR	12	Proteïna BIP (325-336)	TB471	NA			32.834	0.00
25	TYFPHFDLSHGSAQVK	16	Hemoglobina cadena α (41-56)	TB471	NA			476.3	0.67
+ve	PKYVKQNTLKLAT		Flu HA 307-319		DRB1*0407	-	-	164.58	-
+ve	PKYVKQNTLKLAT		Flu HA 307-319		DRB5*0101	-	-	-	1108.6

Taula 17: Unió de pèptids als al·lells DR15, DR3, DR407 i DR51. [§]Al·lel assignat per ProPred. En vermell, controls positius per cada un dels al·lells. [†]DR51 és una molècula de DR formada per DRα i l'al·lel *0101 del gen DRB5. En ombrejat es marquen les caselles corresponents als al·lells expressats per cada una de les mostres.

L'assaig per DR51 presentava certes inconsistències. Molts pèptids presentaven un índex d'unió molt baix o zero, i el pèptid de la cadena β de DQB1*0602(75-89) (nº 12), aïllat d'una mostra DR2 homozigota (TB237) en aquest assaig no s'unia a DR15 ni a DR51. Aquest pèptid ja havia estat definit com a lligand de DR15 i de DR51 (Vogt, Kropshofer et al. 1994) i l'assaig de competència havia donat positiu per la unió amb ambdós al·lells de l'haplotip DR2 (veure taula 16). Altres pèptids, com ara els de VE-cadherina(196-210), cadena β hemoglobina(31-41) i col·lagen α1(1243-1257), demostraven la validesa del mètode al mostrar valors d'unió tan alts com els controls positius i per tant, clara assignació a un al·lel.

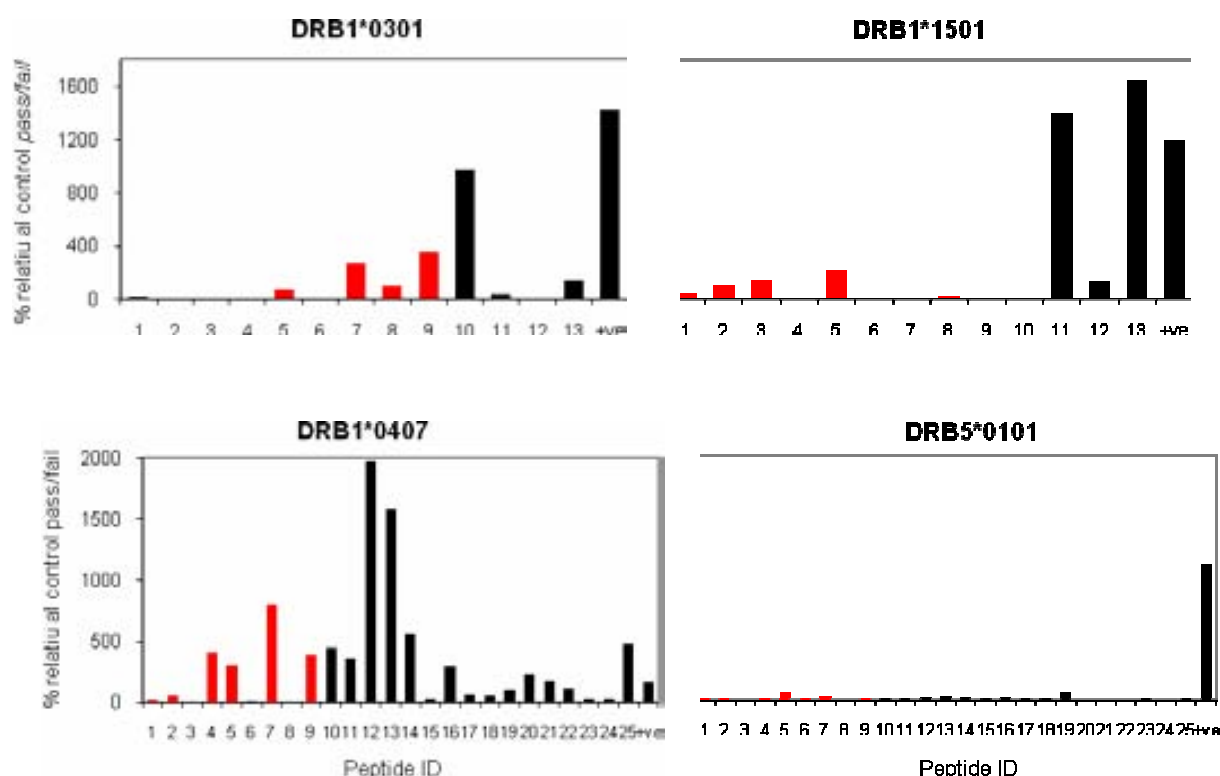


Figura 37: Representació gràfica dels resultats de l'assaig d'unió de pèptids a DR, lliure de cèl·lules, REVEAL™. En vermell, pèptids de tiroglobulina. Els pèptids 3 i 8, que són variants de longitud del 2 i el 7, no es van testar amb DRB1*0407 i B5*0101.

7.4. Comparació dels resultats dels assajos d'unió peptídica

El primer que s'observava comparant aquests assajos i les prediccions informàtiques era que la sensibilitat dels mètodes era insuficient per pèptids de baixa afinitat però que pels pèptids de major afinitat era suficient (Taula 18).

Les prediccions informàtiques permeten fer una primera assignació teòrica que s'ha de confirmar amb assajos d'unió peptídica. El sistema del programa ProPred calcula la unió en funció d'unes matrius d'afinitat, que no tenen en compte factors que podrien impedir la unió dels pèptids, com la presència de determinats aminoàcids en una posició concreta. Per exemple l'al·lel DRB1*0301 uneix residus carregats negativament, preferentment Asp i en alguns casos Glu, en posició 4. La matriu això ho té en compte i dona un valor alt a l'Asp en P4, però no reflecteix el fet que certs aminoàcids dificultarien o inclús impedirien la unió del pèptid si es trobessin en aquesta posició, degut a les seves característiques de mida o càrrega. Per exemple a la base de dades SYFPEITHI descriuen el motiu d'ancoratge per DR3 amb un Asp en posició P4 i la majoria dels pèptids naturals publicats (Wahlstrom, Dengjel et al. 2007) presenten residus àcids en aquesta posició. Si estudiem la Pro, un aminoàcid molt

diferent a la resta i que, tenint en compte les característiques d'unió d'aquesta butxaca, no esperaríem trobar en aquesta posició, només 4 dels 79 pèptids descrits a un article recent (Wahlstrom, Dengjel et al. 2007) tenien Pro en P4. Un era un pèptid de l' α -1-antitripsina (AIFFLPDEGKLQ), que tindria Asp en P4 només desplaçant el motiu d'ancoratge que ells predeïen, mantenint una Phe en P1, per tant segurament estava mal alineat; els altres dos, ATP sintasa (PVPPLPEYGGKVRYG) i C5 (DKPVYTPDQSVKQ) també tindrien Asp o Glu en P4, desplaçant el motiu una posició. L'últim és el mateix pèptid d'hemoglobina que nosaltres hem seqüenciat (LVVYPWTQRF) del TB449, i que en el nostre estudi s'uneix a HLA-DR15 i mostra un valor d'unió baix a HLA-DR3. Tanmateix, aquest pèptid ha estat aïllat d'una cèl·lula HLA-DR3 homozigota. En resum, els mètodes disponibles d'unió de pèptid detecten valors alts i negatius sense problema, però la discriminació d'unions de baixa afinitat, que poden ser molt rellevants sobretot en autoimmunitat, no estan del tot resoltes.

En aquests moments estem col·laborant amb Pau Marc Muñoz, del grup de Bioinformàtica del Dr. Xavier Daura per generar un programa de predicció bioinformàtic més acurat que els que hi ha actualment.

L'únic pèptid de Tg que es podia assignar amb total fiabilitat era Tg(2098-2112) presentat per DR3, ja que tant en els assajos cel·lulars com en els sense-cèl·lules, donava resultats clars d'unió a DR3. El pèptid Tg(726-743), que s'unia a DR15 i a DR51 amb baixa intensitat, donava valors molt clars amb DR407, tot i que de moment no s'ha pogut confirmar amb cap altra assaig. El pèptid Tg(2224-2241) podria presentar-se unit a DR8, ja que complia el motiu d'ancoratge d'aquesta molècula i la unió a DR3 era negativa. Desafortunadament encara no tenim disponibles els assajos d'unió a DR8. Finalment, el pèptid Tg(1080-1090), que presenta capacitat d'unió elevada per DR407 (no expressat per TB471), mostra un valor d'unió a DR3 positiu però per sota del control *pass-fail*. En el context del TB471, aquest podria ser un pèptid unit amb baixa afinitat a DR3. La resta de pèptids de Tg, tots del TB471, no es van poder assignar a cap dels al·lels de la mostra ja que la unió amb DR3 era negativa i tampoc presentaven residus d'ancoratge definits per DR8. No es pot descartar la possibilitat que siguin presentats per l'altre molècula de l'haplotip DR3, DRB3*0101. Tots aquests podrien ser pèptids de molt baixa afinitat que s'uneixen a DR exclusivament en condicions patològiques com ara l'hiperactivació de l'endocitosi del col·loide per les CFT en GD.

De la resta de pèptids mostrats a la taula 8, alguns es van poder assignar clarament a un dels al·lels però d'altres encara van quedar per determinar (? a la taula 18). Quatre dels pèptids aïllats de la mostra TB471 es van assignar a DR8 ja que presentaven valors d'afinitat baixos per DR3 i en canvi presentaven més de dos residus d'ancoratge per DR8. Dels 4 pèptids de la mostra TB448, dos es van poder assignar clarament a DR407 ja que presentaven nivells d'unió elevat i més de dos motius d'ancoratge. Els altres dos, tot i que donaven valors relativament alts d'unió a DR407 amb l'assaig sense-cèl·lules, no s'adaptaven clarament al motiu d'unió de DR407 i l'assignació no era tan clara.

ID	Proteïna	GT	Proimmune				ProPred			TPIMS		Unió directa			Assig final
			DR15	DR3	0407	DR51	DR15	DR3	DR51	DR15	DR51	DR15	DR3	DR51	
1	Tioglobulina (2520-2532)	TB471	41	16.4	24.92	6.87	20.41	0	0						?
2	Tioglobulina (2224-2240)	TB471	104.4	0	52.45	14.30	10.2	15.79	5.1						DR8
3	Tioglobulina (2225-2241)	TB471	143	0			10.2	15.79	5.1						DR8
4	Tioglobulina (2508-2519)	TB471	0	0	403.2	14.41	0	0	0						?
5	Tioglobulina (1080-1090)	TB471	216.7	75.1	303.8	63.86	0	0	0						?
6	Tioglobulina (2756-2765)	TB471	0	0	8.53	15.63	0	11.58	25.51						?
7	Tioglobulina (726-742)	TB448	0	271	796.5	28.82	10.2	12.63	29.59	40	32	+		++	DR2/4
8	Tioglobulina (727-743)	TB448	13.6	102			10.2	12.63	29.59	40	32	+		++	DR2/4
9	Tioglobulina (2098-2112)	TB449	0	353	383.8	14.97	32.65	49.47	14.29			++	+++	-	DR3
10	VE-Caderina (196-210)	TB449	0.4	976	447.8	6.32	14.29	35.79	31.63						DR3
11	Hemoglobina β (31-41)	TB449	1399	33.2	362.1	4.43	39.8	36.84	29.59						DR15
12	DQB1*0602 β (75-89)	448,237	128.8	0	1976	16.74	27.55	36.84	68.37						DR2/4
13	Col·lagen α 1 XV (1243-1257)	TB449	1644	138	1581	35.14	33.67	12.21	5.1						DR15
14	Apolipoprot. A-IV (239-253)	TB471			557.7	17.96	0	12.63	0						DR8
15	E-Cadherina (793-806)	TB471			36.72	11.09	20.41	0	1.02						DR8
16	60S ribos. L23a (136-152)	TB471			294.9	19.51	35.71	11.58	14.29						DR8
17	Col·lagen α 2 (I) (1129-1144)	TB448			68.14	6.21	7.76	42.11	0	15	13				DR4
18	Catepsina D (227-241)	TB448			49.33	5.76	20.41	0	0	2	-4				DR4
19	Heparan sulfat (1089-1104)	TB448			106.3	62.97	5.1	26.32	9.18	10	23				DR4/51
20	DRB1*4 cadena β (72-86)	TB448			233.3	0.00	13.27	5.26	44.9						?
21	3 hidroxicoA DH II (192-207)	TB449			174.3	0.00	31.63	32.63	34.69						?
22	Rnp nuclear G (63-76)	TB449			118.3	0.00	39.8	33.68	53.06						?
23	Hemoglobina α (126-141)	TB449			31.78	16.30	10.2	9.16	16.33						?
24	Proteïna BIP (325-336)	TB471			32.83	0.00	0	0	0						DR8
25	Hemoglobina α (41-56)	TB471			476.3	0.67	16.33	1.05	7.14						?

Taula 18: Taula comparativa dels resultats dels assajos d'unió de pèptids a MHC. Proimmune, assaig d'unió lliure de cèl·lules; ProPred, % d'afinitat teòrica calculada amb el programa; ProPred. TPIMS, assaig d'unió per competició realitzat al TPIM; Unió directa, assaig d'unió directe de pèptids biotinilats; Assig. Final, assignació final, ?: no es pot assignar amb seguretat. Amb vermell els valors d'afinitat elevats, en verd els valors mitjos i en negreta els valors més alts de l'assaig. En ombrejat es marquen les caselles corresponents als al·lels expressats per cada una de les mostres.

Les dades dels diferents mètodes pels pèptids de cadherina, hemoglobina i col·lagen coincideixen en els valors màxims d'unió pel mateix al·lel i per tant s'han pogut assignar. El pèptid de DQB1*0602 que segons els resultats de l'assaig sense-cèl·lules era bon lligand de DR4, el programa ProPred no l'assignava com a lligand de DR4 i presentava índex d'unió teòric elevats per les dues molècules de l'haplotip DR2, com és d'esperar d'un lligand eluït d'una mostra homozigota per DR2. Els resultats doncs, suggereixen que pot ser un pèptid promiscu.

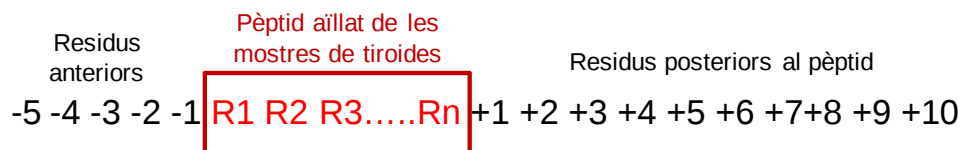
Sembla doncs que els pèptids aïllats del teixit tiroïdal són difícils d'assignar a un o altre al·lel ja que són lligands de baixa afinitat. Això podria ser degut a que les cèl·lules que els estan generant no són

cèl·lules presentadores d'antigen professionals i per tant la maquinària de generació i selecció dels pèptids pot ser diferent.

8. PATRONS DE PROCESSAMENT DELS PÈPTIDS NATURALS EN TIROIDES AUTOIMMUNES

Els pèptids que s'uneixen a MHC-II són de longitud variable, tenen una regió central de 9 aminoàcids que es situa al solc d'unió al pèptid i unes regions laterals (PFR: *peptide flanking residues*) que s'estenen a partir de la regió central cap als extrems C i N terminal. S'ha demostrat que determinats enriquiments en els PFRs resulten de mecanismes cel·lulars relacionats amb el processament d'antigen i no de la unió d'aquestes regions amb l'heterodímer HLA (Godkin, Smith et al. 2001). És possible que les cèl·lules epitelials tiroïdals utilitzin mecanismes diferents per processar i presentar els pèptids que els que utilitzen les APC.

Per estudiar el processament dels pèptids naturals per les cèl·lules tiroïdals vam voler mirar si existia un patró de processament pels extrems C i N-terminal. Es van mirar les 5 posicions anteriors al pèptid i els 10 residus següents, així com el primer i l'últim aminoàcid del pèptid. Les freqüències de cadascun dels aminoàcids en les diferents posicions es van normalitzar respecte la freqüència de cada aminoàcid dins el proteoma. Els resultats es mostren a la figura 38.



La dada més significativa va ser l'elevada freqüència de Lys a les posicions -1 i Rn, que es veia augmentada gairebé 6 vegades respecte al total del proteoma. L'Arg també estava augmentada gairebé 5 vegades a l'última posició del pèptid (Rn). Sembla que la tripsina o un enzim amb el mateix patró de degradació estaria actuant a les tiroides autoimmunes i que tindria importància a l'hora de generar pèptids per classe II. La tripsina és una serin proteasa que trenca les cadenes de proteïnes pel costat carboxil dels aminoàcids Lys i Arg, excepte quan es troben seguits d'una Pro. Aquest enzim té una localització restringida al sistema digestiu i no s'ha demostrat que es secreti en altres parts del cos, per tant hauria de ser un altre enzim amb un patró de restricció semblant.

També s'observava la manca de Pro a la posició -1 i +1 dels extrems dels pèptids i la casi absència en la primera i última posició dels pèptids. Aquests resultats coincideixen amb dades publicades, on es suggereix que la prolina podria actuar com a senyal de parada del processament indicant que aquest aminoàcid, junt amb l'impediment estèric produït per la unió amb el MHC-II podrien protegir el pèptid de la degradació per proteases. Les freqüències de Met a la posició -1 i del Trp a +4 es veien també augmentades.

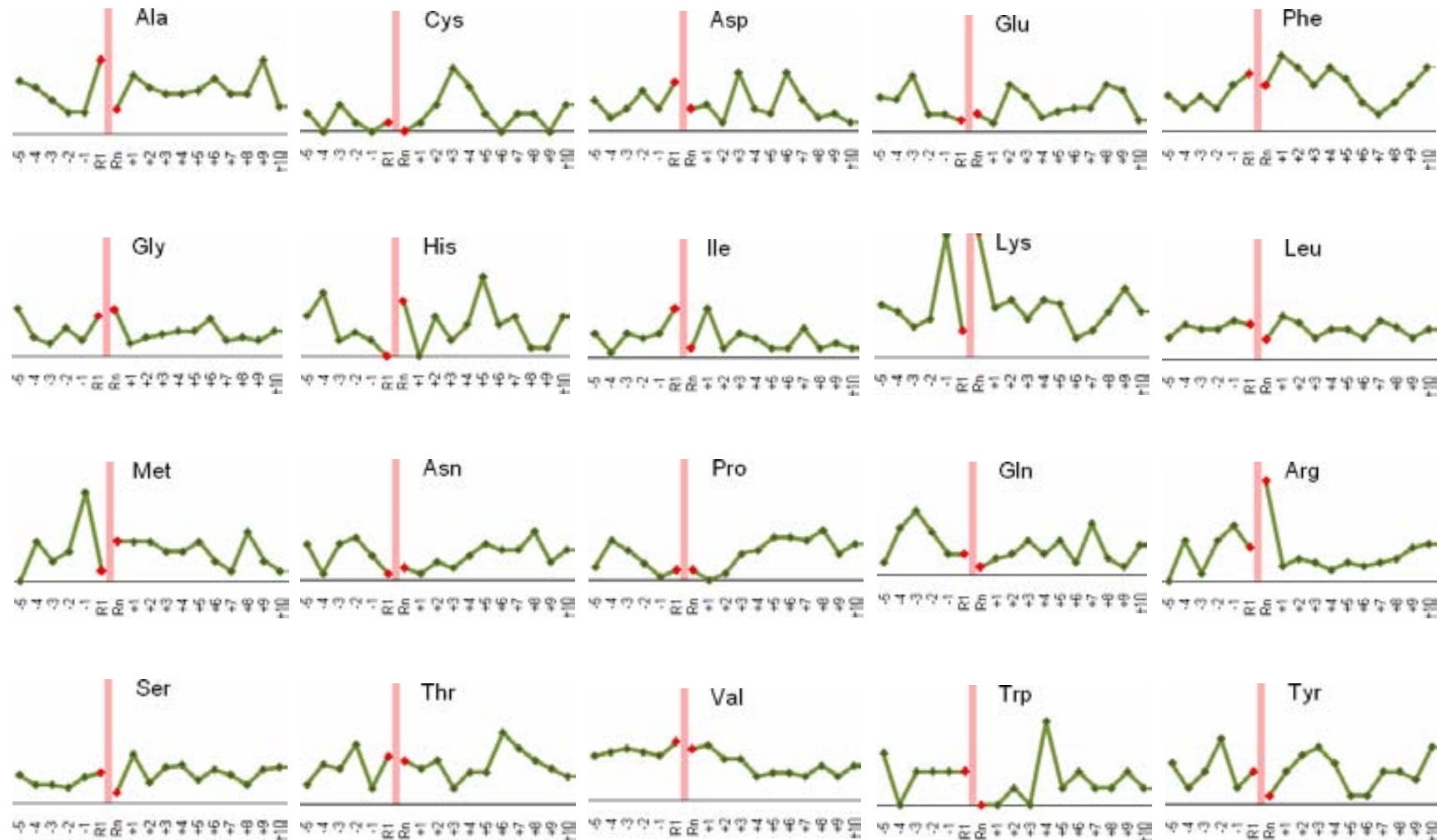


Figura 38: Distribución d'aminoàcids de l'extrem N i C-terminal dels pèptids aïllats de MHC-II de les mostres de tiroides. Per cada extrem es mostren els residus des de la posició -5 a la 10. Les posicions R1 i Rn, marcades en vermell en el gràfic, representen el primer i l'últim aminoàcid del pèptid identificat a les mostres de tiroides.

Un altre fet a destacar era l'elevada presència de pèptids (22%) dels extrems N o C-terminal de la proteïna d'origen (Figura 39). Aquest fet ja s'havia observat en un treball anterior del nostre grup on s'estudiava la influència de les xaperones li i DM en els repertoris peptídics associats a HLA-DR4. En aquest treball, realitzat per la Dra. Aura Muntasell i continuat per la Dra. Montserrat Carrascal, es comparava el repertori peptídic de 4 línees epitelials transfectades amb DR4 i amb combinacions de les xaperones li i DM: DR4, DR4li, DR4DM i DR4liDM. El repertori de la línea cel·lular DR4, a diferència del que passava amb els repertoris de les altres línees transfectades, presentava un percentatge de gairebé 80%, de pèptids dels extrems N i C-terminal de la proteïna d'origen (19 pèptids d'un total de 24 seqüències) (Muntasell, Carrascal et al. 2004). Només un 7% de pèptids dels extrems es trobaven associats a DR4 en la triple transfectant. Aquestes dades feien pensar en un possible mecanisme de processament i transport de pèptids independent de les xaperones en les cèl·lules que no les expressaven. En els tiroides autoimmunes s'ha vist que hi ha expressió de cadena invariant i DM, però que els nivells d'expressió de DM són baixos (Catalfamo, Serradell et al. 1999). Aquest podria ser el motiu pel qual en els tiroides també trobem un elevat nombre de pèptids dels extrems de la proteïna. Un 22% dels pèptids es troben al principi o al final de la proteïna i tot i que el percentatge no és tan elevat com a la línea li⁻DM⁻, els valors són més alts que a les altres transfectants (Taula 19) i molt més que en línies limfoblastoides, segons les dades de DR401 en SYFPEITHY (<1%).

H ₂ N---	P m F I V N T N V P R A S V P D G F L -----	COOH	Factor inhibidor de migració de macròfags
H ₂ N---	P m F I V N T N V P R A S V P D G F L S E -----	COOH	Factor inhibidor de migració de macròfags
H ₂ N---	P m F I V N T N V P R A S V P D G F L S E -----	COOH	Factor inhibidor de migració de macròfags
H ₂ N---	P m F I V N T N V P R A S V P D G F L S E L T Q Q -----	COOH	Factor inhibidor de migració de macròfags
H ₂ N---	V L S P A D K T N V K A A W G K -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	V L S P A D K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M F -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	V H L T P E E K S A V T A L W G K V N V D E V G G E A L G R L L -----	COOH	Hemoglobina cadena β
H ₂ N---	V H L T P E E K S A V T A L W G K V N V D E V G G E A L G R L -----	COOH	Hemoglobina cadena β
H ₂ N---	V H L T P E E K -----	COOH	Hemoglobina cadena β
H ₂ N---	S E T A P A A P A A A P P A E K A P V K K -----	COOH	Histona H1.2
H ₂ N---	S E T A P A A P A A A P P A E K A P V K K K -----	COOH	Histona H1.3
H ₂ N---	S E T A P A A P A A A P P A E K A P V K K K A R -----	COOH	Histona H1.4
H ₂ N---	G R M H A P G K G L S Q S A L P Y R -----	COOH	Proteïna ribosomal 40S S13
H ₂ N---	----- V V D L M A H M A S K E -----	COOH	GAPDH
H ₂ N---	----- D K F L A S V S T V L P S K Y R -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	----- F L A S V S T V L P S K Y R -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	----- A S V S T V L P S K Y R -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	----- R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T S A K -----	COOH	Histona H2B K
H ₂ N---	----- R L L L P G E L A K H A V S E G T K A V T K Y T S A K -----	COOH	Histona H2B
H ₂ N---	----- m L L I P T S F S P L K -----	COOH	proteïna NipSnap4
H ₂ N---	----- I Y T R N T K G G D A P A A G E D A -----	COOH	Proteïna ribosomal 40S S25
H ₂ N---	----- R G N S I I M L E A L E R V -----	COOH	ribonucleoproteïna nuclear petita G
H ₂ N---	----- K T N V K A A W G K V G A H A G E Y G A E A L E R M F L S F P T T K -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	----- A A H L P A E F T P A V H A S L D K F L A S V S T V L T S K Y R -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	----- A A H L P A E F T P A V H A S L D K F L A S V S T V L T S K Y R -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	----- K F L A S V S T V L T S K Y R -----	COOH	Hemoglobina cadena α
H ₂ N---	----- V V A G V A N A L A H K Y H -----	COOH	Hemoglobina cadena β
H ₂ N---	----- S G N F G G S R N M G G P Y G G G N Y G P G S G G S G G Y G G R S R Y -----	COOH	hnRNP A2/B1
H ₂ N---	----- Q V T Q P T V G M N F K T P R G P V -----	COOH	Proteïna ribosomal 40S S17
H ₂ N---	----- A Y V R L A P D Y D A L D V A N K I G I I -----	COOH	Proteïna ribosomal 60S L23a
H ₂ N---	----- T G K N K W F F Q K L R F -----	COOH	Proteïna ribosomal 60S L27
H ₂ N---	----- L S L Q E P G S K T Y S K -----	COOH	Tioglobulina

Figura 39: Pèptids aïllats de tiroides autoimmunes, localitzats en els extrems N i C-terminals de les proteïnes d'origen. Només es mostren aquelles seqüències situades a menys de 10 residus dels extrems. En vermell es mostra la seqüència del pèptid identificat, i en negre els residus que no formen part del pèptid.

Mostra	Nº pèptids totals	Pèptids dels extrems	% d'extrems
DR4	24	19	79.17
DR4 DM	27	2	7.41
DR4 li	18	3	16.67
DR4 li DM	84	6	7.14
Tiroides	162	36	22.22

Taula 19: Nombre de pèptids dels extrems N o C-terminal de la proteïna. Percentatge de pèptids localitzats als extrems de les proteïnes de les línees de cèl·lules transfectades generades per la Dra. Aura Muntasell i de les mostres de tiroides.

Thyroglobulin Peptides Associate In Vivo to HLA-DR in Autoimmune Thyroid Glands¹

Laia Muixí,* Montserrat Carrascal,[†] Iñaki Alvarez,* Xavier Daura,[‡] Mercè Martí,* Maria Pilar Armengol,[§] Clemencia Pinilla,[¶] Joaquín Abian,[‡] Ricardo Pujol-Borrell,[§] and Dolores Jaraquemada^{2*}

Endocrine epithelial cells, targets of the autoimmune response in thyroid and other organ-specific autoimmune diseases, express HLA class II (HLA-II) molecules that are presumably involved in the maintenance and regulation of the in situ autoimmune response. HLA-II molecules thus expressed by thyroid cells have the “compact” conformation and are therefore expected to stably bind autologous peptides. Using a new approach to study in situ T cell responses without the characterization of self-reactive T cells and their specificity, we have identified natural HLA-DR-associated peptides in autoimmune organs that will allow finding peptide-specific T cells in situ. This study reports a first analysis of HLA-DR natural ligands from ex vivo Graves’ disease-affected thyroid tissue. Using mass spectrometry, we identified 162 autologous peptides from HLA-DR-expressing cells, including thyroid follicular cells, with some corresponding to predominant molecules of the thyroid colloid. Most interestingly, eight of the peptides were derived from a major autoantigen, thyroglobulin. In vitro binding identified HLA-DR3 as the allele to which one of these peptides likely associates in vivo. Computer modeling and bioinformatics analysis suggested other HLA-DR alleles for binding of other thyroglobulin peptides. Our data demonstrate that although the HLA-DR-associated peptide pool in autoimmune tissue mostly belongs to abundant ubiquitous proteins, peptides from autoantigens are also associated to HLA-DR in vivo and therefore may well be involved in the maintenance and the regulation of the autoimmune response. *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 795–807.

Class II MHC³ molecules are transmembrane glycoproteins that bind mostly exogenous peptides to be presented to CD4⁺ T lymphocytes. Constitutive expression of HLA-II is restricted to professional APCs such as dendritic cells, macrophages, and B cells. HLA-II expression can be induced in

other cell types in inflammatory conditions as shown in vivo in epithelial cells from various target organs in autoimmune diseases such as autoimmune thyroiditis (1–4).

Human autoimmune thyroid diseases (AITD), such as Hashimoto’s thyroiditis and Graves’ disease (GD), are characterized by T and B cell infiltration of the thyroid gland and an intense immune response to well-characterized thyroid autoantigens such as thyroglobulin (Tg), thyroid peroxidase, and the thyrotropin receptor. Thyroid follicular cells (TFC) are polarized epithelial cells that have a very important endocytic activity in their apical end, from where they endocytose thyroglobulin-rich colloid that is processed to generate thyroid hormones that are released by exocytosis to the capillaries in the basal pole. The expression of HLA-II by TFC in these diseases is well documented (5). In situ dendritic cells, macrophages, and B cells infiltrating the organ also express HLA-II and can process and present self Ags. The importance of nonprofessional APCs such as TFCs in this context is not known, but it is clear that the autoimmune response is modulated by the interaction between cells of the immune system and cells of the target organ, with a strong influence of the local microenvironment, which may determine the formation of tertiary lymphoid tissue (6).

TFCs in Graves’ disease overexpress class I molecules and express ectopic HLA-II, invariant chain, and HLA-DM. The HLA-DM expression level by TFCs is low but sufficient to allow peptide loading into the HLA-II molecules and express stable HLA-II-peptide complexes at the cell surface (7). Thus, HLA-II-expressing epithelial cells in autoimmune diseases could present autoantigens to infiltrating CD4⁺ cells and play a role in the maintenance and/or the regulation of the autoimmune response. Consequently, the antigenic repertoire displayed at the surface of HLA-II-expressing epithelial cells must be relevant to understand

*Immunology Unit, Institut de Biociències i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; [†]Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universitat Autònoma de Barcelona, Proteomics Facility, Institut d’Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona; [‡]Catalan Institution for Research and Advanced Studies and Institut de Biociències i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; [§]Laboratory of Immunobiology for Research and Application to Diagnosis, Blood and Tissue Bank, University Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, and Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; and [¶]Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA 92121

Received for publication September 26, 2006. Accepted for publication April 16, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was funded by the Spanish Ministry of Education Grants SAF2003-08843-C02-01 and SAF00-0131-C02-01. X.D. was supported by the Spanish MEC/FEDER Grant BIO2003-02848. L.M. is a Formación de Personal Investigador fellow of the Spanish Ministry of Education. I.A. was partially funded by the Eurothyroid Integrated European Project LSHB-CT-2003-503410. C.P. was funded by the Multiple Sclerosis National Research Institute.

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Dolores Jaraquemada, Institut de Biociències i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain. E-mail address: dolores.jaraquemada@uab.es

³ Abbreviations used in this paper: HLA-II, HLA class II; AITD, autoimmune thyroid diseases; EAT, experimental autoimmune thyroiditis; EBVP, EBV DNA polymerase; GD, Graves’ disease; HMBP, human myelin basic protein; ITMS, ion trap mass spectroscopy; MHC-II, MHC class II; MS, mass spectroscopy; m/z, mass-to-charge; nESI, nanoelectrospray; rpHPLC, reversed-phase HPLC; TFC, thyroid follicular cells; Tg, thyroglobulin; vMALDI, vacuum MALDI.

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/\$2.00

Table I. *Thyroid glands from GD patients used for the assays*

Sample	Sex	Age (years)	HLA-II Expression ^a	Sample Processed (g)	HLA-II
TB449	F	35	++	25.5	DRB1*0301,1501, DQB1*0201,0602
TB471	F	28	++	15	DRB1*0301,081, DQB1*0201,0402
TB448	F	26	++	8	DRB1*0407,1501, DQB1*0301,0602
TB 270	F	32	+++	3.31	DRB1*0701, DQB1*0202,0303
TB269	F	30	++	2	DRB1*1101,1104, DQB1*0301
TB 237	F	41	+	1.1	DRB1*1501, DQB1*0602
TB190	F	35	++	1	DRB1*1101,1104, DQB1*0301

^a HLA-II expression level in thyroid follicular cells as assessed by flow cytometry and immunofluorescence (see *Materials and Methods*). Expression scores are based on immunofluorescence staining on cryostat sections as follows: +, positive staining in <10% follicles (focal); ++, 10–50% positive follicles (multifocal); +++, >50% positive follicles (generalized) (14).

self-reactive T cell responses in situ. However, other cells in autoimmune thyroid glands also express HLA-II, namely resident and infiltrating dendritic cells, endothelial cells, activated T cells, B cells, and macrophages (5).

Studies characterizing HLA-DR-associated peptides were mostly done using lymphoblastoid cell lines as the source of DR-peptide complexes. They led to the identification of the allele-specific structural motifs common to peptides that associate to most DR and some DQ alleles (8–10). Studying natural DR ligands in other cell types is more difficult, mostly due to low HLA-II expression and limited access to cells. In previous work, we analyzed the peptide repertoire associated to HLA-DR4 molecules expressed by a transfected insulinoma cell line. We detected a heterogeneous pool of self peptides derived from cell surface proteins and proteins from internal cell compartments, including the cytosol and the secretory pathway, some of which corresponded to tissue-specific proteins (11). Although these data were very informative and showed a different pattern from that of DR4-associated peptides from lymphoblastoid cells, this material gave only a very indirect assessment of what the repertoire of peptide ligands occupying the cavity of HLA-II molecules in a real-life autoimmune tissue would be.

Therefore, studies from ex vivo tissue samples are still necessary to gain insight into the real repertoire of DR-associated natural peptides from autoimmune tissue. Little has been done with human tissue, where sample heterozygosity adds to the other difficulties. In the first published work on HLA-DR-peptide purification from human tissue in 1995, 17 peptides were identified from 50 g of the spleen of a patient with rheumatoid arthritis (12). Later, 55 peptides were sequenced from 9 human intestine samples from patients with inflammatory bowel disease (13). Recently, a large number of HLA class II-associated peptides have been identified from primary renal carcinoma samples (14).

In the present report, we describe the characterization of natural peptides bound to HLA-II molecules from thyroid glands of GD patients, using mass spectroscopy (MS) techniques. No cell separation methods were applied and whole tissue from several glands was processed to analyze the HLA-DR-associated peptides. A total of 162 DR ligands from 7 different donors were identified. All peptides complied with the common features of HLA-DR natural ligands: they were variable in length, formed “nested” sets with a common core and varying flanking sequences, and were derived from proteins present in different compartments, including the extracellular milieu, the plasma membrane, vesicular compartments, and the cytosol. Most extracellular peptides were derived from complement factors, extracellular matrix proteins, or colloid components such as albumin. Most interestingly, we were able to identify eight different peptides corresponding to the well-defined thyroid autoantigen thyroglobulin, which is also one of the major com-

ponents of the colloid. Although we cannot be certain that all of these peptides are associated with class II molecules expressed by the thyroid follicular cells and not by other class II-expressing cells, the common presence of colloid components together with the important endocytic activity at the apical end of the TFCs make us think that some of these peptides can indeed be associated to DR molecules expressed by TFCs.

Materials and Methods

Thyroid samples and Abs

Thyroid surgery samples from patients with Graves' disease were used after the patients' informed consent, using a protocol approved by the ethical committees of University Hospitals Germans Trias i Pujol and Vall d'Hebron. Donors were women, 26–41 years of age, and their HLA class II typing was obtained by exon 2 sequencing (Table I). HLA-II expression by TFC was assessed by immunofluorescence staining on cryostat sections and by flow cytometry, as described (5).

Anti-HLA-DR $\alpha\beta$ mouse IgG2a mAb L243 (American Type Culture Collection) and anti-HLA-DR β mouse IgG2b mAb B8.11.2 (kindly provided by Dr. F. Koning, Immunohaematology Department, University of Leiden, Leiden, The Netherlands) were used for affinity chromatography.

Immunoaffinity purification of HLA-II-peptide complexes from autoimmune thyroid and reversed-phase HPLC (rpHPLC) fractionation

A modification of the previously described method (15) was applied. Briefly, frozen thyroid samples were mechanically homogenized with a tissue homogenizer in H buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml pepstatin, and 5 mM iodoacetamide) and resuspended in lysis buffer (H buffer plus 0.5% Nonidet P-40 (Surfact-Amps Nonidet P-40; Cultiect)). HLA-II-peptide complexes from the lysate were purified by affinity chromatography using 1 ml Sepharose bead columns with 5 mg mAb L243. The unretained fraction of sample TB449 was repurified by eluting through a column with mAb B8.11.2, due to the low affinity of L243 for the DR3 molecule. TB471 peptides were purified using the B8.11.2 column directly.

HLA-II-peptide complexes were eluted with trifluoroacetic acid 0.1%, following standard procedures (11). Eluted class II-peptide mixtures were spun through 10-kDa cut-off ultrafiltration filters (Centriprep-10; Millipore) and collected from the flow-through. The low molecular mass fraction containing the peptide pools was separated by rpHPLC using an acetonitrile gradient column (Vydac protein and peptide C18, 2.1 mm $\times$ 25 cm) (15). Chromatographic analysis was monitored at 214-nm UV wavelength. One-minute fractions were collected from minute 20 to 100 and then analyzed by MS.

Peptide sequencing

HPLC fractions were evaporated and redissolved in 5 μ l MeOH/H₂O 1/1, 1% AcOH. The molecular mass of each fraction's components was measured in a MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager-DE PRO, Applied Biosystems) in positive ion reflector mode. Peptide sequences were obtained by electrospray tandem MS using an LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) with a nanospray electrospray ionization (nESI) source (nESI-ion trap MS (ITMS)/MS from Protana A/S, Odense, Denmark), by a MALDI-TOF/TOF in a mass spectrometer (AB 4700 mass

spectrometer, Applied Biosystems), and by vMALDI-MS/MS in an LTQ instrument (Thermo Fisher Scientific).

For nESI-ITMS/MS analysis, 2 μ l of each HPLC fraction was loaded in the nanospray needle. Product ion spectra were obtained by collision-induced dissociation, mainly of the double- and triple-protonated peptide molecules. Precursor masses were selected from the MALDI-TOF data spectra and from the signals observed in the nanospray full MS scan. Isolation windows of 3- and 4-unit widths were used for the MS/MS and MS3 experiments, respectively, and a 25–35% relative collision energy, depending on the charge state of the precursor ion. For MALDI-TOF/TOF analysis, 0.4 μ l of each sample was automatically analyzed: a full scan was done within the mass-to-charge (m/z) range 900–6000, and the four most abundant signals detected over the m/z range 1100–3500 Da were fragmented. For vMALDI-MS/MS analysis, 0.5 μ l of each sample was shot automatically in the Crystal Positioning System mode. Instrument setup was optimized in a data-dependent scan mode as follows: Automatic Spectral Filter parameters were restrictive in the m/z 1200–2500 range, wide band activation was set up for the MS/MS experiments, dynamic exclusion was 1, and 5 MS/MS were acquired for each full MS.

Sequences from the MALDI-TOF/TOF fragmentation spectra were identified using the MASCOT software program (Matrix Science) without protein size or enzyme cleavage site restriction. Using the same parameters, peptide identification from the nESI spectra was done with the MS-Tag (ProteinProspector; Mass Spectrometry Facility, University of California–San Francisco) and Mascot software programs, by comparing the MS/MS spectrum of each peptide with the virtual spectra derived from protein sequences in public databases (Swiss-Prot, European Bioinformatics Institute, Heidelberg, Germany; and GenPept, National Center for Biotechnology Information). The Sequest software (Thermo Fisher Scientific) was used for the vMALDI-MS/MS spectra identification using the parameters described above.

Peptide synthesis

Thyroglobulin and other peptides were synthesized at the Peptide Facility, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.

Peptide-binding assay

HLA-DR3 and HLA-DR15 binding experiments were performed by Pro-Immune[®] using their cell-free class II REVEAL binding assay. A total of 11 peptides (plus 2 overlapping peptides) were tested, including 7 thyroglobulin peptides and others that we could assign to one HLA-DR allele (see Fig. 3). The tests consisted of the detection by a conformational Ab of HLA-DR-peptide complex formation after mixing soluble DR molecules with each peptide. Positive control for DR15 was hCMV pp65 109–123 peptide MSIYVYALPLKMLNI and for DR3, *M. tuberculosis* Ab 85B 14–27, PPSMGRDIKVFQ. Negative control peptides did not show any binding (data not shown), but the reference analysis was done comparing the binding of each peptide to each allele with a known borderline affinity control peptide (score of 100), named pass/fail control binder, and to each positive control peptide. Each experiment was conducted twice at two different dilutions, generating four data points for assembly reaction (peptide/allele). Thus, values between 0 and 100 were considered weak binding and values >100 were considered positive binding.

Modeling of DR-peptide interactions

Modeling the complex between peptide Tg^{726–743} and the HLA-DR51 or HLA-DR15 molecules was performed using a novel simulation protocol (X. Daura, unpublished). The essential aspects are summarized below.

Structures for DR51 and DR15 were obtained from the Protein Data Bank (PDB entries 1H15 and 1BX2). The 1h15.pdb and 1bx2.pdb files contain crystallographic coordinates for the complexes between DR51 and an EBV DNA polymerase (EBVP) peptide and between DR15 and a human myelin basic protein (HMBP) peptide. Initial system configurations included the following atoms: residues Glu²⁸–Thr¹⁰⁵ of DRA1*0101 and Pro³⁴–Arg¹²² of DRB5*0101 and DRB1*1501, and the backbone atoms of residues Val⁶³⁰–His⁶³⁹ of EBVP and Val¹¹³–Thr¹²² of HMBP (residue numbers according to Swiss-Prot). The protocol developed generates the missing peptide atoms via a molecular dynamics slow-growth technique (16) under nonequilibrium conditions, thus transforming a generic 10-residue backbone (EBVP630–639 or HMBP113–122) into the Tg^{726–743} peptide within the binding grooves of DR51 and DR15. Additionally, the method allows the assignment of a relative binding score. The following steps were followed:

1) Analysis of the Tg^{726–743} sequence and the known binding motifs to DR alleles (17) suggested Leu⁷³² as the most probable candidate for binding to P1 in both DR51 and DR15. This alignment was therefore fixed for subsequent modeling of DR/Tg^{726–743} interactions. The following steps were performed in parallel for the DR51 and DR15 alleles.

2) The positions of (missing) Tg^{726–743} backbone and side-chain atoms were assigned by successive addition of a small vector (10^{-4} nm in the x direction) to the coordinates of the closest existing backbone atom.

3) The atoms added in step 2 were defined as dummies in the biomolecular force field of the GROMOS96 simulation package (18). A dummy atom is one that has no interactions with the rest of the system. All other atoms (which we shall call crystallographic) were assigned parameters from the vacuum (45B3) force field (19), which includes shielding of charge-charge interactions in a very crude way to mimic a basic solvent effect. The protonation state of ionizable residues was chosen to mimic a neutral pH.

4) Following equilibration of the system, a nonequilibrium slow-growth molecular dynamics simulation (200 ps) in vacuum at a very low temperature (10 K) was performed. In the course of this simulation the dummy atoms were progressively transformed into regular atoms (i.e., atoms with standard force field parameters) using a soft-core potential to avoid atomic clashes, while the positions of the crystallographic atoms were restrained with a harmonic potential. During the process, the growing atoms (i.e., atoms that were initially dummies) accommodate to the environment under the sole influence of the force field. The simulation delivers the work involved in the transformation (16). To accumulate statistics on the nonequilibrium process, the simulation was repeated 1000 times with different initial velocity distributions.

5) The free-energy change associated to the transformation was estimated by using the following equation (20):

$$\Delta G = -k_B T \ln[\exp(-W/k_B T)]$$

where k_B is Boltzmann's constant, T is the absolute temperature, W is the work, and the brackets denote an average over the 1000 work values. This free-energy difference estimate was taken as a score for binding affinity. Because the transformation affects exactly the same atoms in the two complexes, the scores for DR51/Tg^{726–743} and DR15/Tg^{726–743} can be directly compared.

6) The 1000 model structures obtained for the complex were structurally clustered, using an atom-position root-mean-square difference of 0.1 nm as similarity cutoff for the buried side chains (Leu⁷³², Glu⁷³⁵, Ala⁷³⁷, Phe⁷³⁸, and Arg⁷⁴⁰). The structural variability within the ensemble of 1000 model structures could be thus evaluated. The above equation can then be used to estimate the free energy change for each structural cluster or family (ΔG_{clus}). Here, the brackets denote an average over the work values obtained for the specific cluster.

Note that the estimated free energies do not have a direct connection to the experimental binding free energies. The calculated free energies are associated, strictly, to the creation of residues Cys⁷²⁶–Cys⁷³⁰ and Thr⁷⁴¹–Gln⁷⁴³ and the side chains of residues Gln⁷³¹–Arg⁷⁴⁰ in the binding grooves of DR51 ($\Delta G_{\text{DR51/Tg}^{726-743}}$) and DR15 ($\Delta G_{\text{DR15/Tg}^{726-743}}$) at 10 K and in the absence of solvent effects. Additionally, 1000 simulations may not suffice to guarantee convergence of ΔG . Nevertheless, we make the plausible hypothesis that the sign of the difference $\Delta G_{51-15} = \Delta G_{\text{DR51/Tg}^{726-743}} - \Delta G_{\text{DR15/Tg}^{726-743}}$ is equal to the sign of the difference between the experimental binding free energies. That is, we assume that the free energy change involved in the creation of this set of atoms of Tg^{726–743} in the binding groove of DR51 and DR15, under the specified conditions, is correlated with the binding affinities of Tg^{726–743} for the two molecules.

Results

Description of peptides isolated from GD thyroid glands

A total of 150 peptide sequences were obtained from DR molecules isolated from three GD thyroid samples: TB448 (8 g, 19 sequences), TB449 (25.5 g, 61 sequences), and TB471 (15 g, 70 sequences). Of the 19 TB448 peptides, 11 were sequenced by nESI, 6 by MALDI-TOF/TOF, and 2 were obtained using both techniques. Similarly, 47 of 61 TB449 peptides were sequenced by nESI, 5 by MALDI-TOF/TOF, and 9 by both. Of the 70 peptides from TB471, 49 were sequenced by nESI, 7 by MALDI-TOF/TOF, and 10 by vMALDI. Some peptides were detected by all three methods. A summary of the sequences obtained and their characteristics is shown in Table II.

Table II. Peptide sequences obtained from three thyroid samples from GD patients

M_r (Da) ^a	Size ^b (aa)	PPPPPPPP ^c 123456789	Allele Assigned ^d	% Affinity Index ^e	Promiscuity ^f	Source Protein ^g	Id No. ^h	L ⁱ
Sample: TB448 (DRB1*1501, DRB5*0101/DRB1*0407, DRB4*0103)								
1770.0	15	DIPELVNMGQWKIRA	DRB1*1501	41.84	27/51	Complement C3 (194–208)	P01024	E
1594.0	15	AAGLLSTYRAFLSSH	DRB1*1501	33.67	2/51	Collagen α 1 chain (XV) (1243–1257)	P39059	EM
1522.8	14	AGLLSTYRAFLSSH	DRB1*1501	33.67	2/51	Collagen α 1 chain (XV) (1244–1257)	P39059	EM
1687.0	13	LKKYLYEIAARRHP	DRB1*1501	33.67	6/51	Serum albumin (159–171)	P02768	Co
2014.2	16	YPKSLHMYANRLDHR	DRB1*1501	55.10	19/51	Apolipoprotein B (1200–1215)	P04114	E
1629.8	15	DVGVRVAVTQGRPD	DRB5*0101	68.37	7/51	QDB1*0602 β -chain (75–89)	P03992	M
1676.8	15	DVGVRVAVTELGRPD	DRB5*0101	44.90	3/51	HLA II β -chain DRB1*4 (72–86)	P13760	M
1633.0	15	GGEELRFTVTQRSPQG	DRB5*0101	29.59	39/51	Heparan sulfate proteoglycan (1006–1020)	P98160	EM
1795.0	16	YGGEELRFTVTQRSPQG	DRB5*0101	29.59	39/51	Heparan sulfate proteoglycan (1005–1020)	P98160	EM
1660.8	14	YDHNFKAINAIQK	DRB5*0101	54.08	19/51	Cathepsin C (170–183)	P53634	Cv
1661.0	16	RLPIIDVAPLDVGAPD	DRB5*0101	13.27 (LB)	7/51	Collagen α 1 chain (I) C-term propeptide (1436–1451)	P02452	EM
2030.0	18	CPTPCQLQAEQAFRLRTVQ	DRB5*0101	29.59	2/51	Thyroglobulin (726–743)	P01266	Co
1678.9	12	REIFNMARQSR	DRB5*0101	46.94	30/51	Apolipoprotein B (427–439)	P04114	E
1720.0	16	IRASYAQQPAESRVSG	DRB1*0407	ND	0/51	Heparan sulfate proteoglycan (1089–1104)	P98160	EM
1827.0	16	NIFSFLYSLRDPDAQPG	DRB1*0407	ND	3/51	Cathepsin D (227–241)	P07339	Cv
1863.0	16	RPKDYEVDA TLKSLNN	DRB1*0407	ND	15/51	Collagen α 2 chain (I) C-term propeptide (1129–1144)	P08123	EM
1613.8	15	KPGQFIRSVDPDSPA	DRB1*0407	ND	0/51	NHERF (174–188)	O14745	C
1449.8	12	EDFRDGLKMLLL	DRB1*0407	ND	3/51	α -Actinin 1 (57–68) or α -Actinin 4 (76–87)	P12814	C
1895.1	16	DVPKWISIMTERSVPH	DRB1*0407	ND	19/51	Annexin II (208–223)	P07335	EM
Sample: TB449 (DRB1*1501, DRB5*0101/DRB1*0301, DRB3*0101)								
1362.7	12	VVDLMAHMASKE	DRB1*1501	19.39 (LB)	5/51	GAPDH (324–335)	NP002037	C
1763.8	14	LISWYDNEFGYSNR	DRB1*1501	16.33 (LB)	0/51	GAPDH (310–323)	NP002037	C
1650.2	13	ISWYDNEFGYSNR	DRB1*1501	16.33 (LB)	0/51	GAPDH (311–323)	NP002037	C
1779.2	14	LISWYDNEFGYSNR	DRB1*1501	16.33 (LB)	0/51	GAPDH (310–323)	NP002037	C
1274.6	10	LLVVPWTQR	DRB1*1501	39.80	21/51	Hemoglobin δ -chain (31–40)	P02042	E
1308.2	10	LLVVPWTQRF	DRB1*1501	39.80	21/51	Hemoglobin δ -chain (32–41)	P02042	E
1421.8	11	LLVVPWTQRF	DRB1*1501	39.80	21/51	Hemoglobin δ -chain (31–41)	P02042	E
2301.3	22	LVTLAHLTAFTPAVHASLKD	DRB1*1501	24.49 (LB)	7/51	Hemoglobin α -chain (106–127)	P69905	E
1687.0	13	LKKYLYEIAARRHP	DRB1*1501	33.67	6/51	Serum albumin (159–171)	P02768	Co
1567.0	15	TNVPPEVTVLINSVP	DRB1*1501	23.47 (LB)	3/51	HLA-II, DR α -chain (108–122)	P01903	M
1690.9	15	GNRIAQWQSFQLEGG	DRB1*1501	29.60	1/51	α -2-macroglobulin (172–186)	P01023	E
1633.9	14	GNRIAQWQSFQLEG	DRB1*1501	29.60	1/51	α -2-macroglobulin (172–185)	P01023	E
1522.8	14	AGLSTYRAFLSSH	DRB1*1501	33.67	2/51	Collagen α -1 (XV) chain (1244–1257)	P39059	EM
1593.6	15	AAGLSTYRAFLSSH	DRB1*1501	33.67	2/51	Collagen α -1 (XV) chain (1243–1257)	P39059	EM
1521.0	13	DGVIKVFNMDMKVR	DRB1*1501	57.10	3/51	Cofilin, non-muscle isoform (Cofilin-1) (8–20)	P23528	C
1310.8	10	WRLEEFGRFA	DRB5*0101	20.41 (LB)	0/51	HLA-II, DR α -chain (68–76)	P01903	M
1409.8	11	VWRLEEFGRFA	DRB5*0101	22.45 (LB)	1/51	HLA-II, DR α -chain (67–76)	P01903	M
1687.1	16	RVMITAPGLFGTPLL	DRB5*0101	34.69	4/51	3-Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase type II (192–207)	Q99714	C
1815.0	16	DKFLASVSTVLPSKYR	DRB5*0101	16.33 (LB)	4/51	Hemoglobin α -chain (126–141)	P69905	E
1571.6	14	FLASVSTVLPSKYR	DRB5*0101	16.33 (LB)	4/51	Hemoglobin α -chain (128–141)	P69905	E
1600.9	14	RGNSTIMLEALERV	DRB5*0101	53.06	29/51	Small nuclear ribonucleoprotein G (63–76)	Q15357	N
1857.0	16	IGSSYFPEHGYFRAPE	DRB5*0101	32.7	2/51	Multimerin 2 (851–866)	Q9H8L6	EM
1728.1	15	QLQPDNSTLTWVKPT	DRB1*0301	32.63	7/51	Phospholipase C (883–897)	Q9HBX6	M
1914.4	18	IVNTNVPASVDPDGLSE	DRB1*0301	36.84	23/51	Macrophage migration inhibitory factor (5–22)	P14174	E
2245.3	21	LAQATGKPPQYIAHVVPDQL	DRB1*0301	23.16 (LB)	11/51	Macrophage migration inhibitory factor (27–47)	P14174	E
2305.6	21	PmFIVNTNVPASVDPDGLSE	DRB1*0301	36.84	32/51	Macrophage migration inhibitory factor (2–22)	P14174	E
2089.6	19	PmFIVNTNVPASVDPDGL	DRB1*0301	36.84	32/51	Macrophage migration inhibitory factor (2–20)	P14174	E
2384.6	22	IVNTNVPASVDPDGLSELTQQ	DRB1*0301	36.84	23/51	Macrophage migration inhibitory factor (5–26)	P14174	E
1362.4	12	MLLIPTSFSPK	DRB1*0301	47.05	30/51	NipSnap4 protein (236–247)	Q9UFN0	C
1744.0	16	WLRNGKPVTTGVSETV	DRB1*0301	35.79	12/51	HLA-II, DR α -chain (146–161)	P01903	M
1845.1	17	TWLRNGKPVTTGVSETV	DRB1*0301	35.79	12/51	HLA-II, DR α -chain (145–161)	P01903	M
1489.0	14	EDIVADHVASYGVN	DRB1*0301	62.11	12/51	HLA-II, DQ(2,6,3) α -chain (24–37)	P04226	M
1937.1	15	EQFVVDLKKKETVWH	DRB1*0301	35.76	10/51	MHC-II (61–75)	Q95HB9	M
1730.9	15	FDPFIIDRHGGYKPS	DRB1*0301	26.30	0/51	Creatine kinase, B chain (B-CK) (89–103)	P12277	C
1643.8	14	FDPFIIDRHGGYKPS	DRB1*0301	26.30	0/51	Creatine kinase, B chain (B-CK) (89–102)	P12277	C
1919.3	18	RLLLPGLAKHAVSEGTEK	DRB1*0301	17.58 (LB)	0/51	Histone H2B K (99–116)	P62807	N
1416.9	13	RLLLPGLAKHAV	DRB1*0301	17.58 (LB)	0/51	Histone H2B (99–111)	P62807	N
2031.2	19	AFTPEGERLIGDAAKNLQ	DRB1*0301	26.32	5/51	BIP (67–85)	P11021	ER
1670.0	15	LSSVVVDPSIRHFDV	DRB1*0301	49.47	16/51	Thyroglobulin (2098–2112)	P01266	Co
2043.2	23	TGGASGLGLATAERLVQGASAV	DRB1*0301	28.11	4/51	3-Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase type II (16–38)	Q99714	C
1530.4	14	GTLIIRDVKESDQ	DRB1*0301	48.42	34/51	Heparan sulfate proteoglycan (462–475)	P98160	EM
1626.9	14	KEYFAIDNSGRIIT	DRB1*0301	35.79	10/51	Cadherin-5 (197–210)	P33151	M
1684.0	15	GKEYFAIDNSGRIIT	DRB1*0301	35.79	10/51	Cadherin-5 (196–210)	P33151	M
1171.6	11	VLSPADKTNV	DRB1*0301	15.79 (LB)	0/51	Hemoglobin α -chain (1–11)	P69905	E
1504.9	13	RYSVDIPLDKTVV	DRB1*0301	21.05 (LB)	6/51	60S Ribosomal protein L27	P61353	C
1175.7	10	FLENVIRDAV	NA	NA	0/51	Histone H4 (61–70)	P62805	N

(Table continues)

Table II. (Continued)

M _r (Da) ^a	Size ^b (aa)		Allele Assigned ^d	% Affinity Index ^e	Promiscuity ^f	Source Protein ^g	Id No. ^h	L ⁱ
1442.8	14	SRAGLELGAEPTI	NA		0/51	Nidogen-2 (NID-2) (1167–1180)	Q14112	EM
1733.9	15	GELEKEEAQPIVTKY	NA		0/51	Hypothetical protein (490–504)	Q8N3B3	
1397.7	12	RFDSVDVGEFRAV	NA		0/51	HLA-II, DR, DP DQ β-chain (68–79)	P01911	M
1257.6	11	FDSVDVGEYRAV	NA		0/51	HLA-II, DRB3-1 β-chain (69–79)	P79483	M
1807.0	18	IYTRNTKGGDAPAGEDA	NA		6/51	Ribosomal protein S25 (108–125)	P62851	C
1714.4	16	AVPSPPPASPRSQYNF	NA		0/51	Serine protease (134–149)	O43464	C
2013.4	19	AVPSPPPASPRSQYNFIAD	NA		0/51	Serine protease (134–152)	O43464	C
1311.6	12	ASVSTVLPSKYR	NA		4/51	Hemoglobin α-chain (130–141)	P69905	E
1735.8	14	SWYDNEFGYSNRVV	NA		0/51	GAPDH (312–325)	P04406	C
1631.9	16	SWNSGALTSQVHTFFPA	NA		0/51	Ig γ-1 chain C (40–55)	P08157	E
1637.6	18	AKVAVLGASGGIGQPLSL	NA		0/51	Malate dehydrogenase (25–42)	P40926	mit
2167.3	19	LLTEAPLNPKANREKMTQI	NA		3/51	Actin (106–124)	P63261	C
1296.7	10	DRVYIHPFHL	NA		0/51	Angiotensin α (34–43)	ANHU	E
1543.8	13	DTNADKQLSFEEF	NA		0/51	Calgranulin B (67–79)	P06702	C
1004.6	9	IKEESKTAV	NA		0/51	CENP-F kinetochore protein (2346–2354)	P49454	N
Sample: TB471 (DRB1*0301, DRB3*0101/DRB1*0801)								
3274.66	31	VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDDEVGGEALGRL	DRB1*0301	48.42	3/51	Hemoglobin β-chain (1–31)	P02023	E
3387.83	32	VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDDEVGGEALGRL	DRB1*0301	48.42	3/51	Hemoglobin β-chain (1–32)	P02023	E
1308.63	10	LVVYFWQRF	DRB1*0301	36.84	12/51	Hemoglobin β-chain (32–41)	P02042	E
1956.92	18	QVTQPTVGMNFKTPRGPV	DRB1*0301	40	18/51	40S ribosomal protein S17 (107–134)	P08708	C
1470.73	12	YYKVDENGKISR	DRB1*0301	31.58	8/51	40S ribosomal protein 27 (29–40)	P62979	C
1905.95	16	AHLILRLDTKTYMLAF	DRB1*0301	66.32	26/51	α-1 acid glycoprotein (117–132)	P02763	E
1758.92	15	AHLILRLDTKTYMLA	DRB1*0301	66.32	26/51	α-1 acid glycoprotein (117–131)	P02763	E
1374.6	13	KAVLTIDEKGTEA	DRB1*0301	51.58	5/51	α-1-antitrypsin (359–371)	P01009	E
1501.8	15	KAVLTIDEKGTEAAG	DRB1*0301	51.58	5/51	α-1-antitrypsin (359–373)	P01009	E
1737.6	17	VHKAVLTIDEKGTEAAG	DRB1*0301	51.58	5/51	α-1-antitrypsin (357–373)	P01009	E
1774.09	15	KVKKIYLDKRLLAG	DRB1*0301	48	12/51	SPARC-like protein 1 (556–570)	Q14515	E
1683.87	15	GKEYFALDNGSRIIT	DRB1*0301	35.79	11/51	VE-cadherin (196–210)	P33151	M
1915.05	18	DPSPSPVLGKIVYKPVG	DRB1*0301	42.11	23/51	Collagen α-1 type XII (2137–2154)	Q5VYK1	EM
1765.8	15	EGLTQMKKNAEELK	DRB1*0801	65.1	17/51	Apolipoprotein A-IV (239–253)	P06727	E
1636.78	14	GLTFQMKKNAEELK	DRB1*0801	65.1	17/51	Apolipoprotein A-IV (240–253)	P06727	E
1395.6	12	GLTFQMKKNAEE	DRB1*0801	65.1	17/51	Apolipoprotein A-IV (240–251)	P06727	E
1893.97	17	AYVRLAPDYDALDVANK	DRB1*0801	30.23	8/51	60S ribosomal protein L23a (136–152)	P62750	C
1609.8	14	SVPRYLPANPDE	DRB1*0801	38.37	7/51	Epithelial-cadherin (793–806)	P12830	M
1970.94	18	QVDQFLGVPYAAAPLAER	DRB1*0301	15.79 (LB)	0/51	Thyroglobulin (2224–2241)	P01266	Co
1059.4	10	LSLQEPGSKT	DRB1*0301	11.58 (LB)	2/51	Thyroglobulin (2756–2765)	P01266	Co
1448.71	14	VVAGVANALAHKYH	DRB1*0301	26.00 (LB)	9/51	Hemoglobin β-chain (133–146)	68871/P0204	E
1683.91	16	VLSPADKTNVKAAGWK	DRB1*0301	15.79 (LB)	0/51	Hemoglobin α-chain (1–16)	P01922	E
13196.9	31	VLSPADKTNVKAAGWKVGAHAGEYGAEALER	DRB1*0301	15.79 (LB)	2/51	Hemoglobin α-chain (1–31)	P01922	E
3327.44	32	VLSPADKTNVKAAGWKVGAHAGEYGAEALER	DRB1*0301	15.79 (LB)		Hemoglobin α-chain (1–32)	P01922	E
3344.8	32	VLSPADKTNVKAAGWKVGAHAGEYGAEALERm	DRB1*0301	15.79 (LB)	2/51	Hemoglobin α-chain (1–32)	P01922	E
3473.61	33	VLSPADKTNVKAAGWKVGAHAGEYGAEALERMF	DRB1*0301	15.79 (LB)	2/51	Hemoglobin α-chain (1–33)	P01922	E
2582.24	24	VGAHAGEYGAEALERMFSPPTTK	DRB1*0301	28.42 (LB)	6/51	Hemoglobin α-chain (17–40)	P01922	E
1324.49	12	LTPPAVVSERLK	DRB1*0301	21.79 (LB)	0/51	40S ribosomal protein S25 (67–78)	P62851	C
1925.95	18	GRMHAPGKGLSQSALPYR	DRB1*0301	24.21 (LB)	0/51	40S ribosomal protein S13 (1–18)	P62277	C
1709.88	16	TGAAPLIDVRSYGYYK	DRB1*0301	12.32 (LB)	0/51	60S ribosomal protein L27α (94–109)	P46776	C
1688.6	16	ASGNATYISHNPTK	DRB1*0301	14.74 (LB)	0/51	60S ribosomal protein L8 (128–143)	P62917	C
1457.6	15	AGNLGGGVVTIERSK	DRB1*0301	21.05 (LB)	0/51	60S ribosomal protein L22 (52–66)	P35268	C
2094.02	18	SYELPDGQVITIGNERFR	DRB1*0301	17.89 (LB)	2/51	Actin (α, β, γ) (239–256)	P60709	C
1161.4	11	EITALAPSTMK	DRB1*0301	17.58 (LB)	0/51	Actin (α, β, γ) (316–326)	P60709	C
1886.93	17	GTQCKIVDLVKELDRDT	DRB1*0301	13.68 (LB)	0/51	α-1 antitrypsin (188–204)	P01009	E
1829.9	16	TQCKIVDLVKELDRDT	DRB1*0301	13.68 (LB)	0/51	α-1 antitrypsin (189–204)	P01009	E
1613.86	14	TQCKIVDLVKELDR	DRB1*0301	13.68 (LB)	0/51	α-1 antitrypsin (189–202)	P01009	E
2953.23	33	SGNFGRSRNMGPGYGGNGYGGSGGGSGGYGGR	DRB1*0301	14.74 (LB)	4/51	hnRNP A2/B1 (318–350)	P22626	N
1739.83	18	DGRGALQNIIPASTGAAK	DRB1*0301	24.21 (LB)	2/51	GAPDH (197–214)	P04406	C
3095.54	29	AAWGKVGGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTK	DRB1*0801	28.42 (LB)	7/51	Hemoglobin α-chain (12–40)	P01922	E
2690.51	23	AVTELGRPDAYWNSQKDLLEQK	NA		0/51	MHC-II (78–100)	P13760	M
2755.38	24	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVK	NA		6/51	Hemoglobin α-chain (33–56)	P01922	E
3262.68	29	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	NA		6/51	Hemoglobin α-chain (33–61)	P01922	E
3134.58	28	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGK	NA		6/51	Hemoglobin α-chain (33–60)	P01922	E
1833.69	16	TYFPHFDLSHGSAQVK	NA		0/51	Hemoglobin α-chain (41–56)	P01922	E
2341.18	21	TYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	NA		0/51	Hemoglobin α-chain (41–61)	P01922	E
2996.49	29	VADALTNVAHVDMNPALSDLSLHAAK	NA		3/51	Hemoglobin α-chain (62–90)	P01922	E
3427.86	32	AAHLPAEFTPAVHASLKDFLASVSTVLTSKYR	NA		3/51	Hemoglobin α-chain (110–141)	P01922	E
2792.50	27	AAHLPAEFTPAVHASLKDFLASVSTVL	NA		3/51	Hemoglobin α-chain (110–136)	P01922	E
1699.97	15	KFLASVSTVLTSKYR	NA		4/51	Hemoglobin α-chain (127–141)	P01922	E
2846.44	24	AVTELGRPDAYWNSQKDLLEQKR	NA		0/51	HLA-II, DRB1–4 β-chain (78–101)	P13760	M
2744.39	26	KTNVKAAGWKVGAHAGEYGAEALER	NA		2/51	Hemoglobin α-chain (7–32)	P01922	E
2174.04	21	AAWGKVGGAHAGEYGAEALER	NA		2/51	Hemoglobin α-chain (12–32)	P01922	E
1998.98	20	PAAPAAAPPAEKAPVKKAR	NA		0/51	Histone H1.4 (histone H1b) (5–24)	P10412	N
2044	21	SETAPAAAPPAEKAPVKK	NA		0/51	Histone H1.2 (1–21)	P16403	N
2171.8	22	SETAPAAAPPAEKAPVKKK	NA		0/51	Histone H1.2 (1–22)	P16403	N
1331.73	15	GAPAAATAPAPTAHK	NA		0/51	Histone H1 (129–143)	Q92522	N
1511.66	12	AKFEELNMDLFR	NA		0/51	BIP protein (325–336)	P11021	ER
1274.4	12	IGSSQDDGLINR	NA		0/51	Thyroglobulin (2508–2519)	P01266	Co
1220.52	11	SRTSGLLSSWK	NA		0/51	Thyroglobulin (1080–1090)	P01266	Co
1880.78	17	AKAVKQFEESQGRSSK	NA		0/51	Thyroglobulin (2520–2536)	P01266	Co
1477.69	13	AKAVKQFEESQGR	NA		0/51	Thyroglobulin (2520–2532)	P01266	Co
952.4	8	VHLTPEEK	NA		0/51	Hemoglobin β-chain (1–8)	P02023	E
2139.11	20	FESFGDLSTPDVVMGNPKVK	NA		1/51	Hemoglobin β-chain (42–61)	P68871	E
1910.88	18	FESFGDLSTPDVVMGNPK	NA		1/51	Hemoglobin β-chain (42–59)	P68871	E
1528.2	15	VGAHAGEYGAEALER	NA		0/51	Hemoglobin α-chain (17–31)	P01922	E
1214.6	11	TVDGPSGLKLR	NA		0/51	GAPDH (186–196)	P04406	C
1087.5	9	LRVDVNFVK	NA		4/51	Hemoglobin α-chain (91–99)	P01922	E

(Table continues)

Table II. (Continued)

Size ^b <i>M_r</i> (Da) ^a (aa)	PPPPPPPP ^c 123456789	Allele Assigned ^d	% Affinity Index ^e	Promiscuity ^f	Source Protein ^g	Id No. ^h	L ⁱ
1059.51 8	IPDWFLNR	NA		0/51	40S ribosomal protein S18 (79–86)	P62269	C
1699.85 13	TGKNKWFFQKLRF	NA		0/51	60S ribosomal protein L27 (123–135)	P61353	C

^a Molecular weight.
^b Length in amino acid number.
^c DR motif core P1-P9, sequences aligned according to their anchor position P1 when known, anchor positions in bold.
^d HLA allele to which each sequence was assigned.
^e ProPred % affinity index: LB, low binder, peptides with low binding capacity or without a correct P1 residue. NA, not assigned. ND, not done.
^f Ratio between the number of alleles to which peptides are good binders and the total number of HLA molecules analyzed. We considered good binders peptides with correct P1 residue for the corresponding allele and with a theoretical affinity score over 25%.
^g The source protein with position of each peptide in parentheses.
^h Database sequence identification number.
ⁱ Subcellular location of the source protein: EM, extracellular matrix; E, exogenous; C, cytoplasmic; Co, colloid; Cv, cytoplasmic vesicula; M, plasma membrane; N, nucleus; ER, endoplasmic reticulum; mit, mitochondria.

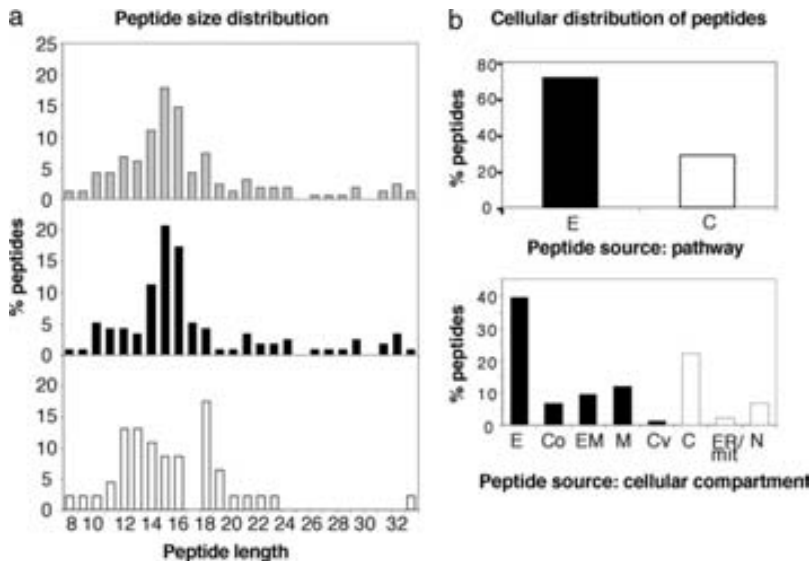
All peptides were autologous, as expected from the starting material, thus confirming the absence of contamination from other sources. Peptide size ranged between 9 and 33 aa length, most of them (76.6%) 12–22 aa, the standard class II size range (Fig. 1a). The mean molecular mass was 1837.6 Da (952.4–3473.6 Da). Fig. 1b shows the cellular distribution of the DR-associated peptides in two groups: peptides expected to be generated by degradation in the endocytic pathway (E) or in the cytosol (C). The size distribution (Fig. 1a) of endocytic peptides was within the standard, although it included some small (9–12 aa) and very large (23–33 aa) peptides, whereas the size of “cytosolic” peptides was more heterogeneously distributed.

Endocytic peptides were the most abundant, but 46 (30%) peptides were derived from proteins potentially degraded in the cytosol, including nuclear proteins. Of 150 DR ligands identified, 103 were “endocytic”, of which 10 were derived from colloid components. One sequence from TB448, one from TB449, and six different ones from TB471 belonged to the major component of the colloid, thyroglobulin, a thyroid-specific protein known as a target autoantigen in autoimmune thyroid diseases. As a confirmation of these sequences, all seven peptides were synthesized and their MS spectra compared with those obtained from the thyroid samples (see Fig. 2). Albumin peptides were also found: albumin is ubiquitous but is also the most abundant protein in the thyroid colloid after the thyroglobulin (21). Of the remaining endocytic peptides, 14 derived

from extracellular matrix proteins, 18 from membrane proteins, and 46 from soluble serum proteins. Many of these peptides derived from hemoglobin, known also to be abundant in the colloid in hyperplastic thyroids. Additionally, there were two peptides from vesicular resident proteins, both derived from cathepsins, very abundant proteases in the TFC endocytic vesicles. Peptides putatively generated by degradation in the cytosol were: 10 nuclear, 2 from the endoplasmic reticulum, 1 from mitochondria, and 33 cytosolic peptides. Only one sequence was not identified in the database.

Analyzing the peptides sequenced from TB448, TB449, and TB471 eluates, the patterns were very similar (Table II). Membrane peptides derived mostly from HLA-II proteins, 2 in TB448, 9 of 12 in TB449, and 2 of 4 in TB471. Endocytic peptides derived from cathepsins, extracellular matrix proteins like heparan sulfate proteoglycan, nidogen-2, multimerin, or collagen; from serum proteins C3 or apolipoprotein B; from albumin, angiotensin, or α -2-macroglobulin; or from the C chain of Ig γ -1. A large number of hemoglobin peptides were identified from TB471. In all samples, colloid peptides from albumin and thyroglobulin were sequenced. A large number of cytosolic peptides belonging to a heterogeneous set of proteins were also identified. Peptides derived from GAPDH, NHERF (Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor), a serine protease, several ribosomal proteins, the enzyme creatine kinase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II, calgranulin B, NipSnap4, actin, the actin-binding protein cofilin-1 and α -actinin,

FIGURE 1. Location and size analysis of peptides sequenced from thyroid samples TB448, TB449, and TB471. *a*, Peptide size distribution of TB448 and TB449 peptides: all peptides (hatched bars) and peptides putatively generated in the endocytic pathway (filled bars) or in the cytosolic pathway (open bars). *b*, *Top*, cellular distribution of the peptides’ source proteins: E proteins from the endocytic pathway (filled bars) and C, from the cytosolic pathway (open bars); *bottom*, each group on the top was analyzed according to their intracellular localization: filled bars, E peptides; open bars, C peptides; E, exogenous; Co, colloid; EM, extracellular matrix; M, cellular membrane; Cv, vesicles; C, cytosol; ER/mit, endoplasmic reticulum or mitochondria; N, nucleus.



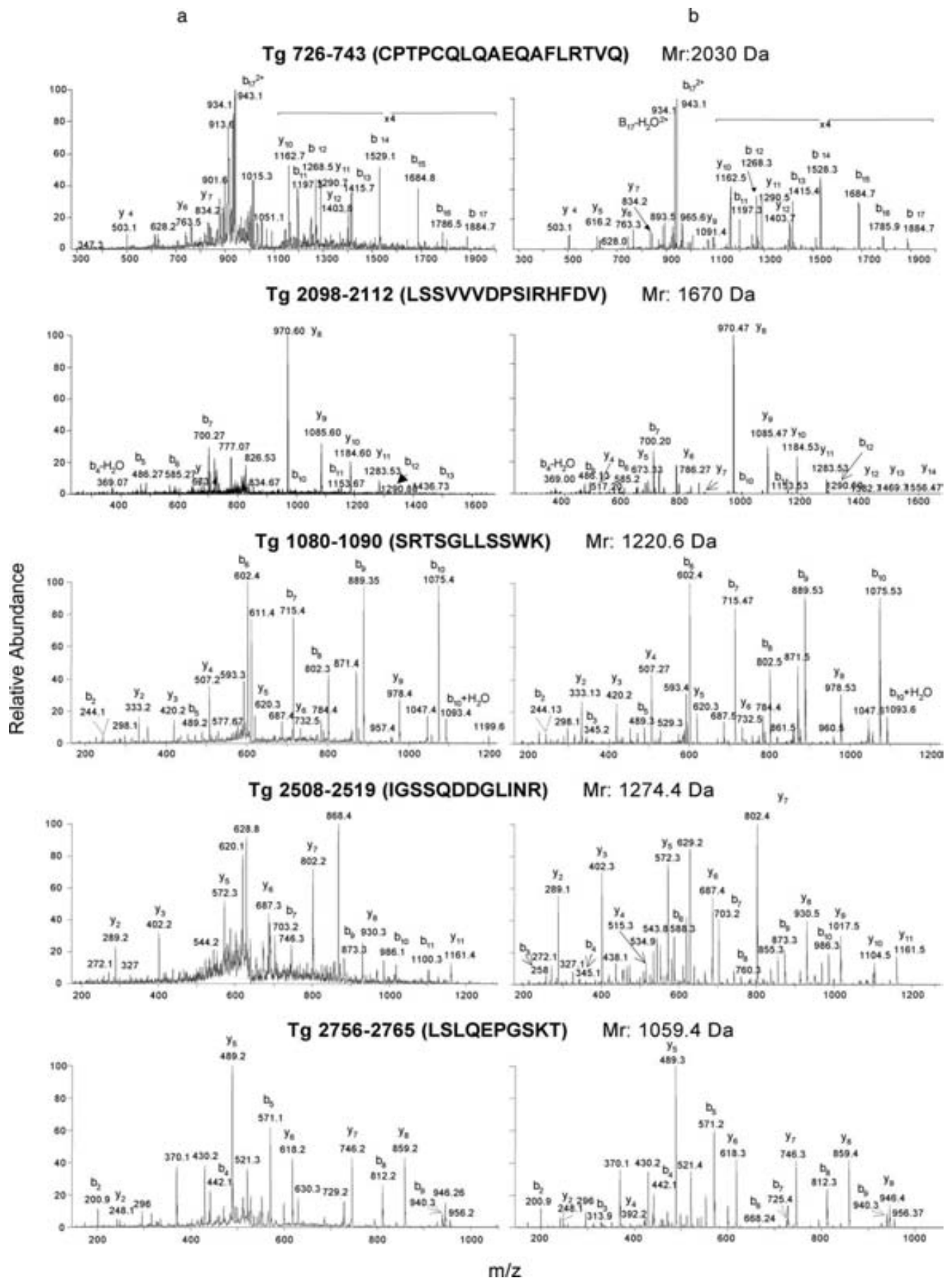
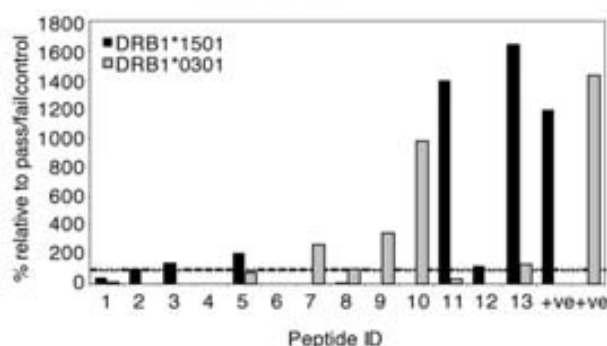


FIGURE 2. Fragmentation spectra comparison of five natural and synthetic thyroglobulin peptides. Spectra corresponding to (a) natural peptides and (b) synthetic peptides. All spectra were obtained by mass spectrometry with an ion trap coupled to a nanoelectrospray source (nESI-ITMS/MS).

FIGURE 3. Peptide binding assay. List of peptides, source protein, and binding data against alleles DR15 (DRB1*1501) and DR3 (DRB1*0301). The data are also shown as a bar graph. All thyroglobulin peptides isolated were tested (peptides 1–9), as were other peptides that had been theoretically assigned to one DR allele (peptides 10–13). Binding data are expressed as the percentage binding compared with a low-binder peptide (pass/fail, see *Materials and Methods*). Most of the thyroglobulin peptides could not be assigned to any allele, except for Tg^{726–743} to DR51 and Tg^{2098–2112} to DR3. Only the latter could be tested and confirmed as a medium binder to DR3. The alleles assigned to peptides 10, 11, and 15 were also confirmed. Assignment to DR51 could not be confirmed because this allele is not available for binding.

ID	Sequence	size	Source Protein	thyroid gland	Allele Assigned**	Binding Data	
						DR15	DR3
1	AKAVKQFEESQGR	13	Thyroglobulin (2520-2532)	TB471	NA	41	16.4
2	QVDQFLGVYAAPPLAE	17	Thyroglobulin (2224-2240)	TB471	NA	104.4	0
3	VDQFLGVYAAPPLAER	17	Thyroglobulin (2225-2241)	TB471	NA	143	0
4	IGSSQDDGLNR	12	Thyroglobulin (2508-2519)	TB471	NA	0	0
5	SRTSGLSSWK	11	Thyroglobulin (1080-1090)	TB471	NA	216.7	75.1
6	LSLQEPGSKT	10	Thyroglobulin (2756-2765)	TB471	NA	0	0
7	CPTPCQLGAQEAFLRTV	17	Thyroglobulin (726-742)	TB448	DRB5*0101	0	270.8
8	PTPCQLGAQEAFLRTVQ	17	Thyroglobulin (727-743)	TB448	DRB5*0101	13.6	101.9
9	LSSVVVDPSIRHFDV	15	Thyroglobulin (2098-2112)	TB449	DRB1*0301	0	353.3
10	GKEYFAIDNSGRIIT	15	VE-Cadherin (196-210)	TB449	DRB1*0301	0.4	975.7
11	LLVVPWTQRF	11	Hemoglobin δ chain (31-41)	TB449	DRB1*1501	1399.2	33.2
12	DVGIVRAVTPQGRPD	15	DQB1*0602 β chain (75-89)	TB448	DRB5*0101	128.8	0
13	AAGLLSTYRAFLSSH	15	Collagen α 1 chain (1243-1257)	TB449	DRB1*1501	1644.3	138.1
+ve	MSHYVALPLKMLNI	15	hCMV pp65 (109-123)	-	DRB1*1501§	1192.2	-
+ve	PSPSMGRDKVQFQ	14	M. tuberculosis 85B (14-27)	-	DRB1*0301§	-	1428.7



Peptide binding analysis

To verify the capacity of the thyroid DR-eluted thyroglobulin peptides to bind DR molecules, binding assays were performed by direct detection of HLA-DR-peptide complexes in a cell-free assay using soluble DR15 and DR3 molecules. DR8 and DR51 soluble molecules were not available for these assays. In addition to the thyroglobulin peptides, we also tested four more thyroid peptides that had been well assigned to one or other of the alleles involved, that is, VE-cadherin 196–210, hemoglobin δ -chain 31–41, DQB1*0602 β -chain 75–89, and collagen α 1-chain (XV) 1243–1257, assigned to DR3, DR15, DR51, and DR15, respectively. The data confirmed the assignments to DR15 and DR3 of the above peptides and demonstrated the positive binding of Tg^{2098–2112} to DR3. Tg^{2224–2240}, considered a low binder to DR3, showed no binding (Fig. 3).

Modeling of HLA-DR-Tg peptide interactions

In the absence of binding data for Tg^{726–743} to DR51, modeling studies were performed for its binding to HLA-DR51 compared with HLA-DR15. The calculations predicted a relatively higher binding affinity ($\sim 10\%$ higher) for the pair DR51/Tg^{726–743} than for DR15/Tg^{726–743}, with an average relative binding score ΔZ_{51-15} of -25 kJ/mol (Tables IV and V). Although the computational method used is not meant to be quantitative, this result is in remarkable agreement with the trend shown by the binding data (Fig. 3).

The potential energy of DR/Tg^{726–743} interactions in the model structure with the best binding score ($V_{DR/Tg^{726-743}}$, Table IV) is more favorable (more negative) for the DR15/Tg^{726–743} complex than for DR51/Tg^{726–743}. The difference, which might appear sur-

prising at first sight, is mainly associated with the interaction between Tg^{726–743} and the DR α -chain. A close examination of the environment of the five Tg^{726–743} residues expected to anchor the peptide to the P1–P5 DR pockets (Table V and Fig. 4) shows that Tg^{726–743} establishes more interactions in the binding groove of DR15 than in that of DR51. In particular, as a consequence of the reduced size of P5 in DR51, Arg⁷⁴⁰ does not enter into this pocket

Table IV. Summary of modeling results

	DR51/Tg ^{726–743}	DR15/Tg ^{726–743}	Δ_{51-15}^h
min(W) ^a (kJ/mol)	–300	–278	–22
min(ΔG_{clus}) ^b (kJ/mol)	–297	–268	–29
ΔG^c (kJ/mol)	–282	–261	–21
Z^c (kJ/mol)	–293	–269	–24
$V_{DRA/Tg^{726-743}}$ ^e (kJ/mol)	–392	–456	64
$V_{DRB/Tg^{726-743}}$ ^f (kJ/mol)	–405	–410	5
Structural families ^g	388	140	248

^a Lowest work value obtained within the 1000 simulations (corresponds to model structure in Fig. 4).

^b Lowest free-energy value associated to a structural cluster. In both cases (DR51/Tg^{726–743} and DR15/Tg^{726–743}), the model structure with the lowest W is a member of the cluster with the lowest ΔG_{clus} .

^c Free energy calculated over the entire set of 1000 work values.

^d Average of the previous three quantities: average binding score.

^e Interaction potential energy between chain DRA and Tg^{726–743} in the model structure with the lowest W (from the ensemble of 1000 model structures generated for each of the two complexes; see Fig. 4).

^f Interaction potential energy between chain DRB and Tg^{726–743} in the model structure with the lowest W .

^g Number of structural families obtained by clustering of the 1000 model complexes based on the structure of the Tg^{726–743} buried side chains (Leu⁷³², Glu⁷³⁵, Ala⁷³⁷, Phe⁷³⁸, and Arg⁷⁴⁰).

^h Difference between the first two columns.

Table V. DR/Tg⁷²⁶⁻⁷⁴³ side-chain contacts^a in model structures with lowest *W*^b

Tg ⁷²⁶⁻⁷⁴³	DR51-DRA1	DR15-DRA1	DR51-DRB5	DR15-DRB1
Leu ⁷³²	Phe ⁴⁹	Phe ⁴⁹		His ¹¹⁰
	Phe ⁵⁷	Phe ⁵⁷	Asn ¹¹¹	Asn ¹¹¹
	Trp ⁶⁸	Trp ⁶⁸	Val ¹¹⁴	Val ¹¹⁴
	Ala ⁷⁷	Ala ⁷⁷		Val ¹¹⁵
Glu ⁷³⁵	Phe ⁷⁹	Phe ⁷⁹	Phe ¹¹⁸	Phe ¹¹⁸
	Gln ³⁴	Gln ³⁴	Tyr ⁴²	Arg ⁴²
			Phe ⁵⁵	Phe ⁵⁵
				Gln ⁹⁹
Ala ⁷³⁷			Arg ¹⁰⁰	
			Ala ¹⁰³	Ala ¹⁰³
			Tyr ¹⁰⁷	Tyr ¹⁰⁷
			Asp ⁴⁰	
			Tyr ⁴²	Arg ⁴²
				Tyr ⁵⁹
Phe ⁷³⁸	Glu ³⁶	Glu ³⁶		
	Asn ⁸⁷	Asn ⁸⁷		
	Val ⁹⁰	Val ⁹⁰		
	Asp ⁹¹	Asp ⁹¹		
		Asn ⁹⁴		
Arg ⁷⁴⁰			Trp ⁹⁰	Tyr ⁵⁹
			Phe ⁹⁶	Phe ⁷⁶
				Trp ⁹⁰
				Ile ⁹⁶
				Gln ⁹⁹
			Arg ¹⁰⁰	
		Asn ⁹⁴		Trp ³⁸
		Ile ⁹⁷		Tyr ⁵⁹
		Met ⁹⁸		Ser ⁶⁶
	Arg ¹⁰¹	Arg ¹⁰¹		Val ⁶⁷
			Pro ⁸⁵	
			Asp ⁸⁶	Asp ⁸⁶
			Tyr ⁸⁹	
				Trp ⁹⁰

^a Two side chains are considered in contact when their distance is ≤ 6 Å.^b See Table IV.

but stays on the surface. In fact, His⁶³⁹ of EBVP also stays out of P5 in the crystallographic structure 1H15 (PDB code). If the energetics of the interaction between Tg⁷²⁶⁻⁷⁴³ and the DR molecules favor complexation with DR15, why do the binding scores indicate the opposite binding preferences? The answer must be found in the entropy. Table IV shows that the structural variability of these five residues among the model complex structures generated, as reflected by the number of structural families obtained, is larger for DR51/Tg⁷²⁶⁻⁷⁴³ than for DR15/Tg⁷²⁶⁻⁷⁴³. Binding is the result of a fine balance between enthalpy and entropy. Optimal complementarity between protein and peptide may lead, despite a favorable enthalpy component, to poor binding due to a large (non-favorable) entropy loss. A good binder is one that maximizes binding enthalpy (interactions) while minimizing the unavoidable entropy loss upon binding. These considerations seem especially relevant for DR molecules that, because of the nature of their function, must escape highly specific interactions.

Discussion

The results of this study provide a first glance to the repertoire of peptides associated with HLA-DR molecules in thyroid glands of patients with autoimmune thyroid disease. To our knowledge, this is the first such analysis from human autoimmune tissue. The identified sequences constitute only a fraction of the total pool of peptides associated with the different DR alleles. They are certainly the most abundant peptides within our system's capability, and therefore peptides poorly represented in the tissue or those with low efficiency of ionization will not have been detected. Despite the limitations, we were able to identify seven different peptides belonging to one of the major autoantigens of thyroid autoimmune disease, thyroglobulin.

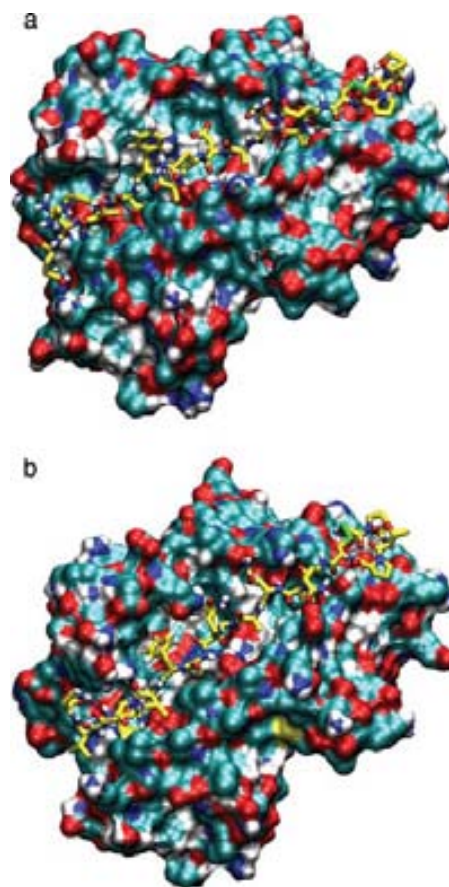


FIGURE 4. Model structure of Tg⁷²⁶⁻⁷⁴³ peptide binding to DR15 and DR51. Graphical representation of the model structure with best binding score (min(*W*) in Table I) for DR51/Tg⁷²⁵⁻⁷⁴³ (a) and for DR15/Tg⁷²⁵⁻⁷⁴³ (b). Peptide color code (stick representation): yellow (C), red (O), blue (N), green (S), white (H). Color code for DR51 and DR15 (space-filling representation): cyan (C), red (O), blue (N), white (H).

Most studies characterizing HLA-II-associated peptides have been conducted using immortalized lymphoid cell lines. When analyzing peptides from cell lines in culture, not only is the cell content different from the original tissue, but also the extracellular context is artificial and does not mimic the environment surrounding the cells in vivo. However, the use of human tissue is difficult due to low availability, low HLA-II expression, and heterozygosity of most samples. In the first study of HLA-II peptides from human tissue, 17 HLA-DR ligands were identified from a rheumatoid arthritis patient's spleen sample (12). Oshitani et al. reported 55 HLA-DR peptides from human intestine samples of 4 controls and 18 patients affected by inflammatory bowel disease (13). More recently, 78 peptides have been reported from a pool of 16 bronchoalveolar lavage samples from patients with sarcoidosis, being the first such study in human autoimmunity, although the nature of the samples was very different (23). Using a different approach, a recent study has shown that most peptides bound to MHC-II from mouse insulinoma cells derive from proteins normally expressed in β cells from normal islets and that some of them are recognized by CD4⁺ T cells from NOD mice (24). In the present report, 162 peptides have been obtained from seven Graves' disease-affected thyroid tissue samples. We were able to sequence peptides from as little as 1 g of human thyroid tissue, despite the low expression of HLA class II in the thyroid and the heterogeneity of this expression.

Our data do not allow discrimination of whether these peptides were associated to DR molecules expressed by TFC, by B cells, dendritic cells, or macrophages, all present in the thyroid gland. In fact, B cells are abundant in GD thyroid infiltrates, where they form autoantigen-specific germinal centers (6, 25). We have indeed identified one Ig peptide that could have been generated from an internalized BCR. However, there is not much tissue destruction in GD thyroids; on the contrary, TFCs are hyperfunctional by their interaction with agonistic anti-TSH-R Abs and therefore produce thyroid hormones, requiring continuous endocytosis of thyroglobulin and other colloid components by the TFCs. In this context, we can hypothesize that by being most accessible to thyroid follicular cells, the thyroglobulin peptides were associated to TFC-expressed DR molecules. Peptide identification from a single cell population in the tissue is at the moment very difficult because the amount of material that can be obtained using the best separation techniques is still very small, and thus it is hard to be sure which APCs would be presenting most peptides identified. Another limitation of human tissue, sample HLA heterozygosity, was mostly overcome because most sequences could be statistically assigned to one or the other DR allele expressed by each sample. The large available database of peptides specific to most HLA-DR alleles facilitated the search. The only limiting alleles were DR407 (DRB1*0407) and DR8, expressed by TB448 and TB471, respectively, for which there are still no well-defined peptide binding motives.

One common protein that generated peptides was albumin, an ubiquitous protein that, after the thyroglobulin, is the most abundant in the thyroid gland and, like the thyroglobulin, is present in the colloid. Another protein from which many peptides were derived was hemoglobin, also found in the colloid in hyperplastic thyroid tissue (21). Many exogenous peptides sequenced belonged to proteins of the extracellular matrix. Autoantibodies reacting with extracellular matrix proteins have been extensively studied in various autoimmune diseases affecting connective tissue. Both T cells and Abs specific for matrix proteins including collagen, laminin, and fibronectin have been detected in patients with Graves'-associated ophthalmopathy (26), diagnosed to patient TB449. Extracellular matrix proteins and proteinases involved in their degradation are related to thyroid function, and many are dependent of thyroid hormone production (27–29). Therefore, the chronic stimulation of thyroid hormone production characteristic of Graves' disease may well be related to the presence of extracellular matrix peptides associated with HLA-DR in the thyroid. Equally, the activation of thyroid hormone production requires active endocytosis of the colloid content by thyroid follicular cells, leading to a higher availability of Tg and even albumin peptides to bind to DR molecules expressed by the TFCs.

The most interesting peptides isolated from the Graves' thyroid glands were the Tg peptides, Tg^{726–743} from TB448 and Tg^{2098–2112} from TB449, that preferentially associated to DR51 and DR3, respectively, and five other from TB471, one of which (Tg^{2224–2240}) appeared to be a DR3 low binder, but could not be confirmed by binding. Thyroglobulin, one of the main autoantigens in autoimmune thyroiditis, constitutes 75–80% of the total protein contents of the colloid (21). Although thyroglobulin is highly expressed in the thymus during maturation (30), and therefore a high degree of tolerance to this molecule is expected in the periphery, the identification of thyroglobulin peptides as natural ligands in the repertoire indicates that these DR-peptide complexes must be relatively abundant in the affected thyroids. This putative high ligand density in the inflamed tissue may be a reason for

otherwise ignorant T cells to become stimulated. The analysis of T cell responses to these peptides both from in situ and peripheral T cells will be a next step to define which functional population of T cells may respond. Much evidence has demonstrated the role of Tg in the etiology of AITD: anti-Tg Abs are detected in almost all patients with AITD, and experimental autoimmune thyroiditis (EAT) can be induced in susceptible animals by both mouse and human Tg immunization (31). EAT can also be induced by direct immunization with thyroiditogenic peptides, including some human Tg peptides (32, 33). Although the pathological relevance of the Tg peptides that we have identified is not known, data from another group have demonstrated the pathogenicity of Tg^{2098–2112} in a DR3 transgenic model of Tg-induced EAT (34). A computer-based predicted set of 39 synthetic DR3-binding Tg peptides was screened against T cells from EAT⁺ DR3-transgenic mice, and only 4 could stimulate T cell responses. Interestingly, only one of those, peptide LSSVVVDPSIRHFDV, identical with the DR3-associated Tg^{2098–2112} peptide from TB449, could induce the disease both by direct peptide immunization and by adoptive transfer of peptide-activated T cells. Our data therefore demonstrate that a potentially pathogenic Tg peptide is indeed generated in vivo and presented by DR3 molecules in human Graves' disease.

Thus, we can now confirm what the authors suggested, that is, that the peptide was likely a natural peptide generated in DR3 individuals (34), demonstrating that a computer algorithm can predict a peptide identical in size and sequence to a naturally processed peptide. It remains to be clarified whether DR51-Tg^{726–743} or any other DR-Tg complex expressed in human GD thyroids are also potentially pathogenic or related to the regulation of the autoimmune response. Thyroglobulin is a very large autoantigen of 2749 aa that is extensively modified by iodination and other post-translational events. Iodinated Tg peptides are highly immunogenic and can trigger thyroid autoreactive T cells (35). Iodine has been proposed as capable of modifying the processing of Tg by APCs, resulting in the generation of pathogenic epitopes (32). Indeed, two of the TB471 peptides, Tg^{2508–2519} and Tg^{2520–2532}, are contained in a sequence that has been shown to be a cryptic peptide in mouse experimental thyroiditis, being only generated when mice are immunized with highly iodinated thyroglobulin (36).

When we compared our sequences with DR3- or DR51-predicted Tg epitopes, we found both the DR3 peptide Tg^{2098–2112} and the DR51 peptide Tg^{726–743} were within the highest scored peptides by ProPred (www.imtech.res.in/raghava/proppred/), RANKPEP (www.mifoundation.org/Tools/rankpep.html), or SYFPEITHI (www.syfpeithi.de/) (only DR3) (data not shown). Computer predictions gave us the assignment of these peptides to their respective alleles, and computer modeling supported these results.

Most other natural peptides identified also derived from highly expressed and ubiquitous proteins. These are by and large the proteins that one would expect to generate peptides capable of associating to class II molecules in any tissue. Some of these were analyzed for binding to their assigned alleles DR3 or DR15 and some demonstrated to be really high binders, such as VE-cadherin 196–210 to DR3 and hemoglobin δ -chain 31–41 or collagen α -chain 1243–1257 to DR15. One interesting feature of many peptides identified was their theoretical "promiscuity", that is, their capability to bind to many different HLA-DR alleles, which may be related to autoreactive TCR degeneracy. In fact, DR association with thyroid diseases is not very high, despite the preference for DR3 (37–40). The main associated alleles are DR3 (DRB1*0301) and DR5 (DRB1*1101). Tg^{726–743} was presumably associated with

DR51, a DR molecule expressed within the DR2 (DR15) haplotype. Although this haplotype has not been associated with AITD, it is not negatively associated and we have found 16% DR15⁺ Graves' patients in a larger study (41). DR51 is the dominant restriction element for myelin basic protein peptide recognition by multiple sclerosis patients' T cells (42) and it has more stringent requirements for peptide binding than does DR15 (22, 43). These requirements include a negatively charged Arg or Lys residue at position P9 (± 2), which was confirmed in all but two peptides assigned to DR51. The modeling studies suggest that Tg⁷²⁶⁻⁷⁴³ binds more strongly to DR51 than to DR15 as a consequence of the major flexibility of the DR51/Tg⁷²⁶⁻⁷⁴³ interface (entropic effect), despite the more favorable network of interactions between Tg⁷²⁶⁻⁷⁴³ and DR15. The low binding of this peptide to DR15 favors this interpretation.

Our data thus demonstrate that tissue-specific peptides are associated in vivo to HLA-DR in GD-affected tissue and therefore may well be involved in the autoimmune process by potentiating the autoimmune responses, but also that the in situ HLA-DR-associated peptide pool mostly derive from abundant and ubiquitous proteins common to other tissues. The relevance of all these peptides may not only relate to their pathogenicity but also to their capacity to regulate responses. Ex vivo studies can well be a first step toward the clarification of the role of HLA class II molecules expressed in autoimmune organs.

Acknowledgments

We thank the patients who donated thyroid tissue and Dr. A. Lucas-Martín (Endocrinology Department, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona) and Dr. G. Obiols (Endocrinology Department, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona) for clinical data. Thanks also to Dr. E. Palou (Laboratory of Immunobiology for Research and Application to Diagnosis, Blood and Tissue Bank, Hospital Germans Trias i Pujol) for HLA typing and Dr. E. Borràs (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona), for help with peptide synthesis. Special thanks to the Port d'Informació Científica and the Òliba-Universitat Autònoma de Barcelona project for providing data storage and computational resources.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Hanafusa, T., R. Pujol-Borrell, L. Chiovato, R. C. Russell, D. Doniach, and G. F. Bottazzo. 1983. Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity. *Lancet* 2: 1111-1115.
- Guardiola, J., and A. Maffei. 1993. Control of MHC class II gene expression in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *Crit. Rev. Immunol.* 13: 247-268.
- Bottazzo, G. F., R. Pujol-Borrell, T. Hanafusa, and M. Feldmann. 1983. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 2: 1115-1119.
- Weetman, A. P. 2003. Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *Eur. J. Endocrinol.* 148: 1-9.
- Lucas-Martín, A., M. Foz-Sala, I. Todd, G. F. Bottazzo, and R. Pujol-Borrell. 1988. Occurrence of thyrocyte HLA class II expression in a wide variety of thyroid diseases: relationship with lymphocytic infiltration and thyroid autoantibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 367-375.
- Aloisi, F., and R. Pujol-Borrell. 2006. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 205-217.
- Catalfamo, M., L. Serradell, C. Roura-Mir, E. Kolkowski, M. Sospedra, M. Vives-Pi, F. Vargas-Nieto, R. Pujol-Borrell, and D. Jaraquemada. 1999. HLA-DM and invariant chain are expressed by thyroid follicular cells, enabling the expression of compact DR molecules. *Int. Immunol.* 11: 269-277.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, J. C. Gorga, D. A. Vignali, W. S. Lane, and J. L. Strominger. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178: 27-47.
- Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanović. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228.
- Singh, H., and G. P. Raghava. 2001. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 17: 1236-1237.
- Muntasell, A., M. Carrascal, L. Serradell, P. van Veelen, F. Verreck, F. Koning, G. Raposo, J. Abian, and D. Jaraquemada. 2002. HLA-DR4 molecules in neuroendocrine epithelial cells associate to a heterogeneous repertoire of cytoplasmic and surface self peptides. *J. Immunol.* 169: 5052-5060.
- Gordon, R. D., J. A. Young, S. Rayner, R. W. Luke, M. L. Crowther, P. Wordsworth, J. Bell, G. Hassall, J. Evans, S. A. Hinchliffe, et al. 1995. Purification and characterization of endogenous peptides extracted from HLA-DR isolated from the spleen of a patient with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 25: 1473-1476.
- Oshitani, N., F. Hato, S. Kitagawa, K. Maeda, K. Higuchi, T. Matsumoto, and T. Arakawa. 2003. Analysis of intestinal HLA-DR bound peptides and dysregulated immune responses to enteric flora in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Med.* 11: 99-104.
- Dengjel, J., M. D. Nastke, C. Gouttefangeas, G. Gitsioudis, O. Schoor, F. Altenberend, M. Muller, B. Kramer, A. Missiou, M. Sauter, et al. 2006. Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 12: 4163-4170.
- Muntasell, A., M. Carrascal, I. Alvarez, L. Serradell, P. van Veelen, F. A. Verreck, F. Koning, J. Abian, and D. Jaraquemada. 2004. Dissection of the HLA-DR4 peptide repertoire in endocrine epithelial cells: strong influence of invariant chain and HLA-DM expression on the nature of ligands. *J. Immunol.* 173: 1085-1093.
- van Gunsteren, W. F., X. Daura, and A. E. Mark. 2002. Computation of free energy. *Helv. Chim. Acta* 85: 3113-3129.
- Nelson, C. A., and D. H. Fremont. 1999. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev. Immunogenet.* 1: 47-59.
- Scott, W. R. P., P. H. Hunenberger, I. G. Tironi, A. E. Mark, S. R. Billeter, J. Fennen, A. E. Torda, T. Huber, P. Kruger, and W. F. van Gunsteren. 1999. The GROMOS biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem. A* 103: 3596-3607.
- Schuler, L. D., X. Daura, and W. F. Van Gunsteren. 2001. An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase. *J. Comput. Chem.* 22: 1205-1218.
- Jarzynski, C. 1997. Nonequilibrium equality for free energy differences. *Phys. Rev. Lett.* 78: 2690-2693.
- Baggio, M. C., G. Medeiros-Neto, Y. Osawa, N. Y. Nguyen, P. Santisteban, M. Knobel, and E. E. Grolman. 1996. Amino acid composition of proteins extracted from endemic goiter glands. *Endocr. Pathol.* 7: 137-143.
- Vogt, A. B., H. Kropshofer, H. Kalbacher, M. Kalbus, H. G. Rammensee, J. E. Coligan, and R. Martin. 1994. Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J. Immunol.* 153: 1665-1673.
- Wahlstrom, J., J. Dengjel, B. Persson, H. Duyar, H. G. Rammensee, S. Stevanovic, A. Eklund, R. Weissert, and J. Grunewald. 2007. Identification of HLA-DR-bound peptides presented by human bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 117: 3576-3582.
- Suri, A., J. J. Walters, H. W. Rohrs, M. L. Gross, and E. R. Unanue. 2008. First signature of islet β -cell-derived naturally processed peptides selected by diabetogenic class II MHC molecules. *J. Immunol.* 180: 3849-3856.
- Armengol, M. P., M. Juan, A. Lucas-Martín, M. T. Fernandez-Figueras, D. Jaraquemada, T. Gallart, and R. Pujol-Borrell. 2001. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am. J. Pathol.* 159: 861-873.
- Bednarczuk, T., J. Kiljanski, T. Mrowiec, M. Slon, E. Ing, C. Stolarski, J. S. Kennerdell, A. Gorski, J. Nauman, and J. R. Wall. 1998. T cell interactions with extracellular matrix proteins in patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Autoimmunity* 27: 221-230.
- Ribeiro-Carvalho, M. M., D. A. Farias-de-Oliveira, D. M. Villa-Verde, and W. Savino. 2002. Triiodothyronine modulates extracellular matrix-mediated interactions between thymocytes and thymic microenvironmental cells. *Neuroimmunomodulation* 10: 142-152.
- Trentin, A. G., C. B. De Aguiar, R. C. Garcez, and M. Alvarez-Silva. 2003. Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion. *Glia* 42: 359-369.
- Damjanovski, S., M. Puzianowska-Kuznicka, A. Ishizuya-Oka, and Y. B. Shi. 2000. Differential regulation of three thyroid hormone-responsive matrix metalloproteinase genes implicates distinct functions during frog embryogenesis. *FASEB J.* 14: 503-510.
- Sospedra, M., X. Ferrer-Francesch, O. Dominguez, M. Juan, M. Foz-Sala, and R. Pujol-Borrell. 1998. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J. Immunol.* 161: 5918-5929.
- Esquivel, P. S., N. R. Rose, and Y. C. Kong. 1977. Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 145: 1250-1263.
- Carayanniotis, G. 2003. The cryptic self in thyroid autoimmunity: the paradigm of thyroglobulin. *Autoimmunity* 36: 423-428.
- Balasa, B., and G. Carayanniotis. 1993. Induction of experimental autoimmune thyroiditis in rats with the synthetic peptide (2495-2511) of thyroglobulin. *Cell. Immunol.* 148: 259-268.
- Flynn, J. C., D. J. McCormick, V. Brusica, Q. Wan, J. C. Panos, A. A. Giraldo, C. S. David, and Y. C. Kong. 2004. Pathogenic human thyroglobulin peptides in

- HLA-DR3 transgenic mouse model of autoimmune thyroiditis. *Cell. Immunol.* 229: 79–85.
35. Champion, B. R., K. R. Page, N. Parish, D. C. Rayner, K. Dawe, G. Biswas-Hughes, A. Cooke, M. Geysen, and I. M. Roitt. 1991. Identification of a thyroxine-containing self-epitope of thyroglobulin which triggers thyroid autoreactive T cells. *J. Exp. Med.* 174: 363–370.
36. Dai, Y. D., V. P. Rao, and G. Carayanniotis. 2002. Enhanced iodination of thyroglobulin facilitates processing and presentation of a cryptic pathogenic peptide. *J. Immunol.* 168: 5907–5911.
37. Farid, N. R., L. Sampson, E. P. Noel, J. M. Barnard, R. Mandeville, B. Larsen, W. H. Marshall, and N. D. Carter. 1979. A study of human leukocyte D locus related antigens in Graves' disease. *J. Clin. Invest.* 63: 108–113.
38. Schleusener, H., G. Scherthaner, W. R. Mayr, P. Kotulla, U. Bogner, R. Finke, H. Meinhold, K. Koppenhagen, and K. W. Wenzel. 1983. HLA-DR3 and HLA-DR5 associated thyrotoxicosis: two different types of toxic diffuse goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 781–785.
39. Tomer, Y., and T. F. Davies. 2003. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr. Rev.* 24: 694–717.
40. Wan, Q., R. Shah, J. C. Panos, A. A. Giraldo, C. S. David, and Y. M. Kong. 2002. HLA-DR and HLA-DQ polymorphism in human thyroglobulin-induced autoimmune thyroiditis: DR3 and DQ8 transgenic mice are susceptible. *Hum. Immunol.* 63: 301–310.
41. Sospedra, M., G. Obiols, L. F. Babi, E. Tolosa, F. Vargas, C. Roura-Mir, A. Lucas-Martin, G. Ercilla, and R. Pujol-Borrell. 1995. Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Graves' disease: a primary defect? *J. Immunol.* 154: 4213–4222.
42. Jaraquemada, D., R. Martin, S. Rosen-Bronson, M. Flerlage, H. F. McFarland, and E. O. Long. 1990. HLA-DR2a is the dominant restriction molecule for the cytotoxic T cell response to myelin basic protein in DR2Dw2 individuals. *J. Immunol.* 145: 2880–2885.
43. Jones, E. Y., L. Fugger, J. L. Strominger, and C. Siebold. 2006. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 271–282.

**Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction, distribution or commercial use.**

This chapter was originally published in the book *Advances in Immunology, Vol 99*, published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues who know you, and providing a copy to your institution's administrator.



All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

From: Laia Muixí, Iñaki Alvarez, and Dolores Jaraquemada, Peptides Presented
In Vivo by HLA-DR in Thyroid Autoimmunity.

In Frederick W. Alt, editor, *Advances in Immunology, Vol 99*.

Burlington: Academic Press, 2008, pp.165-210.

ISBN: 978-0-12-374325-1

© Copyright 2008 Elsevier Inc.

Academic Press.

CHAPTER 6

Peptides Presented *In Vivo* by HLA-DR in Thyroid Autoimmunity

Laia Muixí, Iñaki Alvarez, and Dolores Jaraquemada

Contents	List of Abbreviations	166
	1. Introduction	166
	1.1. Endocrine autoimmunity	166
	1.2. Autoimmune thyroid disease as a model of tissue-restricted autoimmune responses	167
	1.3. HLA class II and AITD	169
	1.4. Tolerance to thyroid antigens	170
	1.5. The role of antigenic peptides in the autoimmune responses <i>in situ</i>	171
	2. Natural Peptides: The Constitutive Ligands of MHC Molecules	173
	2.1. Natural ligands of class II MHC molecules: Binding properties and promiscuity	173
	2.2. Some technical considerations: The analysis of MHC-associated peptides from tissue samples	175
	3. Natural Ligands for HLA Class II in Autoimmune Thyroid Tissue	177
	3.1. Are HLA class II natural ligands related to the function of their specific T cells?	177
	3.2. The case of Tg	191
	3.3. TPO and TSHR peptides	200
	4. Concluding Remarks	200
	Acknowledgments	201
	References	201

Immunology Unit, Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB), and Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Campus de Bellaterra, 08193 Barcelona, Spain

Abstract

The association of the major histocompatibility complex (MHC) genes with autoimmune diseases together with the ectopic expression of class II molecules by epithelial cells of the target tissue gives to these molecules a central role in the pathogenesis of the disease, in its regulation and in the persistence of the immune response *in situ*.

HLA-DR molecules expressed by thyroid follicular cells in thyroid autoimmune diseases are compact molecules stably associated with peptides. The nature of these peptides is of vital importance in the understanding of the disease, since these MHC-II-peptide complexes are going to be recognized by both effector and regulatory T cells *in situ*. In this chapter, we review the current state of the analysis of naturally processed peptides presented by MHC class II molecules in the context of autoimmunity and we discuss our data of natural HLA-DR ligands eluted from Graves' disease affected thyroid glands, from where autoantigen-derived peptides have been identified.

Key Words: Human, thyroid autoimmunity, peptides, antigen presentation, MHC. © 2008 Elsevier Inc.

LIST OF ABBREVIATIONS

T1D, type 1 diabetes; AITD, autoimmune thyroid diseases; GD, Graves' disease; HT, Hashimoto's thyroiditis; DCs, dendritic cells; Tg, thyroglobulin; TPO, thyroid peroxidase; TSHR, thyroid stimulating hormone receptor; TFC, thyroid follicular cells; MHC, major histocompatibility complex; SNP, single nucleotide polymorphism; mTEC, medullary thymic epithelial cells; AIRE, autoimmune regulator; MS, mass spectrometry; B-LCL, B-lymphoblastoid cell line; APC, antigen-presenting cell; EAT, experimental autoimmune thyroiditis

1. INTRODUCTION

1.1. Endocrine autoimmunity

Autoimmune endocrine diseases are mostly classical organ-specific T-cell-mediated diseases of multifactorial etiology and a strong genetic component. The autoimmune attack affects endocrine glands and is directed to molecules expressed by cells of the target organs. Together with type 1 diabetes (T1D), the most common autoimmune endocrine disorders are the autoimmune thyroid diseases (AITD), including Graves'

disease (GD) and Hashimoto's thyroiditis (HT). The pathogenesis of these diseases involves an effector (humoral or cellular) response dependent on self-antigen-specific T cells, which results in the dysfunction of the target organ (Roep, 2003; Weetman, 2004).

Because of the constant presence of the target autoantigens in the affected tissue, the *in situ* immune response produces local chronic inflammation leading in the long term to tissue destruction and loss of function, causing the clinical symptoms of the disease. The tissues affected by these chronic immune responses against self-antigens are infiltrated by cellular components of the immune system, mainly T cells and macrophages, but also by dendritic cells (DCs), B cells, and plasma cells. In many cases, this infiltrate is anatomically and functionally organized as in secondary lymphoid organs, with the formation of T-cell areas as well as functional B-cell follicles, constituting the so-called tertiary lymphoid tissue (Aloisi and Pujol-Borrell, 2006; Armengol *et al.*, 2001; Drayton *et al.*, 2006; Salomonsson *et al.*, 2003; Serafini *et al.*, 2004). This slowly sustained autoimmune response has allowed sometimes the identification of effectors, although the diverse autoantigens, that is, the tissue-specific molecules that are specifically recognized by these effectors, are often unknown.

Although T1D is by far the most important endocrine autoimmune disease for its prevalence in public health, the most relevant studies of its etiology have not been done in human autoimmune pancreas but in the NOD mouse model due to the limited access to tissue samples. The diverse forms of autoimmune thyroidopathies, together with Addison's disease, are the most common organ-specific human autoimmune disorders. In contrast to T1D, the availability of human autoimmune thyroid tissue samples allows its direct analysis, and makes the AITD very interesting models for studying human autoimmunity.

1.2. Autoimmune thyroid disease as a model of tissue-restricted autoimmune responses

Our studies have been directed at the AITD as models of endocrine autoimmunity. Several reasons make thyroid autoimmunity a good model to study human tissue-restricted autoimmune processes: diverse forms of *in situ* immune responses ranging from organ hyperfunction due to the effect of agonistic stimulating antibodies, to hypofunction due to several causes including blocking antibodies and cytotoxic T cells; the three main autoantigens in AITD, thyroglobulin (Tg), thyroid peroxidase (TPO), and the thyroid stimulating hormone receptor (TSHR), are well defined and biochemically and genetically characterized; both B and T cells specific for these three antigens have been isolated from thyroid infiltrates (Armengol *et al.*, 2001; Dayan *et al.*, 1991; Londei *et al.*, 1985; Pichurin *et al.*, 2004; Weetman *et al.*, 1986); mouse experimental models for

nearly all forms of AITD have been obtained (Kim-Saijo *et al.*, 2003; Kong, 2007; Kotani *et al.*, 1990; Nagayama, 2007; Nagayama *et al.*, 2002; Shimojo *et al.*, 1996), including models using HLA-DR transgenic mice (Kong *et al.*, 2007); and finally thyroidectomy is relatively common therapy for some AITD such as GD so a large amount of tissue can be available for different studies from the strictly morphological to the clonal analysis of relevant T or B cells and their receptors. Finally, the thyroid is the most commonly affected organ in human autoimmunity. Therefore, even if the treatments for AITD are effective, nonaggressive, and relatively inexpensive, thyroid autoimmunity remains of public interest. Human GD is a disease mediated by agonistic stimulating autoantibodies to the TSHR. The affected tissue is characterized by a heterogeneous cellular infiltration consisting of mostly T cells but also macrophages, DCs, B cells, and plasma cells, and a local immune response to the above-mentioned thyroid autoantigens, while maintaining the organ structure. The thyroid in GD is considered a tertiary lymphoid tissue, with evident formation of T-cell zones and germinal centers (Aloisi and Pujol-Borrell, 2006; Armengol *et al.*, 2001).

Tissue resident DCs, macrophages, and B cells infiltrating the target organ express class II HLA molecules (HLA-II) and can process and present antigen to T cells. In a recent report, a constitutive role of islet resident DC to capture beta cell antigens and present them to T cells in the draining lymph node to maintain tolerance has been proposed for T1D (Calderon *et al.*, 2008). A parallel role for thyroid resident DCs, in close contact with endocrine cells, could be proposed for maintaining the tolerance to thyroid antigens and thus should be studied.

In addition, the main hormone secreting cells of the thyroid parenchyma, called thyroid follicular cells (TFC), are polarized epithelial cells with a very important endocytic activity at their apical end. From there, they endocytose Tg-rich colloid that is processed to generate thyroid hormones and released by exocytosis to the capillaries in the basal pole (Marino and McCluskey, 2000; Marino *et al.*, 2000). This high capacity of endocytosis of extracellular material, together with their expression of HLA-II induced by the chronic inflammation settled in the tissue, makes TFC capable of presenting self-antigen to T cells (Hanafusa *et al.*, 1983).

The importance of nonprofessional antigen presenting cell (APCs) such as TFC in the context of the disease is unknown, but it is clear that the autoimmune response is maintained and modulated through the interaction between immune cells and cells of the target organ, with a strong influence of the local microenvironment. In this regard, it has been established that many TPO-specific T cells and most TPO-specific autoantibodies in human AITD develop in response to TPO presented by intact TFC, rather than by TPO released by damaged TFC and presented by resident DC (McLachlan and Rapoport, 2007). Data for other thyroid autoantigen are not so clear.

1.3. HLA class II and AITD

Although the exact etiology of the autoimmune thyroid disease remains unknown, there is solid evidence that genetic factors are a major influence in the development of AITD, and it is widely accepted that susceptibility genes, including major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes, in conjunction with environmental factors, such as diet iodine, initiate an autoimmune response in the thyroid (Jacobson and Tomer, 2007a; Tomer and Davies, 2003). Recently several AITD susceptibility genes have been identified including some polymorphisms of immunoregulatory genes such as CTLA-4 or CD40 (Jacobson and Tomer, 2007b), and genes with tissue-restricted expression like Tg and the TSHR (Jacobson and Tomer, 2007b). Although susceptibility to AITD is influenced by all these genes, MHC genes are by far the most important (Jacobson *et al.*, 2008).

HLA-DR genes specifically play a major role in the etiology of GD. Although statistically the association of AITD with HLA class II alleles is less strong than that of other autoimmune diseases including T1D, most studies agree in that GD is associated with HLA-DR3 (Jacobson *et al.*, 2008; Tomer and Davies, 2003). The frequency of DR3 in GD patients is 40–55% compared to 15–30% in the general population, giving a relative risk for HLA-DR3 (HLA-DRB1*0301) positive individuals of 3 (Farid *et al.*, 1980; Manglabruks *et al.*, 1991), and it is generally agreed that HLA-DR3 is the primary susceptibility gene for GD (Zamani *et al.*, 2000). This concept has been confirmed by family studies (Heward *et al.*, 1998) and reinforced by the studies on DR3-transgenic mouse models of experimental thyroiditis (Kong *et al.*, 1996). In addition, HLA-DQA1*0501 has also been shown to be associated with GD in Caucasians (Barlow *et al.*, 1996; Marga *et al.*, 2001; Yanagawa *et al.*, 1993).

The exact mechanism of this association is not known, and there is a relative large number of patients who are HLA-DR3 negative, suggesting that HLA-DR is important, but one of many factors influencing the pathogenesis of GD. In a recent series of studies, it has been postulated that the presence of the amino acid Arg at position 74 (R74) of the HLA-DR β chain is the critical element for conferring susceptibility to GD, whereas other amino acids at that position (Ala or Gln) are protective (Ban *et al.*, 2004; Simmonds *et al.*, 2005). HLA-DR3 (DRB1*0301) is the only allele of the HLA-DRB1 locus that contains the R74 residue, with the exception of some uncommon alleles such as HLA-DRB1*0116, *0422, *1107, *1476, and *1525. Interestingly, a high number of alleles of the HLA-DRB3 gene, commonly associated with DR3 and other DR alleles, also have Arg at position 74. Specifically, all alleles of DRB3*01 except *0107 are positive for DR β -Arg74, in addition to DRB3*0204, *0219, *0222, and *0303 (sequence data from IMGT database, <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/>

[imgt/hla/](#)). Population studies of DRB haplotypes have shown that HLA-DR3 (i.e., DRB1*03 alleles) is mostly associated with DRB3*0101 (83%) versus only 16% of DRB3*0202 ([Tang et al., 2002](#)). Other DRB1 alleles that associate with DRB3*0101 are DRB1*1401 (100%), DRB1*1301 (63%), and DRB1*1201 (~50%). In contrast, 97% of the DR11 haplotypes present association with DRB3*0202 and only 2% with DRB3*0101 ([Tang et al., 2000](#)). HLA-DR3-negative GD patients can therefore express other DR molecules with Arg at position 74 of the beta chain, suggesting that the presence of R74 may indeed be a key element to confer susceptibility to GD and at least explain in part the relatively weak association of GD with the HLA-DR3 allele.

In addition, the existence of a synergistic effect of R74 together with homozygosity for a single nucleotide polymorphism (SNP) in exon 33 of the Tg gene suggests an interaction between these alleles in conferring susceptibility to GD. A possible mechanism can be that the presence of R74 would favor the direct interaction of pathogenic TSHR or Tg peptides with the DR binding groove or their exposition to the TCR, allowing their efficient recognition by specific T cells. Polymorphic changes on the Tg gene could also facilitate the generation of pathogenic epitopes if they induce sequence modifications that generate new processing sites ([Hodge et al., 2006](#)).

1.4. Tolerance to thyroid antigens

Tolerance to self-antigens is established in the thymus (central tolerance) and induced and maintained in the periphery (peripheral tolerance). The deletion of T cells whose TCRs bind peptides derived from self-proteins with high affinity is efficiently achieved by the involvement in thymic selection of medullary thymic epithelial cells (mTECs) expressing the autoimmune regulator (AIRE) ([Anderson et al., 2005](#); [Derbinski et al., 2005](#)). AIRE is a transcriptional mediator that plays an important role in the promiscuous expression of tissue-specific autoantigens in the thymus ([Derbinski et al., 2001](#); [Kyewski et al., 2002](#); [Smith et al., 1997](#); [Sospedra et al., 1998](#)).

To generate an appropriate level of tolerance to autoantigens, the mTECs of the thymus transcribe a partial internal representation of the genome, including genes codifying tissue-specific self-antigens, covering essentially all organs. This permits the accessibility to developing T cells of self-antigens with physically or temporally restricted expression ([Kyewski and Derbinski, 2004](#)). This expression is complex and very variable. Some antigens are expressed by all individuals, whereas others are not homogeneously expressed. Expression varies with time, may be restricted to some regions of the genes, and may generate a different array of epitopes in the thymus if comparing with the cells expressing that same

genes in the periphery (Bruno *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2000; Pugliese *et al.*, 1997).

It has been demonstrated that the genes encoding thyroid-specific autoantigens (Tg, TPO, and TSHR) are expressed in human thymus (Sospedra *et al.*, 1998; Spitzweg, Joba and Heufelder, 1999). More specifically, the Tg gene is expressed by most mammalian thymi, but at least in mouse, thymus Tg transcripts are truncated and maybe not all possible Tg epitopes are accounted for (Li and Carayanniotis, 2005). Besides, compared to Tg, the level of expression of TPO and TSHR transcripts is lower and there are interindividual variations (Sospedra *et al.*, 1998). Therefore, at least theoretically, tolerance to Tg in the thymus should be achieved more efficiently both by the elimination of high reactive T cells and by the generation of peptide-specific regulatory T cells. Indeed higher levels of antigen in thymic medullary epithelium were observed in transgenic mice carrying hen egg lysozyme antigen controlled by the Tg promoter, compared to the H-2K^b promoter (Liston *et al.*, 2004). The trigger of immune responses to Tg, TPO, or TSHR in AITD should then be different or require different thresholds if affected by the level of expression of these three genes in the thymus. Thus, the genetic component of AITD should include the differential expression of the specific autoantigens' in the thymus, in addition to the effect of MHC and other genes. These variations could presumably be controlled by polymorphisms on the genes' promoter regions, as for the insulin gene in T1D. So if the role of MHC molecules in AITD is the efficient presentation of self-antigens to effector or regulatory cells in the thyroid, at the same time as presenting peptides in the thymus to establish central tolerance, a modulation of this role in periphery by the degree of thymus expression of each of the autoantigens can be expected.

1.5. The role of antigenic peptides in the autoimmune responses *in situ*

MHC class I and II molecules are expressed at the cell surface of antigen-presenting cells, associated by default with peptides derived from self-molecules that, in case of infection, will be displaced by peptides from the pathogen's antigens. Class II MHC (human HLA-II) molecules are trans-membrane glycoproteins which mostly bind peptides derived from exogenous or cell membrane proteins to be presented to CD4⁺ T lymphocytes. The correct expression of stable peptide-HLA-II complexes at the surface depends mainly on two class II-pathway-specific chaperones, the invariant chain and HLA-DM, which permit the stabilization of the complex in the endocytic pathway by favoring the binding of "high stability" peptides (Arndt *et al.*, 1997; Avva and Cresswell, 1994; Kropshofer *et al.*, 1997; Vogt *et al.*, 1997). Expression of HLA-II is normally restricted to

professional APCs, that is, DCs, macrophages, B cells, and thymic epithelial cells (TECs), but it is induced in other cell types by inflammatory conditions as shown *in vivo* in epithelial cells from the target organs of autoimmune diseases including AITD (Bottazzo *et al.*, 1983; Guardiola and Maffei, 1993; Hanafusa *et al.*, 1983; Lucas-Martin *et al.*, 1988). This expression of MHC molecules is related to the *in situ* maintenance of the autoreactive response, although the mechanisms involved are as yet unknown. The nature of the T-cell populations that recognize peptides in the context of MHC expressed by the epithelial cells or by the APC that share the space in the infiltrated tissue is unknown, as are many of the autoantigens recognized by the infiltrating T cells.

Our group has demonstrated that the expression of HLA-II in GD TFC is accompanied by the expression of the two main chaperones of the class II pathway, invariant chain and HLA-DM. The level of HLA-DM expression is sufficient to allow correct peptide loading into the HLA-II molecules and hence the expression of stable HLA-II-peptide complexes at the cell surface (Catalfamo *et al.*, 1999; Lucas-Martin *et al.*, 1988). Therefore, we can assume that the HLA-II-expressing epithelial cells in human AITD are capable of presenting self-proteins to infiltrating CD4⁺ cells *in situ*. Thus, class II⁺ TFC should play a role in the regulation of the sustained autoimmune response in the target tissue. As a consequence, the peptide repertoire displayed at the surface of HLA-II-expressing epithelial cells must be relevant to understand self-reactive T-cell responses *in situ*. This role should be complementary to that played by other HLA-II-expressing cells in the infiltrated thyroid glands, namely, resident and infiltrating DCs, endothelial cells, activated T cells, B cells, and macrophages (Catalfamo *et al.*, 1999).

To identify the target antigens and the different functions played by the multiple T-cell populations infiltrating the tissue, we and other have studied cloned T cells from AITD thyroid infiltrating lymphocytes, including CD4⁺ cells, but also CD8⁺, gamma delta T cells, NKT cells, and a large number of regulatory cells. The data show that most T cells infiltrating the organ-expressed TCRs capable of recognizing autologous thyroid epithelial cells but in most cases with a very low affinity, impairing the characterization of their function as well as of their specificity (Catalfamo *et al.*, 1996; Dayan *et al.*, 1991; Londei *et al.*, 1985; Roura-Mir *et al.*, 1993, 1997, 2005). The difficulty in characterizing T-cell specificity in the thyroid infiltrates, together with the expression of stable peptide-associated HLA-DR molecules by the TFC, led us to search for the antigenic specificities of the *in situ* responses by identifying which were the peptides that naturally associated with the class II molecules in the tissue. This approach, called by some "reverse immunology", has been used in other systems, both for MHC class I and class II molecules (Dengjel *et al.*, 2006; Paradela *et al.*, 1998; Viatte *et al.*, 2006).

2. NATURAL PEPTIDES: THE CONSTITUTIVE LIGANDS OF MHC MOLECULES

2.1. Natural ligands of class II MHC molecules: Binding properties and promiscuity

The identification of peptide epitopes that naturally associate to MHC class II molecules is an important objective in immunological research. Studies characterizing HLA-DR-associated peptides have mostly been done using B-lymphoblastoid cell lines (B-LCLs) as the source of DR-peptide complexes. These studies have led to the identification of the allele-specific structural motifs common to peptides that associate to most DR and some DQ alleles ([Chicz *et al.*, 1993](#); [Rammensee *et al.*, 1995](#); [Singh and Raghava, 2001](#)), as well as to the generation of large databases of natural ligands for MHC class II molecules ([Rammensee *et al.*, 1999](#); [Sathiamurthy *et al.*, 2003](#); [Singh and Raghava, 2001](#)). On the basis of these data, predictive computational tools have been developed as alternative approaches, although there is still a large number of inaccuracies in these predictions ([Gowthaman and Agrewala, 2008](#); [Wang *et al.*, 2008](#)).

Experiments to identify class II-associated peptides are expensive and time consuming, and the difficulty increases when trying to identify or predict natural DR ligands from nonlymphoid cell types, both for the identification of peptides and for epitope prediction. In these cells, HLA-II expression is more variable, access to samples is normally limited, and there may be variations in the processing mechanisms leading to the generation of class II ligands. This is more so when dealing with highly differentiated hormone-secreting epithelial cells, such as TFC or islet- β cells. Nevertheless, the real diversity of antigens targeted by T cells in any autoimmune tissue can only be inferred from the peptide repertoire-associated *in situ* to class II molecules.

In a previous work, we analyzed the peptide repertoire associated with HLA-DR4 molecules expressed by a transfected insulinoma cell line. We detected a heterogeneous pool of self-peptides derived from cell surface proteins and proteins from internal cell compartments, including the cytosol and the secretory pathway, some of which corresponded to tissue-specific proteins ([Muntasell *et al.*, 2002, 2004](#)). These data showed that the repertoire of peptides associated with DR4 in epithelial cells was different from that of DR4-associated peptides from lymphoblastoid cells, while keeping the right structural DR4-binding motif. The data showed about 50% coincidence in the distribution of proteins generating class II ligands, mostly from the cell membrane. The differences revealed that many of the peptides associated with DR4 in epithelial cells derived from proteins of the cytosol and secretory vesicles, whereas the B cells showed a larger number of peptides derived from proteins resident in endocytic vesicles ([Muntasell *et al.*, 2002](#)).

However, this material gave only an indirect assessment on the repertoire of peptide ligands occupying the groove of HLA-II molecules in real-life autoimmune tissue. Nevertheless, a recent study has demonstrated the reliability of this strategy by using a more differentiated mouse insulino-ma cell line expressing the diabetogenic I-A^{g7} molecules (Suri *et al.*, 2008). They identified naturally processed peptides displayed by I-A^{g7}, some of which derived from secretory granules and other proteins expressed by normal β cells. But the access to differentiated endocrine cell lines is very limited and cultured cells lack the local environment of a whole tissue sample. Therefore, studies from *ex vivo* tissue samples are still necessary to evaluate the real repertoire of DR-associated natural peptides from autoimmune tissue that can be recognized by T-cells *in situ*.

Little has been done with human tissue, where sample heterozygosity adds to the other major difficulties. The first published work on HLA-DR-peptide purification from human tissue in 1995, identified 17 peptides from 50 g of the spleen of a patient with rheumatoid arthritis (Gordon *et al.*, 1995). Later, 55 peptides were sequenced from 9 human intestine samples from patients with inflammatory bowel disease (Oshitani *et al.*, 2003). More recently, a large number of HLA class II-associated peptides were identified from primary renal carcinoma samples (Dengjel *et al.*, 2006). Finally, a recently published study described sequences of HLA-DR3-bound peptides from bronchoalveolar lavage cells of sarcoidosis patients that allowed the identification of antigens targeted by the autoimmune response (Wahlstrom *et al.*, 2007). Even by comparing this limited set of studies, one can realize the influence of the specific characteristics of each tissue in the repertoire of peptides displayed by class II molecules. Whereas peptides from the spleen were derived from proteins of very diverse origin, that is, serum albumin, human erythroid protein, 60S ribosomal proteins L31 and L35, VCAM-1, human immunoglobulin lambda chain, or cathepsin-S, the peptides from intestinal samples were nearly all (51/55) from exogenous proteins, including antigens from *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, or *Caenorhabditis elegans*. In contrast, the repertoire of peptides isolated from human tumoral tissue was more similar to that of epithelial-transfected cells (Muntasell *et al.*, 2002), where in addition to human serum proteins and membrane components, many of the source proteins that generated class II ligands were from nuclear or cytosolic origin (Dengjel *et al.*, 2006).

Peptides bound to the groove of MHC class II molecules have a binding core of 8–9-amino acid residues as class I peptides, but have protruding ends, extended outside the groove by a variable number of residues. Since the groove is open at both ends, the flanking sequences are exposed and can influence MHC binding and stability or T-cell recognition (Dai *et al.*, 2008; Lovitch *et al.*, 2006; Sant'Angelo *et al.*, 2002). Class II MHC-associated peptides are often selected in “nested sets” sharing a common 9-mer core (residues P1-P9), with varying lengths of flanking

residues at both ends (Muntasell *et al.*, 2002; Suri *et al.*, 2006). Another property of class II peptides compared to class I is their degree of promiscuity, that is, the capacity of many peptides to be good binders to more than a single allele of HLA-II (Chicz *et al.*, 1993; Hammer *et al.*, 1993).

During antigen processing, class II ligands are generated and displayed on the surface of APCs to direct immune responses to foreign antigens and to guide self-tolerance. The production of the MHC class II ligands occurs in endolysosomal compartments and thus involves extracellular proteins that travel to this location from the outside of the cell by endocytosis or proteins derived from internal cell components that reach the endocytic pathway via vesicle fusion or by targeted protein degradation (Castellino *et al.*, 1997; Cresswell, 1994; Germain, 1994; Watts, 1997). Exogenous and cytoplasmic antigens are processed by distinct routes within APCs. Exogenous antigens including membrane self-proteins are internalized, processed, and bound to class II molecules within endolysosomal compartments. Proteins from different intracellular vesicles or granules are often degraded by fusion of these organelles with the same endocytic compartments. In contrast, cytoplasmic or nuclear autoantigens can be partially degraded in the cytosol and the resulting peptides translocated to endolysosomal compartments for further trimming and intersection with class II molecules (Lich *et al.*, 2000). A consideration to take into account when comparing processing by different cell types concerns the specific proteases involved in the degradation pathways. It is well known that APC have very efficient processing mechanisms that may be different from those of cells whose cellular machinery is dedicated to hormone synthesis (Haque *et al.*, 2007; Muntasell *et al.*, 2002; Suri *et al.*, 2008). Highly specialized cells like the TFC have very high endocytic activity at their apical membrane and express several proteases involved in thyroid function, including cathepsin L, a protease expressed by TECs but not by professional APCs (Nakagawa *et al.*, 1998). Multiple pathways are thus involved in the association of putative ligands to the nascent class II molecules and therefore different peptides generated from the same proteins in different cell types are expected (Li *et al.*, 2005). Moreover the binding properties of the different alleles of MHC class II can be variable, selecting peptides with very different allele specific structural characteristics although some very different alleles can end up selecting similar peptides, as described for the peptides binding to the human and mouse main diabetogenic alleles, HLA-DQ8 and H-2 I-Ag7 (Suri *et al.*, 2005).

2.2. Some technical considerations: The analysis of MHC-associated peptides from tissue samples

Studies of the peptide repertoires associated with MHC molecules started in the early 90s. With them, the structural features of class I and class II natural ligands could be defined, and their parental proteins identified.

The first experiments were done by immunoprecipitation of class I MHC molecules, acid elution of peptides and Edman sequencing of the nonfractionated peptide pool. They demonstrated that some peptide positions were conserved (Falk *et al.*, 1991), suggesting a structural “binding motif” for each MHC allele, defined by the “anchor residues” of the peptides bound to it.

As mentioned above, peptides bound to class II MHC molecules differ from the class I ligands in their length and in the particularity of having extending ends outside the binding site, which made sequencing by Edman degradation not as efficient as for class I ligands, since class II anchor residues could not easily be defined using pool sequencing. However, Edman degradation was used for the identification of very abundant class II ligands (Rudensky *et al.*, 1991). But important advances in the study of natural ligands of MHC molecules came from the incorporation of mass spectrometry (MS), facilitating the identification of individual sequences that conformed the peptide repertoire (Huczko *et al.*, 1993; Hunt *et al.*, 1992a; Kubo *et al.*, 1994). MS made possible the identification of many individual class II natural ligands and the description of the structural features of the peptide repertoires associated with many different class II alleles. A characteristic feature of class II peptides was the common finding that many peptides conforming these repertoires were grouped in nested sets, with a common binding core that interacted with the binding site and different length extensions of the same protein sequence at both ends of the core (Bluestone *et al.*, 1982; Chicz *et al.*, 1992, 1993; Hunt *et al.*, 1992b; Lippolis *et al.*, 2002).

The classical source of HLA molecules and the corresponding peptides has been B-LCLs expressing known HLA alleles. There is a large collection of HLA homozygous B-LCL available from the International HLA Workshop Repository (<http://www.ihwg.org/cellbank/>). B-LCLs grow very efficiently in culture and express high levels of cell surface HLA molecules. Initially, the low sensitivity of the Edman sequencing technique and of the mass spectrometers available required the use of high cell numbers (3×10^{10} cells were normally used) (Verreck *et al.*, 1996). Improvement of MS devices has increased their accuracy and sensitivity. Thus, the new generation of mass spectrometers has made possible to obtain good enough spectra from much lower amounts of peptides. Our laboratory has recently described the peptide repertoire of HLA-DR10 (DRB1*1001) by sequencing 238 natural ligands of this allele from a total of 2×10^9 cells (Alvarez *et al.*, 2008). Currently larger numbers of sequences can be obtained from even lower amounts of cells (Lippolis *et al.*, 2002; Muixí L., unpublished).

This enhanced sensitivity allow to obtain larger number of spectra from decreasing sample sizes but gives rise to a new problem, that is, the analysis of such amount of data. Thus, the advances in the

development of new and more accurate search engines have been an important complement to the improvement of MS devices. These allow the analysis of a very high number of spectra while decreasing the time that the researcher must spend to obtain the sequences. However, it is still necessary the confirmation of individual sequences to avoid false assignments.

Since class I molecules are expressed by practically all nucleated cells, class I peptides have been easily isolated also from *ex vivo* material in different studies (Schirle *et al.*, 2000; Weinschenk *et al.*, 2002). The isolation of natural ligands of class II molecules from these samples is by far more complex because HLA-II is only expressed in normal conditions in professional APCs. However, recently some reports have described successful attempts to purify and sequence natural ligands associated with class II molecules from different *ex vivo* sources (Dengjel *et al.*, 2006; Wahlstrom *et al.*, 2007). It is then possible after the recent technical advances in MS and in the sequence identification programs, to yield information of the class II-associated peptide repertoires from primary tissues.

3. NATURAL LIGANDS FOR HLA CLASS II IN AUTOIMMUNE THYROID TISSUE

3.1. Are HLA class II natural ligands related to the function of their specific T cells?

The identification of the autologous peptides presented by class II MHC molecules in the affected tissue is important for understanding autoimmune diseases: it gives a *bone fide* account on the antigens that T-cell types present in the infiltrates may be recognizing and it is a step to the understanding of autoreactive T-cell selection.

Whatever the mechanism triggering GD, the aberrant expression of HLA class II molecules on TFC may enhance thyroid autoimmunity via direct thyroid autoantigen presentation. But this expression may also be involved in the regulation of the response by presenting autoantigens to one or more populations of regulatory cells. In view of the heterogeneity of the lymphocytic infiltration of the tissue, containing both effectors and regulatory T cells, it is likely that depending on the peptide presented, both functions may be played by the TFC.

In a recent report, we have characterized a number of natural peptides bound to HLA-II molecules from thyroid glands of GD patients, using MS techniques (Muixí *et al.*, 2008). Because we analyzed whole tissue samples from several glands without applying cell separation techniques (Fig. 6.1), the repertoire of peptides corresponded to all the HLA-DR molecules in the tissue. The data demonstrated the heterogeneity of the class II-bound

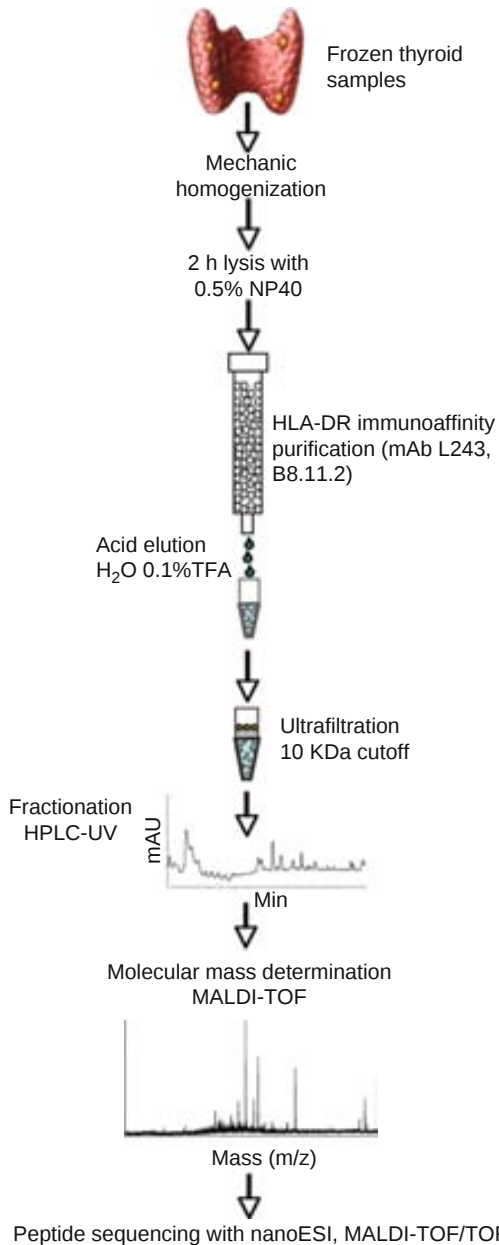


FIGURE 6.1 Protocol for the analysis of DR-associated peptides from thyroid samples of GD patients. (See Plate 10 in Color Plate Section.)

peptides, the generation in the tissue of nested sets of peptides as well as the overwhelming dominance of peptides deriving from ubiquitous self-proteins. We also demonstrated that tissue-specific peptides are generated for their presentation by HLA-DR molecules. A more refined analysis will be required to determine the putative APCs presenting each peptide, but the use of whole tissue samples has advantages, since it has provided complementary information on the tissue milieu. In addition, separation of TFC from the digested tissue requires a minimum of 24 h of culture (Catalfamo *et al.*, 1999; Roura-Mir *et al.*, 1997; Sospedra *et al.*, 1995) that induces downregulation of class II expression, protein degradation, and maybe the modification of the peptide repertoire. Moreover, the yield of thyroid cells obtained from these cultures is low making the use of single-cell-type samples not feasible.

In this work, we were able to identify more than 150 peptides that allowed the partial analysis of the repertoire of peptides associated with DR in autoimmune thyroids. All peptides complied with the known common features of HLA-DR natural ligands: they were variable in length, formed "nested" sets with a common core and varying flanking sequences, and were derived from proteins present in different compartments, including the extracellular milieu, the plasma membrane, vesicular compartments, and the cytosol.

Most peptides came from proteins that would be degraded in the endocytic pathway (Table 6.1). Some were extracellular peptides derived from serum soluble proteins such as complement factors, apolipoprotein, hemoglobin, soluble factors like macrophage migration inhibition factor (MIF), or alpha-1-antitrypsin. Membrane proteins were the next most abundant peptide generators, most from class II MHC molecules or from different cadherins. The next set of "endocytic" peptides corresponded to extracellular matrix proteins, where collagen peptides dominated. Cathepsins were the only endocytic vesicle residents from where peptides were identified.

Within the extracellular peptides, a separate section corresponded to colloid components. Tg and albumin are the most abundant components of the colloid (Baggio *et al.*, 1996) and of the whole thyroid tissue. Although albumin is also a serum protein, the colloid stores large amounts of it, and it seems likely that it would be mostly captured from there. Incidentally, many of the serum proteins generating peptides, such as hemoglobin and complement components, can also be found in the colloid and hemoglobin has been reported to be increased in hyperplastic thyroid tissue (Ribeiro-Carvalho *et al.*, 2002). Most interestingly, we identified eight different peptides corresponding to the well-defined thyroid autoantigen Tg. Two of them were obtained each from TB448 and TB449, and the remaining six were all from the TB471 sample. We will discuss Tg peptides in the next section. Although we do not know if any of these

TABLE 6.1 Peptides generated in the endocytic pathway

Mr (Da)	Sequence	Size (aa)	Source protein	Id no.	L	Sample
1770.0	DIPELVNMGQWKIRA	15	Complement C3 (194–208)	P01024	E	TB448
2014.2	YPKSLHMYANRLLDHR	16	Apolipoprotein B (1200–1215)	P04114	E	TB448
1678.9	REIFNMARQRSR	12	Apolipoprotein B (427–439)	P04114	E	TB448
1765.8	EGLTFQMKKNAEELK	15	A-IV Apolipoprotein (239–253)	P06727	E	TB471
1636.8	GLTFQMKKNAEELK	14	A-IV Apolipoprotein (240–253)	P06727	E	TB471
1395.6	GLTFQMKKNAEE	12	A-IV Apolipoprotein (240–251)	P06727	E	TB471
1690.9	GNRIAQWQSFQLEGG	15	Alpha-2-macroglobulin (172–186)	P01023	E	TB449
1633.9	GNRIAQWQSFQLEG	14	Alpha-2-macroglobulin (172–185)	P01023	E	TB449
1171.6	VLSPADKTNVK	11	Hemoglobin α chain (1–11)	P69905	E	TB449
1683.9	VLSPADKTNVKAAWGK	16	Hemoglobin α chain (1–16)	P01922	E	TB471
3196.9	vlspadktnvkaawgkvgahageygaealer	31	Hemoglobin α chain (1–31)	P01922	E	TB471
3327.4	vlspadktnvkaawgkvgahageygaealerm	32	Hemoglobin α chain (1–32)	P01922	E	TB471
3344.8	vlspadktnvkaawgkvgahageygaealerm	32	Hemoglobin α chain (1–32)	P01922	E	TB471
3473.6	vlspadktnvkaawgkvgahageygaealermf	33	Hemoglobin α chain (1–33)	P01922	E	TB471
2744.4	ktnvkaawgkvgahageygaealerm	32	Hemoglobin α chain (7–32)	P01922	E	TB471
2174.0	AAWGKVG AHAGEYGAEALERM	21	Hemoglobin α chain (12–32)	P01922	E	TB471
3095.5	aawgkvgahageygaealermfsfpttk	40	Hemoglobin α chain (12–40)	P01922	E	TB471
1528.2	VGAHAGEYGAEALER	15	Hemoglobin α chain (17–31)	P01922	E	TB471
2755.4	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVK	24	Hemoglobin α chain (33–56)	P01922	E	TB471
3262.7	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	29	Hemoglobin α chain (33–61)	P01922	E	TB471

3134.6	FLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHGK	28	Hemoglobin α chain (33–60)	P01922	E	TB471
1833.7	TYFPHFDLSHGSAQVK	16	Hemoglobin α chain (41–56)	P01922	E	TB471
2341.2	TYFPHFDLSHGSAQVKGHGKK	29	Hemoglobin α chain (41–61)	P01922	E	TB471
2996.5	VADALTNVAHVNDMPNALSALSDLHAHK	29	Hemoglobin α chain (62–90)	P01922	E	TB471
1087.5	LRVDPVNFK	9	Hemoglobin α chain (91–99)	P01922	E	TB471
3427.9	AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLTSKYR	32	Hemoglobin α chain (110–141)	P01922	E	TB471
2792.5	AAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVL	27	Hemoglobin α chain (110–136)	P01922	E	TB471
1700.0	KFLASVSTVLTSKYR	32	Hemoglobin α chain (127–141)	P01922	E	TB471
2301.3	LVTAAHLPAEFTPAVHASLDK	22	Hemoglobin α chain (106–127)	P69905	E	TB449
1815.0	DKFLASVSTVLTSKYR	16	Hemoglobin α chain (126–141)	P69905	E	TB449
1571.6	FLASVSTVLTSKYR	14	Hemoglobin α chain (128–141)	P69905	E	TB449
1311.6	ASVSTVLTSKYR	12	Hemoglobin α chain (130–141)	P69905	E	TB449
952.4	VHLTPEEK	8	Hemoglobin β chain (1–8)	P02023	E	TB471
3274.7	VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDDEVGGEALGRL	31	Hemoglobin β chain (1–31)	P02023	E	TB471
3387.8	VHLTPEEKSAVTALWGKVNVDDEVGGEALGRLL	32	Hemoglobin β chain (1–32)	P02023	E	TB471
1308.6	LVVYPWTQRF	10	Hemoglobin β chain (32–41)	P02042	E	TB471
1448.7	VVAGVANALAHKYH	14	Hemoglobin β chain (133–146)	P02042	E	TB471
2582.2	VGAHAGEYGAEALERMFLSFPTTK	24	Hemoglobin β chain (17–40)	P01922	E	TB471
2139.1	FESFGDLSTPDAVMGNPKVK	20	Hemoglobin β chain (42–61)	P68871	E	TB471
1910.9	FESFGDLSTPDAVMGNPK	18	Hemoglobin β chain (42–59)	P68871	E	TB471
1274.6	LLVVYPWTQRF	10	Hemoglobin δ chain (31–40)	P02042	E	TB449
1308.2	LVVYPWTQRF	10	Hemoglobin δ chain (32–41)	P02042	E	TB449
1421.8	LLVVYPWTQRF	11	Hemoglobin δ chain (31–41)	P02042	E	TB449
2305.6	PmFIVNTNVPASVPDGFLE	21	Macrophage MIF (2–22)	P14174	E	TB449

(continued)

TABLE 6.1 (continued)

Mr (Da)	Sequence	Size (aa)	Source protein	Id no.	L.	Sample
2089.6	PmFIVNTNVPRASVPDGFL	19	Macrophage MIF (2–20)	P14174	E	TB449
1914.4	IVNTNVPRASVPDGFLSE	18	Macrophage MIF (5–22)	P14174	E	TB449
2384.6	IVNTNVPRASVPDGFLSELTQQ	22	Macrophage MIF (5–26)	P14174	E	TB449
2245.3	LAQATGKPPQYIAVHVVPDQL	21	Macrophage MIF (27–47)	P14174	E	TB449
1886.9	GTQGKIVDLVKELDRDT	17	Alpha-1 antitripsin (188–204)	P01009	E	TB471
1829.9	TQGKIVDLVKELDRDT	16	Alpha-1 antitripsin (189–204)	P01009	E	TB471
1613.9	TQGKIVDLVKELDR	14	Alpha-1 antitripsin (189–202)	P01009	E	TB471
1374.6	KAVLTIDEKGTEA	13	Alpha-1 antitripsin (359–371)	P01009	E	TB471
1501.8	KAVLTIDEKGTEAAG	15	Alpha-1 antitripsin (359–373)	P01009	E	TB471
1737.6	VHKAVLTIDEKGTEAAG	17	Alpha-1 antitripsin (357–373)	P01009	E	TB471
1906.0	AHLLILRDTKTYMLAF	16	Alpha-1 acid glycoprotein (117–132)	P02763	E	TB471
1758.9	AHLLILRDTKTYMLA	15	Alpha-1 acid glycoprotein (117–131)	P02763	E	TB471
1631.9	SWNSGALTSGVHTFPA	16	Ig gamma-1 C chain (40–55)	P08157	E	TB449
1296.7	DRVYIHPFHL	10	Angiotensin (34–43)	ANHU	E	TB449
1774.1	KVKKIYLDEKRLLAG	15	SPARC-like 1 protein(556–570)	Q14515	E	TB471
1629.8	DVG VYRAVTPQGRPD	15	DQB1*0602 β chain (75–89)	P03992	M	TB448
1676.8	DVGEYRAVTELGRPD	15	HLA-II β chain DRB1*4 (72–86)	P13760	M	TB448
1567.0	TNPPEVTVLTNSPV	15	HLA class II, DR α chain (108–122)	P01903	M	TB449

1310.8	WRLEEFGRFA	10	HLA classe II, DR α chain (68–76)	P01903	M	TB449
1409.8	VWRLEEFGRFA	11	HLA classe II, DR α chain (67–76)	P01903	M	TB449
1744.0	WLRNGKPVTTGVSETV	16	HLA class II DR α chain (146–161)	P01903	M	TB449
1845.1	TWLRNGKPVTTGVSETV	17	HLA class II, DR α chain (145–161)	P01903	M	TB449
2846.4	AVTELGRPDAEYWNSQKDLLEQKR	24	HLA class II, DRB1–4 β chain (78–101)	P13760	M	TB471
2690.5	AVTELGRPDAEYWNSQKDILEQK	23	HLA class II, DRB1–4 β chain (78–100)	P13760	M	TB471
1489.0	EDIVADHVASYGVN	14	HLA class II, DQ(2,6,3) α chain (24–37)	P04226	M	TB449
1937.1	EQFYVDLDKKKETVWH	15	MHC class II (61–75)	Q95HB9	M	TB449
1397.7	RFDSDVGEFRAV	12	HLA class II, DR, DP DQ cadena β (68–79)	P01911	M	TB449
1257.6	FDSVDGEYRAV	11	HLA class II, DRB3–1 cadena β (69–79)	P79483	M	TB449
1626.9	KEYFAIDNSGRIIT	14	Cadherin-5 (197–210)	P33151	M	TB449
1684.0	GKEYFAIDNSGRIIT	15	Cadherin-5 (196–210)	P33151	M	TB449, TB471
1609.8	SVPRYLPRPANPDE	14	Epithelial Cadherin (E-Cadherin) (793–806)	P12830	M	TB471

(continued)

TABLE 6.1 (continued)

Mr (Da)	Sequence	Size (aa)	Source protein	Id no.	L.	Sample
1728.1	QLQPDNSTLTWVKPT	15	Phospholipase C (883–897)	Q9HBX6	M	TB449
1594.0	AAGLLSTYRAFLSSH	15	Collagen α 1 chain (XV) (1243–1257)	P39059	ECM	TB448, TB449
1522.8	AGLLSTYRAFLSSH	14	Collagen α 1 chain (XV) (1244–1257)	P39059	ECM	TB448, TB449
1915.1	DPSPSPVLGYKIVYKPVG	18	Collagen α 1 chain (XII) (2137–2154)	Q5VYK1	ECM	TB471
1661.0	RLPIIDVAPLDVGAPD	16	Collagen α 1 chain (I) C-term propeptide (1436–1451)	P02452	ECM	TB448
1863.0	RPKDYEVDTLKLNN	16	Collagen α 2 chain (I) C-term propeptide (1129–1144)	P08123	ECM	TB448
1530.4	GTLIIRDVKESDQG	14	Heparan sulfate proteoglycan (462–475)	P98160	ECM	TB449
1795.0	YGELRFTVTQRSQPG	16	Heparan sulfate proteoglycan (1005–1020)	P98160	ECM	TB448
1633.0	GCELRTFTVTQRSQPG	15	Heparan sulfate proteoglycan (1006–1020)	P98160	ECM	TB448
1720.0	IRASYAQQPAESRVSG	16	Heparan sulfate proteoglycan (1089–1104)	P98160	ECM	TB448
1895.1	DVPKWISIMTERSVPH	16	Annexin II (208–223)	P07335	ECM	TB448
1857.0	IGSSYFPEHGYFRAPE	16	Multimerin 2 (851–866)	Q9H8L6	ECM	TB449

1442.8	SRAGLELGAEETI	14	Nidogen-2 (NID-2) (1167–1180)	Q14112	ECM	TB449
1660.8	YDHNFVKAINAIQK	14	Cathepsin C (170–183)	P53634	V	TB448
1827.0	NIFSFYLSRDPDAQPG	16	Cathepsin D (227–241)	P07339	V	TB448
1687.0	LKKYLYEIARRHP	13	Serum albumin (159–171)	P02768	Co	TB448, TB449
2030.0	CPTPCQLQAEQAFRLTVQ	18	Tg (726–743)	P01266	Co	TB448
1220.5	SRTSGLLSSWK	11	Tg (1080–1090)	P01266	Co	TB471
1670.0	LSSVVVDPSIRHFDV	15	Tg (2098–2112)	P01266	Co	TB449
1970.9	QVDQFLGVPIAAPPLAER	18	Tg (2224–2241)	P01266	Co	TB471
1274.4	IGSSQDDGLINR	12	Tg (2508–2519)	P01266	Co	TB471
1880.8	AKAVKQFEESQGR TSSK	17	Tg (2520–2536)	P01266	Co	TB471
1477.7	AKAVKQFEESQGR	13	Tg (2520–2532)	P01266	Co	TB471
1059.4	LSLQEGSKT	10	Tg (2756–2765)	P01266	Co	TB471

Tg, thyroglobulin; MIF, migration inhibition factor; MHC, major histocompatibility complex.

peptides are associated with class II molecules expressed by the TFC rather than by other class II expressing cells, the common presence of colloid components together with the important endocytic activity at the apical membrane of the TFCs suggested that at least some of these peptides can indeed be associated with DR molecules expressed by TFC. An attractive possibility would be if tissue DC could also capture colloid antigens by the capability of “crossing” the thyroid epithelium with their dendritic extensions, as found for DC in the intestinal epithelium (Chieppa *et al.*, 2006; Vallon-Eberhard *et al.*, 2006).

Otherwise the repertoire of “endocytic peptides” was as expected. With the exception of Tg, all other source proteins were nontissue-specific and peptides were similar to others from the same origin described in other works (Dengjel *et al.*, 2006; Muntasell *et al.*, 2002). All represented ubiquitous and abundant tissue components and many coincided with those isolated from HLA-DR molecules in endocrine epithelial cell transfectants (Muntasell *et al.*, 2002).

The peptides putatively generated in the cytosolic pathway were somehow different. Cytosolic peptides derived mostly from enzymes, although none of them was exclusive of thyroid tissue. These peptides were quantitatively less abundant and accordingly, fewer nested sets were found. However, some have been previously found in other studies, including various histone and GAPDH peptides (Table 6.2) (Dengjel *et al.*, 2006; Muntasell *et al.*, 2002).

Since most of the samples were heterozygous and there was only partial coincidence in the HLA class II typing between them, one of the uncertainties was if the peptides could really be identified as binders to one or other of the DR molecules expressed by each sample. An important issue that arose from these results was therefore the assignment of a sequence to an allele when several are present, as expected from samples of human tissue. The difficulty is based on the designations of the core segment. The main anchor residues vary greatly and are influenced by various other residues in the anchor sites. Prediction algorithms for HLA binding can be used to provide an indication that peptides identified by MS techniques actually bind the HLA of interest, but a confirmation can only come from direct binding studies with purified MHC molecules. Furthermore, a final assignment of any peptide sequence to an HLA allele can never be completely certain unless T-cell data are generated; even binding data may not be enough when discussing about self-peptides, since their binding affinities are often low and peptide binding experiments with class II molecules are not very efficient. However, when we are dealing with a large number of peptides, none of the above is feasible. Therefore, bioinformatic analysis using prediction algorithms is a useful tool if at least some confirming binding data can be provided.

TABLE 6.2 Peptides generated in the cytosolic pathway

Mr (Da)	Sequence	Size (aa)	Source protein	Id no.	L.	Sample
2031.2	AFTPEGERLIGDAAKNQLT	19	BIP (67–85)	P11021	ER	TB449
1511.7	AKFEELNMDLFR	12	BIP Protein (325–336)	P11021	ER	TB471
1637.6	AKVAVLGASGGIGQPLSL	18	Malate deshydrogenase (25–42)	P40926	mit	TB449
1600.9	RGNSIIMLEALERV	14	small G nuclear ribonucleoprotein (63–76)	Q15357	N	TB449
1919.3	RLLLPGELAKHAVSEGTK	18	Histone H2B K (99–116)	P62807	N	TB449
1416.9	RLLLPGELAKHAV	13	Histone H2B. (99–111)	P62807	N	TB449
1175.7	FLENVIRDAV	10	Histone H4 (61–70)	P62805	N	TB449
1999.0	PAAPAAPAPAEKTPVKKKAR	20	Histone H1.4 (Histona H1b) (5–24)	P10412	N	TB471
2044.0	S (Acet) ETAPAAPAAAPPAEKAPVKK	21	Histone H1.2 (1–21)	P16403	N	TB471
2171.8	S (Acet) ETAPAAPAAAPPAEKAPVKKK	22	Histone H1.2 (1–22)	P16403	N	TB471
1331.7	GAPAAATAPAPTAHK	15	Histone H1 (129–143)	Q92522	N	TB471
1733.9	GELEKEEAQPIVTKY	15	hnRNP U-like 2 (611–625)	Q1KMD3	N	TB449
1004.6	IKEESKTAV	9	Kynetocor Protein CENP-F (2346–2354)	P49454	N	TB449
2953.2	sgnfggsrnmggpygggnygpggsggsggyggr	33	hnRNP A2/B1 (318–350)	P22626	N	TB471

(continued)

TABLE 6.2 (continued)

Mr (Da)	Sequence	Size (aa)	Source protein	Id no.	L	Sample
1613.8	KPGQFIRSVDPDSPA	15	NHERF (174–188)	O14745	C	TB448
1449.8	EDFRDGLKLMLL	12	α Actinin 1(57–68) or α actinin 4 (76–87)	P12814	C	TB448
1214.6	TVDGPSGKLWR	11	GAPDH (186–196)	P04406	C	TB471
1739.8	DGRGALQNIIPASTGAAK	18	GAPDH (197–214)	P04406	C	TB471
1763.8	LISWYDNEFGYSNR	14	GAPDH (310–323)	NP002037	C	TB449
1650.2	ISWYDNEFGYSNR	13	GAPDH (311–323)	NP002037	C	TB449
1735.8	SWYDNEFGYSNRVV	14	GAPDH (312–325)	P04406	C	TB449
1362.7	VVDLMAHMASKE	12	GAPDH (324–335)	NP002037	C	TB449
1521.0	DGVIKVFNDMKVR	13	Cofilin-1 (8–20)	P23528	C	TB449
2043.2	TGGASGLGLATAERLVQGASAV	23	3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (16–38)	Q99714	C	TB449
1687.1	RVMTIAPGLFGTPLL	16	3-Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (192–207)	Q99714	C	TB449
1362.4	mLLIPTSFSPK	12	NipSnap4 protein (236–247)	Q9UFN0	C	TB449
1730.9	FDPIIEDRHGGYKPS	15	B chain, creatine kinase (89–103)	P12277	C	TB449
1643.8	FDPIIEDRHGGYKP	14	B chain, creatine kinase (B-CK) (89–102)	P12277	C	TB449
1714.4	AVPSPPPASPRSQYNF	16	Serin protease (134–149)	O43464	C	TB449

2013.4	AVPSPPPASPRSQYNFIAD	19	Serin protease (134–152)	O43464	C	TB449
1926.0	GRMHAPGKGLSQSALPYR	18	Ribosomal protein 40S S13 (1–18)	P62277	C	TB471
1956.9	QVTQPTVGMNFKTTPRGPV	18	Ribosomal protein 40S S17 (107–134)	P08708	C	TB471
1059.5	IPDWFLNR	8	Ribosomal protein 40S S18 (79–86)	P62269	C	TB471
1324.5	LITPAVVSERLK	12	Ribosomal protein 40S S25 (67–78)	P62851	C	TB471
1807.0	IYTRNTKGGDAPAAGEDA	18	Ribosomal protein S25 (108–125)	P62851	C	TB449
1470.7	YYKVDENGKISR	12	Ribosomal protein 40S 27 (29–40)	P62979	C	TB471
1688.6	ASGNYATVISHNPETK	16	Ribosomal protein 60S L8 (128–143)	P62917	C	TB471
1457.6	AGNLGGGVVTIERSK	15	Ribosomal protein 60S L22 (52–66)	P35268	C	TB471
1894.0	AYVRLAPDYDALDVANK	17	Ribosomal protein 60S L23a (136–152)	P62750	C	TB471
1504.9	RYSVDIPLDKTVV	13	Ribosomal protein 60S L27	P61353	C	TB449
1699.9	TGKNKWFFQKLR	13	Ribosomal protein 60S L27 (123–135)	P61353	C	TB471
1709.9	TGAAPIIDVVRSGYYK	16	Ribosomal protein 60S L27a (94–109)	P46776	C	TB471
2167.3	LLTEAPLNPKANREKMTQI	19	Actin (106–124)	P63261	C	TB449

(continued)

TABLE 6.2 (continued)

Mr (Da)	Sequence	Size (aa)	Source protein	Id no.	L	Sample
2094.0	SYELPDGQVITIGNERFR	18	Actin (alpha, beta, gamma) (239–256)	P60709	C	TB471
1161.4	EITALAPSTMK	11	Actin (alpha, beta, gamma) (316–326)	P60709	C	TB471
1543.8	DTNADKQLSFEEF	13	Calgranulin B (67–79)	P06702	C	TB449

For assigning sequences to each allele, having a well-defined binding motif is needed to allow the search for the right anchor residues of the core. Some items as the presence or not of the relevant P1 residue are considered very definitive and are indeed so in our experience (Alvarez *et al.*, 2008; Muntasell *et al.*, 2004). In our samples, assigning sequences to alleles with strong binding motifs was relatively easy, for example, DR3, where in addition to the P1, a Glu or Asp residue is favored in position P4 of the core. Other motifs are less well defined, as for DR7, so the degree of confidence was lower. In some alleles, such as DR8 (DRB1*0801), there is not a defined motif. In addition, DR8 peptides tend to be longer than the usual DR-associated peptides, so no clear assignment could be done. For the final assignment, bioinformatic tools were used and several published analysis systems tested and the results were mostly coincident between them (Muixí L., unpublished data). For completeness, we finally chose one of these programs (ProPred, www.imtech.res.in/raghava/propred/) that scan all possible P1 to P9 residues in each peptide sequence for a large number of HLA-DR alleles ($n = 51$). The binding affinity of the peptides once the allele is assigned is relevant, particularly when studying self-peptides in an autoimmune tissue. The balance between high and low binders may be important for determining tolerance to a given epitope in the thymus, so maybe we should not expect many high binders to be good candidates as target epitopes. Lower binders, in contrast, may have to compete in the thymus for a given allele and one result may be the absence of tolerance to that epitope. A systematic approach comparing all the peptides is not feasible right now, but comparing binding affinities of some peptides with their capacity of activating or regulating T-cell responses would be very informative. Studies of the T-cell populations recognizing the peptides should be needed for such an analysis.

3.2. The case of Tg

The isolation of Tg peptides in three samples of GD thyroids with different DR haplotypes can be relevant to the study of AITD and of autoimmunity in general. Table 6.3 shows the details of each of the Tg peptides identified. Except for two of the peptides (Tg2520–2532 and Tg2520–2536), no nested sets were found. The alleles to which the peptides were assigned were first calculated by the ProPred program (www.imtech.res.in/raghava/propred/), and only two assignments were possible: Tg726–743 from TB448 was apparently associated with DR51 (DRB5*0101 of the DR15 haplotype) and showed an intermediate score for DR15 and Tg2098–2108 from TB449 showed association to DR3 with relatively high scores (Muixí *et al.*, 2008). No allele included in the ProPred database appeared to associate to any of the Tg peptides from sample TB471 (DRB1*0301, B1*0801). The absence of theoretical binding do not necessarily exclude

TABLE 6.3 Thyroglobulin peptides isolated from human GD thyroid samples

Sample	HLA-DR	Mr (Da)	Sequence	Size (aa)	Protein
TB448	DRB1*1501	2031.00	CPTPCQLQAEQAFLRTVQ	18	Tg (726–743)
	DRB1*0407				
TB449	DRB1*0301	1669.99	LSSVVVDPSIRHFDV	15	Tg (2098–2108)
	DRB1*1501				
TB471	DRB1*0301	1477.69	AKAVKQFEESQGR	13	Tg (2520–2532)
	DRB1*0801	1880.78	AKAVKQFEESQGR TSSK	17	Tg (2520–2536)
		1970.94	QVDQFLGVPYAAPPLAER	18	Tg (2224–2241)
		1274.40	IGSSQDDGLINR	12	Tg (2508–2519)
		1220.52	SRTSGLLSSWK	11	Tg (1080–1090)
		1059.40	LSLQEPGSKT	10	Tg (2756–2765)

Tg, thyroglobulin.

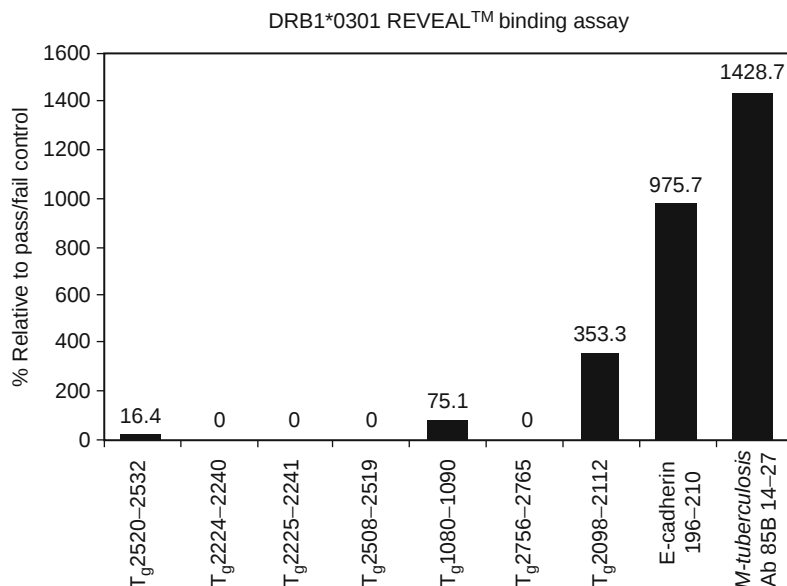


FIGURE 6.2 Cell-free binding assay. HLA-DR3 binding experiments were performed by Proimmune®, using their cell-free class II REVEAL™ binding assay (Muixi *et al.*, 2008). Sequences of the different peptides were: Tg2520–2532 (AKAVKQFEESQGR); Tg2224–2240 (QVDQFLGVPYAAPPLAE); Tg2225–2241 (VDQFLGVPYAAPPLAER); Tg2508–2519 (IGSSQDDGLINR); Tg1080–1090 (SRTSGLLSWK); Tg2756–2765 (LSLQEPGSKT); Tg2098–2112 (LSSVVVDPSIRHFDV) assigned to DR3 by ProPred; E-Cadherin 196–210 (GKEY-FAIDNSGRIIT) assigned to DR3 by ProPred; DR3 positive control peptide, *Mycobacterium tuberculosis* Ab 85B 14–27 (PSPSMGRDIKVQFQ).

the binding of the peptide to that particular allele, it may bind weakly although the probability is low (see Fig. 6.2). Besides, they could either be binding to DR8 (DRB1*0801), or to the DRB3 allele associated with DR3 (DRB3*0101), for which there are not well-defined motifs.

3.2.1. Peptide binding analysis of all Tg peptides yielded some results

In a first set of experiments, the 16 peptides from TB448 were synthesized and analyzed for binding to HLA class II negative bare lymphocyte syndrome (BLS) cells transfected with either HLA-DR15 (DRA1*0101/DRB1*1501) or HLA-DR51 (DRA1*0101/DRB5*0101), of the DR2 haplotype (Norrby-Teglund *et al.*, 2002) by a competition assay (Arndt *et al.*, 2000). In brief, peptides to be tested were incubated with the cells at 37 °C for 3 h in the presence of a control biotinylated peptide specific of each HLA-DR allele (MBP83–99 and MBP85–98 for DR15 and DR51, respectively). Cells were then lysed and HLA-DR-biotinylated peptide

complexes were quantified by ELISA by time-resolved fluorescence, using a europium-streptavidin label. The binding capacity of each peptide was measured as the percent inhibition of control peptide binding. The data are summarized in [Table 6.4](#). Most peptides could be assigned to one or the other allele (or both) and a few could only be theoretically assigned to the other DRB1 allele expressed by the donor (DRB1*0407), for which no transfectants were available. The results showed that Tg726–743 had some moderate binding capacity to both DR15 and DR51. Of the other peptides, some showed considerable binding capacity to DR15, and some were positive for DR51, but with lower levels. Those that were negative or very low for both alleles, showed theoretical binding to DR407 (DRB1*0407). Only one peptide (collagen alpha 1436–1451) showed no binding. Modeling of the Tg726–743 peptide associated with DR15 and DR51 separately suggested that the association was more stable with DR51 ([Muixí *et al.*, 2008](#)).

With Tg peptides from samples TB449 and TB471, a cell-free peptide binding assay could be done, only with DR3 and DR15 molecules, since we did not have any of the other alleles available in soluble form. The DR3 association of Tg2098–2108 was confirmed, showing a good but relatively weak binding affinity, as compared to the control peptide and to the binding to a nontissue-specific peptide from the same thyroid sample, that was also assigned to DR3, E-cadherin 196–210. None of the other Tg peptides showed positive binding to DR3 ([Fig. 6.2](#)). In summary, the Tg peptides capable of binding to one of the HLA-DR alleles tested, showed moderate binding affinity.

Thyroglobulin is a very large autoantigen of 2749 aa that is extensively modified by iodination and other posttranslational events. Iodinated Tg peptides are highly immunogenic and can trigger thyroid autoreactive T cells. Iodine can modify the processing of Tg by APC, resulting in the generation of pathogenic epitopes ([Carayanniotis, 2007](#); [Dai *et al.*, 2005](#); [Jiang *et al.*, 2007](#); [Verginis *et al.*, 2002](#)). However, all the Tg peptides that were isolated from our samples were noniodinated epitopes.

Although the pathological relevance of the Tg peptides that we have identified cannot be determined without *in vivo* studies, they were compared to Tg epitopes identified by other means in studies with both human and mouse AITD. [Table 6.5](#) shows a summary of such epitopes. The most interesting peptide by far was shown to be the DR3-associated Tg2098–2112 peptide from TB449. [Flynn *et al.* \(2004\)](#) had used a computer-based predicted set of 39 synthetic DR3-binding Tg peptides that were screened against T cells from EAT⁺DR3-transgenic mice. Only one out of four peptides capable of stimulating T-cell responses, LSSVVVDPSIRHFDV (identical to Tg2098–2112), could induce the disease both by direct peptide immunization and by adoptive transfer of peptide-activated T cells. Putting the data together, the *in vivo* generation

TABLE 6.4 Binding of TB448 peptides to DR15 and DR51 alleles

Sequence	Size	Protein	% Inhib DRB1*1501 (DR2b)	Core ^a	% Inhib DRB5*0101 (DR2a)	Core ^a	Theoretical binding to DRB1*0407 ^b
GGELRFTVTQRSQPG	15	Heparan sulfate proteoglican (1006–1020)	59	LRFTVTQRS	16	LRFTVTQRS	NO
DIPELVNMGQWKIRA	15	Complement C3 (194–208)	96	LVNMGQWKI	6	LVNMGQWKI	NO
YGELRFTVTQRSQPG	16	Heparan sulfate Proteoglican (1005–1020)	35	LRFTVTQRS	26	LRFTVTQRS	NO
DVGVIYRAVTPQGRPD	15	DQB1*0602 β chain (75–89)	30	VGVYRAVTP	19	YRAVTPQGR	NO
AAGLLSTYRAFLSSH	15	Collagen $\alpha 1$ (XV) (1243–1257)	97	LSTYRAFLS	20	LLSTYRAFL	NO
AGLLSTYRAFLSSH	14	Collagen $\alpha 1$ chain (XV) (1244–1257)	91	LSTYRAFLS	43	LLSTYRAFL	NO
CPTPCQLQAEQAFLRTVQ	18	Thyroglobulin (726–743)	40	LQAEQAFLR	32	LQAEQAFLR	NO
YPKSLHMYANRLLDHR	16	Apolipoprotein B (1200–1215)	93	LHMYANRL	22	LHMYANRL	NO
IRASYAQQPAESRVSG	16	Heparan sulfate proteoglican (1089–1104)	10	IRASYAQQP	23	YAAQPAESR	NO

(continued)

TABLE 6.4 (continued)

Sequence	Size	Protein	% Inhib DRB1*1501 (DR2b)	Core ^a	% Inhib DRB5*0101 (DR2a)	Core ^a	Theoretical binding to DRB1*0407 ^b
EDFRDGLKLMLL	12	α actinin 1 (57–68) or α actinin 4 (76– 87)	–25	FRDGLK L ML	31	F RDGLKLML	NO
YDHNFKVKA I NAIQK	14	Cathepsin C (170–183)	–5	V K A I N A I Q K	43	VKA I NA I Q K	FVK A I N A I Q K
KPGQFIRSVDPDSPA	15	NHERF (174– 188)	7	I RSVDPDSP	9	IRS V DPDSP	FIRSVDPDS
RPKDYEVDATLKSLLN	16	Collagen α 2 (I) C-Term propeptide (1129–1144)	15	YEVDAT L KS	13	Y EVDATLKS	YEVDATLKS
NIFSFYLSRDPDAQPG	16	Cathepsin D (227–241)	2	I FS F YLSRD	–4	IFSFYLSRD	FYLSR D PA
LKKYLYEIARRHP	13	Serum Albumin (159–171)	–18	L KK Y LYEIA	16	Y LYEIARRH	Y LYEIARRH
RLPIIDVAPLDVGAPD	16	Collagen α 1 (I) C-term peptide (1436–1451)	11	I IDVAP L DV	–12	L PIIDVAPL	NO

^a Best core sequence according to ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>).^b Best core sequence fitting to the DRB1*0407 motif (<http://www.syfpeithi.de>).

Bold letters in core sequences correspond to anchor residues

TABLE 6.5 Summary of pathogenic thyroglobulin epitopes from mouse models of experimental thyroiditis

Position	Historical name	Sequence	MHC restriction	Type of T-cell epitope	Tg	EAT induction		T-cell response <i>in vitro</i>	Peptide-specific IgG	Ref.
						Direct	Adoptive			
1–12	T4(5)	NIFEYQVDAQPL	k, s	–	Tg	Weak	$k > s$	±	ND	(Kong <i>et al.</i> , 1995; Wan <i>et al.</i> , 1997)
179–197	hTg179	NTTDMMIFDLVHSYNRFPD	E ^b	–	hTg	+	–	+	+	(Brown <i>et al.</i> , 2008)
181–195	hTg181	TDMMIFDLVHSYNRF	DR3	–	hTg	Weak	–	+	Low	(Flynn <i>et al.</i> , 2004)
410–424	hTg410	QSQQFSVSENLLKEA	E ^b	Dominant	hTg	+	+	ND	ND	(Brown <i>et al.</i> , 2008)
418–432	hTg418	ENLLKEAIRAIFPSR	DR3	–	hTg	ND	ND	+	ND	(Flynn <i>et al.</i> , 2004)
1518–1532	p1518	GSGKAFCDVDEGGRRL	DR3	–	hTg	ND	ND	+	Low	(Flynn <i>et al.</i> , 2004)
1671–1710	F40D	KRFEPTGFGQNLGLY NPIVFSASGANLTDA HLFCLLACD	K	–	hTg	+	ND	ND	+	(Texier <i>et al.</i> , 1992)
2079–2093	p2079	LSSVVVDPSIRHFDV	DR3	Subdominant	hTg	+	+	+	Low	(Flynn <i>et al.</i> , 2004)
2340–2359	p2340	QVAALTWVQTHIRGFGGDP	E ^k , DR3	Subdominant	hTg	Weak	ND	+	+	(Karras <i>et al.</i> , 2003; Karras <i>et al.</i> , 2005)
2730–2743	–	GLREDLLSLQEPGS	K	–	hTg	–	+	+	ND	(Hoshioka <i>et al.</i> , 1993)
2550–2561	T4 (2553)	STDDYASFSTRAL	A ^k	Subdominant	h, mTg	–	+	+	+	(Dai <i>et al.</i> , 1999; Hutchings <i>et al.</i> , 1992; Kong <i>et al.</i> , 1995)
2596–2608	p2596	YGHGSLELLADVQ	A ^k	Subdominant	h, mTg	+	+	+	+	(El Hassani <i>et al.</i> , 2004; Verginis <i>et al.</i> , 2002)
2496–2512	TgP1, p2495	GLINRAKAVKQFEESQG	E ^k	Cryptic	m, rTg	+	ND	+	+	(Chronopoulou and Carayanniotis, 1992; Dai <i>et al.</i> , 1999)
121–130	p117	VQCWCVDTEGMEVYGT	A ^k	–	mTg	Weak ^a	+ ^a	+ ^a	+ ^a	(Li and Carayanniotis, 2006)
181–192	p179	NTTDMMIFDLIHNNR	E ^k , A ^k	–	mTg	Weak	–	+	–	(Li <i>et al.</i> , 2007)

(continued)

TABLE 6.5 (continued)

Position	Historical name	Sequence	MHC restriction	Type of T-cell epitope	Tg	EAT induction		T-cell response <i>in vitro</i>	Peptide-specific IgG	Ref.
						Direct	Adoptive			
181–195	mTg179	NTTDMMIFFDLIHNYNRFPD	E ^b	–	mTg	+	–	+	+	(Brown <i>et al.</i> , 2008)
306–316	p304	GHYQTVQCQTEGMCW	A ^k	–	mTg	– ^a	+ ^a	+ ^a	Low	(Li and Carayanniotis, 2006)
306–320	p306	YQTVQCQTEGMCWCV	A ^k	Subdominant	mTg	+	+	+	–	(Verginis <i>et al.</i> , 2002)
409–423	mTg409	HYQRLSESRSLLREA	E ^b	Subdominant	mTg	Weak	weak	+	Low	(Brown <i>et al.</i> , 2008)
1577–1591	p1579	LVQCLTDCANDEA	A ^k	Subdominant	mTg	Weak	+	+	–	(Verginis <i>et al.</i> , 2002)
1823–1837	p1826	GDMATELFSP	A ^k	Subdominant	mTg	Weak	+	+	–	(Verginis <i>et al.</i> , 2002)
1931–1945	p1931	KVVLNDKVNIFYTRL	A ^k	–	mTg	Weak ^a	+ ^a	+ ^a	–	(Li and Carayanniotis, 2006)
2102–2116	p2102	SMAQDFCLQCSCRHQ	A ^k	Subdominant	mTg	–	+	+	+	(Verginis <i>et al.</i> , 2002)
2496–2504	TgP1	LINRAKAVK	E ^k , A ^s	–	mTg	+	ND	+	+	(Rao <i>et al.</i> , 1994)
2499–2507	TgP1	RAKAVKQFE	A ^k , A ^s	–	mTg	Weak	ND	–	–	(Rao <i>et al.</i> , 1994)
2532–2543	P2529	EDSDARILAAAVWYYSL	E ^k , A ^k	–	mTg	Weak	ND	+	+	(Li <i>et al.</i> , 2007)
2542–2552	P2540	VWYYSLHSTDDYAS	A ^k	–	mTg	Weak	ND	+	+	(Li <i>et al.</i> , 2007)
2694–2705	–	CSFWSKYIQTlk	A ^s	Subdominant	mTg	+	ND	+	+	(Rao <i>et al.</i> , 1999)
2696–2707	–	FWSKYIQTlkDA	A ^s	–	mTg	ND	+	+	+	(Rao and Carayanniotis, 1997)
2696–2713	TgP2, p2695	FWSKYIQTlkDADGAKDA	A ^s	Subdominant	rTg	Weak	+	+	+	(Carayanniotis <i>et al.</i> , 1994)

^a Only the iodinated form of the peptide.

Underlined shared sequences with peptide eluted from GD thyroid samples.

ND, not determined.

of a potential pathogenic Tg peptide presented by DR3 in a human thyroid affected by GD was demonstrated. Our data also confirm the suggestion by the authors that the peptide was likely a natural DR3 ligand and consequently that a computer algorithm can predict a peptide identical in size and sequence to a naturally processed peptide.

Other natural Tg peptides could be related to previously published pathogenic peptides, although not such direct relationship was found.

Tg 2756–2765 from TB471 is a small peptide (LSLQEPGSKT) that could not be assigned to any DR allele of those analyzed. Its sequence is part (underline) of a shared immunogenic T-cell epitope between hTg and hTPO (Tg2730–2743, in the alternative nomenclature) that is related to the development of experimental autoimmune thyroiditis in H-2^k haplotype mice (Hoshioka *et al.*, 1993). The sequence of the epitope is GLREDLLSLQEPGS and it is located at the C terminus of the Tg next to a hormonogenic tyrosine residue.

Two TB471 adjacent peptides: IGSSQDDGLINR (Tg2508–2519) and AKAVKQFEESRGRITSSK (Tg2520–2536) are contained in a sequence that has been shown to be a cryptic peptide in mouse experimental thyroiditis (TgP1, p2495, or Tg2495–2511, corresponding to the sequence GLINRA-KAVKQFEESQG of the mouse Tg). This peptide is only generated when mice are immunized with highly iodinated Tg (Dai *et al.*, 2002). The same region of the Tg sequence was used to delineate the 9-mer (2495–2503) corresponding to the minimal T-cell epitope to induce EAT in E^k mice, capable to be presented by several MHC alleles (Rao *et al.*, 1994). This epitope, despite its small size, still included part of the same two natural peptides. In the same work, another 9-mer (2498–2506) from the same region was also pathogenic for A^k mice. Comparative analysis of the different peptides should be performed to identify a relationship between the natural human peptides and the homologous mice pathogenic epitopes.

It remains to be clarified whether DR51-Tg726–743 or any other DR-Tg complex expressed in human GD thyroids are also potentially pathogenic or related to the regulation of the autoimmune response.

The binding data of Tg peptides compared to other natural ligands from the same sample are interesting (Muixí *et al.*, 2008). When analyzing the binding to HLA-DR3, we found that one of the ubiquitous abundant peptides (E-cadherin 196–210) did bind to HLA-DR3 with high affinity (Fig. 6.2). Binding of the same allele by the putatively pathogenic Tg2098–2112 peptide was however much lower. The affinity of this peptide, albeit positive, is below 50% of the affinity of the cadherin peptide for the same allele. Being a protein involved in multiple function and present in most tissues we can presume that tolerance to cadherin should be efficient and no reactive T cells are expected to be found in the periphery. If these two peptides are generated *in vivo* in the thymus, the Tg peptide would have

difficulty in competing for the binding to DR3 and some cells reactive to this epitope could more readily escape selection.

Further analysis of peptide binding affinities and identification of T cells recognizing HLA-DR complexes with ubiquitous or restricted peptides will give answers as to the potential role of the different peptides in the disease.

3.3. TPO and TSHR peptides

No peptides from these two antigens were detected in our studies. It is obvious that the abundance of these other two molecules is nothing compared to Tg, and a great improvement of the sensitivity of the technique will be necessary to identify them (Rapoport and McLachlan, 2007). In the meantime, there are data available on TSHR peptides' affinity for DR3 and their relation to T-cell responses against the antigen. A study on the binding properties of TSHR to HLA-DR3 showed that DR3 molecules bind TSHR T-cell reactive peptide epitopes with intermediate affinity but nonimmunogenic peptides were mostly poor or no binders. However, there was a single peptide with the highest binding affinity that was not capable of eliciting T-cell responses (Sawai and DeGroot, 2000). A larger analysis of binding specificity of TSHR peptides showed that peptides bound to susceptible DR alleles with intermediate or low affinity, whereas the peptides binding to protective allele HLA-DR7 were high binders (Inaba *et al.*, 2006).

T-cell epitopes from TPO are well defined (McLachlan and Rapoport, 2007), most of them belong to a region of the TPO molecule with homology with granulocyte myeloperoxidase, but no clear immunodominant peptide has been identified. Processing by TFC appears to be essential for recognition of at least one cryptic TPO epitope (Quaratino *et al.*, 1995), although B-cell processing by means of specific immunoglobulins uptake appear to be important since TPO autoantibodies influence T-cell recognition of some epitopes (Guo *et al.*, 1996; Quaratino *et al.*, 2005).

4. CONCLUDING REMARKS

The issue of the utility of peptides as vaccines for cancer or autoimmunity should be reopened in view of new data. MHC-bound peptides are indeed potentially very interesting but their role in T-cell recognition is very variable and they can be used as inhibitory as well as enhancing agents. The line between these two functions is anyway fragile, since there is no evidence of any difference between peptides recognized by effectors or by regulatory cells. Analysis of tolerogenic versus activating peptides could give some answers, but the identification of T cells and their

function from the thyroid infiltrates, capable of recognizing each peptide, is still necessary.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. Mercè Martí and Carme Roura-Mir for help with the manuscript, and for a lot of previous thyroid work. To all the other people that were involved in the work that generated these data, M. Carrascal, C. Pinilla, E. Borràs, M. Catálfamo, L. Serradell, A. Muntasell, M. Costa, M. P. Armengol, M. Sospedra, A. Lucas-Martín, G. Obiols, J. Abian, X. Daura, and R. Pujol-Borrell. And special thanks to the thyroid sample donors.

This work was supported in part by Grants SAF2000-0131-C02-01, SAF2003-08843-C02-01, and SAF2006-08928 from the Spanish Ministry of Education and by the Eurothymaide Integrated European Project LSHB-CT-2003-503410. L. M. is a FPI fellow of the Spanish Ministry of Education.

REFERENCES

- Aloisi, F. and Pujol-Borrell, R. (2006). Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **6**.
- Alvarez, I., Collado, J., Daura, X., Colome, N., Rodriguez-Garcia, M., Gallart, T., Canals, F., and Jaraquemada, D. (2008). The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*1001) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). *Arthritis Rheum.* **58**, 1630.
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C., and Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* **23**, 227.
- Armengol, M. P., Juan, M., Lucas-Martin, A., Fernandez-Figueras, M. T., Jaraquemada, D., Gallart, T., and Pujol-Borrell, R. (2001). Thyroid autoimmune disease: Demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am. J. Pathol.* **159**, 861.
- Arndt, S. O., Vogt, A. B., Hammerling, G. J., and Kropshofer, H. (1997). Selection of the MHC class II-associated peptide repertoire by HLA-DM. *Immunol. Res.* **16**, 261.
- Arndt, S. O., Vogt, A. B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wolpl, A., Sun, Y., Schadendorf, D., Hammerling, G. J., and Kropshofer, H. (2000). Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *Embo J.* **19**, 1241.
- Avva, R. R., and Cresswell, P. (1994). *In vivo* and *in vitro* formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity* **1**, 763.
- Baggio, M. C., Medeiros-Neto, G., Osawa, Y., Nguyen, N. Y., Santisteban, P., Knobel, M., and Groliman, E. E. (1996). Amino acid composition of proteins extracted from endemic goiter glands. *Endocr. Pathol.* **7**, 137.
- Ban, Y., Davies, T. F., Greenberg, D. A., Concepcion, E. S., Osman, R., Oashi, T., and Tomer, Y. (2004). Arginine at position 74 of the HLA-DR beta1 chain is associated with Graves' disease. *Genes Immun.* **5**, 203.
- Barlow, A. B., Wheatcroft, N., Watson, P., and Weetman, A. P. (1996). Association of HLA-DQA1*0501 with Graves' disease in English Caucasian men and women. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **44**, 73.
- Bluestone, J. A., Krutzsch, H. C., Auchincloss, H., Jr., Cazenave, P. A., Kindt, T. J., and Sachs, D. H. (1982). Anti-idiotypes against anti-H-2 monoclonal antibodies: Structural analysis of the molecules induced by *in vivo* anti-idiotypic treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7847.

- Bottazzo, G. F., Pujol-Borrell, R., Hanafusa, T., and Feldmann, M. (1983). Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* **2**, 1115.
- Brown, N. K., McCormick, D. J., Brusica, V., David, C. S., and Kong, Y. C. (2008). A novel H2A-E+ transgenic model susceptible to human but not mouse thyroglobulin-induced autoimmune thyroiditis: Identification of mouse pathogenic epitopes. *Cell. Immunol.* **251**, 1.
- Bruno, R., Sabater, L., Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Escudero, D., Martinez-Caceres, E., and Pujol-Borrell, R. (2002). Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2737.
- Calderon, B., Suri, A., Miller, M. J., and Unanue, E. R. (2008). Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **105**, 6121.
- Carayanniotis, G. (2007). Recognition of thyroglobulin by T cells: The role of iodine. *Thyroid* **17**, 963.
- Carayanniotis, G., Chronopoulou, E., and Rao, V. P. (1994). Distinct genetic pattern of mouse susceptibility to thyroiditis induced by a novel thyroglobulin peptide. *Immunogenetics* **39**, 21.
- Castellino, F., Zhong, G., and Germain, R. N. (1997). Antigen presentation by MHC class II molecules: Invariant chain function, protein trafficking, and the molecular basis of diverse determinant capture. *Hum. Immunol.* **54**, 159.
- Catalfamo, M., Roura-Mir, C., Sospedra, M., Aparicio, P., Costagliola, S., Ludgate, M., Pujol-Borrell, R., and Jaraquemada, D. (1996). Self-reactive cytotoxic gamma delta T lymphocytes in Graves' disease specifically recognize thyroid epithelial cells. *J. Immunol.* **156**, 804.
- Catalfamo, M., Serradell, L., Roura-Mir, C., Kolkowski, E., Sospedra, M., Vives-Pi, M., Vargas-Nieto, F., Pujol-Borrell, R., and Jaraquemada, D. (1999). HLA-DM and invariant chain are expressed by thyroid follicular cells, enabling the expression of compact DR molecules. *Int. Immunol.* **11**, 269.
- Chicz, R. M., Urban, R. G., Lane, W. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Vignali, D. A., and Strominger, J. L. (1992). Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* **358**, 764.
- Chicz, R. M., Urban, R. G., Gorga, J. C., Vignali, D. A., Lane, W. S., and Strominger, J. L. (1993). Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* **178**, 27.
- Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y., and Germain, R. N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J. Exp. Med.* **203**, 2841.
- Chronopoulou, E., and Carayanniotis, G. (1992). Identification of a thyroiditogenic sequence within the thyroglobulin molecule. *J. Immunol.* **149**, 1039.
- Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 259.
- Dai, Y., Carayanniotis, K. A., Eliades, P., Lymberi, P., Shepherd, P., Kong, Y., and Carayanniotis, G. (1999). Enhancing or suppressive effects of antibodies on processing of a pathogenic T cell epitope in thyroglobulin. *J. Immunol.* **162**, 6987.
- Dai, Y. D., Rao, V. P., and Carayanniotis, G. (2002). Enhanced iodination of thyroglobulin facilitates processing and presentation of a cryptic pathogenic peptide. *J. Immunol.* **168**, 5907.
- Dai, Y. D., Eliades, P., Carayanniotis, K. A., McCormick, D. J., Kong, Y. C., Magafa, V., Cordopatis, P., Lymberi, P., and Carayanniotis, G. (2005). Thyroxine-binding antibodies inhibit T cell recognition of a pathogenic thyroglobulin epitope. *J. Immunol.* **174**, 3105.

- Dai, Y. D., Jensen, K. P., Marrero, I., Li, N., Quinn, A., and Sercarz, E. E. (2008). N-terminal flanking residues of a diabetes-associated GAD65 determinant are necessary for activation of antigen-specific T cells in diabetes-resistant mice. *Eur. J. Immunol.* **38**, 968.
- Dayan, C. M., Londei, M., Corcoran, A. E., Grubeck-Loebenstien, B., James, R. F., Rapoport, B., and Feldmann, M. (1991). Autoantigen recognition by thyroid-infiltrating T cells in Graves disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7415.
- Dengjel, J., Nastke, M. D., Gouttefangeas, C., Gitsioudis, G., Schoor, O., Altenberend, F., Muller, M., Kramer, B., Missiou, A., Sauter, M., Hennenlotter, J., and Wernet, D. (2006). Unexpected abundance of HLA class II presented peptides in primary renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res* **12**, 4163.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* **2**, 1032.
- Derbinski, J., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhausen, M., Peltonen, L., Walter, J., and Kyewski, B. (2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* **202**, 33.
- Drayton, D. L., Liao, S., Mounzer, R. H., and Ruddle, N. H. (2006). Lymphoid organ development: From ontogeny to neogenesis. *Nat. Immunol.* **7**, 344.
- El Hassani, R. A., Estienne, V., Blanchin, S., Durand-Gorde, J. M., Mallet, B., De Micco, C., Carayon, P., Lalaoui, K., and Ruf, J. (2004). Antigenicity and immunogenicity of the C-terminal peptide of human thyroglobulin. *Peptides* **25**, 1021.
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**, 290.
- Farid, N. R., Stone, E., and Johnson, G. (1980). Graves' disease and HLA: Clinical and epidemiologic associations. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **13**, 535.
- Flynn, J. C., McCormick, D. J., Brusic, V., Wan, Q., Panos, J. C., Giraldo, A. A., David, C. S., and Kong, Y. C. (2004). Pathogenic human thyroglobulin peptides in HLA-DR3 transgenic mouse model of autoimmune thyroiditis. *Cell Immunol.* **229**, 79.
- Germain, R. N. (1994). MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* **76**, 287.
- Gordon, R. D., Young, J. A., Rayner, S., Luke, R. W., Crowther, M. L., Wordsworth, P., Bell, J., Hassall, G., Evans, J., Hinchliffe, S. A., et al. (1995). Purification and characterization of endogenous peptides extracted from HLA-DR isolated from the spleen of a patient with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1473.
- Gowthaman, U., and Agrewala, J. N. (2008). *In silico* tools for predicting peptides binding to HLA-class II molecules: More confusion than conclusion. *J. Proteome Res.* **7**, 154.
- Guardiola, J., and Maffei, A. (1993). Control of MHC class II gene expression in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *Crit. Rev. Immunol.* **13**, 247.
- Guo, J., Quarantino, S., Jaume, J. C., Costante, G., Londei, M., McLachlan, S. M., and Rapoport, B. (1996). Autoantibody-mediated capture and presentation of autoantigen to T cells via the Fc epsilon receptor by a recombinant human autoantibody Fab converted to IgE. *J. Immunol. Methods* **195**, 81.
- Hammer, J., Valsasini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B., and Sinigaglia, F. (1993). Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* **74**, 197.
- Hanafusa, T., Pujol-Borrell, R., Chiovato, L., Russell, R. C., Doniach, D., and Bottazzo, G. F. (1983). Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: Relevance for autoimmunity. *Lancet* **2**, 1111.
- Haque, A., Hajiaghahmohseni, L. M., Li, P., Toomy, K., and Blum, J. S. (2007). Invariant chain modulates HLA class II protein recycling and peptide presentation in nonprofessional antigen presenting cells. *Cell. Immunol.* **249**, 20.

- Heward, J. M., Allahabadia, A., Daykin, J., Carr-Smith, J., Daly, A., Armitage, M., Dodson, P. M., Sheppard, M. C., Barnett, A. H., Franklyn, J. A., and Gough, S. C. (1998). Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: Replication using a population case control and family-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 3394.
- Hodge, S. E., Ban, Y., Strug, L. J., Greenberg, D. A., Davies, T. F., Concepcion, E. S., Villanueva, R., and Tomer, Y. (2006). Possible interaction between HLA-DRbeta1 and thyroglobulin variants in Graves' disease. *Thyroid* **16**, 351.
- Hoshioka, A., Kohno, Y., Katsuki, T., Shimojo, N., Maruyama, N., Inagaki, Y., Yokochi, T., Tarutani, O., Hosoya, T., and Niimi, H. (1993). A common T-cell epitope between human thyroglobulin and human thyroid peroxidase is related to murine experimental autoimmune thyroiditis. *Immunol. Lett.* **37**, 235.
- Huczko, E. L., Bodnar, W. M., Benjamin, D., Sakaguchi, K., Zhu, N. Z., Shabanowitz, J., Henderson, R. A., Appella, E., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (1993). Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I MHC molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modeling. *J. Immunol.* **151**, 2572.
- Hunt, D. F., Henderson, R. A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Michel, H., Sevilir, N., Cox, A. L., Appella, E., and Engelhard, V. H. (1992). Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* **255**, 1261.
- Hunt, D. F., Michel, H., Dickinson, T. A., Shabanowitz, J., Cox, A. L., Sakaguchi, K., Appella, E., Grey, H. M., and Sette, A. (1992). Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad. *Science* **256**, 1817.
- Hutchings, P. R., Cooke, A., Dawe, K., Champion, B. R., Geysen, M., Valerio, R., and Roitt, I. M. (1992). A thyroxine-containing peptide can induce murine experimental autoimmune thyroiditis. *J. Exp. Med.* **175**, 869.
- Inaba, H., Martin, W., De Groot, A. S., Qin, S., and De Groot, L. J. (2006). Thyrotropin receptor epitopes and their relation to histocompatibility leukocyte antigen-DR molecules in Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 2286.
- Jacobson, E. M., and Tomer, Y. (2007). The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: Back to the future. *J. Autoimmun.* **28**, 85.
- Jacobson, E. M., and Tomer, Y. (2007). The genetic basis of thyroid autoimmunity. *Thyroid* **17**, 949.
- Jacobson, E. M., Huber, A., and Tomer, Y. (2008). The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: From epidemiology to etiology. *J. Autoimmun.* **30**, 58.
- Jiang, H. Y., Li, H. S., Carayanniotis, K., and Carayanniotis, G. (2007). Variable influences of iodine on the T-cell recognition of a single thyroglobulin epitope. *Immunology* **121**, 370.
- Karras, E., Carayanniotis, G., and Lymberi, P. (2003). Induction of murine thyroiditis by a non dominant E(k)-restricted peptide of human thyroglobulin. *Immunology* **108**, 556.
- Karras, E., Yang, H., Lymberi, P., and Christadoss, P. (2005). Human thyroglobulin peptide p2340 induces autoimmune thyroiditis in HLA-DR3 transgenic mice. *J. Autoimmun.* **24**, 291.
- Kim-Saijo, M., Akamizu, T., Ikuta, K., Iida, Y., Ohmori, K., Matsubara, K., Matsuda, Y., Suzuki, M., Matsuda, F., and Nakao, K. (2003). Generation of a transgenic animal model of hyperthyroid Graves' disease. *Eur. J. Immunol.* **33**, 2531.
- Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K., and Kyewski, B. (2000). Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat. Med.* **6**, 56.
- Kong, Y. C. (2007). Experimental autoimmune thyroiditis in the mouse. *Curr. Protoc. Immunol.*
- Kong, Y. C., McCormick, D. J., Wan, Q., Motte, R. W., Fuller, B. E., Giraldo, A. A., and David, C. S. (1995). Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on

- thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis. Secondary role of iodination. *J. Immunol.* **155**, 5847.
- Kong, Y. C., Lomo, L. C., Motte, R. W., Giraldo, A. A., Baisch, J., Strauss, G., Hammerling, G. J., and David, C. S. (1996). HLA-DRB1 polymorphism determines susceptibility to autoimmune thyroiditis in transgenic mice: Definitive association with HLA-DRB1*0301 (DR3) gene. *J. Exp. Med.* **184**, 1167.
- Kong, Y. C., Flynn, J. C., Banga, J. P., and David, C. S. (2007). Application of HLA class II transgenic mice to study autoimmune regulation. *Thyroid* **17**, 995.
- Kotani, T., Umeki, K., Hirai, K., and Ohtaki, S. (1990). Experimental murine thyroiditis induced by porcine thyroid peroxidase and its transfer by the antigen-specific T cell line. *Clin. Exp. Immunol.* **80**, 11.
- Kropshofer, H., Hammerling, G. J., and Vogt, A. B. (1997). How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: Survival of the fittest? *Immunol. Today* **18**, 77.
- Kubo, R. T., Sette, A., Grey, H. M., Appella, E., Sakaguchi, K., Zhu, N. Z., Arnott, D., Sherman, N., Shabanowitz, J., Michel, H., et al. (1994). Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles. *J. Immunol.* **152**, 3913.
- Kyewski, B., and Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: An extended view. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 688.
- Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., and Klein, L. (2002). Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: More than meets the eye. *Trends Immunol.* **23**, 364.
- Li, H. S., and Carayanniotis, G. (2005). Detection of thyroglobulin mRNA as truncated isoform(s) in mouse thymus. *Immunology* **115**, 85.
- Li, H. S., and Carayanniotis, G. (2006). Iodination of tyrosyls in thyroglobulin generates neoantigenic determinants that cause thyroiditis. *J. Immunol.* **176**, 4479.
- Li, H. S., Jiang, H. Y., and Carayanniotis, G. (2007). Modifying effects of iodine on the immunogenicity of thyroglobulin peptides. *J. Autoimmun.* **28**, 171.
- Li, P., Gregg, J. L., Wang, N., Zhou, D., O'Donnell, P., Blum, J. S., and Crotzer, V. L. (2005). Compartmentalization of class II antigen presentation: Contribution of cytoplasmic and endosomal processing. *Immunol. Rev.* **207**, 206.
- Lich, J. D., Elliott, J. F., and Blum, J. S. (2000). Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins. *J. Exp. Med.* **191**, 1513.
- Lippolis, J. D., White, F. M., Marto, J. A., Luckey, C. J., Bullock, T. N., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (2002). Analysis of MHC class II antigen processing by quantitation of peptides that constitute nested sets. *J. Immunol.* **169**, 5089.
- Liston, A., Gray, D. H., Lesage, S., Fletcher, A. L., Wilson, J., Webster, K. E., Scott, H. S., Boyd, R. L., Peltonen, L., and Goodnow, C. C. (2004). Gene dosage—Limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J. Exp. Med.* **200**, 1015.
- Londei, M., Bottazzo, G. F., and Feldmann, M. (1985). Human T-cell clones from autoimmune thyroid glands: Specific recognition of autologous thyroid cells. *Science* **228**, 85.
- Lovitch, S. B., Pu, Z., and Unanue, E. R. (2006). Amino-terminal flanking residues determine the conformation of a peptide-class II MHC complex. *J. Immunol.* **176**, 2958.
- Lucas-Martin, A., Foz-Sala, M., Todd, I., Bottazzo, G. F., and Pujol-Borrell, R. (1988). Occurrence of thyrocyte HLA class II expression in a wide variety of thyroid diseases: Relationship with lymphocytic infiltration and thyroid autoantibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **66**, 367.
- Manglabruks, A., Cox, N., and DeGroot, L. J. (1991). Genetic factors in autoimmune thyroid disease analyzed by restriction fragment length polymorphisms of candidate genes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **73**, 236.
- Marga, M., Denisova, A., Sochnev, A., Pirags, V., and Farid, N. R. (2001). Two HLA DRB 1 alleles confer independent genetic susceptibility to Graves' disease: Relevance of cross-population studies. *Am. J. Med. Genet.* **102**, 188.

- Marino, M., and McCluskey, R. T. (2000). Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, C1295.
- Marino, M., Chiovato, L., Mitsiades, N., Latrofa, F., Andrews, D., Tseleni-Balafouta, S., Collins, A. B., Pinchera, A., and McCluskey, R. T. (2000). Circulating thyroglobulin transcytosed by thyroid cells in complexed with secretory components of its endocytic receptor megalin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 3458.
- McLachlan, S. M., and Rapoport, B. (2007). Thyroid peroxidase as an autoantigen. *Thyroid* **17**, 939.
- Muixí, L., Carrascal, M., Alvarez, I., Daura, X., Marti, M., Armengol, M. P., Pinilla, C., Abian, J., Pujol-Borrell, R., and Jaraquemada, D. (2008). Thyroglobulin peptides associate in vivo to HLA-DR in autoimmune thyroid glands. *J. Immunol.* **181**, 795.
- Muntasell, A., Carrascal, M., Serradell, L., Veelen Pv, P., Verreck, F., Koning, F., Raposo, G., Abian, J., and Jaraquemada, D. (2002). HLA-DR4 molecules in neuroendocrine epithelial cells associate to a heterogeneous repertoire of cytoplasmic and surface self peptides. *J. Immunol.* **169**, 5052.
- Muntasell, A., Carrascal, M., Alvarez, I., Serradell, L., van Veelen, P., Verreck, F. A., Koning, F., Abian, J., and Jaraquemada, D. (2004). Dissection of the HLA-DR4 peptide repertoire in endocrine epithelial cells: Strong influence of invariant chain and HLA-DM expression on the nature of ligands. *J. Immunol.* **173**, 1085.
- Nagayama, Y. (2007). Graves' animal models of Graves' hyperthyroidism. *Thyroid* **17**, 981.
- Nagayama, Y., Kita-Furuyama, M., Ando, T., Nakao, K., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Eguchi, K., and Niwa, M. (2002). A novel murine model of Graves' hyperthyroidism with intramuscular injection of adenovirus expressing the thyrotropin receptor. *J. Immunol.* **168**, 2789.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J. A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A. Y. (1998). Cathepsin L: Critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450.
- Norrby-Teglund, A., Nepom, G. T., and Kotb, M. (2002). Differential presentation of group A streptococcal superantigens by HLA class II DQ and DR alleles. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2570.
- Oshitani, N., Hato, F., Kitagawa, S., Maeda, K., Higuchi, K., Matsumoto, T., and Arakawa, T. (2003). Analysis of intestinal HLA-DR bound peptides and dysregulated immune responses to enteric flora in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Med.* **11**, 99.
- Paradela, A., Garcia-Peydro, M., Vazquez, J., Rognan, D., and Lopez de Castro, J. A. (1998). The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: Role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity. *J. Immunol.* **161**, 5481.
- Pichurin, P. N., Chen, C. R., Nagayama, Y., Pichurina, O., Rapoport, B., and McLachlan, S. M. (2004). Evidence that factors other than particular thyrotropin receptor T cell epitopes contribute to the development of hyperthyroidism in murine Graves' disease. *Clin. Exp. Immunol.* **135**, 391.
- Pugliese, A., Zeller, M., Fernandez, A., Jr., Zalcberg, L. J., Bartlett, R. J., Ricordi, C., Pietropaolo, M., Eisenbarth, G. S., Bennett, S. T., and Patel, D. D. (1997). The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat. Genet.* **15**, 293.
- Quaratino, S., Thorpe, C. J., Travers, P. J., and Londei, M. (1995). Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T-cell epitope molecular mimicry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10398.
- Quaratino, S., Ruf, J., Osman, M., Guo, J., McLachlan, S., Rapoport, B., and Londei, M. (2005). Human autoantibodies modulate the T cell epitope repertoire but fail to unmask a pathogenic cryptic epitope. *J. Immunol.* **174**, 557.

- Rammensee, H. G., Friede, T., and Stevanović, S. (1995). MHC ligands and peptide motifs: First listing. *Immunogenetics* **41**, 178.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., and Stevanović, S. (1999). SYFPEITHI: Database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**, 213.
- Rao, V. P., and Carayanniotis, G. (1997). Contrasting immunopathogenic properties of highly homologous peptides from rat and human thyroglobulin. *Immunology* **90**, 244.
- Rao, V. P., Balasa, B., and Carayanniotis, G. (1994). Mapping of thyroglobulin epitopes: Presentation of a 9mer pathogenic peptide by different mouse MHC class II isotypes. *Immunogenetics* **40**, 352.
- Rao, V. P., Kajon, A. E., Spindler, K. R., and Carayanniotis, G. (1999). Involvement of epitope mimicry in potentiation but not initiation of autoimmune disease. *J. Immunol.* **162**, 5888.
- Rapoport, B., and McLachlan, S. M. (2007). The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid* **17**, 911.
- Ribeiro-Carvalho, M. M., Farias-de-Oliveira, D. A., Villa-Verde, D. M., and Savino, W. (2002). Triiodothyronine modulates extracellular matrix-mediated interactions between thymocytes and thymic microenvironmental cells. *Neuroimmunomodulation* **10**, 142.
- Roep, B. O. (2003). The role of T-cells in the pathogenesis of type 1 diabetes: From cause to cure. *Diabetologia* **46**, 305.
- Roura-Mir, I. C., Alcalde, L., Vargas, F., Tolosa, E., Obiols, G., Foz, M., Jaraquemada, D., and Pujol-Borrell, R. (1993). Gamma delta lymphocytes in endocrine autoimmunity: Evidence of expansion in Graves' disease but not in type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* **92**, 288.
- Roura-Mir, C., Catalfamo, M., Sospedra, M., Alcalde, L., Pujol-Borrell, R., and Jaraquemada, D. (1997). Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3290.
- Roura-Mir, C., Catalfamo, M., Cheng, T. Y., Marqusee, E., Besra, G. S., Jaraquemada, D., and Moody, D. B. (2005). CD1a and CD1c activate intrathyroidal T cells during Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J. Immunol.* **174**, 3773.
- Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A., and Janeway, C. A., Jr. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**, 622.
- Salomonsson, S., Jonsson, M. V., Skarstein, K., Brokstad, K. A., Hjelmstrom, P., Wahren-Herlenius, M., and Jonsson, R. (2003). Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* **48**, 3187.
- Sanf'Angelo, D. B., Robinson, E., Janeway, C. A., Jr., and Denzin, L. K. (2002). Recognition of core and flanking amino acids of MHC class II-bound peptides by the T cell receptor. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2510.
- Sathiamurthy, M., Hickman, H. D., Cavett, J. W., Zahoor, A., Prilliman, K., Metcalf, S., Fernandez Vina, M., and Hildebrand, W. H. (2003). Population of the HLA ligand database. *Tissue Antigens* **61**, 12.
- Sawai, Y., and DeGroot, L. J. (2000). Binding of human thyrotropin receptor peptides to a Graves' disease-predisposing human leukocyte antigen class II molecule. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 1176.
- Schirle, M., Keilholz, W., Weber, B., Gouttefangeas, C., Dumrese, T., Becker, H. D., Stevanović, S., and Rammensee, H. G. (2000). Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2216.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., and Aloisi, F. (2004). Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* **14**, 164.
- Shimojo, N., Kohno, Y., Yamaguchi, K., Kikuoka, S., Hoshioka, A., Niimi, H., Hirai, A., Tamura, Y., Saito, Y., Kohn, L. D., and Tahara, K. (1996). Induction of Graves-like disease in mice by immunization with fibroblasts transfected with the thyrotropin receptor and a class II molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11074.

- Simmonds, M. J., Howson, J. M., Heward, J. M., Cordell, H. J., Foxall, H., Carr-Smith, J., Gibson, S. M., Walker, N., Tomer, Y., Franklyn, J. A., Todd, J. A., and Gough, S. C. (2005). Regression mapping of association between the human leukocyte antigen region and Graves disease. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 157.
- Singh, H., and Raghava, G. P. (2001). ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* **17**, 1236.
- Smith, K. M., Olson, D. C., Hirose, R., and Hanahan, D. (1997). Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: Evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int. Immunol.* **9**, 1355.
- Sospedra, M., Obiols, G., Babi, L. F., Tolosa, E., Vargas, F., Roura-Mir, C., Lucas-Martin, A., Ercilla, G., and Pujol-Borrell, R. (1995). Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Graves' disease. A primary defect? *J. Immunol.* **154**, 4213.
- Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Dominguez, O., Juan, M., Foz-Sala, M., and Pujol-Borrell, R. (1998). Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J. Immunol.* **161**, 5918.
- Spitzweg, C., Joba, W., and Heufelder, A. E. (1999). Expression of thyroid-related genes in human thymus. *Thyroid* **9**, 133.
- Suri, A., Walters, J. J., Gross, M. L., and Unanue, E. R. (2005). Natural peptides selected by diabetogenic DQ8 and murine I-A(g7) molecules show common sequence specificity. *J. Clin. Invest.* **115**, 2268.
- Suri, A., Lovitch, S. B., and Unanue, E. R. (2006). The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 70.
- Suri, A., Walters, J. J., Rohrs, H. W., Gross, M. L., and Unanue, E. R. (2008). First signature of islet beta-cell-derived naturally processed peptides selected by diabetogenic class II MHC molecules. *J. Immunol.* **180**, 3849.
- Tang, T. F., Huang, A. Y., Pappas, A., Slack, R., Ng, J., Hartzman, R. J., and Hurley, C. K. (2000). Relative frequencies of DRB1*11 alleles and their DRB3 associations in five major population groups in a United States bone marrow registry. *Hum. Immunol.* **61**, 820.
- Tang, T. F., Wang, J., Slack, R., Lin, Y. S., Li, L., Heine, U., Ng, J., Hartzman, R. J., and Katovich Hurley, C. (2002). DRB1*03 diversity and DRB3 associations in five major population groups in the United States. *Hum. Immunol.* **63**, 221.
- Texier, B., Bedin, C., Tang, H., Camoin, L., Laurent-Winter, C., and Charreire, J. (1992). Characterization and sequencing of a 40-amino-acid peptide from human thyroglobulin inducing experimental autoimmune thyroiditis. *J. Immunol.* **148**, 3405.
- Tomer, Y., and Davies, T. F. (2003). Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: From gene mapping to gene function. *Endocr. Rev.* **24**, 694.
- Vallon-Eberhard, A., Landsman, L., Yogev, N., Verrier, B., and Jung, S. (2006). Transepithelial pathogen uptake into the small intestinal lamina propria. *J. Immunol.* **176**, 2465.
- Verginis, P., Stanford, M. M., and Carayanniotis, G. (2002). Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis. *J. Immunol.* **169**, 5332.
- Verreck, F. A., van de Poel, A., Drijfhout, J. W., Amons, R., Coligan, J. E., and Konig, F. (1996). Natural peptides isolated from Gly86/Val86-containing variants of HLA-DR1, -DR11, -DR13, and -DR52. *Immunogenetics* **43**, 392.
- Viatte, S., Alves, P. M., and Romero, P. (2006). Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: Advantages and hurdles. *Immunol. Cell Biol.* **84**, 318.
- Vogt, A. B., Kropshofer, H., and Hammerling, G. J. (1997). How HLA-DM affects the peptide repertoire bound to HLA-DR molecules. *Hum. Immunol.* **54**, 170.
- Wahlstrom, J., Dengjel, J., Persson, B., Duyar, H., Rammensee, H. G., Stevanovic, S., Eklund, A., Weissert, R., and Grunewald, J. (2007). Identification of HLA-DR-bound

- peptides presented by human bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* **117**, 3576.
- Wan, Q., Motte, R. W., McCormick, D. J., Fuller, B. E., Giraldo, A. A., David, C. S., and Kong, Y. M. (1997). Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis: Role of MHC class II. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **85**, 187.
- Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothe, B., Sette, A., and Peters, B. (2008). A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Comput. Biol.* **4**, e1000048.
- Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 821.
- Weetman, A. P. (2004). Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **61**, 405.
- Weetman, A. P., Volkman, D. J., Burman, K. D., Margolick, J. B., Petrick, P., Weintraub, B. D., and Fauci, A. S. (1986). The production and characterization of thyroid-derived T-cell lines in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **39**, 139.
- Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K. H., Wernet, D., Stevanovic, S., and Rammensee, H. G. (2002). Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res.* **62**, 5818.
- Yanagawa, T., Manglabruks, A., Chang, Y. B., Okamoto, Y., Fisfalen, M. E., Curran, P. G., and DeGroot, L. J. (1993). Human histocompatibility leukocyte antigen-DQA1*0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **76**, 1569.
- Zamani, M., Spaepen, M., Bex, M., Bouillon, R., and Cassiman, J. J. (2000). Primary role of the HLA class II DRB1*0301 allele in Graves disease. *Am. J. Med. Genet.* **95**, 432.

DISCUSSIÓ CAPÍTOL 2

Els resultats d'aquest treball han permès fer una primera caracterització del repertori de pèptids associats a molècules d'HLA-DR en glàndules tiroïdes de pacients afectats per la malaltia de Graves–Basedow. Fins al moment aquest és el primer estudi d'aquestes característiques realitzat amb teixit autoimmune. El nombre de seqüències és limitat i representa només una petita fracció del *pool* de pèptids associats als diferents al·lells de DR. Aquests són en teoria els pèptids més abundants que es poden detectar amb la capacitat del sistema, així pèptids en baix número de còpies o amb baixa eficiència de ionització no s'haurien pogut detectar. Tot i les limitacions, hem estat capaços d'identificar 7 seqüències peptídiques diferents de tiroglobulina, un dels principals autoantígens de la patologia autoimmunitària tiroïdal.

La majoria dels treballs realitzats fins ara per caracteritzar els repertoris de pèptids units a molècules de classe II s'han fet a partir de línies limfoblastoides. Quan s'analitzen els pèptids de línees cel·lulars, no només el contingut cel·lular és diferent al teixit original, sinó que l'ambient extracel·lular és artificial i no s'assembla al que rodeja les cèl·lules *in vivo* (Chicz RM i col., 1992; Chicz RM i col., 1993; Hunt DF i col., 1992; Rudensky i col., 1991). Tot i això l'ús de teixit humà és difícil degut a la poca disponibilitat, a la baixa expressió d'HLA-II i a que la majoria de les mostres són heterozigotes. Els primers pèptids associats a HLA de classe II en teixit es van identificar en melsa de pacients amb artritis reumatoide. Van identificar 17 lligands d'HLA-DR a partir d'aproximadament 50 grams de teixit (Gordon RD i col., 1995). Posteriorment Oshitani et al. van identificar 55 pèptids units a HLA-DR de mostres d'intestí humà de 4 controls i 18 pacients afectats per la malaltia intestinal inflamatòria (Oshitani, Hato et al. 2003). Més recentment s'ha publicat un estudi fet amb pacients amb sarcoïdosis, on es van eluir 78 pèptids d'un pool de mostres de rentats broncoalveolars (Wahlstrom, Dengjel et al. 2007). Utilitzant una estratègia diferent, un estudi del 2008 mostrava que la majoria dels pèptids presentats per MHC-II d'un insulinoma de ratolí, derivaven de proteïnes expressades normalment per les cèl·lules β dels illots i que alguns d'ells eren reconeguts per cèl·lules T CD4⁺ dels ratolins NOD (Suri, Walters et al. 2008). En el treball que aquí es presenta s'han obtingut 162 pèptids de 7 mostres de tiroïdes de pacients afectats per la malaltia de Graves. Hem estat capaços de seqüenciar pèptids a partir de quantitats tan petites com un gram de teixit, tot i la baixa i heterogènia expressió d'HLA-II a les tiroïdes.

Les nostres dades no permeten distingir quin tipus cel·lular presenta aquests pèptids, si les CFT o les cèl·lules de l'infiltrat, cèl·lules B, DC o macròfags. Les cèl·lules B són abundants en l'infiltrat de tiroïdes amb GD on s'ha vist que arriben a formar centres germinals específics d'autoantigen (Armengol, Juan et al. 2001; Aloisi and Pujol-Borrell 2006). De fet, en aquest treball hem identificat un pèptid d'una immunoglobulina que segurament s'havia generat per internalització d'un receptor de cèl·lula B. Les cèl·lules dendrítiques i els macròfags es troben en els teixits i tenen alta capacitat de captar material

del teixit extracel·lular. Tot i això a les tiroides de pacients amb GD no hi ha destrucció sinó hiperplàsia del teixit, i les CFT estan hiperactivades pels anticossos agonistes anti-TSH-R. Aquesta hiperactivitat fa que estiguin contínuament produint hormones i per tant endocitant tiroglobulina i altres components del col·loide. En aquest context, podem hipotetitzar que essent més accessible per les CFT, els pèptids de tiroglobulina es poden associar a molècules de DR expressades en aquestes. La identificació de pèptids de poblacions aïllades del teixit és de moment molt difícil degut a la poca quantitat de material que es pot obtenir, inclús usant les tècniques de separació més eficients, per tant encara no es pot assegurar quina APC presenta cadascun dels pèptids identificats.

La majoria dels pèptids seqüenciats provenien de proteïnes exògenes, moltes de la matriu extracel·lular i del col·loide. Les cèl·lules fol·liculars de la tiroide estan rodejades per matriu extracel·lular, el component principal de la qual és la fibronectina i les laminines (Miettinen and Virtanen 1984). De fet les mateixes CFT poden produir i dipositar fibronectina insoluble (Di Matola, Mueller et al. 2000). S'ha vist que la concentració de fibronectina en plasma de pacients amb hipertiroidisme és major que en individus control (Shirakami, Hirai et al. 1986). A més a més diverses malalties autoimmunitàries que afecten al teixit connectiu presenten autoanticossos específics de proteïnes de la matriu extracel·lular. Concretament, pacients amb oftalmopatia associada a GD, com TB449, presenten cèl·lules T i Abs específics per proteïnes de la matriu com col·lagen, laminina o fibronectina. Una de les proteïnes més representada dins el *pool* de pèptids era l'albúmina. L'albúmina, després de la tiroglobulina, és la proteïna més abundant de la tiroide (Baggio, Medeiros-Neto et al. 1996) i, com la Tg, es troba dins el col·loide (Anderberg B i col., 1981), per aquest motiu no és estrany que la trobem àmpliament representada dins el repertori de pèptids associat DR. Una altre proteïna de la qual derivaven moltes seqüències, l'hemoglobina, també es localitza al col·loide de tiroides hiperplàsics (Ford, Lim et al. 1987; Ribeiro-Carvalho, Farias-de-Oliveira et al. 2002; Mohan Kumar, Bobby et al. 2004).

Els pèptids més interessants aïllats de les tiroides són els pèptids de tiroglobulina: Tg(726-743) de la mostra TB448, associat preferentment a DR407 però que també presenta capacitat d'unió pels dos al·lels de l'haplotip DR2; Tg(2098-2112) de TB449, associat preferentment a DR3; i 6 pèptids de la mostra TB471, dos d'ells formant una família de pèptids solapats, Tg(2520-2532) i Tg(2520-2536). Dels pèptids de la mostra TB471 només un, Tg(2224-2240), presentava capacitat teòrica d'unió per DR8 i la resta no tenien residus clars d'ancoratge a cap dels al·lels expressats a la mostra. La tiroglobulina és un dels principals autoantígens de les AITD (Campbell, Doniach et al. 1956), i constitueix entre un 75-80% del contingut proteic total del col·loide (Baggio, Medeiros-Neto et al. 1996). El fet que haguem pogut seqüenciar diferents pèptids de la tiroglobulina indica que aquests complexes són abundants a les tiroides afectades, i per tant aquesta elevada densitat de lligands de Tg poden ser la causa de l'activació de cèl·lules T específiques. L'anàlisi de la resposta de cèl·lules T específiques per aquests pèptids és el següent pas per definir quina població funcional de cèl·lules T

respon a aquests antígens. Existeixen moltes evidències de la importància de la Tg en al etiologia de les AITDs entre elles la presència d'autoanticossos en la majoria de pacients amb AITD i el fet que es pugui induir tiroïditis experimental en animals (EAT) immunitzant amb Tg humana o de ratolí (Esquivel, Rose et al. 1977). Inclús es pot induir EAT directament immunitzant animals amb determinats pèptids de Tg humana (Balasa and Carayanniotis 1993; Carayanniotis 2003; Flynn, McCormick et al. 2004). Tot i que la rellevància dels pèptids que hem identificat no es coneix, les dades publicades pel grup de la Dra. Y. C. Kong demostren la patogenicitat del pèptid Tg(2098-2112) en un model de ratolí transgènic per DR3 amb EAT induïda amb Tg humana (Flynn, McCormick et al. 2004). Les nostres dades demostren per tant que un pèptid de Tg potencialment patogènic pot generar-se *in vivo* i ser presentat per molècules de DR3 en tiroïdes de pacients amb GD. Falta encara demostrar si la resta de pèptids expressats a la tiroïdes són potencialment patogènics o si el que fan és regular la resposta autoimmune. La presència excessiva de lligands de tiroglobulina associats a HLA-DR pot induir l'activació de cèl·lules T efectores o la regulació negativa per cèl·lules T reguladores específiques d'alguns epítops de la Tg.

Malgrat l'alta expressió de tiroglobulina en el timus, permetent un alt nivell de tolerància en la perifèria, la tiroglobulina té dos característiques que la fan especial des del punt de vista immunològic: en primer lloc és una proteïna gran, de 2749aa, amb un elevat nombre de determinants críptics i potencialment patogènics, la qual cosa podria dificultar el manteniment de la tolerància immunològica. En segon lloc té la capacitat única d'emmagatzemar iode, forçant al sistema immune a controlar un autoantigen contínuament modificat per un element de la dieta. S'ha identificat pèptids iodats de la tiroglobulina molt immunogènics i capaços d'activar cèl·lules T autoreactives (Champion, Page et al. 1991). A més a més la iodació s'ha postulat com un mecanisme capaç de modificar el processament de la Tg per les APC, generant epítops críptics que no es presenten en el timus i per tant no es produeix tolerància, essent potencialment patogènics (Carayanniotis 2003). És interessant remarcar que dos pèptids de la mostra TB471 Tg(2508-2519) i Tg(2520-2532) formen part d'una seqüència definida com epítoc críptic en un model experimental de ratolí, que només es genera quan els animals s'immunitzen amb Tg altament iodada (Dai, Rao et al. 2002). La resta de pèptids de tiroglobulina identificats en aquest treball no s'han relacionat fins ara amb cap model experimental de malaltia tiroïdal.

La majoria dels altres pèptids naturals identificats derivaven de proteïnes ubiqües i altament expressades, és a dir, les proteïnes que s'esperaria que generessin els lligands de les molècules de DR a qualsevol teixit.

L'heterozigositat i l'expressió en moltes mostres d'haplotips d'HLA amb més d'un locus de DR viable, dificulta molt l'assignació de les seqüències a una de les molècules de DR expressades. Tot i la gran base de dades de pèptids específics per cada al·lel, encara existeixen moltes molècules de les quals es desconeixen els motius d'ancoratge, sobretot les codificades pels loci DRB3, B4 o B5 i algunes per DRB1. Per aquest motiu també es va decidir en aquest treball caracteritzar el motiu d'ancoratge de

dues molècules de DR, DR407 i DR8, no definides fins al moment. Seria interessant també conèixer els motius d'ancoratge de les molècules DRB3, B4 i B5 per poder determinar si alguns dels pèptids aïllats de la tiroides són bons lligands d'aquestes. Els gens de DRB3, DRB4 i DRB5 només es troben en determinats haplotips i codifiquen cadenes beta que formen complex amb la cadena alfa, monomòrfica d'HLA-DR. Aquestes molècules són capaces de presentar pèptids antigènics a cèl·lules T (Gorski, Irle et al. 1989; Shimoda, Nakamura et al. 1995) i són menys polimòrfiques que les DRB1. Per tant els pèptids que s'uneixin de manera eficient a aquests al·lels serien interessants alhora de dissenyar pèptids terapèutics més universals (Texier, Pouvelle-Moratille et al. 2001). Dels estudis d'assignació a al·lels i dels assajos d'unió de pèptids a HLA-DR es dedueix que molts dels pèptids aïllats són de baixa afinitat, inclosos els pèptids de tiroglobulina, i no s'han pogut assignar clarament a cap dels al·lels expressats per la mostra. Altres però tenien alta afinitat, com els pèptids de la VE-cadherina(196-210) presentat per DR3 i l'hemoglobina β (31-41) i el col·lagen α (11242-1257) per DR15. De totes maneres s'ha demostrat que no existeix correlació entre l'afinitat d'un pèptid individual i la seva abundància relativa, suggerint que l'abundància de la font proteica i/o el processament són més importants a l'hora de determinar el nombre de complexos expressats (Engelhard 1994). Una altra característica interessant d'aquests pèptids era la seva teòrica promiscuïtat, és a dir la seva capacitat teòrica d'unió a més d'un al·lel d'HLA-DR.

L'anàlisi dels patrons de processament del pèptids tiroïdals demostren que molts dels pèptids es generen per restriccions post Lys, Met o Arg. Aquest patró es deu presumiblement a l'ús de vies secretores complexes i altament regulades per les cèl·lules endocrines. El patró de proteases expressat en aquestes cèl·lules és específic i pot permetre la generació diferencial de lligands de DR. La importància de l'especialització d'aquestes cèl·lules a l'hora de presentar pèptids queda demostrada en diferents treballs on descriuen cèl·lules T aïllades dels infiltrats que reconeixen antigens presentats per cèl·lules endocrines i no per les APC convencionals (Londei, Bottazzo et al. 1985; Weetman, Volkman et al. 1986; Dayan, Londei et al. 1991; Quarantino, Feldmann et al. 1996).

Les nostres dades per tant demostren que pèptids específics de teixit poden associar-se *in vivo* a molècules d'HLA-DR de teixits afectats per GD, i que per tant podrien estar involucrats en el procés autoimmunitari potenciant la resposta. Tot i això gran part del repertori del pool peptídic associat a HLA-DR deriva de proteïnes abundants i ubiqües comuns a altres teixits. La rellevància de tots aquests pèptids podria estar relacionada no només amb la patogènia sinó també amb la capacitat de regular la resposta. Aquests resultats són el punt de partida per la caracterització de les cèl·lules T específiques dels pèptids i la seva funció *in situ*. Tot i que l'ús de tetràmers amb pèptids autòlegs és difícil ja que el nombre de cèl·lules específiques és molt baix i l'avidesa del TCR per tetràmers amb pèptids propis és baixa (Nepom 2005), actualment estem desenvolupant aquesta tecnologia amb l'objectiu de determinar si les cèl·lules T específiques per aquests pèptids estan realitzant funcions reguladores o si són cèl·lules efectores.

DISCUSSIÓ FINAL

Els resultats d'aquest treball han permès fer una primera caracterització dels lligands específics de teixit tiroïdal, que amb molta probabilitat es troben associats a molècules d'HLA de classe II expressades ectòpicament per les cèl·lules fol·liculars de la tiroide en la malaltia de Graves-Basedow.

Per poder fer aquest estudi acuradament primer s'han caracteritzat els motius d'ancoratge de dues de les molècules expressades a les mostres de tiroides analitzades, DR407 i DR8. La definició d'aquests motius ens han permès identificar possibles lligands d'aquests al·lells entre els pèptids eluïts de les mostres de tiroides. També vam poder relacionar l'estructura dels motius d'unió identificats amb els d'altres al·lells i afegir informació relacionada amb la susceptibilitat a malalties autoimmunitàries. Així, en el cas de la molècula DR407, la comparació es va fer amb altres variants de DR4 associades a AR i la de DR8 amb al·lells associats a diabetis com DQ8 en humans i IA⁹⁷ en ratolins. Les dades obtingudes afegeixen informació sobre l'associació de determinades seqüències aminoacídiques dels llocs d'unió al pèptid de les molècules d'HLA-II amb la susceptibilitat a malalties autoimmunitàries. En aquest cas, l'absència d'Asp β57 en T1D, que es compleix a la seqüència de DR8 o la presència de *l'epítot compartit* en AR, absent a la seqüència de l'al·lel no associat DR407. La susceptibilitat a la malaltia de Graves també s'ha associat significativament amb una seqüència de la cadena β d'HLA-DR: la presència d'Arg a la posició 74 (Arg β74), fent secundària l'associació amb HLA-DR3. Els residus més comuns en aquesta posició són Ala i Gln que teòricament protegrien de GD, mentre que l'Arg modifica l'estructura tridimensional de la butxaca P4 i està associada amb susceptibilitat a la malaltia. El mecanisme pel qual l'Arg β74 confereix susceptibilitat a GD sembla el mateix que involucra l'Aspβ57 en la susceptibilitat a T1D, la intervenció directa d'aquest residu en la selecció d'epítops que la molècula presenta a les cèl·lules T CD4⁺. Per tant, petites modificacions a la seqüència que forma el solc d'unió a pèptid de les molècules de classe II afecten la seva especificitat, de tal forma que els al·lells de susceptibilitat poden presentar pèptids immunogènics que no presentarien els al·lells protectors.

La segona part de l'estudi ha generat informació sobre els pèptids específics de teixit que s'uneixen a molècules de DR en tiroides afectat per la malaltia de Graves. Les dades obtingudes revelen la presència de pèptids específics del teixit i que al menys un d'aquests pèptids específics és potencialment patogènic, ja que ho és en un model humanitzat de tiroïditis experimental en ratolins. Aquests pèptids específics de la tiroide són de tiroglobulina, un autoantigen ben definit en l'autoimmunitat tiroïdal. És interessant observar que, de tots els pèptids de tiroglobulina, el que s'uneix més clarament i amb suficient afinitat a un al·lel de susceptibilitat a GD (HLA-DR3), és precisament el pèptid patogènic en ratolins transgènics. La possible funció patogènica o reguladora dels altres pèptids de Tg no s'ha pogut definir, encara que al menys dos d'ells semblen estar relacionats amb altres pèptids identificats com a tiroïditogènics en models experimentals de tiroïditis. Tot i això, la seqüència d'aquests pèptids no compleix massa estrictament cap dels motius d'unió dels al·lells expressats pel donant i per tant es considerarien lligands de baixa afinitat.

Una pregunta important és perquè aquesta baixa afinitat entre els pèptids de tiroglobulina. Encara que no s'ha fet un estudi exhaustiu, hem observat que alguns pèptids procedents de proteïnes ubiques eren pèptids d'afinitat tan alta com els controls positius (sempre seqüències d'epítops de patògens confirmades). Entre aquests es troben, per exemple, pèptids de factors de complement o de col·lagen. Així podem estar segurs que les cèl·lules que expressen MHC de classe II a les tiroïdes són perfectament capaces de generar pèptids de mida i seqüència correcta per unir-se amb alta afinitat a les molècules de DR. Una possible explicació de la baixa afinitat dels pèptids de Tg i d'altres pèptids no tan específics podria ser que efectivament aquests hagin estat generats per les CFT, que expressen HLA-DR només en situacions d'inflamació crònica i que no estan dedicades a la generació de pèptids de classe II. Aquests pèptids no canònics podrien ser responsables del manteniment, dins el teixit, de respostes autoimmunitàries poc eficients però amb potencial patològic en condicions d'inflamació crònica.

Les dades del nostre laboratori sobre els repertoris peptídics presentats en melses humanes són suggerents en aquest context. Sembla evident que els repertori de pèptids presentats en absència d'infecció per les cèl·lules d'expressió constitutiva d'HLA-DR estan més seleccionats que els presentats per cèl·lules amb expressió d'HLA-DR induïda (J. Collado, dades no publicades). Això pot aplicar-se per exemple a les cèl·lules B transformades amb EBV que s'han utilitzat per les anàlisis dels repertoris peptídics o a les cèl·lules epitelials en inflamació. La transformació limfoblàstica amb EBV induïx l'hiperexpressió dels gens de l'MHC. Aquesta expressió hipertròfica forçaria el mecanisme de transport i estabilització de molècules de DR sintetitzades *de novo*, fent-les més susceptibles a la càrrega de pèptids no canònics. La situació en teixits inflamats, tot i que no seria equivalent en quant a l'hiperexpressió d'HLA, sí que té lloc en cèl·lules que no expressen constitutivament molècules de classe II, i tot i que també expressen les principals molècules involucrades en el transport i l'estabilització d'HLA-DR (Catalfamo, Serradell et al. 1999), són cèl·lules molt diferenciades i especialitzades funcionalment amb mecanismes de síntesi proteica i de transport intracel·lular dedicats a funcions poc relacionades amb l'expressió de classe II. Per tant, presumiblement les molècules d'HLA-DR poden utilitzar fonts alternatives d'enzims, de chaperones i de pèptids per arribar a expressar-se a la superfície cel·lular. Això podria donar lloc a un processament de proteïnes diferenciat del de les APC, però sobre tot podria resultar en la disponibilitat limitada de pèptids "presentables" en els compartiments de càrrega, permetent la càrrega de pèptids de baixa afinitat o de mides no adequades. La relativament baixa expressió de molècules "editores" dels repertoris com HLA-DM, pot també intervenir en aquests processos. Encara que calen estudis molt més amplis, aquest concepte emfatitzaria la potencial importància dels pèptids no canònics que aparentment es poden presentar en situacions d'autoimmunitat.

L'afinitat d'unió dels pèptids sembla doncs rellevant en el context de l'autoimmunitat. L'equilibri entre lligands d'alta o baixa afinitat pot ser important per determinar la tolerància a determinats epítops en el timus. De fet, no esperàriem que pèptids d'alta afinitat fossin bons candidats com a epítops diana d'atac autoimmune, ja que aquests presumiblement s'haurien generat i presentat eficientment en el timus. En canvi, els lligands de baixa afinitat o poc abundants, també es podrien generar en el timus però haurien de competir amb els bons lligands per les molècules de MHC. Un possible resultat seria la manca de tolerància cap aquests epítops. Una aproximació sistemàtica de comparació de tots els pèptids no és possible amb la tecnologia actual, però la comparació de les capacitats d'unió d'alguns pèptids amb la seva capacitat d'activar o regular cèl·lules T podria ser molt informativa. Un fet que facilitaria aquest estudi seria la modificació de les seqüències d'aquests pèptids en els llocs rellevants d'ancoratge per identificar el seu potencial patogènic i comparar-los amb les seqüències naturals que hem trobat. Això seria possible en models animals, com el de la EAT induïda en animals transgènics per HLA-DR3. Aquest estudi, en col·laboració amb la Dra Yi-Chi Kong, del Department of Immunology and Microbiology, Wayne State University School of Medicine, de Detroit, està actualment en procés.

Aquestes noves dades reobren la discussió sobre l'ús de pèptids com a vacunes en el càncer i en la autoimmunitat (Engelhard, Bullock et al. 2002; Itoh and Yamada 2006; van der Burg, Bijker et al. 2006). Els pèptids units al MHC són potencialment interessants però el seu rol en el reconeixement per cèl·lules T és molt variable ja que poden actuar com a agents inhibidors o estimuladors. La frontera entre aquestes dues funcions és fràgil ja que no hi ha diferències evidents entre els pèptids reconeguts per cèl·lules efectores o reguladores. L'anàlisi dels pèptids tolerogènics en vers els activadors podria aportar algunes respostes però la identificació dels limfòcits T capaços de reconèixer cada pèptid i la seva funció en els infiltrats de tiroides és encara necessària.

La identificació de lligands de DR presentats *in situ* en teixit humà autoimmune, més el coneixement precís dels motius d'unió als al·lels expressats pels pacients, obre la possibilitat de modificar les seqüències peptídiques d'aquests pèptids expressats. Aquesta estratègia pot ser útil: 1) per generar eines per la identificació funcional de les cèl·lules T específiques d'aquests pèptids, per exemple augmentant l'afinitat per les molècules de DR modificant les seqüències dels pèptids i produint tetràmers o nanopartícules d'alta estabilitat i 2) en el futur, per dissenyar teràpies amb pèptids específics que, mantenint la seva capacitat d'unió a les molècules de DR, puguin modular la resposta immunitària *in situ*.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS:

Objectiu I:

- ▶ L'ús de pèptids naturals permet identificar amb precisió els motius d'ancoratge de molècules d'HLA-DR
- ▶ HLA-DR407 (DRA1*0101/DRB1*0407) presenta un motiu d'ancoratge semblant a les altres variants de DR4 però amb dos diferències principals: preferència per Asp en P7, i posició P4 no restrictiva
- ▶ El motiu d'ancoratge d'HLA-DR8 (DRA1*0101/DRB1*0801) presenta una marcada preferència per residus àcids en P9, característica compartida amb altres molècules associats a T1D, DQ8 i DQ2 en humans i I-A^{g7} en ratolins
- ▶ A diferència dels altres al·lels associats a diabetis, DR8 mostra preferència per un residu de Lys en posició 4 o 6. La presència de Lys en una d'aquestes posicions impedeix la presència de Lys a l'altre posició
- ▶ Els repertoris de pèptids dels al·lels estudiats solapen amb els d'altres al·lels de DR, però tenen característiques pròpies que permeten definir lligands específics per cada un d'ells

Objectiu II:

- ▶ És possible seqüenciar pèptids presentats per molècules de classe II a partir de quantitats molt petites de teixit
- ▶ Els pèptids presentats per HLA-DR en tiroides afectades per la malaltia de GD són pèptids autòlegs amb una mida de entre 8 a 33 aminoàcids generats tan per la via endocítica com per la citosòlica
- ▶ La majoria dels pèptids identificats provenen de proteïnes exògenes, de la matriu extracel·lular o del col·loide tiroïdal
- ▶ Hem identificat diversos pèptids de tiroglobulina presentats per molècules d'HLA-DR en tiroides autoimmunes. La tiroglobulina és un dels principals autoantígens de les AITD
- ▶ La gran majoria dels pèptids de tiroglobulina són pèptids de baixa afinitat
- ▶ El processament que genera pèptids a les tiroides afectades per GD presenta certes peculiaritats com un patró de restricció característic i la presència d'un nombre elevat de pèptids dels extrems de les proteïnes

REFERÈNCIES

- Allen, E. M. and L. E. Braverman (1990). "The effect of iodine on lymphocytic thyroiditis in the thymectomized buffalo rat." *Endocrinology* 127(4): 1613-6.
- Aloisi, F. and R. Pujol-Borrell (2006). "Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases." *Nat Rev Immunol* 6(3): 205-17.
- Alvarez, I., J. Collado, et al. (2008). "The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*1001) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401)." *Arthritis Rheum* 58(6): 1630-1639.
- Anderberg, B., S. Enestrom, et al. (1981). "Protein composition in single follicles, homogenates and fine-needle aspiration biopsies from normal and diseased human thyroid." *Acta Endocrinol (Copenh)* 96(3): 328-34.
- Anderson, C. L. and N. R. Rose (1971). "Induction of thyroiditis in the rabbit by intravenous infection of papain-treated rabbit thyroglobulin." *J Immunol* 107(5): 1341-8.
- Anjos, S., A. Nguyen, et al. (2002). "A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele." *J Biol Chem* 277(48): 46478-86.
- Armengol, M. P., M. Juan, et al. (2001). "Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers." *Am J Pathol* 159(3): 861-73.
- Arndt, S. O., A. B. Vogt, et al. (2000). "Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells." *Embo J* 19(6): 1241-51.
- Badenhoop, K., G. Schwarz, et al. (1992). "Tumor necrosis factor beta gene polymorphisms in Graves' disease." *J Clin Endocrinol Metab* 74(2): 287-91.
- Bagchi, N., T. R. Brown, et al. (1985). "Induction of autoimmune thyroiditis in chickens by dietary iodine." *Science* 230(4723): 325-7.
- Baggio, M. C., G. Medeiros-Neto, et al. (1996). "Amino Acid Composition of Proteins Extracted from Endemic Goiter Glands." *Endocr Pathol* 7(2): 137-143.
- Bakke, O. and B. Dobberstein (1990). "MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments." *Cell* 63(4): 707-16.
- Balasa, B. and G. Carayanniotis (1993). "Immunotargeting of thyroglobulin on antigen presenting cells abrogates natural tolerance in the absence of adjuvant." *Cell Immunol* 150(2): 453-8.
- Balasa, B. and G. Carayanniotis (1993). "Induction of experimental autoimmune thyroiditis in rats with the synthetic peptide (2495-2511) of thyroglobulin." *Cell Immunol* 148(2): 259-68.
- Ban, Y., D. A. Greenberg, et al. (2003). "Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15119-24.
- Ban, Y., T. F. Davies, et al. (2004). "Arginine at position 74 of the HLA-DR beta1 chain is associated with Graves' disease." *Genes Immun* 5(3): 203-8.
- Banga, J. P., P. S. Barnett, et al. (1991). "Immunological and molecular characteristics of the thyroid peroxidase autoantigen." *Autoimmunity* 8(4): 335-43.
- Barin, J. G., M. V. Talor, et al. (2005). "Iodination of murine thyroglobulin enhances autoimmune reactivity in the NOD.H2 mouse." *Clin Exp Immunol* 142(2): 251-9.
- Barlow, A. B., N. Wheatcroft, et al. (1996). "Association of HLA-DQA1*0501 with Graves' disease in English Caucasian men and women." *Clin Endocrinol (Oxf)* 44(1): 73-7.
- Battifora, M., G. Pesce, et al. (1998). "B7.1 costimulatory molecule is expressed on thyroid follicular cells in Hashimoto's thyroiditis, but not in Graves' disease." *J Clin Endocrinol Metab* 83(11): 4130-9.

- Bednarczuk, T., J. Kiljanski, et al. (1998). "T cell interactions with extracellular matrix proteins in patients with thyroid-associated ophthalmopathy." *Autoimmunity* 27(4): 221-30.
- Berger, A. C. and P. A. Roche (2009). "MHC class II transport at a glance." *J Cell Sci* 122(Pt 1): 1-4.
- Berndorfer, U., H. Wilms, et al. (1996). "Multimerization of thyroglobulin (TG) during extracellular storage: isolation of highly cross-linked TG from human thyroids." *J Clin Endocrinol Metab* 81(5): 1918-26.
- Bernier-Valentin, F., Z. Kostrouch, et al. (1991). "Analysis of the thyroglobulin internalization process using in vitro reconstituted thyroid follicles: evidence for a coated vesicle-dependent endocytic pathway." *Endocrinology* 129(4): 2194-201.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, et al. (1987). "Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2." *Nature* 329(6139): 506-12.
- Blancou, P., R. Mallone, et al. (2007). "Immunization of HLA class I transgenic mice identifies autoantigenic epitopes eliciting dominant responses in type 1 diabetes patients." *J Immunol* 178(11): 7458-66.
- Bodmer, H., S. Viville, et al. (1994). "Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by invariant chain." *Science* 263(5151): 1284-6.
- Bojunga, J., K. Kusterer, et al. (2003). "Macrophage migration inhibitory factor and development of type-1 diabetes in non-obese diabetic mice." *Cytokine* 21(4): 179-86.
- Bondinas, G. P., A. K. Moustakas, et al. (2007). "The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function." *Immunogenetics* 59(7): 539-53.
- Bottazzo, G. F., R. Pujol-Borrell, et al. (1983). "Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity." *Lancet* 2(8359): 1115-9.
- Boucher, A., N. F. Bernard, et al. (1992). "Nature and significance of orbital autoantigens and their corresponding autoantibodies in thyroid-associated ophthalmopathy." *Autoimmunity* 13(1): 89-93.
- Braun, J., H. Donner, et al. (1998). "CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis." *Tissue Antigens* 51(5): 563-6.
- Bresson, D., M. Cerutti, et al. (2003). "Localization of the discontinuous immunodominant region recognized by human anti-thyroperoxidase autoantibodies in autoimmune thyroid diseases." *J Biol Chem* 278(11): 9560-9.
- Brown, J. H., T. S. Jardetzky, et al. (1993). "Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1." *Nature* 364(6432): 33-9.
- Caillou, B., F. Troalen, et al. (1998). "Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study." *J Clin Endocrinol Metab* 83(11): 4102-6.
- Campbell, P. N., D. Doniach, et al. (1956). "Auto-antibodies in Hashimoto's disease (lymphadenoid goitre)." *Lancet* 271(6947): 820-1.
- Carayanniotis, G. (2003). "The cryptic self in thyroid autoimmunity: the paradigm of thyroglobulin." *Autoimmunity* 36(6-7): 423-8.
- Carayanniotis, G. (2007). "Recognition of thyroglobulin by T cells: the role of iodine." *Thyroid* 17(10): 963-73.
- Carayanniotis, G. and V. P. Rao (1997). "Searching for pathogenic epitopes in thyroglobulin: parameters and caveats." *Immunol Today* 18(2): 83-8.
- Carrascal, M., D. Ovelheiro, et al. (2008). "Phosphorylation Analysis of Primary Human T Lymphocytes Using Sequential IMAC and Titanium Oxide Enrichment." *J Proteome Res.*
- Carson, R. T., K. M. Vignali, et al. (1997). "T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage." *Immunity* 7(3): 387-99.

- Catafamo, M., L. Serradell, et al. (1999). "HLA-DM and invariant chain are expressed by thyroid follicular cells, enabling the expression of compact DR molecules." *Int Immunol* 11(2): 269-77.
- Champion, B. R., K. R. Page, et al. (1991). "Identification of a thyroxine-containing self-epitope of thyroglobulin which triggers thyroid autoreactive T cells." *J Exp Med* 174(2): 363-70.
- Chang, K. Y., A. Suri, et al. (2007). "Predicting peptides bound to I-Ag7 class II histocompatibility molecules using a novel expectation-maximization alignment algorithm." *Proteomics* 7(3): 367-77.
- Charatcharoenwitthaya, P. and K. D. Lindor (2005). "Current concepts in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis." *Ann Hepatol* 4(3): 161-75.
- Chen, C. R., P. Pichurin, et al. (2003). "The thyrotropin receptor autoantigen in Graves disease is the culprit as well as the victim." *J Clin Invest* 111(12): 1897-904.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, et al. (1993). "Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles." *J Exp Med* 178(July): 27-47.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, et al. (1992). "Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size." *Nature* 358(6389): 764-8.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, et al. (1993). "Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles." *J Exp Med* 178(1): 27-47.
- Conant, S. B. and R. H. Swanborg (2003). "MHC class II peptide flanking residues of exogenous antigens influence recognition by autoreactive T cells." *Autoimmun Rev* 2(1): 8-12.
- Consiglio, E., A. M. Acquaviva, et al. (1987). "Characterization of phosphate residues on thyroglobulin." *J Biol Chem* 262(21): 10304-14.
- Corr, M., L. F. Boyd, et al. (1992). "Endogenous peptides of a soluble major histocompatibility complex class I molecule, H-2Lds: sequence motif, quantitative binding, and molecular modeling of the complex." *J Exp Med* 176(6): 1681-92.
- Corr, M., L. F. Boyd, et al. (1993). "H-2Dd exploits a four residue peptide binding motif." *J Exp Med* 178(6): 1877-92.
- Cresswell, P. (1994). "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules." *Annu Rev Immunol* 12: 259-93.
- Cresswell, P. (1996). "Invariant chain structure and MHC class II function." *Cell* 84(4): 505-7.
- Criswell, L. A., K. A. Pfeiffer, et al. (2005). "Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes." *Am J Hum Genet* 76(4): 561-71.
- Cuddihy, R. M., C. M. Dutton, et al. (1995). "A polymorphism in the extracellular domain of the thyrotropin receptor is highly associated with autoimmune thyroid disease in females." *Thyroid* 5(2): 89-95.
- Dai, Y. D., P. Eliades, et al. (2005). "Thyroxine-binding antibodies inhibit T cell recognition of a pathogenic thyroglobulin epitope." *J Immunol* 174(5): 3105-10.
- Dai, Y. D., V. P. Rao, et al. (2002). "Enhanced iodination of thyroglobulin facilitates processing and presentation of a cryptic pathogenic peptide." *J Immunol* 168(11): 5907-11.
- Damjanovski, S., M. Puzianowska-Kuznicka, et al. (2000). "Differential regulation of three thyroid hormone-responsive matrix metalloproteinase genes implicates distinct functions during frog embryogenesis." *Faseb J* 14(3): 503-10.
- Davenport, M. P., A. Godkin, et al. (1997). "A distinctive peptide binding motif for HLA-DRB1*0407, an HLA-DR4 subtype not associated with rheumatoid arthritis." *Immunogenetics* 45(3): 229-32.
- Davenport, M., A. Godkin, et al. (1997). "A distinctive peptide binding motif for HLA-DRB1*0407, an HLA-DR4 subtype not associated with rheumatoid arthritis." *Immunogenetics* 45(3): 229-232.

- Dawe, K. I., P. R. Hutchings, et al. (1996). "Unique role of thyroxine in T cell recognition of a pathogenic peptide in experimental autoimmune thyroiditis." *Eur J Immunol* 26(4): 768-72.
- Dayan, C. M., M. Londei, et al. (1991). "Autoantigen recognition by thyroid-infiltrating T cells in Graves disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16): 7415-9.
- DeMars, R., C. C. Chang, et al. (1983). "Dissection of the D-region of the human major histocompatibility complex by means of induced mutations in a lymphoblastoid cell line." *Hum Immunol* 8(2): 123-39.
- Dengjel, J., H. G. Rammensee, et al. (2005). "Glycan side chains on naturally presented MHC class II ligands." *J Mass Spectrom* 40(1): 100-4.
- Dengjel, J., M. D. Nastke, et al. (2006). "Unexpected Abundance of HLA Class II Presented Peptides in Primary Renal Cell Carcinomas." *Clin Cancer Res* 12(14): 4163-70.
- Dengjel, J., O. Schoor, et al. (2005). "Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(22): 7922-7.
- Dessen, A., C. M. Lawrence, et al. (1997). "X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II." *Immunity* 7(4): 473-81.
- Di Matola, T., F. Mueller, et al. (2000). "Serum withdrawal-induced apoptosis in thyroid cells is caused by loss of fibronectin-integrin interaction." *J Clin Endocrinol Metab* 85(3): 1188-93.
- Donaldson, P. T., A. Baragiotta, et al. (2006). "HLA class II alleles, genotypes, haplotypes, and amino acids in primary biliary cirrhosis: a large-scale study." *Hepatology* 44(3): 667-74.
- Dongre, A. R., S. Kovats, et al. (2001). "In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses." *Eur J Immunol* 31(5): 1485-94.
- Dunn, A. D. and J. T. Dunn (1982). "Thyroglobulin degradation by thyroidal proteases: action of purified cathepsin D." *Endocrinology* 111(1): 280-9.
- Dunn, A. D., H. E. Crutchfield, et al. (1991). "Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L." *J Biol Chem* 266(30): 20198-204.
- Duthoit, C., V. Estienne, et al. (2000). "Production of immunoreactive thyroglobulin C-terminal fragments during thyroid hormone synthesis." *Endocrinology* 141(7): 2518-25.
- Duthoit, C., V. Estienne, et al. (2001). "Hydrogen peroxide-induced production of a 40 kDa immunoreactive thyroglobulin fragment in human thyroid cells: the onset of thyroid autoimmunity?" *Biochem J* 360(Pt 3): 557-62.
- Egwuagu, C. E., P. Charukamnoetkanok, et al. (1997). "Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease." *J Immunol* 159(7): 3109-12.
- Ekholm, R., G. Engstrom, et al. (1975). "Exocytosis of protein into the thyroid follicle lumen: an early effect of TSH." *Endocrinology* 97(2): 337-46.
- El Hassani, R. A., V. Estienne, et al. (2004). "Antigenicity and immunogenicity of the C-terminal peptide of human thyroglobulin." *Peptides* 25(6): 1021-9.
- Elias, J. E. and S. P. Gygi (2007). "Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry." *Nat Methods* 4(3): 207-14.
- Elias, J. E., W. Haas, et al. (2005). "Comparative evaluation of mass spectrometry platforms used in large-scale proteomics investigations." *Nat Methods* 2(9): 667-75.
- Engelhard, V. H. (1994). "Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules." *Annu Rev Immunol* 12: 181-207.

- Engelhard, V. H., T. N. Bullock, et al. (2002). "Antigens derived from melanocyte differentiation proteins: self-tolerance, autoimmunity, and use for cancer immunotherapy." *Immunol Rev* 188: 136-46.
- Erich, H., A. M. Valdes, et al. (2008). "HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families." *Diabetes* 57(4): 1084-92.
- Esquivel, P. S., N. R. Rose, et al. (1977). "Induction of autoimmunity in good and poor responder mice with mouse thyroglobulin and lipopolysaccharide." *J Exp Med* 145(5): 1250-63.
- Estienne, V., R. S. McIntosh, et al. (1998). "Comparative mapping of cloned human and murine antithyroglobulin antibodies: recognition by human antibodies of an immunodominant region." *Thyroid* 8(8): 643-6.
- Falk, K., O. Rotzschke, et al. (1991). "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules." *Nature* 351(6324): 290-6.
- Falk, K., O. Rotzschke, et al. (1994). "Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules." *Immunogenetics* 39(4): 230-242.
- Falk, K., O. Rotzschke, et al. (1994). "Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules." *Immunogenetics* 39(4): 230-42.
- Farid, N. R., L. Sampson, et al. (1981). "The association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR5." *Tissue Antigens* 17(3): 265-8.
- Faure, G. C., D. Bensoussan-Lejzerowicz, et al. (1997). "Coexpression of CD40 and class II antigen HLA-DR in Graves' disease thyroid epithelial cells." *Clin Immunol Immunopathol* 84(2): 212-5.
- Fenouillet, E., G. Fayet, et al. (1986). "Immunochemical evidence for a role of complex carbohydrate chains in thyroglobulin antigenicity." *J Biol Chem* 261(32): 15153-8.
- Ferrari, C., A. Bertoletti, et al. (1991). "Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen." *J Clin Invest* 88(1): 214-22.
- Flynn, J. C., D. J. McCormick, et al. (2004). "Pathogenic human thyroglobulin peptides in HLA-DR3 transgenic mouse model of autoimmune thyroiditis." *Cell Immunol* 229(2): 79-85.
- Foley, T. P., Jr. (1992). "The relationship between autoimmune thyroid disease and iodine intake: a review." *Endokrynol Pol* 43 Suppl 1: 53-69.
- Foot, A., E. M. Briganti, et al. (2004). "Macrophage migration inhibitory factor in systemic lupus erythematosus." *J Rheumatol* 31(2): 268-73.
- Ford, H. C., W. C. Lim, et al. (1987). "Hemoglobin A1 and serum fructosamine levels in hyperthyroidism." *Clin Chim Acta* 166(2-3): 317-21.
- Fouchier, F., J. L. Mego, et al. (1983). "Intralysosomal hydrolysis of thyroglobulin. II. Different fates of poorly and fully iodinated Tg and specific activation by TSH of the degradation of fully iodinated Tg." *Acta Endocrinol (Copenh)* 103(1): 62-7.
- Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, et al. (1996). "Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides." *Science* 272(5264): 1001-4.
- Friede, T., V. Gnau, et al. (1996). "Natural ligand motifs of closely related HLA-DR4 molecules predict features of rheumatoid arthritis associated peptides." *Biochim.Biophys Acta* 1316(2): 85-101.
- Friedrichs, B., C. Tepel, et al. (2003). "Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L." *J Clin Invest* 111(11): 1733-45.
- Fu, X. T., C. P. Bono, et al. (1995). "Pocket 4 of the HLA-DR(alpha,beta 1*0401) molecule is a major determinant of T cells recognition of peptide." *J Exp Med* 181(3): 915-26.
- Furmaniak, J. and B. R. Smith (1990). "The structure of thyroid autoantigens." *Autoimmunity* 7(1): 63-80.

- Gardas, A., A. Lewartowska, et al. (1997). "Human thyroid peroxidase (TPO) isoforms, TPO-1 and TPO-2: analysis of protein expression in Graves' thyroid tissue." *J Clin Endocrinol Metab* 82(11): 3752-7.
- Gebe, J. A., E. Swanson, et al. (2002). "HLA class II peptide-binding and autoimmunity." *Tissue Antigens* 59(2): 78-87.
- Gelder, C., M. Davenport, et al. (1998). "Six unrelated HLA-DR-matched adults recognize identical CD4+ T cell epitopes from influenza A haemagglutinin that are not simply peptides with high HLA-DR binding affinities." *Int. Immunol.* 10(2): 211.
- Gerding, M. N., J. W. van der Meer, et al. (2000). "Association of thyrotrophin receptor antibodies with the clinical features of Graves' ophthalmopathy." *Clin Endocrinol (Oxf)* 52(3): 267-71.
- Ghosh, P., M. Amaya, et al. (1995). "The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3." *Nature* 378(6556): 457-62.
- Godelaine, D., M. J. Spiro, et al. (1981). "Processing of the carbohydrate units of thyroglobulin." *J Biol Chem* 256(19): 10161-8.
- Godkin, A. J., K. J. Smith, et al. (2001). "Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions." *J Immunol* 166(11): 6720-7.
- Gorski, J., C. Irle, et al. (1989). "Correlation of structure with T cell responses of the three members of the HLA-DRw52 allelic series." *J Exp Med* 170(3): 1027-32.
- Gregersen, P. K., J. Silver, et al. (1987). "The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 30(11): 1205-13.
- Grubeck-Loebenstein, B., G. Buchan, et al. (1989). "Analysis of intrathyroidal cytokine production in thyroid autoimmune disease: thyroid follicular cells produce interleukin-1 alpha and interleukin-6." *Clin Exp Immunol* 77(3): 324-30.
- Grubeck-Loebenstein, B., G. Buchan, et al. (1989). "Intrathyroidal cytokine production in thyroid disease." *J Autoimmun* 2 Suppl: 171-6.
- Hammer, J. (1993). "Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides." *Cell* 74: 197-203.
- Hammer, J. (1995). "New methods to predict MHC-binding sequences within protein antigens." *Curr Opin Immunol* 7(2): 263-9.
- Hammer, J., B. Takacs, et al. (1992). "Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries." *J Exp Med* 176(4): 1007-13.
- Hammer, J., B. Takacs, et al. (1992). "Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries." *J. Exp. Med* 176(4): 1007-1013.
- Hammer, J., E. Bono, et al. (1994). "Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning." *J Exp Med* 180(6): 2353-8.
- Hammer, J., F. Gallazzi, et al. (1995). "Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association." *J Exp Med* 181(5): 1847-55.
- Hammer, J., F. Gallazzi, et al. (1995). "Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association." *J. Exp. Med.* 181: 1847-1855.
- Hammer, J., P. Valsasini, et al. (1993). "Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides." *Cell* 74(1): 197-203.
- Hanafusa, T., R. Pujol-Borrell, et al. (1983). "Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity." *Lancet* 2(8359): 1111-5.
- Hitzel, C., P. van Endert, et al. (1995). "Acquisition of peptides by MHC class II polypeptides in the absence of the invariant chain." *J Immunol* 154(3): 1048-56.

- Hocevar, M., M. Auersperg, et al. (1997). "The dynamics of serum thyroglobulin elimination from the body after thyroid surgery." *Eur J Surg Oncol* 23(3): 208-10.
- Holdsworth, R., C. K. Hurley, et al. (2009). "The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens." *Tissue Antigens* 73(2): 95-170.
- Hollowell, J. G., N. W. Staehling, et al. (2002). "Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)." *J Clin Endocrinol Metab* 87(2): 489-99.
- Hoshioka, A., Y. Kohno, et al. (1993). "A common T-cell epitope between human thyroglobulin and human thyroid peroxidase is related to murine experimental autoimmune thyroiditis." *Immunol Lett* 37(2-3): 235-9.
- Houghten, R. A. (1985). "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(15): 5131-5.
- Hunt, D. F., H. Michel, et al. (1992). "Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-Ad." *Science* 256(5065): 1817-20.
- Hutchings, P. R., A. Cooke, et al. (1992). "A thyroxine-containing peptide can induce murine experimental autoimmune thyroiditis." *J Exp Med* 175(3): 869-72.
- Itoh, K. and A. Yamada (2006). "Personalized peptide vaccines: a new therapeutic modality for cancer." *Cancer Sci* 97(10): 970-6.
- Jacobson, E. M. and Y. Tomer (2007). "The genetic basis of thyroid autoimmunity." *Thyroid* 17(10): 949-61.
- Jaraquemada, D., W. Ollier, et al. (1983). "HLA-DB3: population distribution and family studies of a new HLA-D antigen associated with HLA-D antigen associated with HLA-DR4 in Caucasoids." *Tissue Antigens* 22(5): 315-25.
- Jardetzky, T. S., J. H. Brown, et al. (1996). "Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(2): 734-8.
- Katakura, M., T. Yamada, et al. (1987). "Presence of antideoxyribonucleic acid antibody in patients with hyperthyroidism of Graves' disease." *J Clin Endocrinol Metab* 64(3): 405-8.
- Keller, A., A. I. Nesvizhskii, et al. (2002). "Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search." *Anal Chem* 74(20): 5383-92.
- Kiljanski, J. I., K. Peele, et al. (1997). "Antibodies against striated muscle, connective tissue and nuclear antigens in patients with thyroid-associated ophthalmopathy: should Graves' disease be considered a collagen disorder?" *J Endocrinol Invest* 20(10): 585-91.
- Kim, P. S., D. Bole, et al. (1992). "Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP." *J Cell Biol* 118(3): 541-9.
- Kinouchi, R., H. Kobayasi, et al. (1994). "Peptide motifs of HLA-DR4/DR53 (DRB1*0405/DRB4*0101) molecules." *Immunogenetics* 40(5): 376-8.
- Kirschmann, D. A., K. L. Duffin, et al. (1995). "Naturally processed peptides from rheumatoid arthritis associated and non-associated HLA-DR alleles." *J Immunol* 155(12): 5655-62.
- Klein, M., I. Gestmann, et al. (2000). "The thioredoxin boxes of thyroglobulin: possible implications for intermolecular disulfide bond formation in the follicle lumen." *Biol Chem* 381(7): 593-601.
- Komosinska-Vassev, K., K. Winsz-Szczotka, et al. (2006). "Alterations in serum glycosaminoglycan profiles in Graves' patients." *Clin Chem Lab Med* 44(5): 582-8.
- Kondo, Y. and N. Ui (1961). "Iodination of thyroglobulin by thyroid cellular fractions and the role of thyrotropic hormone." *Biochim Biophys Acta* 48: 415-6.

- Kong, Y. C., D. J. McCormick, et al. (1995). "Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis. Secondary role of iodination." *J Immunol* 155(12): 5847-54.
- Kong, Y. C., L. C. Lomo, et al. (1996). "HLA-DRB1 polymorphism determines susceptibility to autoimmune thyroiditis in transgenic mice: definitive association with HLA-DRB1*0301 (DR3) gene." *J Exp Med* 184(3): 1167-72.
- Konno, N., H. Makita, et al. (1994). "Association between dietary iodine intake and prevalence of subclinical hypothyroidism in the coastal regions of Japan." *J Clin Endocrinol Metab* 78(2): 393-7.
- Kotsa, K. D., P. F. Watson, et al. (1997). "No association between a thyrotropin receptor gene polymorphism and Graves' disease in the female population." *Thyroid* 7(1): 31-3.
- Kotsa, K., P. F. Watson, et al. (1997). "A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism." *Clin Endocrinol (Oxf)* 46(5): 551-4.
- Kouki, T., C. A. Gardine, et al. (2002). "Relation of three polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients with Graves' disease." *J Endocrinol Invest* 25(3): 208-13.
- Kuhn, J. M., M. Rieu, et al. (1983). "Influence of thyroid status on hemoglobin A2 expression." *J Clin Endocrinol Metab* 57(2): 344-8.
- Lamas, L. and S. H. Ingbar (1978). "The effect of varying iodine content on the susceptibility of thyroglobulin to hydrolysis by thyroid acid protease." *Endocrinology* 102(1): 188-97.
- Lampson, L. A. and R. Levy (1980). "Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line." *J Immunol* 125(1): 293-9.
- Lanzavecchia, A. (1995). "How can cryptic epitopes trigger autoimmunity?" *J Exp Med* 181(6): 1945-8.
- Larsen, S. L., L. O. Pedersen, et al. (1996). "T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides." *J Exp Med* 184(1): 183-9.
- Laugwitz, K. L., A. Allgeier, et al. (1996). "The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1): 116-20.
- Li, H. S. and G. Carayanniotis (2006). "Iodination of tyrosyls in thyroglobulin generates neoantigenic determinants that cause thyroiditis." *J Immunol* 176(7): 4479-83.
- Li, H. S., H. Y. Jiang, et al. (2007). "Modifying effects of iodine on the immunogenicity of thyroglobulin peptides." *J Autoimmun* 28(4): 171-6.
- Lich, J. D., J. F. Elliott, et al. (2000). "Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins." *J Exp Med* 191(9): 1513-24.
- Lippolis, J. D., F. M. White, et al. (2002). "Analysis of MHC class II antigen processing by quantitation of peptides that constitute nested sets." *J Immunol* 169(9): 5089-97.
- Liu, H., A. J. MacKenzie-Graham, et al. (2001). "Mice resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis have increased thymic expression of myelin basic protein and increased MBP specific T cell tolerance." *J Neuroimmunol* 115(1-2): 118-26.
- Londei, M., G. F. Bottazzo, et al. (1985). "Human T-cell clones from autoimmune thyroid glands: specific recognition of autologous thyroid cells." *Science* 228(4695): 85-9.
- Long, E. O., T. LaVaute, et al. (1994). "Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide." *J Immunol* 153(4): 1487-94.
- Loosfelt, H., C. Pichon, et al. (1992). "Two-subunit structure of the human thyrotropin receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(9): 3765-9.
- Lopez de Castro, J. A., I. Alvarez, et al. (2004). "HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands." *Tissue Antigens* 63(5): 424-45.

- Loviselli, A., F. Velluzzi, et al. (1992). "Circulating antibodies to DNA-related antigens in patients with autoimmune thyroid disorders." *Autoimmunity* 14(1): 33-6.
- Lovitch, S. B., S. J. Petzold, et al. (2003). "Cutting edge: H-2DM is responsible for the large differences in presentation among peptides selected by I-Ak during antigen processing." *J Immunol* 171(5): 2183-6.
- Lovitch, S. B., Z. Pu, et al. (2006). "Amino-terminal flanking residues determine the conformation of a peptide-class II MHC complex." *J Immunol* 176(5): 2958-68.
- Lucas-Martin, A., M. Foz-Sala, et al. (1988). "Occurrence of thyrocyte HLA class II expression in a wide variety of thyroid diseases: relationship with lymphocytic infiltration and thyroid autoantibodies." *J Clin Endocrinol Metab* 66(2): 367-75.
- Ludgate, M. and G. Baker (2002). "Unlocking the immunological mechanisms of orbital inflammation in thyroid eye disease." *Clin Exp Immunol* 127(2): 193-8.
- Maile, R., K. A. Elsegood, et al. (2000). "Effective formation of major histocompatibility complex class II-peptide complexes from endogenous antigen by thyroid epithelial cells." *Immunology* 99(3): 367-74.
- Marino, M. and R. T. McCluskey (2000). "Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release." *Am J Physiol Cell Physiol* 279(5): C1295-306.
- Marshall, K. W., K. J. Wilson, et al. (1995). "Prediction of peptide affinity to HLA DR molecules." *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1(3): 157-62.
- Marshall, K. W., K. J. Wilson, et al. (1995). "Prediction of peptide affinity to HLA DRB1*0401." *J Immunol* 154(11): 5927-33.
- Matsumura, M., D. H. Fremont, et al. (1992). "Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules." *Science* 257(5072): 927-34.
- McLachlan, S. M., Y. Nagayama, et al. (2005). "Insight into Graves' hyperthyroidism from animal models." *Endocr Rev* 26(6): 800-32.
- McNicholl, J. M., W. C. Whitworth, et al. (1995). "Structural requirements of peptide and MHC for DR(alpha, beta 1*0401)-restricted T cell antigen recognition." *J Immunol* 155(4): 1951-63.
- Melief, C. J., R. Offringa, et al. (1996). "Peptide-based cancer vaccines." *Curr Opin Immunol* 8(5): 651-7.
- Metaye, T., C. Millet, et al. (1993). "Estrogen receptors and cathepsin D in human thyroid tissue." *Cancer* 72(6): 1991-6.
- Metaye, T., J. L. Kraimps, et al. (1997). "Expression, localization, and thyrotropin regulation of cathepsin D in human thyroid tissues." *J Clin Endocrinol Metab* 82(10): 3383-8.
- Miettinen, M. and I. Virtanen (1984). "Expression of laminin in thyroid gland and thyroid tumors: an immunohistologic study." *Int J Cancer* 34(1): 27-30.
- Moens, H., N. R. Farid, et al. (1978). "Hashimoto's thyroiditis is associated with HLA-DRw3." *N Engl J Med* 299(3): 133-4.
- Mohan Kumar, K. M., Z. Bobby, et al. (2004). "Possible link between glycosylated hemoglobin and lipid peroxidation in hyperthyroidism." *Clin Chim Acta* 342(1-2): 187-92.
- Mullarkey, M. E., A. M. Stevens, et al. (2005). "Human leukocyte antigen class II alleles in Caucasian women with primary biliary cirrhosis." *Tissue Antigens* 65(2): 199-205.
- Muntasell, A., M. Carrascal, et al. (2002). "HLA-DR4 molecules in neuroendocrine epithelial cells associate to a heterogeneous repertoire of cytoplasmic and surface self peptides." *J Immunol* 169(9): 5052-60.
- Muntasell, A., M. Carrascal, et al. (2004). "Dissection of the HLA-DR4 peptide repertoire in endocrine epithelial cells: strong influence of invariant chain and HLA-DM expression on the nature of ligands." *J Immunol* 173(2): 1085-93.
- Muresan, Z. and P. Arvan (1998). "Enhanced binding to the molecular chaperone BiP slows thyroglobulin export from the endoplasmic reticulum." *Mol Endocrinol* 12(3): 458-67.

- Nagayama, Y., H. L. Wadsworth, et al. (1991). "Binding domains of stimulatory and inhibitory thyrotropin (TSH) receptor autoantibodies determined with chimeric TSH-lutropin/chorionic gonadotropin receptors." *J Clin Invest* 88(1): 336-40.
- Nelson, C. A., R. W. Roof, et al. (1992). "Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-Ak." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(16): 7380-3.
- Nepom, G. T. (2005). "Tetramer Analysis of Human Autoreactive CD4-Positive T Cells." *Adv Immunol* 88: 51-71.
- Netto, M. and D. Rosenthal (1982). "Albumin concentration in normal and pathological human thyroids." *Braz J Med Biol Res* 15(2-3): 135-41.
- Newcomb, J. R., Surman, M.J. and P. Cressweel (1993). "Characterization of endogenous peptides bound to purified HLA-DR molecules and their absense from invariant chain-associated alpha beta dimers." *J.Immunol.* 150(2): 499-507.
- Norrbj-Teglund, A., G. T. Nepom, et al. (2002). "Differential presentation of group A streptococcal superantigens by HLA class II DQ and DR alleles." *Eur J Immunol* 32(9): 2570-7.
- O'Leary, P. C., P. H. Feddema, et al. (2006). "Investigations of thyroid hormones and antibodies based on a community health survey: the Busselton thyroid study." *Clin Endocrinol (Oxf)* 64(1): 97-104.
- Oshitani, N., F. Hato, et al. (2003). "Analysis of intestinal HLA-DR bound peptides and dysregulated immune responses to enteric flora in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." *Int J Mol Med* 11(1): 99-104.
- O'Sullivan, D., T. Arrhenius, et al. (1991). "On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs." *J Immunol* 147(8): 2663-9.
- Papanastasiou, L., I. A. Vatalas, et al. (2007). "Thyroid autoimmunity in the current iodine environment." *Thyroid* 17(8): 729-39.
- Paradela, A., M. Garcia-Peydro, et al. (1998). "The same natural ligand is involved in allorecognition of multiple HLA-B27 subtypes by a single T cell clone: role of peptide and the MHC molecule in alloreactivity." *J Immunol* 161(10): 5481-90.
- Patil, N. S., A. Pashine, et al. (2001). "Rheumatoid arthritis (RA)-associated HLA-DR alleles form less stable complexes with class II-associated invariant chain peptide than non-RA-associated HLA-DR alleles." *J Immunol* 167(12): 7157-68.
- Pedro, A. B., J. H. Romaldini, et al. (2006). "Association of circulating antibodies against double-stranded and single-stranded DNA with thyroid autoantibodies in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis patients." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114(1): 35-8.
- Powell, N. D., T. L. Papenfuss, et al. (2005). "Cutting edge: macrophage migration inhibitory factor is necessary for progression of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 175(9): 5611-4.
- Prabhakar, B. S., R. S. Bahn, et al. (2003). "Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy." *Endocr Rev* 24(6): 802-35.
- Prentice, L. M., D. I. Phillips, et al. (1990). "Geographical distribution of subclinical autoimmune thyroid disease in Britain: a study using highly sensitive direct assays for autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase." *Acta Endocrinol (Copenh)* 123(5): 493-8.
- Pujo-Borrell, R., T. Hanafusa, et al. (1983). "Lectin-induced expression of DR antigen on human cultured follicular thyroid cells." *Nature* 304(5921): 71-3.
- Quaratino, S., M. Feldmann, et al. (1996). "Human self-reactive T cell clones expressing identical T cell receptor beta chains differ in their ability to recognize a cryptic self-epitope." *J Exp Med* 183(2): 349-58.
- Radstake, T. R., F. C. Sweep, et al. (2005). "Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and circulating levels of macrophage migration inhibitory factor." *Arthritis Rheum* 52(10): 3020-9.
- Rammensee, H. G. (1995). "Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules." *Curr Opin Immunol* 7(1): 85-96.

- Rammensee, H. G., T. Friede, et al. (1995). "MHC ligands and peptide motifs: first listing." *Immunogenetics* 41(4): 178-228.
- Rammensee, H., J. Bachmann, et al. (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." *Immunogenetics* 50(3-4): 213-9.
- Rao, V. P. and G. Carayanniotis (1997). "Contrasting immunopathogenic properties of highly homologous peptides from rat and human thyroglobulin." *Immunology* 90(2): 244-9.
- Rapoport, B., G. D. Chazenbalk, et al. (1998). "The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies." *Endocr Rev* 19(6): 673-716.
- Rasooly, L., C. L. Burek, et al. (1996). "Iodine-induced autoimmune thyroiditis in NOD-H-2h4 mice." *Clin Immunol Immunopathol* 81(3): 287-92.
- Raspe, E., S. Costagliola, et al. (1995). "Identification of the thyroid Na⁺/I⁻ cotransporter as a potential autoantigen in thyroid autoimmune disease." *Eur J Endocrinol* 132(4): 399-405.
- Ratanachaiyavong, S., A. G. Demaine, et al. (1991). "Heat shock protein 70 (HSP70) and complement C4 genotypes in patients with hyperthyroid Graves' disease." *Clin Exp Immunol* 84(1): 48-52.
- Rees Smith, B., S. M. McLachlan, et al. (1988). "Autoantibodies to the thyrotropin receptor." *Endocr Rev* 9(1): 106-21.
- Reinherz, E. L., K. Tan, et al. (1999). "The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II." *Science* 286(5446): 1913-21.
- Ribeiro-Carvalho, M. M., D. A. Farias-de-Oliveira, et al. (2002). "Triiodothyronine modulates extracellular matrix-mediated interactions between thymocytes and thymic microenvironmental cells." *Neuroimmunomodulation* 10(3): 142-52.
- Rocha, N. and J. Neefjes (2008). "MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation." *Embo J* 27(1): 1-5.
- Roche, P. A. and P. Cresswell (1990). "High-affinity binding of an influenza hemagglutinin-derived peptide to purified HLA-DR." *J Immunol* 144(5): 1849-56.
- Rose, N. R. and C. L. Burek (2000). "Autoantibodies to thyroglobulin in health and disease." *Appl Biochem Biotechnol* 83(1-3): 245-51; discussion 251-4, 297-313.
- Rose, N. R. and E. Witebsky (1956). "Studies on organ specificity. V. Changes in the thyroid glands of rabbits following active immunization with rabbit thyroid extracts." *J Immunol* 76(6): 417-27.
- Rose, N. R., F. J. Twarog, et al. (1971). "Murine thyroiditis: importance of adjuvant and mouse strain for the induction of thyroid lesions." *J Immunol* 106(3): 698-704.
- Rose, N. R., L. Rasooly, et al. (1999). "Linking iodine with autoimmune thyroiditis." *Environ Health Perspect* 107 Suppl 5: 749-52.
- Rose, N. R., R. Bonita, et al. (2002). "Iodine: an environmental trigger of thyroiditis." *Autoimmun Rev* 1(1-2): 97-103.
- Roura-Mir, C., M. Catalfamo, et al. (1997). "Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease." *Eur J Immunol* 27(12): 3290-302.
- Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, et al. (1991). "Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules." *Nature* 353(6345): 622-7.
- Runstadler, J. A., H. Salla, et al. (2003). "Analysis of MHC region genetics in Finnish patients with juvenile idiopathic arthritis: evidence for different locus-specific effects in polyarticular vs pauciarticular subsets and a shared DRB1 epitope." *Genes Immun* 4(5): 326-35.
- Saboori, A. M., N. R. Rose, et al. (1999). "Peptides of human thyroglobulin reactive with sera of patients with autoimmune thyroid disease." *J Immunol* 163(11): 6244-50.
- Sanchez, E., L. M. Gomez, et al. (2006). "Evidence of association of macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus." *Genes Immun* 7(5): 433-6.

- Santambrogio, L., A. K. Sato, et al. (1999). "Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26): 15056-61.
- Sant'Angelo, D. B., E. Robinson, et al. (2002). "Recognition of core and flanking amino acids of MHC class II-bound peptides by the T cell receptor." *Eur J Immunol* 32(9): 2510-20.
- Santos, L., P. Hall, et al. (2001). "Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids." *Clin Exp Immunol* 123(2): 309-14.
- Scherberg, N. H., G. Vassart, et al. (1981). "Modulation of thyroglobulin messenger RNA accumulation in the rat thyroid." *Endocrinology* 109(5): 1650-6.
- Schneider, A. B., K. Ikekubo, et al. (1983). "Iodine content of serum thyroglobulin in normal individuals and patients with thyroid tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 57(6): 1251-6.
- Schwarz-Lauer, L., G. D. Chazenbalk, et al. (2002). "Evidence for a simplified view of autoantibody interactions with the thyrotropin receptor." *Thyroid* 12(2): 115-20.
- Scott, C. A., P. A. Peterson, et al. (1998). "Crystal structures of two I-Ad-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues." *Immunity* 8(3): 319-29.
- Sercarz, E. E. and E. Maverakis (2003). "Mhc-guided processing: binding of large antigen fragments." *Nat Rev Immunol* 3(8): 621-9.
- Sercarz, E. E., P. V. Lehmann, et al. (1993). "Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants." *Annu Rev Immunol* 11: 729-66.
- Sette, A., J. Sidney, et al. (1993). "HLA-DR4w4-binding motifs illustrate the biochemical basis of degeneracy and specificity in peptide-DR interactions." *J Immunol* 151(6): 3163-3170.
- Shimoda, S., M. Nakamura, et al. (1995). "HLA DRB4 0101-restricted immunodominant T cell autoepitope of pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: evidence of molecular mimicry in human autoimmune diseases." *J Exp Med* 181(5): 1835-45.
- Shirakami, A., Y. Hirai, et al. (1986). "Changes in plasma fibronectin levels in thyroid diseases." *Horm Metab Res* 18(5): 345-8.
- Sidney, J., H. M. Grey, et al. (1996). "Definition of an HLA-A3-like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules." *Hum Immunol* 45(2): 79-93.
- Sidney, J., H. M. Grey, et al. (1996). "Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs." *Immunol Today* 17(6): 261-6.
- Sidney, J., M. F. del Guercio, et al. (1995). "Several HLA alleles share overlapping peptide specificities." *J Immunol* 154(1): 247-59.
- Simmonds, M. J. and S. C. Gough (2004). "Unravelling the genetic complexity of autoimmune thyroid disease: HLA, CTLA-4 and beyond." *Clin Exp Immunol* 136(1): 1-10.
- Singh, H. and G. P. Raghava (2001). "ProPred: prediction of HLA-DR binding sites." *Bioinformatics* 17(12): 1236-7.
- Sospedra, M., G. Obiols, et al. (1995). "Hyperinducibility of HLA class II expression of thyroid follicular cells from Graves' disease. A primary defect?" *J Immunol* 154(8): 4213-22.
- Sospedra, M., X. Ferrer-Francesch, et al. (1998). "Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens." *J Immunol* 161(11): 5918-29.
- Southwood, S., J. Sidney, et al. (1998). "Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires." *J Immunol* 160(7): 3363-73.
- Spitzweg, C., W. Joba, et al. (1999). "Expression of thyroid-related genes in human thymus." *Thyroid* 9(2): 133-41.

- Stern, L. J., J. H. Brown, et al. (1994). "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide." *Nature* 368(6468): 215-21.
- Stern, L. J., J. H. Brown, et al. (1994). "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide." *Nature* 368: 215-221.
- Stosic-Grujicic, S., I. Stojanovic, et al. (2008). "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus." *J Cell Physiol* 215(3): 665-75.
- Stosic-Grujicic, S., I. Stojanovic, et al. (2008). "MIF in autoimmunity and novel therapeutic approaches." *Autoimmun Rev.*
- Sturniolo, T., E. Bono, et al. (1999). "Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices." *Nat Biotechnol* 17(6): 555-61.
- Sundick, R. S., D. M. Herdegen, et al. (1987). "The incorporation of dietary iodine into thyroglobulin increases its immunogenicity." *Endocrinology* 120(5): 2078-84.
- Suri, A., J. J. Walters, et al. (2003). "Specificity of peptide selection by antigen-presenting cells homozygous or heterozygous for expression of class II MHC molecules: The lack of competition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5330-5.
- Suri, A., J. J. Walters, et al. (2008). "First signature of islet beta-cell-derived naturally processed peptides selected by diabetogenic class II MHC molecules." *J Immunol* 180(6): 3849-56.
- Suri, A., S. B. Lovitch, et al. (2006). "The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules." *Curr Opin Immunol* 18(1): 70-7.
- Tanaka, K., G. D. Chazenbalk, et al. (1999). "The shed thyrotropin receptor is primarily a carboxyl terminal truncated form of the A subunit, not the entire A subunit." *Mol Cell Endocrinol* 150(1-2): 113-9.
- Texier, C., S. Pouvelle-Moratille, et al. (2001). "Complementarity and redundancy of the binding specificity of HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 molecules." *Eur J Immunol* 31(6): 1837-46.
- Thrasyvoulides, A. and P. Lymberi (2003). "Evidence for intramolecular B-cell epitope spreading during experimental immunization with an immunogenic thyroglobulin peptide." *Clin Exp Immunol* 132(3): 401-7.
- Thrasyvoulides, A., M. Sakarellos-Daitsiotis, et al. (2001). "B-cell autoepitopes on the acetylcholinesterase-homologous region of human thyroglobulin: association with Graves' disease and thyroid eye disease." *Eur J Endocrinol* 145(2): 119-27.
- Toes, R. E., R. Offringa, et al. (1996). "Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 7855-60.
- Tolosa, E., C. Roura, et al. (1992). "Expression of intercellular adhesion molecule-1 in thyroid follicular cells in autoimmune, non-autoimmune and neoplastic diseases of the thyroid gland: discordance with HLA." *J Autoimmun* 5(1): 107-18.
- Tomer, Y. and T. F. Davies (2003). "Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function." *Endocr Rev* 24(5): 694-717.
- Tomer, Y., D. A. Greenberg, et al. (2002). "Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases." *J Clin Endocrinol Metab* 87(1): 404-7.
- Tomer, Y., E. Concepcion, et al. (2002). "A C/T single-nucleotide polymorphism in the region of the CD40 gene is associated with Graves' disease." *Thyroid* 12(12): 1129-35.
- Tomer, Y., G. Barbesino, et al. (1998). "A new Graves disease-susceptibility locus maps to chromosome 20q11.2. International Consortium for the Genetics of Autoimmune Thyroid Disease." *Am J Hum Genet* 63(6): 1749-56.
- Tonacchera, M. and A. Pinchera (2000). "Thyrotropin receptor polymorphisms and thyroid diseases." *J Clin Endocrinol Metab* 85(8): 2637-9.

- Trentin, A. G., C. B. De Aguiar, et al. (2003). "Thyroid hormone modulates the extracellular matrix organization and expression in cerebellar astrocyte: effects on astrocyte adhesion." *Glia* 42(4): 359-69.
- Ueda, H., J. M. Howson, et al. (2003). "Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease." *Nature* 423(6939): 506-11.
- Vali, M., N. R. Rose, et al. (2000). "Thyroglobulin as autoantigen: structure-function relationships." *Rev Endocr Metab Disord* 1(1-2): 69-77.
- van der Burg, S. H., M. S. Bijker, et al. (2006). "Improved peptide vaccine strategies, creating synthetic artificial infections to maximize immune efficacy." *Adv Drug Deliv Rev* 58(8): 916-30.
- Van Kerckhove, C., H. Melin-Aldana, et al. (1990). "A distinct HLA-DRw8 haplotype characterizes patients with juvenile rheumatoid arthritis." *Immunogenetics* 32(5): 304-8.
- Vanderpump, M. P., W. M. Tunbridge, et al. (1995). "The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey." *Clin Endocrinol (Oxf)* 43(1): 55-68.
- Velaga, M. R., V. Wilson, et al. (2004). "The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease." *J Clin Endocrinol Metab* 89(11): 5862-5.
- Verginis, P., M. M. Stanford, et al. (2002). "Delineation of five thyroglobulin T cell epitopes with pathogenic potential in experimental autoimmune thyroiditis." *J Immunol* 169(9): 5332-7.
- Verreck, F. A., A. van de Poel, et al. (1994). "Identification of an HLA-DQ2 peptide binding motif and HLA-DPw3-bound self-peptide by pool sequencing." *Eur J Immunol* 24(2): 375-9.
- Verreck, F. A., A. van de Poel, et al. (1996). "Natural peptides isolated from Gly86/Val86-containing variants of HLA-DR1, -DR11, -DR13, and -DR52." *Immunogenetics* 43(6): 392.
- Viatte, S., P. M. Alves, et al. (2006). "Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles." *Immunol Cell Biol* 84(3): 318-30.
- Vogt, A. B., H. Kropshofer, et al. (1994). "Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides." *J Immunol* 153(4): 1665-73.
- Vogt, A. B., H. Kropshofer, et al. (1994). "Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides." *J Immunol* 153(4): 1665-1673.
- Wahlstrom, J., J. Dengjel, et al. (2007). "Identification of HLA-DR-bound peptides presented by human bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis." *J Clin Invest* 117(11): 3576-82.
- Wan, Q., R. Shah, et al. (2002). "HLA-DR and HLA-DQ polymorphism in human thyroglobulin-induced autoimmune thyroiditis: DR3 and DQ8 transgenic mice are susceptible." *Hum Immunol* 63(4): 301-10.
- Wang, R., Y. Charoenvit, et al. (1996). "Protection against malaria by Plasmodium yoelii sporozoite surface protein 2 linear peptide induction of CD4+ T cell- and IFN-gamma-dependent elimination of infected hepatocytes." *J Immunol* 157(9): 4061-7.
- Watts, C. (1997). "Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules." *Annu Rev Immunol* 15: 821-50.
- Weetman, A. P., D. J. Volkman, et al. (1986). "The production and characterization of thyroid-derived T-cell lines in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis." *Clin Immunol Immunopathol* 39(1): 139-50.
- Winchester, R. (1994). "The molecular basis of susceptibility to rheumatoid arthritis." *Adv Immunol* 56: 389-466.
- Wordsworth, B. P., J. S. Lanchbury, et al. (1989). "HLA-DR4 subtype frequencies in rheumatoid arthritis indicate that DRB1 is the major susceptibility locus within the HLA class II region." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(24): 10049-53.

- Wucherpennig, K. W. and J. L. Strominger (1995). "Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases." *J Exp Med* 181(5): 1597-601.
- Wucherpennig, K. W., A. Sette, et al. (1994). "Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones." *J. Exp. Med* 179(1): 279-290.
- Yanagawa, T., A. Manglabruks, et al. (1993). "Human histocompatibility leukocyte antigen-DQA1*0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population." *J Clin Endocrinol Metab* 76(6): 1569-74.
- Yanagawa, T., Y. Hidaka, et al. (1995). "CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population." *J Clin Endocrinol Metab* 80(1): 41-5.
- Yoshinari, M. and A. Taurog (1985). "Lysosomal digestion of thyroglobulin: role of cathepsin D and thiol proteases." *Endocrinology* 117(4): 1621-31.
- Zavala-Ruiz, Z., E. J. Sundberg, et al. (2003). "Exploration of the P6/P7 region of the peptide-binding site of the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1." *J Biol Chem* 278(45): 44904-12.
- Zhang, Z. G., Q. Dong, et al. (1992). "Antibodies in the serum of patients with autoimmune thyroid disorders react with a recombinant 98 amino acid fragment of a full length 64 kDa eye muscle membrane protein which is also expressed in the thyroid." *Autoimmunity* 13(2): 151-7.
- Zheng, R. Q., E. R. Abney, et al. (1990). "Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-3 on human thyroid epithelial cells in Graves' and Hashimoto's diseases." *J Autoimmun* 3(6): 727-36.
- Zinkernagel, R. M., S. Ehl, et al. (1997). "Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity." *Immunol Rev* 156: 199-209.

ANNEX:

CARACTERITZACIÓ DEL REPERTORI PRESENTAT PER MHC DE CLASSE II EN CÈL·LULES DE LIMFA DE BENS EN CONDICIONS D'HOMÈOSTASIS

ARTICLES:

- Muixí et al. Characterization of naturally processed MHC class II peptides on ovine skin lymph dendritic cells at steady state (manuscrit en preparació)

INTRODUCCIÓ

Aquest treball s'ha fet en col·laboració amb el grup de la Dra Isabelle Schwartz-Cornil, del Centre de Recerca INRA de Jouy-en-Josas, França. En el seu laboratori tenen a punt un sistema de canulació del conducte limfàtic cervical pseudo-aferent en bens que permet col·lectar limfa en condicions fisiològiques. Amb aquesta metodologia es poden recolectar grans quantitats de cèl·lules dendrítiques (DC) de diferents subtipus així com altres leucòcits circulants provinents de les mucoses oro-nasals abans de la seva entrada als nòduls limfàtics (Schwartz-Cornil, Epardaud et al. 2005; Schwartz-Cornil, Epardaud et al. 2006). Aquestes mucoses són portes d'entrada al cos i estan amb contacte constant amb grans quantitats d'antígens orals o inhalats així com patògens potencials.

La cateterització del conducte limfàtic pseudoaferent s'ha dut a terme prèviament per estudiar la migració cel·lular i el transport antigènic dins la limfa (Howard, Sopp et al. 1997; Liu, Zhang et al. 1998; Hein, Barber et al. 2004; Bonneau, Epardaud et al. 2006), i gràcies a aquesta metodologia s'ha demostrat la presència de dues subpoblacions de DC en varies espècies, rates (Huang, Platt et al. 2000), bovins (Howard, Sopp et al. 1997) i ovins (Pernthaner, Cole et al. 2002; Epardaud, Bonneau et al. 2004)

L'objectiu d'aquesta col·laboració era fer una primera aproximació a l'estudi dels pèptids associats a classe II en cèl·lules dendrítiques provinents de la perifèria abans d'entrar al gangli en absència d'infecció. Aquest treball pot aportar informació sobre la funció d'aquestes cèl·lules en la regulació del sistema immunitari.

Les dificultats del projecte radicaven primer en l'obtenció d'un nombre suficient de cèl·lules per poder identificar pèptids i després en l'escassa informació disponible sobre el proteoma oví. El nombre màxim de cèl·lules que es va poder recollir d'un mateix animal va ser $260 \cdot 10^6$ amb entre 25-40% de DC. Per altra banda, a l'hora d'identificar els pèptids es va haver d'utilitzar una base de dades de proteïnes de mamífers ja que la de bens no està completa, per tant part de la informació obtinguda es podia perdre.

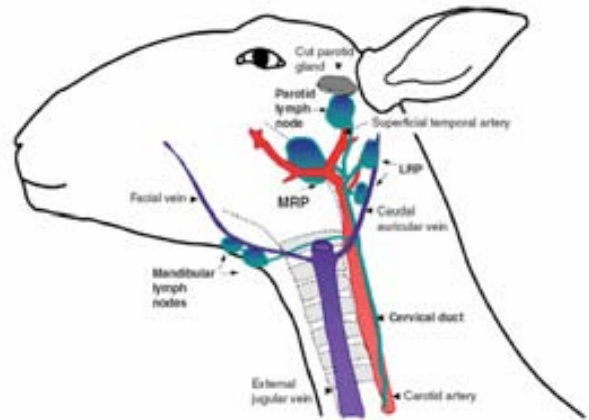


Figura 1: Localització dels nòduls limfàtics del cap i del conducte cervical

1. EL SISTEMA LIMFÀTIC

El sistema limfàtic és l'encarregat de drenar el líquid intersticial de la pell, els epitelis i els diferents òrgans (Figura 2). El líquid intersticial absorbit, anomenat limfa, flueix a través dels vasos limfàtics fins

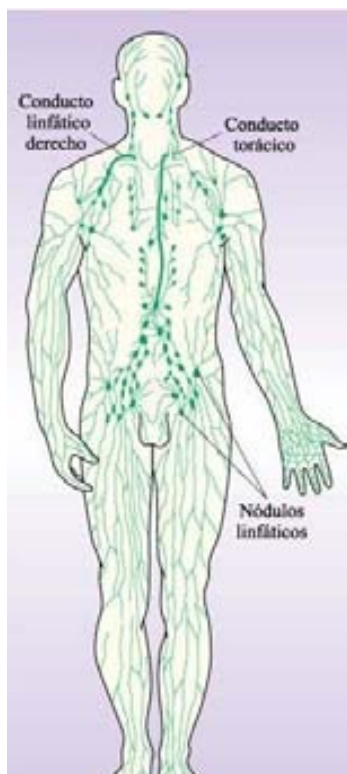


Figura 2: Sistema limfàtic humà

al conducte toràcic on el líquid és retornat al sistema circulatori per la vena cava superior. La limfa és un líquid molt similar al plasma sanguini, però que conté un elevat nombre de leucòcits. També conté proteïnes, restes cel·lulars i pot contenir partícules foranies i patògens. Els ganglis limfàtics es troben interposats al llarg dels vasos limfàtics i actuen com a filtres que mostregen la limfa abans que aquesta torni a la sang. Els antígens solubles i particulats, presents a la pell, mucoses i altres teixits entren al sistema limfàtic i són transportats als ganglis limfàtics. Els antígens també poden ser recollits per DC immadures residents als epitelis i ser transportats fins als ganglis limfàtics proximals.

Quan la limfa entra als nòduls limfàtics (NL) pels vasos limfàtics aferents, es filtra a través de l'estroma. Les DC portadores d'antigen un cop al gangli es situen al paracòrtex, zona rica en cèl·lules T. Per altra banda cèl·lules residents a l'estroma ganglionar com macròfags, DC i limfòcits B poden processar els antígens solubles o opsonitzats transportats per la limfa. D'aquesta manera els limfòcits B, les DC i els macròfags un cop han processat els antígens poden presentar-los a les cèl·lules T.

Al llarg dels anys s'ha anat fent treballs de caracterització, cada cop més precisos, de les diferents poblacions presents a la limfa de mamífers. A principis dels 70 es va fer un estudi comparatiu del contingut cel·lular en ovins, de la limfa perifèrica (limfa que no ha passat per cap NL) i la central (que ha passat a través d'un NL) (Smith, McIntosh et al. 1970). En aquest treball descrivien visualment el contingut cel·lular, i veien que la població majoritària de la limfa perifèrica eren els limfòcits, que representaven entre 75-90% i la resta eren entre un 5-20% macròfags i entre un 0-5% altres tipus cel·lulars (incloent neutròfils, eosinòfils, basòfils), a la limfa central en canvi entre un 95-100% eren limfòcits i entre un 0-5% altres tipus cel·lulars.

Posteriorment en un estudi més exhaustiu, amb Ab monoclonals, on caracteritzaven les poblacions cel·lulars de la limfa perifèrica de bens, observaven que un 83.5% de les cèl·lules eren limfòcits T i un 13.3% B. Un 50.2% dels limfòcits eren cèl·lules T CD4⁺, mentre que un 7.3% eren CD8⁺. Pel que fa referència a l'expressió de MHC entre els limfòcits un 71.1% eren classe I positius i un 21.8% expressaven classe II. En quan a altres tipus cel·lulars no limfoides, hi havia entre 1-10% de DC (Bujdoso, Hopkins et al. 1989). Els macròfags i cèl·lules velades (DC) de la limfa perifèrica expressaven classe II i classe I (Hein, McClure et al. 1987).

En un treball més recent fet en bens es va veure que la limfa cervical contenia majoritàriament cèl·lules T $CD4^+$ (entre un 50-60%), principalment cèl·lules memòria, $CD45RA^-$ i $CD2^{hi}$ i hi havia entre un 11-24% de cèl·lules $CD25^+$, que podrien correspondre a cèl·lules T reguladores. De la resta de cèl·lules, hi havia entre un 8-13% de limfòcits T $CD8^+$, 9-15% de cèl·lules B, 3-6% cèl·lules T γ/δ , 0.1-2% de monòcits, 0.1-3% de granulòcits i aproximadament un 1% de DC, amb entre 0.2-0.5% de DC plasmacitoides ($CD45RB^{hi}$, $MHC II^{lo}$) (Schwartz-Cornil, Epardaud et al. 2005).

2. LES CÈL·LULES DENDRITIQUES

Les cèl·lules dendrítiques tenen un rol central en l'activació de les cèl·lules T naïve. Estan especialitzades en la captació i el processament d'antígens, per presentar-los via MHC als limfòcits T i iniciar una resposta immune. Capten l'antigen en els teixits perifèrics, a través de múltiples mecanismes (pinocitosi, fagocitosi, endocitosi per receptor) (Lanzavecchia 1996) i el transporten als nòduls limfàtics (NL). La captació d'antígens i l'inici de la resposta immune són funcions que la DC du a terme en diferents estadis funcionals, anomenats immadur i madur (Figura 3)

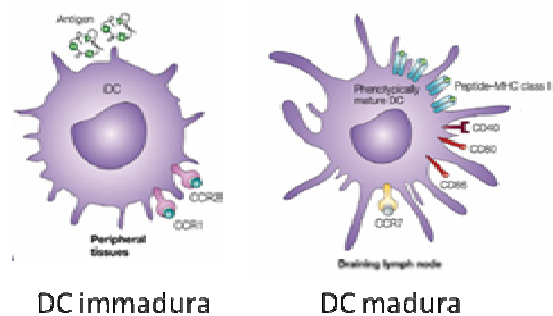


Figura 3: Estats funcionals de les DC. DC immadures, capten antigen, tenen diferents receptors per realitzar aquesta funció. DC madures, pateixen canvis com l'augment de l'expressió de complexes MHC-pèptid i de molècules coestimuladores, la síntesis de citocines, i l'expressió de receptors de quimiocines i citocines.

Les DC immadures es troben a la pell i als epitelis intestinals i respiratoris, que són les principals vies d'entrada dels antígens. Aquestes cèl·lules expressen nivells baixos de MHC i de molècules coestimuladores, i acumulen molècules de MHC II als compartiments endosomals. La seva principal funció és la captació i transport d'antígens als NL drenants. Estan equipades amb una sèrie de receptors de patrons moleculars, com els toll-like (TLR) i receptors de citocines i quimiocines que les guien cap als òrgans limfoides secundaris. Durant aquest viatge fins als NL les DC van madurant i comencen a expressar nivells alts de MHC i molècules coestimuladores a la membrana. Les DC madures són eficients presentadores d'antigen i estimuladores de les cèl·lules T i es localitzen a les zones T dels NL (Villadangos and Schnorrer 2007). La maduració es dona en resposta a productes microbians a través de TLR o a senyals provinents de cèl·lules T activades o macròfags.

Les DC també que són capaces d'induir tolerància (Finkelman, Lees et al. 1996). Inicialment es va suggerir que la tolerància i la immunitat eren dutes a terme per les DC en els diferents estats funcionals (Finkelman, Lees et al. 1996) (Figura 4), però posteriorment s'ha vist que DC fenotípicament madures també poden induir tolerància (Albert, Jegathesan et al. 2001).

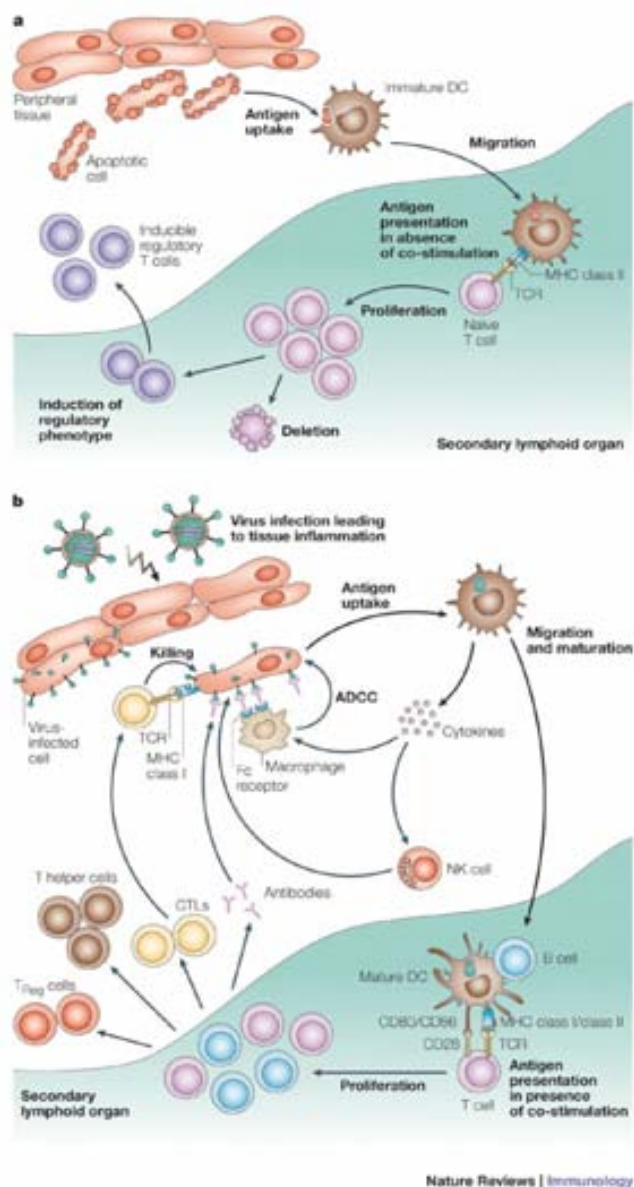


Figura 4: Diferents funcions de les DC madures i immadures. a) Les DC immadures indueixen tolerància. Les DC del teixit mostregen constantment el seu entorn, capten antígens i migren cap als NL proximals. Quan no hi ha un procés inflamatori les DC romanen en un estat immadur i presenten antígens a les cèl·lules T sense coestímuls, la qual cosa genera deleció de cèl·lules T o generació de cèl·lules T reguladores induïbles. b) Les DC madures indueixen immunitat. La inflamació del teixit indueix la maduració de les DC i la migració d'un gran nombre de DC madures als NL. Les DC madures expressen complexos MHC-pèptid a la superfície, així com molècules coestimuladores. Això permet l'activació de les cèl·lules T $CD4^+$ i $CD8^+$ i l'inici d'una resposta immune adaptativa. Per controlar la RI també s'expandeixen les població de cèl·lules T reguladores

L'anàlisi de les DC del timus, melsa i NL ha mostrat la gran heterogeneïtat d'aquesta població en quan al seu origen hematopoietic, al cicle de vida i a les característiques funcionals (Shortman and Naik 2007; Villadangos and Schnorrer 2007). En varies espècies de mamífers, entre elles ratolins, humans (Shortman and Liu 2002; Wu and Dakic 2004) i porcs (Summerfield, Guzyllack-Piriou et al. 2003; Summerfield and McCullough 2008), s'ha vist que existeixen dos grans categories de DC, les DC convencionals (cDC) i les DC plasmacitoides (pDC). Aquests subgrups difereixen en l'expressió de marcadors i en la seva funció.

2.1. Cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (pDC)

Les pDC són les cèl·lules més potents alhora de produir IFN- α quan s'activen via TLR-7 o TLR-9 per virus o bacteries. En estat de repòs es troben al timus i als òrgans limfoides secundaris (Summers, Hock et al. 2001; Asselin-Paturel, Brizard et al. 2003; Okada, Lian et al. 2003), i a baixes concentracions als pulmons (de Heer, Hammad et al. 2004), fetge (Abe, Zahorchak et al. 2004), pell (Zaba, Fuentes-Duculan et al. 2007) i a la sang (Diacovo, Blasius et al. 2005). El rol de les pDC com a presentadores d'antigen no està del tot clar. Durant el seu procés maduratiu adopten la morfologia típica de cèl·lula dendrítica i incrementen l'expressió en superfície de MHC de classe II i de molècules coestimuladores, la qual cosa fa pensar que com les cDC, les pDC madures poden activar cèl·lules T naïve (Bjorck 2001; Nakano, Yanagita et al. 2001; Villadangos and Young 2008). En un treball recent s'ha vist que les pDC un cop activades segueixen ubiquitinant i per tant internalitzant els complexos pèptid-MHC, aquesta característica les fa ineficients alhora de presentar antígens exògens, però les fa capaces de processar de manera contínua antígens virals o propis (Young, Wilson et al. 2008).

Molts articles reporten que les pDC arriben als NL i a la melsa per la via sanguínia, a través de les vènules d'endoteli alt i no per la limfa (Yoneyama, Matsuno et al. 2004; Diacovo, Blasius et al. 2005), una visió reforçada per la manca aparent de pDC als vasos limfàtics aferents provinents de l'intestí o del fetge de rates (Yrlid, Cerovic et al. 2006). Altres treballs però, descriuen la presència de pDC a les vies limfàtiques aferents de la pell no inflamada de porcs i bous (Riffault, Eloranta et al. 1996; de Heer, Hammad et al. 2004; Pascale, Contreras et al. 2008).

2.2. Cèl·lules dendrítiques convencionals (cDC)

Les cDC es poden subdividir en 5 poblacions que es distingeixen pel seu patró d'expressió de marcadors, aquestes poblacions poden agrupar-se en dos grans grups en funció de la seva via d'accés als òrgans limfoides: DC migradores o DC residents (Villadangos and Schnorrer 2007). Les DC migradores es subdivideixen en cèl·lules de Langerhans i intersticials: aquestes cèl·lules es troben a la perifèria on capten Ags, i des d'allà viatgen fins als NL on presenten un fenotip madur. S'ha vist en estudis amb ratolins en condicions lliures de patògens o deficientes en molècules de senyalització dels TLR (My88 i TRIF) que aquests animals contenen el mateix nombre de DC migradores que els ratolins normals (Huang, Platt et al. 2000; Walton, He et al. 2006), i que aquestes presenten un fenotip madur, com en els ratolins normals. Això implica que la migració i maduració de les DC és constitutiva i independent de la presència de patògens o de la senyalització per TLR, i que components inflamatoris alliberats de manera constitutiva en baixes quantitats en els teixits perifèrics podrien activar-les.

El segon gran grup són les DC residents, que constitueixen l'altre meitat de les DC dels NL i totes les de la melsa i el timus. Es subdivideixen en tres grups: CD4⁺ DC, CD8⁺ DC i CD4⁻, CD8⁻ DC. Aquests cèl·lules no segueixen el paradigma de les cèl·lules de Langerhans sinó que es desenvolupen a partir de precursors de medul·la òssia dins els òrgans limfoides sense previ pas per la perifèria (Liu, Waskow

et al. 2007; Shortman and Naik 2007). Presenten un fenotip immadur tota la seva vida a no ser que rebin senyals d'activació (Wilson, El-Sukkari et al. 2003).

2.3. Subpoblacions de dendrítiques a la limfa dels bous i d'altres espècies mamífers

En mamífers no humans s'està començant a estudiar les poblacions homòlogues de DC. En rates s'ha observat l'existència de dues subpoblacions de DC a la limfa provinent de l'intestí (Liu, Zhang et al. 1998). Una població $CD4^+ OX41^+$ (membre de la família SIRP (signal regulatory protein)) amb característiques funcionals de DC madura: elevada expressió de MHC II a superfície i capacitat de presentació d'antigen, i l'altra $CD4^- OX41^-$, amb alts nivells de MHC II però dèbil com a APC tot i expressar B7. Aquesta última població conté incusions citoplasmàtiques de citoqueratines i esterases no específiques i transporta de manera constitutiva cossos apoptòtics de cèl·lules epitelials intestinals, a les àrees T dels nòduls limfàtics mesentèrics (Huang, Platt et al. 2000). Aquest subgrup de DC capaç d'endocitar i transportar constitutivament cèl·lules apoptòtiques podria tenir un rol en el manteniment de la tolerància oral a lo propi i a antígens innocus de la flora comensal o dels aliments (Finkelman, Lees et al. 1996; Huang, Platt et al. 2000).

En un treball anterior de la Dra Schwartz-Cornil, on utilitzaven la tècnica de canulació del conducte limfàtic eferent en bous, també van observar dues subpoblacions de DC una $CD1b^+ CD26^{hi} SIRP^-$ i l'altra $CD1b^+ CD26^{lo} SIRP^+$. La població $CD26^{hi} SIRP^-$, transportava cossos apoptòtics, fragments de cèl·lules epitelials i incusions de citoqueratina en el citosol (Epardaud, Bonneau et al. 2004). Els seus resultats mostraven que les mucoses no afectaven l'estat de maduració de les DC que migraven però si que s'afavoria la sortida del subgrup de DC que mostrejava antígens propis i probablement ambientals per ser processats i presentats als NL.

2.4. Paper de les DC en el manteniment de la tolerància

Com ja hem vist les DCs són una població heterogènia, amb funcions importants tan per la immunitat com per la tolerància (Shortman and Naik 2007; Villadangos and Schnorrer 2007). Molts estudis demostren que la tolerància perifèrica a antígens propis de teixit es controlada per la captació d'antígens propis per les DC, mitjançant la deleció de cèl·lules T efectores o la generació de cèl·lules T no responedores o reguladores (Huang, Platt et al. 2000; Scheinecker, McHugh et al. 2002; Steinman and Nussenzweig 2002). La captació de fragments apoptòtics és un mecanisme que usen les DC per capturar antígens però que no les activa (Inaba, Turley et al. 1998; Huang, Platt et al. 2000), per tant es creu que contribueix a la inducció de la tolerància (Figura 5). A més a més s'ha demostrat que el tràfic constitutiu de DC pot tenir lloc en absència d'estímul (Smith, McIntosh et al. 1970; Hill, Edwards et al. 1990; Janeway 1992; Matzinger 1994).

El nombre de DC que arriba als NL també és un element clau en la inducció de la resposta immune (Sallusto and Lanzavecchia 1999). Un elevat nombre de DC activades pot iniciar una resposta immune, mentre que un baix nombre de DC condueix a una situació de tolerància.

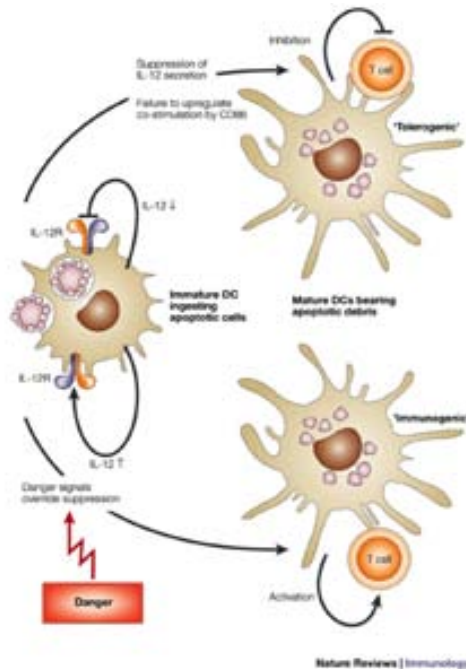


Figura 5: Modulació de la maduració de les DC per ingestió de cèl·lules apoptòtiques. Les DC immadures poden ingerir cèl·lules apoptòtiques, que poden alterar l'estat de maduració de les DC, inhibint per exemple la secreció d'IL-12 que té un efecte autocrí/paracrí en la maduració, amb la conseqüent pèrdua de l'expressió de la molècula coestimuladora CD86. El resultat és que la DC no activa les cèl·lules T, i s'especula que es tornen tolerogèniques. Tot i així aquesta supressió pot ser anul·lada per mecanismes no gaire coneguts que inclouen senyals de perill.

3. EL SISTEMA MAJOR D'HISTOCOMPATIBILITAT DELS BENS: OVAR-MHC

El complex major d'histocompatibilitat es troba a totes les espècies de vertebrats mandibulats estudiats fins al moment. En bens, l'Ovar-MHC està molt poc caracteritzat, en comparació amb els d'altres espècies d'animals domèstics. Es va identificar per primer cop al 1978 amb estudis de serologia i se'l va anomenar OLA (ovine leukocyte antigen) (Milot 1978), però posteriorment, per uniformar la nomenclatura de MHC dels vertebrats, se'l va designar com a Ovar-MHC. L'estructura bàsica del MHC és similar a la de qualsevol altre mamífer (Dukkipati, Blair et al. 2006) (Figura 6). En general les regions de classe II i III són bastant semblants, deriven d'un mateix ancestre i no han estat subjecte a molts reordenaments (excepte en els remugants) i es conserva l'ordre gènic. En els remugants, la regió de classe II està dividida en dues subregions a i b (Andersson and Rask 1988; van Eijk, Beever et al. 1995). La regió de classe I ha reordenat varies vegades (Kelley, Walter et al. 2005).

En bens la regió de classe I no està ben caracteritzada, i hi ha certa controvèrsia sobre el nombre de loci de classe I. Existeix poca informació sobre el polimorfisme d'aquesta regió, però alguns autors suggereixen que és elevat i que varia entre les diferents poblacions (Ellis 2004), de fet alguns estudis genètics han demostrat l'existència de 5-13 al·lels en aquest locus i que varia en funció de les races (Paterson 1998; Gruszczynska, Charon et al. 2002). La nomenclatura dels gens de MHC classe I es troba a la base de dades dels polimorfismes de MHC (IPD; www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/index.html;))

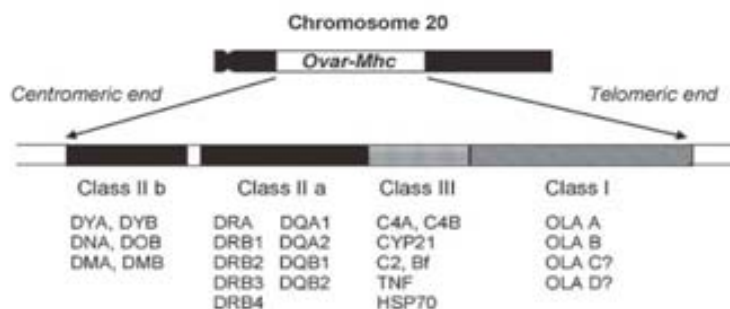


Figura 6: Representació esquemàtica de l'estructura de l'Ova-MHC (Dukkipati, Blair et al. 2006)

De les tres regions de l'MHC oví la de classe II és la que està més ben caracteritzada (Dukkipati, Blair et al. 2006). Com en altres espècies de mamífers es classifiquen en diferents famílies: DP, DQ i DR (Puri and Brandon 1987) i s'ha vist que DQ i DR presenta certes homologies amb els gens d'HLA (Puri, Gogolin-Ewens et al. 1987; Puri, Scott et al. 1987; Scott, Choi et al. 1987).

Els gens DR són molt polimòrfics i les molècules que codifiquen s'expressen a més altes concentracions que les de DQ. El locus DRB és el més polimòrfic de tots els gens del MHC i existeixen múltiples còpies, algunes funcionals i d'altres no, fins al moment hi ha descrits 4 loci DRB, el gen DRB1 funcional es localitza a un d'ells i els pseudogens DBB2, DRB3 i DRB4, es troben en els 3 loci restants (Scott, Maddox et al. 1991).

MATERIAL I MÈTODES

4. OBTENCIO DE LES MOSTRES

La recol·lecció de la limfa dels diferents bous es va fer en el Centre de Recerca INRA de Jouy-en-Josas, França, mitjançant el sistema de canulació del conducte limfàtic cervical pseudo-aferent en bous, que permetia col·lectar grans quantitats de limfa en condicions fisiològiques. La tècnica inclou tres passos: 1) Eliminació del nòduls limfàtics d'un costat del cap. 2) Cateterització dels conductes limfàtics cervicals després de dos mesos. 3) Recol·lecció de la limfa i purificació de les cèl·lules.

En un treball anterior es demostrava que les cèl·lules drenants dels conductes limfàtics pseudoaferents eren originals de les mucoses orals i nasals (Schwartz-Cornil, Epardaud et al. 2005). Les cèl·lules que es col·lecten amb aquest sistema inclouen: cèl·lules fagocítiques incloent DC, granulòcits i monòcits, cèl·lules T CD4⁺ de memòria CD45RA⁻ CD2⁺ integrina $\beta 7^{\text{lo}}$, cèl·lules T CD4⁺ CD25⁺, CD8⁺ i $\gamma\delta$, i limfòcits B.

La limfa es recol·lectava durant tota la nit en un flasc de cultiu amb 500 IU d'heparina, 10000 IU de penicil·lina i 10mg d'estreptomicina, aproximadament es recollien unes 50×10^6 cèl·lules per hora. Les cèl·lules es separaven amb un gradient densitat de iodoxanol (Optiprep; Nycomed Pharma) per enriquir les cèl·lules de baixa densitat (LDL: low-density lymph) (Schwartz-Cornil, Epardaud et al. 2006). Un cop recuperades, es centrifugaven a 700g durant 7 min i s'usaven directament o es congelaven amb 10% DMSO en sèrum boví fetal. Per eluir els pèptids de MHC, les mostres es centrifugaven a 700g durant 7 min en criotubs i els botons cel·lulars es congelaven directament amb nitrogen líquid. Un cop es tenien tots els vials preparats s'enviaven a la UAB per l'elució i posterior caracterització dels pèptids. Les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) s'aïllaven fent un gradient de Percoll (Chevallier, Berthelemy et al. 1998). Les mostres s'enviaven a la UAB en les mateixes condicions, per a l'elució dels pèptids.

5. MOSTRES ANALITZADES

S'ha usat 12 bous per l'estudi: 3 per l'anàlisi fenotípic dels PBMC (#97, #12 and #03), 4 per l'anàlisi fenotípic de les poblacions limfàtiques (#78, #70, #58 and #55), 2 bous (50303 i 41931) i una barreja de limfa de 4 bous per l'elució dels pèptids de cèl·lules de la limfa i 1 be per l'elució de pèptids de PBMC (50303).

El llistat de les mostres processades per l'extracció de pèptids s'indica a la taula Taula 1. Alguns dels vials de la mostra 50303 tenien isopentà en els criotubs, la qual cosa com es va veure posteriorment va embrutar bastant la mostra.

Mostres de be	Nº de Cel.	DC %	Nº de DC
50303	260.5x10 ⁶	24.7	64.4
41931	180 x10 ⁶	22	39.6
Pool limfa de bens	360 x10 ⁶	15	54
PBMC be 50303	400 x10 ⁶		

Taula 1: Mostres de limfa usades per l'extracció de pèptids. El nº de cèl·lules s'indica en milions.

6. TINCIÓ CEL·LULAR DE SUPERFÍCIE

Es deixaven 5 x 10⁶ PBMC o LDL (> 95% viabilitat) amb medi FACS (RPMI-1640 amb 4% sèrum de cavall (HS)) en gel durant 15 minuts. Els anticossos primaris, 50 µl de sobrenedant d'hibridomes sense diluir (CD4 (ST4, IgG1), Pan B (DU2-104, IgM), CD11c (OM1, IgG1)) o diluïts a 1 µg/ml amb medi FACS (CD8 (CACT80C, IgG1), γ/δ T cell (86D, IgG1), CD1b (Th97A, IgG2a), MHC de classe II (Th21A, IgG2b), CD14 (CAM36A, IgG1) s'incubaven durant 30 min a 4°C. El cocktail de mAbs pan T incloïa anti CD4, anti CD8 i anti γ/δ (tots IgG1). Després de dos rentats, les cèl·lules s'incubaven durant 30 min a 4 °C amb un anticòs secundari de cabra contra els isotips específics de ratolí (GAM) conjugat amb fluoresceïn- (FITC), phycoerythrin- (PE), tricolor o Cyanin-5 (Cy-5), diluït a 1:200 (Caltag Laboratories). Posteriorment es feien dos rentats amb medi FACS. Es van usar IgG1, IgG2a, IgG2b i IgM de ratolí irrelevants com a controls d'isotip (ISC). Les cèl·lules marcades resuspeses amb medi FACS es van analitzar amb un FACSCalibur™ usant els software CELLQuest™ (Becton Dickinson).

6.1. Anàlisi comparativa dels nivells d'expressió en superfície de molècules de classe II a les cèl·lules de la limfa.

Els nivells d'expressió en superfície de les molècules de MHC II de les cèl·lules CD1b⁺ i CD1b⁻ es van mesurar per quantificació indirecte del valor mig d'intensitat de fluorescència lineal (MFI) (Wozniak 2004). La relació entre el valor mig de molècules de MHC II a les cèl·lules CD1b⁺ i a les CD1b⁻ es va calcular mitjançant la fórmula $[\text{MFI lineal MHC II} - \text{MFI lineal isotip control}]$ a les cèl·lules CD1b⁺ : $[\text{MFI lineal MHC II} - \text{MFI lineal isotip control}]$ a les cèl·lules CD1b⁻.

7. PROTOCOL D'ELUCIÓ DELS PÈPTIDS ASSOCIATS A LES MOLÈCULES DE MHC

La generació de les columnes d'immunoafinitat i l'elució dels pèptids es va fer utilitzant els mateixos protocols descrits en la secció de material i mètodes d'aquesta tesis.

Abans de plantejar-nos la realització d'aquest treball vam haver de comprovar si algun dels hibridomes dels quals disposàvem, produïen anticossos que reconeguessin les molècules de MHC dels bens, ja que per la construcció de les columnes es necessita una gran quantitat d'anticòs, no disponible

comercialment. Per comprovar-ho es comparaven les tincions de citometria de cèl·lules de la LDL amb anticossos específics de bens i amb els anticossos dels quals disposàvem dels híbridomes productors. Es va veure que ni L243 ni B8.11.2 reconeixien les molècules de bens però en canvi l'anticòs EDU-1 (específic d'un epítip comú de les molècules d'HLA-II) si, per tant es va procedir al creixement i purificació de l'anticòs per poder construir les columnes d'immunoafinitat. Els resultats de les tincions es mostren a la Figura 7.

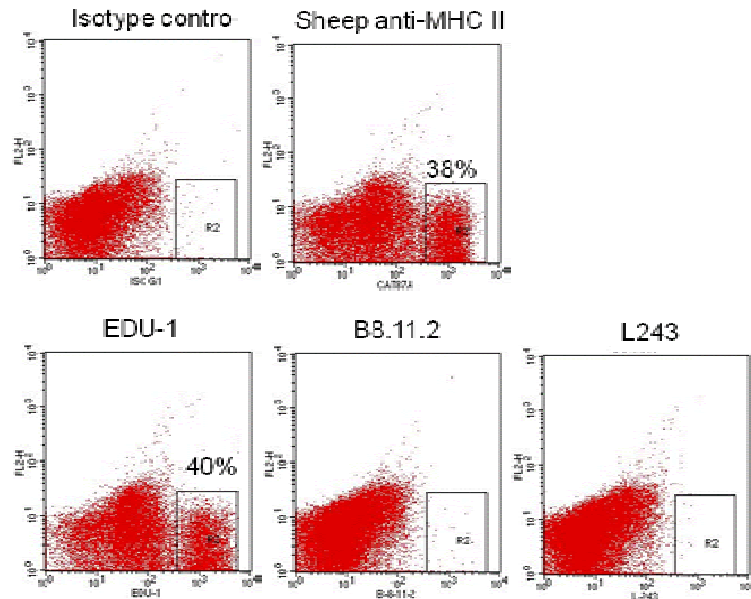


Figura 7: Tinció per citometria de la mostra de be 41817. La tinció es va fer a partir d'una mostra congelada de cèl·lules limfàtiques enriquides amb un gradient d'optiprep. A la part de dalt de la figura es mostra el control negatiu i el control positiu amb una anticòs anti-MHC II específic de be.

8. ANALISIS PER ESPECTROMETRIA DE MASSES DELS REPERTORIS PEPTIDICS ASSOCIATS A MHC DE CLASSE II OVÍ

Les mostres es van analitzar per LC- μ ESIMS/MS capil·lar, la mateixa tecnologia que es va utilitzar per la línia cel·lular JHAF. El processament de les mostres es va fer segons el protocol descrit a l'apartat de material i mètodes. L'única diferència era que en el cas de les mostres de be es va establir una exclusió dinàmica de 2, ja que així teníem més possibilitats d'obtenir un espectre bo d'un mateix pèptid fraccionat i d'aquesta manera tampoc perdíem gaire informació ja que el nombre de pèptids presents a la mostra era molt baix.

9. CERQUES A LES BASES DE DADES

Els espectres de fragmentació MS² es van buscar usant el programa SEQUEST (Bioworks v3.3, ThermoFisher, San Jose, CA) contra una base de dades de mamífers, els paràmetres de cerca s'expliquen amb detall a l'apartat de material i mètodes. Totes les identifications obtingudes es van revisar manualment, igual que tots els espectres bons, per intentar seqüenciar-los *de novo* manualment.

Com que la base de dades de proteïnes ovines és molt reduïda, en molts casos es va haver d'utilitzar les bases de dades humanes, bovines o d'altres mamífers. En alguns casos, les seqüències obtingudes coincidien exactament amb la proteïna bovina, humana o d'altres espècies usades, però en d'altres la seqüència obtinguda tenia alguna modificació i per tant la identificació dels pèptids en molts casos es va haver de fer de forma manual. S'ha de tenir en compte que les modificacions entre seqüències d'aminoàcids amb el mateix pes molecular no es poden detectar amb aquest sistema.

RESULTATS

10. EXPRESSIÓ DE MHC DE CLASSE II A LES CÈL·LULES LDL I EN PBMC DE BENS

S'ha demostrat que les DC contingudes a la limfa del conducte pseudoaferent de la pell, identificades amb el marcador CD1b, representen al voltant del 3% del total cel·lular de la limfa dels bens, amb un 75% de limfòcits T, 10% de B i <1% de monòcits (Bujdoso, Hopkins et al. 1989; Mackay, Marston et al. 1990; Epardaud, Bonneau et al. 2004; Schwartz-Cornil, Epardaud et al. 2006). El gradient de baixa densitat permet un enriquiment de fins al 50% de DC. Per comprovar si aquesta metodologia era adequada per obtenir una font acceptable de DC per l'elució de pèptids, es va mirar l'expressió de MHC II a les cèl·lules de la LDL. Un $72.1 \pm 7.7\%$ (Figura 8), eren positives, amb cèl·lules d'expressió elevada ($40.1 \pm 11.3\%$) i altres amb expressió mitja ($30.8 \pm 8.9\%$). El percentatge mig de DC a les poblacions cel·lulars de la LDL de 4 bens diferents, era de $38.5 \pm 10.3\%$, mentre que les cèl·lules T, B i monòcits representaven el 29.2 ± 5.3 , 8.8 ± 5.5 , $2.3 \pm 1.8\%$ respectivament (Figura 8B). Alguns subgrups de LDL no es van poder assignar a cap població coneguda. Les cèl·lules CD1b+ (DC) representaven més del $52.8 \pm 12.4\%$ de les cèl·lules positives per MHC de classe II (Figura 9). Les cèl·lules d'alta expressió de classe II, contienien un $89.6 \pm 6.4\%$ de DC, mentre que la població amb nivells mitjans d'expressió era heterogenis i incloïa DC ($9.4 \pm 11.3\%$), limfòcits T ($44.3 \pm 13.5\%$), cèl·lules B ($17.6 \pm 8.2\%$) i monòcits ($3.3 \pm 2.7\%$). En resum l'anàlisi de l'expressió de MHC de classe II per les cèl·lules LDL va mostrar que hi havia una alt percentatge de cèl·lules amb nivells elevats d'expressió i que la majoria d'aquestes cèl·lules eren DC. Les cèl·lules que no eren DC expressaven nivells mitjans de MHC II i eren majoritàriament limfòcits T.

S'havia vista anteriorment que el MFI lineal era proporcional al nombre de molècules expressades a la superfície cel·lular (Sukwit, Chuenchitra et al. 2005). Per poder comparar quantitativament l'expressió en superfície de MHC II a les DC i a la resta de poblacions, es va calcular la relació del MFI lineal entre ambdós grups en diferents bens. Vam comprovar que l'expressió de MHC II a les DC era 33.4 ± 7.3 vegades més elevada que a la resta de poblacions (Figura 10). Com que les DC representen més del 50% de les cèl·lules MHC II positives (Figura 9A), podem dir que més del 95% de les molècules de MHC extretes d'una preparació cel·lular de LDL provenen de les DC.

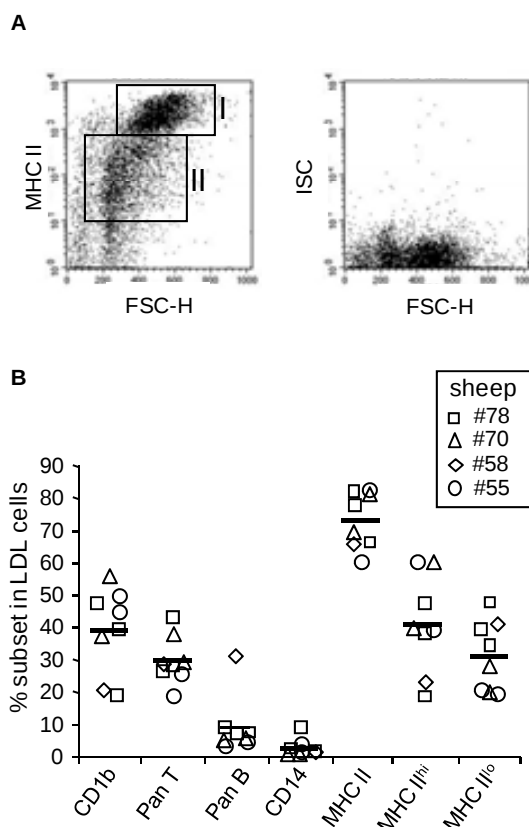


Figura 8: Expressió de MHC de classe II i distribució cel·lular dins les cèl·lules de la LDL. Es van tenir les cèl·lules de la LDL amb mAb anti MHC de classe II, anti CD1b, cocktail Pan T (anti CD4, CD8 and γ/δ), i anti CD14 (veure material i mètodes). A) Poblacions amb alta (I) i baixa expressió (II) de MHC II d'un exemple representatiu, al costat tinció no específica amb els controls negatius d'isotip (ISC). B) Percentatge de les diferents subpoblacions de LDL de 6 tincions diferents de 4 animals.

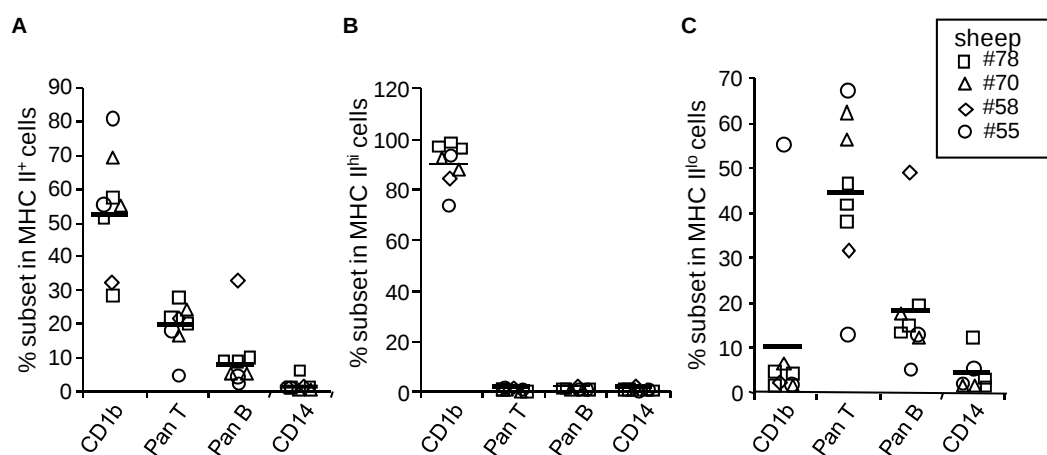


Figura 9: Distribució de les poblacions dins les LDL MHC II⁺. Distribució de les subpoblacions dins el total de cèl·lules LDL MHC II⁺ (A), dins les cèl·lules MHC II^{hi} (B) i dins les MHC II^{low} (C). Es van fer 6 tincions de 4 bens diferents.

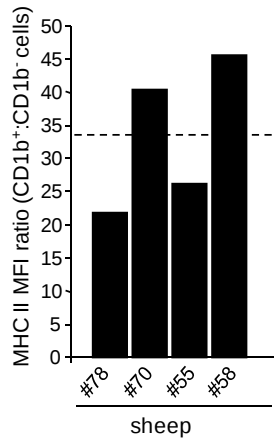


Figura 10: Nivells d'expressió de MHC de classe II de les DC en vers la resta de cèl·lules de l'LDL. La relació del MFI lineal de MHC II de les cèl·lules CD1b⁺ respecte les CD1b⁻ es va calcular per 4 animals. La mitja del MFI de MHC II es representa amb una línia de punts.

Un anàlisi similar es va fer amb les PBMC de 3 bous. No es van detectar cèl·lules CD1b⁺ entre les PBMC. Les cèl·lules CD11c⁺ (DC) (Pernthaner, Cole et al. 2002), no es podien detectar entre la població de cèl·lules de la sang MHC II⁺ que no eren limfòcits B, la qual cosa suggeria que les DC MHC II⁺ eren escasses a la sang dels bous (no mostrat). Les cèl·lules T representaven un $43.2 \pm 6.5\%$ de les PBMCs, les B $15.9 \pm 4.7\%$ i els monòcits $7.4 \pm 3.2\%$ (Figura 11). L'expressió de MHC II en PBMC era intermèdia en comparació amb la de les cèl·lules de l'LDL. Les PBMC positives per MHC II eren limfòcits T ($42.0 \pm 4.6\%$), limfòcits B ($27.3 \pm 9.3\%$) i monòcits ($7.4 \pm 3.5\%$) (Figura 11C).

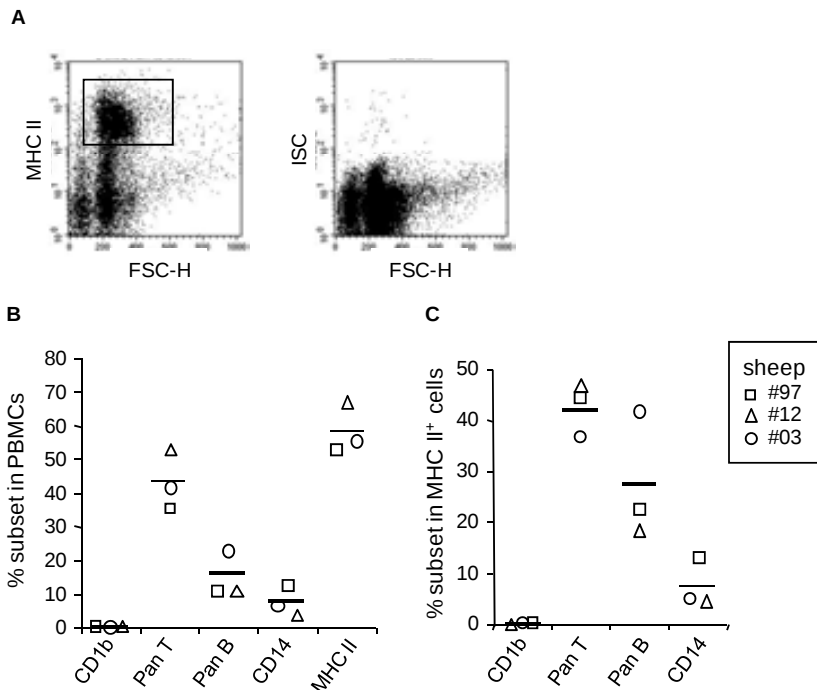


Figura 11: Expressió de MHC de classe II i distribució de les diferents poblacions cel·lulars dins les PBMCs. Les PBMC es van tindre amb el mateix protocol que les cèl·lules de la LDL (veure Figura 8). A) La població MHC II⁺ s'indica amb un rectangle, la positivitat de la fluorescència es basa en la tinció no específica amb els controls negatius d'isotip (ISC). B) Percentatge de les diferents subpoblacions de PBMC de 3 animals diferents. C) Representació de la distribució de les diferents poblacions cel·lulars dins el total de cèl·lules MHC II⁺.

En conclusió, les preparacions de LDL eren bones fonts cel·lulars per l'anàlisi del repertori peptídic presentat per MHC II de les DC que migren de la pell als nòduls limfàtics en absència d'activació. Les PBMC, amb nivells més baixos de MHC II i provinents d'una altra font cel·lular, es podien usar com a controls.

11. PÈPTIDS PRESENTATS PER MHC EN CÈL·LULES DE LIMFA OVINA

Es van processar 3 mostres de limfa de be, dues de dos animals, el 50303 i el 41931 i la tercera d'un pool de cèl·lules de la LDL de diferents bous. Es va decidir usar un pool degut a la enorme dificultat per obtenir grans quantitats de cèl·lules d'un únic animal.

La mostra 50303, tal i com es va poder comprovar en l'anàlisi per espectrometria de masses, contenia molta contaminació de polímers, fet que va dificultar enormement l'obtenció de seqüències, ja que els polímers emascaraven els pocs pèptids que hi havia. Es va pensar que la contaminació podia provenir o bé de l'isopentà que havia quedat en els tubs del procés de congelació o bé del detergent NP40 usat per fer la lisis cel·lular. Per aquest motiu per les posteriors mostres es va tenir cura al fer els botons cel·lulars secs i es va decidir canviar a un NP40 més pur (Surfact-Amps NP40).

En total es va aconseguir identificar 68 pèptids provinents de 32 proteïnes diferents: 10 seqüències de la mostra 50303, 34 de 41931, i 24 pèptids del pool de cèl·lules de la LDL.

D'acord amb el patró descrit en humans o ratolins, els pèptids associats a molècules de classe II de bous tenien longituds entre 11 i 19 aminoàcids, i molts es presentaven en grups de famílies (nested sets) de seqüències solapades. A les tres mostres es van identificar pèptids que ens confirmaven que les seqüències identificades pertanyien a lligands de les molècules de classe II, ja que corresponien a lligands clàssics com la cadena invariant, proteases lisosomals, com la catepsina B o proteïnes del MHC.

La gran majoria dels pèptids eren endocítics, derivats de proteïnes exògenes, com l'hemoglobina o la lactotransferrina, de proteïnes de membrana com molècules del MHC o Rap 1-A, o dels lisosomes o endosomes. També s'identificaven a totes les mostres pèptids generats a la via citosòlica de processament, de proteïnes nuclears, com histones, citosòliques com proteïnes del citoesquelet o proteïnes ribosomals o del Golgi.

De la mostra 50303 es van identificar 3 pèptids de la cistatina que contenien una modificació respecte la seqüència de la proteïna bovina, i enlloc de glutàmic tenien glutamina o lisina (no es pot saber quin dels dos aminoàcids era ja que tenen el mateix pes molecular). El pèptid més rellevant que es va seqüenciar va ser un provinent de la citoqueratina, proteïna que no s'expressa a cap de les cèl·lules classe II positives presents a la limfa. Per tant, el més probable és que aquest pèptid provingui de cèl·lules epitelials de la pell o les mucoses, i que hagi estat captat per DC o per altres fagocits MHC-II positius de la limfa per fagocitosis de cèl·lules apoptòtiques.

Entre els pèptids de la mostra 41931 es van seqüenciar dos pèptids de la Interleucina-8 i un de la Tachykinin-1. La Tachykinin-1 és un pèptid neurotransmissor àmpliament distribuït en el sistema nerviós central i perifèric però també té una distribució no neuronal on funciona com a regulador autocrí, paracrí o endocrí. La Interleucina-8 és una quimiocina produïda per macròfags o per cèl·lules epitelials i endotelials i és un important mediador de la resposta immune innata.

Proteïna origen	MH+	Pèptid	Nº aa	Espècie	NºId	L
Be 50303						
Cytokeratin-10 (185-201)	2134.07	DYSKYYQTIEDLKNQIL	17	Canfa	Q6EIZ0	C
Cystatin C (85-100)	1799.90	VVSGMNYFLDV[QK]LGRT	19	Bovina	P01035	E
Cystatin C (86-99)	1602.00	VSGMNYFLDV[QK]LGR	17	Bovina	P01035	E
Cystatin C (85-98)	1542.75	VVSGMNYFLDV[QK]LG	17	Bovina	P01035	E
Stomatin-like protein 3 (219-231)	1517.77	ARAKVIAAEGEMNAS	15	Humana	P27105	M
Actin-1 (129-146)	1870.99	TPAmYVAIQAVLSLYASG	18	Be	P60713	C
Cathepsin B (247-263)	1891.40	GPVEGAFSVYSDFLLYK	18	Bovina	P07688	Lys
LAMA-like protein (77-91)	1522.81	GILEIKAGYGSQSLS	15	Bovina	Q9GL30	E
Invariant chain (136-150)	1723.64	VYPQLKGSLEPENLKH	15	Bovina	Q7JFY1	End
Ras-related protein Rab-5 (86-100)	1672.85	APMYRGAQAIVVY	15	Bovina	Q0IIG7	End
Be 41931						
Alpha-1-antitrypsin (171-185)	1779.02	DAEEAKKKINDYVEK	15	Be	P12725	E
Alpha-enolase (127-141)	1695.7	GVPLYRHIADLAGNAE	16	Bovina	Q9XSJ4	C
Alpha-enolase (128-141)	1509.72	VPLYRHIADLAGNA	14	Bovina	Q9XSJ4	C
Alpha-enolase (128-142)	1638.58	VPLYRHIADLAGNAE	15	Bovina	Q9XSJ4	C
Apolipoprotein C-III (64-76)	1536.54	TESFSSLKDYWSS	13	Bovina	P19035	E
Ceruloplasmin (102-117)	1894.78	GDKVYVHLKNFASRPY	16	Be	Q9XT27	E
Elongation factor 1-alpha 1 (82-98)	1983.19	TSKYVVTIIDAPGHRDF	17	Bovina	P68103	N
Gelsolin (419-433)	1684.42	GGDSYIILYNRYHGG	15	Bovina	Q3SX14	C
Integral membrane protein 2B (102-120)	2119.48	EPSADAPASRYQTIEENIK	19	Bovina	Q3T0P7	g
Integral membrane protein 2B (106-120)	1734.82	DAPASRYQTIEENIK	15	Bovina	Q3T0P7	g
Integral membrane protein 2B (107-120)	1619.76	APASRYQTIEENIK	14	Bovina	Q3T0P7	g
Integral membrane protein 2B (107-121)	1732.12	APASRYQTIEENIKI	15	Bovina	Q3T0P7	g
Integral membrane protein 2B (145-158)	1676.86	IVHDFNKKLTAYLD	14	Bovina	Q3T0P7	g
Integral membrane protein 2B (193-206)	1681.56	LPQSYLIHEHMIT	14	Bovina	Q3T0P7	g
Interleukin-8 (42-56)	1854.67	TPFHFKFIKELRVIE	15	Be	P36925	E
Interleukin-8 (42-60)	2231.8	TPFHFKFIKELRVIESGPH	19	Be	P36925	E
Invariant chain (143-155)	1527.66	SLPENLKHKLKDSm	13	Bovina	Q7JFY1	End
Invariant chain (144-156)	1539.78	LPENLKHKLKDSMD	13	Bovina	Q7JFY1	End
Invariant chain (142-155)	1584.62	GSLPENLKHKLKDSm	14	Bovina	Q7JFY3	End
Invariant chain (142-155)	1568.7	GSLPENLKHKLKDSM	14	Bovina	Q7JFY1	End
Invariant chain (142-156)	1700.8	GSLPENLKHKLKDSmD	15	Bovina	Q7JFY3	End
Invariant chain (143-155)	1511.7	SLPENLKHKLKDSM	13	Bovina	Q7JFY1	End
Invariant chain (143-156)	1626.78	SLPENLKHKLKDSMD	14	Bovina	Q7JFY1	End
Invariant chain (144-155)	1424.26	LPENLKHKLKDSM	12	Bovina	Q7JFY1	End
MHC class I (112-123)	2152.78	GRDYALNEDLR	12	Be	A4ZVX7	M
MHC class I (140-152)	1549.7	DGRDYALNEDLR	13	Bovina	P13752	M
MHC class II (15-28)	1549.96	GPSSGQYIHEFDGDE	14	Be	Q7YPU4	M
MHC class II (108-121)	1497.64	LRNGHSVIEGVSET	14	Búfal	Q45T67	M
MHC class II (14-29)	1815.76	HGPSGQYIHEFDGDEQ	16	Be	Q7YPU4	M
MHC class II DQ α chain (147-161)	1627.54	WLKNGHAVTEGVSET	15	Be	A8IW56	M
MHC class II, DR α chain (25-35)	1295.12	IKEDHVIIQAE	11	Be	Q30846	M
Nucleobindin-1 (241-255)	1717.78	NPKTFFILHDINSDG	15	Bovina	Q0P569	g
Tachykinin-1 (58-68)	1363.56	RPKPQQFFGLm	11	Bovina	P01289	E
Ras-related protein Rap-1A (61-73)	1633.86	TEQFTAMRDLYMK	13	Bovina	P62833	M

Pool de limfa de diferents bens

60S ribosomal protein L13a (19-32)	1479.97	LAAIVAKQVLLGRK	14	Bovina	Q3SZ90	C
Beta-2-microglobulin (49-66)	2048.12	GFHPPQIEIDLLKNGEKI	18	Ovina	Q6QAT4	E
Beta-2-microglobulin (51-64)	1602.85	HPPQIEIDLLKNGE	14	Ovina	Q6QAT4	E
Beta-2-microglobulin (51-65)	1730.17	HPPQIEIDLLKNGEK	15	Ovina	Q6QAT4	E
Beta-2-microglobulin (51-66)	1844.03	HPPQIEIDLLKNGEKI	16	Ovina	Q6QAT4	E
Cofilin-1 (9-21)	1520.83	DGVIVKFNDMKVR	13	Ovina	Q6B7M7	C
Hemoglobin subunit beta (37-52)	1854.84	TQRFEEHFGDLSNADA	16	Ovina	P02075	E
Histone H1.1 (36-52)	1696.95	GPPVSELITKAVAASKE	17	Bovina	P02253	N
Histone H2A type 1 (97-112)	1494.86	GKVITIAQGGVLPNIQ	15	Humana	P20671	N
Histone H2A type 1 (98-112)	1607.95	LGKVITIAQGGVLPNIQ	16	Humana	P20671	N
Invariant chain li (136-151)	1835.74	VYPQLKGSLPENLKHL	16	Bovina	Q29630	End
Invariant chain, li (50-62)	1588.82	TTAYFLYQQQGRL	13	Bovina	Q29630	End
Invariant chain, li (50-64)	1831.08	TTAYFLYQQQGRDLK	15	Bovina	Q29630	End
Invariant chain, li (66-79)	1514.88	TVTSQNLQLENLR	13	Bovina	Q29630	End
Lactotransferrin (447-464)	1902.04	RPTEGYLAVAVVKKANEG	18	Bovina	P24627	E
OVAR-DQ beta chain (165-180)	1727.76	NDQEETAGVVSTPLIR	16	Be	Q30839	M
OVAR-DQ beta chain (165-181)	1842.92	NDQEETAGVVSTPLIRN	17	Be	Q30839	M
OVAR-DQ beta chain (164-180)	1614.81	DQEETAGVVSTPLIR	15	Be	Q30839	M
OVAR-DQ beta chain (164-180)	1499.80	QEETAGVVSTPLIR	14	Be	Q30839	M
OVAR-DQ beta chain (165-182)	1899.94	NDQEETAGVVSTPLIRNG	18	Be	Q30839	M
OVAR-DQ alpha chain (29-40)	1372.42	DHIAAYGINVYH	12	Be	Q9MXE,	M
OLA-DRA, alpha chain (76-91)	1669.59	ASFEAQGALANmAVmK	16	Be	Q30846	M
OLA-DRA, alpha chain (76-91)	1638.75	ASFEAQGALANMAVMK	16	Be	Q30846	M
Syntenin-1 (15-30)	1598.08	VIQAQTAFSANPANPA	16	Humana	O00560	M

Taula 2: Seqüències dels pèptids associats a classe II de les mostres de cèl·lules de la LDL. Proteïna origen, proteïna de la qual prové el pèptid amb la posició relativa d'aquest entre parèntesis; MH+, pes molecular del pèptid; N°aa; mida del pèptid en número d'aminoàcids. Espècie, espècie de la qual prové la proteïna origen; N°Id, número d'identificació de la proteïna en el SwissProt o al genpept.; L, localització de la proteïna: C, citoplàsmica; E, exògena; M, de membrana; Lys, lisosomes; End, endosomes; N, nuclear; g, golgi

12. COMPARACIÓ DELS PÈPTIDS AILLATS DE PBMC I DE CÈL·LULES LIMFÀTIQUES DE BE

12.1. Pèptids aïllats de PBMCs del be 50303

Es van identificar un total de 30 pèptids agrupats en 6 famílies peptídiques formades per entre 2 i 3 seqüències i 15 seqüències úniques. Els pèptids provenien de 14 proteïnes diferents. Els pèptids tenien mides que anaven des de 11 fins a 23 aminoàcids. La majoria de lligands provenien de proteïnes exògenes presents en el sèrum tals com l'hemoglobina, l'albumina sèrica, un pèptid d'una immunoglobulina, i de la α -1B glicoproteïna. La resta eren pèptids de proteïnes citosòliques tals com les proteïnes de xoc tèrmic o la timosina beta-4. També es va seqüenciar, com a les altres mostres, un pèptid de la cadena invariant.

Proteïna origen	MH+	Pèptid	Nºaa	Espècie	Nº Id	L
PBMC del be 50303						
Heat shock 70 kDa (37-49)	1487.70	TTPSYVAFTDTER	13	Bovina	Q27975	C
Heat shock protein 71 kDa (420-437)	2026.97	IPTKQTQTFTTYSNQPQ	18	Bovina	P19120	C
Hemoglobin subunit alpha-1 (131-141)	1182.64	ANVSTVLTSKY	11	Be	P68240	E
Hemoglobin subunit alpha-1/2	1452.31	LANVSTVLTSKYR	13	Be	P68240	E
Hemoglobin subunit alpha-1/2 (131-142)	1339.23	ANVSTVLTSKYR	12	Be	P68240	E
Integral membrane protein 2B (149-163)	1796.00	FNKKLTAYLDLNLDK	15	Bovina	Q3T0P7	g
NADH dehydrogenase (70-82)	1525.79	VDYSKLLKKEGPDF	13	Bovina	Q01321	mit
Protachykinin-1 (58-68)	1348.72	RPKPQQFFGLM	11	Bovina	P01289	E
Serum albumin (139-160)	2650.26	LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK	22	Humana	P02768	E
Serum albumin (169-183)	1899.00	RHPYFYAPELLFFAK	15	Humana	P02768	E
Serum albumin (178-191)	1704.95	LLFFAKRYKAAAFTE	14	Humana	P02768	E
Serum albumin (340-351)	1411.72	KNYQEAQDVFLG	12	Be	P14639	E
Serum albumin (361-372)	1467.84	RHPDYSVVLRLR	12	Humana	P02768	E
Serum albumin (397-413)	2045.10	VFDEFKPLVEEPQNLIK	17	Humana	P02768	E
Serum albumin (400-418)	2086.06	FKPLVEEPQNLIKQNC	17	Humana	P02768	E
Serum albumin (438-452)	1639.94	KVPQVSTPTLVEVSR	15	Humana	P02768	E
Serum albumin (567-580)	1583.78	QLKAVMDDFAAFVE	14	Humana	P02768	E
Serum albumin (570-581)	1342.63	AVMDDFAAFVEK	12	Humana	P02768	E
Serum albumin (596-609)	1326.81	GKKLVAAASQAALGL	14	Humana	P02768	E
Serum albumin (598-609)	1141.69	KLVAASQAALGL	12	Humana	P02768	E
Serum albumin (599-609)	1013.60	LVAASQAALGL	11	Humana	P02768	E
Thymosin beta-4 (20-44)	2829.41	KTETQEKNPPLSKETIEQEKQAGES	25	Bovina	P62326	C
Thymosin beta-4 (22-44)	2600.27	ETQEKNPPLSKETIEQEKQAGES	23	Bovina	P62326	C
Thymosin beta-4 (23-44)	2471.23	TQEKNPPLSKETIEQEKQAGES	22	Bovina	P62326	C
Immunoglobulin light chain V region (45-59)	1504.92	APKLLIYGATSRASG	15	Be	5802442	E
Invariant chain, Ii (67-80)	1730.30	TAYFLYQQGRLDK	14	Humana	P04233	End
Transthyretin, chain A (42-54)	1366.04	GSPAINVAVHVR	13	Humana	P02766	E
Endozepine, Acyl-CoA-binding protein (34-53)	2149.77	QATVGDIINTERPGMLDFTGK	20	Humana	P07108	C
Alpha-1B-glycoprotein (450-469)	2097.77	GAAANLELIFVGPQHAGNYR	20	Humana	P04217	E
Alpha-1B-glycoprotein (448-469)	2296.34	TPGAAANLELIFVGPQHAGNYR	22	Humana	P04217	E

Taula 3: Seqüències dels pèptids associats a classe II aïllats de PBMC. Veure llegenda de la taula 2

12.2. Comparació dels repertoris de les PBMC i de les cèl·lules limfàtiques

A continuació vam comparar el tipus i origen dels pèptids eluïts de les cèl·lules de la limfa amb els pèptids presentats per les PBMCs.

La diferència més evident entre aquestes dos pools va ser la mida dels pèptids, més restringida en els provinents de la limfa (11-19aa) en comparació amb la tendència de les PBMCs a unir pèptids més llargs (11-25aa) (Figura 12).

Tot i que la majoria de pèptids tant de les PBMC (77%) com de les cèl·lules LDL (80%) eren generats a la via endocítica hi havia una clara diferència pel que fa a l'origen de les proteïnes. Els pèptids eluïts de les PBMC eren principalment de proteïnes sèriques, i vam trobar també un pèptid clàssic de cèl·lules B, d'una Immunoglobulina. Per altra banda els pèptids provinents de cèl·lules de la limfa derivaven principalment de proteïnes de la membrana plasmàtica o de compartiments intracel·lulars. Aquestes diferències reflectien el tipus cel·lular responsable del processament i presentació dels pèptids a cadascuna de les mostres. En el cas de la mostra de cèl·lules de la LDL, tal i com vam

comprovar per citometria, més del 50% de les cèl·lules positives per MHC II eren DC, a més a més l'expressió de MHC II per aquestes cèl·lules era més de 30 vegades superior a la dels altres tipus cel·lulars, és a dir que un 95% de les molècules aïllades d'una preparació cel·lular de LDL provenien de les DC i per tant podíem assumir que tots els pèptids identificats en aquestes mostres estaven presentats per DC no activades de la limfa. En el cas de la mostra de PBMC, les cèl·lules positives per MHC II eren principalment cèl·lules T (42%) i B (27%), en aquest cas l'expressió de MHC II era més baixa que la de les cèl·lules de la LDL, per això no es d'estranyar que tot i el major nombre de cèl·lules processades la quantitat de pèptids identificats fos menor que per les mostres limfàtiques.

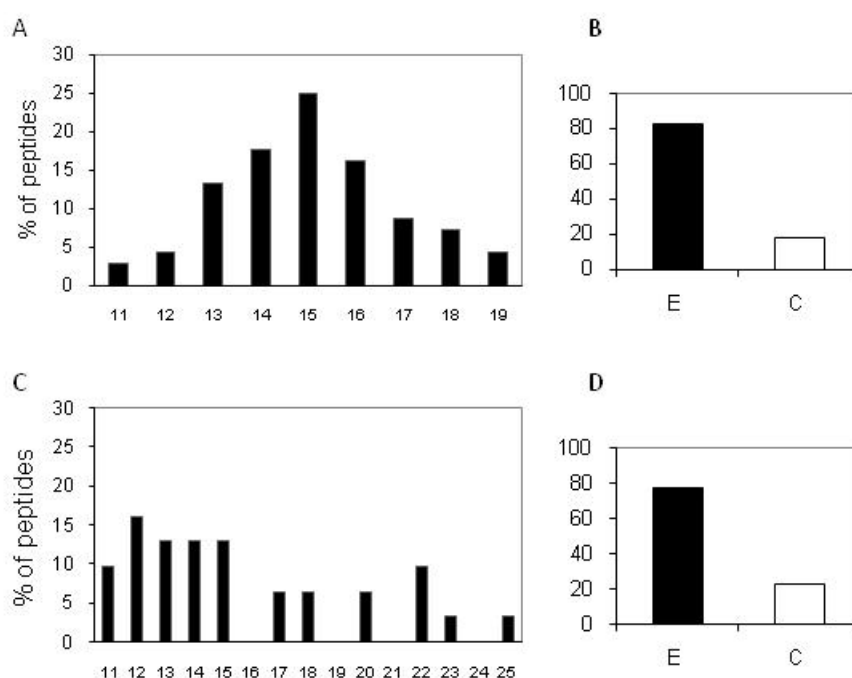


Figura 12: Distribució de mides i localitzacions dels pèptids aïllats de cèl·lules de la LDL i de PBMCs. (A i C) Distribució de mides dels pèptids provinents de cèl·lules limfàtiques (A) i de PBMCs (C). (B and D) Distribució cel·lular de les proteïnes origen dels pèptids, en funció de la seva via de processament, de cèl·lules de la LDL (B) i de PBMC (D), E: via endocítica (barres negres); C: via citosòlica (barres blanques).

DISCUSSIÓ

La tecnologia de canulació pseudoaferent dels conductes limfàtics permet recol·lectar limfa durant uns quants dies per adquirir grans quantitats de cèl·lules que normalment quedarien atrapades als nòduls limfàtics (Schwartz-Cornil, Epardaud et al. 2005; Schwartz-Cornil, Epardaud et al. 2006). En aquest treball vam usar aquesta aproximació per caracteritzar els pèptids presentats per molècules de classe II de cèl·lules presents a la limfa, majoritàriament dendrítiques, que viatgen dels teixits cervicals cap als nòduls limfàtics en condicions d'homeòstasi, en els bens.

Les seqüències identificades constitueixen només una fracció del total del pool peptídic associat a les molècules de MHC-II, per tant probablement corresponen als pèptids més abundants que es poden detectar mitjançant el nostre sistema, així pèptids poc representats o amb baixa eficiència d'ionització no es poden identificar. Tot i les limitacions del treball, ja que la quantitat de cèl·lules de les quals disposaven estava molt per sota dels límits reportats per poder detectar pèptids presentats per classe II (Wahlstrom, Dengjel et al. 2007), hem estat capaços d'identificar entre 10-34 pèptids per mostra, i s'ha pogut valorar que el processament acurat de la mostra i la quantitat de contaminants presents són un punt crític alhora d'obtenir bons resultats.

S'ha seqüenciat 68 pèptids naturals de MHC de classe II mitjançant LC- μ ESI-ITMS/MS de cèl·lules de la LDL i 30 de PBMC. Els lligands d'ambdues mostres provenen majoritàriament de proteïnes processades per la via endocítica, proteïnes de membrana o de compartiments membranosos com endosomes, lisosomes, reticle endoplasmàtic o l'aparell de Golgi, mentre que els pèptids eluïts de PBMC la majoria provenen de proteïnes exògenes del sèrum. També s'ha identificat aproximadament un 20% de pèptids de proteïnes citosòliques, a ambdós tipus de mostres. Comparant els dos repertoris, el de les cèl·lules provinents de la limfa i el de les cèl·lules de sang perifèrica s'observa que la mida dels pèptids presentats per les PBMC és més heterogènia, mentre que les cèl·lules de la LDL presenten pèptids de mida més restringida. A més l'origen dels pèptids aïllats de les PBMC provenen majoritàriament de proteïnes sèriques. Aquestes diferències reflecteixen la composició cel·lular de cada mostra i per tant els diferents mecanismes de processament i generació dels pèptids i el diferent entorn en el qual es trobaven cadascuna de les poblacions cel·lulars. A les mostres de cèl·lules de la LDL, es pot assumir que la gran majoria dels pèptids sinó tots eren presentats per DC, ja que un 95% de les molècules de MHC provenien de les DC, mentre que a la mostra de PBMC podien estar presentats per cèl·lules T o B, però no per DC. Els repertoris peptídics presentats per DC són poc coneguts inclús en humans, tots els treballs de lligands de MHC de classe II s'han fet amb cèl·lules B (Chicz, Urban et al. 1993; Rammensee, Friede et al. 1995; Muntasell, Carrascal et al. 2002) o directament amb teixits on és difícil diferenciar entre el tipus cel·lular que està presentant els pèptids (Gordon, Young et al. 1995; Oshitani, Hato et al. 2003; Wahlstrom, Dengjel et al. 2007; Muixi, Carrascal et al. 2008). Les nostres dades suggereixen que les DC a l'hora de generar pèptids per presentar-los via classe II són més restrictives en quant a la mida d'aquests lligands.

Tot i les limitacions del material, s'ha identificat un pèptid de citoqueratina, una proteïna expressada per les cèl·lules epitelials de la pell i les mucoses. En un treball previ es va demostrar que les DC originàries de les mucoses del cap contenen cossos apoptòtics i inclusions de citoqueratines (Epardaud, Bonneau et al. 2004). Per tant aquests resultats juntament amb la demostració que els pèptids de citoqueratina poden presentar-se per molècules de classe II expressades a la superfície de les DC, evidencien el fet que aquestes cèl·lules poden incorporar autoantígens de les mucoses, per exemple per fagocitosis de cèl·lules epitelials apoptòtiques, i transportar-los als nòduls limfàtics per presentar-los a les cèl·lules T. S'ha proposat que el constant transport de cossos apoptòtics deu jugar un paper important en el manteniment de la tolerància, els nostres resultats van amb concordança amb aquesta idea ja que demostren que alguns autoantígens, com la citoqueratina, poden presentar-se via classe II per les DC que es dirigeixen cap als NL.

Fins al moment no hi havia cap altre treball de caracterització de pèptids en bens i només s'havia publicat algun treball sobre pèptids presentats per BOLA, el complex major d'histocompatibilitat boví. S'ha fet estudis sobre pèptids presentats per molècules de BOLA-I (Hegde, Ellis et al. 1995; Gaddum, Ellis et al. 1996) i més recentment es va publicar un treball fet amb cèl·lules L transfectades amb 2 al·lels de BOLA-DR on identificaven un total de 24 pèptids naturals, aquests pèptids tenien entre 13 i 20 aminoàcids de longitud i la majoria formaven grups de seqüències solapades.

Aquest treball ens ha permès per tant fer una primera caracterització dels tipus de pèptids presentats per cèl·lules dendrítiques de bens, en absència d'estimulació i, tot i que és necessari fer un estudi més ampli per poder treure conclusions més fermes, podem dir que al menys algunes d'aquestes DC poden presentar pèptids autòlegs provinents dels teixits, i transportar-los fins als nòduls limfàtics proximals. Aquestes dades poden ser l'inici d'un estudi més profund del possible paper d'aquestes DC presentadores d'antigens propis en la tolerància.

BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., A. F. Zahorchak, et al. (2004). "Migratory responses of murine hepatic myeloid, lymphoid-related, and plasmacytoid dendritic cells to CC chemokines." Transplantation **78**(5): 762-5.
- Albert, M. L., M. Jegathesan, et al. (2001). "Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells." Nat Immunol **2**(11): 1010-7.
- Andersson, L. and L. Rask (1988). "Characterization of the MHC class II region in cattle. The number of DQ genes varies between haplotypes." Immunogenetics **27**(2): 110-20.
- Asselin-Paturel, C., G. Brizard, et al. (2003). "Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody." J Immunol **171**(12): 6466-77.
- Bjorck, P. (2001). "Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice." Blood **98**(13): 3520-6.
- Bonneau, M., M. Epardaud, et al. (2006). "Migratory monocytes and granulocytes are major lymphatic carriers of Salmonella from tissue to draining lymph node." J Leukoc Biol **79**(2): 268-76.
- Bujdoso, R., J. Hopkins, et al. (1989). "Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage." J Exp Med **170**(4): 1285-301.
- Chevallier, N., M. Berthelemy, et al. (1998). "Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis and increased cell survival mainly involve the CD11b+ B-lymphocyte subset in sheep." J Virol **72**(5): 4413-20.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, et al. (1993). "Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles." J Exp Med **178**(1): 27-47.
- de Heer, H. J., H. Hammad, et al. (2004). "Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen." J Exp Med **200**(1): 89-98.
- Diacovo, T. G., A. L. Blasius, et al. (2005). "Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes." J Exp Med **202**(5): 687-96.
- Dukkipati, V. S., H. T. Blair, et al. (2006). "'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms." Genet Mol Res **5**(4): 581-608.
- Ellis, S. (2004). "The cattle major histocompatibility complex: is it unique?" Vet Immunol Immunopathol **102**(1-2): 1-8.
- Epardaud, M., M. Bonneau, et al. (2004). "Enrichment for a CD26hi SIRP- subset in lymph dendritic cells from the upper aerodigestive tract." J Leukoc Biol **76**(3): 553-61.
- Finkelman, F. D., A. Lees, et al. (1996). "Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion." J Immunol **157**(4): 1406-14.
- Gaddum, R. M., S. A. Ellis, et al. (1996). "Identification of potential CTL epitopes of bovine RSV using allele-specific peptide motifs from bovine MHC class I molecules." Vet Immunol Immunopathol **54**(1-4): 211-9.
- Gordon, R. D., J. A. Young, et al. (1995). "Purification and characterization of endogenous peptides extracted from HLA-DR isolated from the spleen of a patient with rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **25**(5): 1473-6.
- Gruszczynska, J., K. M. Charon, et al. (2002). "Microsatellite polymorphism in locus OMHC1 (MHC Class I) in Polish Heath Sheep and Polish Lowland Sheep (Zelazna variety)." J Appl Genet **43**(2): 217-22.
- Hegde, N. R., S. A. Ellis, et al. (1995). "Peptide motif of the cattle MHC class I antigen BoLA-A11." Immunogenetics **42**(4): 302-3.

- Hein, W. R., T. Barber, et al. (2004). "Long-term collection and characterization of afferent lymph from the ovine small intestine." J Immunol Methods **293**(1-2): 153-68.
- Hein, W. R., S. J. McClure, et al. (1987). "Cellular composition of peripheral lymph and skin of sheep defined by monoclonal antibodies." Int Arch Allergy Appl Immunol **84**(3): 241-6.
- Hill, S., A. J. Edwards, et al. (1990). "Systemic migration of dendritic cells during contact sensitization." Immunology **71**(2): 277-81.
- Howard, C. J., P. Sopp, et al. (1997). "Identification of two distinct populations of dendritic cells in afferent lymph that vary in their ability to stimulate T cells." J Immunol **159**(11): 5372-82.
- Huang, F. P., N. Platt, et al. (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med **191**(3): 435-44.
- Inaba, K., S. Turley, et al. (1998). "Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells." J Exp Med **188**(11): 2163-73.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-6.
- Kelley, J., L. Walter, et al. (2005). "Comparative genomics of major histocompatibility complexes." Immunogenetics **56**(10): 683-95.
- Lanzavecchia, A. (1996). "Mechanisms of antigen uptake for presentation." Curr Opin Immunol **8**(3): 348-54.
- Liu, K., C. Waskow, et al. (2007). "Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice." Nat Immunol **8**(6): 578-83.
- Liu, L., M. Zhang, et al. (1998). "Dendritic cell heterogeneity in vivo: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression." J Immunol **161**(3): 1146-55.
- Mackay, C. R., W. L. Marston, et al. (1990). "Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation." J Exp Med **171**(3): 801-17.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Millot, P. (1978). "The major histocompatibility complex of sheep (OLA) and two minor loci." Anim Blood Groups Biochem Genet **9**(2): 115-21.
- Muixi, L., M. Carrascal, et al. (2008). "Thyroglobulin peptides associate in vivo to HLA-DR in autoimmune thyroid glands." J Immunol **181**(1): 795-807.
- Muntasell, A., M. Carrascal, et al. (2002). "HLA-DR4 molecules in neuroendocrine epithelial cells associate to a heterogeneous repertoire of cytoplasmic and surface self peptides." J Immunol **169**(9): 5052-60.
- Nakano, H., M. Yanagita, et al. (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **194**(8): 1171-8.
- Okada, T., Z. X. Lian, et al. (2003). "Murine thymic plasmacytoid dendritic cells." Eur J Immunol **33**(4): 1012-9.
- Oshitani, N., F. Hato, et al. (2003). "Analysis of intestinal HLA-DR bound peptides and dysregulated immune responses to enteric flora in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." Int J Mol Med **11**(1): 99-104.
- Pascale, F., V. Contreras, et al. (2008). "Plasmacytoid dendritic cells migrate in afferent skin lymph." J Immunol **180**(9): 5963-72.
- Paterson, S. (1998). "Evidence for balancing selection at the major histocompatibility complex in a free-living ruminant." J Hered **89**(4): 289-94.
- Pernthaner, A., S. A. Cole, et al. (2002). "Phenotypic diversity of antigen-presenting cells in ovine-afferent intestinal lymph." Arch Med Res **33**(4): 405-12.

- Puri, N. K. and M. R. Brandon (1987). "Sheep MHC class II molecules. II. Identification and characterization of four distinct subsets of sheep MHC class II molecules." Immunology **62**(4): 575-80.
- Puri, N. K., K. J. Gogolin-Ewens, et al. (1987). "Monoclonal antibodies to sheep MHC class I and class II molecules: biochemical characterization of three class I gene products and four distinct subpopulations of class II molecules." Vet Immunol Immunopathol **15**(1-2): 59-86.
- Puri, N. K., P. C. Scott, et al. (1987). "Biochemical and molecular analysis of sheep MHC class II molecules." Vet Immunol Immunopathol **17**(1-4): 231-41.
- Rammensee, H. G., T. Friede, et al. (1995). "MHC ligands and peptide motifs: first listing." Immunogenetics **41**(4): 178-228.
- Riffault, S., M. L. Eloranta, et al. (1996). "Herpes simplex virus induces appearance of interferon-alpha/beta-producing cells and partially interferon-alpha/beta-dependent accumulation of leukocytes in murine regional lymph nodes." J Interferon Cytokine Res **16**(12): 1007-14.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1999). "Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation." J Exp Med **189**(4): 611-4.
- Scheinecker, C., R. McHugh, et al. (2002). "Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node." J Exp Med **196**(8): 1079-90.
- Schwartz-Cornil, I., M. Epardaud, et al. (2005). "Probing leukocyte traffic in lymph from oro-nasal mucosae by cervical catheterization in a sheep model." J Immunol Methods **305**(2): 152-61.
- Schwartz-Cornil, I., M. Epardaud, et al. (2006). "Cervical duct cannulation in sheep for collection of afferent lymph dendritic cells from head tissues." Nat Protoc **1**(2): 874-9.
- Scott, P. C., C. L. Choi, et al. (1987). "Genetic organization of the ovine MHC class II region." Immunogenetics **25**(2): 116-22.
- Scott, P. C., J. F. Maddox, et al. (1991). "The nucleotide sequence and evolution of ovine MHC class II B genes: DQB and DRB." Immunogenetics **34**(2): 80-7.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.
- Smith, J. B., G. H. McIntosh, et al. (1970). "The traffic of cells through tissues: a study of peripheral lymph in sheep." J Anat **107**(Pt 1): 87-100.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 351-8.
- Sukwit, S., T. Chuenchitra, et al. (2005). "Distribution of CD38 molecules on CD3+ and CD8+ T- lymphocyte in adulthood HIV-1-uninfected Thais." J Med Assoc Thai **88 Suppl 1**: S48-55.
- Summerfield, A., L. Guzylack-Piriou, et al. (2003). "Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells." Immunology **110**(4): 440-9.
- Summerfield, A. and K. C. McCullough (2008). "The porcine dendritic cell family." Dev Comp Immunol.
- Summers, K. L., B. D. Hock, et al. (2001). "Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils." Am J Pathol **159**(1): 285-95.
- van Eijk, M. J., J. E. Beever, et al. (1995). "Genetic mapping of BoLA-A, CYP21, DRB3, DYA, and PRL on BTA23." Mamm Genome **6**(2): 151-2.
- Villadangos, J. A. and P. Schnorrer (2007). "Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo." Nat Rev Immunol **7**(7): 543-55.
- Villadangos, J. A. and L. Young (2008). "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells." Immunity **29**(3): 352-61.

- Wahlstrom, J., J. Dengjel, et al. (2007). "Identification of HLA-DR-bound peptides presented by human bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis." J Clin Invest **117**(11): 3576-82.
- Walton, K. L., J. He, et al. (2006). "Dendritic cells in germ-free and specific pathogen-free mice have similar phenotypes and in vitro antigen presenting function." Immunol Lett **102**(1): 16-24.
- Wilson, N. S., D. El-Sukkari, et al. (2003). "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature." Blood **102**(6): 2187-94.
- Wozniak, J. (2004). "Two methods for the quantitative analysis of surface antigen expression in acute myeloid leukemia (AML)." Folia Histochem Cytobiol **42**(3): 195-9.
- Wu, L. and A. Dakic (2004). "Development of dendritic cell system." Cell Mol Immunol **1**(2): 112-8.
- Yoneyama, H., K. Matsuno, et al. (2004). "Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules." Int Immunol **16**(7): 915-28.
- Young, L. J., N. S. Wilson, et al. (2008). "Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells." Nat Immunol **9**(11): 1244-52.
- Yrliid, U., V. Cerovic, et al. (2006). "Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph." J Immunol **177**(9): 6115-21.
- Zaba, L. C., J. Fuentes-Duculan, et al. (2007). "Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages." J Clin Invest **117**(9): 2517-25.