



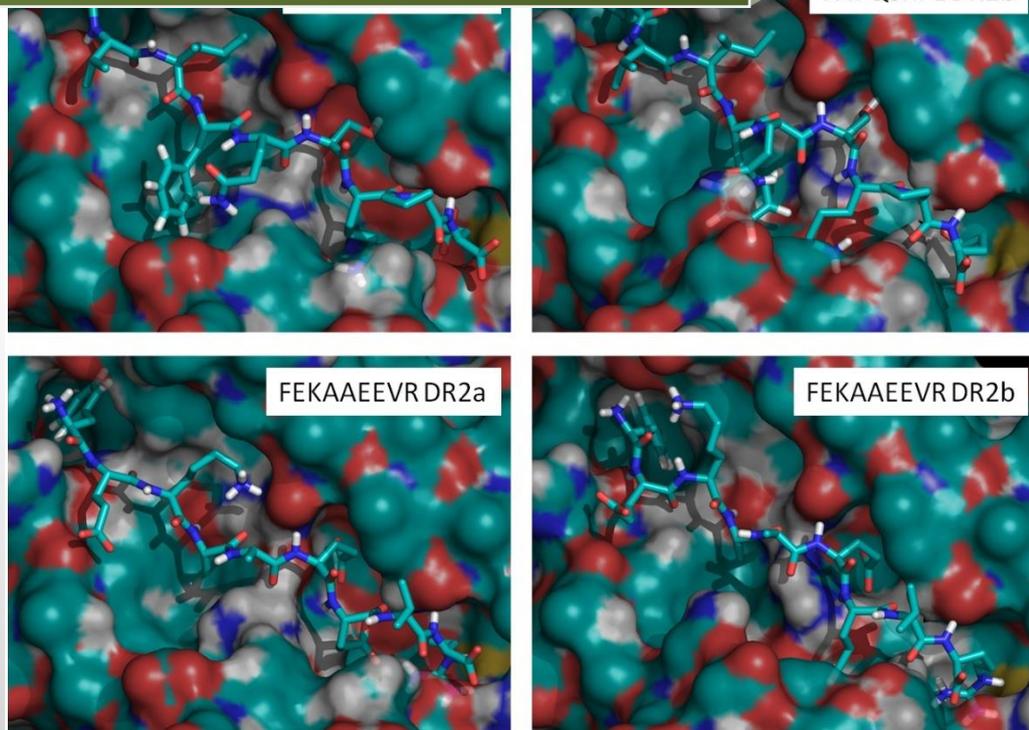
Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Mecanismos de Procesamiento y Presentación Antigénica en Autoinmunidad



*Memoria de tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Inmunología,
por la Universidad Autónoma de Barcelona
Bellaterra, Mayo 2017*

Erika Margaret Scholz Valero

Departamento de Biología Celular,
Fisiología e Inmunología
Facultad de Biociencias
Universidad Autónoma de Barcelona



Memoria presentada por:

Erika Margaret Scholz Valero

Para optar al grado de:

Doctora en Inmunología por el programa de doctorado en Inmunología de la
Universidad Autónoma de Barcelona RD_{1393/2007}

Título de la Tesis:

Mecanismos de Procesamiento y Presentación Antigénica en Autoinmunidad

Tesis realizada en el Laboratorio de Inmunología Celular del Instituto de
Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona bajo la
dirección de Iñaki Álvarez

Doctoranda

Director

Erika Margaret Scholz Valero

Iñaki Álvarez

Bellaterra, Mayo 2017

Resumen de tesis

Las moléculas de HLA son moléculas presentadoras de péptidos, que muestran a los linfocitos T el estado de la célula y su entorno lo que permite activar la respuesta inmune específica en caso de infección o transformación tumoral. Existen dos tipos de moléculas de HLA, de clase I (HLA-A, -B y -C) y de clase II (HLA-DR, -DP y -DQ). Las primeras presentan péptidos procedentes del catabolismo de proteínas endógenas, mientras que las moléculas de HLA de clase II presentan péptidos exógenos, de membrana o de la ruta vesicular. La asociación genética más fuerte en muchas enfermedades autoinmunes es con varios alelos de HLA. Entre estas enfermedades están la artritis reumatoide, asociada a HLA-DR1, varios subtipos de DR4 y DR10, entre otras y no asociadas a otras moléculas como HLA-DR15. Por su parte, HLA-DR15 es un haplotipo asociado a esclerosis múltiple y expresa dos genes funcionales, HLA-DRB1*15:01 (DR2b) y HLA-DRB5*01:01 (DR2a). Por otro lado, se ha visto que varios péptidos pueden unirse a múltiples moléculas de HLA de clase II, lo que se ha denominado promiscuidad de las moléculas de HLA de clase II.

Por otro lado, el proteasoma es un complejo multicatalítico abundante y es el principal sistema degradativo del citosol y el núcleo. Se han descrito tres tipos principales de proteasoma: el proteasoma constitutivo, con las subunidades catalíticas $\beta 1, \beta 2$ y $\beta 5$; el inmunoproteasoma ($\beta 1i, \beta 2i$ y $\beta 5i$) y el timoproteasoma ($\beta 1i, \beta 2i$ y $\beta 5t$). Recientemente se han descrito proteasomas intermedios, conteniendo las subunidades del inmunoproteasoma $\beta 5i$ o $\beta 5i$ y $\beta 1i$, junto con $\beta 1$ y $\beta 2$ o $\beta 2$, respectivamente.

En esta tesis se han abordado, mediante técnicas bioquímicas y de espectrometría de masas, varios aspectos del procesamiento y presentación antigénica. En primer lugar, se han analizado los repertorios peptídicos presentados por moléculas de HLA-DR asociadas diferencialmente a artritis reumatoide. En segundo lugar, se han comparado los repertorios peptídicos de las moléculas presentes en el haplotipo DR15: DR2a y DR2b. Finalmente se ha caracterizado la especificidad del proteasoma intermedio $\beta 5i$ y se ha estudiado su papel en la generación de ligandos peptídicos de HLA de clase I.

Nuestros datos indican que entre los alotipos asociados a enfermedad, los repertorios peptídicos más similares son entre DR1 y DR10 y que un alto porcentaje de los péptidos comunes contienen leucina en la posición P4 del *core* de unión y residuos básicos en la posición P8. Por otro lado, los repertorios peptídicos de DR2a y DR2b ha permitido refinar los motivos de anclaje de dichas moléculas. Dichos repertorios son complementarios y poco solapantes. Además, se ha estimado que ambas moléculas aportan un número similar de péptidos al repertorio global de DR15. Un aspecto importante es que de todas las moléculas que hemos analizado, el grado de solapamiento de los repertorios peptídicos

ha sido muy bajo en todas, lo que indica que, aunque la promiscuidad de HLA-DR existe, se produce en un bajo porcentaje de los ligandos peptídicos.

Por otro lado, se ha desarrollado una nueva metodología para purificar proteasoma 20S activo y con alta pureza de forma rápida y eficiente. Los datos obtenidos indican que el proteasoma intermedio $\beta 5i$ presenta una actividad *chymotrypsin-like* menor que el proteasoma constitutivo, una actividad *caspase-like* similar, aunque un poco disminuida y una actividad tipo *trypsin-like* incrementada sobre el proteasoma constitutivo. Finalmente, se ha podido explicar, con digestiones *in vitro* de precursores peptídicos con proteasoma 20S purificado, la generación de varios ligandos de moléculas de HLA de clase I.

Thesis resume

HLA molecules are peptide-presenting molecules, which show to T lymphocytes the state of the cell and environment, what allows to activate the specific immune response in case of infection or tumoral transformation. There are two types of HLA molecules, class I (HLA-A, -B and -C) and class II (HLA-DR, -DP and -DQ). Class I molecules show peptides derived from the catabolism of endogenous proteins, while class II molecules show peptides derived from exogenous, membrane or vesicle proteins. The strong genetic association of many autoimmune diseases are with some HLA alleles. Among these disorders are rheumatoid arthritis, associated with DR1, several subtypes of DR4 and DR10, but not with DR15. HLA-DR15 is a complex haplotype associated with multiple sclerosis which expresses two functional genes, HLA-DRB1*15:01 (DR2b) and HLA-DRB5*01:01 (DR2a). On the other hand, several peptides can bind to multiple class II molecules, what has been denominated promiscuity of HLA class II molecules.

On the other hand, the proteasome is an abundant multicatalytic complex which is the main degradative system in the cytosol and nucleus. Three major types of proteasome have been described: the constitutive proteasom with the catalytic subunits $\beta 1, \beta 2$ y $\beta 5$; the immunoproteasome ($\beta 1i, \beta 2i$ y $\beta 5i$) and the thymoproteasome ($\beta 1i, \beta 2i$ y $\beta 5t$). Recently, intermediate proteasome have been described. These contain $\beta 1, \beta 2$ and $\beta 5i$ or $\beta 1i, \beta 2$ and $\beta 5i$.

In this thesis we have studied, using biochemical and mass spectrometry techniques, several points of the antigenic processing and presentation. First, the peptide repertoires bound to HLA-DR molecules differentially associated with rheumatoid arthritis have been analyzed. Second, we have studied the peptide repertoires associated to DR2a and DR2b, molecules simultaneously expressed in cells with the haplotype HLA-DR15. Finally, we have characterized the specificity of the intermediate proteasome $\beta 5i$ and its role in the generation of HLA class I peptide ligands.

Our data indicate that, among the allotypes associated with the disease, the most similar peptide repertoires are DR1 and DR10, and many common peptides contain leucine in P4 core position and basic residues in P8. The peptide repertoires bound to DR2a and DR2b allowed the refinement of their binding motifs. Both repertoires are complimentary and with a low degree of overlap. Furthermore, we estimated that both molecules contribute similarly to the global peptide repertoire presented by HLA-DR15. The fact that all peptide repertoires analyzed showed a low degree or overlap indicate that, although the HLA-DR promiscuity exists, it occurs in a low number of peptide ligands.

On the other hand, a new protocol for the rapid and efficient purification of an active and pure 20S proteasome has been developed. The data indicate that the intermediate proteasome $\beta 5i$ has a decreased chymotrypsin-like activity, a similar caspase-like and an increased trypsin-like activity than the standard proteasome. Finally, *in vitro* digestions with purified 20S proteasomes of peptide precursor of HLA class I-ligands has allowed to explain the generation of several HLA- class I peptide ligands.

INTRODUCCIÓN

I. El Complejo Principal de Histocompatibilidad

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC), denominado antígeno leucocitario humano (*Human Leucocyte Antigen*, HLA) en humanos, es una región de DNA que contiene múltiples genes que codifican proteínas con funciones inmunitarias. En humanos está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y abarca una extensión aproximada de 4 megabases en la que están contenidos unos 260 genes (1). Muchos de estos genes codifican proteínas que intervienen en el procesamiento y presentación antigénica, mientras que otros codifican proteínas que participan en la respuesta inmunitaria innata o adaptativa (1,2).

El HLA se organiza en tres regiones (3): 1) la región telomérica de clase I, comprende los genes que codifican las moléculas de MHC de clase I clásicas (*HLA-A*, *-B* y *-C*), los genes que codifican las moléculas *class I-like* (*HLA-E*, *-F* y *-G*) y los genes de ligandos del receptor NKG2D (*MIC-A* y *MIC-B*); 2) la región centromérica de clase II, contiene los genes que codifican las moléculas de MHC de clase II (*HLA-DR*, *-DQ* y *-DP*), las moléculas no clásicas asociadas con el ensamblaje (*HLA-DM* y *-DO*), las proteínas que componen el transportador asociado con procesamiento antigénico (*Transporter Associated with Antigen Processing*, *TAP*) *TAP-1* y *TAP-2* y los genes asociados con las subunidades del inmunoproteasoma, *LMP2* ($\beta 1i$) y *LMP7* ($\beta 5i$) (2); 3) la región de clase III, ubicada entre las otras dos, agrupa los genes que codifican componentes del sistema de complemento, citocinas de la familia del factor de necrosis tumoral, proteínas de *shock* térmico (HSP) y otros de función aún desconocida (1) (Figura 1).

Los genes de HLA clásicos son los más polimórficos del genoma humano (5–7) y determinados alelos están asociados con el incremento o resistencia a la susceptibilidad de ciertas patologías de tipo infecciosa y autoinmune (2,8–10). Además, tal y como se observó en los experimentos pioneros de Gorer y Snell, son decisivos en el rechazo a los trasplantes de órganos y tejidos, aspecto de excepcional relevancia en la medicina actual.

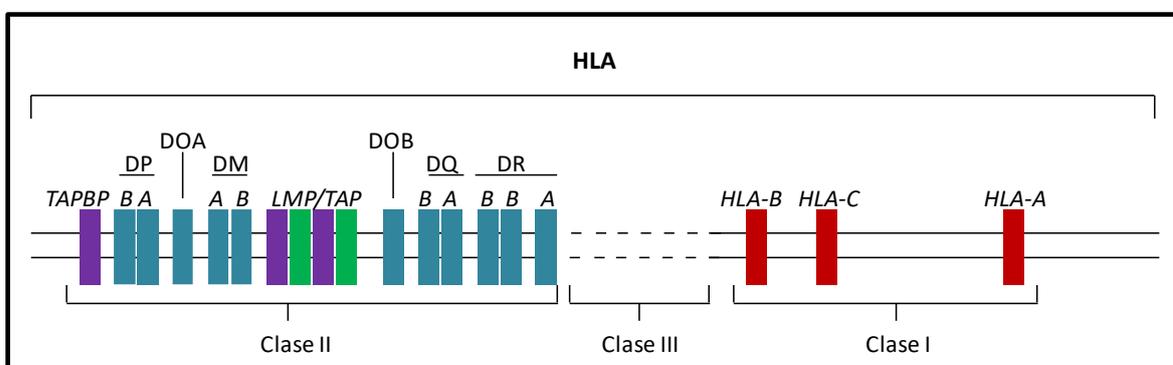


Figura 1: Estructura génica del HLA. Se muestran los genes de las principales regiones del HLA, en el cromosoma 6. Tomado de *Janeway's Immunobiology, 8th Edition*.

1. Estructura de las moléculas de MHC

Las moléculas de MHC clásicas son glicoproteínas de membrana encargadas de procesar y presentar péptidos para ser reconocidos por los linfocitos T. Existen dos tipos: las moléculas de MHC de clase I (MHC-I) y las moléculas de MHC de clase II (MHC-II). Las moléculas de MHC están presentes en todos los vertebrados mandibulados y se han conservado a lo largo de la evolución (3).

Las moléculas de MHC-I están compuestas por dos cadenas polipeptídicas asociadas de manera no covalente: una glicoproteína de unos 43 kDa denominada cadena α o cadena pesada, codificada por los tres genes de la región de clase I, en humanos, *HLA-A*, *-B* y *-C* y, una proteína de 12 kDa, denominada β_2 microglobulina, no polimórfica y codificada en el cromosoma 15, fuera de la región de HLA (11). La cadena pesada posee tres regiones: una región extracelular, que contiene tres dominios (α_1 , α_2 y α_3) de aproximadamente 90 aminoácidos cada uno, una región transmembrana de unos 25 aminoácidos y una región intracitoplásmica de 30 aminoácidos aproximadamente. Los dominios α_1 y α_2 , conforman el surco de unión al péptido, mientras que el dominio α_3 y la β_2m poseen residuos relativamente conservados (12,13) (Figura 2A).

Las moléculas de MHC-II son heterodímeros formados por dos glicoproteínas denominadas cadenas α y β , de unos 35 y 30 kDa respectivamente, unidas no covalentemente y codificadas por los tres pares de genes presentes en la región de clase II, en humanos *HLA-DR*, *-DQ* y *-DP*. En una cadena están los dominios extracelulares α_1 , y α_2 y, en la otra, los dominios β_1 y β_2 . Los dominios α_2 y β_2 son proximales a la membrana, en tanto que α_1 y β_1 se encuentran distales a ésta y forman la hendidura de unión al péptido. Ambas cadenas se anclan a la membrana a través de una región de 20-25 aminoácidos seguidos de una cola citoplasmática corta de 12-15 aminoácidos (14,15) (Figura 2B).

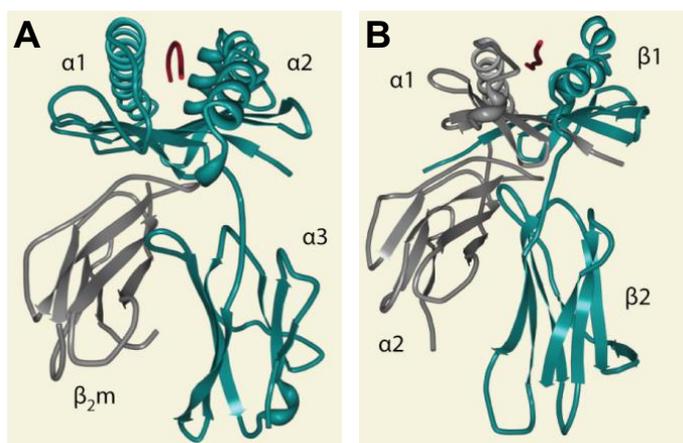


Figura 2: Estructura tridimensional de las moléculas de MHC de clase I y clase II unidas a un ligando peptídico. (A) MHC-I: Cadena pesada (verde), β_2 microglobulina (gris), péptido (rojo). (B) MHC-II: Cadena α de HLA-DR (gris), cadena β (verde), péptido (rojo). Tomado Blum JS, et al. 2013. Annual Review of Immunology 31:443-73.

Aunque los componentes son diferentes, en las moléculas de MHC-I y MHC-II el sitio de unión al péptido es estructuralmente similar y consiste en un surco formado por dos hélices alfa, a modo de paredes, sobre una lamina β formada por ocho hebras β antiparalelas, aportadas equitativamente por los dominios α_1 y α_2 en MHC-I (Figura 3A) y α_1 y β_1 en MHC-II (Figura 3B).

En esta estructura algunos residuos forman cavidades o *pockets*, donde se pueden acomodar las cadenas laterales de los aminoácidos del ligando peptídico, con características específicas, según las propiedades fisicoquímicas de los residuos que forman el *pocket*. Cada alotipo puede unir un repertorio peptídico compuesto por varios miles de moléculas diferentes (5,16). El mayor grado de polimorfismo de las moléculas está concentrado en el surco de unión, permitiendo que diferentes moléculas de MHC unan repertorios peptídicos diferentes (17). La capacidad de una molécula de MHC de unirse a diferentes péptidos es específica para cada alotipo y define su repertorio peptídico.

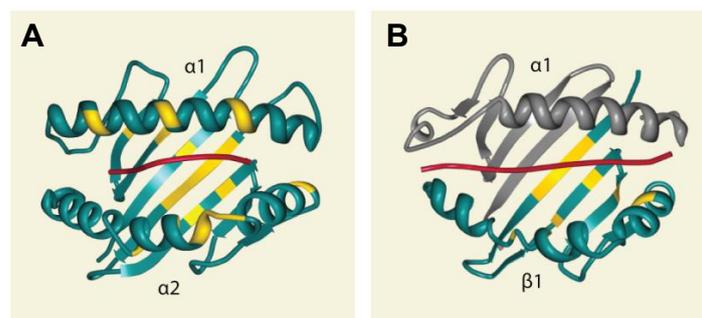


Figura 3: Representación esquemática de la estructura tridimensional del surco de unión peptídico de las moléculas de MHC-I y MHC-II. (A) HLA-A2 unida a un péptido de influenza₅₈₋₆₆. (B) HLA-DR1 unida a un péptido de hemaglutinina₃₀₆₋₃₁ del virus de influenza, cadena α (gris), cadena β (verde), péptido (rojo). Tomado de Blum JS, et al. 2013. *Annual Review of Immunology* 31:443-73.

2. Interacción HLA-péptido

El surco de unión de las moléculas de MHC-I es cerrado en los extremos y une péptidos habitualmente de entre 8 y 12 aminoácidos, mayoritariamente nonámeros (18,19), en conformación extendida (20) (Figuras 2A y 3A). Los péptidos más largos logran acomodarse adoptando una conformación abultada en el centro, sobresaliendo hacia el receptor de células T (TCR) (21–25). El ligando se fija al surco a partir de los extremos amino y carboxilo. Además de por los extremos peptídicos, el ligando se une a las moléculas de MHC-I en alguna otra posición de anclaje. En muchos alotipos esta posición es la P2 (o B) además del residuo C-terminal (20,25,26). Otros residuos, que no interactúan de manera profunda en el surco de unión, se exponen hacia el exterior y pueden ser reconocidos por el TCR del linfocito

T específico. La posición carboxilo terminal del ligando peptídico suele contener residuos alifáticos, aromáticos o básicos (5,27).

Existe un amplio consenso de que el proteasoma genera directamente el extremo C-terminal de los péptidos anclados a las moléculas de MHC-I (5,28,29). En algunos casos el proteasoma puede generar directamente el extremo N-terminal (30) o extensiones del mismo (31), que son posteriormente procesadas en el retículo endoplásmico (RE) mediante la aminopeptidasa ERAAP (32).

Los péptidos unidos a MHC-II tienen usualmente entre 10 a 20 residuos de largo, siendo mayoritarios aquellos de entre 13 y 16 residuos (33), aunque se han identificado péptidos de hasta 30 aminoácidos o más (34). El surco de unión de la molécula de clase II es abierto en los extremos, por lo que el ligando después de acomodar el núcleo de interacción o *core*, sobresale por los extremos del mismo (Figura 3B). El *core*, de 9 aminoácidos, interacciona en el sitio de unión, en donde participan las posiciones P1, P4, P6/P7 y P9 en la mayoría de los alelos (14,35). Las cadenas laterales de los residuos de anclaje se acomodan en los *pockets* presentes en el surco de unión estabilizándose, al igual que en MHC-I, mediante interacciones no covalentes (interacciones iónicas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals). Dado que las moléculas de MHC-II soportan la unión de péptidos de longitudes diversas, se habla de familias peptídicas o *nested sets*, es decir, conjuntos de péptidos que comparten el mismo *core* de interacción pero difieren en la longitud de los extremos amino y carboxilo terminal (33,34,36). A diferencia de MHC-I, el hecho de que los extremos de los ligandos de MHC-II puedan sobresalir del surco de unión junto con que varios de los *pockets* pueden tener una especificidad laxa, permitiendo la unión de las cadenas laterales de un grupo amplio de aminoácidos, dificulta la identificación inequívoca del *core* de interacción. Esto genera que los algoritmos de predicción de unión peptídica al MHC-II, puedan identificar de forma errónea los residuos de anclaje para un determinado ligando peptídico.

3. Vías de procesamiento de antígeno

3.1. Vía de procesamiento de antígeno de clase I

Las moléculas de MHC de clase I son expresadas por todas las células nucleadas del organismo y son las encargadas de presentar péptidos a los linfocitos T CD8⁺ (27). Estos péptidos provienen del catabolismo de proteínas citosólicas o nucleares, bien propias (en

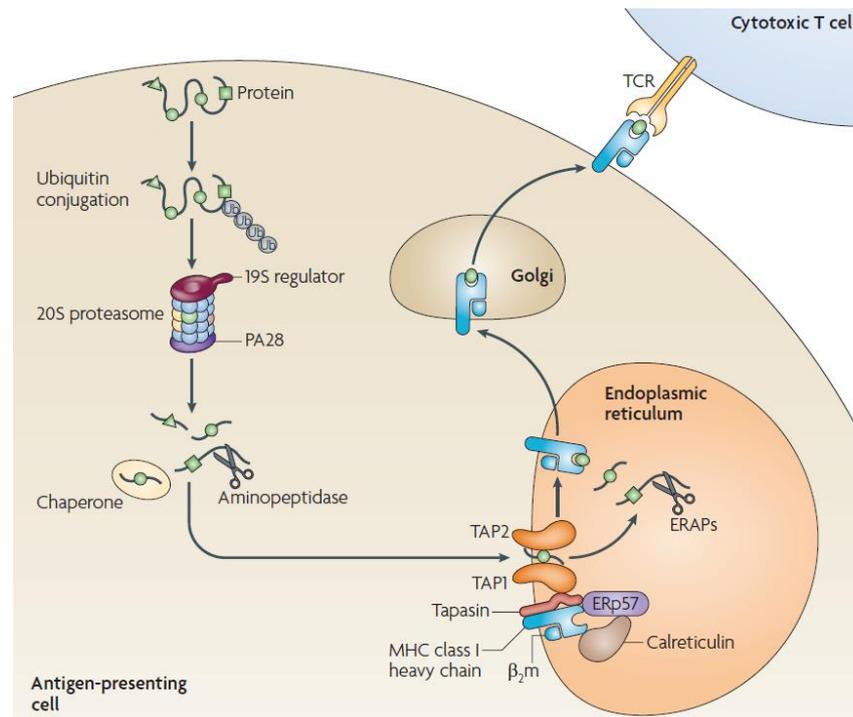


Figura 4: Vía de procesamiento de antígeno de clase I y presentación a un CTL. Tomado de Groettrup M., et al. 2010. *Nature Reviews Immunology*,

ausencia de infección) o derivadas de patógenos intracelulares. Otra fuente importante de ligandos de las moléculas de MHC-I son los productos ribosomales defectuosos (DRiPs), que pueden generar hasta un 30% de los ligandos de clase I (37), aunque otros autores señalan que este porcentaje puede ser más bajo (38,39). El proteasoma puede, además, generar péptidos que no están codificados en el genoma, lo que ocurre por la ligación de dos fragmentos peptídicos durante la digestión de la proteína, fenómeno conocido como *protein splicing* (40,41).

Como se ha comentado anteriormente, las proteínas son degradadas en el citosol, principalmente por el proteasoma. Los péptidos generados, inestables en el citosol, son rápidamente transportados al interior del retículo endoplásmico (ER). Además del proteasoma, otras proteasas participan en la degradación de los péptidos citosólicos, como la tripeptidil peptidasa II (TPPII) (42,43), la nardilisina (44), la oligopeptidasa thimet (TOP) (44,45), la enzima degradadora de insulina (IDE) (46) y la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (47), entre otras.

Los péptidos de entre 8 y 16 aminoácidos son translocados al lumen del ER por TAP-1 y TAP-2, los cuáles seleccionan los potenciales sustratos principalmente por el tamaño y por el extremo C-terminal, mostrando una fuerte preferencia por aquellos con residuos hidrófobos

en esta posición (48,49). Por otra parte, el heterodímero de MHC-I es ensamblado en el ER. La cadena α (o cadena pesada) del MHC-I se sintetiza en el lumen del ER rugoso, en donde se asocia a la chaperona calnexina (50) que la mantiene parcialmente plegada. La unión de la cadena β_2m provoca la disociación de la calnexina y el recién formado heterodímero α - β_2m es estabilizado por otra chaperona, la calreticulina (51,52). Este trímero forma un complejo con la tapasina (53) y la Erp57 (54,55) o la recientemente descrita PDI (56) formando el denominado complejo de carga (PLC). La tapasina cataliza el intercambio de péptidos de baja afinidad por otros de mayor afinidad, determinando los péptidos que finalmente se unirán a la molécula de MHC-I (57), siendo algunos alotipos más dependientes de tapasina que otros (58,59). La tapasina hace de puente entre la molécula de MHC-I y TAP (60). En muchos casos, los péptidos son procesados por aminopeptidasas residentes del ER, siendo ERAAP la más conocida. Se conocen dos miembros de esta familia de aminopeptidasas: ERAAP-1 (32,61,62) y ERAAP-2 (63). ERAAP no forma parte del PLC, por lo que muchos péptidos son procesados en el lumen del ER y contactan posteriormente con el PLC para unirse al heterodímero de MHC-I o encuentran una molécula de MHC libre fuera del PLC (64). La unión de un péptido con suficiente afinidad estabiliza finalmente la molécula de MHC-I (65). Finalmente, el trímero cadena pesada- β_2m -péptido es exportado a la superficie celular, donde se presenta a los linfocitos T CD8⁺ (Figura 4).

3.2. Vía de procesamiento de antígeno de clase II

Las moléculas de MHC-II son expresadas por células presentadoras de antígeno profesionales (APCs), como las células dendríticas, los macrófagos y las células B, así como por las células epiteliales tímicas, tanto las corticales (cTECs) como las medulares (mTECs). Las moléculas de MHC-II presentan péptidos a las células T CD4⁺ (2,66). La expresión de MHC-II puede ser inducida por IFN- γ y otros estímulos en células no inmunes(64,67).

La mayoría de los péptidos presentados por las moléculas de MHC-II provienen de proteínas localizadas en la membrana plasmática, en los orgánulos de las vías endocítica o secretora y en el exterior celular (internalizadas en la vía vesicular por fagocitosis, endocitosis, pinocitosis, etc.).

La transcripción de los genes de MHC-II es controlada por el transactivador del complejo principal de histocompatibilidad clase II (CIITA). La proteína no interactúa directamente con el DNA, sino que actúa como un regulador "maestro" de la transcripción, a través de la interacción con otras proteínas (67). Las cadenas α y β del heterodímero de MHC-II, son sintetizadas y ensambladas en el RE, en donde se asocian a la cadena invariante (Ii o CD74), una glicoproteína transmembrana presente en el RE que actúa como pseudopéptido,

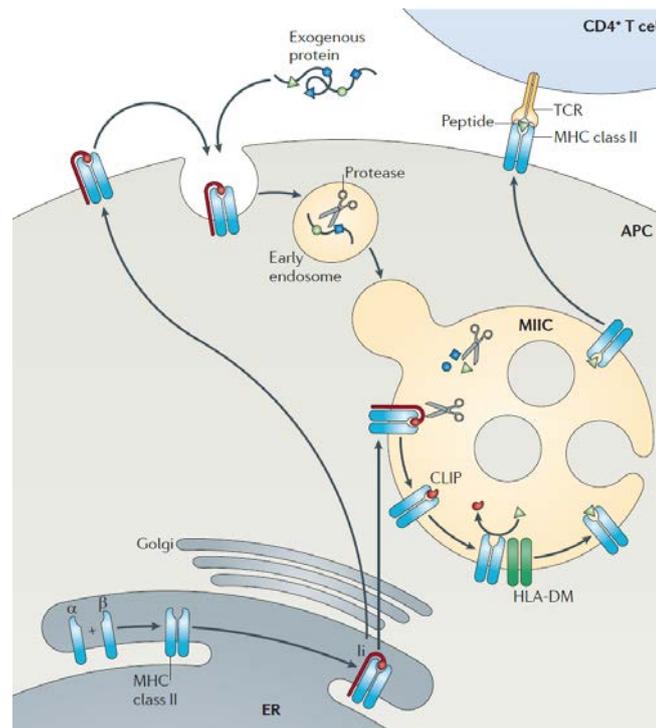


Figura 5: Vías de procesamiento y presentación antigénica por las moléculas MHC de clase II. Tomado de Neefjes et al. 2011, *Nature Reviews Immunology*. 823-836

cumpliendo varias funciones (68,69): 1) evita que proteínas parcialmente plegadas provenientes del propio RE alcancen el surco de unión; 2) estabiliza los complejos; 3) dirige la salida de las moléculas MHC-II a la ruta vesicular por un motivo de dileucinas presente en la cola citoplasmática. Existen 4 isoformas de cadena invariante en humanos (68). CD74 forma trímeros, en donde cada subunidad se une de forma no covalente a un heterodímero $\alpha\beta$ del MHC-II, dando lugar a nonámeros $li_3(\alpha\beta)_3$ (70). Mientras este complejo se ensambla en el retículo endoplasmático, sus componentes se asocian con la calnexina (71). Una vez formados, los nonámeros son liberados de la calnexina y salen del RE para ser dirigidos hacia compartimentos endosómicos de pH bajo, donde ocurre la unión del péptido. Dichos compartimentos se denominan MIIC (72). En el MIIC, las moléculas de MHC-II encuentran al péptido, generado por proteasas residentes, especialmente las catepsinas L y S, las cuales degradarán también a li, quedando en el surco de unión un péptido de CD74 denominado CLIP (*Class II Associated li Peptide*) (Figura 5).

HLA-DM, es una chaperona *class-II-like* localizada en los compartimentos vesiculares, cuya función es la regulación del intercambio de CLIP por péptidos derivados del catabolismo de las proteínas en los compartimentos de la vía endocítica, así como la protección contra la inactivación (73,74). HLA-DO es otra molécula que se expresa en células B y en la médula tímica, cuya función parece ser modular la acción de DM (75,76).

Finalmente, cuando se forma el complejo trimérico, formado por el péptido y las cadenas α y β de las moléculas de MHC-II, éste es transportado a la membrana plasmática, vía transporte vesicular, donde se presentará a los linfocitos T CD4⁺.

En ausencia de infección, la mayoría de los péptidos presentados por MHC-I y MHC-II derivan de proteínas autólogas (5,77). Esta presentación es importante para el mantenimiento del repertorio de linfocitos T circulantes. Existe una intercomunicación en ambas vías, lo que permite la presentación de proteínas exógenas por moléculas de clase I, denominada presentación cruzada o *cross-presentation*, lo que es importante a la hora de que las células dendríticas presenten péptidos de patógenos captados por la vía endocítica a los linfocitos T CD8⁺ (78).

II. HLA y enfermedades autoinmunes

1. Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (RA) (OMIM #180300) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta principalmente a las articulaciones. Se caracteriza por la presencia de sinovitis, sensibilidad articular y atrofia muscular. El resultado final es la destrucción de la articulación, conduciendo finalmente a una discapacidad severa y mortalidad prematura (79). Asimismo, la RA puede afectar otros órganos. Tiene una prevalencia del 1% en la población mundial, siendo más frecuente en mujeres, con edad superior a 35 años, que en hombres en un ratio 2-3:1 (80). La RA es considerada una enfermedad autoinmune. En el suero se detectan varios tipos de autoanticuerpos. Se conocen desde hace mucho tiempo un tipo de anticuerpo anti-inmunoglobulinas propias, denominado factor reumatoideo. Estos anticuerpos se usan como prueba diagnóstica, pero no son específicos de RA (81,82). Asimismo, se han descrito anticuerpos anti-proteínas citrulinadas, cuya aparición precede las manifestaciones clínicas (83,84). La presencia de dichos anticuerpos es más específica de RA y está asociada a una enfermedad más severa (83–85).

Como ocurre en la mayoría de las enfermedades autoinmunes, su etiopatogenia no está totalmente definida, sin embargo, ciertos factores ambientales y genéticos se han asociado con un incremento en la susceptibilidad. La principal

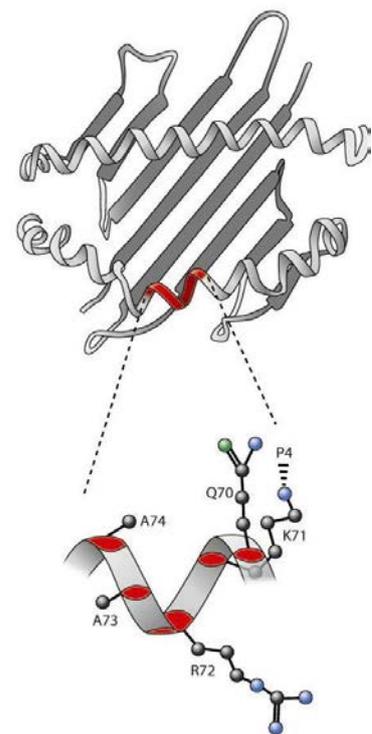


Figura 6: Representación esquemática del (SE) presente en los alelos de HLA-DRB1. Tomado de *Imboden J. et al, 2009, Annual Review of Pathology. 4:417-434*

asociación genética se ha establecido con el locus *HLA-DRB1* (86–88), aunque otros genes también están asociados: *HLA-B*, *HLA-DPB1*, *PTPN22*, *IL23R*, *TRAF1*, *CTLA4*, *IRF5*, *STAT4*, *CCR6* y, *PADI4*, entre otros (86,89).

La asociación con los alelos de *HLA-DRB1* está claramente establecida. Se han descrito alelos positivamente asociados con la enfermedad, como algunos subtipos de HLA-DR4 (DRB1*04:01, DRB1*04:04, DRB1*04:05, DRB1*04:08), HLA-DR1 (DRB1*01:01, DRB1*01:02) y HLA-DR10 (DRB1*10:01), alelos negativamente asociados, como (DRB1*03:01, DRB1*07:01, DRB1*08:01), mientras que otros alelos son considerados de bajo riesgo o no asociados con la enfermedad, como HLA-DRB1*15:01 (87,89).

Los alelos de *HLA-DRB1* que están asociados con RA contienen una secuencia consenso básica (R(Q)K(R)RAA) (Tabla 1) que abarca los aminoácidos en las posiciones 70-74 de la cadena β de la molécula de HLA-DR, localizada en una de las α hélices del surco de unión (Figura 6). Esta característica estructural llevó a postular la hipótesis del epítipo compartido (*Shared Epitope*, SE) (90), la cuál define que dicha secuencia puede contribuir a la patogenia de la enfermedad y modular el reconocimiento por parte de la célula T, bien sea por interacción directa con el TCR o influyendo en el repertorio peptídico asociado a través de la interacción directa con los péptidos (89).

<i>HLA-DRB1</i>	Posición del residuo				
	70	71	72	73	74
Susceptibilidad Alta					
*04:01,*13:03	Q	K	R	A	A
Susceptibilidad Intermedia					
*01:01,*01:02,*04:04,*04:05, *04:08,*10:01,*14:02,*14:06	Q/R	R	R	A	A
Susceptibilidad Baja					
*1501,*1502,*1503	Q	A	R	A	A
*0103,*0402,*1301,*1302,*1102,*1103	D	E	R	A	A
*1202,*16	D	R	R	A	A
No asociados					
*03	Q	K	R	G	R
*0403,*0407	Q	K	R	A	E
*07	D	R	R	G	Q
*08	D	R	R	A	L
*09	R	R	R	A	E
*14 (excepto *1402 y *1406)	R	R	R	A	E

Tabla 1: Residuos en las posiciones del SE en las moléculas de HLA-DR diferencialmente asociadas con RA. Tomado de *Imboden J. et al, 2009, Annual Review of Pathology. 4:417-434*

La citrulinación es una modificación postransduccional en la que el aminoácido arginina, con carga positiva, se convierte en citrulina, un aminoácido neutro. Esta modificación ocurre en condiciones fisiológicas, pudiendo ser citrulinadas una gran variedad de proteínas, principalmente proteínas presentes en la epidermis, como la vimentina y la filagrina (91), aunque, puede darse en proteínas en múltiples lugares del organismo, como el sistema nervioso central y el pulmón (92,93).

Sin embargo, la citrulinación ocurre generalmente en procesos inflamatorios (92). Como se ha comentado previamente, la presencia de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas está asociada a una versión más agresiva de la enfermedad y es altamente específica, aunque no exclusiva, de RA (92,94).

La reacción es catalizada por un grupo de enzimas denominadas peptidil arginina deiminasas (PADs) (92,93,95,96) en un proceso de deiminación del grupo guanidino de la arginina, que comporta la sustitución de un nitrógeno por un oxígeno, mediante el requerimiento de una molécula de agua y la liberación de amonio como producto de la reacción (Figura 7). Las PADs, requieren elevadas concentraciones de calcio para ejercer su actividad y se activan en condiciones de estrés celular y apoptosis (93). En el tejido sinovial de pacientes con RA han sido encontradas distintas proteínas citrulinadas como el fibrinógeno, la fibrina, la vimentina y la α -enolasa (97–99).

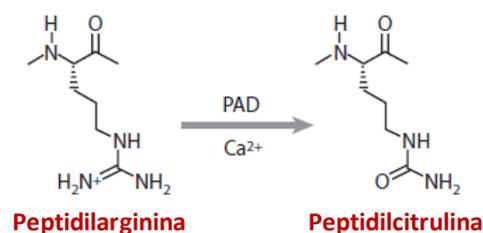


Figura 7: Citrulinación de Proteínas. Tomado de *Imboden J. et al, 2009. Annual Review of Pathology. 4:417-434*

Los residuos que conforman el SE forman parte o están localizados cerca del *pocket* donde interacciona el residuo en la posición 4 (P4) del *core* peptídico. Concretamente, uno de los contactos moleculares entre la molécula de HLA-DR y el péptido se suele dar entre el residuo 71 de la cadena β de DR y la cadena lateral del residuo en posición P4 del péptido, como se demostró mediante estudios cristalográficos hechos a partir de alelos que contienen el SE, HLA-DR1 (HLA-DRB1*0101) y HLA DR4 (HLA-DRB1*0401) unido a un péptido de la hemaglutinina del virus influenza y con un péptido derivado del colágeno tipo II, respectivamente (100–102).

La presencia de residuos básicos (Arg y Lys) en esta posición dificulta la unión de residuos de la misma naturaleza, tales como Arg en la posición P4 del *core*. La citrulinación de ciertos péptidos incrementa su afinidad por moléculas de DR que contienen el SE lo que facilitaría su presentación a las células T (89). Esta modificación postransduccional puede contribuir a que la posición P4, que normalmente no admitiría residuos básicos, pueda aceptar el residuo neutro citrulina en esta posición (90,100–104). Los alotipos que contienen el SE permiten la unión, en la posición P4, de glutamina, aminoácido polar sin carga con características fisicoquímicas similares a la citrulina, lo que permite suponer que estas moléculas pueden aceptar citrulina en la posición P4 del *core* peptídico (80). De hecho, se ha visto que péptidos con citrulina en la posición P4 son capaces de unirse con alta afinidad a diversas moléculas de HLA-DR (105). Así, se evidenció en experimentos con ratones transgénicos que expresaban DRB1*04:01, que la forma citrulinada del péptido de vimentina producía una respuesta específica T CD4⁺. En este mismo experimento, en un ensayo de *binding in vitro*, se incrementó la afinidad del péptido por la molécula de HLA que contenía el SE, de 20 a 100 veces. Sin embargo, esta explicación no es extensiva a todas las proteínas dianas en RA como el fibrinógeno (89,106).

2. HLA-DR15 y esclerosis múltiple

En humanos, el polimorfismo de las moléculas de HLA-DR viene dado en exclusiva por la cadena DR β , ya que, aunque DR α es dimórfica, ambas moléculas son funcionalmente equivalentes. En el caso de HLA-DP y -DQ tanto la cadena α como la β son polimórficas. Por tanto, en una célula heterocigótica, se expresan cuatro moléculas de DP y de DQ y dos moléculas de DR, ya que cualquier cadena α puede interactuar con cualquier cadena β . Sin embargo, algunos haplotipos de DR incluyen dos genes *HLA-DRB* funcionales, permitiendo la expresión de 4 moléculas diferentes en individuos heterocigotos. Específicamente, los haplotipos DR3, DR11, DR12, DR13 y DR14 expresan DRB1 y DRB3; DR4, DR7 y DR9 expresan DRB1 y DRB4; y DR15 y DR16 expresan DRB1 y DRB5. El hecho de que algunos haplotipos porten dos genes DRB funcionales indica que provee algunas ventajas en relación a la presentación de péptidos derivados de patógenos a los linfocitos T CD4⁺.

Desde hace tiempo se sabe que diferentes moléculas de HLA-DR pueden presentar péptidos comunes, lo que indica que dichas moléculas son, en cierto nivel, promiscuas. De hecho, en el surco de unión peptídico se une a múltiples moléculas de HLA el péptido CLIP, proceso necesario para la carga correcta de los ligandos peptídicos en los compartimentos MIIC. Además, se han descrito múltiples ligandos promiscuos (107–117).

Sin embargo, aunque la promiscuidad de las moléculas de HLA-DR está aceptada, hasta ahora no se ha analizado el grado de solapamiento entre diferentes repertorios peptídicos, ni entre diferentes alotipos de HLA-DRB1 ni entre diferentes *loci* expresados en un mismo alotipo.

HLA-DR15, es un haplotipo que, como se ha comentado previamente expresa dos genes *HLA-DRB* funcionales. Es un haplotipo asociado a esclerosis múltiple, que es una enfermedad inflamatoria crónica del sistema nervioso central y es considerada una enfermedad autoinmune mediada por células T. Su prevalencia es de 0,5-1.5 por cada 1000 habitantes en el hemisferio norte (118). La patología está caracterizada por inflamación, demielinización y degeneración axonal (119). Como otras enfermedades autoinmunes, su etiología no es simple e implica múltiples factores genéticos y ambientales. La asociación genética más fuerte es con el haplotipo HLA-DR15, con un *odds ratio* descrito de 3,08 (120). Los alelos contenidos en el haplotipo DR15 son, casi exclusivamente, HLA-DRB1*15:01 (DR2b) y HLA-DRB5*01:01 (DR2a). Los motivos de anclaje de dichas moléculas se describieron hace años (121,122), en base a unas pocas secuencias peptídicas obtenidas por degradación de Edman y a ensayos de unión peptídicos. Un número mayor de ligandos de DR2a y DR2b se han obtenido recientemente, pero los ligandos provenían mayoritariamente de HLA-II y de otras proteínas de la ruta endocítica (123), lo que intuye a pensar que existía un elevado número de contaminantes. Se han descrito cientos de ensayos de unión a DR2a y DR2b en el *Immuno Epitope Database and Analysis resource* (<http://www.iedb.org/>). Sin embargo, el número limitado de péptidos eluidos de estos alotipos, los cuáles son, en definitiva, los péptidos más relevantes presentados *in vivo*, junto con que los ensayos de unión pueden dejar fuera varios residuos de anclaje, sugiere que los motivos de anclaje de unas moléculas especialmente relevantes por su asociación a esclerosis múltiple pueden no estar totalmente definidos.

La coexpresión de DR2a y DR2b a nivel de RNA y sobre la superficie celular se ha demostrado en diferentes tipos celulares (124). En este estudio, se observó que los niveles de RNA de DR2a fueron mayores, aunque la expresión en la superficie celular, detectada por citometría de flujo parecía ser similar en ambos alotipos. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado si los peptidomas presentados por estas moléculas de HLA-DR expresadas en el mismo alotipo pueden ser altamente solapantes o, por el contrario, ser complementarias, lo que explicaría su selección a lo largo de la evolución. Finalmente, tampoco se ha analizado si ambas moléculas contribuyen de una manera similar a la conformación del repertorio peptídico de HLA-DR15 o, en cambio, una de ellas aporta de forma significativa un porcentaje elevado de los epítomos potencialmente reconocidos por los linfocitos T CD4⁺.

III. El sistema ubiquitina proteasoma

El sistema ubiquitina proteasoma (UPS) es el principal sistema de degradación de proteínas en el interior celular (125,126). En un proceso que requiere el marcaje previo con ubiquitina, las proteínas son hidrolizadas a oligopéptidos por el proteasoma, un complejo multicatalítico presente en el citosol, libre o unido al ER, y en el núcleo de las células eucariotas (127–130).

La actividad del proteasoma dentro de este sistema se produce *in vivo* por la asociación de un *core* catalítico, el proteasoma 20S, a una variedad de complejos reguladores. La forma más común en las células de mamíferos, es el proteasoma 26S (126,127), resultado de la asociación del proteasoma 20S con una o dos subunidades reguladoras 19S (PA700). Existen otras dos familias de reguladores: el complejo 11S (PA28, PA26) y PA200 (Blm10), que son menos conservados y sus substratos y funciones no están totalmente dilucidados (131–133). Los complejos reguladores facilitan el acceso del substrato y coordinan el reconocimiento y la translocación del mismo al *core* 20S. (131,134).

En el UPS las proteínas son marcadas para la degradación por la unión covalente de varias unidades de una proteína de 76 aminoácidos, la ubiquitina, gracias a la acción secuencial de tres enzimas; E1, E2 y E3, en un proceso que requiere energía. Brevemente, la ubiquitinación se inicia con la unión de la ubiquitina a E1, mediante la formación de un enlace tioéster entre un residuo de glicina, en el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina, y la cisteína presente en el sitio activo de la enzima (135). Este paso implica la formación de un complejo intermediario (el ubiquitin adenilato) y la hidrólisis de ATP. La ubiquitina activada es transferida al sitio activo de la proteína transportadora E2. La ubiquitina, capturada por E2, es unida por el extremo C-terminal a un grupo ϵ -amino de la proteína diana, por acción de una ubiquitin ligasa E3, la cual confiere especificidad al sistema. Una vez que la proteína ha sido marcada por la primera ubiquitina, se añadirán nuevas moléculas de ubiquitina formando cadenas de poliubiquitinas unidas a un residuo específico de lisina. La proteína poliubiquitinada es reconocida generalmente por el complejo 26S por unión a UBA (*Ubiquitin Associated Domains*), requiriendo la hidrólisis de ATP, siendo finalmente llevada a su degradación en las cavidades internas del proteasoma 20S. Durante el proceso de desnaturalización la proteína es deubiquitinada, proceso necesario para el reciclaje de la ubiquitina (126,136).

El UPS es esencial en el mantenimiento de la homeostasis proteica asegurando la eliminación de las proteínas defectuosas. Así, la proteólisis dependiente de proteasoma regula un gran número de procesos biológicos, como la diferenciación celular, la apoptosis y la transducción de señales, entre otros, participando en la progresión del ciclo celular

(126,134,137). Además, como ya se mencionó, es fundamental en la generación de los péptidos antigénicos presentados por el MHC-I (31,137).

1. Estructura del proteasoma 20S

El proteasoma 20S es una estructura extraordinariamente conservada, presente en los tres dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya* (138). Está compuesto por 28 subunidades, catorce subunidades alfa y catorce subunidades beta, organizadas en cuatro anillos heptaméricos apilados entre sí, formando una estructura cilíndrica. En un plano transversal, el cilindro está constituido por dos mitades idénticas. Los anillos externos corresponden a siete subunidades α (α_1 , a α_7) y los anillos internos a siete subunidades β (β_1 a β_7) (139), lo que estequiométricamente resulta en: $\alpha_7\text{-}\beta_7\text{-}\beta_7\text{-}\alpha_7$ (140,141). Las subunidades α sirven de soporte a los complejos reguladores (PA700, PA28, PA26 y PA200), las cuales pueden unirse a uno o a ambos lados del proteasoma 20S, o formar proteasomas híbridos, en donde el core 20S se une a dos complejos reguladores diferentes (132). En vertebrados, entre las subunidades β , hay tres con funciones catalíticas: β_1 , β_2 y β_5 (142). Cada subunidad tiene un tamaño aproximado de entre 20 y 35 kDa, otorgando al complejo 20S un peso molecular de 700-750 kDa (136) (Figura 8).

El proteasoma 20S contiene tres cavidades internas: dos antecámaras, entre los anillos α y β , y una cavidad central, entre los dos anillos β adyacentes(143). La hidrólisis del péptido es mediada por un residuo de treonina (Thr) N-terminal, presente en las subunidades catalíticas β , la cual está expuesta en el lumen del proteasoma 20S, en la cámara catalítica (141,144,145). La porción C-terminal se encuentra en la superficie externa del complejo. La proteólisis del sustrato a oligopéptidos se produce por un ataque nucleofílico del grupo hidroxilo, de la cadena lateral de la Thr, sobre un grupo carbonilo presente en el sustrato. Se produce un intermediario acil-enzima a través del cuál un fragmento del péptido permanece unido al proteasoma por un enlace tipo éster. El producto intermediario es hidrolizado por moléculas de agua presentes en la cámara, liberando el fragmento peptídico que será luego transferido al citosol (132,146).

En los vertebrados el ensamblaje del proteasoma es un proceso altamente ordenado que involucra primero la formación de las mitades del cilindro (hemiproteasoma). Comienza con la formación de los anillos α . Cada subunidad α ocupa una posición definida dentro del anillo. En este proceso participan varias chaperonas (147). Por su parte, cada subunidad β se ensambla sobre un anillo α . El ensamblaje del anillo β se inicia con la subunidad β_2 , seguido de β_3 , β_4 , β_5 , β_6 , β_1 y finalmente β_7 (148) La incorporación de la última subunidad β_7 , desencadena la dimerización de los dos hemiproteasomas. El proceso de incorporación cooperativa es

dirigido por una chaperona, denominada proteína de maduración del proteasoma (POMP). Las subunidades catalíticas ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$), entre otras, son sintetizadas como un propéptido, el cuál es eliminado al final del ensamblaje desenmascarando los sitios activos de $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ (149).

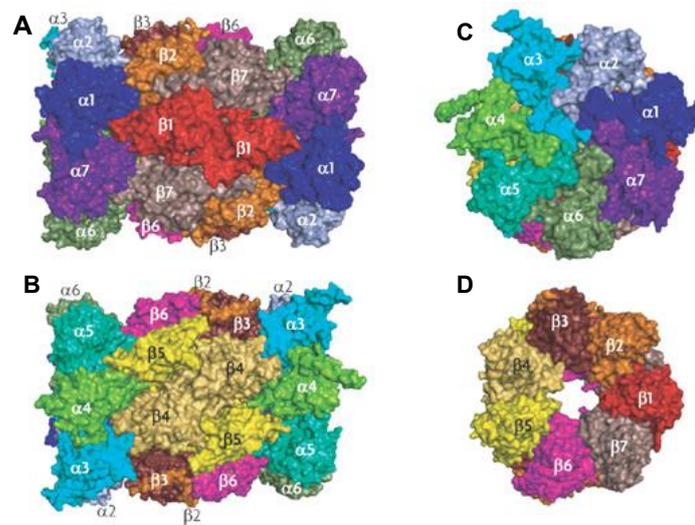


Figura 8: Estructura molecular del proteasoma 20S de bovino. (A) (B) Vista lateral (C) vista superior del anillo α (D) Vista superior del anillo β . Tomado de Murata S., et al. 2009, *Molecular mechanisms of proteasome assembly. Nature Review Mol Cellular Biology* (2):104-15

2. Tipos de Proteasoma

En la actualidad se han descrito tres tipos de proteasoma (150): el proteasoma constitutivo o estándar (CP), el inmunoproteasoma (IP) y el timoproteasoma (TP) (Figura 9).

El CP está presente en todas las células del organismo. Las actividades de las subunidades catalíticas han sido fundamentalmente definidas en ensayos con péptidos fluorogénicos y está determinada, para cada tipo de proteasoma, por la naturaleza de los aminoácidos que componen el *pocket* S1 (146,151). Generalmente se reconoce que la subunidad $\beta 1$ corta preferentemente después de residuos ácidos (actividad tipo caspasa o *caspase-like*), la $\beta 2$ después de aminoácidos básicos (actividad tipo tripsina o *trypsin-like*) y la subunidad $\beta 5$ rompe el enlace peptídico después de residuos hidrofóbicos (actividad tipo quimiotripsina o *chymotrypsin-like*) (132,145).

En algunos tejidos linfoides y en células expuestas a INF- γ y TNF- α (152), las subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ son reemplazadas por otras tres subunidades, $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$ (inmunosubunidades), otorgando al complejo un perfil de actividad diferente. Según la

mayoría de autores, este inmunoproteasoma es más eficiente que el CP en la generación de determinantes antigénicos que se unen a MHC-I (153,154) favoreciendo el procesamiento y presentación de estos ligandos (155–157). Las subunidades $\beta 1i$ (LMP2) y $\beta 5i$ (LMP7) están codificadas por genes localizados en la región de clase II del MHC (158,159). El IP cumple un papel importante en la eliminación, por parte de las células $CD8^+$, de células tumorales y células infectadas por virus (149,150,160,161). Sin embargo, también se han descrito que algunos antígenos derivados de proteínas propias o tumorales, son producidos menos eficientemente por el IP que por el CP. Una disminución de la actividad tipo caspasa y un incremento en las actividades tipo tripsina y quimiotriptica definen el perfil de actividad de este tipo de proteasoma (132,155).

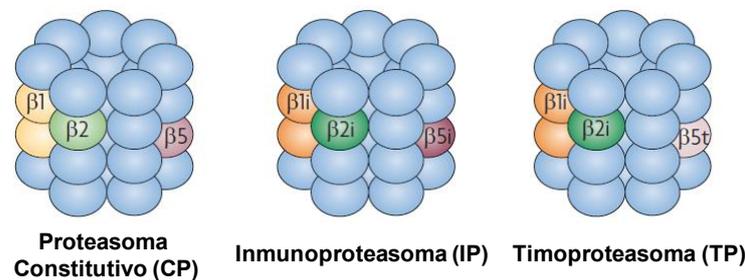


Figura 9: Representación esquemática de los tres tipos de proteasoma 20S. Se muestran las correspondientes subunidades catalíticas. Groettrup M., et al. 2010. *Nature Reviews Immunology*.

El ensamblaje del IP, al igual que el del proteasoma constitutivo, ocurre de forma escalonada y cooperativa (149). Una diferencia remarcable, es que $\beta 1i$ entra en el ensamblaje antes que la subunidad $\beta 1$ en el CP. Asimismo, la incorporación de $\beta 2i$ es dependiente de $\beta 1i$ (147,162,163). Por su parte, la subunidad $\beta 5i$ es necesaria para el procesamiento del propeptido de $\beta 1i$ y $\beta 2i$ (162,164). $\beta 5i$ es la única subunidad capaz de incorporarse al proteasoma, independiente a las otras inmunosubunidades (149,162).

El timoproteasoma ha sido identificado en las cTECs (161,165). En el TP la subunidad $\beta 5i$ es reemplazada por $\beta 5t$ (PSMB11). Por tanto, el TP está formado por las subunidades catalíticas $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5t$. La subunidad $\beta 5t$ ejerce un importante efecto en el establecimiento del repertorio reconocido por los linfocitos T citotóxicos, así lo demostró un experimento realizado con ratones $\beta 5t^{-/-}$. Los linfocitos T citotóxicos en estos ratones mostraron una reducción del 80% y no fueron capaces de responder frente a una infección con el virus de influenza (161,165). El TP muestra una disminución en la actividad quimiotriptica, mientras que las actividades tipo caspasa y tripsina no presentan variaciones respecto al inmunoproteasoma (161). En línea con esta afirmación está el hecho de que el *pocket* S1 de $\beta 5t$ presenta residuos hidrofílicos, mientras que los de $\beta 5$ o $\beta 5i$ contienen residuos hidrofóbicos (132,161).

En la actualidad aún se desconoce con exactitud el papel del timoproteasoma en la generación del repertorio de células T inmunocompetentes.

Aunque durante un tiempo se creía que el cambio de CP a IP era un "todo o nada", de tal manera que una vez se sustituía una de las subunidades se sustituían todas (162), recientemente se han descrito los denominados proteasomas intermedios (PI). Hasta el momento se han encontrado dos tipos de proteasomas intermedios: uno compuesto por las subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5i$ y un segundo formado por $\beta 1i$, $\beta 2$ y $\beta 5i$ Figura 10. La existencia de los proteasomas intermedios es consistente con las reglas del ensamblaje cooperativo de las subunidades catalíticas del IP (132).

Estas formas alternativas de proteasoma, fueron inicialmente sugeridas por Dahlmann, B. et al, a principios del siglo XXI, idea que surgió de la observación de que algunos tejidos presentaban solo algunas de las tres inmunosubunidades (166). Una década más tarde, Guillaume et al., aislaron y determinaron la composición exacta de estos proteasomas, gracias al desarrollo de un *set* de anticuerpos con capacidad de detectar la proteína nativa (149).

La abundancia de dichos proteasomas intermedios es variable. Representan el 30-50% del total de proteasoma presente en el hígado, colon, intestino delgado riñón y células dendríticas, mientras que su abundancia es superior en células tumorales (149). Las actividades tipo tripsina y quimiotripsina de estos proteasomas se describieron, a partir de ensayos con péptidos fluorogénicos, como intermedias entre las del CP y la del IP, lo cuál está en consonancia con las actividades descritas para las subunidades e inmunosubunidades catalíticas. Por otra parte, se han descrito antígenos tumorales, que son exclusivamente generados por estos proteasomas. Por tanto, los proteasomas intermedios podrían ampliar el repertorio presentado por MHC-I (132,149). Sin embargo, no se ha estudiado la especificidad de los mismos en detalle con precursores peptídicos ni se ha analizado el papel que juegan los IP en la conformación de los peptidomas presentados por HLA-I.

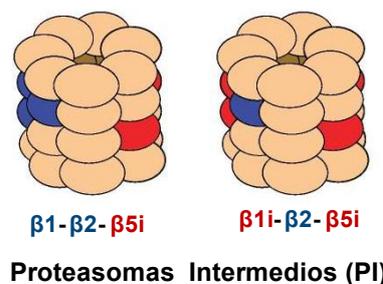


Figura 10: Representación esquemática de los proteasomas intermedios. Tomado de *Vigneron N. et al, Biomoleculas, (4) 994-1025.*

OBJETIVOS

Objetivos Generales:

En esta tesis se abordan dos objetivos principales en referencia a la presentación antigénica por parte de las moléculas de HLA de clase I y II: 1) determinar el grado de solapamiento de los repertorios peptídicos asociados a moléculas de HLA-DR involucradas en autoinmunidad y 2) evaluar el papel del proteasoma intermedio $\beta 5i$ en la generación de ligandos peptídicos presentados por moléculas de HLA de clase I.

Objetivos Específicos:

1. Analizar los repertorios peptídicos de moléculas de HLA-DR asociadas de forma diferencial con artritis reumatoide.
2. Determinar los motivos de unión, el grado de similitud y la aportación de las moléculas HLA-DRB1*15:01 y HLA-DRB5*01:01 al repertorio global de HLA-DR15, haplotipo asociado con esclerosis múltiple.
3. Caracterizar la especificidad del proteasoma intermedio $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 5i$ en comparación con el proteasoma constitutivo y analizar la generación por parte de los mismos de ligandos de HLA de clase I.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares

1.1 Líneas celulares de origen linfoide

a) B-LCL: Se utilizaron líneas linfoblastoides con expresión homocigota de algunos de los alelos de HLA-DR asociados diferencialmente con artritis reumatoide (87,167). Estas incluían: HOM-2 (*DRA1*01:01/DRB1*01:01*), WT51 (*DRA1*01:01/DRB1*04:01*), BEN (*DRA1*01:01/DRB1*10:01*) y MGAR (*DRA1*01:01/DRB1*15:01* y *DRA1*01:01/DRB5*01:01*). Las líneas utilizadas fueron obtenidas en el *10th International Histocompatibility Workshop Group (IHWG)* excepto BEN que se generó en el laboratorio de la Dra. Teresa Gallart y había sido descrita previamente (168).

b) HMy2.C1R (C1R): Es una línea celular que expresa niveles bajos de HLA-B35:01 y HLA-C (169). Como se aprecia en la figura 11, tomada de Marcilla et al. (170), C1R posee una mezcla de proteasoma constitutivo e inmunoproteasoma, aunque la presencia de inmunoproteasoma es extremadamente baja en comparación con el proteasoma estándar, por lo que la actividad mayoritaria es la del proteasoma constitutivo.

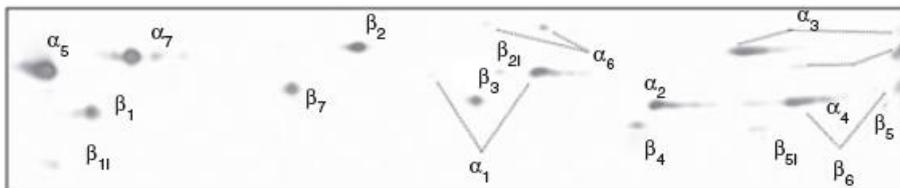


Figura 11: HMy2.C1R expresa proteasoma constitutivo y cantidades mínimas de Inmunoproteasoma (IP). Electroforesis en gel 2D de proteasoma 20S purificado a partir de células C1R transfectadas con el alelo HLA-B*2705 y teñido con tinción de plata. La intensidad de los *spots* correspondientes a las subunidades catalíticas del IP (*spots* de β_{1i} , β_{2i} y β_{5i}) son de una intensidad mucho menor que las del proteasoma constitutivo (*spots* β_1 , β_2 y β_5). Tomado de Marcilla et al. 2007.

c) BLS-DR2a y BLS-DR2b: Línea derivada de pacientes con el síndrome de linfocito desnudo (BLS). Estas células carecen de la expresión de moléculas de MHC-II y habían sido previamente transfectadas con cada uno de los alelos del haplotipo de DR15, DR2a (*DRA1*01:01/DRB5*01:01*) y DR2b (*DRA1*01:01/DRB1*15:01*)(171,172).

d) Hibridomas: Se usaron los hibridomas HB-95, B8.11.2 y MCP21. Son hibridomas productores de los anticuerpos monoclonales (mAb) W6/32, B8.11.2 y MCP21, respectivamente.

1.2 Líneas celulares de origen no linfoide

HEK-293 (ATCC® CRL-1573™) es una línea humana procedente de células embrionarias de riñón transformadas con el DNA del adenovirus 5 (173). HEK-293-F (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) es una adaptación de la línea celular HEK-293 que le permite ser cultivada en suspensión y en medio sin suero. SK-Hep-1 (ATCC® HTB-52™) es una línea celular derivada de un carcinoma hepatocelular. HT93 es una línea celular epitelial de tiroides transformada por la infección con el virus SV40(174). HT93-CIITA, corresponde a la célula HT93 transfectada con el transactivador del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (CIITA).

1.3 Condiciones de cultivo

Las líneas celulares de origen linfoide se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco™, Life Technologies, Gaithersburg, MS, USA) previamente inactivado a 56°C y 2mM de L-glutamina, a 37°C y 5% de CO₂. Se utilizó el sistema de *roller bottles* (Bellco Glass, INC, Vineland, USA) para el crecimiento a gran escala, prescindiendo en este paso de la atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Las líneas celulares de origen no linfoide se crecieron en *flasks* de 75 cm² (Becton Dickinson Falcon™, Franklin Lakes; NJ, USA) con medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco™), suplementado con 10% FBS inactivado y 2mM de L-glutamina, a 37°C y 5% de CO₂. Las células HEK-293F, se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 125mL, 500mL, 1L y 2L (BD Falcon™) en medio *FreeStyle™ 293 Expression Medium* (Gibco), en agitación orbital de 150 rpm, a 37°C y 8% CO₂.

Los hibridomas se crecieron en medio de hibridoma (Sigma-Aldrich), hasta alcanzar un volumen de 0,5 L a 1L, en *roller bottles*. Cuando la viabilidad celular descendía a un 20%, se recolectaba el anticuerpo tras una centrifugación a 1.000 x g a 4°C, durante 15 min. Finalmente el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su purificación. Todo el proceso se realizó en frío.

Se congelaron *pellets* secos de todos los tipos celulares. Para ello, las células se recogieron en esterilidad y se centrifugaron a 1.000 x g durante 15 min a 4°C. Se lavaron dos veces con *Phosphate Buffered Saline* (PBS), frío, a 1.800 x g durante 10 min, y se sumergieron en 10 ml de N₂ líquido. Se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

2. Anticuerpos

2.1 Anticuerpos monoclonales y primarios

W6/32 es un mAb de la clase IgG2a, específico de un determinante monomórfico compartido por las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C (175). B8.11.2 es un mAb clase IgG2b que reconoce un determinante monomórfico de las moléculas de HLA-DR (176,177). MCP21 es un mAb IgG1, que reconoce la subunidad $\alpha 2$ del proteasoma 20S.

Los anticuerpos primarios utilizados en western blot WB, Anti- $\beta 1$, - $\beta 1i$, - $\beta 2$, - $\beta 2i$, - $\beta 5$ y - $\beta 5i$, fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). El anticuerpo primario anti-NWSHPQFEK (Anti Strep-tag II), fue adquirido en GenScript, (GenScript, Piscataway, NJ, USA).

2.2 Purificación de anticuerpo

El sobrenadante de los hibridomas (500 mL) se descongeló a 4°C, 24 horas antes de su purificación y se filtró a través de discos de celulosa (Millipore, Billerica, MA, USA) de 0,45 μ m de diámetro de poro, con ayuda de una bomba de vacío. Posteriormente, se pasó dos veces por una columna de proteína-G (Sephacrose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare, Uppsalla, Sweden) equilibrada previamente con tampón de lavado (tampón fosfato 20mM, pH: 7). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de tampón de lavado y se eluyó con 15 mL de ácido cítrico 0,1 M, pH: 2,8, recolectados en fracciones de 0,7 mL, en tubos *Protein LoBind* (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), conteniendo 0,3 mL de Tris 1M pH: 8. Todo el procedimiento de la purificación se hizo a 4°C. Se realizó una tinción con el reactivo de Bradford y las fracciones con mayor concentración de proteína, se agruparon y se dializaron a través de una membrana de celulosa de 12.000 a 14.000 Da de tamaño de poro (Medicell International Ltd, London, UK), frente a 500 mL de tampón de acoplamiento (NaHCO₃ 0,1M; NaCl 0,5M; pH: 8,3). Finalmente, el anticuerpo se recogió y almacenó a -20°C hasta su uso. Se separó una alícuota de 50 μ L para el control de calidad del anticuerpo.

2.3 Control de Calidad

a) Pureza del anticuerpo

Se realizó un gel discontinuo de SDS-PAGE según el método de Laemmli et al.(178). Las muestras se resuspendieron en tampón de carga (Tris-HCl 0,2 M pH: 6,8; SDS 2% p/v, glicerol 10% v/v, 2-mercaptoetanol 2,8 mM y azul de bromofenol 0,02% p/v) y se separaron en un gel al 12% de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. El gel se tiñó con

azul de *comassie* al 0,1% p/v y se destiñó con solución decolorante (20% MeOH y 10% CH₃COOH (v/v)) (Figura 12).

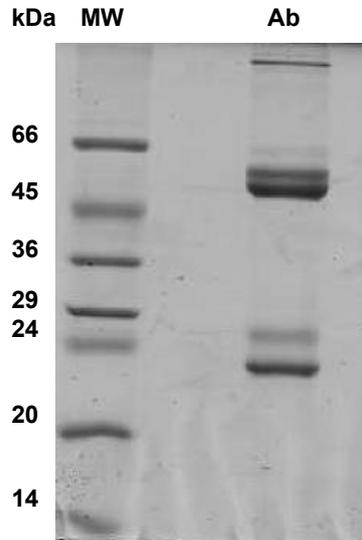


Figura 12: Gel de SDS al 12% de acrilamida, purificación del anticuerpo monoclonal B8.11.2. (MW) marcador de peso molecular. (Ab) Purificación de B8.11.2: cadena α (~35 kDa) y cadena β (~33kDa) de HLA-DR.

b) Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó mediante la detección colorimétrica con el método de Lowry modificado, DC™ *Protein Assay* (Bio-Rad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro (Multilabel Plate Reader VICTOR 3, Perkin Elmer) a 620 nm. El valor obtenido se extrapola a una recta patrón con albúmina sérica bovina (BSA).

c) Titulación funcional del anticuerpo

Se realizó mediante citometría de flujo. Aproximadamente 3×10^5 células se lavaron con PBS y se incubaron en placas de 96 pocillos de fondo cónico, durante 30 min, a 4°C, con 50 μ l de anticuerpo específico a diferentes diluciones en PBS-2% FBS. Se lavaron tres veces con 200 μ l de PBS-2% FBS, centrifugando 5 min a 500 x g. Las células se resuspendieron en 50 μ l de anticuerpo secundario marcado con Alexa Fluor® 488 (Life Technologies) diluido 1/200 en PBS-2% FBS y se incubaron a 4°C durante 30 min en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con 200 μ l de PBS, se resuspendieron en 400 μ l de PBS y se procesaron en un citómetro de flujo (BD FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

2.4 Acoplamiento de los anticuerpos a bolas de sefarosa

Para elaborar las columnas de afinidad se utilizaron bolas de sefarosa, *CNBr-Activated Sepharose 4B* (GE, Healthcare) acopladas al anticuerpo de interés, como soporte cromatográfico. Para cada columna se pesaron 0,5 g de sefarosa y se hidrataron con 50 mL de HCL 1mM durante 20 min, seguidamente las bolas de sefarosa se lavaron con HCL 1 mM en un matraz con disco de vidrio poroso (Glassfilter 3, Duran R Schott, Mainz, Germany). Después de un aclarado con tampón de acoplamiento (500 x g a temperatura ambiente), las bolas de sefarosa eran divididas en dos partes, una mitad se bloqueó durante 2 horas con 25 mL de Tris-HCl 1M, dando lugar a la precolumna y, la otra se incubaba durante 4 horas con 5 mg del anticuerpo correspondiente, conformando la columna. Para eliminar el anticuerpo no unido, se realizaron dos lavados con tampón de acoplamiento. Seguidamente se bloquearon los grupos reactivos remanentes con 25 mL de *buffer* Tris-HCl 0,1 M; pH: 8, durante 2 horas. Finalmente, las bolas de sefarosa (precolumna y columna), eran lavadas en filtro de vidrio, alternando 30 mL NaAc 0,1M; NaCl 0,5M, pH, 4 y a continuación 30 mL de tampón Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,5M, pH, 8, repitiendo este ciclo tres veces. El anticuerpo acoplado se conservó a 4°C hasta su uso.

3. Análisis de los ligandos naturales unidos a las moléculas de HLA de clase I y clase II

3.1 Purificación de los péptidos asociados a las moléculas de HLA.

Los péptidos asociados a las moléculas de HLA se obtuvieron mediante cromatografía de afinidad, elución ácida y ultrafiltración. Todo el proceso se llevó a cabo a 4°C. Los *pellets* secos de $1-3 \times 10^9$ células se lisaron en tampón de lavado frío (BL: 20mM Tris HCl pH 7,6; NaCl 150 mM) en presencia de inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Basel, Switzerland) y 1% de detergente no iónico NP40 y se mantuvieron en agitación durante 1,5h. El lisado se centrifugó durante 10 min a 1300 x g. El sobrenadante se ultracentrifugó durante 1h a 100.000 x g. El sobrenadante de la ultracentrifugación se pasó por una precolumna de bolas de sefarosa, bloqueadas con Tris-HCl 0,1M, pH, 8 equilibrada previamente con BL. El *flow throug* se dejó incubando toda la noche (O/N) en rotación orbital de 150 rpm, a 4°C, con la sefarosa acoplada al mAb específico. El soporte cromatográfico se empaquetó en una columna e inmediatamente se realizaron tres lavados: el primero con 50 mL de *buffer* de lavado con 0,5% de detergente; el segundo con 200 mL de *buffer* de lavado, y por último, un lavado con 500 mL de 20mM Tris-HCl pH 7.6, 5mM NaCl.

Los complejos MHC-péptidos se eluyeron con 10 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (Sigma-Aldrich), en fracciones de 1 mL. Se midió la presencia de proteínas mediante tinción de Bradford. Las fracciones que contenían proteína se evaporaron en un Speed Vac, se juntaron y se pasaron a través de un Centricon® 10, para los ligandos de HLA-DR o Centricon® 3, para ligandos de HLA-I. La fracción peptídica se concentró en un SpeedVac. Las muestras se desalaron en un ZipTip (C18), se secaron en un SpeedVac y se resuspendieron en ácido fórmico 0,1%.

NOTA: en algunos experimentos se pudieron realizar pequeñas variaciones al protocolo descrito, pero sin efecto importante en las purificaciones.

3.2 Espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF).

Los péptidos se fragmentaron por *reverse phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC). Se recogieron fracciones cada 15 seg. y se analizaron en un espectrómetro de masas *matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight* (MALDI-TOF) UltrafleXtreme (Bruker daltonics, Bremen, Alemania).

Los *pools* peptídicos de los diferentes alotipos se compararon por pares usando el *software* MSHandler (179), con los siguientes ajustes: rango de masas (1100-3000 Da); tolerancia usada para definir dos señales como un péptido equivalente $\pm 0,25$ Da/z para el valor de m/z y ± 2 posiciones de elución para el tiempo de retención cromatográfico; el corte de la señal de intensidad para el espectro completo fue 100 en valores de intensidad absolutos y el corte de la señal específica (descartando señales asignadas probablemente como específicas de una forma errónea por falta de ajuste instrumental) fue 500; la anchura de la señal de búsqueda, descartando las señales que son probablemente asignadas como específicas debido a un corrimiento entre los perfiles cromatográficos comparados fue de ± 6 posiciones de elución.

Un *False Discovery Rate* (FDR) se calculó para cada comparación. El cálculo de la FDR se llevó a cabo determinando el solapamiento entre la cromatografía de la muestra real y una cromatografía ficticia (*decoy*) generada calculando la masa de un *pool* de secuencias peptídicas entre 9-27 residuos que se distribuyeron a lo largo de 250 fracciones cromatográficas teóricas, conteniendo cada una 20-30 masas.

3.3 Espectrometría de masas (LC-MS/MS).

3.3.1 Análisis de los repertorios peptídicos de moléculas asociadas diferencialmente a artritis reumatoide

Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas de trampa iónica tridimensional (Esquire HCT Ultra, Bruker, Bremen, Alemania) (168,180) y en un espectrómetro de masas de alta resolución (LTQ-Orbitrap XL, ThermoFisher, San Jose, CA) (180–182).

Para el Esquire HCT Ultra, los *pool*es peptídicos se transfirieron a una columna nano de fase reversa PepMap (300 nm ID X 1 mm) para su concentración y desalado a un flujo de 30 μ l/min. Los péptidos se separaron por cromatografía nano-fase reversa con un gradiente lineal de acetonitrilo del 7% al 40% de tampón B en 74 min (solvente A: ácido fórmico, 0.1% y solvente B: acetonitrilo 80% en solvente A; flujo: 250 nl/min) y entonces eluido a través de una aguja nanoespray PicoTip emitter (New Objective, Woburn, MA) sobre la fuente de ionización nanospray del espectrómetro de masas. La fragmentación MS/MS se llevó a cabo sobre 2 de los iones más intensos, en 1,2 seg con un *MS survey scan* (310-1500 m/z), usando un tiempo de exclusión dinámica de 1,2 min en la selección del ión precursor.

Para el LTQ-Orbitrap XL, las muestras se separaron por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC) usando un gradiente lineal de acetonitrilo del 3% al 40% de tampón B en 180 min (solvente A: ácido fórmico, 0.1% y solvente B: acetonitrilo con ácido fórmico, 0,1%) a un flujo de 0,4 μ l/min. La salida de la columna se conectó al LTQ-Orbitrap XL equipado con una *interface* Protana (Protana A/S, Dinamarca). El espectrómetro de masas opero en el modo ión positivo con un voltaje del spray de 2kV. Se adquirió un *full MS scan* (rango de m/z de 700-3000, resolución de 60000) usando el modo *automatic data-dependent* del instrumento. Los 5 iones más abundantes en cada Full MS se fragmentaron en la trampa iónica (en el rango m/z 350-700, donde los iones de carga simple no se seleccionaron para el análisis MS/MS). Para la fragmentación se usó una anchura de 2,5 Da y 35% de energía relativa. Un tiempo de exclusión dinámica de 45 segundos se seleccionó para minimizar la selección redundante de iones precursores.

3.3.2 Análisis de los repertorios peptídicos de DR2a y DR2b

Las muestras se analizaron en un nano-LC Ultra HPLC (Eksigent) acoplado online con un espectrómetro de masas 5600 triple TOF (AB Sciex) y equipado con una C18 chromXP *trapping column* (350 μ m X 0,5 mm, 3 μ m, Eksigent) y una columna C18 chromXP (75 μ m X 150 mm, 3 μ m, Eksigent). El solvente A y B fueron, ácido fórmico 0,1% y acetonitrilo con ácido fórmico 0,1%, respectivamente. Los péptidos se fraccionaron a un flujo de 300 mL/min a 40°C bajo las siguientes condiciones de elución: un incremento lineal de 5-30% B durante 180 min, un incremento lineal a 90% B en 15 min 10 min a 90% B. Cada ciclo de adquisición comprendió un *survey scan* (350-1250 m/z) de 250 ms y hasta 25 MS/MS *scans* (100-1500 m/z) de 100 ms.

3.4 Identificación de los espectros de fragmentación (MS/MS)

Los archivos adquiridos con el aparato Esquire HCT Ultra se transformaron a formato mgf con el software Data Analysis 4.0 (Bruker). Los archivos mgf se analizaron con Mascot (Matrix Science, Londres) contra la base de datos Human Uniprot (uniprot_taxonomy_A9606Human_reviewed20130201.fasta) y los espectros fueron revisados manualmente. Los archivos del LTQ-Orbitrap XL se analizaron con SEQUEST, usando el software Protein Discoverer (ThermoFisher, San José, CA) contra una base de datos target/decoy que consistía en la base de datos indicada anteriormente a la que se la añadió la copia reversa. Se consideraron identificaciones correctas aquellas con una FDR (False Discovery Rate) < 0,5%. Los parámetros en ambas búsquedas fueron: sin restricción enzimática, sin modificaciones fijas, con metionina oxidada variable y conversión de glutamina N-terminal a ácido piroglutámico variable. La tolerancia del precursor fue 0,6 Da y 10 ppm para el Squire HCT Ultra y el LTQ-Orbitrap XL, respectivamente. En todos los casos la tolerancia de los fragmentos fue 0,6 Da. Se consideraron las identificaciones con SEQUEST con una Xcorr > 2 y en Mascot con un ion score > 20.

En el caso de los espectros de péptidos asociados a DR2a o DR2b, los datos MS/MS se convirtieron a archivos mgf con Peakview 1.2 (AB Sciex) y la búsqueda se realizó contra la base de datos target/decoy de la entrada Uniprot del proteoma completo de *Homo sapiens* (Marzo 2015), con 88669 entradas y sus correspondientes secuencias reversas. El motor de búsqueda fue MASCOT con los siguientes parámetros: sin enzima, MS tolerancia 15 ppm, MS/MS tolerancia de 0,025 Da y con las modificaciones variables: acetilación N-terminal, formación de ácido piroglutámico en N-terminal y oxidación de metionina.

4. Modelización

Las estructuras modelizadas de los complejos peptídicos asociados a las moléculas de HLA-DR se obtuvieron a partir de diferentes estructuras cristalográficas del *Protein Data Bank* (PDB). Se usaron las siguientes entradas: 3PDO para DR1, 1J8H para DR4, 2WBJ para DR2b y 1FV1 para DR2a. Los péptidos unidos se convirtieron a nona-Gly eliminando las cadenas laterales de los residuos de los *cores* de interacción. La aproximación de modelización elegida genera los átomos de las cadenas laterales correspondientes a los péptidos seleccionados vía una técnica de dinámica molecular *slow-growth* bajo condiciones de no equilibrio. Asimismo, el método permite la asignación de un *binding score* para cada interacción. El estado de protonación de los residuos ionizables se simuló sobre pH neutro. Para limitar el grado de dinámica de la proteína se eligió una temperatura 10 K en condiciones de vacío. Para acumular estadística en proceso de no-equilibrio, la

simulación se repitió 1000 veces con diferentes distribuciones de velocidad inicial. La variación de energía libre asociada a la transformación fue estimada según la ecuación Jarzinsky:

$$\Delta G = -kBT \ln(\langle \exp(-W/kBT) \rangle),$$

donde kB es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, W es el trabajo y los corchetes angulados denotan un promedio de los 1.000 valores de trabajo.

Para obtener un *score* que pueda ser usado para hacer un *ranking* de los diferentes péptidos, la transformación previa (nona-Gly a péptido de interés) necesita ser llevada a cabo también para el péptido aislado en el vacío. Entonces, el *binding score* puede ser calculado como:

$$S_{\text{bind}} \equiv \Delta\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{groove}} - \Delta G_{\text{vacuum}},$$

donde ΔG_{groove} se refiere a la transformación dentro del surco de unión y ΔG_{vacuum} se refiere a la transformación del péptido aislado.

5. Purificación del proteasoma 20S

5.1 Diseño del vector pcDNA 3.1-Strep-tag II

Al vector de expresión en eucariotas pcDNA™ 3.1 (+) se le insertó una cola Strep-tag II en las secuencias diana de las enzimas de restricción XhoI y Apal (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Para ello, se calentaron 10 μL de cada *primer* (Tabla 2), a una concentración de 50 μM , durante 5 min a 95°C y se permitió la hibridación a temperatura ambiente. Por su parte, el vector se digirió con las mismas enzimas y se desfosforiló. Se realizó la ligación con los primers hibridados con el kit *Rapid DNA Dephos & Ligation* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la ligación se usó una relación molar vector: inserto de 1:200.

5.2 Clonaje de las subunidades catalíticas $\beta 5$ y $\beta 5i$ del proteasoma en el vector pcDNA 3.1- Strep-tag II

Los genes codificantes de las subunidades catalíticas $\beta 5$ y $\beta 5i$ del proteasoma se clonaron en el vector pcDNA 3.1-Strep-tag II. Para la amplificación de las subunidades catalíticas $\beta 5$ y $\beta 5i$ se utilizó como molde cDNA procedente de la línea celular MGAR.

Gen	Primer	Secuencia 5' - 3'
Strep-tag II	Fw	TCGAGTGGAGCCACCCCCAGTTCGAGAAGTGATGAGGGCC
	Rv	CTCATCACTTCTCGAACTGGGGGTGGCTCCAC
$\beta 5$	Fw	AAAAAAAGCTTACCATGGCGCTTGCCAGCGTG
	Rv	AAAAACTCGAGGCCGCCGCCGGGGGTAGAGCCACTATA
$\beta 5i$	Fw	AAAAAAAGCTTACCATGGCGCTACTAGATGTA
	Rv	AAAAACTCGAGGCCGCCGCCCTTGATTGGCTTCCCG GTA

Tabla 2: Primers utilizados en los diferentes clonajes. Fw (Forward), Rv (Reverse).

a) Extracción de RNA, Retrotranscripción y GAPDH:

Se partió de un *pellet* seco de 1×10^7 células MGAR. Se realizó la extracción de mRNA utilizando el kit RNeasy Plus Mini® (Quiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Uno o dos microgramos de mRNA se retrotranscribieron con la retrotranscriptasa *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MLV RT) (Invitrogen). Brevemente, el volumen necesario de mRNA se completó hasta 10,5 μ L con agua DEPC y se agregaron 0,5 μ L de oligo (dT) (Invitrogen) y 1 μ L de dNTPs 10mM y se calentó 5 minutos a 65°C. Tras 1 min en hielo, se añadieron 4 μ L de M-MLV RT *reaction buffer* 5X, 2 μ L de DTT (Dithiothreitol) 0,1 M y 1 μ L de RNASEOUT (Ribonuclease inhibitor-recombinant, Invitrogen™, 20 U/ μ L). La mezcla se homogeneizó con la pipeta y se calentó a 37°C, 2 min. Finalmente se adicionó 1 μ L de M-MLV 100 U. La reacción se realizó en el termociclador My Cyclor™ Thermal cycler (Bio-Rad) con el programa: 50' a 37°C, 15' a 70°C y 5' a 4°C. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización. La integridad del cDNA se comprobó mediante la amplificación por PCR del gen *housekeeping* GAPDH (Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa).

b) Amplificación de las subunidades catalíticas $\beta 5$ y $\beta 5i$

Se amplificaron los genes de las subunidades $\beta 5$ y $\beta 5i$ con la DNA polimerasa Phusion High-Fidelity (Thermo Scientific). Se incubaron 10 ng del cDNA con una Mix formada por: 4 μ L de 5X Phusion HF Buffer (Thermo Scientific); 0,4 μ L de dNTPs 10 mM; 2 μ L del correspondiente *primer* (Tabla 2) y el agua necesaria para completar 19 μ L, se mezcló con la pipeta y se añadió 1 μ L de la polimerasa (0,4 U). El programa de PCR fue el siguiente: 30'' a 98 °C y 35 ciclos de: 7'' a 98 °C, 20'' a 64,5 °C y 10'' a 72°C; finalmente 7' a 72 °C y 10' a 4°C. La reacción se realizó en un aparato *My Cyclor™ Thermal cycler* (Bio-Rad).

c) Ligación, Transformación y Secuenciación

El producto de PCR fue separado e identificado en un gel de agarosa al 0,8 % con 0,5 µg de EtBr/mL. Se recortaron las bandas correspondientes y se purificaron con el kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare). Se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 y posteriormente se digirieron con las enzimas de restricción Hind III y XhoI (Thermo Scientific). La ligación en el vector pcDNA 3.1-Strep-tag II se realizó con la *T4 ligase* (Thermo Scientific). En cada caso se incluyeron los siguientes controles: control positivo (vector pcDNA3.1 (+)), control negativo (células competentes) y control de religación (pcDNA 3.1-StrepTag II digerido con las mismas enzimas de restricción).

Para la transformación se utilizaron las células competentes DH5α. Unos 50 µL de bacterias competentes se mantuvieron 5 min en hielo, tras lo cual, entre un 25-50% del producto de ligación se mezcló con las bacterias y se incubó 20 min en hielo. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 min y se sembraron en placas de LB-Agar (1% Triptona; 0,5 % Extracto Levadura; 1% NaCl; 1,5 Agar; pH: 7,2) con ampicilina (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich). Las placas se mantuvieron O/N a 37°C.

Entre 6 y 8 colonias de cada placa se cultivaron en 4 mL de medio LB con 0,1 mg/mL de ampicilina y se dejaron O/N en agitación a 37°C. El DNA plasmídico se purificó con el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, Fitchburg, WI, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y la calidad del DNA se midieron en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). El DNA obtenido se digirió con las enzimas de restricción Hind III y Xho I y se visualizó en un gel de agarosa al 0,8%, comprobando la presencia del inserto. Las construcciones que contenían el inserto se secuenciaron en el Servicio de Genómica y Bioinformática del IBB-UAB con los *primers* T7 y BGH reverse. Las secuencias se verificaron con el *software* Chromas y se analizaron en el programa informático de alineamiento de secuencia *Blastn*.

Una de las colonias que contenían la secuencia correcta se creció a mayor escala (250 mL en LB con ampicilina) y el DNA plasmídico se purificó con el kit *HiSpeed Plasmid Maxi* (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación y la determinación de la pureza del DNA se realizaron en el NanoDrop 1000.

5.3 Transfecciones

Las células HEK-293F se ajustaron a una concentración de 5×10^5 cel/ml 24 horas antes de la transfección, en un volumen de 10 mL. Se preparó una Mix en dos partes: A) 10 µg

de DNA diluidos en 0,5 mL de *293 FreeStyle Medium* e incubados durante 5 min a TA. B) 30 μ L de polietilenimina 1mg/mL (PEI) (Polysciences, Hirschberg, Germany) diluidos en 0,5 mL de medio. Se añadió el PEI sobre el DNA, gota a gota, se agitó durante 15 seg en vórtex y después de un pulso de centrifuga se dejó reposar 15 min a TA. La mezcla se añadió gota a gota sobre las células. A las 4h de la transfección se suplementó el medio con ácido valproico 4 mM (Sigma-Aldrich). A las 24 h se realizó un cambio a medio fresco con 1 mg/mL de G418.

5.4 Western blot

Alrededor 1×10^7 células se lisaron a 4°C en 500 μ L de tampón de lisis (TL: 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, inhibidores de proteasas *Complete-Mini protease inhibitor cocktail* (Roche) y 1% (v/v) de NP40, pH 7,4 y se centrifugaron a 15.000 x g, 10 min a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo *ependorf* y se cuantificaron las proteínas. Aproximadamente 20 μ g de proteínas se separaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad) y la membrana se bloqueó 1 hora con 5% de leche desnatada y 0,1% de Tween-20 en PBS (T-PBS). La membrana se incubó durante 1h con el anticuerpo primario, se lavó tres veces y se incubó 1h con el anticuerpo secundario diluido en T-PBS. Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia utilizando el substrato *Clarity™ Western ECL Substrate* (BioRad) en un equipo *VersaDoc™ Imaging System* (BioRad).

5.5 Purificación del proteasoma 20S

Todo el proceso se realizó a 4°C. Alrededor de 3×10^9 células se lisaron mecánicamente con ayuda de un homogeneizador *Potter-Elvehjem* en 50 mL de *buffer* de homogenización (BH: 50mM Tris-HCl; 25 mM KCl; pH: 8). El lisado celular se centrifugó a 1.500 x g durante 10 min. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante se pasó dos veces por una columna de StrepTactin™ Sepharose (GE, Healthcare) (1,2 mL del soporte cromatográfico) equilibrada con 10 mL de *binding buffer*, (BB: 50 mM Tris-HCl; 50 mM KCl; pH: 8). La columna se lavó con 8 CV volúmenes de columna con *BB* y la proteína se eluyó con 10 mL de *d-Desthiobiotin* 2,5 mM (Sigma-Aldrich). Se colectaron fracciones de 500 μ L. La presencia de proteína se comprobó con el reactivo de Bradford. Para confirmar la pureza y la presencia de los proteasomas se realizó una electroforesis en gel de SDS-PAGE al 12%.

Las fracciones que contenían proteasoma 20S se cargaron sobre un gradiente de glicerol (10 a 30 %), siguiendo el protocolo descrito por Marcilla M, et al. 2007 (170), con ligeras

modificaciones. Brevemente, se superpusieron en un tubo de centrifugación diversas capas de 400 μ L con concentraciones crecientes de glicerol (Sigma-Aldrich) (10, 15, 17,5, 20, 22,5, 25, 27,5 y 30%) diluidas en *buffer* de diálisis (BD: 50 mM Tris-HCl, 300 mM KCl, 1M Urea, pH: 8). La muestra diluida en glicerol 10% se cargó sobre el gradiente y se centrifugó a 200.000 g, 18 horas a 4°C. Se recogieron alícuotas de 200 μ L en tubos *ependorf Protein Lo Bind* y se visualizaron las proteínas en un gel de SDS-PAGE al 12%. La fracción contenedora de proteasoma 20S se dializó frente a BD en *Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes* (Thermo Scientific). El proteasoma se cuantificó y se alicuotó y se almacenó a -80°C hasta su uso.

6. Análisis de los repertorios peptídicos de HLA-I en las células HEK-293F que expresan el proteasoma constitutivo o el proteasoma intermedio β 5i

El análisis de los ligandos peptídicos purificados de la línea HEK-293F sin transfectar o transfectada con las subunidades β 5 y β 5i se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Orbitrap-Velos (Thermo) de manera similar al análisis con el Orbitrap-LTQ. La búsqueda se realizó con el motor de búsqueda MASCOT, con una FDR del 5%.

7. Digestiones *in vitro* de precursores peptídicos con proteasoma 20S

Se incubó a 37°C el péptido con proteasoma 20S en tampón HEPES 20mM pH 7,4 a una relación enzima sustrato 1:10 (p/p). La reacción se detuvo con ácido trifluoroacético a una concentración final de 0,1%. Los productos de digestión se analizaron por MALDI-TOF. Los espectros se analizaron con el programa Data Explorer versión 4.4 (Applied Biosystems, California, USA).

La secuencia de las masas con m/z entre 700 a 4.000 se identificaron con el programa ANCHOR (180), con una ventana de 0,2 Da. La abundancia en valores arbitrarios obtenidos del MALDI-TOF de las áreas de cada señal con una m/z entre 700 y el tamaño del péptido parental menos la masa del residuo más pequeño entre los dos extremos se sumó y se referenció como 100%. Se calculó la abundancia relativa de cada masa que se identificó con un péptido en relación al total considerado. Cuando una masa coincidía con dos péptidos se usó LC-MS/MS para identificar el péptido. Algunas masas no pudieron ser identificadas, y se consideraron las dos. Sin embargo, esto ocurrió en péptidos poco abundantes y no afectó de forma considerable al análisis realizado.

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL REPERTORIO PEPTÍDICO
DE LAS MOLÉCULAS DE HLA-DR ASOCIADAS DIFERENCIALMENTE
CON ARTRITIS REUMATOIDE**

CAPÍTULO I

1. Solapamiento de los repertorios peptídicos de moléculas de HLA-DR asociadas diferencialmente a artritis reumatoide

Se purificaron por inmunofinidad los péptidos unidos a cuatro alotipos asociados diferencialmente a RA. Para ello, se utilizaron líneas celulares con expresión homocigota de los alelos seleccionados de HLA-DR. Las líneas usadas fueron: HOM-2 (homocigota para DR1), WT51 (DR4), BEN (DR10) y MGAR (DR15). DR1, DR4 y DR10 están asociados a RA, mientras que DR15 no está asociado a la enfermedad. Las mezclas peptídicas se analizaron por dos técnicas diferentes MALDI-TOF/TOF-MS y LC-IonTrap MS.

Los *pools* peptídicos se fragmentaron por RP-HPLC. Se recogieron 240 fracciones de cada alotipo, las cuáles se analizaron por MALDI-TOF/TOF. Se consideraron 6.309 señales con un rango de m/z entre 1.100 a 3.000. De éstas, 1.594 correspondían a DR1, 1.278 a DR4, 1.248 a DR10 y 2.189 a DR15. Para evaluar el grado de solapamiento entre los repertorios, los *pools* peptídicos se compararon por parejas. El mayor grado de similitud observado fue entre los ligandos de DR1 y DR10, que compartían un 10,4% y un 9,4%, respectivamente, del total de masas analizadas (Tabla 3). El bajo grado de solapamiento podía deberse a diferencias en la separación cromatográfica. Para descartar esta posibilidad, las masas más abundantes de todas las fracciones se fragmentaron por MALDI-TOF/TOF. Se identificaron un total de 73 secuencias peptídicas: 11 para DR1, 38 para DR4, 19 para DR10 y 5 para DR15. Algunas de estas secuencias eran compartidas por dos moléculas de HLA-DR. Los péptidos comunes tenían el mismo tiempo de retención cromatográfico (figura 13) lo que indicaba que las diferencias observadas en el grado de similitud de los repertorios peptídicos no se debían a diferencias en el fraccionamiento de los *pools* peptídicos.

A	B	ALELO A (%)	ALELO B (%)
DR1 vs. DR4		4,35	3,88
DR1 vs. DR10		10,40	9,36
DR1 vs. DR15		6,66	3,49
DR4 vs. DR10		6,47	6,57
DR4 vs. DR15		9,00	5,30
DR10 vs. DR15		8,41	4,85

Tabla 3: Porcentaje de masas moleculares comunes entre diferentes moléculas de HLA-DR detectadas por LC-MALDI-TOF.

Estos datos confirman la promiscuidad de los repertorios peptídicos entre las moléculas de HLA de clase II estudiadas. Asimismo, los datos obtenidos indican que el grado de solapamiento entre los repertorios asociados a dichas moléculas de HLA-DR es bajo (alrededor de un 10%).

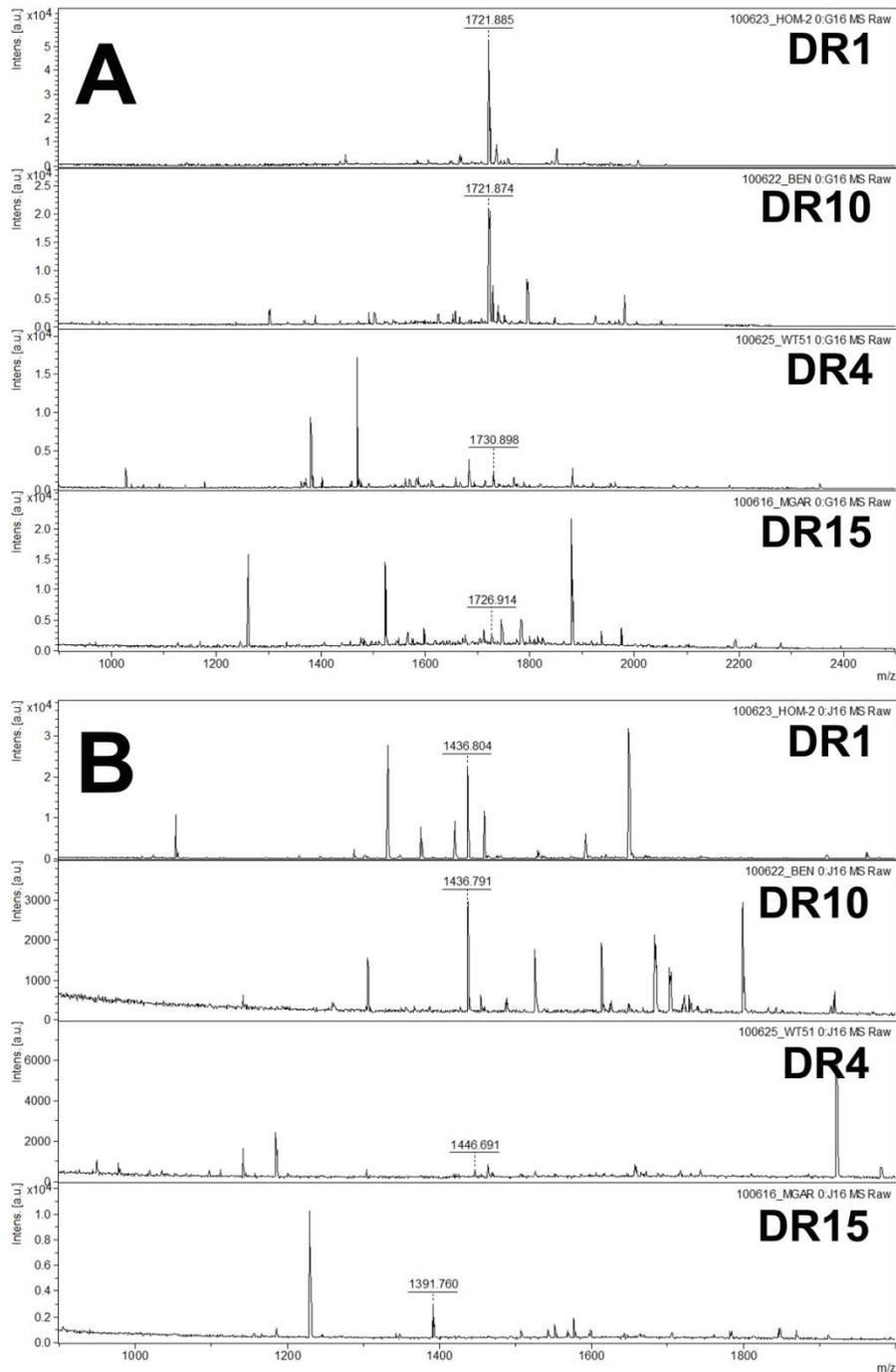


Figura 13: Espectros de MALDI-TOF/TOF-MS de dos diferentes fracciones. Los péptidos comunes presentaron el mismo tiempo de retención cromatográfico. Los picos con m/z de: **(A)** 1.721,9 (RVEYHFLSPYVSPK) y, **(B)** 1.436,8 (QQYLPLPTPKVIG), se eluyeron de las mismas fracciones de DR1 y DR10, pero no de DR4 y DR15.

2. Características del repertorio peptídico asociado a las moléculas de HLA-DR

Para incrementar el número de secuencias peptídicas obtenidas por MALDI-TOF/TOF-MS, los *pools* peptídicos se analizaron por LC-IonTrap MS. Se identificaron un total de 962 secuencias no redundantes: 229 ligandos de DR1, 285 de DR4, 270 de DR10 y 178 de DR15 (Anexo 1).

2.1 Distribución de tamaño

La representación del tamaño de los péptidos secuenciados siguió una distribución normal, con un número promedio de aminoácidos similar para todos los alotipos: 15,3 para DR1; 15,4 para DR4; 15,3 para DR10 y 15,6 para DR15 (Figura 14-A). La distribución de tamaño también se determinó a partir de las masas del MALDI-TOF, obteniendo un tamaño similar y adecuado para los ligandos de clase II, con una relación m/z promedio de 1.594,6 para DR1; 1.576,5 para DR4; 1.616,5 para DR10 y 1.645,2 para DR15 (Figura 14-B).

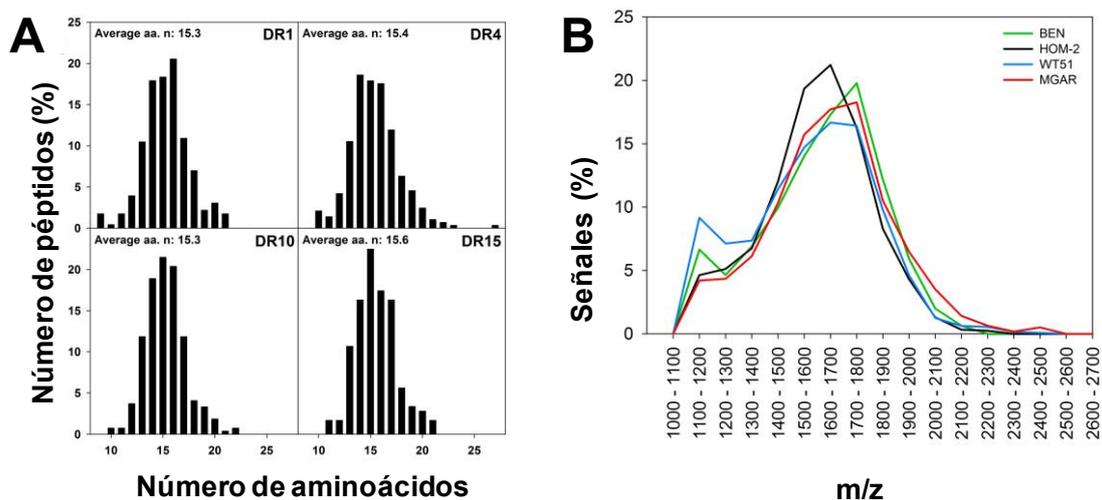


Figura 14: Distribución de tamaño de los ligandos secuenciados de HLA-DR1, -DR4, -DR10 y -DR15 (A) Distribución de tamaño por aminoácido de los péptidos secuenciados **(B)**. **(A)** Distribución de la relación m/z de las masas detectadas por MALDI-TOF.

2.2 Origen de los péptidos unidos a las moléculas de HLA-DR

La localización de las proteínas parentales se definió utilizando las bases de datos *UniProt* (<http://www.uniprot.org>) y *Human Protein Reference Database* (<http://www.hprd.org/>). Se consideró una proteína para cada *nested set*, resultando en 121 proteínas diferentes para DR1, 79 para DR4, 128 para DR10 y 69 para DR15. Cuando una proteína se encontraba localizada en diferentes compartimientos celulares se eligió el más común. La mayoría de las proteínas parentales de los ligandos de HLA-DR (entre un 63,3% y un 82,3%) estaban localizadas en la ruta endocítica (membrana plasmática, secretadas, vesículas, retículo

endoplasmático y aparato de Golgi), mientras que un rango entre 16,5% a 33,6 % de los ligandos peptídicos provenían de proteínas citosólicas, nucleares o mitocondriales (Figura 15).

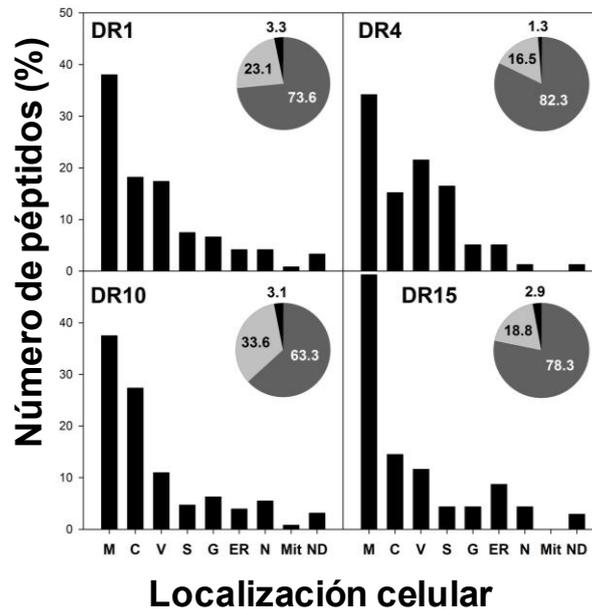


Figura 15: Localización celular de las principales proteínas parentales de los péptidos secuenciados de los diferentes alotipos de HLA-DR.

2.3 Afinidad teórica de los ligandos de HLA-DR

Para evaluar la afinidad teórica de los péptidos secuenciados de cada molécula de HLA-DR, se utilizó la plataforma informática *NetMHCIIpan-3.1 Server* (183) considerando los valores de IC50 en la interacción de cada péptido a cada molécula de HLA-DR. En el análisis se incluyeron además, ambos alelos del haplotipo DR15 (*DRB5*01:01* y *DRB1*15:01*). El *pool* peptídico asociado a DR1 presentó menos ligandos con baja afinidad (*weak binders*, WB) a sí mismo (7,86%) y a DR10 (21,83%) que a otras moléculas de HLA-DR. Un resultado equivalente se observó en los datos de afinidad teórica de DR10, el cual contenía menos WB a sí mismo (28,89%) y a DR1 (16,30%) que a otros alelos de DR (Tabla 4).

Estos resultados están en concordancia con los datos obtenidos en el análisis por MALDI-TOF/TOF, sugiriendo que el mayor grado de similitud estaba entre los repertorios peptídicos de DR1 y DR10 (168).

<i>Pool peptídico</i>	Afinidad	DRB1*01:01	DRB1*04:01	DRB1*10:01	DRB1*15:01	DRB5*01:01
DR1	SB	69,43	9,61	21,83	7,86	31,00
	IB	22,71	64,19	56,33	54,15	41,05
	WB	7,86	26,20	21,83	37,99	27,95
DR4	SB	23,16	5,61	5,26	0,00	2,46
	IB	57,19	72,98	58,95	28,77	38,95
	WB	19,65	21,40	35,79	71,23	58,60
DR10	SB	58,89	13,33	15,56	4,44	23,33
	IB	24,81	51,85	55,56	48,52	41,11
	WB	16,30	34,81	28,89	47,04	35,56
DR15	SB	37,08	5,62	14,04	6,18	43,26
	IB	52,25	53,93	47,75	57,87	37,08
	WB	10,67	40,45	38,20	35,96	19,66

Tabla 4. Afinidad teórica de los péptidos secuenciados en las diferentes moléculas de HLA-DR a los otros alotipos. Los resultados son mostrados como porcentajes de ligandos de elevada afinidad (SB: IC50 < 50nM), afinidad intermedia (IB: 50nM < IC50 < 500 nM) y baja afinidad (WB: > 500nM).

3. Identificación de los péptidos comunes entre los alelos de HLA-DR

Para evaluar el grado de solapamiento directo entre los repertorios peptídicos, se analizaron los péptidos comunes secuenciados de las diferentes moléculas de HLA-DR. Cuando se estudiaron los péptidos compartidos entre HLA-DR10 y cualquier otra molécula, se observó que 26 péptidos eran comunes entre DR10 y DR1; 6 péptidos entre DR10 y DR4 y ningún péptido, entre DR10 y DR15. HLA-DR1 compartía 1 péptido con DR4 y 6 con DR15. DR4 compartía únicamente 1 péptido con DR15. Adicionalmente, 2 péptidos fueron secuenciados de DR10, DR1 y DR4, y 2 péptidos de, DR1, DR4 y DR15. Finalmente, un péptido fue común a los cuatro alotipos (Tabla 5). Por lo tanto, DR10 compartía un total de 29 péptidos con DR1 (10,7% y 12,4% de los péptidos secuenciados, respectivamente), 9 péptidos con DR4 (3,3% y 3,2%) y 1 con DR15 (0,4% y 0,6%). Por su parte, HLA-DR1 presentó 6 péptidos comunes con DR4 (2,6% y 2,1%) y 9 con DR15 (3,9% y 5,1%). Finalmente, DR4 y DR15 compartían un total de 4 péptidos (1,4% y 2,2%).

SECUENCIA	PROTEÍNA	HOM-2 (DR1)	BEN (DR10)	WT51 (DR4)	MGAR (DR15)
LPSYEEALSLPSKTPE	<i>Lysosomal-associated transmembrane protein 5</i>	X	X	X	X
VTQEIVTERSVSRRQA	<i>Desmoglein 2</i>	X	X	X	
VVLPSYEEALSLPSKTPE	<i>Lysosomal-associated transmembrane protein 5</i>	X	X	X	
LPSYEEALSLPSKTP	<i>Lysosomal-associated transmembrane protein 5</i>	X		X	X
LPSYEEALSLPSKTPEG	<i>Lysosomal-associated transmembrane protein 5</i>	X		X	X
AEPNYHSLPSARTDEQ	<i>Regulator complex protein LAMTOR1</i>	X	X		
APSTYAHLSPAKTPPP	<i>Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor</i>	X	X		
APSTYAHLSPAKTPPPP	<i>Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor</i>	X	X		
APSTYAHLSPAKTPPPPA	<i>Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor</i>	X	X		
ASAF AFLAPARAIL	<i>Solute carrier family 23 member 2</i>	X	X		
DARSYTA AVANRAKGGG	<i>Myotubularin-related protein 4</i>	X	X		
DFYKILGVP RSASIK	<i>DnaJ homolog subfamily B member 11</i>	X	X		
IEKFEKEAAEMGKG	<i>Elongation factor 1a1</i>	X	X		
ISQEEELRAEQQL	<i>Low-affinity immunoglobulin epsilon Fc receptor</i>	X	X		
KGRLDYLSLKV KGLV	<i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>	X	X		
LPTSFGSLAPL VFP GP	<i>Ubiquitin protein ligase E3 RNF167</i>	X	X		
LPVILDIK GEMSRPG	<i>Proactivator polypeptide</i>	X	X		
NPKTFFILHDINSDG	<i>Nucleobindin 1</i>	X	X		
QQYLPLTPK VIG	<i>70-kd heat-shock protein 13</i>	X	X		
QQYLPLTPK VIGID	<i>70-kd heat-shock protein 13</i>	X	X		
QYLPLTPK VIGID	<i>70-kd heat-shock protein 13</i>	X	X		
RVEYHFLSPYVSP	<i>Transferrin receptor protein 1</i>	X	X		
RVEYHFLSPYVSPK	<i>Transferrin receptor protein 1</i>	X	X		
RVEYHFLSPYVSPKE	<i>Transferrin receptor protein 1</i>	X	X		
SPEDEYELLMPHRIS	<i>Germinal center-associated signaling and motility proein.</i>	X	X		
SPEDEYELLMPHRIS	<i>Germinal center-associated signaling and motility protein</i>	X	X		
SPERPFLAILG GAKVADK	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	X	X		
SPTNYHFLSSPKEA	<i>Beta-mannosidase</i>	X	X		
TPDPSKFFS QLSSEHG GD	<i>Interleukin-2 receptor subunit beta</i>	X	X		
TPDPSKFFS QLSSEHG DV	<i>Interleukin-2 receptor subunit beta</i>	X	X		
VDKVIQAQTAF SANPA	<i>Syntenin 1</i>	X	X		
DDTQFVRFDSDA ASPR	<i>HLA class I histocompatibility antigen, B-14 a-chain</i>		X	X	
VDDTQFVRFDSDA ASPR	<i>HLA class I histocompatibility antigen, B-14 a-chain</i>		X	X	
GNRYIESVLSSSG	<i>Ganglioside GM2 activator</i>		X	X	
TGNYRIESVLSSSG	<i>Ganglioside GM2 activator</i>		X	X	
TGNYRIESVLSSSGK	<i>Ganglioside GM2 activator</i>		X	X	
TTGNYRIESVLSSSGK	<i>Ganglioside GM2 activator</i>		X	X	
VTQEIVTERSVSRRQAQ	<i>Desmoglein2</i>	X		X	
EDPAFYMLK GKLQYE	<i>Interleukin-21 receptor</i>	X			X
PAFYMLK GKLQYE	<i>Interleukin-21 receptor</i>	X			X
SPNIVIALAGNKAD	<i>Ras-related protein Rab-5C</i>	X			X
SPNIVIALAGNKADL	<i>Ras-related protein Rab-5C</i>	X			X
SPSIVIALAGNKAD	<i>Ras-related protein Rab-5B</i>	X			X
SPSIVIALAGNKADL	<i>Ras-related protein Rab-5B</i>	X			X
DHNFVKAINAIQKS	<i>Dipeptidylpeptidase 1</i>			X	X

Tabla 5: Péptidos comunes asociados a las diferentes moléculas de HLA-DR. Los alotipos DR1 y DR10 son los que comparten el mayor número de péptidos.

Algunos de estos péptidos comunes formaban parte de un *nested set*. Al considerar cada familia peptídica como un único péptido, se determinó que 25 péptidos eran compartidos entre las diferentes moléculas de HLA-DR: 1 péptido fue común a los 4 alelos; 1 péptido a DR1, DR4 y DR10; 18 péptidos a DR1 y DR10; 2 péptidos a DR10 y DR4; 2 péptidos a DR1 y DR15; y 1 péptido a DR4 y DR15. Estos datos, confirman claramente que los repertorios peptídicos más similares son aquellos asociados a DR1 y a DR10.

4. Características de los péptidos comunes entre las moléculas de HLA-DR

Se evaluaron si los péptidos compartidos entre los diferentes alotipos presentaban algunas características específicas. Para ello se consideraron únicamente aquellos ligandos comunes a DR1 y DR10, ya que era el único conjunto con un número suficientemente elevado (18 de los 25 *nested sets* eran comunes a estos alelos). El análisis mostró un claro sesgo hacia Leu en la posición P4 del *core* de unión entre estos péptidos (Tabla 6). Así, catorce de los 18 péptidos comunes (77,8%), contenían Leu4, mientras que solo 2 de los 7 *cores* restantes compartidos (28,6%) presentaban Leu4. Estos péptidos contenían Ala, Glu, Asp y Leu (Tabla 6). El péptido SPNIVIALAGNKAD presentaba el *core* de unión teórico VIALAGNKA para DR1, DR4, DR10 y DR2b, mientras que IVIALAGNK fue el *core* teórico para DR2a. Aproximadamente, un 35% de los ligandos eluidos de DR1 y un 38% de los de DR10 contenían Leu4, mientras que solo un 4% y un 18% de los ligandos de DR4 y DR15 presentaban Leu4, respectivamente. Así, a pesar de que la leucina es aceptada en la posición P4 de todos los alotipos, está claramente favorecida en DR1 y DR10. Por otra parte, aunque el número de péptidos es bajo, la mayoría de los péptidos comunes que incluían DR4 como una de las moléculas de las cuales habían sido eluidos, contenían un residuo ácido en la posición P4 del *core*. Cerca de un 29% de los péptidos eluidos de DR4 tenían Asp o Glu en P4, en comparación con el 22% de DR1, 15% de DR10 y 12% de DR15.

Los péptidos compartidos por DR1 y DR10 presentaban preferencia por residuos básicos en la posición 8 del *core*. Así, el 61,2% de los péptidos comunes tenían un residuo básico en esta posición (27,8% Arg; 27,8% Lys y 5,6% His). Ninguno de los péptidos compartidos con otras moléculas presentaban esta característica a pesar de que todas las moléculas aceptaban residuos básicos en esta posición (DR1: 33,6%, DR4: 19,8%, DR10: 31,0% y DR15: 24,0%).

Core de unión peptídico	HOM-2	BEN	WT51	MGAR	P4	P8
YEEALS LPS	X		X	X	A	P
IVTERSVSS	X	X	X		E	S
YHSLPSART	X	X			L	R
Y AHLSPAKT	X	X			L	K
FAFLAPARA	X	X			L	R
YTA AVANRA	X	X			A	R
YKILGVPRS	X	X			L	R
FEKEAAEMG	X	X			E	M
LEELRAEQQ	X	X			L	Q
LDYLS LKV	X	X			L	K
FGSLAPAPL	X	X			L	P
LDI IKGEMS	X	X			I	M
FFILHDINS	X	X			L	N
YLPLPTPKV	X	X			L	K
YHFLSPYVS	X	X			L	V
YELLMPHRI	X	X			L	R
LAILGGAKV or FLAILGGAK ¹	X	X			L o I	K o A
YHFLSSPKE	X	X			L	K
FSQLSSEHG	X	X			L	H
IQAQTAFSA	X	X			Q	S
VRFDSDAAS	X	X			D	A
YRIESVLSS		X	X		E	S
FYMLK GK LQ		X	X	X	L	L
VIALAGNKA or IVIALAGNK ²	X			X	L o A	K o N
FVKAINAIQ or VKAINAIQK ³			X	X	A o I	I o Q

Tabla 6: Cores teóricos de los péptidos comunes asociados a las moléculas de HLA-DR. Los Cores se seleccionaron utilizando el *software NetMHCIIpan 3.1*. Se muestran los residuos de las posiciones P4 y P8. *Cores seleccionados ¹ FLAILGGAK a DRB1*10:01. ² IVIALAGNK a DRB5*01:01. ³ VKAINAIQK a DRB5*01:01.

5. Ensayo de unión de los péptidos compartidos a las moléculas de HLA-DR

Se sintetizaron los péptidos VTQEIVTERSVSSRQA, SPSIVIALAGNKADL, DHNFVKAINAIQKS y APSTY AHLSPAKTPPP, y se calculó su afinidad de unión a DRB1*01:01, DRB1*04:01, DRB1*10:01, DRB1*15:01 y DRB5*01:01, de forma experimental. Estos péptidos se secuenciaron en los repertorios peptídicos asociados de forma diferencial a los diferentes alotipos. Así, VTQEIVTERSVSSRQA fue secuenciado de DR1, DR4 y DR10; APSTY AHLSPAKTPPP de DR1 y DR10; SPSIVIALAGNKADL de DR1 y DR15; y DHNFVKAINAIQKS de DR4 y DR15. Los datos experimentales mostraron que todos los péptidos tenían alta afinidad por las moléculas de HLA-DR a partir de las cuáles

habían sido identificados, así como una baja afinidad a los alelos en los que no habían sido detectados. (Tabla 7)

PEPTIDO UNIDO A:	SECUENCIA	DRB1* 01:01	DRB1* 04:01	DRB1* 10:01	DRB1* 15:01	DRB5* 01:01
DR1 - DR4 - DR10	VTQEIVTERS V SSRQA	8,26	0,33	3,36	0,55	>50
DR1 - DR10	APST Y AHLSPAKT P PP	0,15	>50	0,09	>50	18,15
DR1 - DR15	SPSIVIALAG N KADL*	0,19	>50	>50	>50	<0,05
DR4 - DR15	DH N FVKAINAIQKS	> 50	0,04	1,75	<0,05	0,07
-	CONTROLES	0,07	0,16	0,93	0,05	0,1

Tabla 7: Ensayo unión experimental (*binding*) de los péptidos compartidos asociados a las moléculas de HLA-DR. Los residuos de interacción están resaltados en negrita. El *core* teórico para DRB5*01:01 utilizado fue IVIALAGNK, tal y como se definió por el *software NetMHCIIpan 3.1*.

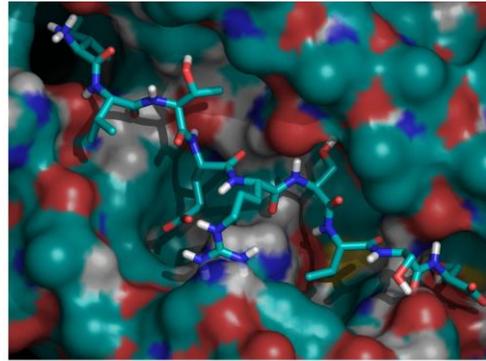
En el ensayo de *binding* unos pocos péptidos no detectados en un repertorio peptídico específico se unían experimentalmente a dicha molécula con relativa afinidad. Así, el péptido VTQEIVTERS**V**SSRQA podía unirse a DRB1*15:01 con una elevada afinidad (IC50=0,55 nM); el péptido DH**N**FVKAINAIQKS a DRB1*10:01 con un valor IC50 de 1,75 nM, aunque este valor era 25 veces menor que la afinidad a los alotipos de los cuáles había sido secuenciado (0,04 nM a DRB1*04:01, <0,05 nM a DRB1*15:01, y 0,07 nM a DRB5*01:01); y el péptido APST**Y**AHLSPAKT**P** unido a DRB5*01:01, con una afinidad mucho más baja al de las moléculas de donde se había secuenciado (18,15 nM a DRB5*01:01 frente a 0,15 nM a DRB1*01:01 y 0,09 nM a DRB1*10:01). Por lo tanto, los resultados del ensayo de *binding* fueron altamente consistentes con el origen de los péptidos secuenciados.

6. Modelización de la interacción Péptido-MHC

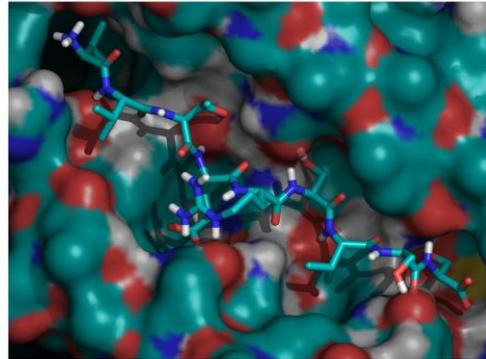
El péptido con secuencia VTQEIVTERS**V**SSRQA, derivado de desmogleína-2, un tipo de cadherina, era capaz de unirse a las tres moléculas de HLA-DR asociadas a RA, pero no a DR15. La interacción del *core* IVTERS**V**SS con las cuatro moléculas de HLA-DRB1 y HLA-DRB5*01:01 se estudió por modelización computarizada, revelando unos valores de -112 kJ/mol para DR1, -201 kJ/mol para DR4, -156 kJ/mol para DR10, -123 kJ/mol para DR2b y -95 kJ/mol para DR2a, por lo que sugiere una afinidad más baja para DR2a (Figura 16). Estos datos fueron compatibles con los obtenidos del ensayo de *binding*, los cuales confirmaban la alta afinidad de este péptido por DR1, DR4 y DR10 y DR2b pero no por DR2a (Tabla 7).

Figura 16: Modelización de el péptido IVTERSVS unido a -DR1, -DR4, -DR10, DR2b y DR2a. Los bindings scores son: -112 kj/mol, -201 kj/mol, -156 kj/mol, -123 kj/mol y -95 kj/mol, respectivamente

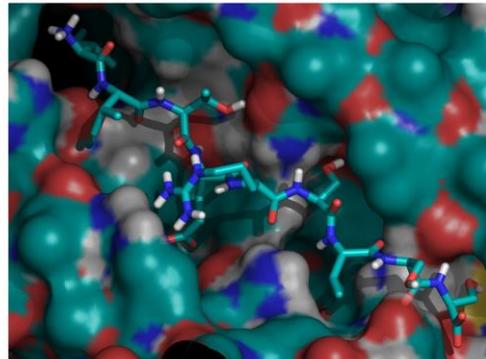
DR1



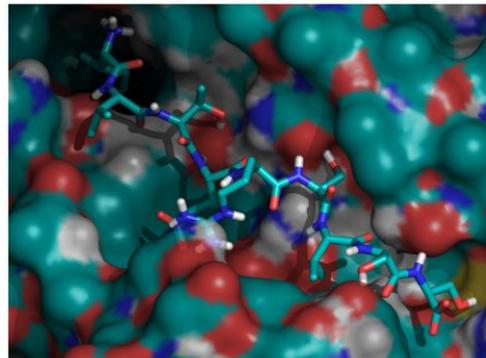
DR4



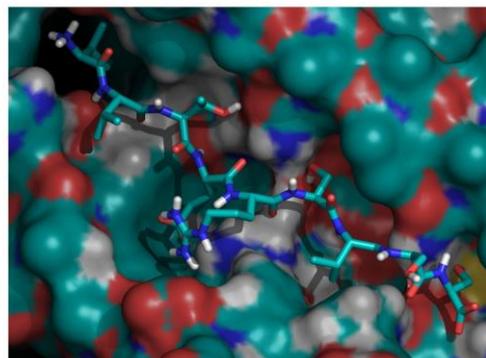
DR10



DR2b



DR2a



GRADO DE SIMILITUD ENTRE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS

ASOCIADOS A HLA-DRB1*15:01 y HLA-DRB5*01:01

CAPÍTULO II

1. Caracterización del repertorio peptídico asociado a DR2a y DR2b

Los complejos péptido-MHC (pMHCs) pertenecientes al haplotipo HLA-DR15 se purificaron a partir de células BLS que expresaban con los alelos *DRA1*01:01/DRB5*01:01* (BLS-DR2a) y *DRA1*01:01/DRB1*15:01* (BLS-DR2b), por cromatografía de inmunoafinidad. Los pMHCs se eluyeron en medio ácido y los péptidos se purificaron por ultrafiltración.

El *pool* peptídico se analizó por LC-MS/MS y las secuencias se identificaron utilizando la base de datos *Mascot*. En el análisis se consideraron los péptidos con una longitud igual o superior a 11 aminoácidos. Se identificaron un total de 177 ligandos peptídicos para DR2a y 560 para DR2b. Los péptidos derivados de algunas ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas fueron consideradas contaminantes debido a sus características de secuencia (secuencias ricas en Pro y Gly) y a que secuencias similares a éstas habían sido obtenidas, tanto en el peptidoma de clase I como en el de clase II, en trabajos previos del grupo (182). Así, finalmente se consideraron un total de 169 péptidos para DR2a (Anexo 2) y 555 péptidos para DR2b (Anexo 3). Es importante resaltar que la diferencia entre el número de péptidos eluidos de cada alotipo, se obtuvo de manera reiterada y reproducible en varios experimentos.

1.1 Distribución de tamaño

Los ligandos secuenciados de las células BLS-DR2a y BLS-DR2b presentaban una distribución gaussiana con un tamaño de acuerdo al esperado para los péptidos de HLA de clase II. Así, el número promedio de aminoácidos fue de 17,6 para DR2a y 15,9 para DR2b (Figure 17-A). Al considerar la distribución de tamaño a partir del peso molecular obtenido por MALDI-TOF MS, se obtuvo una relación masa carga (m/z) de 1.977,9 para DR2a y 1.761,0 m/z para DR2b (Figure 17-B).

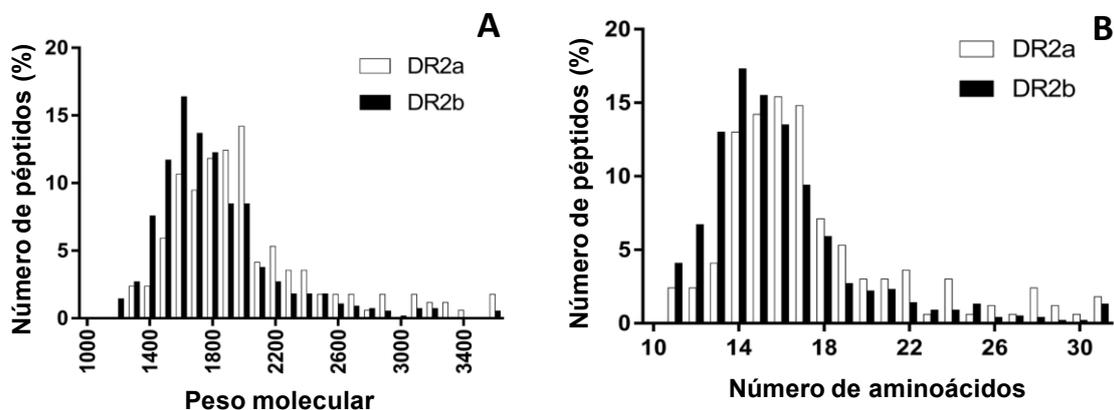


Figura 17: Distribución de tamaño de los péptidos secuenciados de DR2a y DR2b. (A) Promedio en función del peso molecular. **(B)** Promedio del número de aminoácidos.

1.2 Origen de los péptidos unidos a DR2a y DR2b

Se determinó la localización de las proteínas parentales, utilizando las bases de datos *UniProt* (<http://www.uniprot.org>) y *Human Protein Reference Database* (<http://www.hprd.org/>). Se consideró una proteína para cada *nested set* y cuando una proteína se encontraba en varios compartimientos, se seleccionó el más común.

La mayoría de los ligandos se generaron a partir de proteínas localizadas en los compartimientos vesiculares (membrana, proteínas secretadas, vesículas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi) aunque, algunos provenían de proteínas citosólicas, nucleares o mitocondriales (Figura 18-A). El origen de los péptidos en relación al compartimento celular fue similar en ambos alotipos. Así, tal y como se muestra en la figura 18-B, un 66,2% de los ligandos de DR2a y un 68,1% de los de DR2b provenían de proteínas de la ruta endocítica, mientras que el 32,4% en DR2a y el 31,4% en DR2b derivaron de proteínas localizadas en la ruta citosólica. Estos resultados son consistentes con los esperados para los ligandos de HLA de clase II.

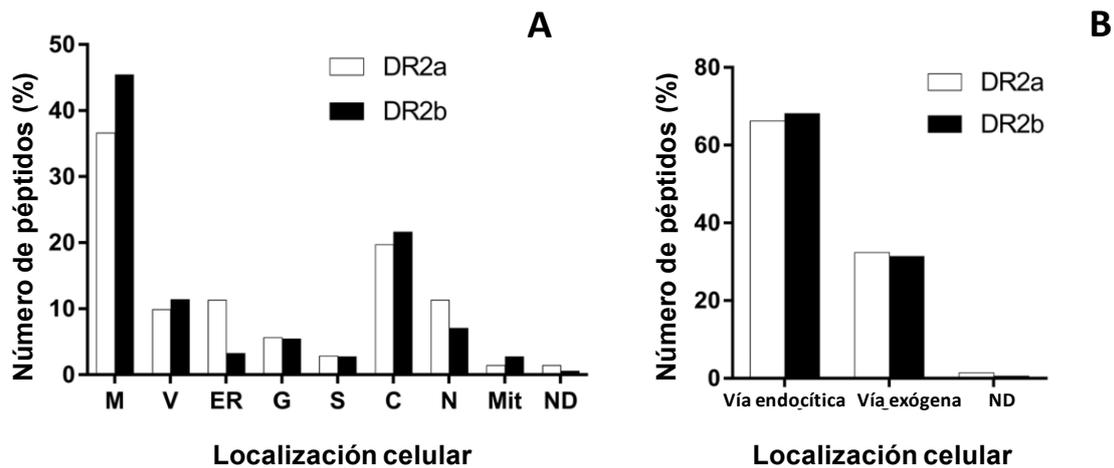


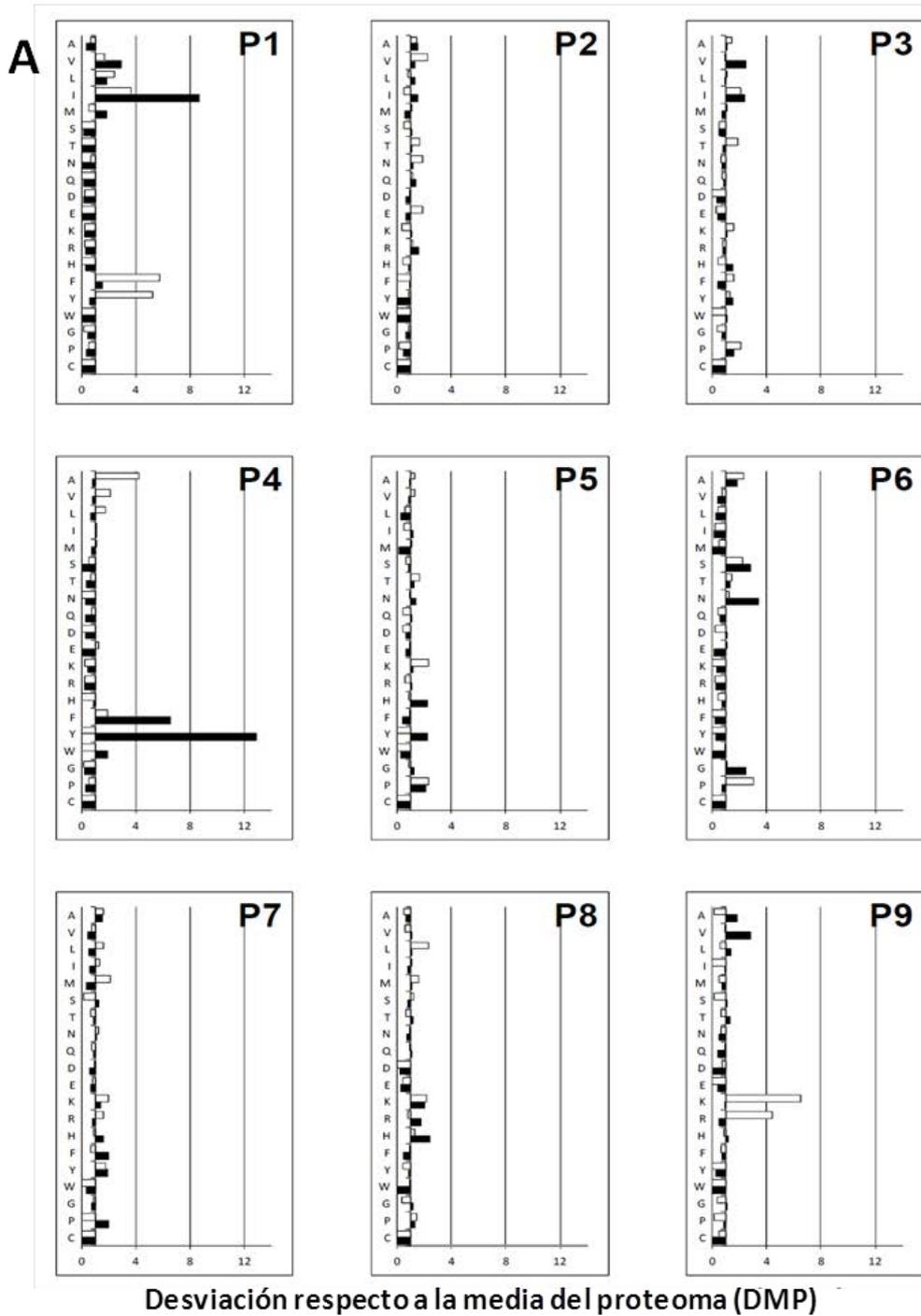
Figura 18: Localización de las proteínas parentales de los péptidos secuenciados de DR2a y DR2b. (A) Los valores se muestran como porcentaje de las proteínas para cada localización celular. M, membrana; V, compartimientos vesiculares; ER, retículo endoplásmico; G, golgi; S, proteínas secretadas; C, citosol; N, nucleos; Mit, mitocondria; ND, no determinado. **(B)** Se muestran los porcentajes de las proteínas en cada vía celular. **La vía endocítica** comprende: membrana, compartimientos vesiculares, retículo endoplásmico, golgi y proteínas secretadas. **La vía endógena** comprende: citosol, núcleo y mitocondria. ND: no determinado

2. Refinamiento del motivo de unión de HLA-DRB5*01:01 y HLA-DRB1*15:01

Los motivos de unión de DR2a y DR2b se describieron a principios de la década de los noventa (121,122). El motivo de anclaje de DR2a reveló un requerimiento de residuos hidrofóbicos (Phe, Tyr, Leu y Met) en P1; Gln, Val, Ile y Met en P4 y residuos con carga positiva (Arg y Lys) en P9. Por su parte, DR2b uniría principalmente residuos alifáticos (Leu, Val e Ile) en P1; residuos aromáticos (Phe, Tyr) e Ile en P4; mientras que la P7 estaría favorecida por la

presencia de residuos alifáticos (Ile, Leu, Val y Met) así como por Phe. La descripción de estos motivos de unión se basó en un bajo número de secuencias peptídicas identificadas a partir de péptidos eluidos de estos alotipos y en ensayos de unión hechos con algunos péptidos seleccionados, lo que hace probable que algunos residuos no hayan sido detectados como parte del motivo de unión. Por lo tanto, se analizaron los péptidos eluidos en este trabajo a partir de las líneas BLS-DR2a y BLS-DR2b con la intención de refinar las preferencias de unión de estas moléculas. Para ello, se usó la plataforma informática *NetMHCIIpan-3.1 Server* para asignar a cada ligando peptídico identificado un *core* teórico de interacción con DR2a o DR2b. Cuando había un *nested set* solo un péptido fue seleccionado. En total se consideraron 89 *cores* para DR2a y 270 para DR2b. Con estos datos se estableció la frecuencia de cada aminoácido en cada una de las posiciones del *core*. Se estableció la relación de dichas frecuencias con la abundancia relativa de cada aminoácido en el proteoma humano (DMP, *Deviation from mean in proteome*).

Como se muestra en la figura 19, el motivo de unión obtenido para cada alotipo fue similar al previamente descrito (<http://www.syfpeithi.de/>), aunque se observaron algunas diferencias significativas. En DR2a las principales posiciones fueron P1, P4, P6 y P9. En P1, Phe, Tyr e Ile, fueron los residuos preferidos. P4 mostró una clara preferencia por residuos pequeños, siendo significativo el aminoácido Ala, que no había sido descrito previamente. En P6 Pro, Ala y Ser estuvieron incrementados, mientras que Lys y Arg fueron los residuos más favorecidos en P9. En DR2b, P1, P4, P6 y P9 fueron también las principales posiciones de anclaje. En P1, Ile y Val fueron los aminoácidos más favorecidos. En P4 se seleccionaron preferencialmente residuos aromáticos (Phe y Tyr), mientras que en P6, los residuos polares Asn y Ser fueron los más favorecidos. Por último, en P9 el residuo que mostró un mayor incremento fue Val.



B

DR2a	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Residuo principal	F,Y,L			A		P			K,R
Residuo secundario	L,V	V,N,E,T	P,I,T,F,K	V,F,L	K,P,T	A,S	M,K,Y,A,L,R	L,K,M	

DR2a	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Residuo principal	I,V			Y,F		N,S			V
Residuo secundario	L,M,F	R,I	V,I,P,H	W	P,H,Y	G,A	P,F,Y,H,A	K,H,R	A

Figura 19: Motivo de unión refinado para DR2a y DR2b. (A) Uso de residuos entre los ligandos naturales de DR2a (blanco) y DR2b (negro). **(B)** Motivo de unión de DR2a y DR2b. Residuos con significación estadística después de la corrección de Bonferroni, se consideró un valor de DMP > 2.5.

3. Baja similitud entre los repertorios peptídicos asociados a DR2a y DR2b

#	Proteína	Péptido
1	<i>Cofilin-1</i>	ASGVAVSDGVIKVFNDMKVR
2	<i>Cofilin-1</i>	ASGVAVSDGVIKVFNDMKVRK
3	<i>Integrin beta</i>	NIQPIFAVTSRMVKTYE
4	<i>Invariant chain</i>	KPPKPVSKMRMATPLLMQA
5	<i>Invariant chain</i>	KPPKPVSKMRMATPLLMQALP
6	<i>Invariant chain</i>	LPKPPKPVSKM
7	<i>Invariant chain</i>	LPKPPKPVSKMRMATPLLMQAL
8	<i>Invariant chain</i>	LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALP
9	<i>Invariant chain</i>	LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPM
10	<i>Nuclease-sensitive element-binding protein 1</i>	PPAENSSAPEAEQGGAE
11	<i>Protein CutA</i>	PALLPVASRLLLLP
12	<i>SWI/SNF complex subunit SMARCC2</i>	PGTPLPPDPTAPSPGTVTPVPPPQ
13	<i>SWI/SNF complex subunit SMARCC3</i>	PTAPSPGTVTPVPPPQ

Tabla 8: Péptidos comunes secuenciados de DR2a y DR2b.

Dado que los motivos de unión de DR2a y DR2b mostraban algunas características comunes, se consideró analizar el grado de solapamiento entre los repertorios peptídicos. Entre los ligandos identificados en este trabajo, únicamente 13 péptidos fueron comunes a ambos alotipos (7,7% para DR2a y un 2,3% para DR2b) (Tabla 8). Es importante destacar que en ambos alotipos, pero mucho más consistentemente en DR2a, se habían secuenciado un elevado número de péptidos derivados de la cadena invariante. Concretamente, 6 de los péptidos comunes (46,2%) provenían de CD74. Si estos péptidos no se incluyen en el análisis, sólo 7 péptidos (4,1% para DR2a y 1,3% de DR2b) eran comunes entre ambas moléculas.

En el trabajo descrito en el primer capítulo de esta tesis, se secuenciaron unos 200 ligandos peptídicos a partir de la LCL con expresión homocigota de DR15 (MGAR) (167). En estos datos, un total de 22 péptidos agrupados en 15 *nested sets*, fueron secuenciados también de DR2a (8 péptidos, 6 *nested sets*) o DR2b (14 péptidos, 9 *nested sets*) (tabla 9). Ningún péptido fue encontrado en los tres repertorios, lo que demuestra que los repertorios peptídicos asociados a DR2a y DR2b presentan un bajo grado de solapamiento.

4. Contribución de HLA-DRB5*01:01 y HLA-DRB1*15:01 al repertorio de HLA-DR15

Para analizar la contribución de los péptidos eluidos de DR2a y DR2b al peptidoma global presentado por DR15, se analizaron las mezclas peptídicas obtenidas de las líneas celulares BLS-DR2a y BLS-DR2b junto a las de la línea B-LCL MGAR (167). En primer lugar, se analizaron los peptidomas asociados a DR2a y DR2b para determinar la afinidad teórica por ambas moléculas. Mediante el software *NetMHCIIpan-3.1* se identificó el *core* de interacción

entre el ligando y la molécula de HLA correspondiente (DR2a y DR2b). Asimismo, el programa asigna una afinidad teórica de cada péptido con el *core* elegido. Se compararon las afinidades teóricas de la unión de cada péptido a DR2a o DR2b para determinar si la afinidad teórica correspondía con la molécula de la cuál se habían secuenciado los ligandos peptídicos. Con esta metodología, se obtuvo que un 88,8% de los péptidos secuenciados de las BLS-DR2a presentaban mayor afinidad a DR2a que a DR2b (Anexo 4). En contraste, solo el 43,4% de los ligandos naturales de DR2b mostraban mayor afinidad teórica por la molécula de la cuál habían sido eluidos que por DR2a (Anexo 5). En un intento de solventar esta aparente contradicción, se realizó una segunda aproximación usando el motivo obtenido en este trabajo a partir de los propios *pools* peptídicos secuenciados. Se generó un nuevo *score* para todos los números posibles de cada péptido, sumando los valores de DMPs obtenidos para cada residuo en cada posición y se seleccionó el *core* con el *score* más alto. Usando esta aproximación, basada directamente en los péptidos secuenciados de DR2a y DR2b, se encontró que el 85,8% de los péptidos secuenciados de DR2a tenían mayor afinidad por DR2a que por DR2b (Anexo 6). Más relevante resultó el hecho de que el porcentaje de péptidos con mayor afinidad por DR2b, entre los ligandos secuenciados de este alotipo, se incrementó de un 43,4% a un 86,1% (Anexo 7). Estos datos indican que la información empírica obtenida de la caracterización de los peptidomas asociados a las moléculas de HLA-DR, es complementaria a la provista por las herramientas informáticas como el *NetMHCIIpan-3.1 Server*, mejorando así la predicción de las afinidades de unión y contribuyendo a definir motivos de anclaje más precisos.

Esta misma aproximación, se utilizó sobre la mezcla peptídica derivada de la LCL MGAR. Siguiendo esta metodología se estimó que el 51,1% de los péptidos presentados por DR15 son presentados por DR2a y el 48,9% restante por DR2b (Anexo 8). Estos datos sugieren, que la contribución de ambas moléculas al repertorio global de DR15 es similar, al menos en términos cuantitativos.

6. Ensayo de unión a las moléculas de HLA-DR

Para conocer mejor las características moleculares que rigen la interacción de DR15 con sus ligandos peptídicos, se consideraron los 8 péptidos asociados a DR2a y 14 péptidos asociados a DR2b, descritos previamente como ligandos de DR15 en la línea MGAR (167). Se calculó la afinidad teórica con la plataforma informática *NetMHCIIpan-3.1*. Todas los péptidos probados mostraron una elevada afinidad ($IC_{50} < 1000$ nM) por el alotipo del cual fueron identificados, excepto el péptido TPKIQVYSRHP, derivado de la β 2-microglobulina, el cuál probablemente no sea un verdadero ligando, sino un contaminante. Cabe destacar además, que todos los péptidos presentaban una mayor afinidad para el alotipo a partir del cual habían sido secuenciados, con la excepción de los *nested sets* LEEFGRFASFEAQG(A) y el péptido TPKIQVYSRHP, identificados de la línea BLS-DR2b, que mostraban mejor afinidad teórica por

DR2a (Tabla 9). Cuando la afinidad teórica se calculó a partir de la matriz generada con los datos en el presente trabajo, todas las secuencias presentaban una mayor afinidad por la molécula de HLA-DR de la cual habían sido eluidas, excepto el péptido NPPDIVVQPGHIR, secuenciado de DR2a, que mostró un *score* superior para DR2b (Tabla 9).

A fin de obtener una valoración experimental, se sintetizaron los péptidos ELEELRAEQQLKSQDL, QTKEFQVLKSLGKLAMG y SQAEFKAAEEVRHL, secuenciados de BLS-DR2a y de la LCL-MGAR, así como los péptidos LEEFGRFASFEAQQ, LPSEKAIFLVDKTVPQS y QKKEIHLYQTFVVQ secuenciados de DR2b y de la LCL-MGAR. Su afinidad a DR2a y DR2b se calculó experimentalmente en un ensayo de unión. Los tres péptidos secuenciados de DR2a mostraron una elevada afinidad por DR2a (ELEELRAEQQLKSQDL, IC₅₀: 2,4 µM; QTKEFQVLKSLGKLAMG IC₅₀: 0,08 µM y SQAEFKAAEEVRHL IC₅₀: 5,8 µM) y una afinidad no detectable en el ensayo para DR2b (Figura 20-A). El péptido LPSEKAIFLVDKTVPQS, secuenciado de DR2b, se unió a DR2b con una IC₅₀ de 14,5 µM mientras que su unión fue indetectable a DR2a. Sorprendentemente, los otros dos péptidos, secuenciados de las BLS-DR2b, no se unieron ni a DR2a ni a DR2b. (Figura 20-B). La falta de unión experimental de estos dos péptidos (*cores*, FGRFASFEA y IHLYQTFVV) a DR2b fue inesperada y es difícil de explicar, puesto que cumplen con los motivos de unión para este alotipo. La ausencia de unión de este último fue especialmente sorprendente, ya que los residuos de unión son muy similares a los del péptido LPSEKAIFLVDKTVPQS (P1: Ile e Ile; P4: Tyr y Phe; P6: Thr y Asp; and P9: Val y Val), que se une eficientemente.

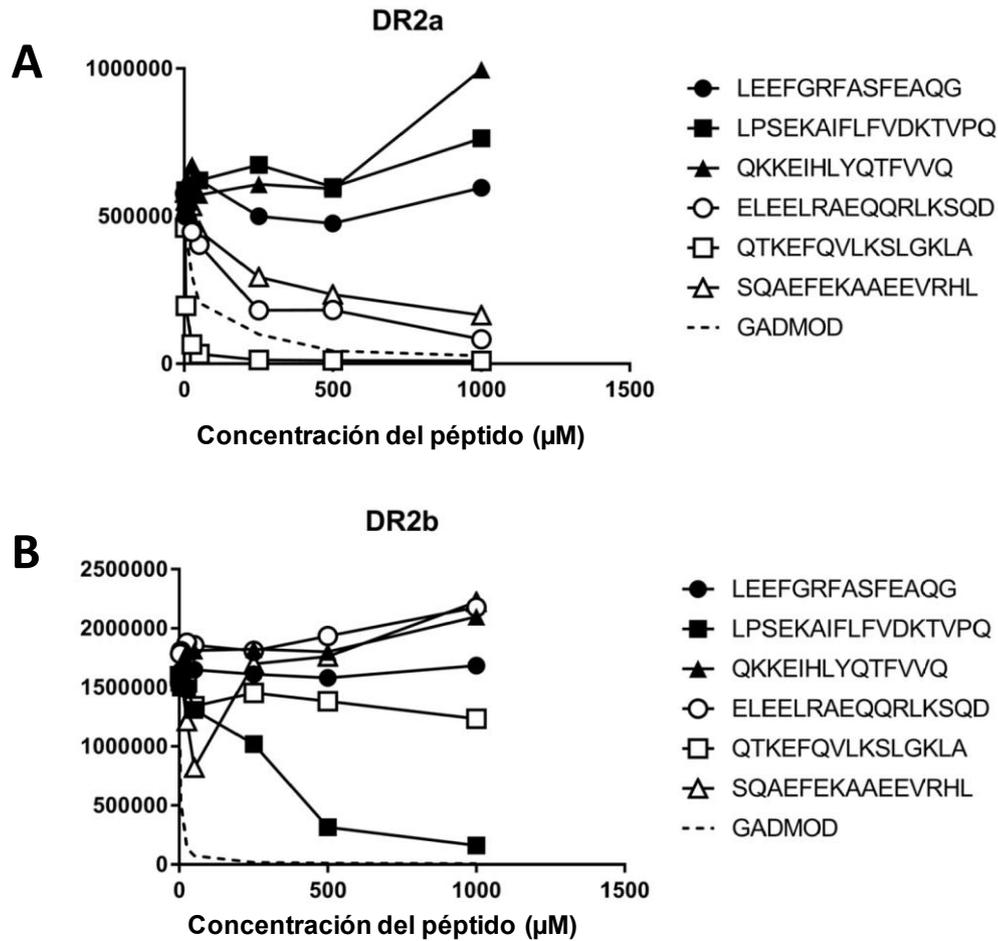


Figura 20: Ensayo de unión experimental de los péptidos secuenciados de MGAR y DR2a o DR2b. Concentraciones de

5. Modelización de la interacción péptido-MHC

La interacción pMHC de diferentes *cores* putativos, obtenidos del servidor *NetMHCIIpan-3.1* junto a algunos *cores* adicionales, se estudió por modelización computarizada con ambas moléculas de DR2a y DR2b. La tabla 9 muestra el *core* más favorecido energéticamente para cada péptido unido a la correspondiente molécula, medido por la variación de la energía libre de Gibbs (kJ/mol) al formarse el complejo. Energéticamente, todos los ligandos peptídicos secuenciados de DR2b deberían interaccionar mejor con DR2b que con DR2a. La modelización con los péptidos secuenciados de DR2a indicaron que 4 de los 6 péptidos interaccionarían mejor con DR2a que con DR2b. Los otros dos péptidos se unirían energéticamente mejor a DR2b que a DR2a.

PEPTIDE	SEQUENCED FROM			NetMHCIIpan 3.1				Matrix of this paper				BINDING (IC50 (nM))		MODELING (ΔG , kJ/mol)		
	DR2a	DR2b	MGAR	CORE DR2a	IC 50 (nM) DR2a	CORE DR2b	IC 50 (nM) DR2b	Core DR2a	Score DR2a	Core DR2b	Score DR2b	DR2a	DR2b	CORE*	DR2a	DR2b
LEEFGRFASFEAQG		X	X	FGRFASFEA	275.33	FGRFASFEA	500.20	FGRFASFEA	13.411	FGRFASFEA	16.571	>50 uM	>50 uM	FGRFASFEA	-41	-55
LEEFGRFASFEAQGA		X	X													
ADDGKIVIFQSKPEIQ		X	X	IVIFQSKPE	564.48	IVIFQSKPE	213.78	IVIFQSKPE	15.037	IVIFQSKPE	24.163	ND	ND	IVIFQSKPE	-58	-150
APGAGSLALFPGIRLE		X	X	LALFPGIRL	148.05	LALFPGIRL	112.11	SLALFPGIR	13.674	LALFPGIRL	18.801	ND	ND	LALFPGIRL	-50	-97
LPSEKAIFLFVDKTVPQ		X	X	FLFVDKTVP	1108.20	IFLFVDKTV	362.52	KAIFLFVDK	12.652	IFLFVDKTV	22.154	-	14.5 uM	IFLFVDKTV	-52	-86
LPSEKAIFLFVDKTVPQS		X	X													
LVRVVVPYQGPSSDY		X	X	VRVVVPYQG	1365.31	VRVVVPYQG	460.01	VRVVVPYQG	13.268	VVPYQGPSS	22.408	ND	ND	VRVVVPYQG	-35	-100
														VVPYQGPSS	-80	-114
NEQKLNRYPASSLVVVR		X	X	LNRYPASSL	181.61	LNRYPASSL	150.87	RYPASSLVV	13.245	LNRYPASSL	20.546	ND	ND	LNRYPASSL	-82	-94
QKKEIHLYQTFVVQ		X	X					IHLYQTFVV	9.231							
QKKEIHLYQTFVVQL		X	X	IHLYQTFVV	577.16	IHLYQTFVV	86.23		9.231	IHLYQTFVV	26.846	>50 uM	>50 uM	IHLYQTFVV	-42	-102
QKKEIHLYQTFVVQLQDPR		X	X						10.604							
QKKEIHLYQTFVVQLQDPRP		X	X						10.604							
QPGVLIQVYEGGERAM		X	X	IQVYEGERA	660.48	IQVYEGERA	487.63	LIQVYEGER	12.470	IQVYEGERA	27.822	ND	ND	IQVYEGERA	-61	-123
TPKIQVYSRHP		X	X	PKIQVYSRH	1423.97	PKIQVYSRH	3407.84	TPKIQVYSR	11.077	KIQVYSRHP	13.167	ND	ND	PKIQVYSRH	-77	-100
ADIQTERAYQKQP	X		X	IQTERAYQK	190.72	IQTERAYQK	3028.33	IQTERAYQK	19.227	IQTERAYQK	17.163	ND	ND	IQTERAYQK	-58	-117
ELEELRAEQQLKSQD	X		X	LRAEQQLK	140.55	LRAEQQLK	2413.08	LRAEQQLK	17.190	LRAEQQLK	9.480	2.4 uM	>50 uM	LRAEQQLK	-116	-107
ELEELRAEQQLKSQDL	X		X								10.511					
NPPDIVVQPGHIR	X		X	IVVQPGHIR	131.27	IVVQPGHIR	1690.71	IVVQPGHIR	16.488	IVVQPGHIR	19.347	ND	ND	IVVQPGHIR	-47	-76
QTKEFQVLKSLGKLA	X		X	FQVLKSLGK	5.89	FQVLKSLGK	62.71	FQVLKSLGK	21.571	FQVLKSLGK	13.238	0.08 uM	>50 uM	FQVLKSLGK	-88	-56
QTKEFQVLKSLGKLAMG	X		X													
SQAEFEKAAEEVRHL	X		X	FEKAAEEVR	493.62	FEKAAEEVR	5881.78	FEKAAEEVR	20.382	QAEFEKAAE	10.940	5.8 uM	>50 uM	FEKAAEEVR	-112	-82
VAIVQAVSAHRHR	X		X	IVQAVSAHR	4.87	IVQAVSAHR	35.95	IVQAVSAHR	20.445	IVQAVSAHR	18.858	ND	ND	IVQAVSAHR	-154	-138

Tabla 9: : Péptidos comunes de MGAR y BLS-DR2a y BLS-DR2b

En la figura 21 se muestran como ejemplos dos *cores* FEKAAEEVR e IVIFQSKPE, obtenidos de dos péptidos identificados en las células BLS-DR2a y -DR2b, respectivamente, interaccionando con ambas moléculas. El resto de complejos pMHC son mostrados en el anexo 9. Los modelos mostrados en la figura 21, indican que en DR2b la mutación G86V reduce significativamente el tamaño del *pocket* P1, disminuyendo estéricamente la afinidad por residuos aromáticos. En P4, la mutación R71A incrementa de forma significativa el tamaño de la cavidad, favoreciendo la unión de residuos aromáticos grandes, como Phe y Tyr. Finalmente, en P9 las mutaciones D30Y, D37S (y en menor medida D11P) disminuye la afinidad del *pocket* por residuos con carga positiva, mientras que al mismo tiempo la mutación Q9W disminuye también el tamaño de la cavidad, permitiendo explicar la preferencia de este *pocket* por residuos pequeños apolares (Val y Ala). El péptido IVIFQSKPE mostró una elevada afinidad a DR2b (score de -150 kJ/mol) en comparación a DR2a (-58 kJ/mol). Esto es consistente, de acuerdo al análisis previo, con la presencia de Ile en P1 (más común en DR2b), Phe en P4 (buena afinidad para DR2b, demasiado grande para DR2a) y Glu en P9 (carga no favorecida para DR2a, y aceptable en DR2b). Por otro lado, el péptido FEKAAEEVR muestra mayor afinidad para DR2a (-112 kJ/mol) con respecto a DR2b (-82 kJ/mol). Esto está también en concordancia con la presencia de los residuos, Phe, Ala y Arg, en P1, P4 y P9, respectivamente.

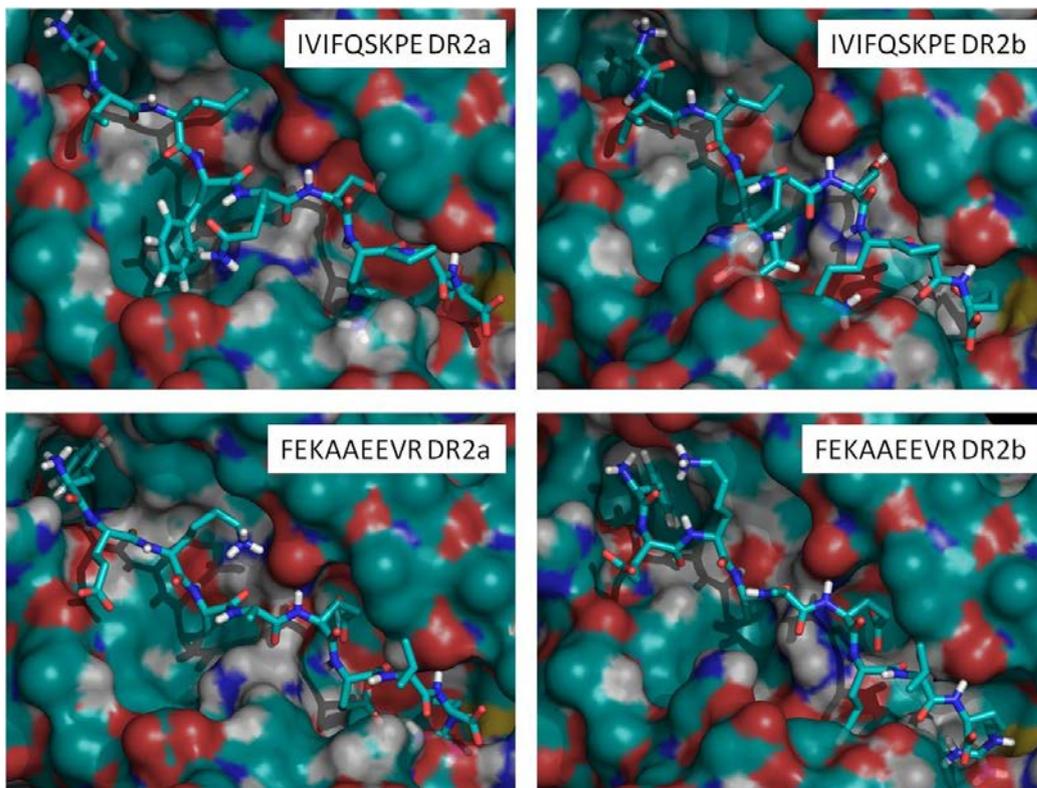


Figura 21: Estructura modelizada de los péptidos IVIFQSKPE (eluido de DR2b) y FEKAAEEVR (eluido de DR2a) unido con DR2a y DR2b. El *binding score* IVIFQSKPE fue de -58 kJ/mol para DR2a y -150 kJ/mol para DR2b. FEKAAEEVR fue de -112 kJ/mol para DR2a y -82 kJ/mol para DR2b.

**CARACTERIZACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL PROTEASOMA INTERMEDIO β 1-
 β 2- β 5i. ANÁLISIS DE SU CONTRIBUCIÓN SOBRE EL REPERTORIO PEPTÍDICO
ASOCIADO A HLA-I**

CAPÍTULO III

1. Generación de un modelo celular para analizar diferentes tipos de proteasoma

1.1 Selección del modelo celular

El estudio de la especificidad de diferentes tipos de proteasoma y su papel sobre el repertorio peptídico requiere utilizar una célula que, idealmente, exprese un único tipo de proteasoma que pueda ser usado para reemplazar sus subunidades catalíticas y que sea fácilmente transfectable. Para seleccionar una línea celular adecuada, se analizó por WB la expresión de las subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 1i$, $\beta 2$, $\beta 2i$, $\beta 5$ y $\beta 5i$ en diferentes tipos celulares. Concretamente, se seleccionaron las líneas HT93, HT93-CIITA, C1R, HEK-293, HEK-293F y SK-Hep-1. Como se muestra en la figura 22, las subunidades constitutivas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$, se expresaban en todos los tipos celulares. La expresión de las subunidades catalíticas del IP ($\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$), se detectó con diferentes niveles de expresión en todas las líneas evaluadas excepto en las líneas celulares HEK-293 y HEK-293F (Figura 22). Por tanto, se seleccionaron las líneas celulares HEK-293 y HEK-293F como línea celular para la expresión de las diferentes subunidades, ya que expresaban únicamente el proteasoma constitutivo.

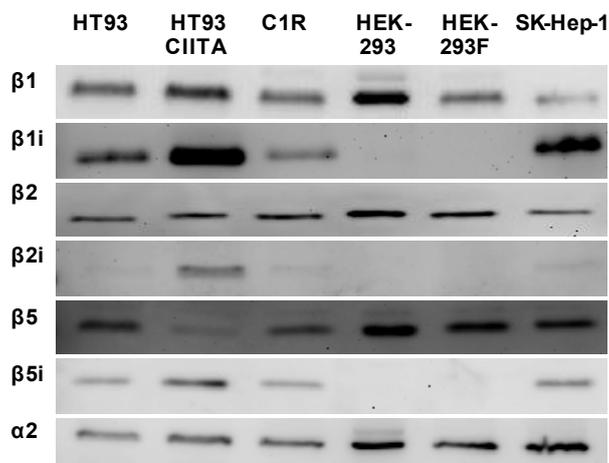


Figura 22: Expresión de las subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 1i$, $\beta 2$, $\beta 2i$, $\beta 5$ y $\beta 5i$ en diferentes líneas celulares. Se realizó un extracto proteico de las líneas celulares HT93, HT93-CIITA, HMy2.C1R, HEK-293, HEK-293F y SK-Hep-1. Alrededor de 20 μg de proteína total, de cada una de las muestras, se analizaron por western blot usando anticuerpos específicos contra las subunidades catalíticas del CP o IP. Como control de carga se usó el mAb MCP21, específico de la subunidad $\alpha 2$.

1.2 Generación de los transfectantes con expresión estable de las subunidades catalíticas $\beta 5$ y $\beta 5i$

Se transfectaron las construcciones $\beta 5$ -pcDNA 3.1 Strep-tag II, $\beta 5i$ -pcDNA 3.1 Strep-tag II y el plásmido sin inserto (control *mock*) en las líneas HEK-293 y HEK-293F. La expresión

de las proteínas quiméricas se comprobó por WB, utilizando el anticuerpo primario anti-Strep-tag II®. Se detectaron las bandas correspondientes a las proteínas precursora y procesada de las subunidades $\beta 5$ y $\beta 5i$, en los transfectantes de las células HEK-293F (figura 23). En el transfectante que expresa $\beta 5i$ no se detectó la subunidad $\beta 5$. Cuando se realizó el WB con el anticuerpo específico de $\beta 5$, se detectó la correspondiente subunidad en las líneas sin transfectar y en el transfectante *mock*. La proteína quimérica $\beta 5$ -StreptagII se detectó con un peso molecular aparente mayor que la proteína nativa (Figura 23), debido a la adición de la cola Streptag II.

Resultados similares se obtuvieron en los transfectantes estables generados en la línea HEK-293 (resultados no mostrados).

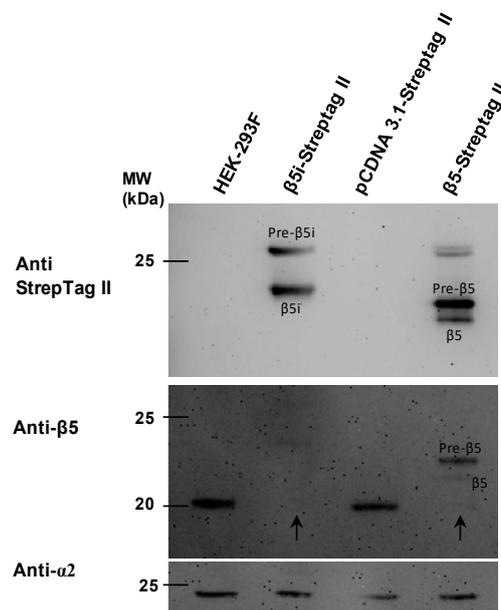


Figura 23: Expresión de las subunidades $\beta 5$ y $\beta 5i$ en los transfectantes estables. Aproximadamente 20 μ g de los extractos proteicos de HEK-293F, HEK-293F_ $\beta 5$ -Strep-tag II, HEK-293F_ $\beta 5i$ -Strep-tag II y HEK-293F_ Strep-tag II se analizaron por western blot con los anticuerpos primarios anti Strep-tag II y anti- $\beta 5$. El control de carga se realizó con el mAb MCP21.

2. Generación de un nuevo protocolo de purificación del proteasoma 20S

Los protocolos utilizados habitualmente para la purificación del proteasoma 20S (170,184), son tediosos y requieren en muchos casos de un equipamiento especializado. Nos planteamos desarrollar un nuevo método más rápido y sencillo. Para la puesta a punto, se utilizó el transfectante estable de $\beta 5i$. El proteasoma 20S se purificó mediante cromatografía de afinidad, a partir de la cola de StreptagII fusionada al extremo C-terminal de la proteína (figura 24). La pureza del proteasoma 20S se analizó mediante SDS-PAGE. El proteasoma 20S se enriqueció de forma considerable en un solo paso de purificación, aunque se detectaron algunas bandas contaminantes (figura 24).

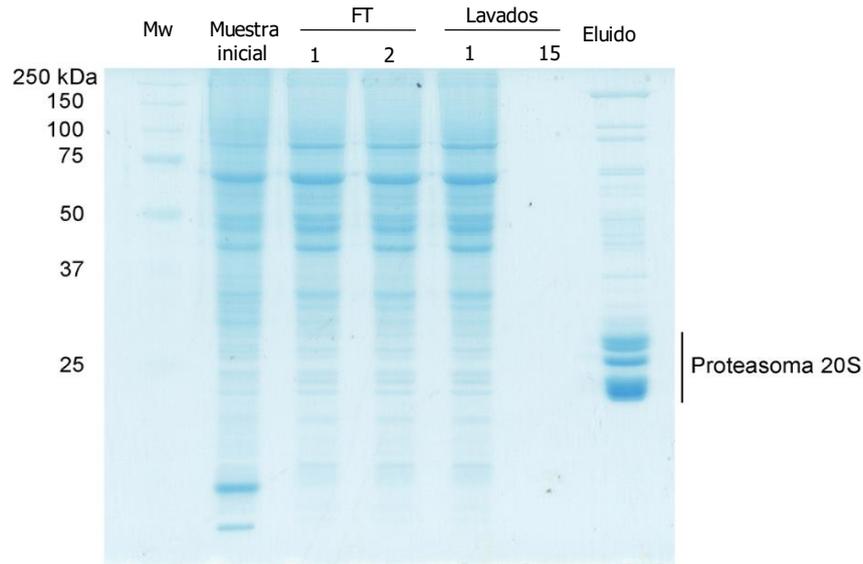


Figura 24: Purificación parcial del proteasoma 20S mediante cromatografía de afinidad. Alrededor de 10 μ l de cada muestra se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12%. Muestra inicial: extracto proteico celular total, FT: proteína no retenida en la columna, Lavados: primer y último lavado de la columna, Eluido: proteína eluida.

Para eliminar las proteínas inespecíficas presentes en el eluido, se realizó un paso adicional de purificación que consistió en un gradiente de glicerol. Como se observa en la figura 25, se obtuvo un proteasoma de elevada pureza, sin contaminantes apreciables por SDS-PAGE y tinción con *coomassie blue*. Por tanto, se ha desarrollado un protocolo de purificación en dos pasos, que permite obtener un proteasoma 20S altamente puro.



Figura 25: Obtención de un proteasoma de alta pureza. La muestra obtenida por cromatografía de afinidad se cargó sobre un gradiente de glicerol al 10-30 %. Las fracciones recuperadas se analizaron por gel SDS-PAGE al 12%. **A)** Diez últimas fracciones del gradiente. **B)** 20 μ g de proteína se precipitaron con acetona y se cargaron sobre un gel SDS-PAGE al 12%. **1:** Muestra original sin precipitar, **2:** Muestra original precipitada, **3:** Fracción recuperada del gradiente de glicerol, precipitada.

Siguiendo el protocolo descrito, se purificaron los proteasomas 20S a partir de los transfectantes estables de $\beta 5$ y $\beta 5i$ realizados sobre la línea celular HEK-293F, en adelante 20S- $\beta 5$ y 20S- $\beta 5i$ (figura 26). Para evaluar que se obtenía un proteasoma 20S funcional, se digirió un péptido sintético correspondiente a un fragmento de 27 residuos de la subunidad $\beta 6$ del proteasoma (Péptido C5) (Tabla 10). Como control de la digestión, se usó un proteasoma 20S purificado a partir de la línea C1R previamente purificado con un protocolo "convencional" (20S-C1R). Dicho proteasoma 20S había sido previamente usado para digerir precisamente el péptido C5 (184).

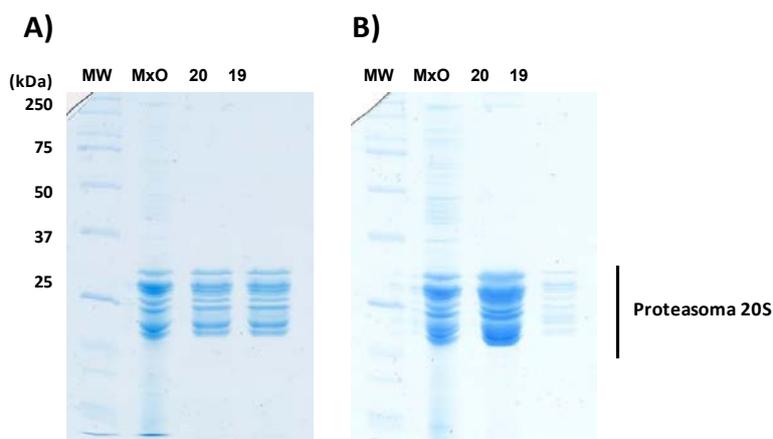


Figura 26: Proteasomas 20S $\beta 5$ y $\beta 5i$ purificados. Gel de SDS-PAGE al 12% de acrilamida, tinción de proteínas con *coomassie blue*. **A)** Proteasoma 20S- $\beta 5$ **B)** Proteasoma 20S- $\beta 5i$.

Los productos de la digestión se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Como se observa en la figura 27, los espectros obtenidos de los productos de las digestiones con los proteasomas 20S-C1R y 20S- $\beta 5$ fueron similares entre sí, mientras que diferían del espectro obtenido con el proteasoma intermedio (PI) 20S- $\beta 5i$. Específicamente, las masas 1.310,66 m/z y 1.397,69 m/z eran generadas únicamente por los primeros, mientras que no se generaban de forma apreciable por el proteasoma 20S- $\beta 5i$. Como se ha indicado en materiales y métodos, C1R expresa cantidades mínimas de IP (170), con lo cual se puede considerar que su actividad es básicamente la de un proteasoma constitutivo.

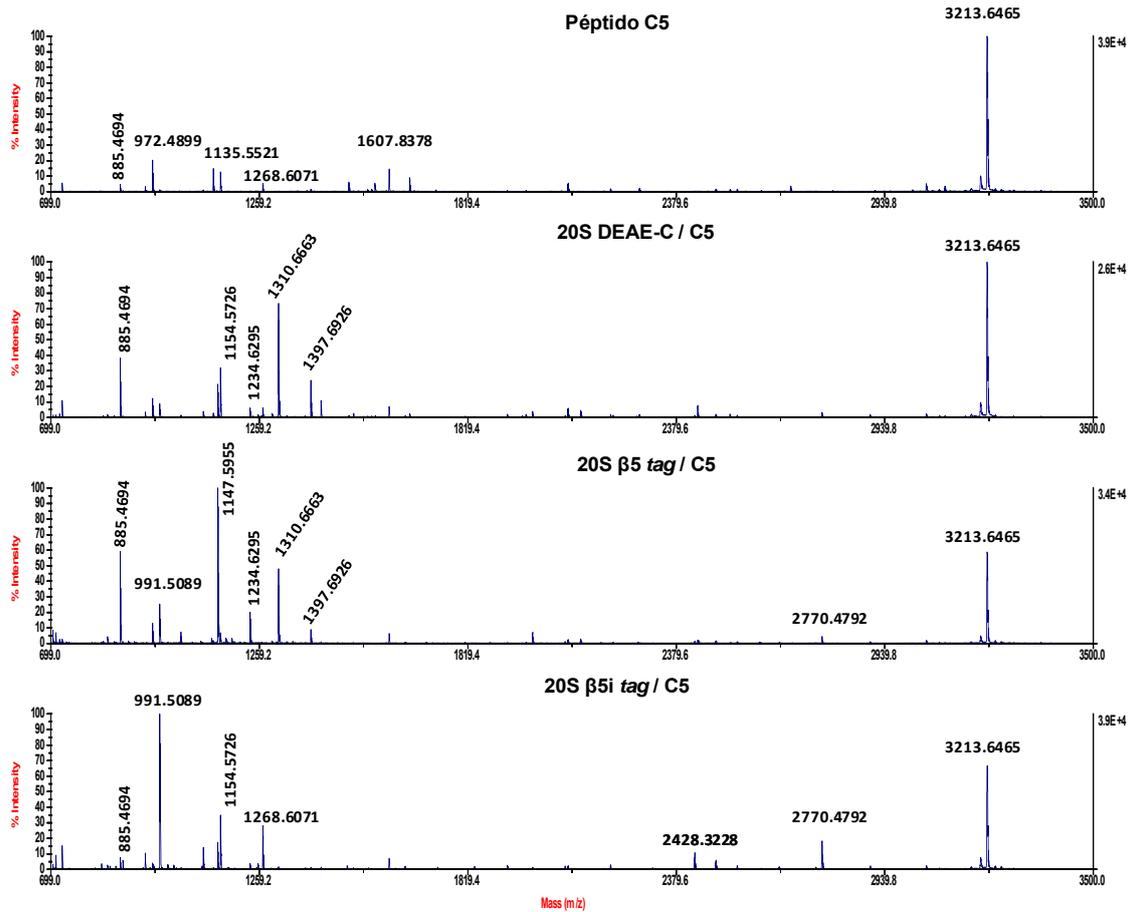


Figura 27: Análisis de la actividad de los proteasomas 20S. El péptido C5 se digirió con diferentes proteasomas 20S purificados a una relación enzima:sustrato 1:10 (p/p). Los productos de la digestión se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. De arriba a abajo: espectros de MALDI TOF del péptido sin digerir, digerido con el proteasoma 20S-C1R, 20S-β5 y 20S-β5i.

Estos datos confirman que mediante la purificación por cromatografía de afinidad y gradiente de glicerol se pueden obtener proteasomas 20S funcionales y que la fusión del tag no interfiere en la actividad del complejo.

3. Análisis de la especificidad del proteasoma intermedio 20S β5i

3.1.- Repertorio peptídico asociado a las moléculas de HLA de clase I en células que expresan el proteasoma constitutivo o el proteasoma intermedio β5i

Con el objeto de determinar el papel del PI β5i en la composición de los repertorios peptídicos presentados a las células T CD8⁺ se purificaron por inmunofinidad los pMHC-I y se eluyeron los ligandos peptídicos asociados de tres líneas celulares: 1) células HEK-293F, 2) células HEK-293F-β5, 3) células HEK-293F-β5i. Se realizaron dos experimentos (excepto HEK-293F-β5, en que se perdió una muestra). Las mezclas peptídicas se

analizaron por LC-MS/MS. Los espectros se identificaron mediante el motor de búsqueda Mascot. Se consideró una FDR del 5% y péptidos con una longitud de entre 8 y 12 aminoácidos.

Hasta el momento se han obtenido 302 secuencias en total (Anexo 10): 85 comunes en células que expresan $\beta 5$ y $\beta 5i$, 135 identificadas exclusivamente en células $\beta 5$ y 82 en células $\beta 5i$. Este número es aún insuficiente para deducir si hay algún sesgo en la secuencia de los péptidos asociados a HLA-I. Sin embargo, algunos de los péptidos se secuenciaron de forma reiterada en la línea parental y en el transfectante $\beta 5$, sin encontrarse en el transfectante que expresa la subunidad $\beta 5i$. Otros péptidos se secuenciaron únicamente en el transfectante $\beta 5i$. Algunos péptidos se han secuenciado repetidamente en ambos transfectantes de $\beta 5$ y $\beta 5i$, así como en las células HEK-293F sin transfectar (datos no mostrados). Este aspecto nos ha permitido seleccionar algunos de estos ligandos para evaluar su generación *in vitro* con los proteasomas 20S purificados.

3.2 Digestiones *in vivo* de precursores peptídicos de ligandos de HLA-I

Con el objeto de caracterizar la especificidad del proteasoma 20S- $\beta 5i$ en comparación con el CP se sintetizaron y digirieron *in vitro* con los proteasomas 20S purificados 6 precursores peptídicos, de 24 aminoácidos cada uno, derivados de ligandos de HLA-I secuenciados en este trabajo. Concretamente, se analizaron: 1) un péptido secuenciado en ambos transfectantes, 2) dos péptidos procedentes exclusivamente de las células que expresan el proteasoma constitutivo y 3) dos péptidos derivados de las células que expresaban el PI $\beta 5i$ (aunque sólo se pudo analizar uno de ellos, por problemas en la ionización del otro péptido). Asimismo, se digirió un precursor de 27 residuos de dos ligandos de HLA-B27, secuenciados de la línea C1R-B27:05 y reconocidos por un clon aloreactivo descritos previamente (184). Finalmente, se digirió también la neurogranina, péptido de 16 aminoácidos que, aunque no contiene ningún ligando conocido presentado por HLA-I, es un polipéptido rico en residuos polares y básicos que consideramos adecuado para el estudio de la especificidad del proteasoma 20S. La tabla 10 muestra los péptidos analizados.

Procedencia	Proteína	Péptido precursor
Ligandos de HLA-I	H3BTH3 (H3BTH3_HUMAN). <i>60S ribosomal protein L13.</i>	MAPSRNGMVLKPHFHKDWQRRVAT ¹
	Q9NQS7 (INCE_HUMAN). <i>Inner centromere protein</i>	DQADGPREPPQSARRKRSYKQAVS ²
	E9PLB0 (E9PLB0_HUMAN). <i>RNA-binding protein 4B.</i>	LHHYKLHGVNINVEASKNKSAST ³
	Q06055 (AT5G2_HUMAN). <i>ATP synthase F(0) complex subunit C2, mitochondrial.</i>	VSTPSLVKSTSQLLSRPLSAVVLK ⁴
	C5	LSTILYSRRFFPYVYVNIIGGLDEEGK
Proteína específica	Neurogranin	AAKIQASFRGHMARKK

Tabla 10: Precursores peptídicos utilizados en los ensayos de digestión *in vitro* por los proteasomas 20S β 5(CP) y 20S β 5i (PI β 5i). Ligandos de HLA-I, derivados de los repertorios peptídicos purificados de los diferentes transfectantes: ¹Purificado tanto en β 5 como β 5i. ^{2,3}Purificados únicamente de β 5. ⁴Purificado exclusivamente en el transfectante β 5i. C5: precursor de dos ligandos conocidos de HLA-B27. Proteína específica: Neurogranina: Polipéptido rico en residuos polares y básicos

La digestión se realizó en tres experimentos a intervalos de tiempo de 1, 4, 8 y 24 horas. Los fragmentos generados en la digestión se analizaron por MALDI TOF y las secuencias de los fragmentos generados se obtuvieron con el programa informático ANCHOR (180). Estos experimentos permitieron evaluar tanto la especificidad de los dos tipos de proteasoma como la generación *in vitro* de ligandos de HLA-I.

3.2.1 Caracterización de la especificidad del proteasoma 20S constitutivo y del proteasoma intermedio β 5i

Los péptidos resultantes de las digestiones de los precursores y del péptido de 16 aminoácidos neurogranina se analizaron de forma exhaustiva para definir la especificidad del 20S-CP y del 20S-PI β 5i. Para ello, se cuantificó la abundancia relativa de todos los fragmentos peptídicos identificados y se sumaron las abundancias de todos los péptidos generados tras la ruptura de cada enlace. Este análisis se realizó para cada péptido y para cada tiempo de digestión. Los datos completos se muestran de manera gráfica en el Anexo 11. El proteasoma no hidrolizó de la misma manera los enlaces tras determinados residuos en los diferentes péptidos lo que indica que la especificidad de los proteasomas 20S purificados es dependiente de secuencia. A pesar de la complejidad del análisis y del número limitado de precursores digeridos se trató de caracterizar las diferencias en la especificidad entre el CP y el PI β 5i. Para ello, se sumaron las abundancias relativas de

todos los fragmentos peptídicos generados y se sumaron las abundancias de los péptidos que se habían generado durante la ruptura de los enlaces tras un residuo concreto. Esto se hizo para los 20 aminoácidos. Con esta metodología, nuestros datos indicaron que respecto al corte tras residuos alifáticos, ambos proteasomas hidrolizaron eficientemente los enlaces tras Leu, Val y Ala, siendo el proteasoma constitutivo el que tuvo mayor actividad (Figura 28).

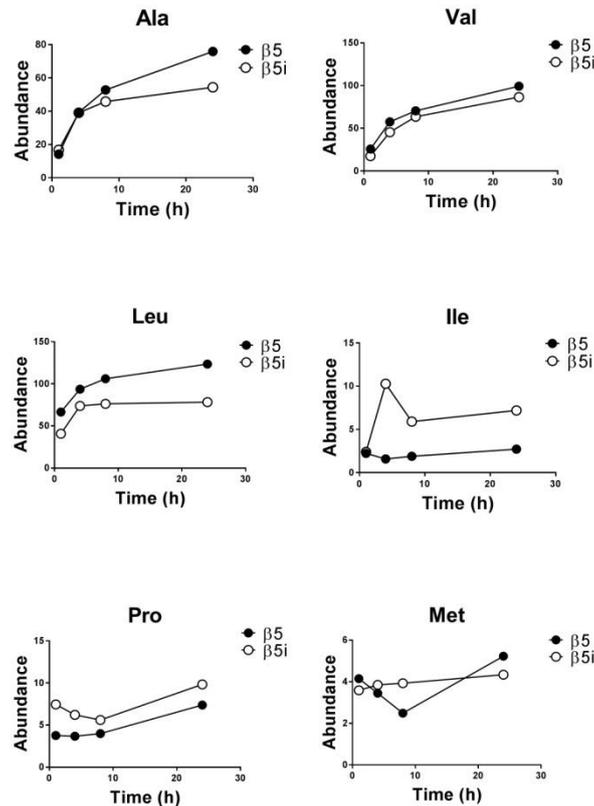


Figura 28: Actividad hidrolítica tras residuos alifáticos del proteasoma constitutivo y proteasoma intermedio $\beta 5i$. Los precursores peptídicos se digirieron *in vitro* con los proteasomas 20S purificados y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Los datos reflejan la suma de las abundancias relativas de los fragmentos peptídicos generados durante la hidrólisis de los enlaces tras los aminoácidos indicados en todos los péptidos. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

La abundancia de los péptidos generados en la hidrólisis de los enlaces tras Ile fue baja, pero el proteasoma intermedio $\beta 5i$ parecía ser más eficiente. La figura 29 muestra el análisis del corte tras residuos aromáticos. En el conjunto de los péptidos digeridos, el aminoácido tras el cual la hidrólisis fue más activa fue Tyr, siendo más activo el CP que el

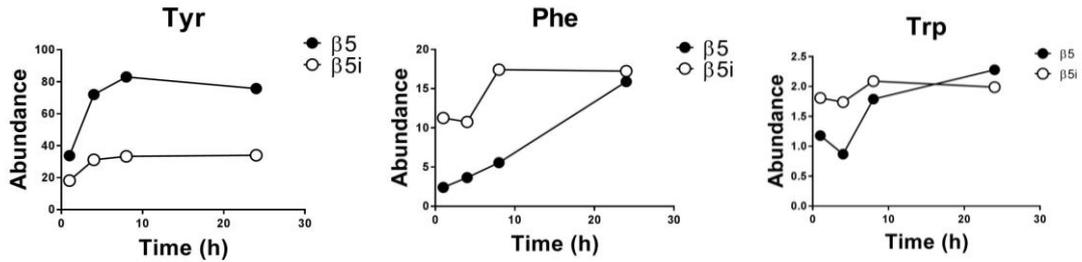


Figura 29: Actividad hidrolítica tras residuos aromáticos del proteasoma constitutivo y proteasoma intermedio β5i. Los precursores peptídicos se digirieron *in vitro* con los proteasomas 20S purificados y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Los datos reflejan la suma de las abundancias relativas de los fragmentos peptídicos generados durante la hidrólisis de los enlaces tras los aminoácidos indicados en todos los péptidos. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

PI β5i. Los enlaces tras Phe contribuyeron menos a la abundancia de los péptidos generados, siendo más eficiente en el conjunto de los precursores analizados el PI β5i, aunque los datos son escasos para concluirlo de forma definitiva. La hidrólisis tras residuos ácidos fue similar, con una actividad ligeramente superior del proteasoma constitutivo (Figura 30).

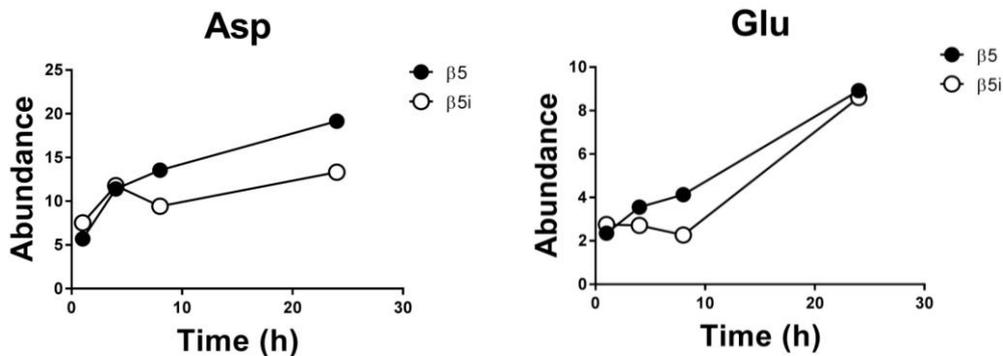


Figura 30: Actividad hidrolítica tras residuos ácidos del proteasoma constitutivo y proteasoma intermedio β5i. Los precursores peptídicos se digirieron *in vitro* con los proteasomas 20S purificados y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Los datos reflejan la suma de las abundancias relativas de los fragmentos peptídicos generados durante la hidrólisis de los enlaces tras los aminoácidos indicados en todos los péptidos. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

Aunque no se ha descrito una actividad tras residuos polares con péptidos fluorogénicos, nuestros datos con péptidos precursores de ligandos de HLA-I mostraron que el proteasoma es altamente eficiente en el corte tras varios residuos polares (Figura 31).

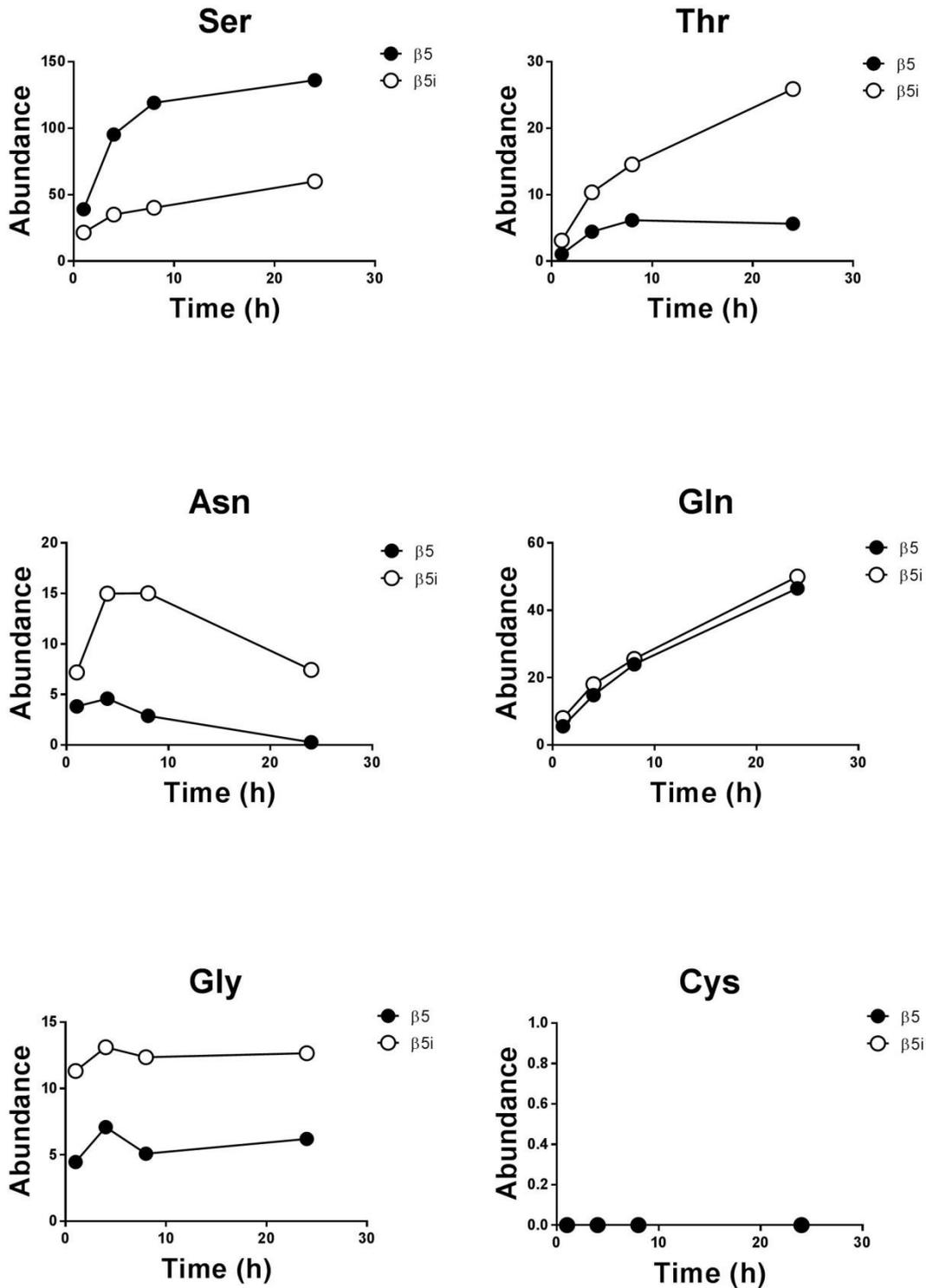


Figura 31: Actividad hidrolítica tras residuos polares del proteasoma constitutivo y proteasoma intermedio $\beta 5i$. Los precursores peptídicos se digirieron *in vitro* con los proteasomas 20S purificados y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Los datos reflejan la suma de las abundancias relativas de los fragmentos peptídicos generados durante la hidrólisis de los enlaces tras los aminoácidos indicados en todos los péptidos. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

El corte tras Ser fue más eficiente con el CP, mientras que los enlaces tras Thr y Asn fueron mejor hidrolizados con el PI $\beta 5i$. El corte tras residuos básicos fue de forma consistente más eficiente con el PI $\beta 5i$ que con el CP (Figura 32).

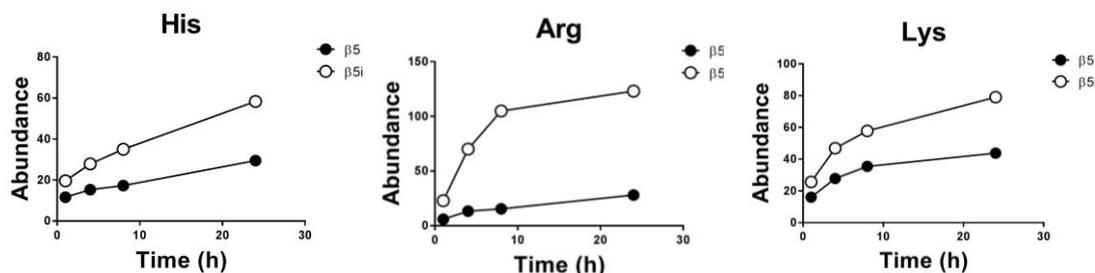


Figura 32: Actividad hidrolítica tras residuos básicos del proteasoma constitutivo y proteasoma intermedio $\beta 5i$. Los precursores peptídicos se digirieron *in vitro* con los proteasomas 20S purificados y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Los datos reflejan la suma de las abundancias relativas de los fragmentos peptídicos generados durante la hidrólisis de los enlaces tras los aminoácidos indicados en todos los péptidos. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

Cuando se agruparon los péptidos generados por grupo de aminoácidos con características físico-químicas similares se vio que, aunque con diferencias en aminoácidos específicos, el CP era más eficiente en el corte tras residuos alifáticos (Figura 33A), aromáticos (Figura 33B), polares (Figura 33C) y, ácidos (Figura 33D), aunque la generación de péptidos tras Asp o Glu es demasiado baja para ser concluyente. Sin embargo, el PI $\beta 5i$ es claramente más eficiente en el corte tras residuos básicos (Figura 13E). Por tanto, aunque la especificidad de los proteasomas analizados (medida como corte tras un residuo concreto) es dependiente de la secuencia del péptido precursor y la presencia de los diferentes residuos en los péptidos analizados es variable, se puede concluir que el PI $\beta 5i$ presentó una actividad *trypsin-like* más elevada que el proteasoma constitutivo. La actividad *chymotrypsin-like* fue predominante en el proteasoma constitutivo. La actividad *caspase-like* fue similar, aunque ligeramente disminuida en el PI $\beta 5i$. Finalmente, algunos enlaces tras residuos polares fueron diana primordial del proteasoma 20S, siendo la especificidad de corte tras Ser superior en el CP y tras Thr y Asn en el PI $\beta 5i$.

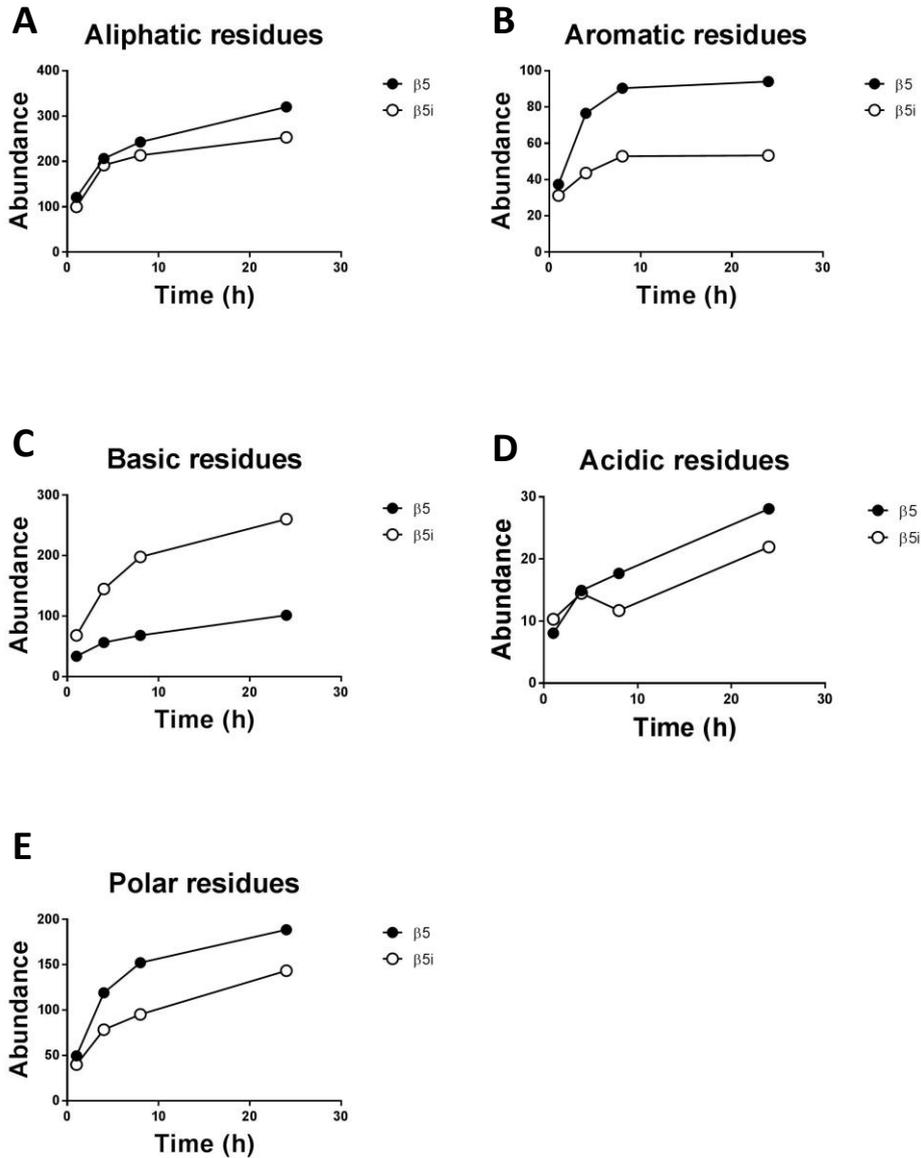


Figura 33: Cuantificación de las diferentes actividades del proteasoma constitutivo y proteasoma intermedio $\beta 5i$. Los precursores peptídicos se digirieron *in vitro* con los proteasomas 20S purificados y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Los datos reflejan la suma de las abundancias relativas de los fragmentos peptídicos generados durante la hidrólisis de los enlaces tras los grupos de aminoácidos indicados en todos los péptidos. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

b) Formación de ligandos de HLA-I por el proteasoma 20S

La digestión del precursor de 24 aminoácidos del péptido APSRNGMVL procedente de la 60S ribosomal protein L13, asignado como ligando de HLA-B*27:02 en base a su secuencia, permitió analizar su generación *in vitro*. Este péptido se secuenció en todas las muestras analizadas independientemente del proteasoma expresado. El péptido se generó de forma muy poco abundante en la digestión (alrededor del 0,1%). Esto es debido a que el péptido precursor se sintetizó con la Met inicial, que es eliminada *in vivo* por la metionina

aminopeptidasa. Cuando se analizó el péptido con la metionina inicial, éste se generó de forma abundante (alrededor de un 10%) con ambos proteasomas (Figura 34). Se analizaron los cortes que generaban los extremos amino y carboxilo del ligando. En la figura 34 se puede apreciar que el corte en el enlace Met-Ala que generaría el extremo

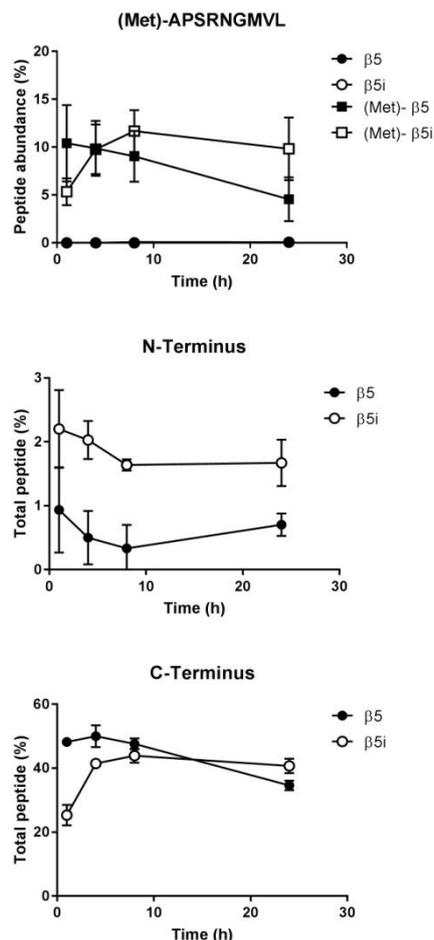


Figura 34: Generación *in vitro* del ligando APSRNGMVL. El precursor peptídico se digirió *in vitro* con el proteasoma 20S purificado y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Panel superior: Se indica la abundancia relativa de los péptidos APSRNGMVL y (Met)-APSRNGMVL. Panel intermedio: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo N-terminal del ligando. Panel inferior: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo C-terminal del ligando. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

amino no fue muy abundante, como era de esperar, por la cercanía al extremo N-terminal. Además, como se mencionó antes, este enlace se hidroliza *in vivo* por la metionina amino peptidasa. La hidrólisis del enlace Leu-Lys, que genera el extremo carboxilo del ligando se produce de forma prominente en la digestión con ambos proteasomas (Figura 34). La generación del ligando se produce antes con el proteasoma constitutivo, ya que a 1h de digestión se detectó la máxima cantidad de ligando, mientras que con el proteasoma $\beta 5i$ se alcanza el máximo a las 8h.

Se analizaron dos ligandos secuenciados exclusivamente en los repertorios procedentes de las células que expresaban el CP. El primer péptido, GPREPPQSA, procedía de la *Inner centromere protein* y el segundo, KLHGVNINV, de la *RNA-binding protein 4B*. El péptido GPREPPQSA se asignó por su secuencia como ligando de HLA-B*07:02 y el péptido KLHGVNINV de HLA-A*02:01. Ambos ligandos se secuenciaron a partir de las células que expresaban el CP y no se encontraron en las células con el PI $\beta 5i$. En el experimento *in vitro*, el péptido GPREPPQSA se generó mejor con el proteasoma constitutivo (Figura 35). Asimismo, los enlaces que generan los extremos amino y carboxilo del ligando se hidrolizaron mejor con el proteasoma constitutivo que con el proteasoma $\beta 5i$ (Figuras 35).

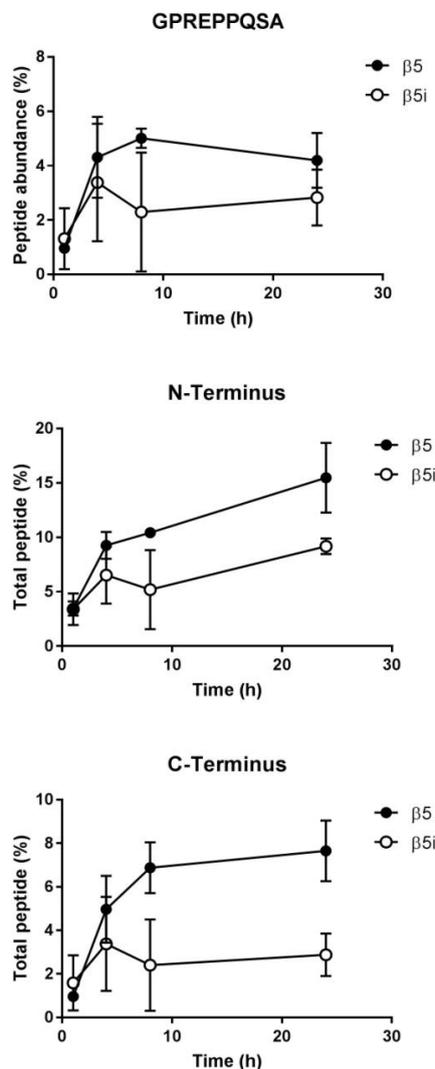


Figura 35: Generación *in vitro* del ligando GPREPPQSA. El precursor peptídico se digirió *in vitro* con el proteasoma 20S purificado y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Panel superior: Se indica la abundancia relativa del péptido GPREPPQSA. Panel intermedio: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo N-terminal del ligando. Panel inferior: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo C-terminal del ligando. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

En cuanto al péptido KLHGVNINV, no se generó a niveles detectables en las digestiones *in vitro* (Figura 36A). El análisis de la ruptura de los enlaces necesarios para la generación de los extremos del péptido indicaron que el enlace entre los aminoácidos Tyr-Lys, que generaba el extremo N-terminal, se hidrolizó de forma claramente superior con el proteasoma estándar (Figura 36B), mientras que la especificidad de corte en el enlace Val-Glu, que generaba el extremo C-terminal del péptido, fue muy baja en ambos proteasomas (Figura 36C).

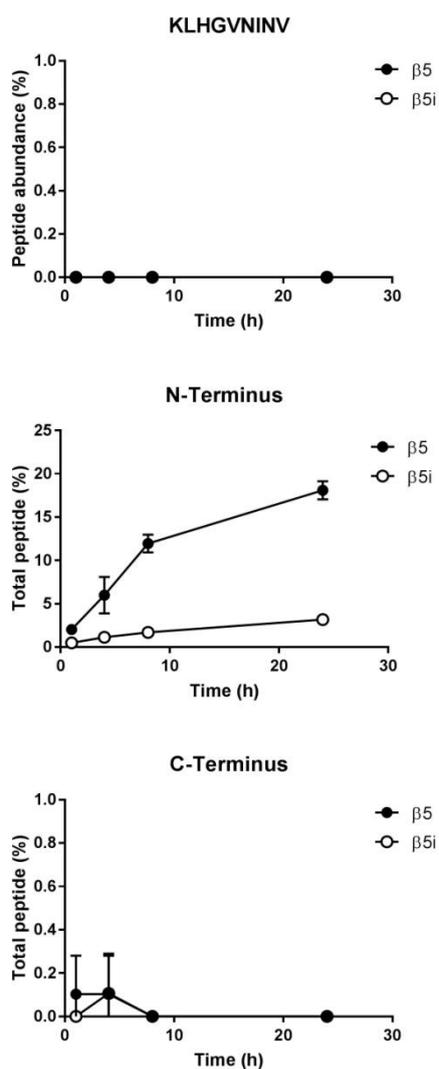


Figura 36: Generación *in vitro* del ligando KLHGVNINV. El precursor peptídico se digirió *in vitro* con el proteasoma 20S purificado y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Panel superior: Se indica la abundancia relativa del péptido KLHGVNINV. Panel intermedio: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo N-terminal del ligando. Panel inferior: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo C-terminal del ligando. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

Se sintetizaron dos ligandos secuenciados de los repertorios peptídicos de las células que expresaban el PI $\beta 5i$. Un péptido no se pudo analizar, ya que no se detectó ninguna señal en el espectrómetro de masas. El péptido que se analizó, TPSLVKSTSQL, procedente de la *ATP synthase F(0) complex subunit C2 mitochondrial*, se asignó como ligando de HLA-B*07:02. El ligando no se generó de forma detectable a partir del precursor peptídico *in vitro* con ninguno de los proteasomas (Figura 37). El análisis de ruptura de los enlaces que generaban los extremos amino y carboxilo terminal del ligando, indicaron que la ruptura del enlace Ser-Thr que genera el extremo amino, es producido a niveles ligeramente superiores con el proteasoma intermedio $\beta 5i$ (Figura 37), mientras que el enlace Leu-Leu, que genera el extremo carboxilo terminal, lo hace de forma más eficiente con el proteasoma constitutivo (Figura 37).

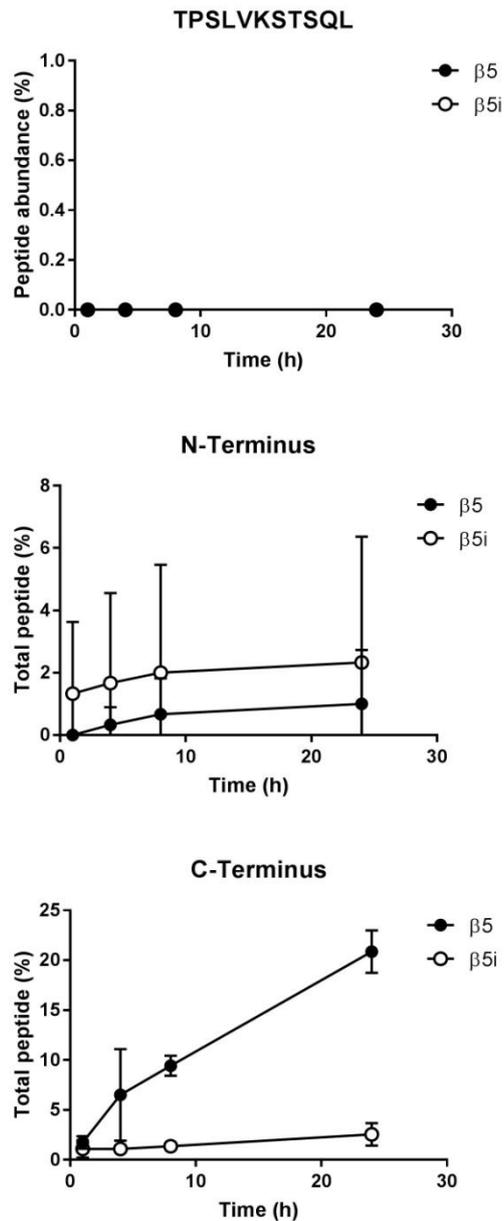


Figura 37: Generación *in vitro* del ligando TPSLVKSTSQR. El precursor peptídico se digirió *in vitro* con el proteasoma 20S purificado y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. Panel superior: Se indica la abundancia relativa del péptido TPSLVKSTSQR. Panel intermedio: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo N-terminal del ligando. Panel inferior: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo C-terminal del ligando. Los resultados son la media de tres experimentos individuales.

Por otra parte, el precursor peptídico de dos ligandos presentados por la molécula HLA-B27 se digirió de la misma forma. Los ligandos son el nonámero RRFFPRRVY y el octámero RRFFPRRV, que pierde el residuo C-terminal. Ambos péptidos provienen de la

proteína *Proteasome subunit beta type-1* (subunidad $\beta 6$ del proteasoma 20S). Se observó que el CP generaba directamente ambos ligandos de forma mucho más eficiente que el PI $\beta 5i$ (Figuras 38A y 38B). Los enlaces que generaban el extremo amino de ambos péptidos (Ser-Thr) y los extremos carboxilo (Val-Tyr para el octámero y Tyr-Asn para el nonámero) se rompieron de forma más eficiente con el CP que con el PI $\beta 5i$ (Figuras 38C-F).

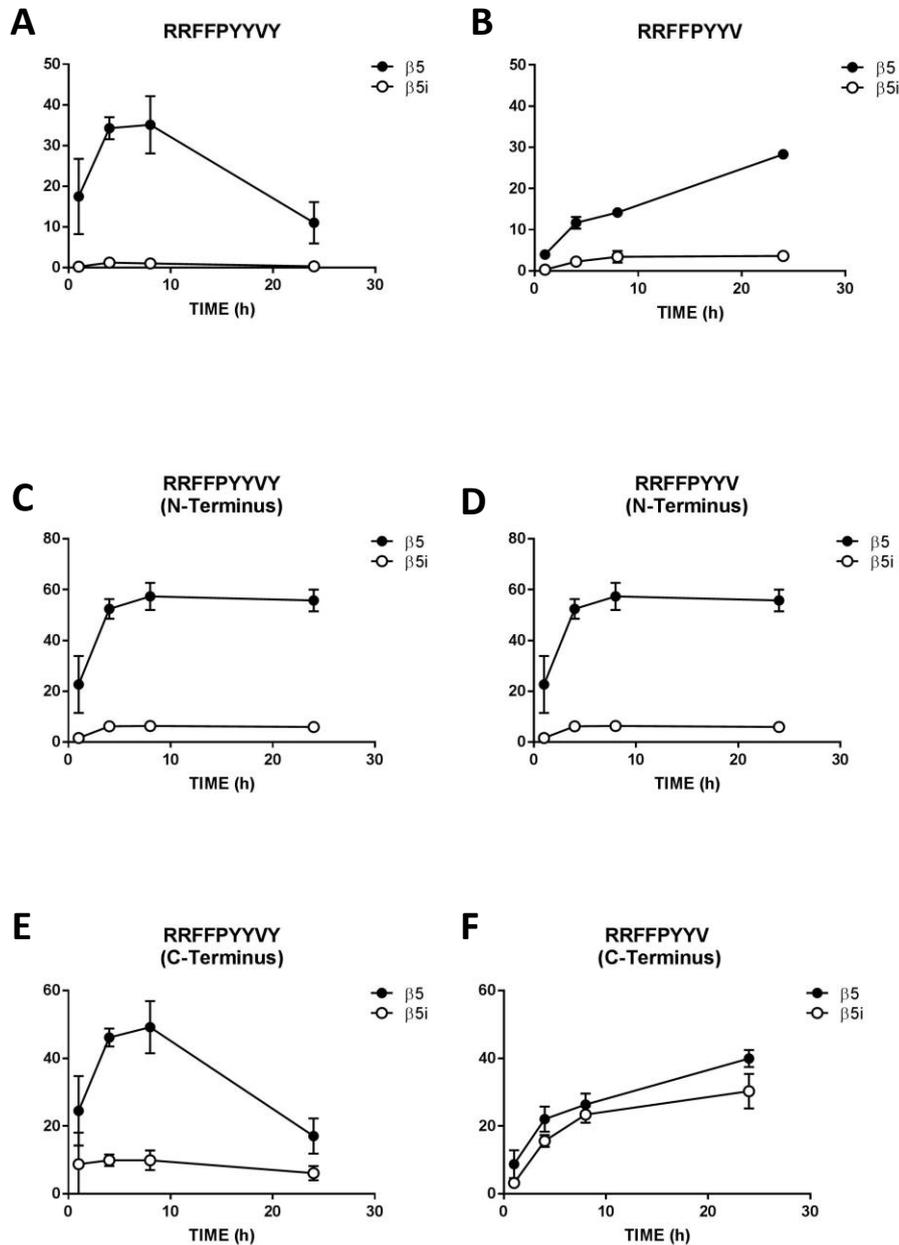


Figura 38: Generación *in vitro* de los ligandos RRFPPYYVY y RRFPPYYV. Los precursores peptídicos se digirieron *in vitro* con el proteasoma 20S purificado y los fragmentos generados se analizaron por MALDI-TOF a 1h, 4h, 8h y 24h. A: Se indica la abundancia relativa del péptido RRFPPYYVY. B: Se indica la abundancia relativa del péptido RRFPPYYV. C: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo N-terminal del ligando RRFPPYYVY. D: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo N-terminal del ligando RRFPPYYV. E: Se indica la suma de las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo C-terminal del ligando RRFPPYYVY. F: Se indica la suma de

las abundancias relativas de los péptidos generados tras el corte que genera el extremo N-terminal del ligando RRFFPYV.

En definitiva, los experimentos de digestión *in vitro* de precursores de ligandos peptídicos con los proteasomas 20S purificados, permitió explicar de forma clara la generación de un ligando (APSRNGMVL) que se presentaba de forma abundante en ambos transfectantes y un péptido detectado únicamente en las células que expresan el proteasoma constitutivo (GPREPPQSA). *In vitro*, el extremo C-terminal de otro ligando (KLHGVNINV), que se observó de forma exclusiva en las células con el proteasoma constitutivo, no se generó de forma eficiente. Sin embargo, el CP fue más eficiente en la generación del extremo N-terminal, lo que puede explicar de algún modo la presencia del mismo en el repertorio peptídico. En el análisis de la generación del único péptido que pudimos estudiar secuenciado específicamente en las células con el PI β 5i (TPSLVKSTSQL) se observó que el extremo N-terminal se generó mejor con dicho proteasoma, y de forma claramente más ineficiente el extremo C-terminal. Finalmente, los ligandos de HLA-B27 procedentes de la subunidad β 6 del proteasoma 20S (RRFFPRRVY Y RRFFPRRV) se generaron consistentemente mejor con el CP que con el PI β 5i.

DISCUSIÓN

La respuesta inmune específica depende críticamente de los productos de degradación proteica presentados en forma de péptidos unidos a las moléculas de MHC-I o MHC-II, (HLA en humanos) (185). Estos péptidos son reconocidos por células T CD8⁺ o CD4⁺ específicas. Las moléculas de MHC-I y MHC-II, son altamente polimórficas (69). El mayor grado de polimorfismo de las moléculas está concentrado en el surco de unión, lo que permite que diferentes moléculas de MHC unan repertorios peptídicos diferentes. Estos residuos polimórficos son la base de la especificidad de los TCRs por un péptido antigénico presentado en el contexto de una molécula de MHC concreta. La capacidad de una molécula de MHC de unirse a diferentes péptidos es específica para cada alotipo y define su repertorio peptídico (17). Por otra parte, es ampliamente conocido, sobre todo en clase II, que un mismo péptido pueda unirse a distintas moléculas de HLA, lo que se ha definido como promiscuidad del MHC.

Los alelos de HLA-DR que están asociados con RA, presentan una característica estructural común, la presencia de una secuencia consenso básica, que abarca los residuos 70-74 de la cadena β de DR. Como consecuencia de esta homología de secuencia, se podrían esperar características estructurales similares en los péptidos presentados por las moléculas asociadas a RA. Así, en nuestro laboratorio se había descrito previamente el motivo de anclaje de HLA-DR10 (168) y, se vio que, al menos teóricamente, las moléculas asociadas a RA unían repertorios peptídicos más similares que los presentados por moléculas no asociadas a RA. Diferentes estudios han analizado el repertorio peptídico asociado a muchas de estas moléculas (34,168,186–188), pero no se había hecho de una manera comparativa.

Se había descrito que algunos alelos asociados a RA pueden compartir ligandos, como es el caso de DR1 y DR4, que pueden unir el mismo péptido inmunodominante derivado del colágeno de tipo II, interactuando con los mismos residuos en ambas moléculas (189). Sin embargo, el grado de solapamiento de los repertorios unidos a alelos diferencialmente asociados con RA, no había sido medido hasta ahora. Con el objeto de cuantificar la similitud de los repertorios peptídicos se analizaron los péptidos unidos a las moléculas asociadas positivamente con RA, DR1, DR4 y DR10, y al alotipo no asociado DR15.

El primer análisis de los ligandos se realizó con LC-MALDI-TOF/TOF-MS. Se recolectaron y analizaron 240 fracciones de RP-HPLC de cada *pool* peptídico. Aunque los repertorios peptídicos contenían ligandos comunes, el grado de solapamiento global entre dos moléculas-HLA-DR fue bajo, alrededor de un 10%, en los repertorios peptídicos más similares (DR1 y DR10).

En un segundo análisis, se identificaron por LC-MS/MS secuencias de péptidos asociados a los diferentes alelos. El análisis de estos péptidos confirmó el bajo grado de

solapamiento y además, mostró de manera clara que DR1 y DR10 tenían el repertorio peptídico más similar, compartiendo el 12,7% y 10,7% de los ligandos, respectivamente.

Entre los ligandos de HLA-DR secuenciados se encontró un péptido derivado de la proteína desmoglein-2 con la secuencia VTQEIVTERS SVSSRQA. Este péptido se secuenció a partir de DR1, DR4 y DR10. Se realizó la modelización del *core* putativo de este péptido correlacionándolo con datos de unión empíricos. Este péptido podía unirse con elevada afinidad a DR1, DR4, DR10 y DR2b, pero no a DR2a. El *core* de interacción contiene Glu en P4 como uno de los residuos de anclaje. Como se ha comentado antes, se habían descrito algunos péptidos promiscuos entre moléculas de HLA-DR asociadas con RA (34,112,189), pero en este trabajo se ha incluido DR10 por primera vez.

Otro péptido, LPSYEEALSLPSKTPE, derivado de la proteína transmembranal 5 asociada a lisosoma, fue secuenciado como ligando de todos los alotipos analizados. Aunque este péptido *per se*, podría no tener implicaciones inmunológicas, es el primer ligando peptídico natural secuenciado de cuatro alelos de HLA-DR asociados diferencialmente con RA, a excepción de CLIP. Este hallazgo confirma la promiscuidad presente en las moléculas de HLA-DR con respecto a los péptidos que pueden unir. Aunque, el hecho de que solo un péptido común haya sido eluido de todos los alelos indica que el número de péptidos con capacidad de unirse a muchas moléculas de HLA-DR es limitado.

Como se mencionó anteriormente, los repertorios que compartían el mayor número de péptidos eran DR1 y DR10. Se observaron dos características principales entre los péptidos comunes a ambos alelos: la mayoría de los péptidos tenían Leu en P4 y un residuo básico en P8. Esta característica se enriqueció considerablemente al hacer el análisis sobre los péptidos comunes, en comparación con los péptidos eluidos a partir de DR1 o DR10 por separado. A pesar de que se requiere un mayor número de péptidos, estos datos sugieren que los péptidos que contienen Leu4 y residuos básicos en P8 están favorecidos para unirse a DR1 y a DR10, en comparación con las otras moléculas analizadas. Una excepción fue el péptido SPSIVIALAGNKADL, el cual fue eluido de DR1 y DR15. El ensayo de *binding* experimental demostró que este péptido podía unirse con elevada afinidad a DR1 y DR2a, pero no a DR4, DR10 y DR2b. El *core* de unión teórico a DR2a fue IVIALAGNK, el cual no presenta Leu4 y Lys8, sino Ala4 y Asn8.

Los residuos polares Ser y Asn fueron los aminoácidos más abundantes en la P9 del *core* de unión de DR10 (19% y 20% respectivamente). Ser fue también detectada en otros *pools* peptídicos (11% en DR1, 21% en DR4 y 10% en DR15). Sin embargo, Asn no fue detectada en ninguno de los ligandos de DR1 ni DR15, y solo 2% de los péptidos unidos a DR4 presentaban Asn9. Así, aunque la P9 del *core* de unión acepta un alto número de diferentes residuos, la mayoría son residuos polares o alifáticos pequeños y solo DR10

tenía Asn como residuo favorecido. Así, estos datos sugieren que los péptidos compartidos entre DR1 y DR10 están favorecidos con la presencia de Leu4, residuos básicos en P8 y no contienen Asn en P9.

Aproximadamente, 60% de los pacientes con RA presentan ACCP (93), los cuales están en correlación con la expresión de alotipos que contienen el SE (190). La identificación de péptidos citrulinados directamente a partir del *pool* peptídico es verdaderamente complicada (191). La glutamina es un aminoácido con características fisicoquímicas similares a la citrulina. La presencia de Gln4 puede ser un indicio de la aceptación de citrulina en la P4 del *core*. Los 4 repertorios peptídicos contenían péptidos con Gln4 (6,4% para DR1; 14,3% para DR4; 6,7% para DR10 y 5,6% para DR15). Así, si la premisa de que la presencia de Gln4 puede predecir la unión de péptidos con Cit4, el análisis de estos *pools* peptídicos sugiere que DR4 puede ser el alelo con mayor probabilidad de presentar péptidos con citrulina en P4 del *core*. La unión de péptidos con esta modificación a DR4 ha sido descrita (103). Por otro lado, DR15 presenta pocos péptidos con Gln4, pero el porcentaje fue muy similar a los de DR1 y DR10.

Una conclusión importante de este apartado de la tesis es que, aunque las moléculas de HLA-DR son capaces de compartir diversos ligandos peptídicos, algunos como ligandos promiscuos de varias moléculas, los repertorios peptídicos no tienen un alto grado de solapamiento. Incluso en el caso de los más similares, este solapamiento está alrededor del 10% del total. Por otro lado, el trabajo ha permitido caracterizar algunas características estructurales entre los alelos asociados a RA. La caracterización de patrones de secuencias peptídicas entre los péptidos comunes unidos a los alelos asociados con RA y ausentes en los alelos no asociados, podría ser usada para identificar nuevos epítomos de células T derivados de autoantígenos en las articulaciones y diferencialmente presentados en pacientes con RA.

Como se mencionó antes, DR15 no está asociado con RA o se considera de muy bajo riesgo. Sin embargo, el análisis del repertorio peptídico que puede unir el haplotipo DR15 es de gran importancia debido a su asociación con esclerosis múltiple. Este haplotipo es uno de los que presenta dos *loci* de DRB funcionales, *DRB1* y *DRB5*, que expresan dos alotipos funcionales DRB1*15:01 (DR2b) y DRB5*01:01 (DR2a). El motivo de unión de DR15 se describió hace más de dos décadas tomando en consideración unos pocos péptidos eluidos de DR2a y DR2b, a partir de ensayos de unión (121,122,192).

En la segunda parte de esta tesis se usó la línea BLS transfectada con los genes DRA1*01:01/DRB5*01:01 y DRA1*01:01/DRB1*15:01 como fuente para la identificación de *pools* peptídicos asociados a DR2a y DR2b. A partir del análisis de los péptidos obtenidos se refinó el motivo de unión. El motivo de unión encontrado fue bastante similar al

previamente descrito, aunque se observaron algunas diferencias. En el caso de DR2a, Ala resultó ser el principal residuo encontrado en P4, una característica que no había sido previamente descrita (121,122). Una segunda diferencia involucraba a DR2b. En el motivo de unión reportado las principales posiciones de anclaje eran P1, P4 y P7. Las posiciones de anclaje a partir de los ligandos identificados en este trabajo fueron P1, P4, P6 y P9. Dado que estas son posiciones canónicas de anclaje en la mayoría de las moléculas de HLA-DR y debido al suficiente número de péptidos eluidos de DR2b, presumimos que los datos reportados aquí son más exactos. De hecho, estructuras cristalográficas han demostrado que éstos son, los residuos que interactúan con el surco de unión en DR2b (193,194) y DR2a (195,196) en los péptidos cristalizados. Aunque los residuos preferidos en P6 fueron polares o pequeños tal y como está descrito para la mayoría de las moléculas de HLA-DR (37).

La posición P8 mostró una frecuencia incrementada de residuos cargados positivamente en ambas moléculas (de forma significativa, Lys en DR2a y Lys, His y Arg en DR2b). Como se comentó anteriormente, esta preferencia se observó en mayor medida en los alotipos asociados a RA DR1 y DR10. En el análisis en detalle de los repertorios asociados a DR2a y DR2b, se observó una preferencia por péptidos con residuos básicos en P8, aunque tal vez menos pronunciada. Por tanto, nuestros datos permiten proponer que la preferencia por residuos positivos en esta posición puede ser una preferencia extendida de muchos alotipos de HLA-DR.

Es bien conocido que algunos péptidos pueden unirse a muchas moléculas de HLA-DR. En el caso de HLA-DR15, aunque el motivo de unión de DR2a y DR2b es diferente, ambos alotipos pueden acomodar residuos similares o idénticos en las principales posiciones de anclaje. Así, aunque con diferente preferencia, ambas moléculas pueden aceptar residuos alifáticos o aromáticos en P1 y P4, residuos polares en P6 y aminoácidos alifáticos y básicos en P9.

Entre los péptidos identificados a partir de los alotipos de DR15, solo 13 fueron comunes a DR2a y DR2b. De los cuales, 6 eran derivados de la cadena invariante, reflejando la elevada abundancia de ligandos derivados de Ii en esta línea celular. Este fenómeno fue particularmente evidente en DR2a. Los otros siete péptidos que eran comunes, derivaban de 5 proteínas diferentes, 2 de ellas localizadas en la membrana plasmática, 2 en el núcleo y uno en el citosol. Los tres péptidos derivados de proteínas nucleares o citosolicas, presentaban una baja afinidad teórica calculada con el NetMHCIIpan 3.1 o con la matriz generada en este trabajo. Por tanto, no se descarta que algunas de las secuencias peptídicas sean contaminantes. Está claro que éste no es el caso para la mayoría de los péptidos secuenciados, ya que: 1) el motivo de unión que se observó era similar al descrito previamente, y 2) la localización subcelular de las proteínas parentales son las esperadas

para HLA-DR. La identificación de un contaminante presenta mayores posibilidades de ser eluido de ambas líneas celulares, ya que es independiente de alelo. Por tanto, el solapamiento actual podría ser aún más bajo que el descrito aquí. El bajo grado de solapamiento sugiere que, al menos en el caso de DR15, la existencia de dos alelos de DRB en el mismo haplotipo, puede incrementar la diversidad del repertorio peptídico presentado a los linfocitos T. Además, algunos péptidos pueden ser presentados en diferentes registros, como se demostró previamente para un péptido derivado de la proteína básica de mielina que abarca los residuos 86-105 (196). En este caso, las posiciones de anclaje fueron: Phe1, Ile4, Thr6 y Thr9 para DR2a y Val1, Phe4, Asn6 y Thr9 para DR2b, los cuales son residuos favorecidos o bien aceptados según el motivo de anclaje obtenido en esta tesis. La presentación del mismo péptido en diferentes registros permite incrementar el número de células T CD4+ capaz de reconocer un particular determinante antigénico ya que diferentes clones podrían reconocer el mismo péptido presentado en el contexto de dos moléculas de HLA-DR diferentes, sobre todo si se unen en diferentes registros.

Las estructuras modelizadas, que contienen ligandos de DR2a y DR2b asociados a ambas moléculas, se explican de forma satisfactoria con los motivos de anclaje obtenidos a partir de los ligandos peptídicos. Así, el motivo de unión de ambos alelos muestra que las restricciones más claras se producen a nivel de P1, P4 y P9. P1 una preferencialmente residuos aromáticos grandes en DR2a y residuos alifáticos pequeños (preferencialmente Ile) en DR2b. P4 mostró la tendencia opuesta, con pequeños residuos alifáticos en DR2a y residuos aromáticos en DR2b. Finalmente, P9 mostró una preferencia por residuos básicos en DR2a y residuos alifáticos en DR2b. Estas preferencias pueden ser en general explicadas por las diferencias en las secuencias de DR2a y DR2b. Así, el dimorfismo G86V explica la preferencia de P1 en cada alotipo. Según el motivo de anclaje observado, P4 es una posición más restrictiva en DR2b que en DR2a, lo que puede ser explicado estructuralmente por el polimorfismo R71A. P9 es más restrictivo en DR2a que en DR2b, teniendo preferencias por residuos básicos, lo que es explicado por la presencia de Asp30, Asp37 y Asp11.

Para refinar el motivo de unión de dos alotipos de HLA-DR asociados con MS se utilizó una aproximación basada en el análisis del peptidoma obtenido por LC-MS/MS. En nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que los repertorios peptídicos de dos moléculas de HLA-DR pertenecientes a un mismo haplotipo son comparados directamente. Nuestros datos indican que los peptidomas unidos por ambas moléculas son complementarios y con un solapamiento extremadamente bajo. Además, nuestros datos sugieren que, cuantitativamente, ambas moléculas contribuyen de forma similar, al repertorio presentado por el haplotipo HLA DR15 en la superficie celular. Por tanto, la presencia de DR2a y

DR2b incrementa la capacidad de presentación de las células que expresan el haplotipo DR15.

Finalmente, proponemos que los datos obtenidos del análisis de ligandos peptídicos eluidos de moléculas de HLA-DR pueden ser complementarios a las herramientas informáticas ampliamente utilizadas en la actualidad y pueden contribuir a mejorar la predicción de nuevos epítomos de células T relevantes en enfermedades autoinmunes

En conjunto, los datos obtenidos de los capítulos 1 y 2 de la presente tesis, que han incluido diversos alelos asociados a RA y el estudio de un haplotipo complejo asociado a MS, indican que los peptidomas presentados por alelos abundantes en la población caucásica tienen un bajo grado de solapamiento y han podido ser seleccionados por incrementar a nivel poblacional la presentación antigénica de patógenos presentes en el medio.

En el capítulo III de esta tesis se ha abordado el papel de los proteasomas intermedios en la generación de los ligandos de HLA-I. Concretamente, se ha caracterizado la especificidad de uno de los dos tipos de proteasomas intermedios identificados hasta el momento, el PI 20S $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 5i$ y se analiza su contribución al repertorio peptídico de HLA-I.

El repertorio peptídico presentado por una célula determinada, depende en gran medida del contenido de su proteasoma. El proteasoma degrada proteínas endógenas y está aceptado que genera directamente el extremo C-terminal de la mayoría de los péptidos que se unen a las moléculas de HLA de clase I. La importancia del papel del proteasoma en la composición del repertorio peptídico presentado por HLA-I a los linfocitos T CD8⁺ se ha demostrado en estudios en los que se describió que la inhibición del proteasoma bloquea la presentación de antígenos a las moléculas de HLA-I (28). Además, se ha descrito que tanto el proteasoma constitutivo como el inmunoproteasoma pueden generar o destruir diversos epítomos reconocidos por células T específicas. Por tanto, un cambio en el contenido celular del proteasoma puede modular el repertorio antigénico y su reconocimiento o no, por los linfocitos T CD8⁺ (132,149).

La existencia de los proteasomas intermedios había sido sugerida por Dahlmann B., et al, al encontrar en diversos tejidos proteasomas que contenían solo algunas de las inmunosubunidades (166). Se han descrito dos tipos de proteasomas intermedios, el proteasoma $\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 5i$ y el proteasoma $\beta 1i$ - $\beta 2$ - $\beta 5i$. La existencia de éstos está en concordancia con las reglas del ensamblaje cooperativo entre las subunidades inducibles del proteasoma (162–164,197). Así, ambos PI presentan $\beta 5i$, subunidad necesaria para la maduración de $\beta 1i$ y $\beta 2i$. No se han descrito proteasomas intermedios conteniendo únicamente $\beta 2i$, subunidad que no es incorporada sin $\beta 1i$ (132).

Los proteasomas intermedios forman el 10% al 20% del contenido de proteasoma total hallado en tumores y entre un 30% a 50% del presente en hígado, riñón, intestino delgado, colón y células dendríticas (149). Dado que los PI contienen una ($\beta 5i$) o dos ($\beta 1i$ - $\beta 5i$) de las subunidades catalíticas del inmunoproteasoma, son considerados intermedios entre la del CP e IP. Se ha analizado la especificidad de dichos proteasomas intermedios en ensayos con péptidos fluorogénicos y se ha visto que tienen una actividad similar, pero no idéntica, a la del IP respecto a las actividades *trypsin-like* y *chymotrypsin-like* (149). El inmunoproteasoma presenta, respecto al proteasoma constitutivo, una disminución en la actividad *caspase-like*, ejercida principalmente por la subunidad catalítica $\beta 1i$ y un incremento en las actividades *trypsin-like* y *chymotrypsin-like*, correspondientes a las subunidades $\beta 2i$ y $\beta 5i$, respectivamente.

Por lo cual, un incremento en la actividad quimiotrípica sería esperable en los PI. En este trabajo se purificaron proteasomas 20S funcionales, a partir de una metodología nueva. El método se basa en una purificación por cromatografía de afinidad a partir de una cola de streptag II fusionada al extremo C-terminal de la subunidad de interés. Prácticamente en un solo paso, de forma sencilla y sin requerir gran equipamiento, se purificaron los proteasomas 20S constitutivo e intermedio $\beta 5i$. Su correcta funcionalidad se demostró a partir de la digestión de un precursor peptídico previamente descrito (170), donde se vio que el proteasoma 20S constitutivo tenía una actividad prácticamente idéntica a la purificada por un método tradicional más laborioso descrito previamente (184). Aunque la actividad de los proteasomas intermedios se ha descrito con ensayos de moléculas fluorogénicas, en este trabajo hemos abordado la caracterización de la especificidad del proteasoma intermedio $\beta 5i$ en comparación con el proteasoma constitutivo con péptidos precursores de varios ligandos de HLA-I purificados a partir de transfectantes que expresaban exclusivamente el proteasoma constitutivo o el proteasoma $\beta 5i$. Concretamente se digirieron 6 precursores, seleccionados del *pool* peptídico eluido de las células 293F sin transfectar y 293F- $\beta 5i$. La especificidad se midió cuantificando y sumando la abundancia de todos los péptidos generados tras la ruptura de cada uno de los enlaces tras un aminoácido concreto.

Con la substitución de $\beta 5$ por $\beta 5i$ no se incrementó la actividad tras residuos hidrofóbicos (*chymotrypsin-like*) por parte del PI $\beta 5i$. En este sentido, ambos proteasomas rompieron de manera eficiente tras, Leu, Val y Ala, siendo más eficaz el CP que el PI $\beta 5i$. Este hallazgo está en concordancia con los resultados observados por Guillaume et al sobre dos péptidos fluorogénicos, Suc-LLVY-AMC y Z-GGLAMC. La actividad del PI $\beta 5i$ sobre Leu-Leu-Val-Tyr fue similar a la del CP, mientras que sobre Gly-Gly-Leu estuvo considerablemente incrementada (149). Nuestros resultados indicaron que la hidrólisis tras residuos ácidos fue similar, con una actividad ligeramente superior del proteasoma

constitutivo. Esta actividad, está generalmente asociada a la subunidad catalítica $\beta 1$ (149), presente en los dos proteasomas evaluados. Finalmente, los datos obtenidos en este trabajo indicaron que el corte tras residuos básicos (actividad *trypsin-like*) fue consistentemente más eficiente con el PI $\beta 5i$ que con el proteasoma constitutivo.

La atribución del perfil de actividad de los PI con sustratos fluorogénicos es limitada, ya que son independientes de las secuencias circundantes. Un estudio de corte hecho con el PI, sobre la proteína enolasa, demostró que su actividad es opuesta a la del proteasoma constitutivo, favoreciendo los cortes detrás de residuos hidrofóbicos y desfavoreciendo los cortes antes de los residuos de la misma naturaleza (198). En esta línea, en MAGE-A3₂₇₁₋₂₇₉, un péptido derivado de una línea tumoral y procesado exclusivamente por el PI $\beta 5i$, el corte entre dos residuos hidrofóbicos, (F₂₇₁ y L₂₇₂), no es ejercido por la subunidad $\beta 5i$. Por tanto el incremento en la actividad quimiotróptica esperable en el PI $\beta 5i$, podría ser, al igual que ocurre en los otros tipos de proteasoma, dependiente de secuencia.

La especificidad de los PI había sido estudiada sobre líneas tumorales y con péptidos fluorogénicos. A nuestro conocimiento no se ha hecho un análisis exhaustivo como el presentado aquí para caracterizar la especificidad del PI $\beta 5i$, tomando en consideración, a pesar de las limitaciones, las secuencias circundantes. Tampoco había sido evaluada la influencia del PI directamente en el repertorio peptídico. Como se mencionó anteriormente, el repertorio peptídico presentado por una célula dada depende en gran medida del contenido de su proteasoma. El procesamiento de algunos péptidos de manera exclusiva por el proteasoma intermedio $\beta 5i$ (149,160,199–202) incrementa el repertorio de péptidos presentados a los linfocitos T CD8⁺ (132). Del *pool* de péptidos eluidos de las células HEK-293F expresando tanto el CP como el PI $\beta 5i$, se analizaron: 1) un péptido secuenciado en ambos transfectantes, 2) dos péptidos procedentes exclusivamente de las células que expresan el proteasoma constitutivo y 3) un péptido derivado de las células que expresaban el PI $\beta 5i$. También se evaluó la generación directa de dos ligandos de HLA-B27 que son reconocidos por un clon alorreactivo a partir de un precursor de 27 residuos (184).

Estos experimentos de permitieron explicar la generación del ligando APSRNGMVL presente de forma abundante en ambos transfectantes y un péptido detectado únicamente en las células que expresan el proteasoma constitutivo (GPREPPQSA). La hidrólisis del enlace Leu-Lys, que genera el extremo carboxilo del ligando común se produce de forma prominente en la digestión con ambos proteasomas. La generación es más rápida y eficiente en el proteasoma constitutivo, lo que está en concordancia con los datos observados respecto al corte tras Leu en el global de las secuencias digeridas. En el caso de ligando GPREPPQSA también se generó mejor el extremo C-terminal con el

proteasoma constitutivo, lo que también coincide con la especificidad de dichos proteasomas en el corte tras Ala.

In vitro, el extremo C-terminal de otro ligando detectado en el peptidoma de HLA-I en células que expresaban el proteasoma constitutivo (KLHGVNINV), que se observó de forma exclusiva en las células con el proteasoma constitutivo, no se generó de forma eficiente. Sin embargo, el proteasoma estándar fue más eficiente en la generación del extremo N-terminal, lo que puede explicar de algún modo la presencia del mismo en el repertorio peptídico, ya que puede unirse de forma directa previo al recorte por ERAAP en el RE. En el análisis de la generación del único péptido que pudimos estudiar secuenciado específicamente en las células con el proteasoma intermedio $\beta 5i$ (TPSLVKSTS Q L), se observó que el extremo N-terminal se generó mejor con dicho proteasoma, y de forma claramente más ineficiente el extremo C-terminal. Sin embargo, a nuestro entender estos datos no explican de forma satisfactoria la presencia de dicho péptido en el repertorio peptídico de HLA-I exclusivamente en las células que expresan el PI $\beta 5i$. Finalmente, los ligandos de HLA-B27 procedentes de la subunidad $\beta 6$ del proteasoma 20S (RRFFPRRV Y RRFFPRRV) se generaron consistentemente mejor con el proteasoma constitutivo que con el proteasoma intermedio, lo que sugiere que dichos péptidos se deberían presentar de forma más eficiente en células HLA-B17:05⁺ que expresan el proteasoma constitutivo respecto a las que expresan el PI $\beta 5i$. Dicho extremo se analizará en un futuro.

Por tanto, la presencia de proteasomas intermedios incrementa el repertorio peptídico presentado por las moléculas de HLA-I a los CTLs. Como se mencionó antes, un elevado porcentaje del contenido total del proteasoma presente en las células dendríticas y en células tumorales, corresponde a proteasomas intermedios, lo que multiplica la capacidad de generación de ligandos de HLA-I. La caracterización de la presencia y ausencia de estos tipos de proteasoma en células sanas y tumorales o la variación de la presencia de dichos proteasomas intermedios en células infectadas por virus podría resultar de gran valor en la inmunoterapia contra el cáncer y contra infecciones virales.

CONCLUSIONES

1. A pesar de que está establecido desde hace tiempo que las moléculas de HLA-DR son promiscuas en la presentación de determinados péptidos antigénicos, la similitud de los repertorios peptídicos presentados por HLA-DR1, DR4, DR10, DR15 es bajo.
2. El mayor grado de solapamiento se da entre las moléculas asociadas a artritis reumatoide DR1 y DR10.
3. Un alto porcentaje de los péptidos compartidos por DR1 y DR10 (contienen en leucina en la posición P4 del core de unión (77.8%) y residuos básicos en la posición P8 (61.2%).
4. Los motivos de unión de DR2a y DR2b, obtenidos a partir de las mezclas peptídicas secuenciadas en esta tesis, concuerdan parcialmente con los motivos descritos previamente y han permitido definir nuevos residuos de anclaje.
5. Los repertorios peptídicos de DR2a y DR2b son complementarios y presentan un grado de solapamiento bajo.
6. La aportación de DR2a y DR2b al repertorio global de HLA-DR15, según el score desarrollado a partir de los motivos de unión identificados en esta tesis, es similar.
7. La adición del StreptagII a subunidades del protasoma ha permitido desarrollar un protocolo de purificación rápido que genera un proteasoma de alta pureza y funcional.
8. Experimentos de digestión *in vitro* de precursores peptídicos con los proteasomas 20S purificados indican que el proteasoma intermedio $\beta 5i$ presenta una mayor actividad *trypsin-like*, una menor actividad *chymotrypsin-like* y una actividad *caspase-like* similar al proteasoma constitutivo.
9. Las digestiones *in vitro* de precursores peptídicos con los proteasomas 20S purificados han permitido explicar la generación de varios ligandos de HLA-I: APSRNGMVL, presente en los repertorios peptídicos de células que expresan el proteasoma constitutivo y el proteasoma intermedio $\beta 5i$; GPREPPQSA y KLHGVNINV, presentes exclusivamente en células que expresan el proteasoma constitutivo. Sin embargo, estos experimentos no explican de manera satisfactoria la generación de un ligando, TPSLVKSTSQL, presente en células que expresan el proteasoma intermedio.

10. Digestiones *in vitro* con proteasoma 20S sugieren que los ligandos de HLA-B*27:05 provenientes de la subunidad β 6 del proteasoma, RRFPPRRVY y RRFPPRRV, se presentarán mejor en células que expresan el proteasoma estándar que en células que expresan el proteasoma intermedio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2013;14:301-23.
2. Kumánovics A, Takada T, Lindahl KF. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:629-57.
3. Klein, Sato. Birth of the Major Histocompatibility Complex. *Scand J Immunol.* 1 de marzo de 1998;47(3):199-209.
4. Campbell RD, Milner CM. MHC genes in autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* diciembre de 1993;5(6):887-93.
5. Engelhard VH. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:181-207.
6. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature.* 28 de octubre de 1999;401(6756):921-3.
7. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SGE. The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 28 de enero de 2015;43(Database issue):D423-31.
8. McMichael AJ, Jones EY. Genetics. First-class control of HIV-1. *Science.* 10 de diciembre de 2010;330(6010):1488-90.
9. Nepom GT, Erlich H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:493-525.
10. Unanue ER, Turk V, Neefjes J. Variations in MHC Class II Antigen Processing and Presentation in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 20 de mayo de 2016;34:265-97.
11. Goodfellow PN, Jones EA, Van Heyningen V, Solomon E, Bobrow M, Miggiano V, et al. The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature.* 20 de marzo de 1975;254(5497):267-9.
12. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 8 de octubre de 1987;329(6139):506-12.
13. Cresswell P, Turner MJ, Strominger JL. Papain-solubilized HL-A antigens from cultured human lymphocytes contain two peptide fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mayo de 1973;70(5):1603-7.
14. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, et al. Pillars article: three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature.* 1993. 364: 33-39. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de enero de 2015;194(1):5-11.
15. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:259-93.
16. Wooldridge L, Ekeruche-Makinde J, van den Berg HA, Skowera A, Miles JJ, Tan MP, et al. A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J Biol Chem.* 6 de enero de 2012;287(2):1168-77.

-
17. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:443-73.
 18. Jardetzky TS, Lane WS, Robinson RA, Madden DR, Wiley DC. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature.* 26 de septiembre de 1991;353(6342):326-9.
 19. Schumacher TN, De Bruijn ML, Vernie LN, Kast WM, Melief CJ, Neefjes JJ, et al. Peptide selection by MHC class I molecules. *Nature.* 25 de abril de 1991;350(6320):703-6.
 20. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature.* 26 de septiembre de 1991;353(6342):321-5.
 21. Guo HC, Jardetzky TS, Garrett TP, Lane WS, Strominger JL, Wiley DC. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature.* 26 de noviembre de 1992;360(6402):364-6.
 22. DiBrino M, Parker KC, Shiloach J, Knierman M, Lukszo J, Turner RV, et al. Endogenous peptides bound to HLA-A3 possess a specific combination of anchor residues that permit identification of potential antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 de febrero de 1993;90(4):1508-12.
 23. Corr M, Boyd LF, Frankel SR, Kozlowski S, Padlan EA, Margulies DH. 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.* 1 de diciembre de 1992;176(6):1681-92.
 24. Engelhard VH, Appella E, Benjamin DC, Bodnar WM, Cox AL, Chen Y, et al. Mass spectrometric analysis of peptides associated with the human class I MHC molecules HLA-A2.1 and HLA-B7 and identification of structural features that determine binding. *Chem Immunol.* 1993;57:39-62.
 25. Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science.* 14 de agosto de 1992;257(5072):919-27.
 26. Silver ML, Guo HC, Strominger JL, Wiley DC. Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide. *Nature.* 26 de noviembre de 1992;360(6402):367-9.
 27. Rammensee HG, Falk K, Rötzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:213-44.
 28. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 9 de septiembre de 1994;78(5):761-71.
 29. Heemels MT, Ploegh H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:463-91.
 30. Alvarez I, Martí M, Vázquez J, Camafeita E, Ogueta S, López de Castro JA. The Cys-67 residue of HLA-B27 influences cell surface stability, peptide specificity, and

-
- T-cell antigen presentation. *J Biol Chem.* 28 de diciembre de 2001;276(52):48740-7.
31. Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 15 de mayo de 2001;20(10):2357-66.
 32. York IA, Chang S-C, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, et al. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol.* diciembre de 2002;3(12):1177-84.
 33. Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong S-C, Barlow A, Janeway CA. Pillars Article: Sequence Analysis of Peptides Bound to MHC Class II Molecules. *Nature.* 1991. 353: 622-627. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de febrero de 2016;196(3):941-6.
 34. 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.* 1 de julio de 1993;178(1):27-47.
 35. Sette A, Sidney J, Oseroff C, del Guercio MF, Southwood S, Arrhenius T, et al. HLA DR4w4-binding motifs illustrate the biochemical basis of degeneracy and specificity in peptide-DR interactions. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de septiembre de 1993;151(6):3163-70.
 36. Rudensky AY, null, Preston-Hurlburt P, al-Ramadi BK, Rothbard J, Janeway CA. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature.* 1 de octubre de 1992;359(6394):429-31.
 37. Yewdell JW, Schubert U, Bennink JR. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J Cell Sci.* marzo de 2001;114(Pt 5):845-51.
 38. Vabulas RM, Hartl FU. Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science.* 23 de diciembre de 2005;310(5756):1960-3.
 39. Cardinaud S, Starck SR, Chandra P, Shastri N. The synthesis of truncated polypeptides for immune surveillance and viral evasion. *PloS One.* 21 de enero de 2010;5(1):e8692.
 40. Vigneron N, Stroobant V, Chapiro J, Ooms A, Degiovanni G, Morel S, et al. An antigenic peptide produced by peptide splicing in the proteasome. *Science.* 23 de abril de 2004;304(5670):587-90.
 41. Hanada K-I, Yewdell JW, Yang JC. Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature.* 15 de enero de 2004;427(6971):252-6.
 42. Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW, et al. A major role for TPP1 in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity.* abril de 2004;20(4):495-506.
 43. Geier E, Pfeifer G, Wilm M, Lucchiari-Hartz M, Baumeister W, Eichmann K, et al. A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science.* 12 de febrero de 1999;283(5404):978-81.

-
44. Kessler JH, Khan S, Seifert U, Le Gall S, Chow KM, Paschen A, et al. Antigen processing by nardilysin and thimet oligopeptidase generates cytotoxic T cell epitopes. *Nat Immunol.* enero de 2011;12(1):45-53.
 45. York IA, Mo AXY, Lemerise K, Zeng W, Shen Y, Abraham CR, et al. The cytosolic endopeptidase, thimet oligopeptidase, destroys antigenic peptides and limits the extent of MHC class I antigen presentation. *Immunity.* marzo de 2003;18(3):429-40.
 46. Parmentier N, Stroobant V, Colau D, de Diesbach P, Morel S, Chapiro J, et al. Production of an antigenic peptide by insulin-degrading enzyme. *Nat Immunol.* mayo de 2010;11(5):449-54.
 47. Shen XZ, Lukacher AE, Billet S, Williams IR, Bernstein KE. Expression of angiotensin-converting enzyme changes major histocompatibility complex class I peptide presentation by modifying C termini of peptide precursors. *J Biol Chem.* 11 de abril de 2008;283(15):9957-65.
 48. Howard JC. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr Opin Immunol.* febrero de 1995;7(1):69-76.
 49. Parcej D, Tampé R. ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition. *Nat Chem Biol.* agosto de 2010;6(8):572-80.
 50. Rajagopalan S, Brenner MB. Calnexin retains unassembled major histocompatibility complex class I free heavy chains in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med.* 1 de julio de 1994;180(1):407-12.
 51. Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.* agosto de 1996;5(2):103-14.
 52. Wearsch PA, Peaper DR, Cresswell P. Essential glycan-dependent interactions optimize MHC class I peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 de marzo de 2011;108(12):4950-5.
 53. Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, Grandea AG, et al. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science.* 29 de agosto de 1997;277(5330):1306-9.
 54. Morrice NA, Powis SJ. A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr Biol CB.* 4 de junio de 1998;8(12):713-6.
 55. Hughes EA, Cresswell P. The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr Biol CB.* 4 de junio de 1998;8(12):709-12.
 56. Park B, Lee S, Kim E, Cho K, Riddell SR, Cho S, et al. Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell.* 20 de octubre de 2006;127(2):369-82.
 57. Fisette O, Wingbermühle S, Tampé R, Schäfer LV. Molecular mechanism of peptide editing in the tapasin-MHC I complex. *Sci Rep.* 12 de enero de 2016;6:19085.

-
58. Peh CA, Burrows SR, Barnden M, Khanna R, Cresswell P, Moss DJ, et al. HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity*. mayo de 1998;8(5):531-42.
 59. Montserrat V, Galocha B, Marcilla M, Vázquez M, López de Castro JA. HLA-B*2704, an allotype associated with ankylosing spondylitis, is critically dependent on transporter associated with antigen processing and relatively independent of tapasin and immunoproteasome for maturation, surface expression, and T cell recognition: relationship to B*2705 and B*2706. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de noviembre de 2006;177(10):7015-23.
 60. Lehner PJ, Surman MJ, Cresswell P. Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity*. febrero de 1998;8(2):221-31.
 61. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature*. 3 de octubre de 2002;419(6906):480-3.
 62. Saric T, Chang S-C, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, et al. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol*. diciembre de 2002;3(12):1169-76.
 63. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, et al. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat Immunol*. julio de 2005;6(7):689-97.
 64. Neefjes J, Jongasma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol*. 11 de noviembre de 2011;11(12):823-36.
 65. Townsend A, Ohlén C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Kärre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*. 10 de agosto de 1989;340(6233):443-8.
 66. Knight SC, Stagg AJ. Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol*. junio de 1993;5(3):374-82.
 67. Choi NM, Majumder P, Boss JM. Regulation of major histocompatibility complex class II genes. *Curr Opin Immunol*. febrero de 2011;23(1):81-7.
 68. Cresswell P, Roche PA. Invariant chain-MHC class II complexes: always odd and never invariant. *Immunol Cell Biol*. julio de 2014;92(6):471-2.
 69. Rock KL, Reits E, Neefjes J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends Immunol*. noviembre de 2016;37(11):724-37.
 70. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature*. 5 de diciembre de 1991;354(6352):392-4.
 71. Anderson KS, Cresswell P. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J*. 1 de febrero de 1994;13(3):675-82.

-
72. Neefjes J. CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur J Immunol.* mayo de 1999;29(5):1421-5.
 73. Mosyak L, Zaller DM, Wiley DC. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity.* septiembre de 1998;9(3):377-83.
 74. Anders A-K, Call MJ, Schulze M-SED, Fowler KD, Schubert DA, Seth NP, et al. HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nat Immunol.* enero de 2011;12(1):54-61.
 75. Denzin LK, Fallas JL, Prendes M, Yi W. Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol Rev.* octubre de 2005;207:279-92.
 76. Guce AI, Mortimer SE, Yoon T, Painter CA, Jiang W, Mellins ED, et al. HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism. *Nat Struct Mol Biol.* enero de 2013;20(1):90-8.
 77. Dongre AR, Kovats S, deRoos P, McCormack AL, Nakagawa T, Paharkova-Vatchkova V, et al. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur J Immunol.* mayo de 2001;31(5):1485-94.
 78. Norbury CC, Basta S, Donohue KB, Tschärke DC, Princiotta MF, Berglund P, et al. CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science.* 28 de mayo de 2004;304(5675):1318-21.
 79. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* septiembre de 2010;62(9):2569-81.
 80. Álvarez I. HLA and Citrullinated Peptides in Rheumatoid Arthritis. 2011 [citado 12 de mayo de 2017]; Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/autoimmune-disorders-pathogenetic-aspects/hla-and-citrullinated-peptides-in-rheumatoid-arthritis>
 81. Aho K, Heliövaara M, Maatela J, Tuomi T, Palosuo T. Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* septiembre de 1991;18(9):1282-4.
 82. Aho K, von Essen R, Kurki P, Palosuo T, Heliövaara M. Antikeratin antibody and antiperinuclear factor as markers for subclinical rheumatoid disease process. *J Rheumatol.* agosto de 1993;20(8):1278-81.
 83. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* febrero de 2004;50(2):380-6.
 84. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* octubre de 2003;48(10):2741-9.

-
85. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis.* septiembre de 2004;63(9):1085-9.
 86. Bowes J, Barton A. Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatol Oxf Engl.* abril de 2008;47(4):399-402.
 87. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee H-S, Jia X, et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 29 de enero de 2012;44(3):291-6.
 88. Seldin MF, Amos CI, Ward R, Gregersen PK. The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* junio de 1999;42(6):1071-9.
 89. Imboden JB. The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:417-34.
 90. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* noviembre de 1987;30(11):1205-13.
 91. Weidenthaler B, Hausser I, Anton-Lamprecht I. Is filaggrin really a filament-aggregating protein in vivo? *Arch Dermatol Res.* 1993;285(3):111-20.
 92. Cantaert T, De Rycke L, Bongartz T, Matteson EL, Tak PP, Nicholas AP, et al. Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient! *Arthritis Rheum.* noviembre de 2006;54(11):3381-9.
 93. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:651-75.
 94. Huizinga TWJ, Amos CI, van der Helm-van Mil AHM, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.* noviembre de 2005;52(11):3433-8.
 95. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* agosto de 2003;34(4):395-402.
 96. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, Chapuy-Regaud S, Al Badine R, Méchin M-C, et al. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum.* noviembre de 2007;56(11):3541-53.
 97. Després N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Ménard HA. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* junio de 1994;21(6):1027-33.
 98. Bang H, Egerer K, Gauliard A, Lüthke K, Rudolph PE, Fredenhagen G, et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* agosto de 2007;56(8):2503-11.
 99. Ménard HA, Lapointe E, Rochdi MD, Zhou ZJ. Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Res.* 2000;2(6):429-32.

-
100. Dessen A, Lawrence CM, Cupo S, Zaller DM, Wiley DC. X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*. octubre de 1997;7(4):473-81.
 101. Hennecke J, Wiley DC. Structure of a complex of the human alpha/beta T cell receptor (TCR) HA1.7, influenza hemagglutinin peptide, and major histocompatibility complex class II molecule, HLA-DR4 (DRA*0101 and DRB1*0401): insight into TCR cross-restriction and alloreactivity. *J Exp Med*. 4 de marzo de 2002;195(5):571-81.
 102. Rosloniec EF, Ivey RA, Whittington KB, Kang AH, Park H-W. Crystallographic structure of a rheumatoid arthritis MHC susceptibility allele, HLA-DR1 (DRB1*0101), complexed with the immunodominant determinant of human type II collagen. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de septiembre de 2006;177(6):3884-92.
 103. Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de julio de 2003;171(2):538-41.
 104. du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, et al. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum*. abril de 2005;52(4):1063-8.
 105. James EA, Moustakas AK, Bui J, Papadopoulos GK, Bondinas G, Buckner JH, et al. DR1001 presents 'altered-self' peptides derived from joint associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets. *Arthritis Rheum*. octubre de 2010;62(10):2909-18.
 106. Lee H-S, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, et al. Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum*. junio de 2007;56(6):1745-53.
 107. Busch R, Strang G, Howland K, Rothbard JB. Degenerate binding of immunogenic peptides to HLA-DR proteins on B cell surfaces. *Int Immunol*. 1990;2(5):443-51.
 108. Consogno G, Manici S, Facchinetti V, Bachi A, Hammer J, Conti-Fine BM, et al. Identification of immunodominant regions among promiscuous HLA-DR-restricted CD4+ T-cell epitopes on the tumor antigen MAGE-3. *Blood*. 1 de febrero de 2003;101(3):1038-44.
 109. Contreras CE, Ploton IN, Siliciano RF, Karp CL, Viscidi R, Kumar N. Mapping of specific and promiscuous HLA-DR-restricted T-cell epitopes on the Plasmodium falciparum 27-kilodalton sexual stage-specific antigen. *Infect Immun*. agosto de 1998;66(8):3579-90.
 110. Guttinger M, Romagnoli P, Vandel L, Meloen R, Takacs B, Pink JR, et al. HLA polymorphism and T cell recognition of a conserved region of p190, a malaria vaccine candidate. *Int Immunol*. septiembre de 1991;3(9):899-906.
 111. Kobayashi H, Song Y, Hoon DS, Appella E, Celis E. Tumor-reactive T helper lymphocytes recognize a promiscuous MAGE-A3 epitope presented by various

-
- major histocompatibility complex class II alleles. *Cancer Res.* 15 de junio de 2001;61(12):4773-8.
112. O'Sullivan D, Arrhenius T, Sidney J, Del Guercio MF, Albertson M, Wall M, et al. On the interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de octubre de 1991;147(8):2663-9.
113. O'Sullivan D, Sidney J, Appella E, Walker L, Phillips L, Colón SM, et al. Characterization of the specificity of peptide binding to four DR haplotypes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de septiembre de 1990;145(6):1799-808.
114. Ranasinghe S, Cutler S, Davis I, Lu R, Soghoian DZ, Qi Y, et al. Association of HLA-DRB1-restricted CD4⁺ T cell responses with HIV immune control. *Nat Med.* julio de 2013;19(7):930-3.
115. Roche PA, Cresswell P. High-affinity binding of an influenza hemagglutinin-derived peptide to purified HLA-DR. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 de marzo de 1990;144(5):1849-56.
116. Sinigaglia F, Guttinger M, Kilgus J, Doran DM, Matile H, Etlinger H, et al. A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules. *Nature.* 22 de diciembre de 1988;336(6201):778-80.
117. Wen W, Zhang L, Peng J, Chen J, Hao J, Li X, et al. Identification of promiscuous HLA-DR-restricted CD4⁺ T-cell epitopes on the cancer-testis antigen HCA587. *Cancer Sci.* agosto de 2011;102(8):1455-61.
118. Gourraud P-A, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev.* julio de 2012;248(1):87-103.
119. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* abril de 2016;36(2):115-27.
120. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* 10 de agosto de 2011;476(7359):214-9.
121. Wucherpfennig KW, Sette A, Southwood S, Oseroff C, Matsui M, Strominger JL, et al. Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J Exp Med.* 1 de enero de 1994;179(1):279-90.
122. Vogt AB, Kropshofer H, Kalbacher H, Kalbus M, Rammensee HG, Coligan JE, et al. Ligand motifs of HLA-DRB5*0101 and DRB1*1501 molecules delineated from self-peptides. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de agosto de 1994;153(4):1665-73.
123. Mohme M, Hotz C, Stevanovic S, Binder T, Lee J-H, Okoniewski M, et al. HLA-DR15-derived self-peptides are involved in increased autologous T cell proliferation in multiple sclerosis. *Brain J Neurol.* junio de 2013;136(Pt 6):1783-98.
124. Prat E, Tomaru U, Sabater L, Park DM, Granger R, Kruse N, et al. HLA-DRB5*0101 and -DRB1*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype. *J Neuroimmunol.* octubre de 2005;167(1-2):108-19.

-
125. York IA, Rock and KL. Antigen Processing and Presentation by the Class I Major Histocompatibility Complex. *Annu Rev Immunol.* 1996;14(1):369-96.
 126. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-79.
 127. Rechsteiner M, Hoffman L, Dubiel W. The multicatalytic and 26 S proteases. *J Biol Chem.* 25 de marzo de 1993;268(9):6065-8.
 128. Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R. The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1999;28:295-317.
 129. Wilk S, Orlowski M. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. *J Neurochem.* noviembre de 1980;35(5):1172-82.
 130. Harris JR. Release of a macromolecular protein component from human erythrocyte ghosts. *Biochim Biophys Acta.* 29 de abril de 1968;150(3):534-7.
 131. Stadtmueller BM, Hill CP. Proteasome activators. *Mol Cell.* 7 de enero de 2011;41(1):8-19.
 132. Vigneron N, Van den Eynde BJ. Proteasome subtypes and regulators in the processing of antigenic peptides presented by class I molecules of the major histocompatibility complex. *Biomolecules.* 18 de noviembre de 2014;4(4):994-1025.
 133. Raule M, Cerruti F, Benaroudj N, Migotti R, Kikuchi J, Bachi A, et al. PA28 $\alpha\beta$ reduces size and increases hydrophilicity of 20S immunoproteasome peptide products. *Chem Biol.* 24 de abril de 2014;21(4):470-80.
 134. Tomko RJ, Hochstrasser M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem.* 2013;82:415-45.
 135. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem.* 1992;61:761-807.
 136. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:801-47.
 137. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:739-79.
 138. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:1015-68.
 139. Grziwa A, Baumeister W, Dahlmann B, Kopp F. Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett.* 23 de septiembre de 1991;290(1-2):186-90.
 140. Pühler G, Weinkauff S, Bachmann L, Müller S, Engel A, Hegerl R, et al. Subunit stoichiometry and three-dimensional arrangement in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum*. *EMBO J.* abril de 1992;11(4):1607-16.

-
141. Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. 28 de abril de 1995;268(5210):533-9.
 142. Marques AJ, Palanimurugan R, Matias AC, Ramos PC, Dohmen RJ. Catalytic mechanism and assembly of the proteasome. *Chem Rev*. abril de 2009;109(4):1509-36.
 143. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:1015-68.
 144. Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R, Baumeister W. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*. 28 de abril de 1995;268(5210):579-82.
 145. Heinemeyer W, Fischer M, Krimmer T, Stachon U, Wolf DH. The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem*. 3 de octubre de 1997;272(40):25200-9.
 146. Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol*. mayo de 2003;35(5):606-16.
 147. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. febrero de 2009;10(2):104-15.
 148. Hirano Y, Kaneko T, Okamoto K, Bai M, Yashiroda H, Furuyama K, et al. Dissecting beta-ring assembly pathway of the mammalian 20S proteasome. *EMBO J*. 20 de agosto de 2008;27(16):2204-13.
 149. Guillaume B, Chapiro J, Stroobant V, Colau D, Van Holle B, Parvizi G, et al. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de octubre de 2010;107(43):18599-604.
 150. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(1):73-8.
 151. Unno M, Mizushima T, Morimoto Y, Tomisugi Y, Tanaka K, Yasuoka N, et al. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Struct Lond Engl* 1993. mayo de 2002;10(5):609-18.
 152. Aki M, Shimbara N, Takashina M, Akiyama K, Kagawa S, Tamura T, et al. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem (Tokyo)*. febrero de 1994;115(2):257-69.
 153. Groettrup M, van den Broek M, Schwarz K, Macagno A, Khan S, de Giuli R, et al. Structural plasticity of the proteasome and its function in antigen processing. *Crit Rev Immunol*. 2001;21(4):339-58.
 154. Witt E, Zantopf D, Schmidt M, Kraft R, Kloetzel PM, Krüger E. Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. *J Mol Biol*. 4 de agosto de 2000;301(1):1-9.

-
155. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature*. 16 de septiembre de 1993;365(6443):264-7.
 156. Driscoll J, Brown MG, Finley D, Monaco JJ. MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature*. 16 de septiembre de 1993;365(6443):262-4.
 157. Kincaid EZ, Che JW, York I, Escobar H, Reyes-Vargas E, Delgado JC, et al. Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nat Immunol*. 25 de diciembre de 2011;13(2):129-35.
 158. Martinez CK, Monaco JJ. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. *Nature*. 17 de octubre de 1991;353(6345):664-7.
 159. Glynne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J. A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature*. 26 de septiembre de 1991;353(6342):357-60.
 160. Chapiro J, Claverol S, Piette F, Ma W, Stroobant V, Guillaume B, et al. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de enero de 2006;176(2):1053-61.
 161. Murata S, Sasaki K, Kishimoto T, Niwa S-I, Hayashi H, Takahama Y, et al. Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science*. 1 de junio de 2007;316(5829):1349-53.
 162. Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Kaer LV, Monaco JJ, et al. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med*. 5 de enero de 1998;187(1):97-104.
 163. Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 de agosto de 1997;94(17):8970-5.
 164. Kingsbury DJ, Griffin TA, Colbert RA. Novel propeptide function in 20 S proteasome assembly influences beta subunit composition. *J Biol Chem*. 4 de agosto de 2000;275(31):24156-62.
 165. Tomaru U, Ishizu A, Murata S, Miyatake Y, Suzuki S, Takahashi S, et al. Exclusive expression of proteasome subunit {beta}5t in the human thymic cortex. *Blood*. 21 de mayo de 2009;113(21):5186-91.
 166. Dahlmann B, Ruppert T, Kuehn L, Merforth S, Kloetzel PM. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. *J Mol Biol*. 10 de noviembre de 2000;303(5):643-53.
 167. Scholz E, Mestre-Ferrer A, Daura X, García-Medel N, Carrascal M, James EA, et al. A Comparative Analysis of the Peptide Repertoires of HLA-DR Molecules Differentially Associated With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. octubre de 2016;68(10):2412-21.

-
168. Alvarez I, Collado J, Daura X, Colomé N, Rodríguez-García M, Gallart T, et al. 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.* junio de 2008;58(6):1630-9.
 169. Zemmour J, Little AM, Schendel DJ, Parham P. The HLA-A,B «negative» mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 de marzo de 1992;148(6):1941-8.
 170. Marcilla M, de Castro JAL, Castaño JG, Alvarez I. Infection with *Salmonella typhimurium* has no effect on the composition and cleavage specificity of the 20S proteasome in human lymphoid cells. *Immunology.* septiembre de 2007;122(1):131-9.
 171. Hume CR, Shookster LA, Collins N, O'Reilly R, Lee JS. Bare lymphocyte syndrome: altered HLA class II expression in B cell lines derived from two patients. *Hum Immunol.* mayo de 1989;25(1):1-11.
 172. Kovats S, Nepom GT, Coleman M, Nepom B, Kwok WW, Blum JS. Deficient antigen-presenting cell function in multiple genetic complementation groups of type II bare lymphocyte syndrome. *J Clin Invest.* julio de 1995;96(1):217-23.
 173. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* julio de 1977;36(1):59-74.
 174. Belfiore A, Mauerhoff T, Pujol-Borrell R, Badenhop K, Buscema M, Mirakian R, et al. De novo HLA class II and enhanced HLA class I molecule expression in SV40 transfected human thyroid epithelial cells. *J Autoimmun.* junio de 1991;4(3):397-414.
 175. Barnstable CJ, Bodmer WF, Brown G, Galfre G, Milstein C, Williams AF, et al. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell.* mayo de 1978;14(1):9-20.
 176. Bontrop R, Ottenhoff T, Van Miltenburg R, Elferink D, De Vries R, Giphart M. Quantitative and qualitative differences in HLA-DR molecules correlated with antigen-presentation capacity. *Eur J Immunol.* febrero de 1986;16(2):133-8.
 177. Rebai N, Malissen B, Pierres M, Accolla RS, Corte G, Mawas C. Distinct HLA-DR epitopes and distinct families of HLA-Dr molecules defined by 15 monoclonal antibodies (mAb) either anti-DR or allo-anti-I-Ak cross-reacting with human DR molecule. I. Cross-inhibition studies of mAb cell surface fixation and differential binding of mAb to detergent-solubilized HLA molecules immobilized to a solid phase by a first mAb. *Eur J Immunol.* febrero de 1983;13(2):106-11.
 178. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 15 de agosto de 1970;227(5259):680-5.
 179. Muixí L, Gay M, Muñoz-Torres PM, Guitart C, Cedano J, Abian J, et al. The peptide-binding motif of HLA-DR8 shares important structural features with other type 1 diabetes-associated alleles. *Genes Immun.* octubre de 2011;12(7):504-12.

-
180. García-Medel N, Sanz-Bravo A, Van Nguyen D, Galocha B, Gómez-Molina P, Martín-Esteban A, et al. Functional interaction of the ankylosing spondylitis-associated endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 polymorphism and HLA-B27 in vivo. *Mol Cell Proteomics MCP*. noviembre de 2012;11(11):1416-29.
 181. Alvarez I, Collado JA, Colobran R, Carrascal M, Ciudad MT, Canals F, et al. Central T cell tolerance: Identification of tissue-restricted autoantigens in the thymus HLA-DR peptidome. *J Autoimmun*. junio de 2015;60:12-9.
 182. Espinosa G, Collado JA, Scholz E, Mestre-Ferrer A, Kuse N, Takiguchi M, et al. Peptides presented by HLA class I molecules in the human thymus. *J Proteomics*. 6 de diciembre de 2013;94:23-36.
 183. Andreatta M, Karosiene E, Rasmussen M, Stryhn A, Buus S, Nielsen M. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. *Immunogenetics*. noviembre de 2015;67(11-12):641-50.
 184. Paradela A, Alvarez I, García-Peydró M, Sesma L, Ramos M, Vázquez J, et al. Limited diversity of peptides related to an alloreactive T cell epitope in the HLA-B27-bound peptide repertoire results from restrictions at multiple steps along the processing-loading pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de enero de 2000;164(1):329-37.
 185. Neefjes J, Ovaa H. A peptide's perspective on antigen presentation to the immune system. *Nat Chem Biol*. diciembre de 2013;9(12):769-75.
 186. Chicz RM, Urban RG, Lane WS, Gorga JC, Stern LJ, Vignali DA, et al. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature*. 27 de agosto de 1992;358(6389):764-8.
 187. Muntasell A, Carrascal M, Alvarez I, Serradell L, van Veelen P, Verreck FAW, et al. 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 Baltim Md 1950*. 15 de julio de 2004;173(2):1085-93.
 188. Scally SW, Petersen J, Law SC, Dudek NL, Nel HJ, Loh KL, et al. A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 18 de noviembre de 2013;210(12):2569-82.
 189. Rosloniec EF, Whittington KB, Zaller DM, Kang AH. HLA-DR1 (DRB1*0101) and DR4 (DRB1*0401) use the same anchor residues for binding an immunodominant peptide derived from human type II collagen. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de enero de 2002;168(1):253-9.
 190. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*. enero de 2006;54(1):38-46.
 191. Seward RJ, Drouin EE, Steere AC, Costello CE. Peptides presented by HLA-DR molecules in synovia of patients with rheumatoid arthritis or antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Mol Cell Proteomics MCP*. marzo de 2011;10(3):M110.002477.

-
192. Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. noviembre de 1999;50(3-4):213-9.
 193. Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW. Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med*. 19 de octubre de 1998;188(8):1511-20.
 194. Lang HLE, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol*. octubre de 2002;3(10):940-3.
 195. Li Y, Huang Y, Lue J, Quandt JA, Martin R, Mariuzza RA. Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule. *EMBO J*. 7 de septiembre de 2005;24(17):2968-79.
 196. Li Y, Li H, Martin R, Mariuzza RA. Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in different registers by two HLA-DR2 proteins. *J Mol Biol*. 24 de noviembre de 2000;304(2):177-88.
 197. De M, Jayarapu K, Elenich L, Monaco JJ, Colbert RA, Griffin TA. Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly. *J Biol Chem*. 21 de febrero de 2003;278(8):6153-9.
 198. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med*. 2 de julio de 2001;194(1):1-12.
 199. Guillaume B, Stroobant V, Bousquet-Dubouch M-P, Colau D, Chapiro J, Parmentier N, et al. Analysis of the processing of seven human tumor antigens by intermediate proteasomes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de octubre de 2012;189(7):3538-47.
 200. Schultz ES, Chapiro J, Lurquin C, Claverol S, Burlet-Schiltz O, Warnier G, et al. The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J Exp Med*. 18 de febrero de 2002;195(4):391-9.
 201. van der Bruggen P, Bastin J, Gajewski T, Coulie PG, Boël P, De Smet C, et al. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur J Immunol*. diciembre de 1994;24(12):3038-43.
 202. Ma W, Vigneron N, Chapiro J, Stroobant V, Germeau C, Boon T, et al. A MAGE-C2 antigenic peptide processed by the immunoproteasome is recognized by cytolytic T cells isolated from a melanoma patient after successful immunotherapy. *Int J Cancer*. 15 de noviembre de 2011;129(10):2427-34.

PUBLICACIONES

Scholz E, Mestre-Ferrer A, Daura X, García-Medel N, Carrascal M, James EA, Kwok WW, Canals F, Álvarez I.

A Comparative Analysis of the Peptide Repertoires of HLA-DR Molecules Differentially Associated With Rheumatoid Arthritis. Publicado en: *Arthritis&Rheumatology*. 2016 Oct;68(10):2412-21. doi: 10.1002/art.39736. PMID:27158783

Scholz Erika, Miguel Marcilla, Xavier Daura, Eddie A. James and Iñaki Alvarez. HLA-DRB1*15:01 and HLA-DRB5*01:01 present complimentary peptide repertoires. Manuscrito enviado a publicar.

Espinosa G, Collado JA, **Scholz E**, Mestre-Ferrer A, Kuse N, Takiguchi M, Carrascal M, Canals F, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D, Alvarez I. Peptides presented by HLA class I molecules in the human thymus. *J Proteomics*. **2013** Dec 6;94:23-36. doi: 10.1016/j.jprot.2013.08.023. Epub 2013 Sep 9. PMID:24029068

Codina-Busqueta E, **Scholz E**, Muñoz-Torres PM, Roura-Mir C, Costa M, Xufré C, Planas R, Vives-Pi M, Jaraquemada D, Martí M. **TCR** bias of in vivo expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1 diabetes. *J Immunol*. **2011** Mar 15;186(6):3787-97. doi: 10.4049/jimmunol.1002423. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21325620

