

Estudio de la presentación de péptidos por HLA clase II mediante técnicas proteómicas

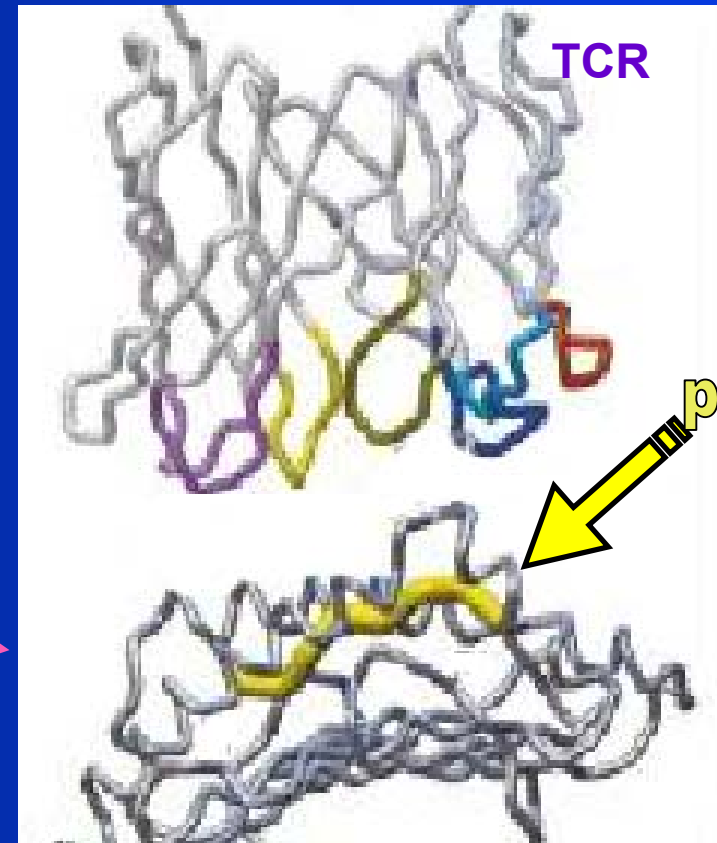
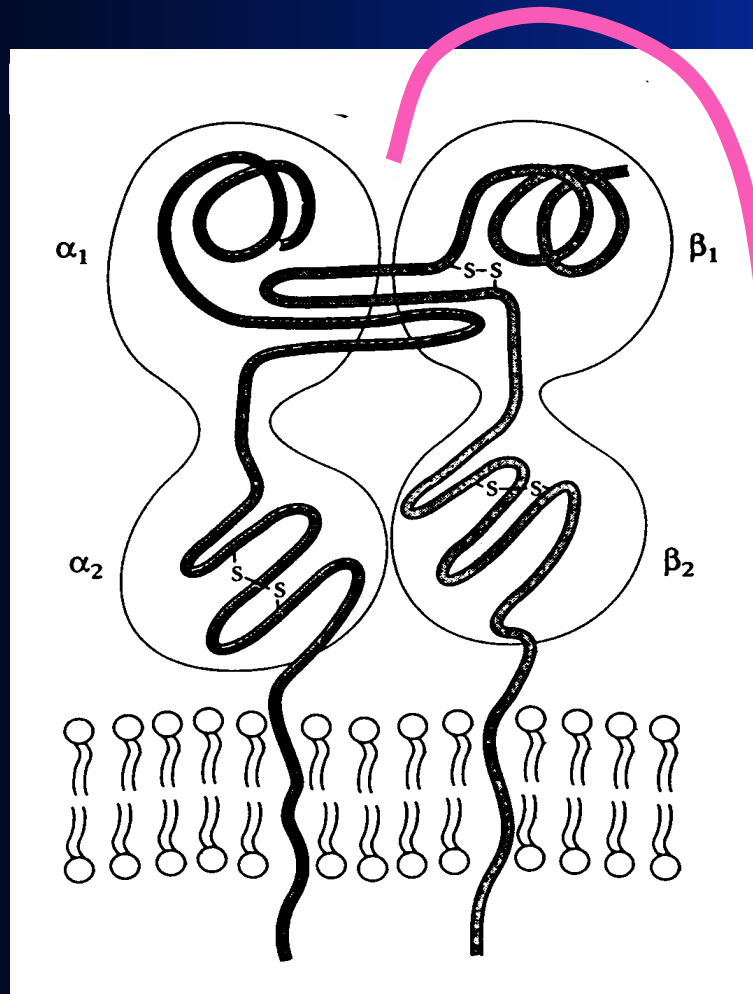
M.Carrascal, L.Muixi¹, P.Ruperez, D.Jaraquemada¹ y J.Abián

Biological and Structural Mass Spectrometry Unit, IIBB/CSIC-IDIBAPS) and Immunology Unit, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB, Barcelona, Spain

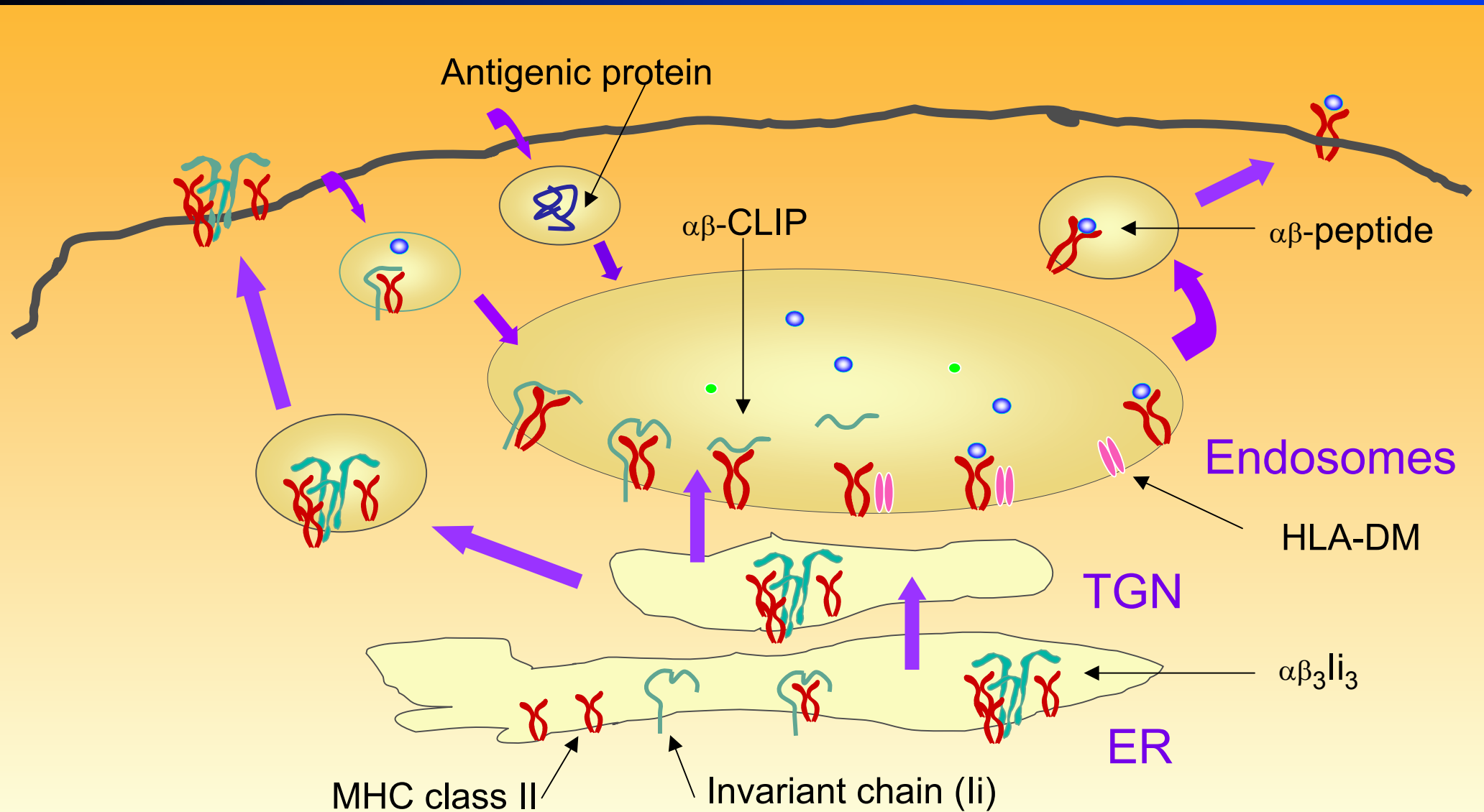


- Secuenciación de péptidos presentados por HLA-II
- Comparación de los repertorios observados en células transfectadas y en una APC profesional
- Influencia de las moléculas Ii y HLA-DM en el repertorio
- Proteoma de la célula RIN transfectada
- Chaperonas alternativas a Ii y DM
- Identificación de péptidos antigénicos en tiroides autoinmunes humanos

MOLÉCULA DE MHC-II



Class II biosynthetic pathway





MOLECULAS DE MHC DE CLASE II

- Las moléculas de MHC de clase II se expresan en células presentadoras de antígenos (APC) y están especializadas en la presentación de antígeno exógeno.

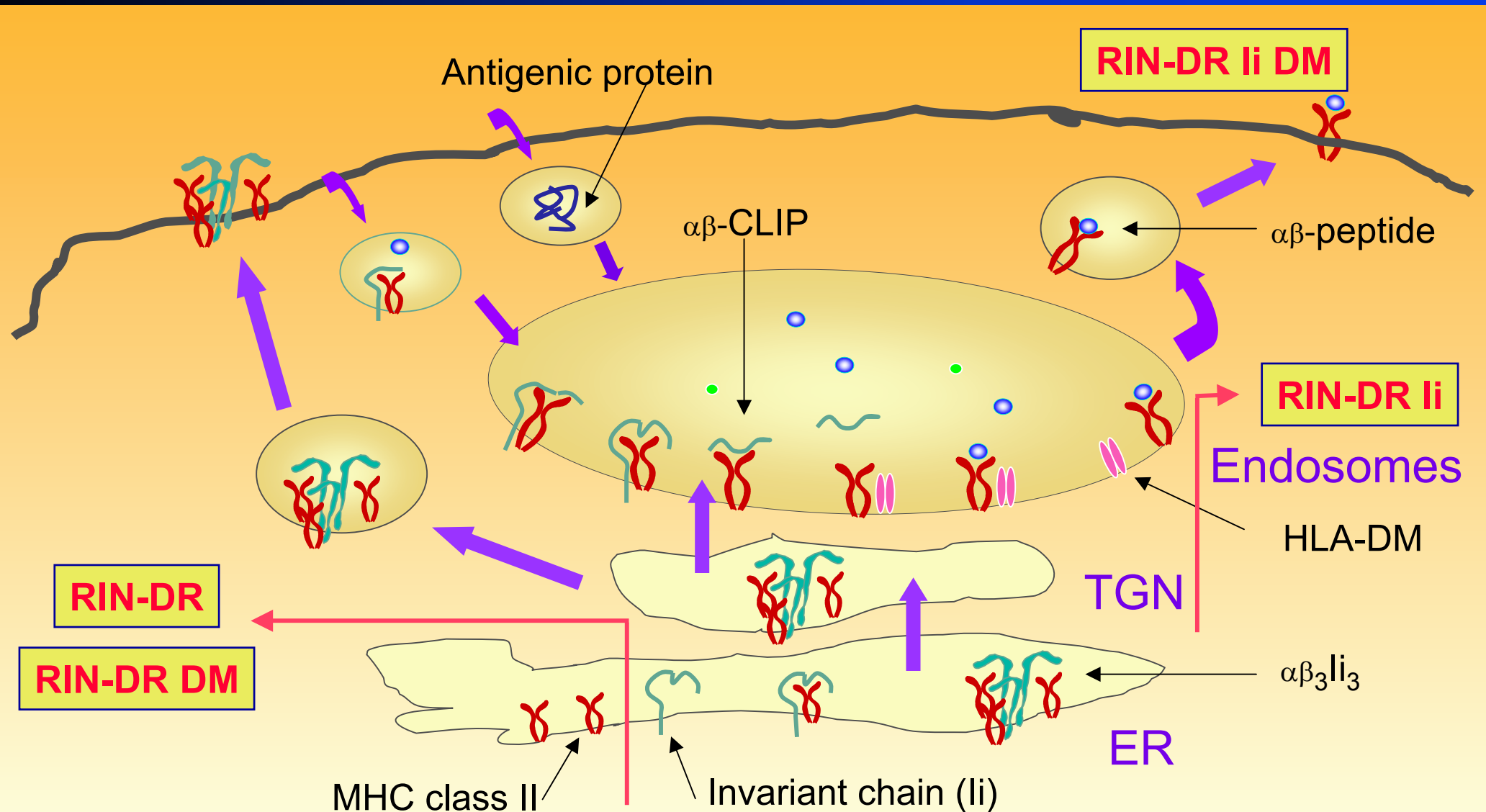
- Las moléculas de clase II también pueden expresarse en células epiteliales y pueden presentar antígenos endógenos.

Relevancia: selección tímica, **autoinmunidad**, aloreconocimiento

- Los mecanismos de procesamiento y presentación de autoantígeno por las células epiteliales en enfermedades autoinmunes podrían ser diferentes a los utilizados por las APC profesionales.

- Las interacciones entre células epiteliales y células T son importantes en los procesos autoinmunes y están muy influenciadas por el repertorio peptídico.

Class II biosynthetic pathway



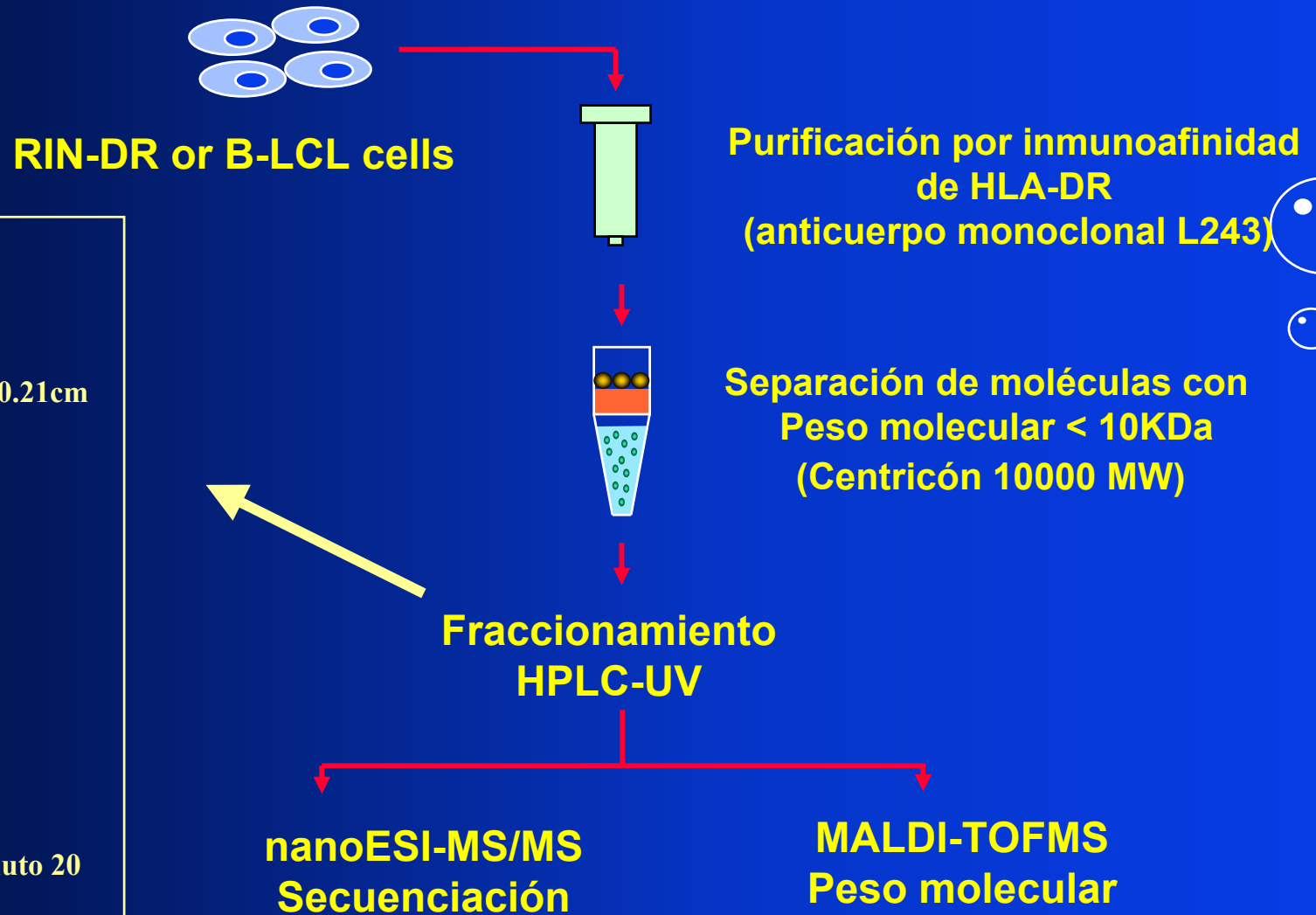
ANALISIS DE PEPTIDOS PROCEDENTES DE MOLÉCULAS DE MHC CLASE II

- . Cantidad de muestra (3×10^9 células)
- . Baja concentración de péptidos (30-300 fmol/ 10^8 cel.)
- . Heterogeneidad de pool peptídico.
- . Tamaño de los péptidos: 14-28 aa
- . Matriz compleja
- . Péptidos desconocidos (El inmunoensayo no sirve)



**ESPECTROMETRÍA DE MASAS
EDMAN**

IDENTIFICACION DE PEPTIDOS UNIDOS A MOLECULAS DE MHC DE CLASE II



A: H₂O/AcN/TFA 95/5/0.05
B: AcN/H₂O/TFA 80/20/0.05

Columna:
Vydac Protein & Peptide C18 25*0.21cm

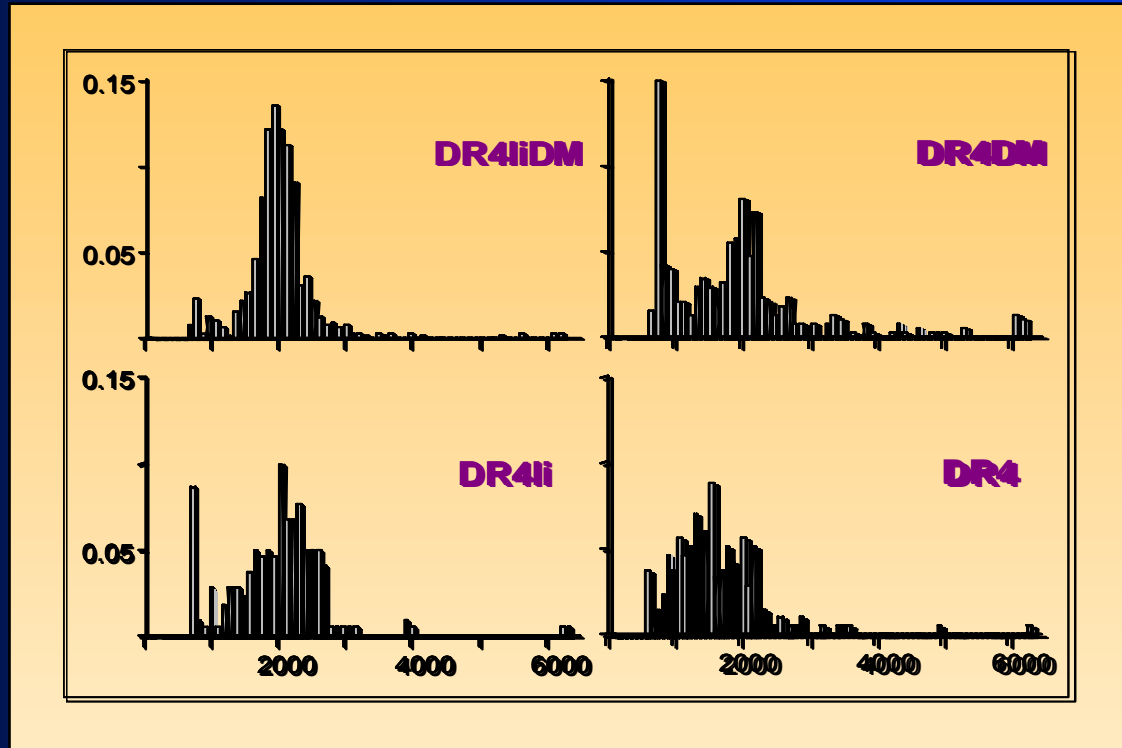
<u>Programa:</u>	<u>Time</u>	<u>%B</u>
	0	0
	15	0
	90	60
	95	90
	100	90

Flujo: 200 µl/min

Detector: UV a 214 nm

Fracciones: Se recogen desde minuto 20 al 100, una fracción cada minuto.
Para el análisis MS se evaporan a sequedad y se redisuelven en MeOH/H₂O 1/1 1% AcOH

ANALISIS DE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS MEDIANTE MALDI-TOF



Histograma de frecuencia de masas de los péptidos asociados a HLA-DR4 en las líneas celulares DR4IiDM, DR4DM, DR4Ii y DR4. Anchura de Rangos= 100 Da.

SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS PRESENTADOS POR MOLÉCULAS DE MHC DE CLASE II

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS

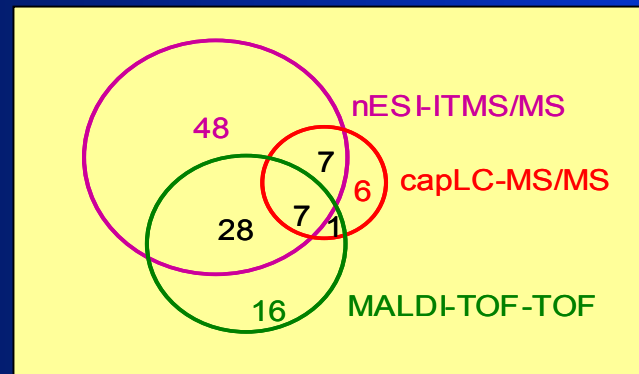
Fr HPLC	Técnica secuenciación			Mr (Da)	Motivo unión DR4	nº aa	Proteína origen (aa _a -aa _r)	acceso DB	L.*	IA**
	nESI	TOF TOF	µLC		P P P P P P P P P P 1 2 3 4 5 6 7 8 9					
34	x			1577.8	F V K D Q T V I Q N T D G N	14	Serotransferrin (559-572)			
41,42	x			1691.8	D V A F V K D Q T V I Q N T D	15	Serotransferrin (556-570)			
42	x			1749.9	D V A F V K D Q T V I Q N T D G	16	Serotransferrin (556-571)	Q29443	E	6
41	x			1805.9	G D V A F V K D Q T V I Q N T D G	17	Serotransferrin (555-571)			
41	x			1862.9	D V A F V K D Q T V I Q N T D G N	17	Serotransferrin (556-572)			
41	x			1919.9	G D V A F V K D Q T V I Q N T D G N	18	Serotransferrin (555-572)			
39	x	x		2230.1	K P V V A E F H G T K D N P Q T H Y Y	19	Serotransferrin (96-114)	Q29443	E	1.7
31	x			1779.9	I K E K Y G K D A T N V G D E G G	17	α-enolase (196-212)	P06733	C	3.4
53	x			1923.0	G V P L Y R H I A D L A G N S E V I	18	α-enolase (126-143)	P06733	C	1.8
37	x			1565.8	I E K F E K E A A E M G K G	14	Elongation Factor ? (1-16)	P24534	C	0.8
38		x		1241.7	F V R F D S D A A S Q	11	HLA-A2, A69 (57-67, 29-42)			
37	x			1397.7	F V R F D S D A A S Q R	12	HLA-A2, A69 (57-68, 29-43)			
40	x	x	x	1626.8	T Q F V R F D S D A A S Q R	14	HLA-A2, A69 (55-68, 27-43)			
40,41	x	x	x	1741.8	D T Q F V R F D S D A A S Q R	15	HLA-A2, A69 (54-68, 26-43)			
44	x			1872.9	D T Q F V R F D S D A A S Q R M	16	HLA-A2, A69 (54-69, 26-44)			
42	x		x	1955.9	V D D T Q F V R F D S D A A S Q R	17	HLA-A2, A69 (52-68, 24-43)			
41	x	x		1856.8	D D T Q F V R F D S D A A S Q R	17	HLA-A2, A69 (53-68, 25-43)			
44	x			1984.8	D D T Q F V R F D S D A A S Q R M	17	HLA-A2, A69 (53-69, 25-44)			
43		x		1998.8	D T Q F V R F D S D A A S Q R M E	17	HLA-A2, A69 (54-70, 26-45)			
44,45	x	x	x	2098.9	D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P	18	HLA-A2, A69 (54-71, 26-46)	P01892 P10316	M	3
44	x			2216.0	V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E	19	HLA-A2, A69 (52-70, 24-45)			
45		x		2214.1	D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P	19	HLA-A2, A69 (53-71, 25-46)			
43		x	x	2271.0	D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R	19	HLA-A2, A69 (54-72, 24-47)			
			x	2370.3	D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R	20	HLA-A2, A69 (53-72, 25-45)			
46	x	x	x	2313.0	V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P	20	HLA-A2, A69 (52-71, 24-46)			
44,45	x		x	2469.1	V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R	21	HLA-A2, A69 (52-72, 24-45)			
51	x	x		2823.3	V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W	24	HLA-A2, A69 (52-75, 24-48)			
52,53	x	x		3065.3	V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E	26	HLA-A2, A69 (52-77, 24-50)			
54		x		3327.6	Y V V D D T Q F V R F D S D A A S Q R M E P R A P W I E	28	HLA-A2, A69 (50-77, 22-50)			
38		x		1366.7	F V R F D S D A A S P R	12	HLA-B35 /HLA-Cw04 (58-68)			
41	x	x		1595.8	T Q F V R F D S D A A S P R	14	HLA-B35 /HLA-Cw04 (55-68)			
41	x	x	x	1710.8	D T Q F V R F D S D A A S P R	15	HLA-B35 /HLA-Cw04 (54-68)	P30685 P30481	M	3
39,42	x	x		1825.8	D D T Q F V R F D S D A A S P R	16	HLA-B35 /HLA-Cw04 (53-68)			
43	x	x		1924.8	V D D T Q F V R F D S D A A S P R	17	HLA-B35 /HLA-Cw04 (52-68)			

SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS PRESENTADOS POR MOLÉCULAS DE MHC DE CLASE II

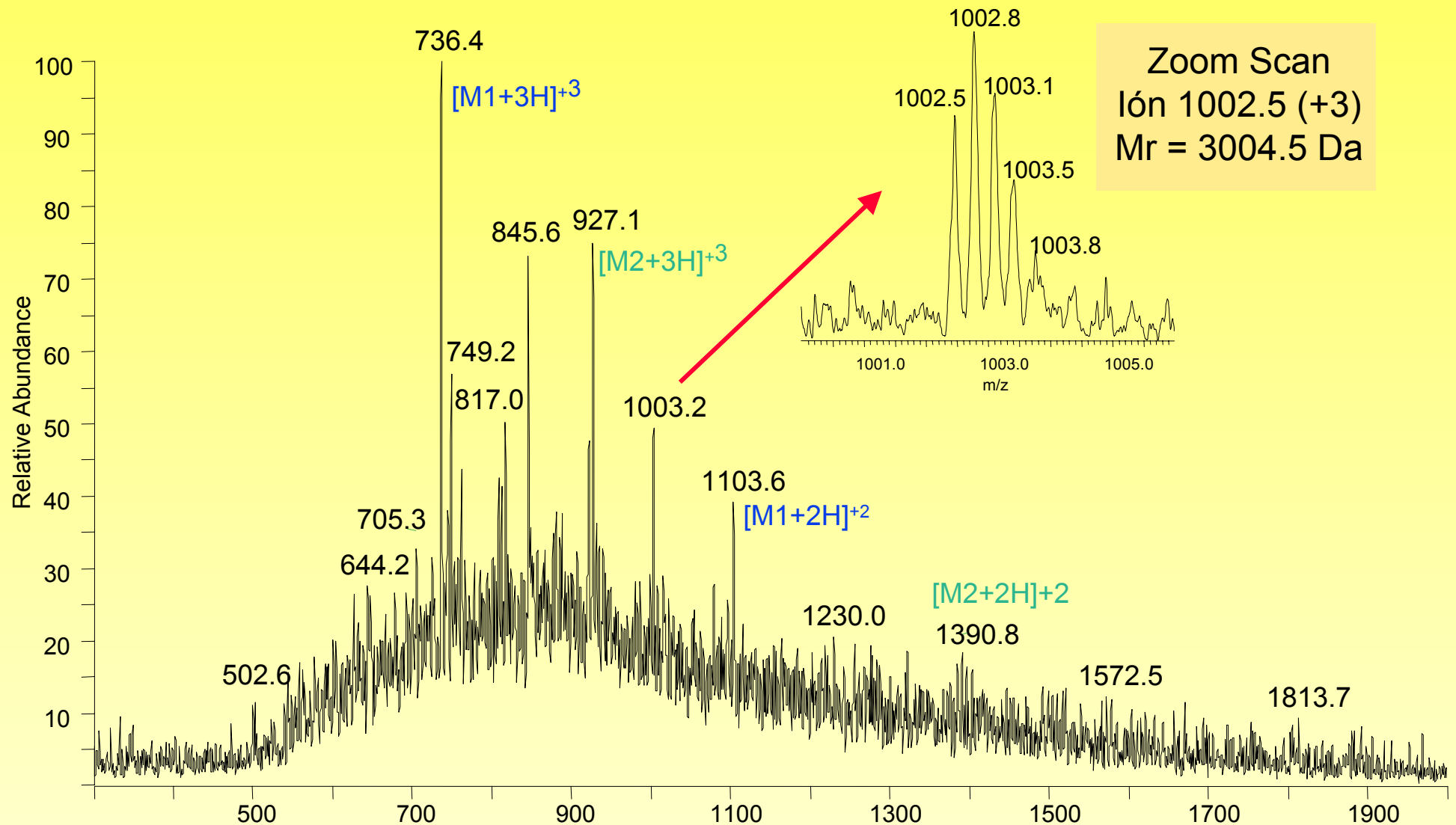
COMPARACIÓN DE TÉCNICAS

Comparación de resultados en la caracterización del repertorio peptídico mediante nESI-ITMS/MS, MALDI-TOF/TOF y capLC-ESIMS/MS.

Técnica	Consumo de muestra (%)	péptidos identificados	Automatización	proteínas identificadas	epítomos caracterizados
nESI - ITMS/MS	40%	90	-	22	27
MALDI - TOF - TOF	8%	52	+	20	21
capLC - MS/MS	16%	21	+++	9	7
TOTAL	-	113	-	25	32



FRACCION 49, B-LCL

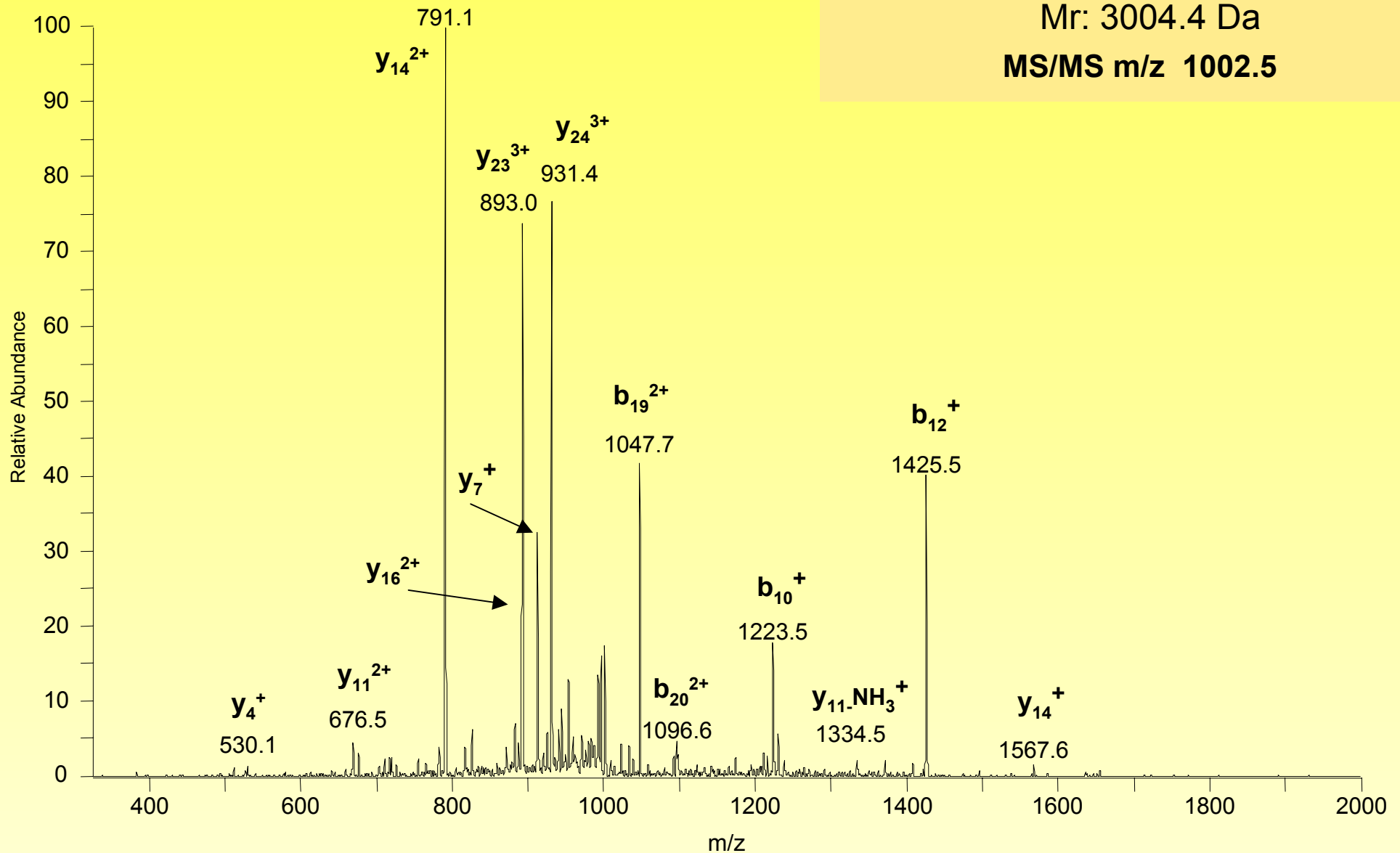


FRACTION 49, B-LCL

VDDTQFVRFDSDAAAPRGEPREPWVE

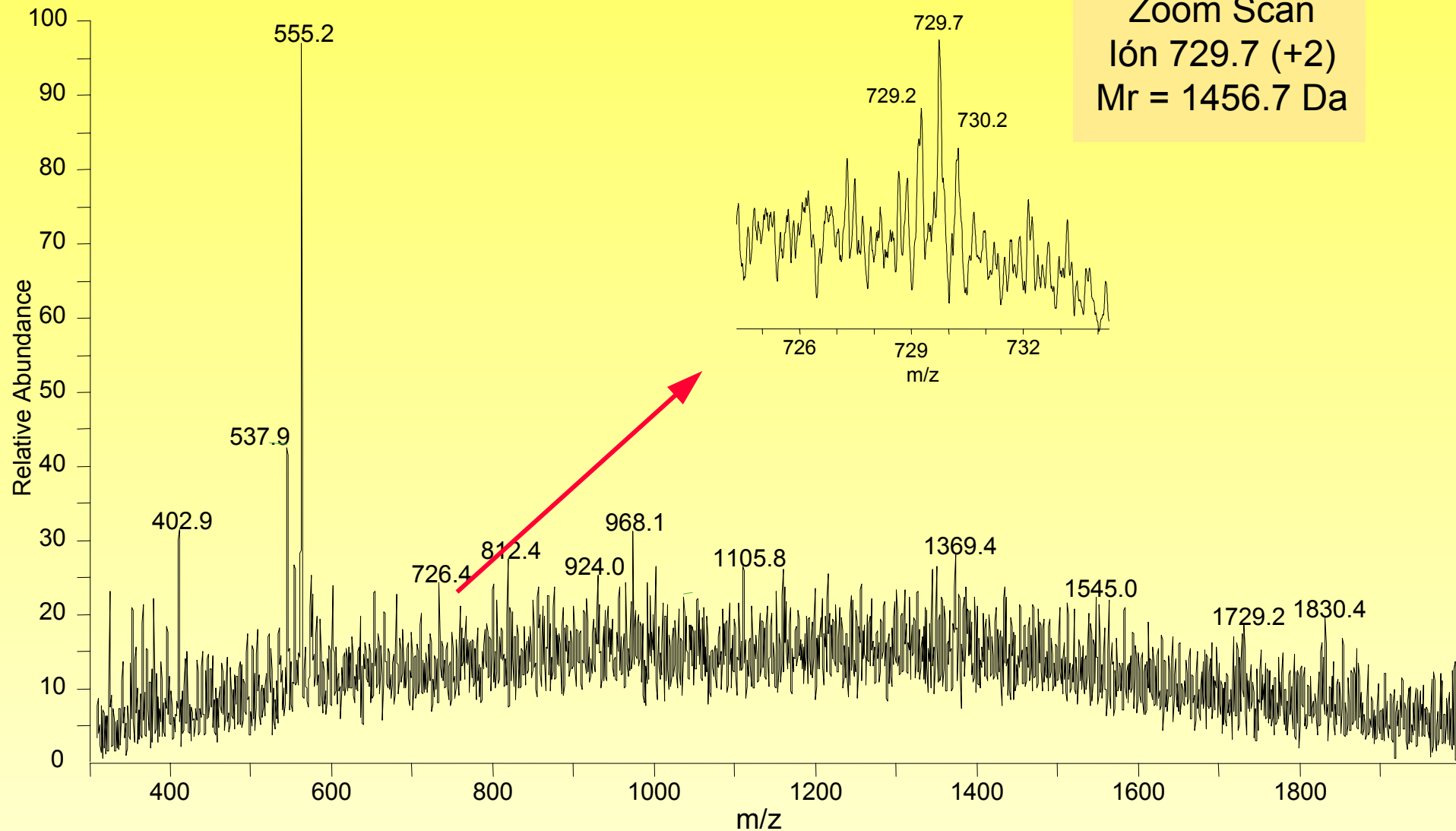
Mr: 3004.4 Da

MS/MS m/z 1002.5



FRACCION 31, B-LCL

Full MS
 $m/z = 300-2000$



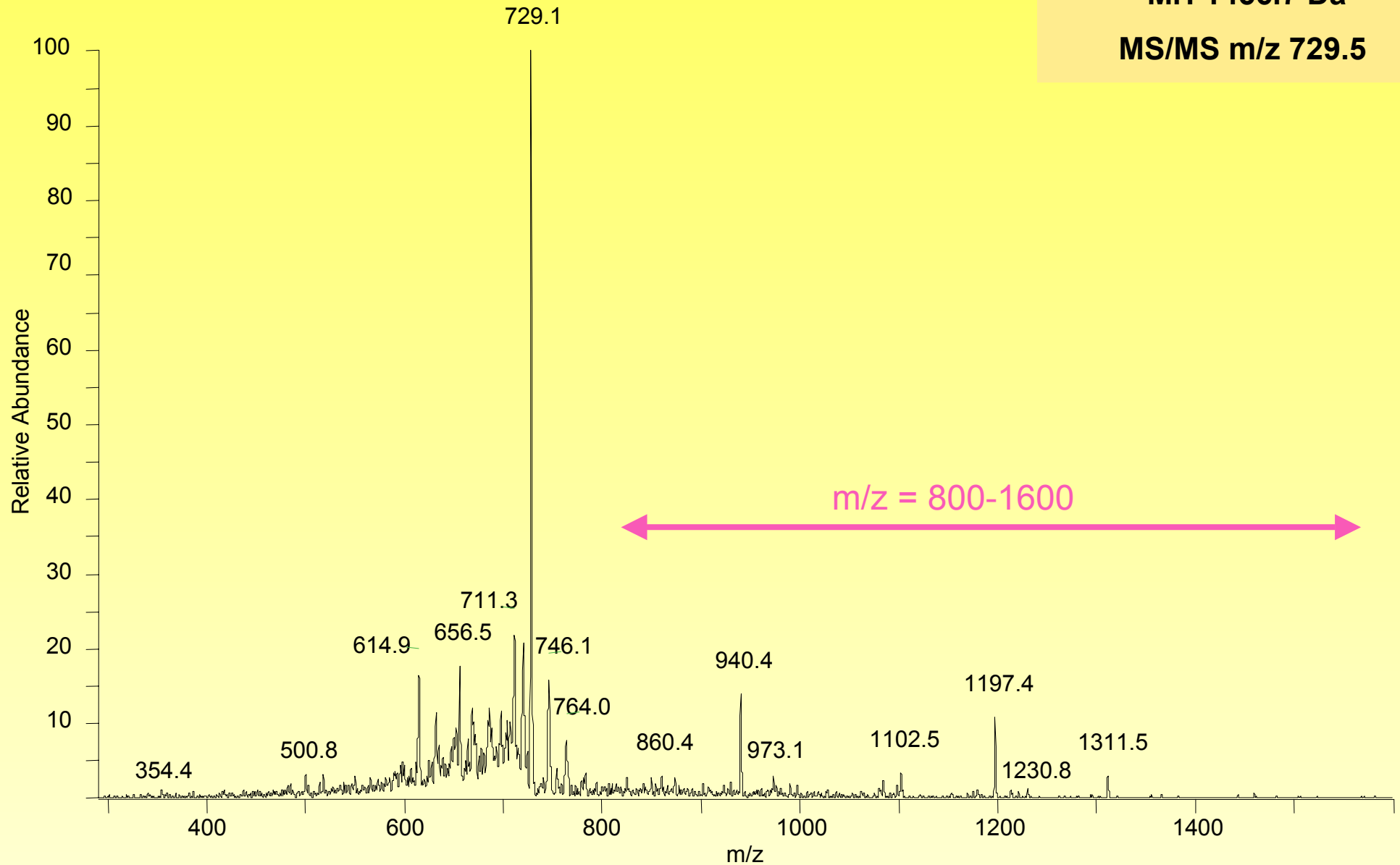
Zoom Scan
Ión 729.7 (+2)
Mr = 1456.7 Da

FRACCION 31, B-LCL

LNQELRADGTVNQ

Mr: 1456.7 Da

MS/MS m/z 729.5

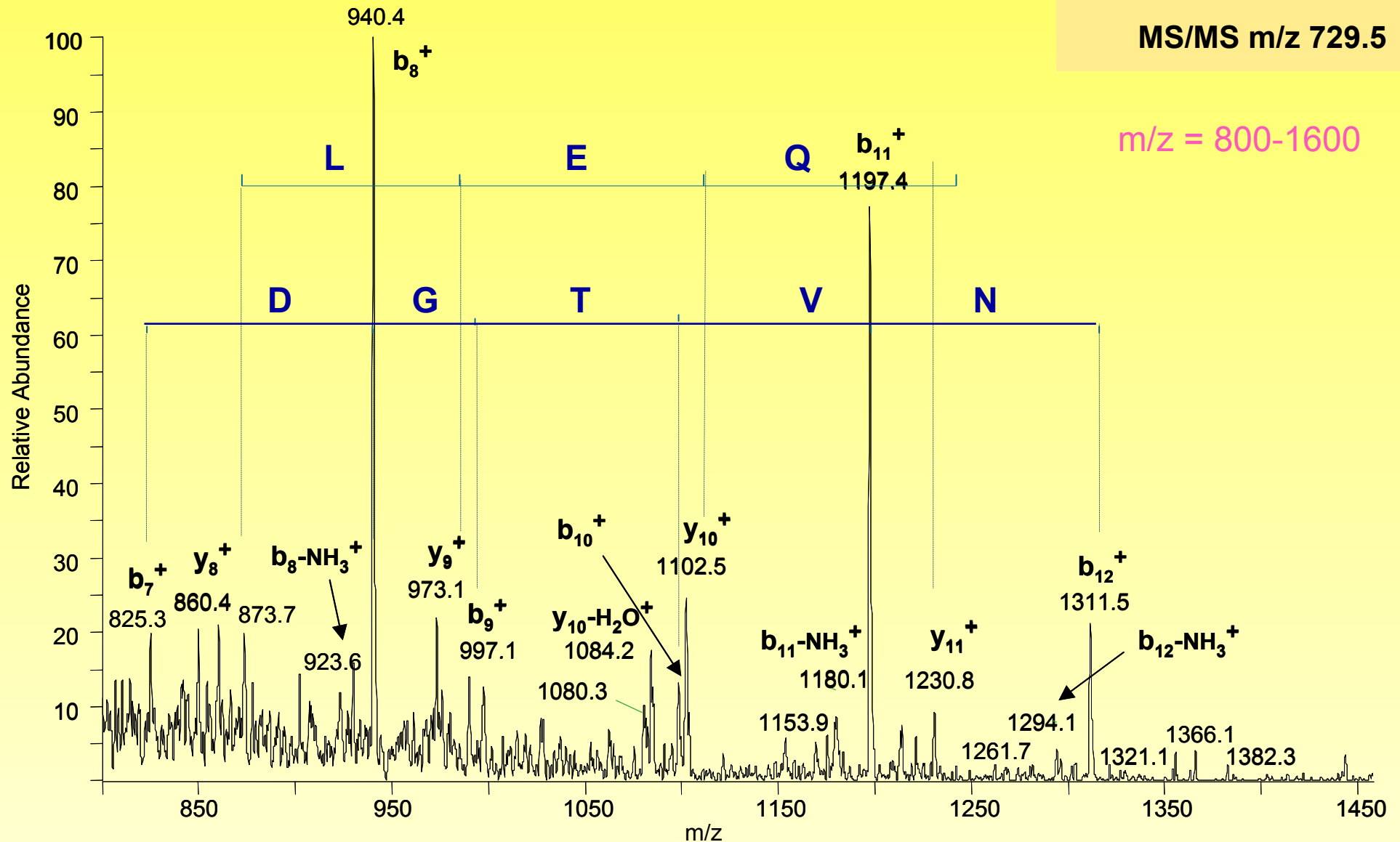


FRACCION 31, B-LCL

LNQELRADGTVNQ

Mr: 1456.7 Da

MS/MS m/z 729.5



Estudio de la presentación de péptidos por HLA clase II mediante técnicas proteómicas

M.Carrascal, L.Muixi¹, P.Ruperez, D.Jaraquemada¹ y J.Abián

Biological and Structural Mass Spectrometry Unit, IIBB/CSIC-IDIBAPS) and Immunology Unit, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB, Barcelona, Spain

Secuenciación de péptidos presentados por HLA-II



Comparación de los repertorios observados en células transfectadas y en una APC profesional

- Influencia de las moléculas Ii y HLA-DM en el repertorio
- Proteoma de la célula RIN transfectada
- Chaperonas alternativas a Ii y DM
- Identificación de péptidos antigénicos en tiroides autoinmunes humanos

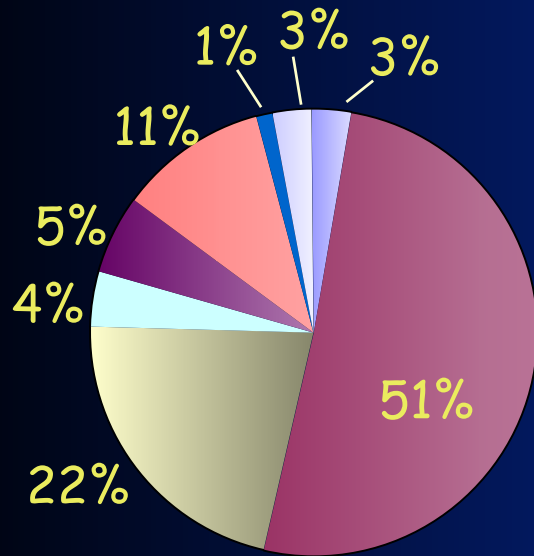
PEPTIDOS PRESENTADOS POR CELULAS EPITELIALES (CELULAS RIN DR4IiDM)

DR4 motif	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Source protein										
Exogenous																				
	G	D	V	A	F	V	K	D	Q	T	V	Y	Q	N	T	D	G	Transferrin (555-571)		
	D	L	R	H	T	F	S	G	V	A	S	V	E	S	S	S	G	E	Fetuin (311-329)	
Y	D	R	N	T	K	S	P	L	F	V	G	K	V	V	N	P	T	Q	A	Alpha-1-antiproteinase precursor (397-416)
	V	A	Q	A	S	L	G	E	Y	L	F	E	R	L	T	L	K	H	D	Ferritin light chain (165-183)
Surface membrane																				
	N	P	T	T	Y	Q	M	D	V	N	P	E	G	K	Y	S				Epidermal Growth Factor Receptor (271-286)
Y	N	P	T	T	Y	Q	M	D	V	N	P	E	G	K	Y	S				Epidermal Growth Factor Receptor (270-286)
	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K	G					MHC class I (55-69)
R	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K	G					MHC class I (54-69)
	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K	G	H				MHC class I (55-71)
R	E	G	P	E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K	G	H	E			MHC class I (54-71)
Y	V	D	D	T	E	F	V	R	Y	D	S	D	A	E	N	P	R			MHC class I (28-45)
	A	E	Y	E	V	Y	V	V	A	E	N	Q	Q	G	K	S	K	A		N-CAM (679-696)
N	A	E	Y	E	V	Y	V	V	A	E	N	Q	Q	G	K	S	K	A		N-CAM (678-696)
	G	I	V	Y	T	G	D	R	T	V	M	G	R	I						ATPase α subunit (258-273)
		I	V	Y	T	G	D	R	T	V	M	G	R	I	A					ATPase α subunit (259-274)
	G	I	V	Y	T	G	D	R	T	V	M	G	R	I	A					ATPase α subunit (258-274)
	G	I	V	Y	T	G	D	R	T	V	m	G	R	I	A					ATPase α subunit (258-274)
	V	H	N	Y	F	A	I	D	P	T	T	G	A	I	H	T				Protocadherin (1818-1834)
E	P	S	V	H	N	Y	F	A	I	D	P	T	T	G	A	I	H			Protocadherin (1815-1833)
	K	N	K	D	Y	Y	I	I	S	T	S	N	G	S	L	E	G			Ephrin B2 precursor (129-145)
		T	S	W	T	A	E	K	S	I	A	Q	L	N	S	K				Neprilysin (180-194)

PEPTIDOS PRESENTADOS POR APC (CELULAS B-LCL)

DR4 motif	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Source protein													
Surface membrane																							
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M	E	P	R	HLA-A2 (28-48)		
			D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M	E	P	HLA-A2 (30-47)		
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M	E			HLA-A2 (28-46)		
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R					HLA-A2 (28-44)		
			D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M			HLA-A2 (30-45)		
			D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R				HLA-A2 (30-44)		
			T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R					HLA-A2 (31-44)		
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	T	E	P	R	HLA-B35 (27-47)		
			D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	T	E	P	HLA-B35 (29-46)		
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	T	E	P		HLA-B35 (27-46)		
			D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R			HLA-B35 (28-43)		
			E	D	L	S	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q	R	HLA-C (122-139)		
			D	L	S	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q	R		HLA-C (123-139)		
			L	S	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q				HLA-C (124-138)		
			L	S	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T					HLA-C (124-137)		
			E	D	L	R	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q		HLA-C (128-144)		
			D	L	R	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q			HLA-C (129-144)		
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P	R	HLA-C (28-48)		
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P		HLA-C (28-47)		
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P	W	V	E	HLA-C (28-51)
V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P	W			HLA-C (28-49)
V	D	D	T	Q	F	V	Q	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P	R			HLA-C (28-48)
			E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V		Immunoglobuline kappa chain (187-205)
			E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P			Immunoglobuline kappa chain (187-204)
			K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V			Immunoglobuline kappa chain (188-205)
			E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S					Immunoglobuline kappa chain (187-202)
			H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V				Immunoglobuline kappa chain (189-205)
			K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S						Immunoglobuline kappa chain (188-202)
			H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S							Immunoglobuline kappa chain (189-202)
H	P	V	T	G	Q	F	L	Y	Q	D	S	N	W	A	S	K	V	E					Transferrin receptor (561-534)
			K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A				Immunoglobuline heavy chain (31-47)

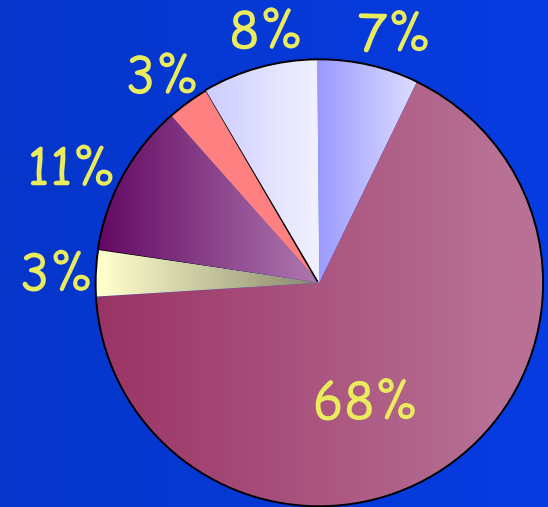
ORIGEN DE LOS PEPTIDOS PRESENTADOS POR MHC CLASE II EN LOS DIFERENTES COMPARTIMENTOS CELULARES



Células Epiteliales

(RIN DR4IiDM)

ORIGEN DE LOS PEPTIDOS



APC Profesionales

(B-LCL)

Estudio de la presentación de péptidos por HLA clase II mediante técnicas proteómicas

M.Carrascal, L.Muixi¹, P.Ruperez, D.Jaraquemada¹ y J.Abián

Biological and Structural Mass Spectrometry Unit, IIBB/CSIC-IDIBAPS) and Immunology Unit, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB, Barcelona, Spain

Secuenciación de péptidos presentados por HLA-II

- Comparación de los repertorios observados en células transfectadas y en una APC profesional

 Influencia de las moléculas Ii y HLA-DM en el repertorio

- Proteoma de la célula RIN transfectada
- Chaperonas alternativas a Ii y DM
- Identificación de péptidos antigénicos en tiroides autoinmunes humanos

PEPTIDOS PRESENTADOS POR DR4 EN AUSENCIA DE Ii Y DM (CELULAS DR4)

DR4 motif	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Source protein
	G	F	G	D	L	K	T	P	A	G L Q V L N D
	Y	V	G	D	L	H	P	D	V	T E A M L
	A	R	K	L	I	G	D	P	N	L E F
	V	P	I	D	V	D	K	T	K	V H N V E P V E S A R I E P P D T G L Y
	I	I	D	P	G	D	S	D	I	I R S M P E Q T G E K
	G	N	G	G	A	A	T	T	A	E E N G S M M R
	E	A	R	G	A	R	R	G	V	K K V M V L
	L	E	T	L	H	E	A	L		
	M	K	I	F	V	G	N	V	D	G A D T T P E E L
	I	G	A	G	G	T	G	A	A	L Y V M R L A L
	S	A	M	T	E	E	A	A	V	A I K A M A K
	N	V	W	Q	V	N	T	S	R	T R I T F V
										HEMC Hydroxymethylbilane synthase(3-19)
										Integrin A-1 precursor VLA-1 (264-278)
										n-chimaerin (251-258)
										SYT Interacting protein SIP (1-18) 16kD
										NADH-Ubiquin. oxidoreductase MLRQ (15-31)
										Initiation factor 5A (139-153)
										DNA Replication Licensing factor (706-719)

Los péptidos naturales asociados a DR4 en ausencia de Ii y de DM, no cumplen el motivo de unión a DR4 y corresponden principalmente a extremos N y C terminales de proteínas citoplasmáticas.

PEPTIDOS PRESENTADOS POR DR4 EN AUSENCIA DE Ii Y DM (CELULAS DR4)

H ₂ N	MRYVASYLL	COOH
H ₂ N	MKIFVGNVDGADTTPEEL	COOH
H ₂ N	M - GFDLKT P AGLQVLND	COOH
H ₂ N	MS - GNGGAATTAEENGSMR	COOH
H ₂ N	13 AA YVGD LHPDVTEAML	COOH
H ₂ N	21 AA IGAGGTGAALYVMRLAL	COOH
H ₂ N	24 AA VPIDVDKTKVHNVEPVESARIEPPDTGLY	COOH
H ₂ N	IVIQNPT	COOH
H ₂ N	AEFAKSLQ	COOH
H ₂ N	FISNHAY	COOH
H ₂ N	NVWQVNTSRTRITFV	COOH
H ₂ N	SAMTEEA A VAIKAMAK	COOH
H ₂ N	A A VAIKAMAK	COOH
H ₂ N	IIDPGDSDIIRSMPEQTGEK	COOH
H ₂ N	QVTQPTVGMNFKTPRGAV	COOH
H ₂ N	VAQASLGEYLFERLTLKHD	COOH
H ₂ N	ALSQDSTYQGERAYQHGGVTGLSQY	COOH
H ₂ N	RIEPFSSPELPDVMKPQDSGGSANEQAVQ	COOH
H ₂ N	PALAPPEVMDPALAAQYEHDLVAQTALPDEDDDL	COOH
H ₂ N	ARKLIGDPNLEF	40 AA COOH

EL 95% DE LOS PEPTIDOS SECUENCIADOS DE CELULAS HLA-DR4 CORRESPONDEN A EXTREMOS N- Y C- TERMINAL DE LAS PROTEINAS ORIGEN

PEPTIDOS PRESENTADOS POR DR4 EN AUSENCIA DE DM (CELULAS DR4iI)

DR4 motif	1 2 3 4 5 6 7 8 9	Source protein
V G K T P I V G Q P S I P G G P V R		Fetuin (331-347)
G K T P I V G Q P S I P G G P V R		Fetuin (332-347)
S G E A F H V G K T P I V G Q P S		Fetuin (325-341)
S E Q H D I A I D L S P L A Q H E E G		Mannose 6-phos./insulin-like growth fact. recep.(324-342)
E G P E Y W E E Q T Q R A K G H E		MHC class I (57-71)
G R P T L L P E E I D D A F P L		P58 8296-311)
D L L S G K K N T V E G L P P L G G M K		Protein tyrosine phosphatases non-receptor type 21(823-842)
K P P K P V S K M R M A T P L L M Q A L P		Invariant chain (99-119)
L P K P P K P V S K M R M A T P L L M Q A L P M		Invariant chain (97-120)

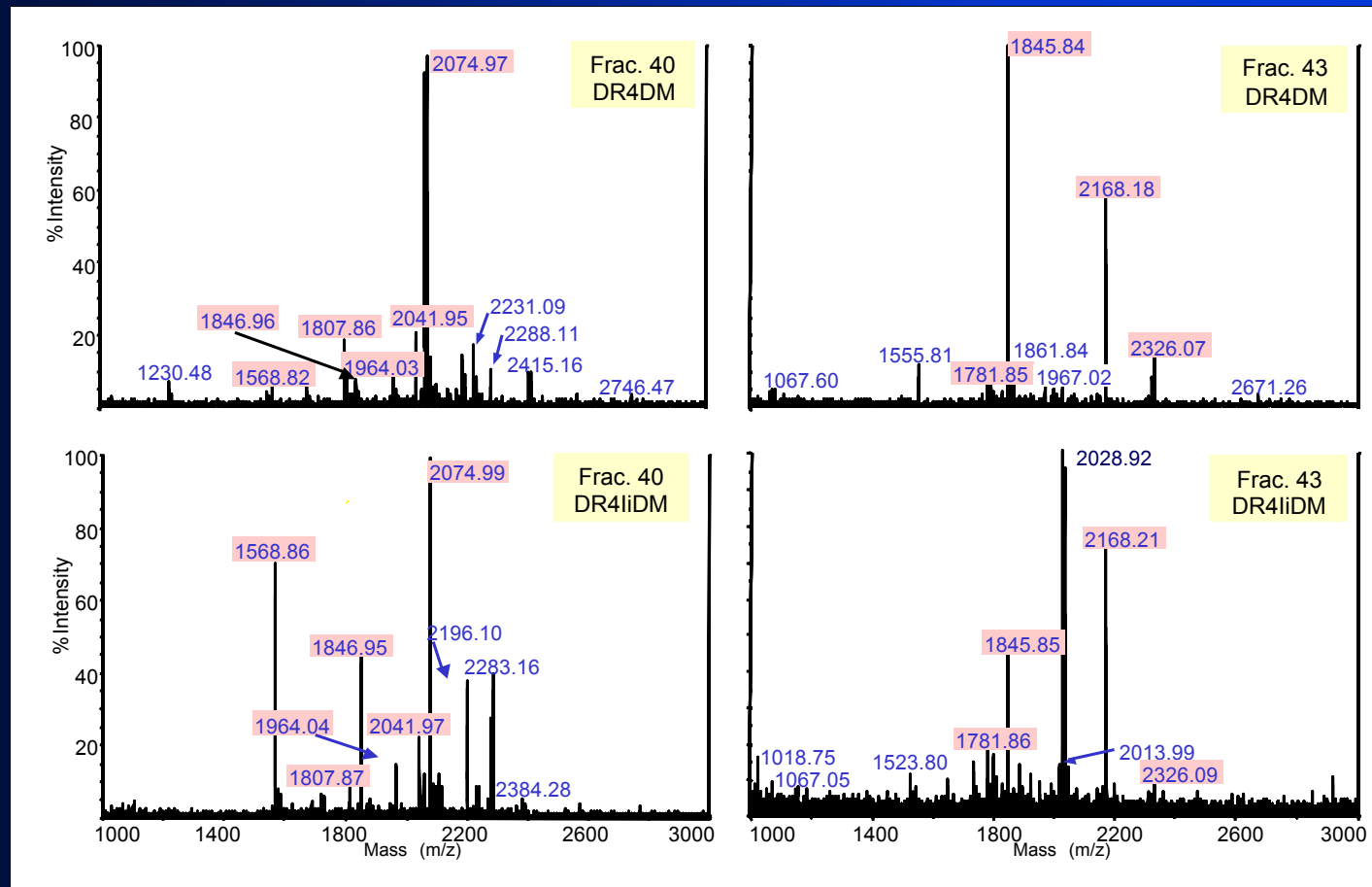
- En ausencia de DM, DR4 presenta casi exclusivamente péptidos CLIP derivados de la cadena invariante.
- Todos los péptidos detectados cumplen el motivo de unión con preferencia por aminoácidos pequeños hidrofóbicos

PEPTIDOS PRESENTADOS POR DR4 EN AUSENCIA DE Ii (CELULAS DR4DM)

DR4 motif	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Source protein
V L N Q E	L	R	A	D	G	T	V	N	Q	I E G
R E G P E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K G
R E G P E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K G H E
E G P E	Y	W	E	E	Q	T	Q	R	A	K G
E R E G P E	Y	W	E	E	Q	T	L	V	A	K
E P S V H N Y	F	A	I	D	P	T	T	G	A	I H
L Y N P T T	Y	Q	M	D	V	N	P	E	G	K Y S
N P T T	Y	Q	M	D	V	N	P	E	G	K Y S
E P G E P E	F	K	I	Y	G	N	M	H	G	N E A
S L Q E	Y	L	A	E	Q	N	Q	R	Q	L E S N
D E F K K	F	I	S	D	K	D	A	S	V	V G
I S W	Y	D	N	E	Y	G	Y	S	N	R V V D
G F P K P P S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y D E
F P K P P S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y D E
G F P K P P S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y D E
F P K P P S	Y	N	V	A	T	T	L	P	S	Y D
										Nedd4WWW (121-137)

La expresión de DM en presencia o ausencia de Ii, permite la asociación a DR4 péptidos estables y que cumplen con el motivo de unión a DR4

ANÁLISIS DE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS MEDIANTE MALDI-TOF: INFLUENCIA DE LA EXPRESIÓN DE Ii EN CÉLULAS DM+



Más del 50% de los iones detectados en la línea DR4DM se detectaron también en la triple transfectante (53%), mostrando que la expresión de HLA-DM molécula era suficiente para generar un repertorio estable aunque no igual al de las células DR4IiDM.

Estudio de la presentación de péptidos por HLA clase II mediante técnicas proteómicas

M.Carrascal, L.Muixi¹, P.Ruperez, D.Jaraquemada¹ y J.Abián

Biological and Structural Mass Spectrometry Unit, IIBB/CSIC-IDIBAPS) and Immunology Unit, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB, Barcelona, Spain

Secuenciación de péptidos presentados por HLA-II

- Comparación de los repertorios observados en células transfectadas y en una APC profesional
- Influencia de las moléculas Ii y HLA-DM en el repertorio

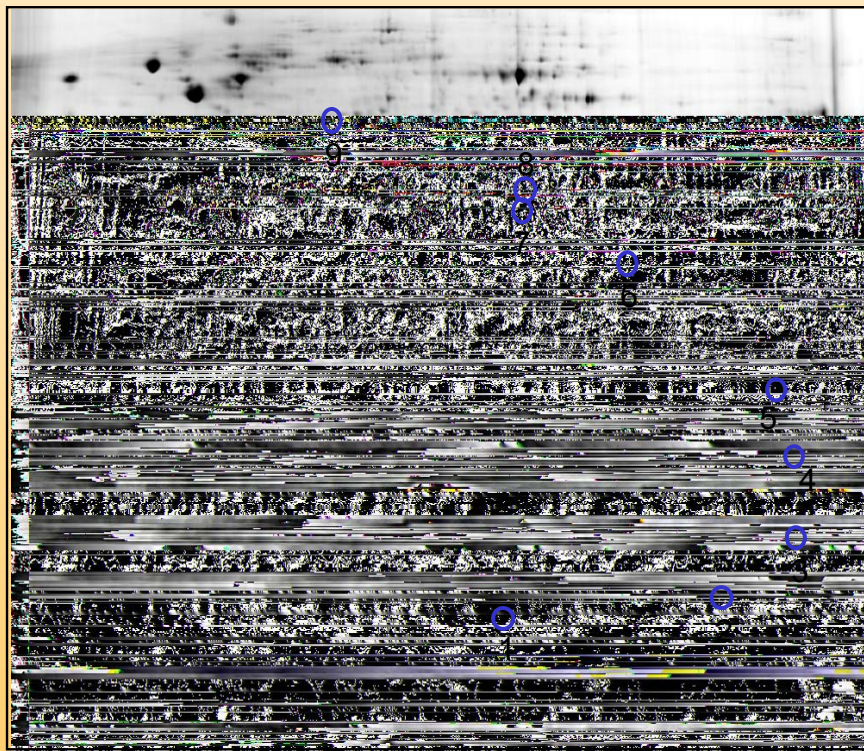


Proteoma de la célula RIN transfectada

- Chaperonas alternativas a Ii y DM
- Identificación de péptidos antigénicos en tiroides autoinmunes humanos

EXPRESIÓN PROTEICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS RIN TRANSFECTADAS CON HLA-DR4, Ii Y HLA-DM (SISTEMA DIGE)

Células RIN

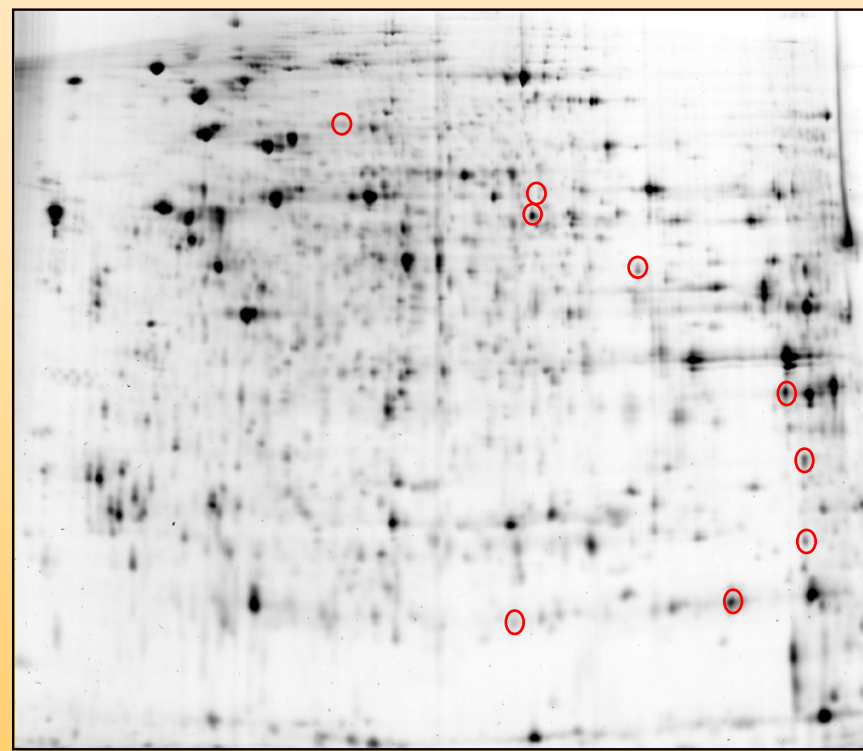


3

pI

10

Células RIN- DR4IiDM



3

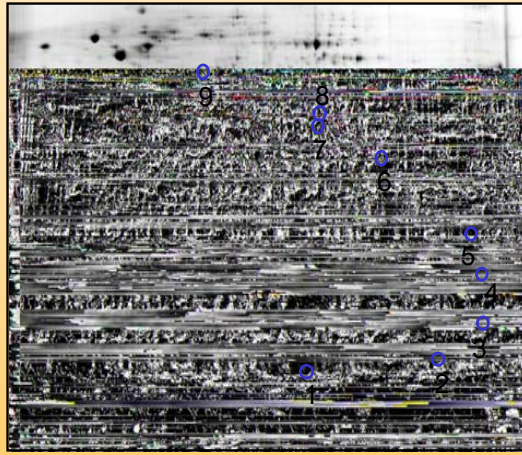
pI

10

ANÁLISIS DE IMAGEN CON EL SOFTWARE PROGENESIS

RIN

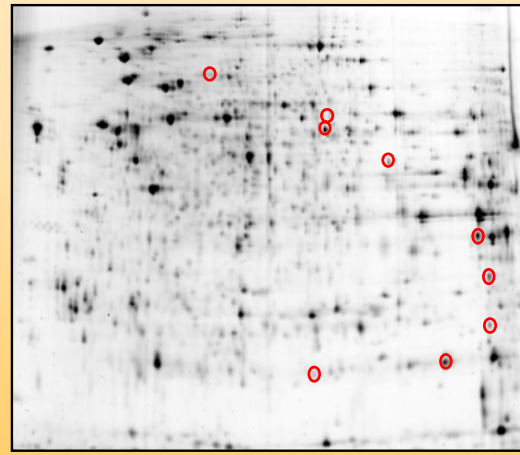
RIN- DR4liDM



3

pl

10



3

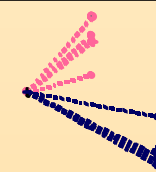
pl

10

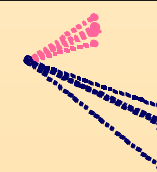
Manchas detectadas y emparejadas para cada una de las imagenes obtenidas en el análisis de expresión diferencial mediante el sistema DIGE.

Línea celular	Imagen	Marcaje	Manchas detectadas	Manchas emparejadas
DR4liDM	1*	Cy5	2238	2238
DR4liDM	2	Cy5	1815	1311
DR4liDM	3	Cy3	2187	1383
DR4liDM	4	Cy3	1969	1304
RIN	1	Cy3	2238	2238
RIN	2	Cy3	1815	1311
RIN	3	Cy5	2187	1383
RIN	4	Cy5	1969	1304

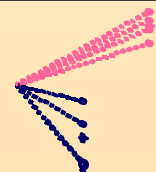
MANCHAS DIFERENCIALES



Mancha 416
T student 0.00064
Av. Ratio = -1.69



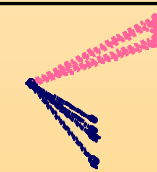
Mancha 745
T student 0.00046
Av. Ratio = -1.62



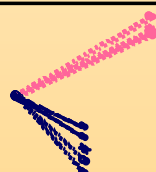
Mancha 833
T student 0.00057
Av. Ratio = 1.7



Mancha 1097
T student 3.20E-06
Av. Ratio = 1.56



Mancha 1535
T student 6.70E-05
Av. Ratio = 2.47



Mancha 1692
T student 3.50E-05
Av. Ratio = 2.14



Mancha 1895
T student 1.50E-07
Av. Ratio = 5.13



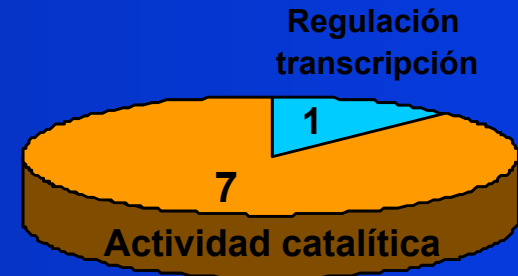
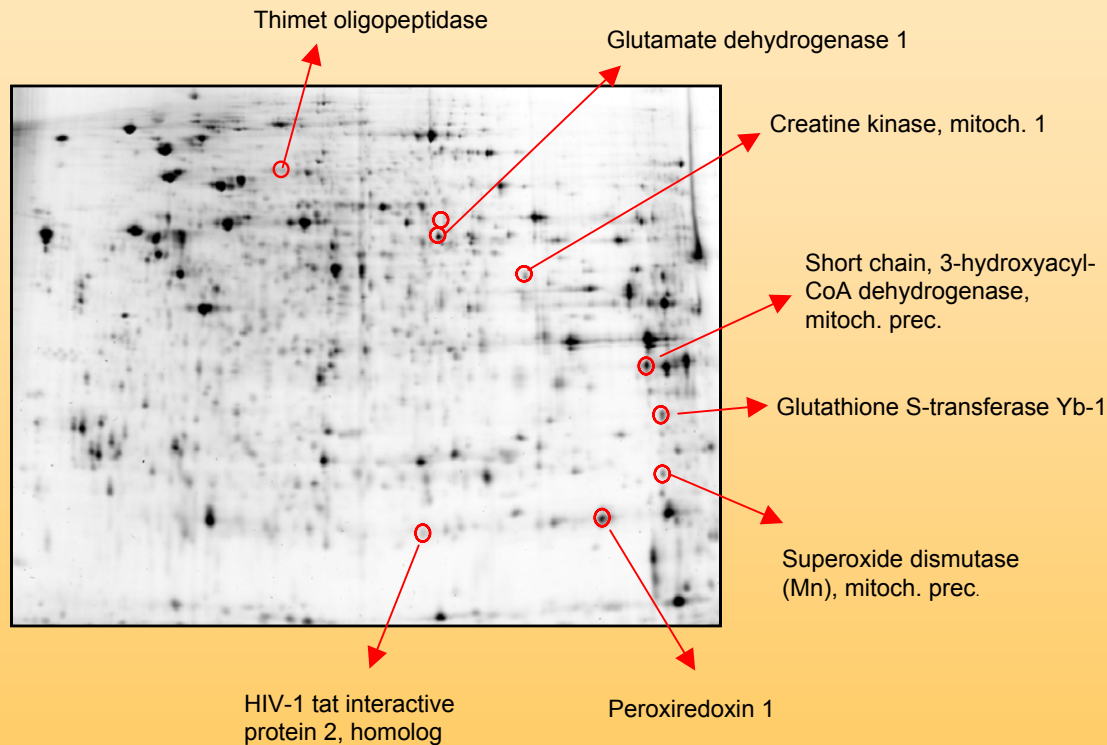
Mancha 2012
T student 9.70E-05
Av. Ratio = 4.79



Mancha 2046
T student 0.00098
Av. Ratio = 2.1

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DIFERENCIALES

Células RIN- DR4iDM



- Oxidoreductasa :
 - Glutamato deshidrogenasa
 - 3-hidroxiacil - CoA deshidrogenasa
 - Peroxiredoxina 1
 - Superoxido dismutasa [Mn]
- Hidrolasa:
 - Oligopeptidasa Thimet
- Transferasa:
 - Glutatión S - transferasa Mu 1
 - Creatina kinase
- Quinasa:
 - Creatina kinase

Estudio de la presentación de péptidos por HLA clase II mediante técnicas proteómicas

M.Carrascal, L.Muixi¹, P.Ruperez, D.Jaraquemada¹ y J.Abián

Biological and Structural Mass Spectrometry Unit, IIBB/CSIC-IDIBAPS) and Immunology Unit, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB, Barcelona, Spain

Secuenciación de péptidos presentados por HLA-II

- Comparación de los repertorios observados en células transfectadas y en una APC profesional
- Influencia de las moléculas Ii y HLA-DM en el repertorio
- Proteoma de la célula RIN transfectada
- ➔ Chaperonas alternativas a Ii y DM
- Identificación de péptidos antigénicos en tiroides autoinmunes humanos

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON HLA-DR4 EN UNA CÉLULA EPITELIAL QUE EXPRESA MHCII

PROTOCOLO:

➡ Unión del anticuerpo L243 a las bolas de Sefarosa.

➡ Lisis “suave de las células”: Solubilización de las moléculas de MHC sin romper las interacciones entre proteínas.

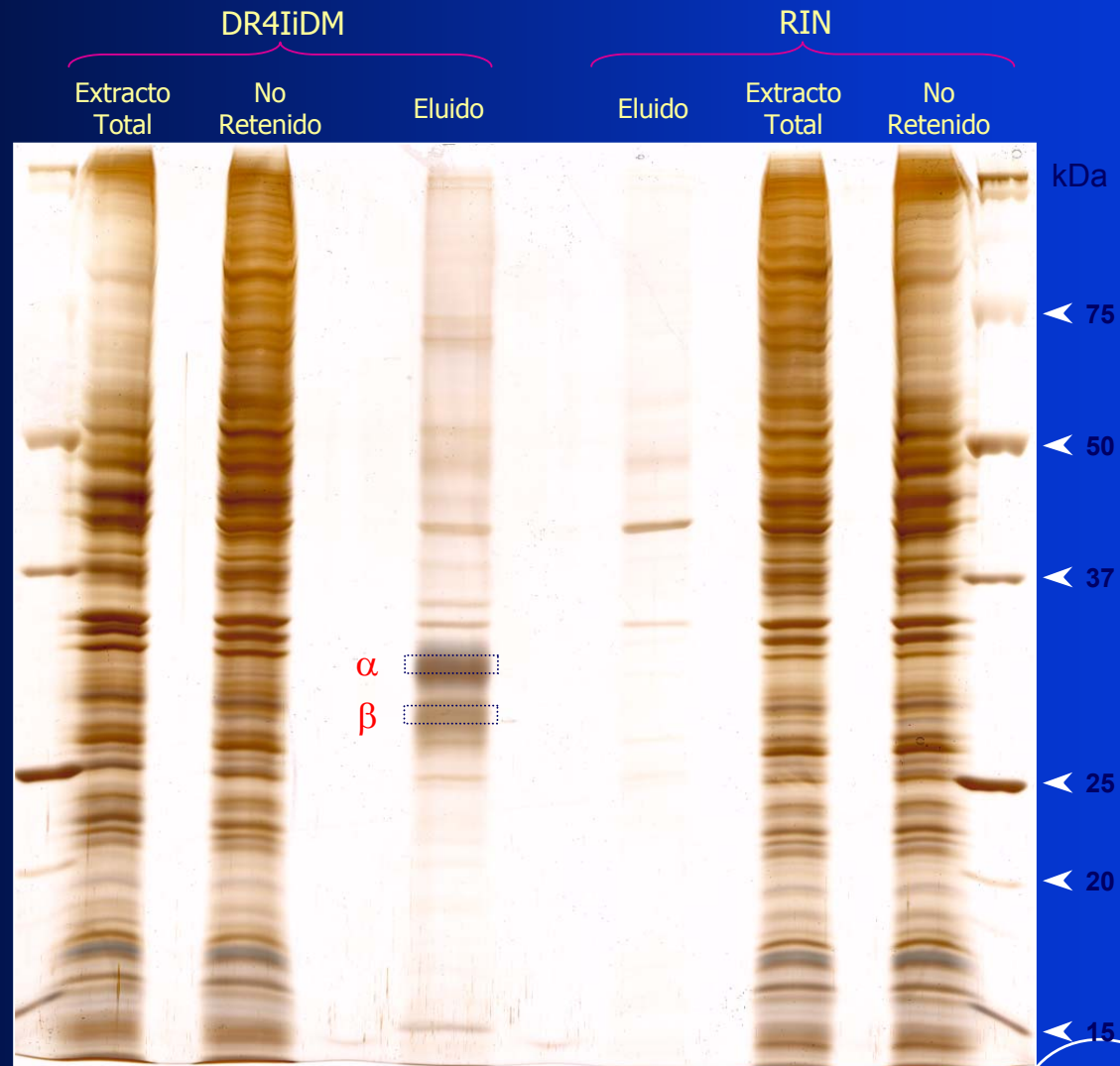


- 1) Proteínas no solubilizadas en 2) y solubilizada con 2% SDS
- 2) Proteínas solubilizado con 1% digitonina
- 3) Fracción no retenida control (incubación con bolas bloqueadas)
- 4) Fraccion retenida control (eluido)
- 5) Fracción no retenida bolas-Ab L243
- 6) Fraccion retenida bolas-Ab L243 (eluido)

➡ Purificación por Inmunoadfinidad de DR4 y proteínas asociadas.

↓
Separación de las proteínas por
SDS-PAGE y 2DE

SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS AFINES POR HLA-DR4 MEDIANTE SDS-PAGE



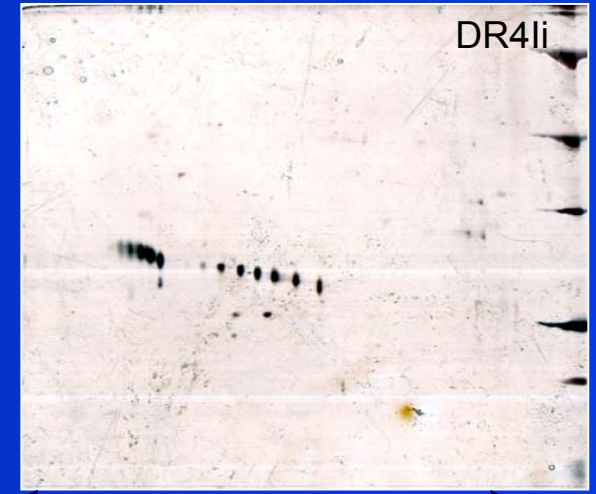
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS AFINES A HLA-DR4 EN CÉLULAS EPITELIALES TRANSFECTADAS CON DIFERENTES COMBINACIONES DE LAS MOLÉCULAS HLA-DR, Ii Y HLADM



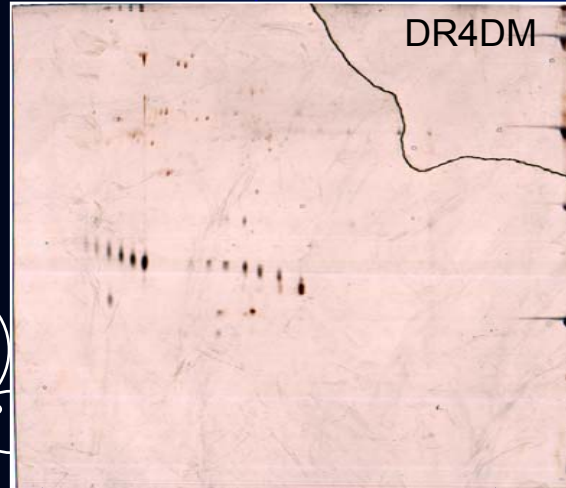
3 pl 10



3 pl 10



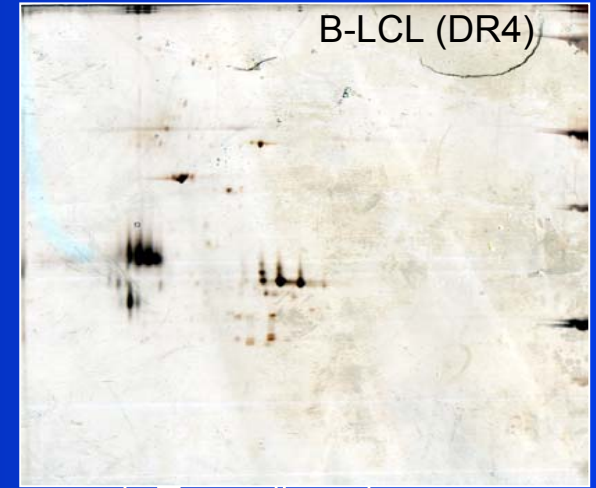
3 pl 10



3 pl 10

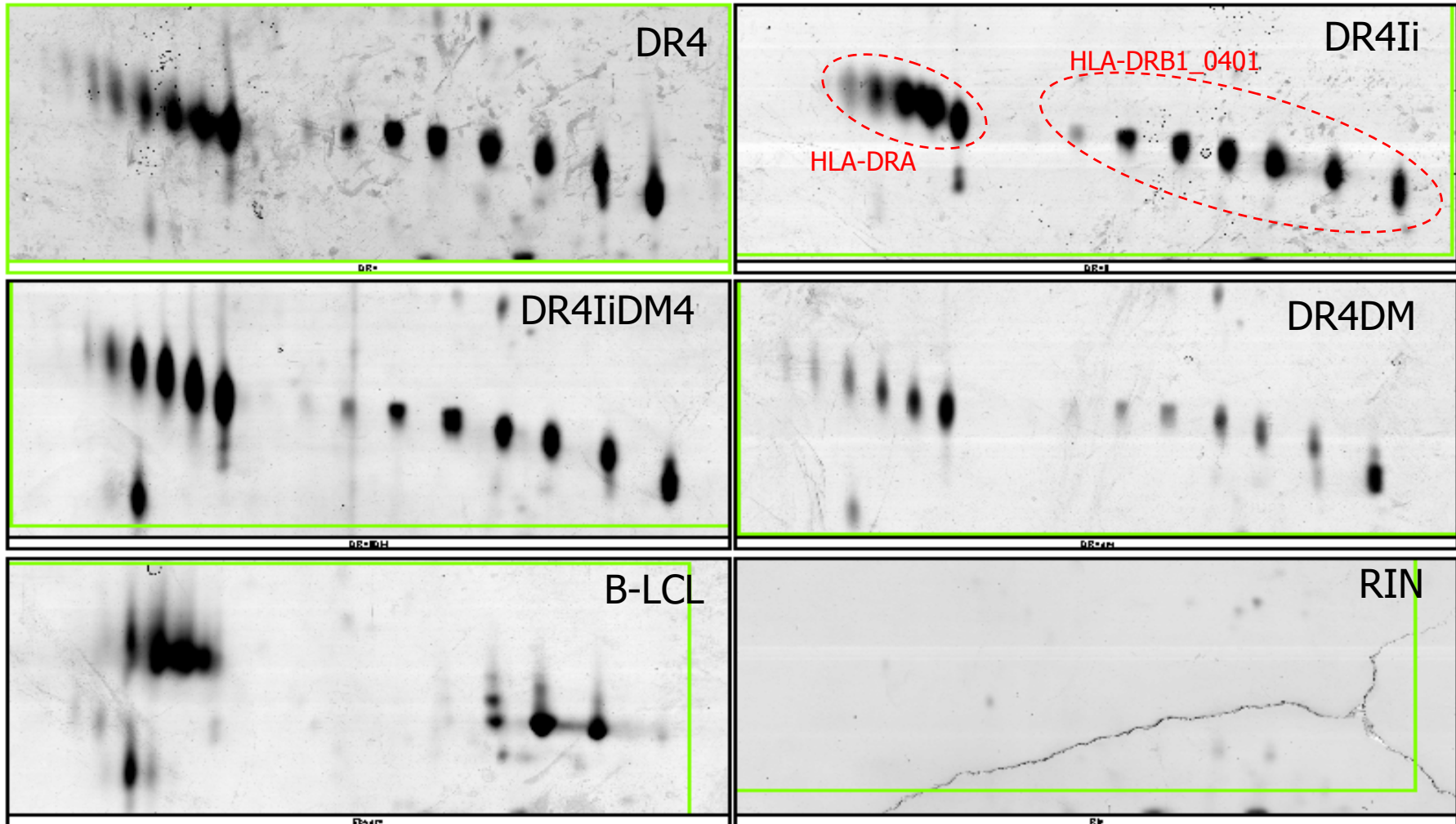


3 pl 10



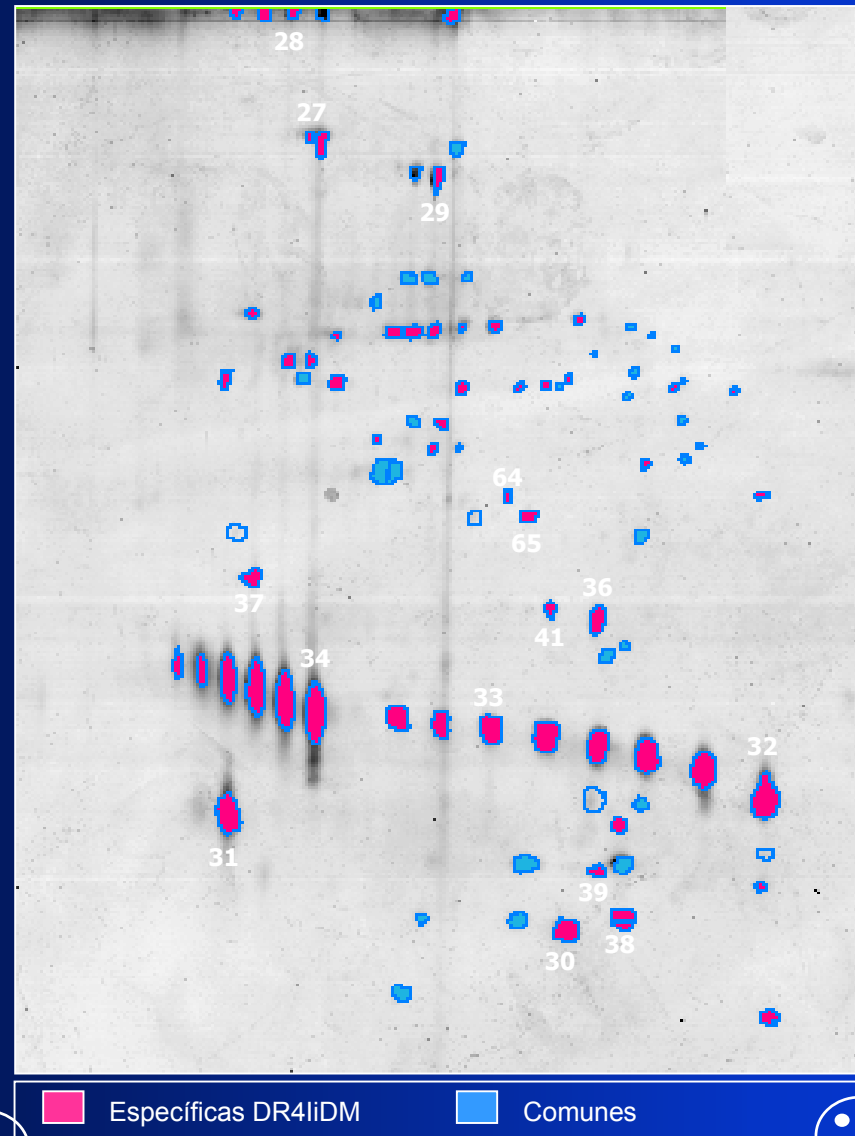
3 pl 10

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS AFINES A HLA-DR4 EN CÉLULAS EPITELIALES TRANSFECTADAS CON DIFERENTES COMBINACIONES DE LAS MOLÉCULAS HLA-DR, Ii Y HLADM



SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS AFINES POR HLA-DR4 MEDIANTE 2DE

ANÁLISIS DE IMAGEN



PROTEÍNAS DIFERENCIALES IDENTIFICADAS

Proteína identificada	Masa (kDa)/pI	nº acceso*
78 kDa glucose-regulated protein precursor (BIP)	75 / 5.1	P06761
Glucose regulated protein, 58 kDa	57 / 5.9	38382858
Heat shock cognate protein, 71 kDa	71 / 5.4	5729877
Heat shock 70 kDa protein 9B	74 / 6.0	21040386
Peroxiredoxin 4 (Macht DIGE)	31 / 6.2	Q63716
Protein disulfide isomerase precursor	57 / 4.8	P04785
Similar to protein OS-9 precursor	79 / 5.1	34865783
Similar to reticulocalbin	38 / 4.7	34856626
Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	68 / 5.4	34869154
Vacuolar ATP synthase subunit B	57 / 5.6	17105370

Estudio de la presentación de péptidos por HLA clase II mediante técnicas proteómicas

M.Carrascal, L.Muixi¹, P.Ruperez, D.Jaraquemada¹ y J.Abián

Biological and Structural Mass Spectrometry Unit, IIBB/CSIC-IDIBAPS) and Immunology Unit, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB, Barcelona, Spain

Secuenciación de péptidos presentados por HLA-II

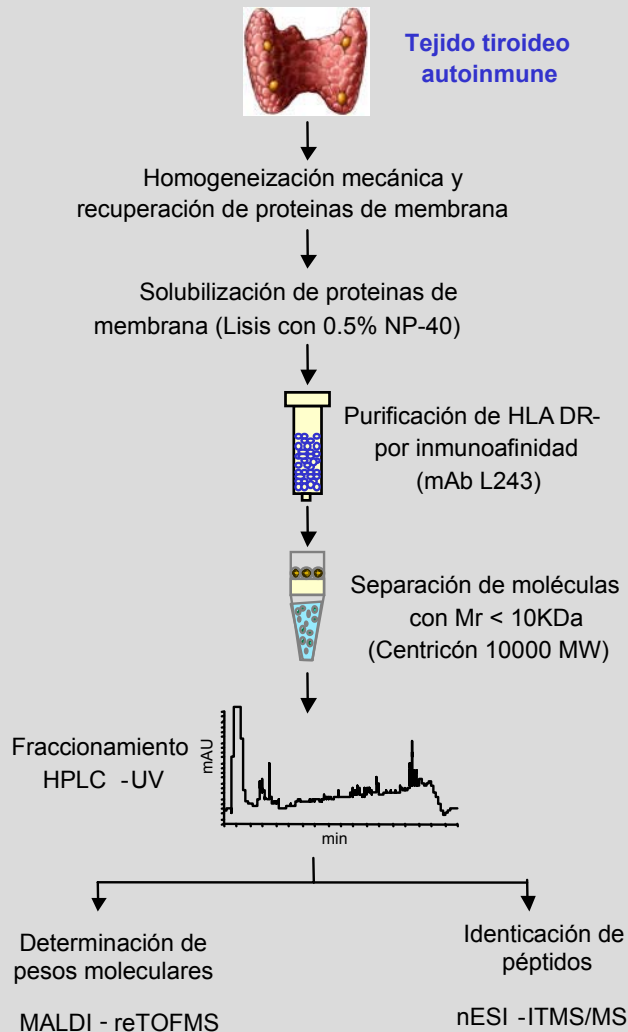
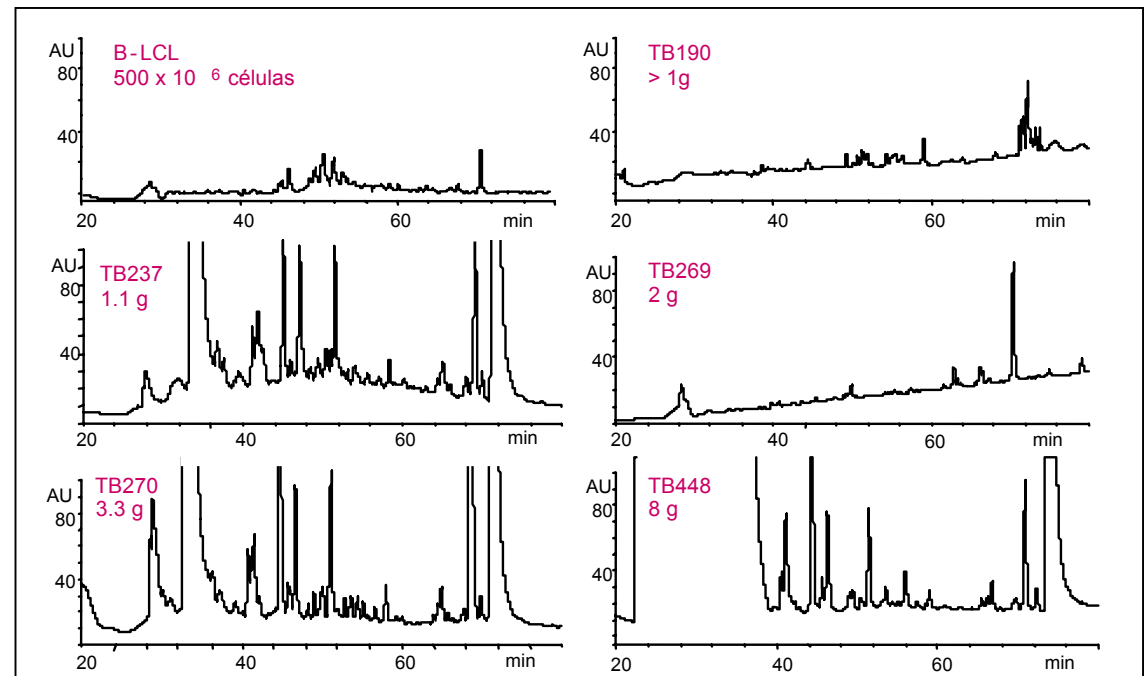
- Comparación de los repertorios observados en células transfectadas y en una APC profesional
 - Influencia de las moléculas Ii y HLA-DM en el repertorio
 - Proteoma de la célula RIN transfectada
 - Chaperonas alternativas a Ii y DM
-  Identificación de péptidos antigénicos en tiroides autoinmunes humanos

CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO ASOCIADO A LA MOLÉCULA DE MHCII EN UN SISTEMA IN VIVO: ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A CLASE II EN TIROIDES AFECTADOS CON LA ENFERMEDAD DE GRAVES-BASEDOW.

Tabla I: Tejido utilizado para la identificación de péptidos asociados a la molécula de MHCII.

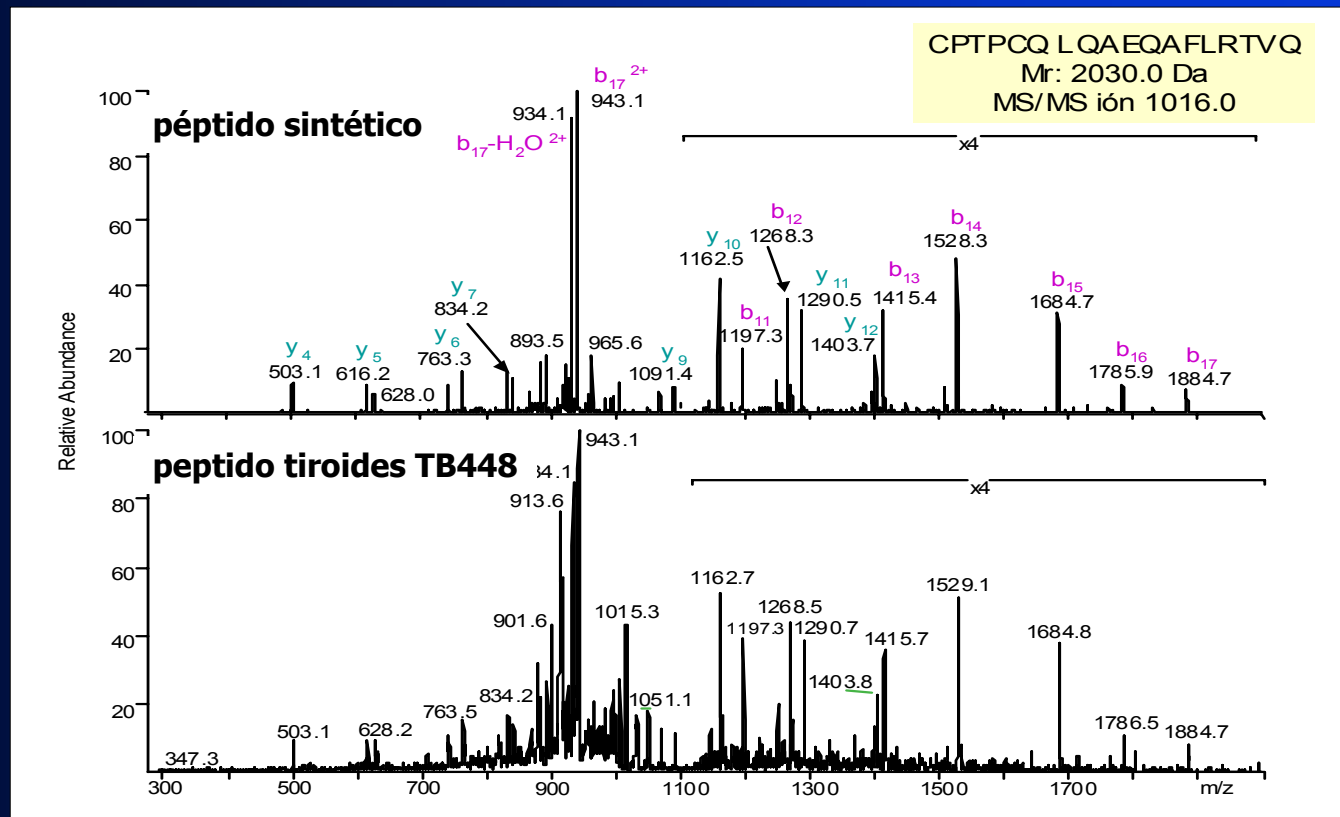
ID tiroides	Expresión de clase II	Fenotipo para clase II	Cantidad (g)
TB-190	++	DRB1*1101, DRB1*1104, DQB1*0301	< 1
TB-269	++	DRB1*1101, DRB1*1104, DQB1*0301	2
TB-270	+++	DRB1*0701, DQB1*0202, DQB1*0303	3.3
TB-237	+	DRB1*1501, DQB1*0602	1.1
TB-448	++	DRB1*0407, DRB1*1501, DQB1*0301,	8

Perfiles HPLC-UV de la línea celular B-LCL (5 x 10⁶ células) y de los tiroides analizados



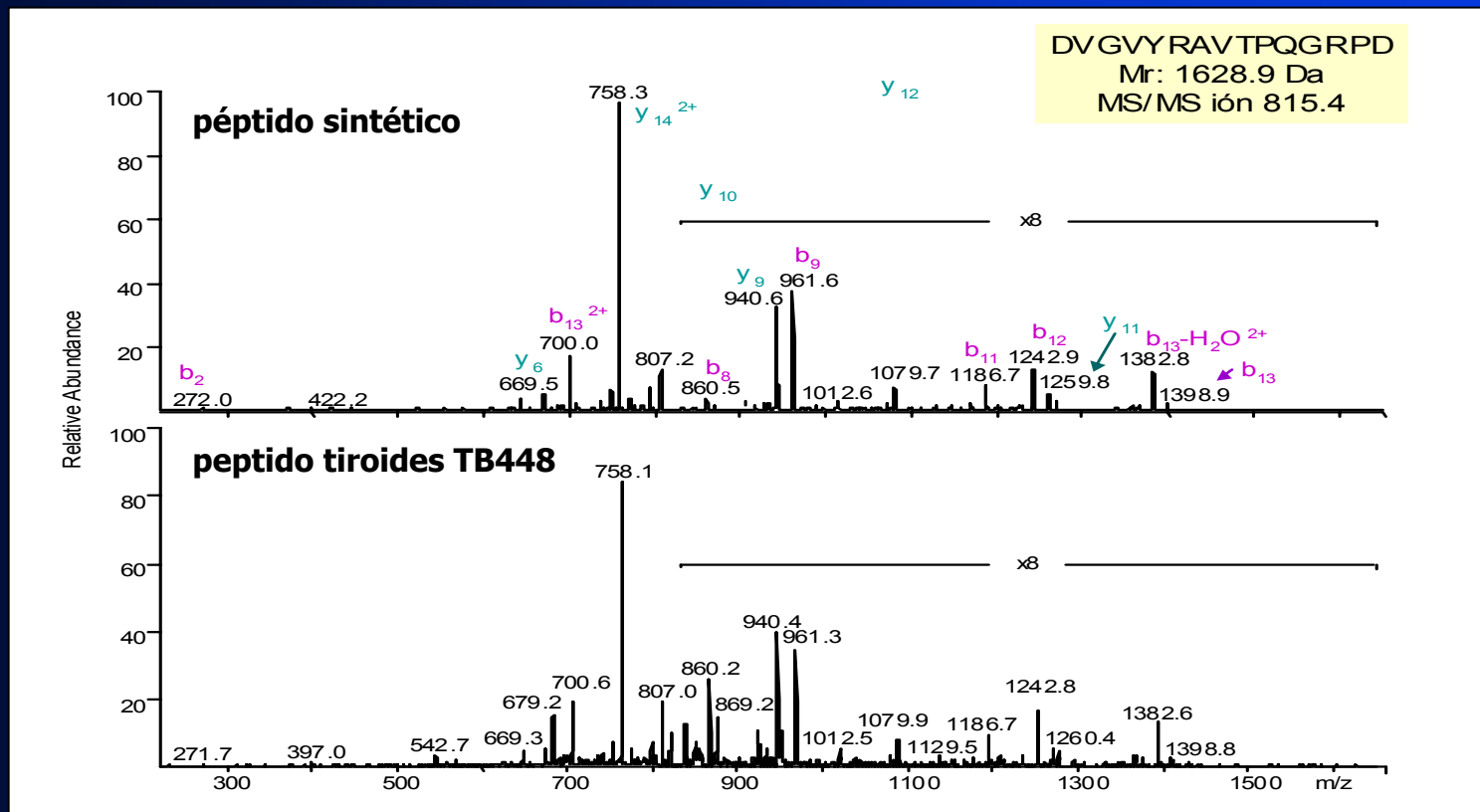
CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO ASOCIADO A LA MOLÉCULA DE MHCII EN UN SISTEMA IN VIVO: ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A CLASE II EN TIROIDES AFECTADOS CON LA ENFERMEDAD DE GRAVES-BASEDOW.

Tiroglobulina [726-743]



CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO ASOCIADO A LA MOLÉCULA DE MHCII EN UN SISTEMA IN VIVO: ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A CLASE II EN TIROIDES AFECTADOS CON LA ENFERMEDAD DE GRAVES-BASEDOW.

MHCII DQB1*0602 [75-89]



CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO ASOCIADO A LA MOLÉCULA DE MHCII EN UN SISTEMA IN VIVO: ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A CLASE II EN TIROIDES AFECTADOS CON LA ENFERMEDAD DE GRAVES-BASEDOW.

1	11	21	31	41	51	61	71
MKWVTFISLL	FLFSSAYSRG	VFRDAHKSE	VAHREFKDLGE	ENFKALVLIA	FAQYLQCCPF	EDHVKLNVNEV	TEFAKTCVAD
81	91	101	111	121	131	141	151
ESAENCCKSL	HTLFGDKLCT	VATLRETYGE	MADCCAKQEP	ERNECFLQHK	DDNPNLRLV	RPEVDVMCTA	FHDNEETFLK
161	171	181	191	201	211	221	231
KYLYEIARRH	PYFYAPELLF	FAKRYKAAFT	ECCQAADKAA	CLLPKLDELRL	DEGKASSAKQ	RLKCASLQKF	GERAFKAWAV
241	251	LGEYKFQNALVRYT	261	281	TPTLVEVSRNLGKVG	311	
ARLSQRFKA	EFAEVSKLVT	DLTKVHTECC	HGDLLECADD	RADLAKYICE	NQDSISSKLK	ECCEKPLLEK	SHCIAEVEND
321	331	341	351	361	371	STPTLVEVSRNLGKVG	
EMPADLPSLA	ADFVESKDVC	KNYAEAKDVF	LGMFLYEYAR	RHPDYSVLL	LRLAKTYETT	LEKCCAAADP	HECYAKVFDE
QLGEYKFQNALVRYT		421	431	441	451	461	471
FKPLVEEPQN	LIKQNCSELF	OLGEYKFQNA	LLVRYTK KVP	QVSTPTLVEV	SRNLGKVGSK	CCKHPEAKRM	PCAEDYLSVV
481	491	501	511	521	531	TPTLVEVSRNLGKVGSK	
LNQLCVLHEK	TPVSDRVTKC	CTESLVNRRP	CFSALEVDET	YVPKEFNAET	FTFHADICTL	SEKERQIKKQ	TALVELVKHK
561	571	LGEYKFQNALVRYTK	591	601	VSTPTLVEVSRNLGKVG		
PKATKEQLKA	VMDDFAAFVE	KCKKADDKET	CFAEEGKKLV	AASQAALGL			

Figura 4: Secuencia aminoacídica de la albúmina sérica humana, con los epítomos caracterizados a partir de los tiroides TB190, 260 y 270 marcados en rojo. Los péptidos identificados para cada epítomo se muestran encuadrados en naranja.

CARACTERIZACIÓN DEL REPERTORIO ASOCIADO A LA MOLÉCULA DE MHCII EN UN SISTEMA IN VIVO: ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A CLASE II EN TIROIDES AFECTADOS CON LA ENFERMEDAD DE GRAVES-BASEDOW.

Localización celular de las proteínas origen identificadas a partir de tejido tiroideo.

