

1.2.1. Les MHC de classe I uneixen pèptids en el reticle endoplasmàtic

La major part dels pèptids presentats per les molècules de classe I es generen per la degradació de proteïnes sintetitzades en el citoplasma i en el nucli cel·lular. Com que la síntesi proteica es dona en el citosol, totes les proteïnes endògenes o els productes traduïts de manera incompleta, així com proteïnes víriques, poden ser presentats units a MHC I (Jaraquemada D i col., 1990; Malnati M i col., 1992; Reits EA i col., 2000; Schubert U i col., 2000). Les proteïnes de membrana o secretades que no superen el control de qualitat de l'ER, són translocades al citosol on són degradades pel mecanisme anomenat ERAD per generar lligands potencials per les MHC I (Kopito R i col., 1997; Gelman MS i col., 2001). La major part de les proteïnes citoplasmàtiques són degradades per una estructura multicatalítica anomenada proteasoma que presenta diferents activitats endoproteasa (Harding CV i col., 1995; Dick TP i col., 1998). També s'han descrit altres proteases citoplasmàtiques involucrades en la generació de lligands per a les MHC I (York IA i col., 1999). Els pèptids generats al citosol són transportats a l'interior del ER pel transportador associat al processament antigènic (TAP). Aquest és un heterodímer format per les subunitats TAP-1 i TAP-2, codificades per gens del MHC. La delecció de qualsevol de les dues subunitats, origina la inhibició pràcticament total de l'expressió de MHC I a la superfície cel·lular (de la Salle H i col., 1994), assenyalant-lo com el complex subministrador de pèptids per les MHC I. Arribats a l'ER, els pèptids generats s'uneixen al complex format per la cadena pesada i la $\beta 2m$.

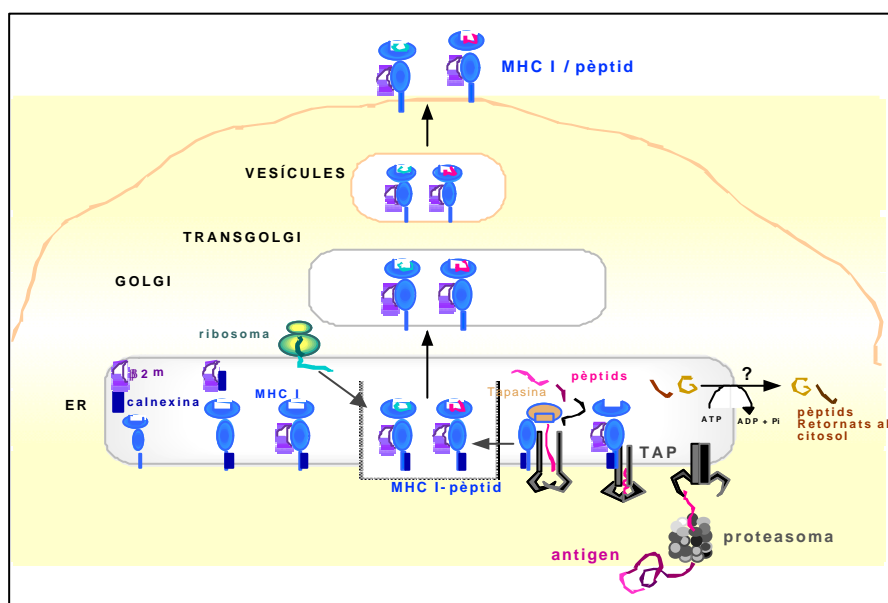


Figura 4 Esquema de la via de processament d'antigen per MHC I. Les cadenes pesades i la $\beta 2m$ recent sintetitzades es transloquen a l'ER, així com els pèptids generats al citosol pel proteasoma i altres proteases. Les MHC de classe I s'associen a pèptids antigènics presents en l'ER amb l'ajut de la Tapasina. El complex trimolecular estable és exportat cap a la superfície cel·lular per la via de secreció constitutiva.

Les cadenes pesades de les MHC I s'associen a la β 2-microglobulina de forma inestable, a t^a fisiològica en absència de pèptid (Townsend A i col., 1989). Aquesta manca d'una conformació estable entre la cadena pesada i la β 2-m permet la retenció de les cadenes pesades de MHC I en l'ER fins que es produeix la unió del pèptid adequat. Una sèrie de proteïnes residents al ER regulen l'ensamblatge del complex trimolecular (van Endert PM i col., 1999). Entre aquestes proteïnes, la calnexina, la calreticulina i la ERp57 estan implicades en la formació i estabilització dels complexos entre la cadena pesada i la β 2m, mentre que la tapasina està implicada en l'associació dels complexos de classe I i el transportador TAP, facilitant i seleccionant la unió del pèptid. Només quan està totalment format el complex cadena pesada- β 2m-pèptid, les proteïnes auxiliars es dissocien i el complex s'exporta a la superfície cel·lular.

També s'ha descrit la presentació d'antígens exògens per les molècules MHC I, amb la implicació de diferents vies. Aquells antígens que són internalitzats per endocitosi i degradats en els compartiments endosomals, poden ser capturats per les MHC I que recirculen des de la superfície (Grommé M i col., 1999). També s'ha descrit la translocació a citosol d'antígens exògens ja sigui per l'acció dels mateixos antígens, o bé mitjançant altres proteïnes o mecanismes especialitzats de transport (Heath WR i col., 2001). Aquesta translocació permet la seva degradació pel proteasoma i per tant la seva entrada en la via clàssica d'unió al MHC I.

1.2.2. Les MHC de classe II uneixen pèptids en la via endocítica

Les molècules MHC de classe II han evolucionat per a presentar pèptids derivats de proteïnes que entren a la cèl·lula des de l'exterior i per tant, presents en un lloc on resideixen molts patògens: la via endocítica. A diferència de les MHC de classe I, les molècules MHC de classe II interaccionen amb chaperones específiques que les dirigeixen als endosomes, una localització subcel·lular independent de la via constitutiva d'exocitosi, on uneixen el pèptid antigènic. Així doncs, els pèptids presentats per les MHC II es generen majoritàriament per la degradació de proteïnes que tenen accés a la via endocítica, on són processades per proteases lisosomals i altres hidrolases.

	Endosomes Primerencs (EE)		(Mvbs)	(Mlbs)
Propietats	Endosomes d'internalització	Endosomes de reciclatge	Compartiments multivesiculars	Endosomes tardans
Topologia	Perifèria	Variable	Tot el citoplasma	Perinuclear
Morfologia	Tubulo-vesicular	Tubular	Membranes internes esfèriques	Membranes internes complexes (sovint concèntriques)
pH luminal	6,2	6,5	5,5	5,5
Receptors i altres proteïnes de membrana	Receptor de la transferrina (altres receptors que reciclen)	-----	Receptor de CI-Man6P Glicoproteïnes lisosomals (lamp)	
Proteïnes perifèriques	EAA1, annexina II	-----	Annexina I	

Taula I. Resum d'algunes de les propietats conegudes dels endosomes.

La via endocítica està formada per una complexa xarxa de compartiments de diversa morfologia, propietats físico-químiques i contingut (Mellman I i col., 1996). Dins de la complexitat però es poden diferenciar tres regions principals reconegudes com:

1. Endosomes primerencs (EE): són els primers compartiments trobats pel material endocitat, presenten un pH lleugerament acídic i són feblement proteolítics.
2. Endosomes tardans (ET): són més acídics i de morfologia complexa i variable. Contenen alguns dels components clàssicament usats com a marcadors de lisosomes com són algunes proteases i les glicoproteïnes lamp-1 i -2.
3. Lisosomes (L): presenten un pH baix i tenen un contingut ric en enzims hidrolítics. Són el darrer estadi de la via endocítica, esdevenint un dels “dipòsits” cel·lulars principals de material de rebuig o en degradació.

En molts treballs, i també en el present, s’ha usat el terme “compartiments de MHC II” (MIIC), per designar els compartiments de la via endocítica de les APCs on una proporció important de les MHC II s’uneixen al pèptid antigènic (Peters PJ i col., 1991; Amigorena S i col., 1994; Tulp A i col., 1994). Aquesta nomenclatura però, no implica l’existència de compartiments específics, presents només en les APCs (Geuze H i col., 1998; Neefjes J i col., 1999) sino que referencia el compartiment endocític on es generen la majoria dels complexos MHC-pèptid.

1.2.2.1. La cadena invariant: Una chaperona específica de la via endocítica.

Les cadenes de MHC II recent sintetitzades, són translocades a l’ER, on s’associen a la cadena invariant (Ii), una proteïna transmembrana de tipus II (Cresswell P i col., 1996), amb l’ajut de chaperones com la calnexina. En humans s’han descrit 4 isoformes de la cadena invariant (p33, p35, p41 i p43) que es generen mitjançant splicing alternatiu o bé llocs alternatius d’inici de traducció. La forma majoritària és la p33 (p31 a ratolí) de 206 aminoàcids (Strubin M i col., 1986a; Strubin M i col., 1986b). La Ii conté en la regió C-terminal una seqüència involucrada en la formació d’un homotrímer que serveix d’esquelet per a la unió de tres dímers $\alpha\beta$ (Roche PA i col., 1991). De manera semblant a la interacció del pèptid amb les MHC I, la unió amb la Ii estabilitza el plegament de les MHC II en l’ER. En cèl·lules deficientes per Ii, els dímers $\alpha\beta$ de MHC II no s’ensamblen correctament, i formen homoagregats (Bikoff EK i col., 1993; Elliott EA i col., 1994) que romanen retinguts a l’ER, associats a chaperones com la BIP, la grp94 i la p72 (Bonnerot C i col., 1994; Schaiff WT i col., 1992). La interacció entre el dímer MHC II i la Ii es dona principalment per la inserció de la regió anomenada CLIP de la Ii en el solc d’unió a pèptid (Ghosh P i col., 1995). D’aquesta manera, la regió CLIP estabilitza la conformació del dímer $\alpha\beta$, impedit la unió d’aquest amb altres proteïnes residents en l’ER o amb polipèptids translocats des del citosol, i mantenint així, la dicotomia entre les molècules de MHC de classe I i de classe II respecte a l’origen cel·lular dels pèptids que uneixen (Roche PA i col., 1990; Teyton L i col., 1990; Busch R i col., 1996). Altres regions de la Ii contribueixen a estabilitzar la interacció amb el dímer $\alpha\beta$, establint contactes amb àrees no polimòrfiques

adjacents al solc d'unió a antigen i dins del segment transmembrana (Stumptner P i col., 1997; Jasanoff A i col., 1999; Castellino F i col., 2001).

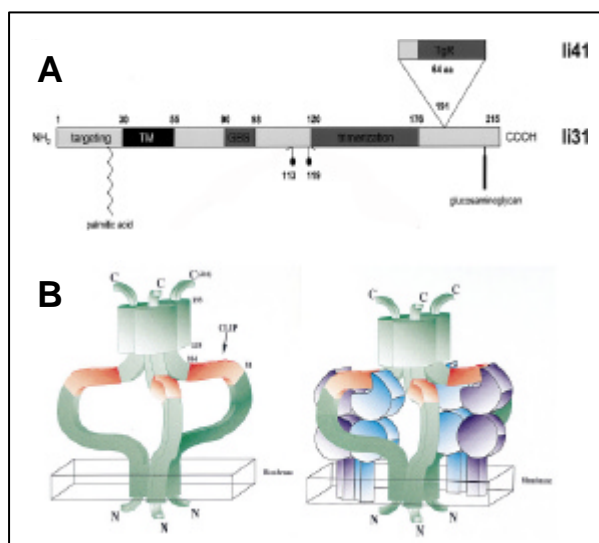


Figura 5: Esquema de l'estructura de la cadena invariant. (A) Esquema dels dominis de les dues isoformes Ii41 i Ii31 de ratolí. (B) Representació esquemàtica del trimer de cadenes invariants (esquerra) que forma l'esquelet que allotjarà als tres dimers de MHC II en blau i lila (dreta). El segment N-terminal de la cadena invariant queda extès permetent la inserció de la seqüència CLIP al solc d'unió a antigen de les MHC II. La regió C-terminal entre els residus 118 i 193 permet la formació de l'estructura trimèrica.

Els nonàmers $(\alpha\beta)_3Ii_3$, travessen l'aparell de Golgi per arribar a la xarxa del trans-Golgi, on són segregats de la via secretora constitutiva i dirigits a la via endocítica (Peters PJ i col., 1991). En la cua citoplasmàtica de la Ii es troben dos motius basats en Leu que són els responsables de dirigir les MHC II cap a la via endocítica (Bakke O i col., 1990; Lotteau V i col., 1990; Wolf PR i col., 1995). Aquest mecanisme de transport no és 100% eficient i, en funció del tipus cel.lular, una fracció variable dels macrocomplexes MHC II-Ii segueixen la via constitutiva cap a la superfície cel.lular (Wraight CJ i col., 1990; Koch N i col., 1991; Saudrais C i col., 1998). Els complexos MHC II-Ii que arriben a la superfície cel.lular són ràpidament internalitzats ja que la cadena invariant també conté una senyal d'internalització en la seva cua citoplasmàtica (Roche PA i col., 1993; Bremnes B i col., 1994).

El destí dels complexos MHC II-Ii que surten de la xarxa del trans-Golgi encara és un tema de debat. La visió més acceptada és que la majoria de complexos entren en la via endocítica a nivell d'EE o bé en la transició EE /ET (Geuze H i col., 1998; Villadangos JA i col., 2000b; Watts C, 2001).

Recentment, s'ha descrit l'associació d'Ii amb altres molècules involucrades en la presentació antigènica, com HLA-DM i CD1d (Jayawardena-Wolf J i col., 2001; Kang SJ i col., 2002), suggerint un rol d'Ii més ampli com a chaperona de les molècules implicades en la presentació d'antigens generats en la via endosomal.

1.2.2.2. Generant MHC II "receptives" per a la unió a antigen.

Quan els complexos MHC II-Ii arriben a la via endocítica, la Ii és degradada per aspàrtic i cistein proteases en un procés seqüencial que genera les formes intermediàries Iip22, Iip10 i finalment CLIP (Villadangos JA i col., 1999). El nonàmer MHC II-Ii és molt compacte i la resta de la cadena invariant no esdevé accessible a les proteases fins que no s'ha eliminat el domini

de trimerització, donant lloc a tres complexos MHC II-lip22. A continuació es talla l'extrem C-terminal de l'lip22 que conté un carbohidrat, donant lloc al complex MHC II-lip10. Amb l'eliminació del carbohidrat probablement es deixa al descobert el proper lloc de tall en l'extrem N-ter de CLIP que donarà lloc al complex final MHC II-CLIP (Neumann J i col., 2001). Dels tres processos proteolítics que es donen durant la degradació de la li, només la degradació d'lip10 s'ha pogut atribuir a un enzim particular. S'han identificat tres proteases de cisteïnes, amb un patró d'expressió diferencial en les APCs, que presenten la capacitat de tallar lip10. Les cèl·lules B i les cèl·lules dendrítiques utilitzen la Cat S (Riese RS i col., 1996; Villadangos JA i col., 1997; Nakagawa TY i col., 1999; Shi GP i col., 1999), les cèl·lules epitelials tímiques usen la Cat L en aquest pas (Nakagawa TY i col., 1998) i els macròfags el poden realitzar mitjançant la Cat S, la Cat L i també la Cat F (Shi GP i col., 2000). Avui en dia encara no està clar si les diferències (i redundàncies) en l'ús d'aquestes proteases en les diferents APCs té una funció biològica específica o bé si és només una conseqüència de les característiques del llinatge cel·lular o teixit.

La conversió d'lip10 a CLIP és crucial per la biologia de les MHC II per dues raons:

- a) Dóna lloc al precursor immediat del complex MHC II-pèptid.
- b) S'elimina la senyal de localització endosomal de la cua citoplasmàtica de la li nativa, també present en els intermediaris lip22 i lip10, que actua com a motiu de retenció, impeding la sortida cap a la superfície cel·lular de les MHC II.

Així doncs, el complex MHC II-CLIP és lliure de sortir cap a la superfície i per això la degradació d'lip10 ha d'anar temporal i espacialment seguida de la substitució de CLIP per un pèptid antigènic.

Hi ha diferents factors que contribueixen a l'eliminació de CLIP del solc de MHC II per a que aquestes quedin receptives per unir el pèptid antigènic. El solc de les MHC II és flexible i pot presentar una conformació "oberta" que permet l'alliberació de CLIP i la unió d'altres pèptids amb la seqüència correcta. Un dels factors que induïx la conformació oberta de les MHC II es el pH baix (Jensen PE i col., 1990; Mouritsen S i col., 1992; Sette A i col., 1992; Kropshofer H i col., 1995; Runnels HA i col., 1996; Reich Z i col., 1997), però el més important és la intervenció d'una altra chaperona d'estructura similar a les pròpies molècules MHC II: HLA-DM. HLA-DM estabilitza la conformació oberta del solc de les MHC II, augmentant el temps durant el qual aquestes poden completar la unió del pèptid antigènic (Sanderson F i col., 1994; Kropshofer H i col., 1999) i editant el repertori peptídic que s'associarà de forma estable a les MHC II (Kropshofer H i col., 1996). En algunes APCs professionals, com en les cèl·lules B, s'ha descrit l'expressió constitutiva d'HLA-DO, una segona chaperona que interacciona amb el complex MHC II/DM en els endosomes i modula l'acció d'HLA-DM (Liljedahl M i col., 1996; Brocke P i col., 2002). Quan les MHC II ja s'han unit a un pèptid antigènic, els complexos s'exporten des de la via endocítica a la membrana plasmàtica mitjançant transport vesicular.

Com la majoria de proteïnes de membrana residents a la superfície cel·lular, els complexos MHC II-pèptid s'eliminen per endocitosi seguida de la seva destrucció en els compartiments lisosomals. Quan aquests complexos són internalitzats, les MHC II poden intercanviar el pèptid i recircular cap a la superfície de nou (Pinet V i col., 1995; Cella M i col., 1997; Askew D i col., 2000).

Tot i que la majoria de pèptids antigènics presentats per MHC II es generen per la degradació de proteïnes en la via endocítica, s'han descrit dues vies alternatives. En la primera, les proteïnes extracel·lulars són degradades en l'exterior de les cèl·lules per proteases solubles o ectoproteases de membrana (Larsen SL i col., 1996; Santambrogio L i col., 1999; Dong X i col., 2000). Els pèptids generats per aquesta via poden unir-se directament a les MHC II de la superfície cel·lular, desplaçant altres pèptids de menor afinitat, o bé ser internalitzats per endocitosi incorporant-se a la via clàssica d'unió a antigen de les MHC II. L'altra via descrita es dona en el citosol i sembla que el proteasoma i les calpaines són les proteases responsables de produir els pèptids antigènics en el citosol que seran translocats cap a la via endocítica mitjançant un mecanisme molt poc conegut (Lich JD i col., 2000). També es poden translocar als endosomes algunes proteïnes per a la seva degradació. S'han descrit alguns exemples de pèptids derivats de proteïnes citosòliques presentats per MHC II (Jin Y i col., 1988; Jacobson S i col., 1989; Jaraquemada D i col., 1990; Nuchtern JG i col., 1990; Malnati MS i col., 1992; Oxenius A i col., 1995; 1997), i alguns dels pèptids eluïts de classe II en B-LCLs deriven de proteïnes citosòliques (Rudensky Y i col., 1991; Chicz RM i col., 1993; Dongre AE i col., 2001).

