



## Hipòtesi de treball

El treball que es presenta en aquesta tesi es basa en dos publicacions prèvies del laboratori (Serradell L i col, 1999, Catálfamo M i col, 1999) i en les tesis de M. Catálfamo i L. Serradell. L'estudi bioquímic de les molècules de classe II de tiròcits d'un pacient amb l'hipertiroiditis de Graves-Basedow, va confirmar la inducció de MHCII amb IFN $\gamma$  i va demostrar la seva associació a pèptids antigènics estables i per tant, la seva capacitat potencial de ser reconegudes per cèl·lules T CD4<sup>+</sup>. En aquest mateix estudi també es demostrà l'expressió funcional de la cadena invariant i d'HLA-DM en els tiròcits de glàndules autoimmunes

En aquest estudi s'ha treballat amb la hipòtesi que les MHC II que s'expressen en les cèl·lules endocrines en situacions d'autoimmunitat s'associen a pèptids autòlegs formant complexos estables capaços de mantenir la resposta autorreactiva dels limfòcits T CD4<sup>+</sup> en l'òrgan diana.

## Model experimental

Els principals factors que dificulten els estudis en cèl·lules parenquimals, són per una banda la manca de material *ex vivo*, i d'altra banda, la pèrdua de l'expressió de les molècules de classe II de les cèl·lules endocrines primàries aïllades i mantingudes en cultiu *in vitro*. Per abordar aquesta qüestió es van establir en el laboratori dos grups de línies cel·lulars derivades de la línia RINm5F que expressen per transfecció estable les molècules humanes DRB1\*0401 o DRB1\*0301, i les chaperones Ii i HLA-DM. La transfecció seqüencial dels diferents gens va permetre generar cèl·lules neuroendocrines que expressaven les 4 combinacions possibles per cada un dels al·lels: -DR, -DRli, -DRDM, -DRliDM. Així s'aconseguien models de cèl·lules presentadores que permetien l'estudi de les influències que tenen Ii i HLA-DM en la presentació d'antígens per MHC II en una línia cel·lular endocrina.

En la primera etapa del projecte realitzat per la Dra. Laurence Serradell es van generar les línies endocrines MHC II<sup>+</sup> i es procedí a la caracterització bioquímica de les molècules de classe II expressades per les diferents línies endocrines segons l'expressió d'Ii, DM o d'ambdues molècules (Serradell L i col., 1999). Els resultats demostraven que:

- En absència d'ambdues chaperones, els dímers DR expressats per les cèl·lules epitelials eren sensibles al SDS a t<sup>a</sup> ambient, indicant l'absència de lligands capaços d'estabilitzar el complex
- La co-expressió de la cadena invariant en absència d'HLA-DM permeté la detecció d'una majoria de dímers DR-CLIP a la superfície de les doble transfectants DR4li i DR3li. Aquest dímers no eren resistents al SDS a t<sup>a</sup> ambient.

- En les cèl·lules DRDM, es produï a la conversió de part dels complexos DR-pèptid a la conformació compacte, resistents a SDS a t<sup>a</sup> ambient, indicant que DM és funcional en absència d'Ii.
- A la superfície de les cèl·lules que co-expressaven ambdues chaperones, els complexos DR-pèptid presentaven conformació compacte i no es detectaren complexos DR-CLIP a la superfície.

## **OBJECTIU GENERAL**

*Aprofundir en l'estudi de les cèl·lules endocrines com a cèl·lules presentadores d'antigen per MHC II*

### **Objectiu 1. Estudi del rol d'HLA-DM com a chaperona de DR en absència de la cadena invariant.**

La presència de complexos DR-pèptid estables a la superfície de les cèl·lules transfectades amb DR i DM en absència d'Ii (Serradell L i col., 1999), va generar una sèrie de preguntes que s'aboardaren en el primer capítol de resultats d'aquest treball

- On es produeix la colocalització de DR i DM en absència d'Ii?
- En absència d'Ii, pot DM actuar com a chaperona de DR, facilitant la seva arribada als compartiments endocítics?

#### **Objectius específics:**

- 1.1. Estudi de la localització de DR4, Ii i DM en les línies transfectades DR, DRiI, DRDM i DRiIDM per microscòpia confocal
- 1.2. Anàlisi del paper de DM com a chaperona durant la maduració de les molècules DR de nova síntesi

### **Objectiu 2. Estudi de l'organització dels compartiments subcel·lulars involucrats en la biogènesi i captació d'antigen de les molècules MHC II en la línia RINm5F.**

La manca de dades sobre els compartiments intracel·lulars implicats en la biosíntesi i l'adquisició de lligands per les MHC II en les cèl·lules endocrines, i la importància que aquests compartiments tenen pel repertori antigènic presentat per qualsevol APC van donar lloc a la segona part d'aquest treball .En aquest objectiu es vol respondre a les preguntes:

- quins compartiments de la via endocítica de la línia RINm5F estan involucrats en la presentació d'antigen per MHC II?
- l'expressió de les MHC II, Ii i HLA-DM indueix canvis en la via endocítica de les cèl·lules endocrines?
- com influeixen Ii i DM en la localització de les molècules DR4 en el context de la cèl·lula RINm5F?

#### **Objectius específics:**

- 2.1. Determinar la influència de l'expressió de DR4, Ii i HLA-DM en l'organització de la via endocítica de la línia RINm5F per microscòpia de transmissió
- 2.2. Determinar la influència de l'expressió d'Ii i DM en la localització subcel·lular de les molècules DR4 en les cèl·lules RINm5F per microscòpia de transmissió

### **Objectiu 3. Estudi del repertori peptídic associat a DR4 en la línia endocrina RINm5F**

En la tercera part d'aquest treball es vol avaluar la capacitat de les cèl·lules endocrines per a presentar els autoantígens sintetitzats per elles mateixes en el context de les MHC II, responnent a les següents preguntes:

¿Les MHC II en les cèl·lules RINm5F s'associen a pèptids autòlegs?

¿quina és la influència de la presència o absència d'Ii i HLA-DM en el repertori peptídic presentat per MHC II en les cèl·lules endocrines?

#### **Objectius específics:**

3.1. Caracterització per MALDI del repertori de pèptids associats a DR4 expressat en les cèl·lules transfectades: DR4, DR4Ii, DR4DM, DR4IiDM. Influències de l'expressió d'Ii i DM

3.2. Identificació dels lligands majoritaris en el repertori associat a DR4 en les cèl·lules transfectades: DR4, DR4Ii, DR4DM, DR4IiDM per espectrometria de masses en tàndem. Anàlisi de la influència exercida per la presència o absència d'Ii i d'HLA-DM sobre el repertori de DR4

### **Objectiu 4. Estudi comparatiu de les característiques com a cèl·lules presentadores d'antigen per MHC II entre una cèl·lula endocrina i una cèl·lula B limfoblastoid.**

La presència de cèl·lules B i d'altres cèl·lules amb la capacitat per presentar antígens per MHC II en els infiltrats de les glàndules afectades per respostes autoimmunitàries i l'evidència que els repertoris presentats per aquestes i per les cèl·lules endocrines són diferents, van generar la quarta part d'aquest estudi en la que es vol respondre a les preguntes:

¿presenten diferències importants el repertoris associats a DR4 en una línia epitelial i en una línia B limfoblastoid?

¿quines són les semblances i diferències en les vies de maduració dels dímers DR4 en ambdós tipus cel·lulars?

#### **Objectius específics:**

4.1. Caracterització de l'organització de la via endocítica en les cèl·lules B limfoblastoid. Comparació amb l'organització de la via endocítica en les cèl·lules DR4IiDM.

4.2. Estudi de la distribució subcel·lular de les molècules DR4 i les chaperones Ii i HLA-DM en la cèl·lula B limfoblastoid. Comparació amb la distribució observada en les cèl·lules DR4IiDM

4.3. Caracterització del repertori peptídic associat a DR4 en una línia B limfoblastoid i identificació dels lligands majoritaris

4.2. Comparació del repertori associat a DR4 en la línia B limfoblastoid i en les cèl·lules endocrines DR4IiDM



## 1. Línies cel·lulars

La línia cel·lular RINm5F (Gadzar AF i col., 1980) generada d'un insulinoma de rata es cultivà en monocapa, en medi de cultiu RPMI 1640 (GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) enriquit amb el 10% de sèrum boví fetal (FCS) (Gibco) prèviament descomplementat per calor a 56°C durant 30 minuts, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicil·lina i 0.1 mg/ml d'estreptomicina (anomenat medi complet). Les cèl·lules es van cultivar en flascons de poliestirè i es diluï en cada 3-4 dies mitjançant un procés de tripsinització (0.025% de tripsina, (Sigma, St Louis, MO, USA) i 0.02% d'EDTA en PBS: Tampó fosfat salí, pH 7.2)

Les diferents línies RINm5F transfectades es cultivaren en monocapa en medi de cultiu complet en el qual s'afegí el medi de selecció corresponent en cada cas. A la taula es mostren les concentracions dels diferents antibiòtics en les solucions mare, de selecció, preparades en medi complet:

	<b>transfectant</b>	<b>Antibiòtic</b>
<b>1</b>	DR4/DR3	+ Geneticina 0.25 mg/ml
<b>2</b>	DR4li/DR3li	+ Geneticina 0.25 mg/ml + MXH 1x
<b>3</b>	DR4DM/DR3DM	+ Hygromicina B (0.8 mg/ml) + Puromicina (4µg/ml)
<b>4</b>	DR4liDM/DR3liDM	+Hygromicina B (0.8 mg/ml) + Puromicina (4 µg/ml)

**Taula II: Concentració dels diferents antibiòtics en les solucions mare**

Per a la preparació de les solucions mare, la geneticina G418 (Gibco) i la higromicina B (Boehringer Mannheim) en solució líquida, s'usaren directament. La solució stock de MXH 100x es preparà amb 25 mg/ml de Xanthine (Calbiochem, La Jolla, CA, USA), 1.5 mg/ml d'hipoxantina (Sigma) i 0.6 mg/ml d'àcid micofenòlic (Gibco). La solució stock de puromicina (Sigma) es preparà a una concentració de 2mg/ml en aigua. Aquestes dues darreres solucions, s'esterilitzaren per filtració, s'aliquotaren i s'emmagatzemaren a -20°C.

Les solucions mare 1 i 2 s'usaren sense diluir, mentre que les solucions mare 3 i 4 es diluï ren ¼ en medi complet fins a les concentracions finals de cultiu.

La línia de cèl·lules B limfoblastoids (B-LCL) s'obtingué en el laboratori mitjançant la transformació de limfòcits aïllats de sang perifèrica d'un pacient diabètic amb el virus d'Epstein-Barr (Costa M i col., 2002) i es mantingué en cultiu en medi complet. La tipificació de la LCL es realitzà en col.laboració amb el Dr. Eduard Palou del Laboratori d'HLA del Centre de Transfusions i Banc de Teixit de l'Hospital Vall d'Hebró, Barcelona.

Totes les línies es mantingueren en cultiu en un incubador a 37°C en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2. Anticossos

Els anticossos usats figuren a la taula III:

Anticòs	Especificitat	Natura	Origen/referències
L243	HLA-DR $\alpha\beta$	sobrenadant	ATCC, Rockville, MD, USA/ Lampson i Levy, 1980
VIC-Y1	Ii (part citoplàsmica)	ascitis	Dr. W. Knapp, IFI, Viena, Austria/ Quaranta et al, 1984
CerCLIP.1	CLIP	ascitis	Dr. P. Cresswell/ Denzin et al, 1994
DR $\alpha$	DR $\alpha$	sèrum	Dr. P. Morton
Icc5	Ii C-ter	sèrum	Dr. P. Morton
5C1	DM $\alpha$	Ac purificat	Dr.J.Trowsdale/ Sanderson et al, 1994
Lamp-1	Anti-lamp1	Ac purificat	Dr.S.Carlsson/ Carlsson et al, 1988
RaM	Ig de conill anti-Ig de ratolí	ascitis	Dako, BCN, Espanya
GaM-FITC	Ig de cabra anti-Ig de ratolí marcat amb isothiocyanate de fluoresceïna	ascitis	Southern Biotechnologies, Birmingham, AL, USA
GaM-TRITC	Ig de cabra anti-Ig de ratolí marcat amb isothiocyanat de tetrametil rodamina	Ascitis	Southern Biotechnologies, Birmingham, AL, USA

Taula III Llista dels anticossos usats en aquest estudi.

## 3. Caracterització de les línies usades

### 3.1 Tinció per citometria de flux de cèl·lules en suspensió

El fenotipat de les diferents línies transfectades i de les B-LCLs es realitzà per tècniques d'immunofluorescència indirecta per citometria de flux en cèl·lules en suspensió. Les línies cel·lulars epitelials es desenganxaven i dispersaven mitjançant una procés de tripsinització previ a la tinció. L'adquisició i l'anàlisi de les cèl·lules es realitzà en un citòmetre de flux FACScan i utilitzant el software Cellquest ( Becton-Dickinson, San José, USA). En funció de la localització de la molècula a detectar es van usar 2 protocols



### 3.1.1. Tinció de superfície per immunofluorescència indirecta

Entre  $1$  i  $3 \times 10^5$  cèl·lules es ressuspenyeren en PBS+2% FCS i centrifugaren durant 5 minuts a 500xg, per a l'eliminació de les restes cel·lulars.

El pellet cel·lular s'incubà en 50µl de l'anticòs específic per a la molècula a analitzar (anomenat anticòs primari) a 4°C durant 30 minuts, en placa de 96 pous de fons rodó. S'eliminà l'excés d'anticòs amb dos rentats de les cèl·lules en PBS-2%FCS. La detecció de l'anticòs primari es realitzava per incubació de les cèl·lules a 4°C, durant 30 minuts, a la foscor amb 50µl d'anticòs de cabra anti-Ig de ratolí marcat amb fluoresceïna (anticòs secundari)

### 3.1.2. Tinció de citoplasma

El protocol usat és una variació del protocol descrit per Dodi et al, 1994. Tots els passos es realitzaren a Tª ambient. Es fixaven  $0.5-1 \times 10^6$  cèl·lules durant 10 minuts en 100 µl de PBS-1% de paraformaldehyd. Es realitzaven tres rentats en tampó de rentat (PBS+ 0.1% saponina +1%FCS) i centrifugació de 5 minuts a 500xg. Les cèl·lules s'incubaren en 50µl d'anticòs primari amb 0.05% de saponina, durant 30 minuts. Després de tres rentats de 5 minuts a 500xg amb tampó de rentat, les cèl·lules s'incubaren en 50µl d'anticòs secundari + 0.05% saponina durant 30 minuts a la foscor. Les tincions s'analitzaren en un citòmetre de flux després de tres rentats en tampó de rentat i un darrer rentat en PBS-2%FCS.

### 3.1.3 Dilució dels anticossos

Les dilucions de cada anticòs usada per les tincions analitzades per citometria de flux estan especificades a la taula IV

Anticòs	Dilució d'ús	Diluit en
L243	Sense diluir	-
CerCLIP.1	1/1000	PBS-2%FCS
VIC-Y1	1/500	PBS-0.05% saponina
5C1	1/500	PBS-0.05% saponina
GaM-FITC	1/100	PBS-2%FCS
GaM-FITC	1/100	PBS-0.05% saponina

Taula IV Concentració dels anticossos usats per citometria de flux.

## 3.2. Transferència de Northern ("Northern Blot")

L'anàlisi dels nivells d'expressió de DRα en les diferents transfectants es feu per quantificació dels nivells d'ARN missatger específic per northern blot.

### 3.2.1. Extracció de RNA total

L'ARN total usat en els assajos de Northern es purificà seguint una variant del mètode de GTC/fenol (Chomczynsky and Sacchi, 1987). Les cèl·lules es desenganxaren del cultiu per tripsinització i es recuperaren en un pellet per centrifugació a 500g durant 5 minuts. Es rentaren en PBS per eliminar els restes de medi de cultiu i tripsina. La sol·lució de llisi anomenada GSAMF es preparà al mateix moment de l'extracció a partir d'una sol·lució stock anomenada GSA (isotiocianat de guanidina 4M, acetat sòdic 50mM, N-lauril sarcosina 0.5%). Per un volum de GSA s'afegí 4% de 2 $\beta$ -mercaptoetanol 100mM i un volum de fenol àcid saturat amb aigua). Les cèl·lules es resuspengueren a una relació de 5x10<sup>6</sup> cèl·lules per ml de solució GSAMF i els pellets homogeneïtzats amb pipeta es deixaren 5 minuts a temperatura ambient per tal que es dissociessin els complexos nucleoproteics. A continuació s'afegiren 0.2 vol de cloroform-alcohol isoamílic (49:1) en cada mostra, s'homogeneïtzà per inversió vigorosa 30" i es deixaren 15 min en gel. Finalment les mostres es centrifugaven 30 minuts a 10000xg, 4°C i es recuperava la fase aquosa que era transferida a un tub eppendorf. El contingut de RNA es va precipitar amb un vol d'isopropanol durant 2h a -20°C i per centrifugació a 10000xg durant 30 minuts a 4°C. Un cop obtingut el pellet de RNA es rentava dues vegades amb etanol 75% fred per eliminar-ne les restes de sals. El pellet s'emmagatzemà resuspès en aigua prèviament tractada amb 0.1% de dietilpirocarbonat (DEPC) (INC, Costa Mesa, CA, USA). La concentració i la puresa del RNA obtingut es mesurà per espectrofotometria amb lectura a 260nm i la relació A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, respectivament. Per assegurar la integritat del RNA, el perfil electroforètic de les mostres es verificà mitjançant electroforesi en gel d'agarosa 1% i tinció amb bromur d'etidi, utilitzant 5 $\mu$ g de cada mostra. Les mostres de RNA es conservaven a -70°C.

### 3.2.2. Gel i transferència

10 $\mu$ g de cada mostra de RNA es separaren per electroforesi en gel d'agarosa al 1.5% i formaldehid (2.2M). A continuació les mostres es transferiren per capilaritat durant 16h a una membrana de nylon Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham, Buckinghamshire, UK) usant com a tampó de transferència SSC 20x (NaCl 3M, citrat sòdic 0.3M, pH 7). El RNA transferit es fixà en la membrana de nylon per irradiació amb llum UV (150mJ) en un Stratalinker<sup>TM</sup> 1800 (Stratagene, San Diego, USA). Les membranes es guardaren entre dos papers Whatman 3MM fins al moment d'hibridació.

### 3.2.3. Hibridació amb sondes específiques

Les membranes s'hibridaren amb una sonda de 1.25 kb corresponent al cDNA de HLA-DR $\alpha$ , i amb una sonda de 412 bp de la  $\beta$ -actina humana, marcades radioactivament. Les sondes es van quantificar en un comptador beta, betamatic iV (Kontron), es desnaturalitzaren 5 minuts a 100°C i s'ajustaren amb solució d'hibridació a 2x10<sup>6</sup> cpm/ml.

La hibridació de la membrana es realitzà segons el protocol descrit per Engler-Blum (Engler-Blum G i col, 1993). Després d'un equilibrat de la membrana d'un minut en 50ml de SSC 2x (1xSSC: 0.15M NaCl, 0.013M citrat sòdic), la membrana es pre-hibridà amb solució d'hibridació (SDS 7%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25M, BSA 1%, i EDTA 1mM) a 68 °C durant un mínim de 2 hores en rotació. La sonda radioactiva s'afegia a la solució d'hibridació, i després de 20 hores, les membranes es rentaven 3 vegades durant 20 minuts en solució de rentat (SDS1%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM i EDTA 2mM) a 68°C. Les membranes acabades d'hibridar s'analitzaven directament en un Phosphoimager (Personal Molecular Image, BioRad) i el programa Quantity One (BioRad).

### 3.3. RT-PCR d'HLA-DO

Per analitzar l'expressió de la molècula Rt.1-DO en la línia epitelial RINm5F es determinà el nivell de transcripció del gen RT.Dna per tècniques de RT-PCR

#### **3.3.1. Extracció de RNA total i Retrotranscripció**

Per l'extracció de RNA usat en aquest experiment, s'usa el kit comercial RNAqueous<sup>TM</sup>-4PCR d'extracció de RNA d'Ambion Inc. (Texas, USA). Es partí de 10<sup>6</sup> cèl·lules DR4liDM i com a control s'usà melsa i timus fetal de rata. L'homogenització dels blocs de teixit congelat en N<sub>2</sub> líquid s'aconseguí mecànicament amb un Politron en presència de la solució de llisi comercial.

El cDNA s'obtingué incubant 1µg de RNA total, prèviament desnaturalitzat per calor a 68°C durant 5 minuts, amb: oligo-d(T)<sub>18</sub> 0.5µg de RNA, 20U RNAsin, 1mM de cada dNTP, transcriptasa reversa AMV (15U de RNA) i tampó 1x ( 10mM Tris-HCl pH 8.8, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, Tritó X-100 0.1%) en un volum final de 20 µl durant 1h a 42°C en bany d'aigua. Per aturar la reacció la mostra es mantingué 3min a 95°C i 3 min més en gel.

#### **3.3.2. PCR (Reacció en cadena de la polimerasa)**

El parell d'encebadors per a la cadena RT.1-DO $\alpha$  de rata van ser dissenyats usant la seqüència gènica RS420S2. Els oligonucleòtids inclouen un intró, donen un amplímer de 324 pb, i comprenen les seqüències:

5'GAAGAAGGGGGAGGTCTGTG 3'

5'CTGTGGTTAGGCTGGGAGTAG 3'

Els encebadors pel gen constitutiu S15 eren del kit d'Ambion i amplificaven una regió de 361 pb.

Les reaccions de PCR es realitzaren per incubació de 1µl de cDNA amb una solució que contenia: 200µM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, WT-1 0.05%, tampó 1x (Tris-HCl, pH 9) 10mM, KCl 50mM, Tritó X-100 0.1%), 1µM de cada un dels encebadors específics i 1.25U de Taq polimerasa (DyNAzyme<sup>TM</sup>II DNA polimerasa, Finnzymes Inc., Finlàndia) en un volum final de 15µl. S'afegiren 20µl d'oli mineral en cada tub per evitar

l'evaporació. L'amplificació es realitzà en un termociclador Perkin-Elmer Cetus 480 utilitzant els protocols especificats en la taula V. Com a control negatiu sempre s'incloué un tub amb tots els reactius excepte cDNA. Com a control positiu de l'amplificació de la cadena Rt.1-DO $\alpha$  s'usà cDNA provinent de melsa i timus de rata.

Tipus d'amplímer	Protocol PCR	T <sup>a</sup> d'hibridació
RT.1-DO	1' 72°C 1' 63°C x 35 1' 72°C 10' 72°C	58°C
S15	1' 95°C 1' 55°C x30 1' 72°C 5' 72°C	57°C

**Taula V Protocols d'amplificació per a PCR.** En tots els protocols es realitzava un cicle inicial de 3' a 97°C i una fase de parada a 85°C durant la qual s'afegia l'enzim a la reacció.

Per a poder comparar els resultats de l'amplificació entre les diferents mostres es van normalitzar les quantitats de cDNA en funció de l'expressió del gen constitutiu S15. Es van fer dilucions seriades de cada mostra de cDNA i 2 $\mu$ l de cada mostra es van amplificar amb els encebadors específics per a la S15 a 30 cicles. Es va escollir per a cada mostra aquella dilució de cDNA que donava una intensitat de banda semblant a les altres en un gel d'agarosa tenyit amb bromur d'etidi.

### 3.3.3. Electroforesi i hibridació amb sonda específica

El producte amplificat es visualitzà mitjançant l'electroforesi en un gel d'agarosa al 2% en tampó TAE 1x (Tris, àcid acètic glacial, EDTA) de 10-15  $\mu$ l de producte de PCR. Al producte de PCR s'afegí 1 $\mu$ l de tampó blau de bromofenol 10x (10% ficoll, 0.5% blau de bromofenol i 5mM EDTA). El gel es tenyia amb bromur d'etidi i les bandes corresponents a l'amplímer es visualitzaven en un transil.luminador de llum uv. La transferència a membrana i la hibridació amb la sonda específica per DO $\alpha$  es realitzà seguint el mateix protocol descrit als punts 3.2.2. i 3.2.3. L'oligosonda abarcava la seqüència: 5'AACCGAACCAGAGCCGTA3'

#### 4. Microscòpia de fluorescència

##### 4.1. Tinció amb anticossos específics a partir de cèl·lules en cultiu

Les cèl·lules RIN es posaren directament en cultiu sobre el vidre durant una nit i es fixaren amb acetona freda durant 8 minuts. Després es rentaren 3 vegades en PBS + 2% FCS i els coverlips s'incubaren en 100µl de l'anticòs específic per la molècula a detectar durant 30 minuts. Després de tres rentats, s'incubaren en 100µl de solució del segon anticòs marcat, durant 30 minuts i es rentaren tres vegades més en PBS-2%FCS. Per a l'observació al microscopi els coverlips es montaren sobre portaobjectes de vidre. Els marcatges de les molècules transfectades van ser analitzats en el microscopi Leica TCSNT amb una lent 100x PL (Leica, Viena, Austria) del Servei de Microscopia confocal de l'Hospital Clínic de Barcelona.

Les concentracions i els medis de dilució dels anticossos usats s'indiquen a continuació a la taula VI:

Anticòs	Dilució d'ús	Diluit en
L243	No diluït	-
VIC-Y1	1/500	PBS-2%FCS
5C1	1/400	PBS-2%FCS
Lamp-1	1/400	PBS-2%FCS
GaM-FITC	1/100	PBS-2%FCS
GaM-TRITC	1/100	PBS-2%FCS

**Taula VI Concentració dels anticossos usats per microscòpia confocal.**

##### 4.2. Marcatge de l'ER i del GA amb sondes específiques.

La morfologia de l'ER es visualitzà mitjançant la internalització de la sonda R-648 (rhodamine B, hexyl ester, chloride) mentre que l'aparell de Golgi i les vesícules del transgolgi es visualitzaren per internalització de la sonda N-1154 (6-((N-(7-notrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)hexonyl)sphingosine) (Molecular Probes, Oregon, USA). Es preparà una solució stock d'ambdues sondes 1mM en DMSO que s'emmagatzemà a -20° C a la foscor. Les cèl·lules es mantenien en cultiu sobre coverslips de vidre. Abans de realitzar el marcatge, els coverslips es rentaven en PBS i les cèl·lules es fixaven amb PFA 4% durant 10min. S'incubaven els coverslips, 20 min a 4°C amb les sondes específiques, a la concentració d'ús en medi de cultiu (R-648, 5 µM i N-1154 1µM). Mitjançant 3 rentats de 10min en medi de cultiu s'eliminava la sonda en excés previ al muntatge dels coverslips per a l'observació al microscopi.

## 5. Immunoprecipitació de DR i digestió amb Endoglicosidasa H

Per analitzar la cinètica de maduració de DR en les diferents cèl·lules transfectades s'usaren tècniques de marcatge radioactiu de les molècules de nova síntesi combinats amb la immunoprecipitació específica de DR i posterior digestió amb l'enzim endoglicosidasa H. La endoglicosidasa H és un enzim que talla els residus d'alt contingut en manosa que presenten les molècules al sortir de l'ER però que no pot tallar els residus de N-glicans més complexos que presenten les molècules madures després d'haver estat modificades en l'aparell de Golgi.

### 5.1. Marcatge metabòlic amb S<sup>35</sup>

Les cèl·lules adherents cultivades en flascons, es rentaven amb 15ml de PBS i es mantenien en cultiu 30 minuts en medi RPMI sense cisteïna ni metionina (Sigma), amb 5%FCS dialitzat, per a eliminar les fonts de cisteïna i metionina. A continuació les cèl·lules es van marcar durant 30 minuts amb 0.8 mCi d'una barreja del marcadore cel·lular <sup>35</sup>S-PRO-MIX<sup>TM</sup> (Amersham) que conté metionines i cisteïnes marcades radioactivament en un ratio 3:1, respectivament. A continuació les cèl·lules es posaren en cultiu a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> i després de 1.5h, 3h i 5h de cultiu, les cèl·lules marcades es recolliren per tripsinització, es rentaren tres vegades en PBS fred i s'immunoprecipitaren els dímers DR.

### 5.2. Immunoprecipitació de DR i digestió amb Endo H.

Les cèl·lules marcades es resuspengueren en tampó de llisi (Nonidet P40 (Sigma) 0.5%, TrisHCl pH8 50mM, NaCl 150mM) a raó de 10<sup>7</sup> cèl·lules/ml. Els inhibidors de proteases iodoacetamida 10mM, pefabloc 1mM, aprotinina 5µM, leupeptina 5mM, pepstatina 2 mg/ml (Boeringer Mannheim) s'afegiren al tampó de llisi en el moment de ser usat. Les cèl·lules es llisaren durant 30 minuts en gel i es centrifugaren a 14000rpm durant 30 minuts a 4°C, per eliminar debrís cel·lulars i nuclis. Els llisats cel·lulars obtinguts s'incubaren durant 2h a T<sup>a</sup> ambient amb 75µl de sèrum de conill normal (Dako Dignosticos, Barcelona, Espanya) i 100µl de boles de sefarosa recobertes per proteïna A (Protein A Sephrose R CL-4B, Pharmacia) per a eliminar totes les unions inespecífiques. Després d'una centrifugació de segons, els llisats pre-absorbits es passaren a un altre tub i es barrejaren amb 2µl de l'anticòs B.8.11.2., tota la nit a 4°C, en rotació. Els complexos antígen-anticòs formats es van aïllar per absorció en 10µl de boles de sefarosa recobertes per proteïna A, mitjançant una incubació d' 1 hora a T<sup>a</sup> ambient. Després d'una centrifugació curta, s'eliminà el sobrenedant i les boles de sefarosa amb els complexos antígen-anticòs units es rentaren 4 vegades en tampó de llisi i una darrera vegada en un tampó de TrisHCl pH 8 125mM i NaCl 150mM, per eliminar el Nonidet NP40. Cada mostra es dividia en dos i una meitat era tractada tota la nit amb 2mU d'EndoH

(Boheringer Manhein) a pH5.5, a 37°C. Finalment, cada mostra es dividia de nou i es resuspenien en tampó de mostra (SDS 2%, TrisHCl pH6.8 125mM, glicerol 10%, blau de bromofenol 0.1%) . Una meitat es bullia 5min a 95°C mentre que l'altre meitat es mantenia 30minuts a T<sup>a</sup> ambient, previ al carregament del gel

### 5.3. Electroforesi en gel de poliacrilamida

Les mostres es separaren en un gel de poliacrilamida al 12% (12% acrilamida/ Bisacrilamida 29:1, trisHCl pH 8.8 0.375M, SDS 0.1%, persulfat d'amoní 5%, temed 0.05%). L'electroforesi vertical es feu en un aparell Hoeffer (Hoeffer Scientific Instruments, San Francisco CA, USA) durant 5h a 120 volts en tampó de migració (Tris 25mM, SDS 0.1%, glicina 192mM). A continuació el gel es fixà durant 30 minuts en tampó d' isopropanol 25% i àcid acètic 10%. El marcatge s'amplificà mitjançant un amlificador de radioactivitat (Amplify, Amersham) i el gel seguidament s'assecà durant 2 hores a 80°C en un secador de gels (BioRad). Finalment, s'exposaren a una pel·lícula hyperfilm<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup> (Amersham) a -70°C. Les autoradiografies es van analitzar amb un escàner Scanjet II (Hewlett Packard) i el programa Scan Analysis (Biosoft, Cambridge, UK)

## **6. Microscopi electrònic de Transmissió**

Per a l'estudi a nivell ultraestructural de la localització de les molècules estudiades en les diferents línies neuroendocrines transfectades, en línies B-LCL i en cèl·lules dendrítiques immadures, s'usaren tècniques d'immunomarcatge sobre seccions de 80nm obtingudes per tècniques de criomicroscòpia que s'analitzaren en un microscopi de transmissió Phillips. El processament de les mostres per microscòpia de transmissió és el descrit per la Dra. Graça Raposo (Raposo G i col., 1997) del Electron Microscopy of cellular Compartments, UMR114, París, amb la col.laboració de la qual es van desenvolupar aquests experiments.

### 6.1. Internalització d'albúmina sèrica bovina acoplada a or.

Per al marcatge dels compartiments endocítics s'usà albúmina sèrica bovina acoplada a partícules d'or de 5nm de diàmetre (BSA-Au). Entre 5-10 x10<sup>6</sup> cèl·lules de la línia DR4liDM es tripsinitzaren i després es mantingueren 30-40minuts en cultiu en suspensió per a recuperar-les dels efectes de la tripsinització. A continuació s'incubaren 5min a 37°C en bany, amb 15ml de RPMI sense FCS per eliminar l'albúmina aportada pel sèrum. La BSA-Au s'ajustà a una DO=5 a λ=520nm en medi RPMI. Entre 5-10 x10<sup>6</sup> cèl·lules de la línia DR4liDM es resuspengueren en 1.5ml de medi complet prèviament escalfat a 37°C amb 100µl de BSA-Au i s'incubaren a 37°C al bany durant 5 minuts (120µl de BSA-Au es dialitzà tota la nit davant de RPMI). Les cèl·lules es rentaren tres vegades en 1.5ml de RPMI sense FCS fred per eliminar la BSA-Au no endocitada i es deixaren en

cultiu a 37°C al bany en 15 ml de RPMI. Als 5, 20 i 80 minuts es retiraren 5ml de la suspensió, i les cèl.lules es fixaren i processaren per criomicroscòpia.

### 6.2. Fixació química de les cèl.lules

Les cèl.lules es fixaren durant 30 minuts en una barreja vol/vol de medi RPMI complet i de la solució de fixació 2x (0.25% glutaraldehyd i 4% paraformaldehyd en tampó fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2M, pH 7.4). Una segona etapa de fixació es realitzà en solució de fixació 1x durant dues hores a T° ambient. Les cèl.lules adherents es recolliren amb l'ajut d'un scrappie de goma, en aquest punt per a seguir la resta del procés en suspensió. Les cèl.lules fixades es centrifugaren a 500xg durant 6 minuts i els pellets cel.lulars obtinguts es resuspengueren en paraformaldehyd 4X i s'emmagatzemaren a 4°C fins al moment de ser processats.

### 6.3. Processament de les cèl.lules per a la criomicroscòpia.

Els pellets cel.lulars es rentaren 4 vegades en una solució de tampó fosfat que contenia glicina 50mM per al bloqueig dels grups aldehyd altament reactius presents en els fixadors usats. A continuació, els pellets cel.lulars es resuspengueren en 0.5-1ml d'una sol.lució de gelatina al 7.5% preparada en aigua, prèviament líquidificada a 37°C durant 15 minuts en una estufa. Mentre la gelatina encara era tèvia les cèl.lules es repelletejaren per centrifugació a 10000rpm durant 2 minuts i es referedaren en gel fins a la solidificació de la gelatina. Després de tallar els tubs i recuperar els pellets cel.lulars immersos en gelatina, aquests es van tallar en blocs d'aproximadament 2 mm que foren transferits a una sol.lució de sucrosa 2.3M. La infusió de les mostres en sucrosa s'aconseguí per rotació durant 2 hores a 4°C. A continuació cada un dels blocs es montà sobre un suport metàlic, prèviament sotmès a un procés de neteja per ultrasons en acetona, es retirà l'exés de sucrosa amb filtres Wathman del número 4 i es congelà per immersió directa en  $\text{N}_2$  líquid. Les crioseccions es van tallar en un Ultracut FCS ultracriotom (Leica). Cada bloc va ser retallat a -90°C amb un ganivet de vidre per aconseguir un bloc piramidal de superfície plana. Les crio-seccions de 80nm de gruix es tallaren a -120°C amb una ganivet de diamant i es recolliren amb una barreja vol/vol de sucrosa 2.3M i metilcel.lulosa 2%. Les seccions es dipositaren sobre reixetes de 3.05mm de coure/paladi (Gilder G200HEX-CP3), prèviament recouvertes per una capa de Formvar (TAAB Laboratories, Reading, Berks) i per una capa de pols de carboni, i es guardaren a 4°C fins al moment del marcatge.

### 6.4. Immunomarcatge de les crioseccions

S'usaren entre tres i sis seccions de cada línia cel.lular per a cada marcatge. Les seccions es dipositaren cara avall sobre plaques amb una capa de gelatina al 1% solidificada. Es deixaren a l'estufa a 37°C durant 20 minuts per permetre l'eliminació per difusió de l'exés de gelatina de les seccions. Els següents passos pel marcatge, es



realitzà per flotació en gotes de les diferents solucions emprades, a T<sup>a</sup> ambient dipositades sobre parafilm. Es retiraren les reixetes de la gelatina i s'incubaren durant 10 minuts en una solució de tampó fosfat i glicina 50mM . A continuació la glicina s'eliminà en tres rentats successius de 2 minuts sobre gotes de PBS-2%FCS. La incubació amb l'anticòs específic per l'antigen es realitzà per flotació de les seccions sobre una gota de 100µl de l'anticòs durant 1h. Les seccions es rentaren 6 vegades durant 1 minut en PBS-2%FCS. Quan el marcatge es realitzava amb sèrums policlonals, les seccions s'incubaven directament en proteïna A acoplada a partícules d'or de 10 o 15nm de diàmetre durant 20 minuts. Quan l'anticòs marcat era monoclonal, les seccions es rentaven 6 vegades durant 2 minuts en PBS-2% FCS i s'incubaven en 100µl d'Immunoglobulines de conill contra Ig de ratolí durant 30 minuts (Dako). Després de 6 rentats de 2 minuts en gotes de PBS-2%FCS les seccions s'incubaren amb la proteïna A-Au. Per eliminar l'exés de proteïna A marcada, les seccions es rentaren 7 vegades en PBS durant 1 minut i a continuació es fixaren en una solució de glutaraldehyd al 5% en aigua 5 minuts. L'excés de glutaraldehyd s'eliminà per sis rentats d'un minut en aigua previ al contrastat de les seccions en una barreja vol/vol de metilcel.lulosa i acetat d'uranil, pH7 durant 10 minuts seguit per l'incubació en una barreja 9:1 vol/vol de metilcel.lulosa i acetat d'uranil, pH 4, a 4°C i a la foscor durant 10 minuts.

Per als marcatges dobles es recomençava el protocol de marcatge des del principi després de la darrera fixació amb glutaraldehyd i abans de realitzar el contrastat de les seccions.

Els anticossos i sèrums usats per als marcatges, i les dilucions d'aquests, es troben a la taula VII. En aquestes concentracions el marcatge inespecífic a nucli o mitocòndries era reduït a 2-3 partícules d'or.

Anticòs/sèrum	Dil.lució d'ús	Diluit en
HLA-DR $\alpha$	1/100	PBS-5%FCS
Icc5	1/250	PBS-5%FCS
5C1	1/400	PBS-5%FCS
RaM	1/200	PBS-5%FCS

**Taula VII Concentració dels anticossos usats per microscòpia de transmissió.**

#### 6.5. Quantificació dels immunomarcats.

La distribució intracel.lular de les diferents proteïnes marcades es quantificà en 20 cèl.lules diferents escollides aleatòriament d'un mínim de 3 seccions diferents directament al microscopi de transmissió. Les cèl.lules s'escollien a un augment de 8000x i el recompte de les diferents organelles i de les partícules d'or acumulades es realitzà a 15000 augments. Els resultats s'analitzaren pel test F-de fisher com a test *a priori* i per les comparacions del test *a posteriori* s'usà el test t de Student.

## 7. Elució dels lligands naturals associats a DRB1\*040 en cada tipus cel.lular

L'elució, separació, seqüenciació i identificació dels pèptids associats a les molècules del MHC és un procés que comprèn la primera etapa de cultius cel.lulars en la que s'obté el nombre necessari de cèl.lules i els reactius per a la purificació dels complexos MHC-pèptid. La segona etapa del procés comprèn una cromatografia d'afinitat per a purificar els complexos classe II-pèptid i una posterior cromatografia líquida d'elevada resol.lució en fase reversa per la separació dels pèptids obtinguts. Les 4 línies epitelials transfectades amb l'al·lel DR4 es van processar en el laboratori del Dr Fritz Koning del Immunohaematology Blood Bank Department del Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. La línia limfoblastoid es va processar en la Unitat d'Immunologia de l'IBB, UAB.

### 7.1. Rediferenciació de les cèl.lules per tumoració en ratolins

Amb l'objectiu d'obtenir una re-diferenciació de les línies cel.lulars i fer augmentar l'expressió de molècules pròpies i específiques de les cèl.lules  $\beta$  pancreàtiques, les 4 línies cel.lulars transfectades es van sotmetre a dues passades consecutives per ratolins atímics Swiss Nude/Nude. Tots els ratolins usats eren femelles de 4 setmanes i es mantingueren en l'estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona.

$15 \times 10^6$  cèl.lules de cada tipus cel.lular es resuspenien en 400 $\mu$ l de PBS estèril i s'inoculaven subcutàneament a la cuixa dreta. Es van inoculatr dos ratolins per cada línia cel.lular en dos processos seqüencials de rediferenciació. Als 15 dies apareixien els tumors sòlids en el punt d'injecció. Els tumors es deixaven créixer fins a un tamany d'entre 0'8 i 1'5cm de diàmetre, o fins a l'inici de la vascularització del tumor. Es sacrificaven els animals i s'escindia el tumor que es guardava en medi RPMi + 10%FCS a 4°C fins al moment de la digestió. Els tumors es rentaven dues vegades en 20 ml de medi RPMI sense FCS, es tallaven en petits blocs i eren sotmesos a digestió enzimàtica en 15ml de medi de digestió (RPMI amb 2.5mg/ml de tripsina (Trypsin type II, Sigma) i 0.05mg/ml de desoxiribonucleasa I (Sigma) amb l'ajut mecànic d'una mosca magnètica en rotació a 37°C durant 10 minuts. Les cèl.lules disgregades eren passades per un filtre de nylon estèril amb porus de 100nm de diàmetre i recuperades en 5ml de medi de cultiu RPMI-10%FCS fred, per aturar la digestió. Les porcions de teixit no disgregades es sotmeteren a un segon pas de digestió en les mateixes condicions que la primera. El material aconseguit després d'ambdues digestions es centrifugà dues vegades 5 minuts a 500xg, es resuspengué en 5ml de medi de cultiu. Les cèl.lules recuperades es posaren en cultiu en medi RPMI complet en flascons de cultiu T175 a una concentració de  $5 \times 10^6$  cèl.lules/ flascó; a 37°C i atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A les 5-6 hores de cultiu es recuperava el medi amb les cèl.lules encara no adherides i es passava a un altre flascó T175, mentre es renovava el medi del primer flascó. A les 24 i 48h s'eliminaven les

cèl.lules en suspensió i les cèl.lules adherents es mantienien en medi de cultiu sense selecció. Si apareixien fibroblasts en el cultiu, les cèl.lules eren sotmeses a un procés de desenganxat suau amb una solució de tripsina-EDTA, per a recuperar les cèl.lules epitelials i eliminar la contaminació per fibroblasts. Finalment, el nivell d'expressió de les molècules transfectades era comprovat en totes les cèl.lules re-diferenciades entre el primer i el segon pas i previ a la criopreservació en una solució de FCS-10% DMSO en vapors de N<sub>2</sub> líquid.

## 7.2 Cultiu en bulk de les cèl.lules per a l'elució dels pèptids associats a DR4

En base als estudis prèviament fets per a l'aïllament de pèptids associats a molècules del MHC de classe II, i tenint en compte el nivell d'expressió de les transfectants i la dificultat implícita en el creixement de cèl.lules adherents, es va establir un nombre de partida de  $1.5 \times 10^9$  cèl.lules per cada tipus cel.lular analitzat. Les transfectants DR4 i DR4li es van processar en un primer experiment respectant aquest nombre inicial de cèl.lules. Les transfectants DR4DM, DR4liDM i la cèl.lula B-LCL es van procesar en un segon i tercer experiment partint de  $3 \times 10^9$  cèl.lules.

### 7.2.1. Cèl.lules epitelials adherents

Les cèl.lules epitelials es van créixer en monocapa fins a assolir la confluència a 37°C, en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>. Es va créixer un primer stock de  $3 \times 10^7$  cèl.lules en flascons de cultiu T175 usant el medi de cultiu RPMI complet més el medi de selecció corresponent per cada transfectant. Aquest primer estoc de cèl.lules va ser analitzat per comprovar el nivell d'expressió de totes les molècules transfectades, per tècniques d'immunofluorescència analitzades per citometria de flux, i emmagatzemat en vials de  $10 \times 10^6$  cèl.lules en N<sub>2</sub> líquid. A partir d'aquest estoc inicial es va procedir a l'expansió de cada línia cel.lular transfectada en medi RPMI complet però sense antibiòtic de selecció. Per a l'expansió a gran escala es van utilitzar: flascons de polipropilè de 225 cm<sup>2</sup> d'àrea (T175), ampolles de polipropilè amb fons ondulat incubades en rotació en un Cell Roller i Cell Factories de 10 pisos. Les cèl.lules es desenganxaven de la superfície de creixement amb una solució de tripsina-EDTA i centrifugació a 600xg durant 5 minuts. Els pellets cel.lulars recuperats es sotmetien a un rentat amb PBS i es summergien en N<sub>2</sub> líquid i eren emmagatzemats a -70°C fins al moment de ser usats.

### 7.2.2. Cèl.lules de creixement en suspensió, LCLs

Les línies B-LCLs es van créixer en suspensió i en medi de cultiu RPMI complet. Per al creixement fins a  $3 \times 10^9$  cèl.lules es van usar flascons de poliestirè T175 i ampolles de Cell Roller de vidre amb superfície plana. Les cèl.lules es recollien per centrifugació a 500xg durant 6 minuts i després d'un rentat en PBS es summergien directament en N<sub>2</sub> líquid i s'emmagatzemaven a -70°C fins a ser processades.

### 7.3. Construcció de les columnes per a la cromatografia d'afinitat

Per a la purificació dels complexos DR4-pèptid es van usar 2 columnes de sefarosa amb 25 mg de L243 acoplat per les línies DR4 i DR4li; i tres columnes de sefarosa amb 50 mg de L243 per les línies DR4DM, DR4liDM i la LCL.

#### **7.3.1. Creixement de l'hibridoma HB55 i producció de l'anticòs monoclonal L243**

Les cèl.lules de l'hibridoma HB55 es van expandir en dues fases. Primer es van créixer en flascons de poliestirè T175 i en medi de cultiu RPMI complet. D'aquesta primera expansió es van criopreservar vials de  $10 \times 10^6$  cèl.lules a partir dels quals es procedí a la següent expansió. Al descongelar l'estoc, les cèl.lules es creixien durant els primers 5-7 dies en medi RPMI complet fins a recuperar el ritme de creixement. A continuació es canviava el medi per Medi de cultiu per Hibridomes Lliure de Proteïnes (PFHM)(Gibco) sense font de proteïna exògena. Les cèl.lules es feien créixer fins a un volum de 500ml per flascó i fins a la mort del 80% de les cèl.lules. A continuació s'eliminaven les cèl.lules restants i els debrís cel.lulars per centrifugació a 600xg durant 6 minuts i el sobrenedant recuperat era emmagatzemat a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins al moment de la purificació de l'anticòs.

#### **7.3.2. Processament i purificació de l'anticòs monoclonal L243**

Per la purificació de l'anticòs L243 es van usar un total de 7 litres de sobrenedant de l'hibridoma HB55 que s'acoplà a cinc columnes de sefarosa. Per reduir el volum de la mostra i facilitar-ne la manipulació, els 7 litres de sobrenedant van ser dialitzats utilitzant un sistema de diàlisi artificial Hemofilter Renaflo R II (Renal Systems, Minneapolis, MN, USA). Després del pas pel renaflow l'anticòs L243 quedà concentrat en un volum de 500ml. L'activitat biològica de l'anticòs recuperat es testà per citometria de flux i la quantitat de proteïnes del concentrat es mesurà pel test BCA\* (Pierce, Rockford, IL, USA). A partir de 7 litres de sobrenedant es recuperaren 350mg de proteïna total que es guardà a  $4^{\circ}\text{C}$  i amb 0.05% d'azida sòdica per evitar contaminacions

Per a la purificació de l'anticòs s'usaren 2 columnes de 10ml de proteïna A sefarosa CL-4B (PAS)(Protein A Sepharose R CL-4B, Pharamacia). Els 500 ml de sobrenedant de L243 es van diluir amb la mateixa quantitat de tampó d'unió (150mM NaCl, 50mM TrisHCl, pH 8). La meitat del litre final obtingut es va deixar passar per una columna de 10ml de proteïna A unida a sepharosa a un flux de  $750\mu\text{l}/\text{min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . La columna es van rentar successivament amb 300ml (30 vegades el volum de la columna o beadvolums) de 150mM NaCl, 50mM TrisHCl, pH 8; 100ml (10beadvolums) de 50mM NaCl, 50mMTrisHCl; 50ml (5 beadvolums) de 5mMTrisHCl. L'elució de l'anticòs retingut en la columna de proteïna A es realitzà fent passar 30ml de tampó d'elució: 3mM àcid cítric, pH 3. En aquest darrer pas es recolliren alíquotes de 3ml controlant el moment en

que virà el pH del tampó sortint de la columna. Aquestes fraccions eren neutralitzades amb 300µl de TrisHCl 1M a pH 8 i aquelles que presentaven una DO a  $\lambda=280\text{nm}$  entre 1.7 i 3, eren agrupades i emmagatzemades. Les columnes de PAS eren regenerades passant tres volum (30ml) d'àcid cítric 0.1M, pH 3 i el pH era reajustat a 7-8 amb el pas de tampó d'acoplament. Si la columna es guardava per un període llarg de temps s'afegia 0.05% d'azida sòdica al tampó d'acoplament, per a prevenir contaminacions.

### 7.3.3. Acoplament covalent de L243 a boles de sefarosa activades

L'acoplament es realitzà usant la sefarosa CL-4B activada per CNBr (CNBr-activated sepharose R 4B, Pharmacia). Per evitar el bloqueig de la sefarosa activada pel Tris, s'intercanvià el tampó de les immunoglobulines per filtració en un Centriprep 10 (Amicon, Beverly, MA, USA). Després de concentrar tota la preparació d'immunoglobulines per centrifugació a 600xg amb el Centriprep, les immunoglobulines retingudes es rentaren tres vegades amb el tampó d'acoplament ( $\text{NaHCO}_3$  0.1M, NaCl 0.5M, pH 8.3). La concentració de l'anticòs recuperat es determinà amb el mètode BCA\* (Pierce) i l'activitat biològica de l'anticòs es verificà per citometria de flux.

Un total de 15gr de boles de sefarosa es van procesar en dos experiments consecutius. En el primer, 7.5gr de boles de sefarosa es resuspengueren en HCl 1mM verificant l'eliminació total dels agregats. El volum de les boles hidratades era d'uns 20ml. Les boles es rentaren en un filtre de vidre (Glassfilter 3, Duran R Schott, Mainz, Alemanya) amb 200ml d'HCl 1mM per cada gram de boles durant uns 15 minuts. A continuació, les boles de sefarosa es resuspengueren en 20 ml de tampó d'acoplament ( $\text{NaHCO}_3$  0.1M, NaCl 0.5M, pH 8.3) i es centrifugaren 2 minuts a 500xg. Després de l'eliminació del sobrenedant, les boles es resuspengueren amb la preparació d'immunoglobulines en un tub de 50 ml i s'incubaren durant 4 hores a  $T^a$  ambient i en rotació. A continuació es centrifugaren les boles i la concentració proteica del sobrenedant recuperat s'analitzà per absorvància a 280nm. Les boles es rentaren tres vegades en un volum de tampó de bloqueig (TrisHCl 0.1M pH 8) igual al volum ocupat pel gel de boles i s'incubaren durant 2 hores a  $T^a$  ambient en el mateix tampó de bloqueig i en rotació, per a bloquejar tots els llocs d'unió encara lliures de la sefarosa. Es rentaren en un glassfilter amb 60ml de tampó de rentat a pH 4 ( $\text{NaHCO}_3$  0.1M, NaCl 0.5M, pH 4) seguit de 60 ml de tampó de rentat pH 8 ( $\text{NaHCO}_3$  0.1M, NaCl 0.5M, pH 8). Aquesta operació es repetia 3 vegades consecutives. Les boles de sefarosa acoplades a les immunoglobulines es conservaren a 4°C en tampó de rentat a pH 8 amb 0.02% d'azida sòdica. L'activitat i l'especificitat de la preparació es verificaren per immunoprecipitació (paràgraf 5.2) usant un llisat de cèl.lules classe II positives.

### 7.4. Aïllament dels complexos DR4-pèptid.

Els pellets cel.lulars guardats a  $-70^\circ\text{C}$  corresponents a  $3 \times 10^9$  cèl.lules es resuspengueren en tampó de llisi (Tris HCl 50mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Nonidet

NP-40 (Surfact-Amps<sup>R</sup> NP40, Pierce) 0.5%, pH 8) amb els inhibidors de proteases (AEBSF 0.1mM, leupeptina 1µg/ml, antipain 1µg/ml, chymostatine 1µg/ml, pepstatina A 1µg/ml, Boeringer Mannheim) a raó de  $1.5 \times 10^8$  cèl.lules per ml i s'incubaren durant 2 hores, a 4°C amb agitació magnètica. Després d'una centrifugació a 2500 rpm durant 10 minuts, el sobrenedant es recuperà i es centrifugà 1 hora a 10000rpms a 4°C en un rotor swing-out. Durant la centrifugació es prepararen les boles de sefarosa (sepharose R CL-4B, Pharmacia) usades per a l'adsorció inespecífica del sobrenedant. Es necessiten 10 ml de boles de sefarosa per cada 50 ml de llisat cel.lular. Les boles es van rentar 3 vegades amb tampó de rentat (TrisHCl 50mM, NaCl 150mM, pH 8) i es van incubar amb el llisat cel.lular ultracentrifugat durant 3 hores a 4°C en agitació. El llisat cel.lular preadsorvit es separà de les boles de sefarosa per centrifugació a 600xg durant 10 minuts i s'incubà durant tota la nit a 4°C i en rotació amb l'anticòs L243 prèviament acoplat a la sefarosa. La solució es diposità en una columna de polipropilè i el llisat cel.lular es recuperà en un recipient net, es feu passar per la columna dues vegades consecutives, i es guardà a 4°C per a una segona purificació. Per a l'elució de les cèl.lules DR4 i DR4li s'usà 5 ml de sefarosa amb 25mg de L243. Per les cèl.lules DR4DM, DR4liDM i LCL s'usà 10ml de sefarosa i 50mg de L243. La columna es sotmetia a rentats consecutius amb 3volums equivalents al de les boles, de tampó de llisi sense inhibidors de proteases; 20 volums de tampó de rentat; i 10 volums d'un tampó amb TrisHCl 5mM, pH 8. Aquests rentats permeteren consecutivament, l'eliminació del Nonidet NP-40 que interferiria en la detecció dels components de les fraccions de l'HPLC, l'eliminació les unions inespecífiques, i la reducció del contingut de sals de la columna. Finalment, els complexos DR-pèptid s'eluíren amb 3 volums de TFA 0.1% (Sigma) i es guardaren a 4°C. La columna es regenerà amb un volum de tampó de rentat suficient per a retornar-la a pH neutre. Després de la regeneració la columna es guardà en tampó de rentat amb 0.02% d'azida sòdica a 4°C.

Les fraccions àcides recuperades de l'elució de la columna que contenen el complexos DR-pèptid es concentraren en un SpeedVac i es filtraren en un Centricon 10 (Amicon) per eliminar les molècules de pes superior a 10000Da. Les molècules de classe II (cadena  $\alpha$  i  $\beta$ ) eren retingudes pel filtre mentre els pèptids dissociats es recuperaren en la fracció filtrada. Els filtrats es concentraren en un SpeedVac fins a un volum final de 0.5 ml, corresponent al volum de càrrega del bucle d'injecció de l'HPLC.

## **8. Separació dels pèptids eluïts per cromatografia líquida d'elevada resolució en fase reversa (rp-HPLC)**

En la rp-HPLC, la retenció d'un compost és deguda a fenòmens d'adsorció de la substància a la superfície d'una fase estacionària apolar. La fase estacionària de la columna està constituïda per un gel de silici porós on han estat químicament unides les

cadena carbonada C2/C18. El principi d'aquesta tècnica es basa en la separació dels compostos en funció de les seves característiques hidrofòbiques.

El sistema usat fou l'SMART TR System de Pharmacia amb una columna mRPC C2/C18 SC2.1/10. La columna fou equilibrada i rentada amb l'eluent A (0.1% d'àcid trifluoroacètic, TFA). L'eluent B usat fou acetonitril 100%. La separació dels pèptids s'aconsegueix sotmetent la columna a un gradient lineal creixent d'acetonitril fins arribar al 100% de l'eluent B. En el moment en que un pèptid presenta la mateixa hidrofobicitat que el gradient passa de la fase estacionària a la fase mòbil i és recuperat al sortir de la columna. Un espectrofotòmetre acoplat a la sortida de la columna permet la detecció dels pèptids per absorvència a 217nm i la seva visualització en forma de pic. S'injectaren a la columna els 500µl de mostra en 0.1% de TFA i començà el gradient amb un augment de 0.5% d'acetonitril /minut. Es recuperaren 80 fraccions durant el rang de 5-45% d'acetonitril que contenien la majoria dels pèptids eluïts i que foren concentrades en el SpeedVac fins a un volum inferior als 20µl.

## 9. Anàlisi dels pèptids eluïts per espectrometria de masses

L'anàlisi de les masses de les espècies moleculars obtingudes i la seva seqüenciació es realitzà mitjançant tècniques d'Espectrometria de Masses. L'anàlisi per MALDI dels repertoris eluïts de les línies endocrines transfectades es realitzà en col.laboració amb els Drs. Peter van Veelen i Fritz Koning del Immunohaematology Blood Bank Department del Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. L'anàlisi per MALDI del repertori de DR4 en la LCL i la seqüenciació i identificació de tots els pèptids s'ha realitzat en col.laboració amb la Dra. Montse Carrascal i el Dr. Joaquin Abián del Laboratori d'espectrometria de Masses de l'IIBB-IDIBAPS, CSIC, Barcelona.

### 9.1. Anàlisi de les espècies moleculars eluïdes de cada línia cel.lular

La composició peptídica de les fraccions individuals obtingudes per HPLC es va determinar mitjançant espectrometria de masses per MALDI-TOFF (matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight). Les fraccions corresponents als eluïts de les línies transfectades amb l'al.lel DR4 van ser analitzades en un instrument LASERMAT (Thermo Byoanalysis Hemel-Hempstead, UK) prèviament calibrat amb l'ajut d'un pèptid de massa coneguda (1897.1 daltons). Un µl de cada fracció concentrada es barrejà amb 0.5µl de matriu (10mg/ml d'àcid α-ciano-4-hidroxi-cinnamique en una sol.lució del 50% d'acetonitril i 0.1% de TFA) que s'analitzà. Les mostres de la B-LCL s'analitzaren amb un instrument Voyager-DE™PRO Biospectrometry Workstation calibrat amb una barreja de pèptids que contenia Angiotensina, ACTH i insulina bovina. 0.5 µl de matriu (50% d'acetonitril, 0.1% TFA en H2O milliQ) s'uniren amb 0.5 µl de mostra que es deixà assecar sense barrejar i s'analitzà.

## 9.2. Seqüenciació i identificació dels pèptids

Els pics de les fraccions número: 53,54,63 i 64 dels pèptids eluïts de la línia DR4li que corresponien a les dues seqüències CLIP, van ser els únics que se seqüenciaren per degradació N-terminal d'Edman, mitjançant un seqüenciador de proteïnes Hewlett-Packard G1000A ( Palo Alto, CA, USA).

La informació de la resta de seqüències peptídiques es va obtenir per espectrometria de masses en tàndem, usant un espectròmetre de trampa iònica LCQ-Finigan MAT (Thermoquest, Barcelona, Espanya) acoplat a una font nanosprai de Protana (Protana A/S, Odense, Dinamarca). Les fraccions es van assecat i redissoldre en una sol·lució de l'1% d'àcid acètic en metanol/aigua 1:1. Entre 1-2 µl de cada mostra es van carregar en el capilar nanosprai per a l'anàlisi. L'espectre dels productes iònics s'obtingué per dissociació obtinguda per col·lisió (CID) principalment dels pèptids mono- i di-protonats. Els precursors iònics es seleccionaren dels espectres del MALDI o buscant-los directament en l'espectre de l'electrosprai mitjançant el mostreig d'alta resolució en un rang massa/càrrega ( $m/z$ ) limitat (mode ZoomScan). Les energies de col·lisió i la resolució de l'ió precursor foren optimitzades per a obtenir un espectre de fragmentació òptim. Les energies de col·lisió es seleccionaren entre el rang de 15% (triple-)-40% (monocarregats) depenent de la càrrega dels ions precursors. Els ions precursors van ser aïllats amb una finestra de 3 Da pels ions di-carregats i de 4Da pels ions monocarregats. Les possibles seqüències peptídiques s'obtingueren mitjançant l'anàlisi de l'espectre de fragmentació de cada precursor iònic amb el software Protein Prospector (UCSF, San Francisco, CA) usant el programa MS-Tag en conjunció amb les bases de dades de proteïnes NCBI i d'ADN DbEst, seguida d'una comparació manual dels espectres de fragmentació teòrics corresponents a la seqüència amb millor puntuació, front a l'espectre de fragmentació experimental. En els casos en que no es trobà cap espectre teòric concordant es va realitzar seqüenciació *de novo* i la búsqueda es repetí usant el programa MS-Edman.

L'afinitat teòrica de les diferents seqüències obtingudes per la molécula DR4 es calcularen amb la matriu publicada per Hammer (Hammer J i col, 1994). Per a l'anàlisi del motiu d'ancoratge s'escollí l'alineament de la seqüència que donava l'afinitat més elevada.





Els resultats obtinguts amb els estudis de caracterització bioquímica de les molècules DR3 i DR4 expressades per transfecció estable de la línia cel·lular endocrina RINm5F (Serradell L i col., 1999) han confirmat que les MHC II segueixen una biogènesi semblant a la descrita en cèl·lules B i altres tipus cel·lulars.

Les cèl·lules cotransfectades amb DR i HLA-DM en absència d'Ii, expressen una majoria de complexos a la superfície amb conformació estable, tot i que la proporció és menor que la detectada en les cèl·lules que expressen ambdues chaperones. Aquest resultat va generar una sèrie de preguntes que són les que s'han abordat en aquest capítol:

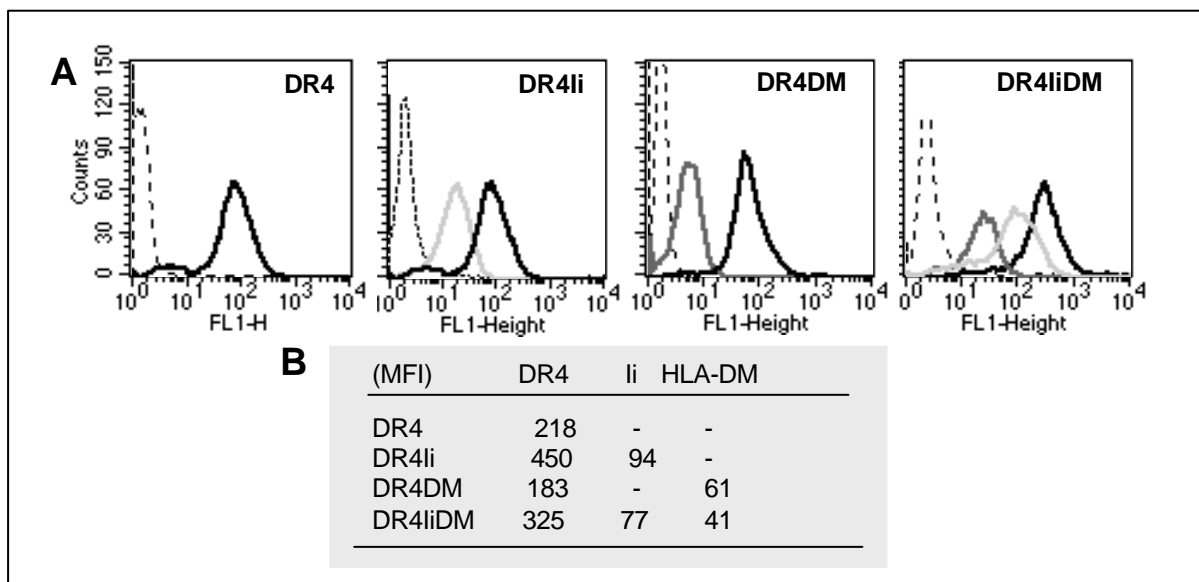
Quines són les diferències en la localització subcel·lular dels dímers DR4 en presència o absència d'Ii i HLA-DM?

En quin compartiment subcel·lular es colocalitzen MHC II i HLA DM, en absència d'Ii?

Exerceix HLA-DM algun rol en la maduració de HLA-DR en absència de la Ii?

### 1. L'expressió de la cadena invariant facilita l'arribada de DR a la superfície cel·lular.

El nivell d'expressió de les molècules transfectades en les vuit línies cel·lulars es va analitzar per citometria de flux amb AcMo específics. A la Figura 13A es mostren els histogrammes de les quatre línies DR4. A la figura 13B, la quantificació de l'expressió de cada molècula com la mitja de la intensitat de fluorescència de la població positiva (MFI).



**Figura 13 Expressió de les molècules transfectades DR4, Ii i HLA-DM en les quatre línies endocrines.** (A) Anàlisi per citometria de flux de l'expressió de DR4 (línia negra), d'Ii (línia gris clar) i d'HLA-DM (línia gris fosc). La tinció amb l'anti-DR (L243) és de la superfície cel·lular. Les tincions corresponents a Ii (VIC-Y1) i HLA-DM (5C1) són citoplasmàtiques. A la taula (C) es mostra la intensitat mitja d'expressió de cada molècula en cada cèl·lula

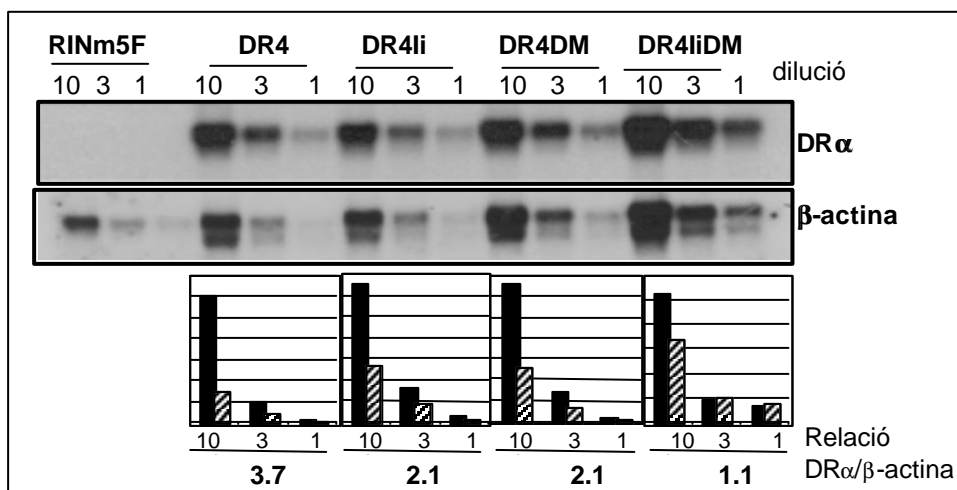
D'acord amb els resultats previs (Serradell L i col, 1999) l'anàlisi confirma que:

- Els dímers DR4 es detectaven a la superfície cel.lular de les quatre cèl.lules neuroendocrines transfectades
- L'expressió més alta de DR4 es trobava a la superfície de les cèl.lules que expressaven la cadena invariant (Ii): DR4Ii (MFI=450) i DR4IiDM (MFI= 325). En les cèl.lules Ii<sup>-</sup>, l'expressió de DR4 en membrana era més baixa i la disminució era més evident amb la coexpressió de DM: DR4 (MFI= 218), DR4DM (MFI= 183)
- El nivell d'expressió de l'Ii citoplasmàtica era semblant en les dues línies positives DR4Ii(MFI=94), DR4IiDM (MFI=77)
- L'expressió d'HLA-DM en la línia DR4DM (MFI=61) era superior a l'observada en la línia DR4IiDM (MFI=41)

Les cèl.lules transfectades amb l'al.lel DR3 presentaven el mateix patró d'expressió que les transfectants DR4 homòlogues (Serradell L i col., 1999).

Les dades indicaven que l'expressió en superfície de DR era més elevada en les cèl.lules que expressaven Ii. Com que totes les cèl.lules havien estat seleccionades en base al nivell de DR de membrana, s'havia de descartar que les diferències d'expressió fossin conseqüència d'un major nivell de transcripció de DR. Es van determinar els nivells de transcripció de DR $\alpha$  en les diferents transfectants per northern blot del RNA total de cada línia cel.lular amb una sonda específica marcada amb P<sup>32</sup>. La quantificació es realitzà mesurant la radioactivitat incorporada en un Phosphoimager. El nivell de mRNA de DR $\alpha$  es va normalitzar respecte el nivell de  $\beta$ -actina detectat en cada línia. Els resultats amb els valors de la densitometria es mostren a la Figura 14.

- Les cèl.lules transfectades únicament amb DR4 presentaven el nivell de transcripció de DR $\alpha$  més elevat (ratio DR $\alpha$ / $\beta$ -actina: 3.7).
- En les cèl.lules DR4DM i DR4Ii, el nivell de transcripció de DR $\alpha$  era semblant (ratio DR $\alpha$ / $\beta$ -actina: 2.1)
- Les cèl.lules DR4IiDM expressaven DR $\alpha$  en menor proporció que qualsevol de les altres cèl.lules (ratio DR $\alpha$ / $\beta$ -actina: 1.1)



**Figura 14 Quantificació de la transcripció de DR $\alpha$  en les diferents cèl.lules transfectades.**

Northern blots de mostres de 10, 3 i 1  $\mu$ g del RNA total obtingut de cada línia cel.lular amb les sondes específiques pels mRNAs de DR $\alpha$  i  $\beta$ -actina marcades amb P<sup>32</sup>. Els nivells d'expressió del mRNA de DR $\alpha$  (histograma negre) es van mesurar en un PhosphorImager i es van normalitzar amb els nivells de mRNA de  $\beta$ -actina corresponents (histograma ratllat). A la figura es mostra la relació DR $\alpha$  /  $\beta$ -actina de les tres dil.lucions.

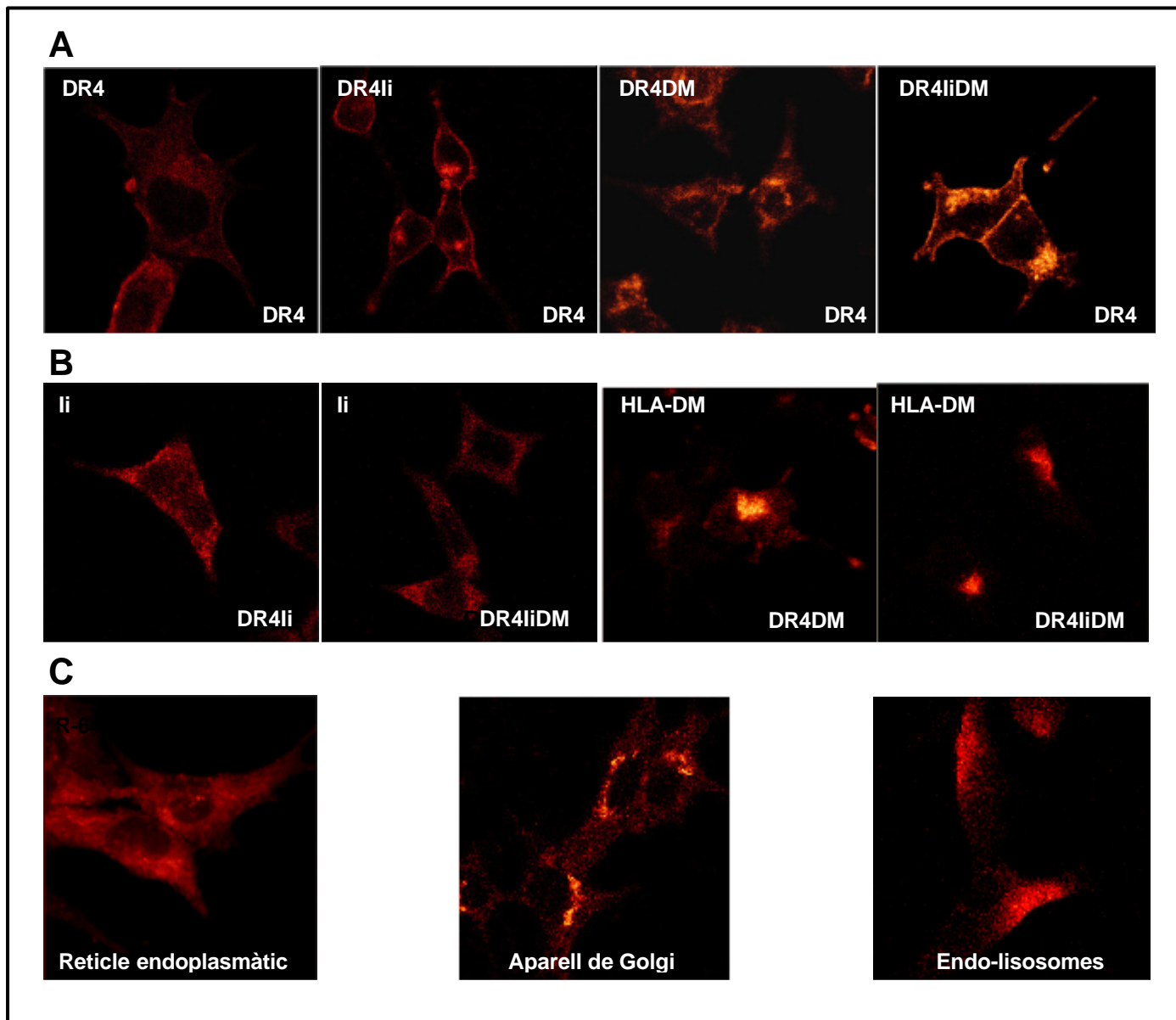
Per tant, el nivell de transcripció de DR $\alpha$  no era responsable de les diferències d'expressió de DR a la superfície de les diferents transfectants, suggerint que l'expressió d'Ii afavoria la sortida a superfície de les molècules DR.

## **2. La coexpressió d'HLA-DM, augmenta la localització de DR en els compartiments de la via endocítica**

Es va procedir a l'estudi de la localització de DR4, Ii i DM mitjançant tècniques d'immunofluorescència i de microscòpia confocal i s'analitzaren els patrons de marcatge obtinguts en cada una de les línies. A la Figura 15 es mostren imatges representatives dels resultats obtinguts amb les cèl.lules transfectades amb l'al.lel DR4. Al panell A hi ha les tincions obtingudes amb l'AcMo L243 específic per dimers DR $\alpha\beta$ . Al panell B es mostren les imatges de les tincions realitzades amb l'Ac VIC-Y1 específic d'un epítip N-terminal de la cadena invariant i les obtingudes amb l'Ac 5C1 que reconeix HLA-DM $\alpha$ . S'usaren sondes específiques per localitzar els diferents compartiments subcel.lulars implicats en la via biosintètica de les MHC II, les imatges de les quals es mostren en el panell C. Per a determinar la localització i la morfologia de l'ER s'usà la rodamina R648 que s'acumula preferentment en la bicapa lipídica de l'ER. La sonda N-1154, amb tropisme per les membranes de l'Aparell de Golgi (GA) fou utilitzada per marcar aquest compartiment i l'Ac policlonal anti-lamp-1 humà s'usà per a marcar els endosomes tardans i lisosomes de la línia RINm5F. Els resultats mostraven que:

- L'expressió de DR4 era més evident en les cèl.lules Ii<sup>+</sup>, en les que s'acumulava principalment a la superfície cel.lular (figura 15A).
- Les cèl.lules DR4Ii (figura 15A) presentaven un marcatge per DR4 perinuclear amb un patró de marcatge semblant al del GA (figura 15C)
- El marcatge perinuclear per DR4 de les cèl.lules DR4IiDM (figura 15A) presentava un patró més extens, semblant a l'observat amb el marcador de compartiments endocítics tardans lamp-1 (figura 15C)
- Les cèl.lules DR4, presentaven un patró de tinció citoplasmàtica per DR difós (figura 15A), semblant al marcatge obtingut per la sonda de l'ER (figura 15C), encara que també s'observava retenció al GA (veure Figura 16)
- En les cèl.lules DR4DM, DR4 es trobava acumulat en vesícules del citoplasma perinuclear (figura 15 A)

- La Ii es localitzava majoritàriament en vesícules del citoplasma més perifèric tant en absència com en presència d'HLA-DM (cèl.lules DR4Ii i DR4IiDM, respectivament) (Figura 15B)
- HLA-DM presentava una tinció perinuclear molt semblant a l'obtingut pel marcador lamp-1 en les cèl.lules DR4DM i DR4IiDM (figura 15B)

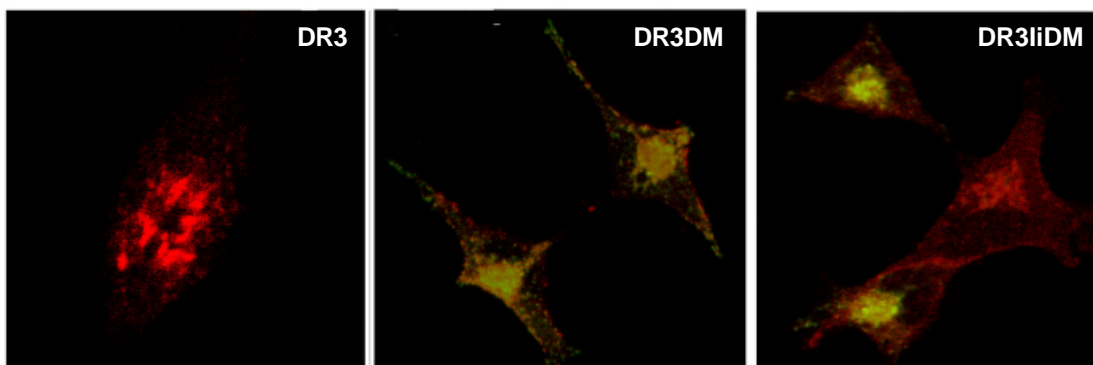


**Figura 15. Localització de DR4, Ii i HLA-DM en les quatre cèl.lules neuroendocrines per immunofluorescència analitzada per microscòpia confocal.** Al panell **A**) hi ha les imatges corresponents a la tinció indirecte de DR4 amb l'AcMo L243 en les cèl.lules DR4, DR4Ii, DR4DM i DR4IiDM, seguit d'un GaM-FITC. Al panell **B**) es mostren les tincions indirectes obtingudes amb l'anticòs anti-Ii: VIC-Y1 en les cèl.lules DR4Ii i DR4IiDM i amb l'AcMo anti-DM $\alpha$ : 5C1 en les cèl.lules DR4DM i DR4IiDM. El darrer panel (**C**), mostra els patrons de fluorescència obtinguts mitjançant les sondes: R-648, éster de rodamina d'acumulació preferent en l'ER, N-1154 ceramida d'acumulació selectiva en l'AG i TGN; i amb l'Ac policlonal anti-lamp-1 que reconeix la proteïna transmembrana lamp-1 marcador dels compartiments més tardans de la via endocítica

La localització de DR, Ii i DM en les cèl·lules transfectades amb l'al·lel DR3 era igual a l'observada en les transfectants homòlogues de l'al·lel DR4.

La presència de complexos DR-pèptid estables a la superfície de les cèl·lules DRDM (Serradell L i col, 1999), indicava que tot i l'absència d'Ii, es produïa una interacció funcional entre DR i HLA-DM en algun punt de la via biosintètica, que permetia que els dímers DR s'unissin a lligands estables. Amb la intenció de determinar on es produïa la colocalització entre DR i DM, es van realitzar co-tincions citoplasmàtiques per ambdues molècules que s'analitzaren per microscòpia confocal. A la Figura 16 es mostra les imatges obtingudes en les cèl·lules DR3, DR3DM i DR3IiDM.

- En les cèl·lules DR3, la majoria de molècules DR detectades es trobaven acumulades en un compartiment perinuclear de morfologia semblant al GA (figura 15C).
- En les cèl·lules que expressaven DM o ambdues chaperones s'observava un patró vesicular extès pel citoplasma semblant al marcatge de lamp-1 (figura 15C). La colocalització de DM i DR s'observava tant en el GA com en la via endocítica d'ambdues cèl·lules, confirmant que l'expressió de DM permetia l'acumulació d'un major nombre de dímers DR4 en la via endocítica.

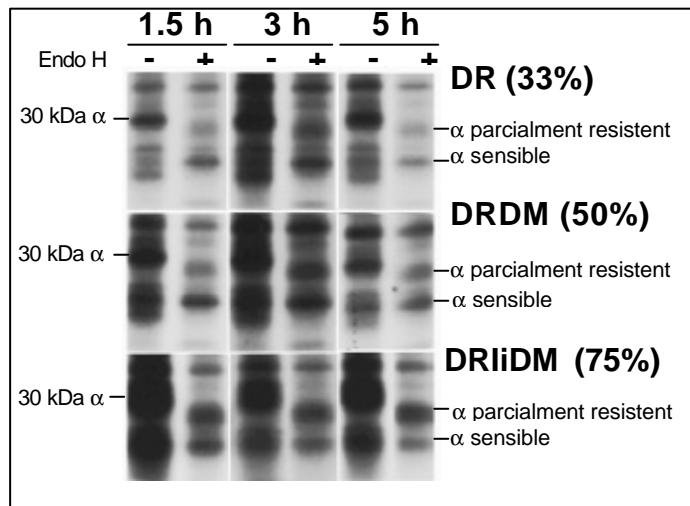


**Figura 16** L'expressió de DM permet la colocalització de DR3 i DM en les vesícules de la via endocítica. Immunofluorescència analitzada per microscòpia confocal dels marcatges per DR3 (vermell) i DM $\alpha$  (verd) en les línies cel·lulars DR3, DR3DM i DR3IiDM.

### 3. L'expressió d'Ii i la d'HLA-DM faciliten la maduració de DR des de l'ER, però amb eficiències diferents

L'expressió de DM, en absència d'Ii permetia una major detecció de DR en la via endocítica. Dues possibilitats explicarien aquest augment de DR citoplasmàtic (i) les molècules DR podrien ser secretades per defecte cap a la superfície cel·lular i posteriorment ser internalitzades i retingudes durant més temps en la via endocítica, per

l'acció de DM; i alternativament (ii) en les cèl.lules DRDM, les molècules DR recent sintetitzades en l'ER podien ser estabilitzades per DM i guiades cap a la via endocítica de manera anàloga al efecte de DM sobre HLA-DO. Per determinar si l'expressió de DM facilitava la sortida de DR de l'ER es va estudiar la cinètica de maduració de DR en les tres cèl.lules: DR, DRDM, DRiDM. Es van marcar metabòlicament les cèl.lules amb  $S^{35}$  durant un pols de 30 minuts i després de 1.5 h, 3 h, i 5h en cultiu lliure de marcatge, es va immunoprecipitar DR amb l'Ac policlonal B.8.11.2. La meitat de cada mostra immunoprecipitada es digerí amb Endoglicosidasa H (Endo H). La cadena HLA-DR $\alpha$ , presenta 2 llocs de N-glicosilació però durant la maduració en el GA només un dels dos N-glicans rics en manosa es converteix a una forma més complexa resistent a l'acció de l'Endo H, mentre que l'altre es manté sensible a l'enzim (Shackelford DA i col, 1981). Aquesta característica permet detectar els dímers DR que han passat pel GA perquè presenten la cadena DR $\alpha$  parcialment resistent a la digestió per Endo H, mentre que els dímers que es troben en l'ER presenten les cadenes  $\alpha$  totalment sensibles a la digestió. A la Figura 17 es mostren els resultats obtinguts de les diferents mostres del panell DR3 immunoprecipitades en cada temps, tractades o no amb Endo H. La quantificació de les bandes corresponents a la cadena  $\alpha$  es va realitzar per densitometria i l'anàlisi de la maduració s'obtingué calculant la relació entre la banda de DR $\alpha$  parcialment resistent a la digestió sobre el total de DR $\alpha$  expressat en cada línia (DR $\alpha$  parcialment resistent a Endo H / DR $\alpha$  parcialment resistent a Endo H + DR  $\alpha$  sensible a Endo H).



**Figura 17 L'expressió de DM facilita una sortida de DR més eficient des de l'ER.** Les cèl.lules transfectades de l'al.lel DR3 s'incubaren durant 30min amb  $S^{35}$  i es mantingueren en cultiu durant 1.5, 3 i 5 hores. Les molècules DR es van immunoprecipitar, es tractaren amb Endo H i s'analitzaren en un gel de poliacrilamida al 12%. La densitat de les bandes rellevants s'analitzà per densitometria. A la figura es mostre el percentatge de DR $\alpha$  resistent a l'Endo H en cada línia després de 5h de cultiu.

Els resultats demostraven que:

- Una proporció de les cadenes DR $\alpha$  immunoprecipitades de les tres cèl.lules es mantenia sensible a la digestió amb EndoH, 5h després de la seva síntesi.
- En les cèl.lules DR3, dos terços de les cadenes  $\alpha$  sintetitzades *de novo*, es mantien sensibles a l'EndoH, i per tant localitzades en l'ER, 5h després de la seva síntesi. Només un terç dels dímers sintetitzats eren parcialment resistents a l'Endo H.
- Amb la coexpressió de DM (cèl.lules DR3DM), el 50% dels dímers detectats havien passat pel GA després de 5h de cultiu i eren parcialment resistents a l'enzim.
- Finalment, en la línia DR3liDM es detectava una proporció important de dímers madurs en només 1.5 h de cultiu que assolía el 75% dels dímers de nova síntesi després de 5h.

Aquests resultats demostraven que la coexpressió d' HLA-DM en absència de la cadena invariant, afavoria la maduració dels dímers DR i la seva sortida de l'ER, encara que amb una eficiència menor que l'aconseguida en presència de la cadena invariant.





Els resultats obtinguts en aquest anàlisi de les cèl.lules endocrines que expressen DR en presència o absència de les dues chaperones associades a la via de presentació per MHC II confirmen els rols prèviament descrits per Ii i HLA-DM, en cèl.lules presentadores d'antigen professionals com les cèl.lules B.

L'expressió de DR en absència de les chaperones Ii i DM, permet la seva detecció a la superfície de les cèl.lules endocrines però majoritàriament resulta en una retenció de les molècules recent sintetitzades en l'ER/GA. Aquestes cadenes possiblement es troben acomplexades amb chaperones d'aquestes localitats i retingudes per mecanismes de control de qualitat de l'ER. Altres estudis han demostrat que les molècules de classe II expressades en absència d'Ii, formen homoagregats que queden retinguts en un compartiment intermig entre l'ER i l'AG, units a chaperones com la BIP, la grp94 i la p72 (Bonnerot C i col, 1994; Schaiff WT i col, 1992).

La coexpressió d'Ii induïx un augment de DR a la superfície cel.lular, independentment de la presència de DM. Les dues transfectants Ii<sup>+</sup>, presenten un nivell de transcripció de DR $\alpha$  més baix o igual que les cèl.lules Ii<sup>-</sup>, i en canvi, la presència de DR a la superfície cel.lular és més elevada en les primeres línies. Per tant, aquests resultats confirmen que en les cèl.lules epitelials l'expressió d'Ii facilita la sortida de DR de l'ER i n'augmenta la localització a la superfície cel.lular.

Quan es produeix la coexpressió d'Ii i DM, es segueix observant l'efecte d'Ii com a chaperona que facilita i accelera l'arribada dels dímers DR a la superfície cel.lular. En les cèl.lules DRliDM és produïx una expressió elevada de DR a la membrana cel.lular tot i que són les línies que presenten un nivell menor de transcripció per DR $\alpha$ . En les cèl.lules DRliDM també s'observa una acumulació de DR en vesícules citoplasmàtiques que no es trobava en absència de DM.

Els resultats més inesperats foren els obtinguts en les cèl.lules DRDM. L'absència d'Ii dificulta el plegament i la sortida dels dímers DR de l'ER, induïnt l'acumulació dels productes amb conformació inestable. Els pocs complexos que escapen de l'ER en aquestes cèl.lules, es localitzen a la membrana cel.lular i presenten conformació inestable (Serradell L i col, 1999). El mateix s'esperaria en les cèl.lules DRDM, on poques molècules sortirien de l'ER en absència de la cadena invariant. Resultats previs ja mostraven que la situació en les cèl.lules DRDM no era tant radical com en les transfectants DR ja que la dels complexos DR-pèptid a la superfície de les primeres eren estables (Serradell L i col, 1999). En les cèl.lules DRDM la transcripció de DR era igual a la detectada en les cèl.lules DRli però menor que la detectada en les cèl.lules DR. Tot i així, l'expressió a superfície de DR era igual en les cèl.lules DR i DRDM indicant que en presència de DM una major proporció dels dímers de nova síntesis arriben a la superfície encara que l'eficiència no és comparable a l'assolida amb l'expressió d'Ii. L'augment de DR en la via endocítica de les cèl.lules DM<sup>+</sup> indica que l'expressió de DM en absència d'Ii permet que una major quantitat de dímers DR es localitzin fora de l'ER.

Dues possibilitats podrien explicar aquest efecte. D'una banda i tal com mostra la colocalització d'ambdues molècules en les vesícules citoplasmàtiques, la interacció de DR i DM en la via endocítica dóna lloc a la formació de complexos DR-pèptids estables i aquests tenen una vida mitja més llarga que els complexos inestables (Kropshofer H i col, 1997). L'augment de la vida mitja dels complexos formats permetria la detecció d'una quantitat major de molècules DR fora de l'ER. D'altra banda, els resultats obtinguts amb la cinètica de maduració dels dímers DR, demostren que l'expressió de DM en absència d'Ii, afavoreix la maduració de DR, suggerint que HLA-DM en absència d'Ii pot actuar com a chaperona de les MHC II afavorint la seva sortida de l'ER. Segurament, ambdós processos descrits són en part, responsables de l'augment de DR detectat fora de l'ER en les cèl.lules DRDM. El mecanisme a través del qual DM facilita la maduració de DR durant el pas de l'ER al GA no està descrit, però la capacitat de DM per establir i guiar els dímers DR en aquest nivell de la biosíntesi (Liljedahl M i col, 1996) suggereix que la intervenció de DM en la maduració de DR podria ser anàloga. DM podria interaccionar directament amb els dímers DR recent sintetitzats, estabilitzant-ne la seva conformació al pH fisiològic de l'ER i guiant la seva arribada als endosomes. La interacció directa de DR i DM a pH 7 no s'ha pogut demostrar en experiments de coimmunoprecipitació (Sanderson F i col, 1996; Ulrich HJ i col, 1997), segurament per la sensibilitat de les interaccions hidrofòbiques establertes a l'acció dels detergents usats per la solubilització de les molècules transmembrana. Però hi ha altres evidències indirectes que recolzen la interacció d'ambdós molècules a aquest pH. La capacitat de DM per editar els pèptids que s'associen a MHC II a la membrana cel.lular de cèl.lules dendrítiques i de cèl.lules B (Santambrogio i col, 1999; Arndt SO i col., 2000) suggereix la interacció directa d'ambdues molècules en aquesta localització cel.lular i per tant, a pH fisiològic. A més la interacció funcional de les MHC II i DM també s'ha descrit en els EE en els quals el pH del lumen és quasi neutre (Pinet V i col., 1998; Pathak SS i col., 2001).

El paper de DM com a chaperona de DR en absència d'Ii no és tant eficient com el desenvolupat per Ii en aquest mateix pas, i segurament, part dels dímers DR recent sintetitzats en les cèl.lules DRDM, segueixen la via secretora per defecte cap a la superfície cel.lular, igual que s'observa en les cèl.lules DR, des d'on poden ser reinternalitzats fins a la via endocítica mitjançant un motiu codificat en la regió citoplasmàtica de DR $\beta$  (Pinet V i col., 1998), on entrarien en contacte amb DM.

En conjunt, els resultats obtinguts amb les cèl.lules RiNm5F transfectades confirmen els rols prèviament descrits per Ii i DM en altres tipus cel.lulars, en el context d'una cèl.lula endocrina, i confirmen el model experimental generat sobre la línia RiNm5F com un bon model de cèl.lules endocrines MHC II<sup>+</sup> amb capacitat d'unir pèptids estables. A més, demostren que en absència d'Ii, l'expressió de DM afavoreix la maduració dels dímers DR i permet la seva localització en vesícules del citoplasma i l'adquisició de pèptids estables en part dels complexos MHC II presentats a la superfície.