

La quantificació del marcatge per DM α es va realitzar seguint el mateix protocol descrit en els apartats anteriors i es mostra a la figura 51, amb els histogrames comparatius de la cèl·lula DR4liDM. Els resultats indicaven que:

1. El marcatge per HLA-DM era quantitativament superior en la línia DR4liDM (583 partícules d'or) que en les cèl·lules B (260 partícules d'or)
2. L'anàlisi de densitats només mostrava diferències significatives a nivell dels compartiments Mlbs, on la cèl·lula neuroendocrina ($d= 11.5$) presentava una densitat de DM molt superior a la de la LCL ($d=1.4$) ($p= 0.004$, test T de Student).
3. En les dues cèl·lules la major acumulació d'HLA-DM es donava en els Mvbs (51% i 47% en la cèl·lula B i la cèl·lula DR4liDM, respectivament)
4. A la superfície cel·lular de les dues cèl·lules el percentatge per DM era superior en la LCL (11%), que en la DR4liDM (7%).
5. El percentatge de DM present en els EE era el doble en la cèl·lula B (24%) que en la línia neuroendocrina (12%).
6. En els Mlbs de la cèl·lula DR4liDM s'acumulava un 30% del marcatge d'HLA-DM mentre que en la línia B limfoblastoid només el 12% de DM es localitzava en aquests compartiments

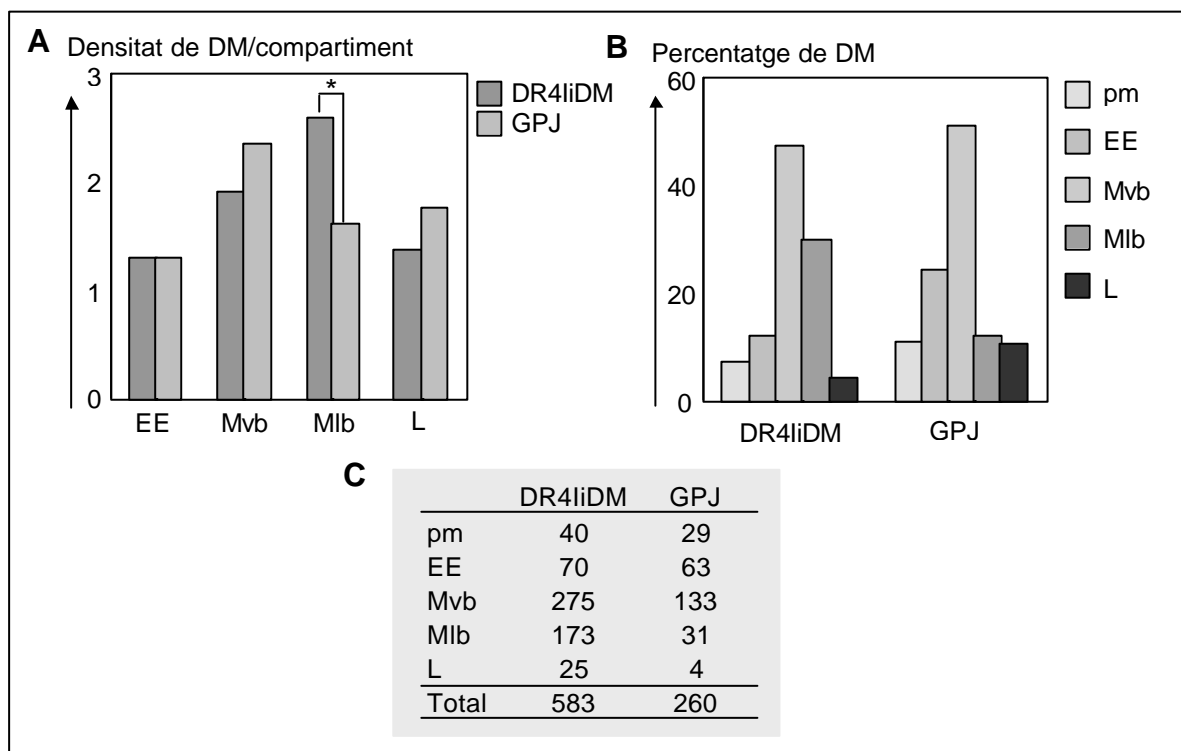


Figura 51. Comparació de la localització i la distribució de DM en els dos tipus cel·lulars. (A) A l'histograma hi ha la densitat mitjana de DM en cada compartiment de les dues cèl·lules. Es marquen (*) aquelles diferències amb valor de significació $p < 0.05$ segons el test t de Student. (B) l'histograma representa la proporció de DM acumulada en cada localitat d'ambdós cèl·lules i a la taula (C), hi ha el nombre de partícules d'or associades a DM recomptades en la línia endocrina i en la LCL.

Resumint, la majoria de marcatge d'HLA-DM era detectat en els Mvbs de les dues cèl·lules. Tot i la similitud quantitativa, en les cèl·lules endocrines HLA-DM es localitzava en la membrana perifèrica i en les membranes internes dels Mvbs, mentre que en la LCL la seva presència quedava restringida a la membrana perifèrica d'aquests. L'excés d'HLA-DM detectat en la línia endocrina s'acumulava en els Mlbs d'aquesta, i una proporció important d'HLA-DM s'acumulava als EE de les LCLs.

6. Comparació del repertori de pèptids associats a DR4 en la línia LCL i en les cèl·lules DR4iDM

Seguint el mateix protocol usat per l'elució del repertori de DR4 de les cèl·lules DR4iDM s'aïllà i analitzà en el repertori de lligands associats a DR4 en la LCL.

6.1. Característiques generals del repertori associat a DR4 en la línia B limfoblastoid

Per a la purificació dels complexos DR4-pèptid expressats en la línia LCL i el posterior aïllament dels lligands de baix pes molecular, es va partir de 3×10^9 cèl·lules i es va seguir el mateix protocol que en les cèl·lules transfectades. A la figura 52 es mostra el perfil obtingut per rp-HPLC del repertori de lligands de DR4 en les LCL.

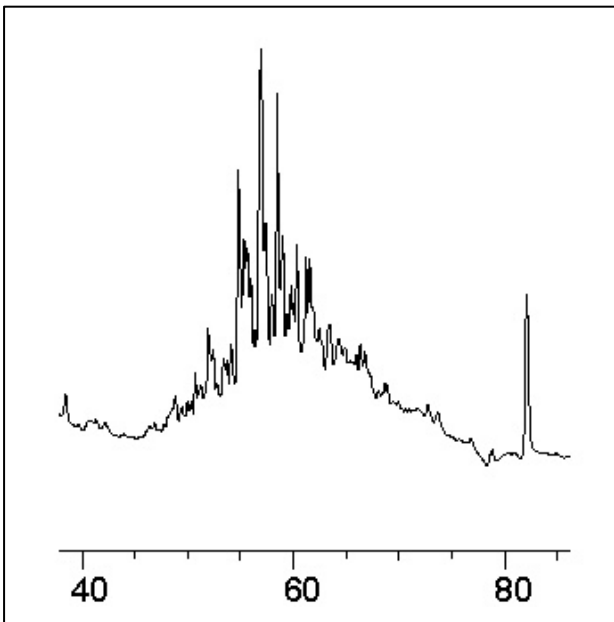


Figura 52 Perfil del cromatograma obtingut per rp-HPLC del repertori de pèptids eluït de les molècules DR4 de la LCL. Per aïllar els lligands de DR4 generats per la LBL es va purificar el DR4 de 3×10^9 cèl·lules per cromatografia d'afinitat amb l'Ac L243. El material recuperat de baix pes molecular es va separar per rp-HPLC en un gradient de 0-80% d'acetonitril

La complexitat de les diferents fraccions recuperades d'aquest repertori s'analitzà per MALDI en un instrument Voyager-DETMPRO. L'anàlisi global de les diferents espècies moleculars detectades es mostra a la Figura 53 amb l'estadística descriptiva a la taula A i la distribució de les diferents espècies moleculars agrupades en rangs de 400 Da a l'histograma B.

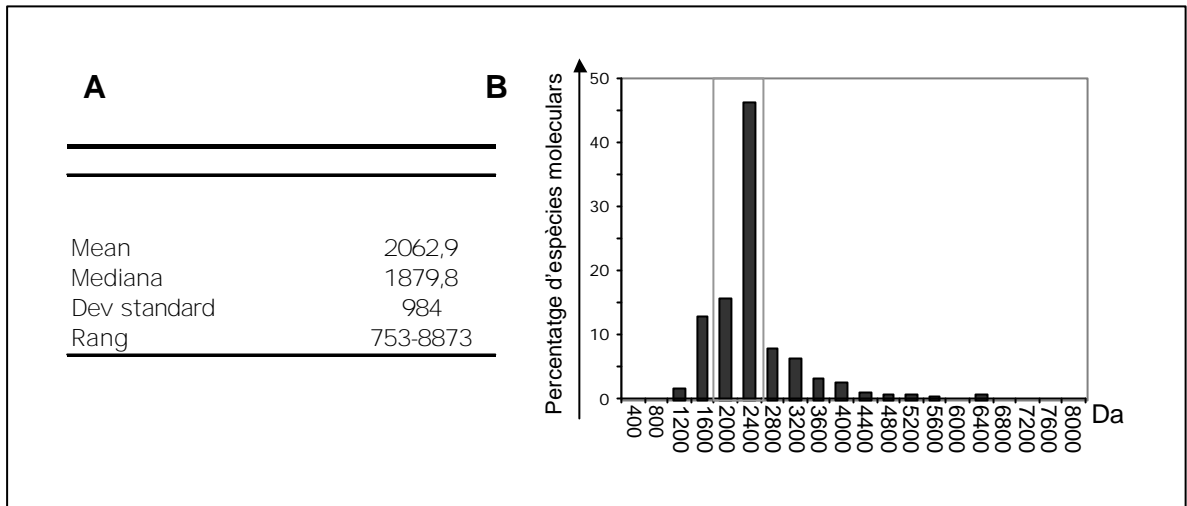


Figura 53. Anàlisi de les masses que conformen el repertori peptídic associat a DR4 en la B-LCL. Les molècules DR4 en la línia B limfoblastoid s'associen a un ampli repertori peptídic pel que fa al nombre d'espècies moleculars, de distribució homogènia acumulada en el rang de masses (longitud) estàndard dels lligands descrits per les MHC II. **A)** Estadística descriptiva de les espècies moleculars que componen el repertori associat a DR4 en la línia LCL. **B)** Histograma amb la distribució de les espècies moleculars del repertori associat a DR4 en la LCL agrupades en intervals de 400 Da. El requadre en gris marca el tamany estàndard descrit pels lligands de les MHC II.

Els resultats del repertori peptídic associat a DR4 en la línia LCL indicaven que:

- Les 772 espècies moleculars diferents detectades en el repertori de la LCL, abarcaven un rang de 753 a 8873 Da amb una massa mitja de 1880 Da (longitud estimada de 16 AA) i una desviació estàndard de 984 Da
- Un 65% de les espècies moleculars detectades presentaven una massa /longitud estàndard pels lligands de les MHC II (1800-2400 Da/ 15-20 AA)
- Només un 5% dels lligands de DR4 presentaven una massa /longitud superior als 30 AA (3600 Da)

La major sensibilitat de l'aparell usat per a l'anàlisi del repertori peptídic associat a DR4 en la línia LCL permeté detectar un major nombre d'espècies moleculars en comparació amb les detectades en el repertori de la línia DR4liDM (145). Aquesta diferència dels aparells de MALDI usats per l'anàlisi dels repertoris associats a DR4 en les dues línies cel·lulars va dificultar la comparació exhaustiva d'aquests. La massa mitja (2063 i 2012 Da en la LCL i DR4liDM, respectivament) i la desviació estàndard (984 i 823 Da, en la LCL i la DR4liDM, respectivament) eren semblant en els dos repertoris estudiats, així com l'absència de lligands d'elevat pes molecular (long >30 AA).

6.2. Identificació dels pèptids més abundants associats a DR4 en la LCL i comparació amb el repertori de la línia DR4liDM

Mitjançant espectrometria de masses en tàndem per nanoESItrampa iònica, s'identificaren 40 seqüències peptídiques del repertori de la LCL, obtingudes de les fraccions 31, 34, 36, 37, 38, 40, 42, 44, 45 i 49 del HPLC. Tal com es mostra a la Taula XVI, els 40 epítops identificats s'alinearen segons l'afinitat per DR4 calculada amb la matriu de Hammer i en tots els casos respectaven el motiu d'unió a DR4. Amb l'excepció de 5 lligands derivats de les proteïnes exògenes: transferrina i apolipoproteïna D, la resta de lligands derivaven de proteïnes endògenes majoritàriament localitzades a la superfície cel·lular de la cèl·lula B. Les MHC I i les Ig de superfície, o receptors de les cèl·lules B, dominaven el repertori associat a DR4. Els lligands exògens i de superfície s'agrupaven formant grups d'entre 2 i 6 pèptids retallats, de longitud entre 13 i 23 AA. Dels 31 lligands derivats de proteïnes de membrana, 16 corresponien a la mateixa regió (28 -48) de les MHC I (A2, B35 i Cw4, expressades per la LCL) que prèviament s'havia identificat associada a DR4 en la cèl·lules DR4liDM, derivat dels MHC I de rata. Finalment, dos dels lligands identificats en aquest repertori derivaven d'una proteïna resident en la via endocítica i també s'identificaren dos lligands derivats de les proteïnes citosòliques: enolasa alfa i de l'extrem N-terminal del factor d'elongació 1.

La comparació dels repertoris de DR4 identificats en les cèl·lules LCL i DR4liDM mostrava similituds però també diferències clares. La identificació de seqüències pràcticament idèntiques com l'epítop de la transferrina exògena juntament amb la dominància de les proteïnes autòlogues com la principal font de lligands per les molècules DR4 eren característiques comuns dels dos repertoris. D'altra banda, el repertori de la línia LCL presentava una diversitat menor que l'observada en les cèl·lules DR4liDM tot i la detecció per MALDI de més espècies moleculars diferents. En la LCL, 31 seqüències derivaven principalment de 2 proteïnes: MHC I i Ig, molt abundants de la superfície cel·lular de la LCL, mentre que les 17 seqüències de la superfície de la cèl·lula endocrina derivaven de 7 proteïnes diferents (vegeu taula IX, resultats III). En el repertori de DR4 de la LCL, la manca de diversitat en les proteïnes origen dels lligands era substituïda per un augment en la variabilitat de la longitud de les regions flanquejants al motiu d'unió amb DR4 i en el nombre de pèptids agrupats amb una seqüència core comú.

Mr	Long	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	Proteïna origen	Localització	Nº Id	PS	N-o C-ter														
1749,9	16	D	V	A	F	V	K	D	Q	T	V	Y	Q	N	T	D	G	Transferrin (556-571)	exògen	Q29443	8,3	no							
1691,8	15	D	V	A	F	V	K	D	Q	T	V	Y	Q	N	T	D		Transferrin (556-570)	exògen	Q29443	8,3	no							
1577,4	14	F	V	K	D	Q	T	V	Y	Q	N	T	D	G	N			Transferrin (559-572)	exògen	Q29443	8,3	no							
1657,8	15	Q	E	L	R	A	D	G	T	V	N	Q	I	E	G	E		Apolipoprotein D (80-94)	exògen	P05090	6,5	no							
1456,7	13	L	N	Q	E	L	R	A	D	G	T	V	N	Q				Apolipoprotein D (80-94)	exògen	P05090	6,5	no							
2469,1	21	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M	E	P	R	HLA-A2 (28-48)	superfície	P79495	5,3	no		
2098,9	18	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M	E	P				HLA-A2 (30-47)	superfície	P79495	5,3	no		
2216	19	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M	E			HLA-A2 (28-46)	superfície	P79495	5,3	no		
1955,9	17	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R					HLA-A2 (28-44)	superfície	P79495	5,3	no		
1872,9	16	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R	M						HLA-A2 (30-45)	superfície	P79495	5,3	no		
1741,8	15	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R							HLA-A2 (30-44)	superfície	P79495	5,3	no		
1626,7	14	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	Q	R								HLA-A2 (31-44)	superfície	P79495	5,3	no		
2408,1	21	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	T	E	P	R	HLA-B35 (27-47)	superfície	O78182	5,3	no		
2037,9	18	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	T	E	P				HLA-B35 (29-46)	superfície	O78182	5,3	no		
2252	20	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	T	E	P		HLA-B35 (27-46)	superfície	O78182	5,3	no		
1825,8	16	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R						HLA-B35 (28-43)	superfície	O78182	5,3	no		
1962,8	18	E	D	L	S	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q	R				HLA-C (122-139)	superfície	Q944H9	2,4	no		
1833,9	17	D	L	S	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q	R					HLA-C (123-139)	superfície	Q944H9	2,4	no		
1562,7	15	L	S	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q							HLA-C (124-138)	superfície	Q944H9	2,4	no		
1434,7	14	L	S	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T								HLA-C (124-137)	superfície	Q944H9	2,4	no		
1875,9	17	E	D	L	R	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q					HLA-C (128-144)	superfície	O19595	2,4	no		
1746,8	16	D	L	R	S	W	T	A	A	D	T	A	A	Q	I	T	Q						HLA-C (128-144)	superfície	O19595	2,4	no		
2364,1	21	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P	R	HLA-C (28-48)	superfície	O78202	5,3	no		
2208	20	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P		HLA-C (28-47)	superfície	O78202	5,3	no		
3004,5	23	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P	W	V	E	HLA-C (28-51)	superfície	O78091	5,3	no
2776,3	21	V	D	D	T	Q	F	V	R	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P	W			HLA-C (28-49)	superfície	O78091	5,3	no
2236,1	21	V	D	D	T	Q	F	V	Q	F	D	S	D	A	A	S	P	R	G	E	P	R		HLA-C (28-48)	superfície	O78202	4,3	no	
2111,1	19	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V			Immunoglobulina kappa (187-205)	superfície	1ADO	3,7	no		
2011,9	18	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P				Immunoglobulina kappa (187-204)	superfície	1ADO	3,7	no		
1982,4	18	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V				Immunoglobulina kappa (188-205)	superfície	1ADO	3,7	no		
1827,9	16	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S						Immunoglobulina kappa (187-202)	superfície	1ADO	3,7	no		
1754,8	17	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V					Immunoglobulina kappa (189-205)	superfície	1ADO	3,7	no		
1698,9	15	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S							Immunoglobulina kappa (188-202)	superfície	1ADO	3,7	no		
1570,8	14	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S								Immunoglobulina kappa (189-202)	superfície	1ADO	3,7	no		
2205	19	H	P	V	T	G	Q	F	L	Y	Q	D	S	N	W	A	S	K	V	E			Transferrin receptor (561-534)	superfície	P02786	4,9	no		
1967	17	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A					Immunoglobulina pesada (31-47)	superfície	AAA58894	5,4	no		
1759,9	16	L	P	S	Y	E	E	A	L	S	L	P	S	K	T	P	E						Proteïna associada lisosomal (237-252)	endocítica	Q1357	2,1	no		
1816,9	17	L	P	S	Y	E	E	A	L	S	L	P	S	K	T	P	E	G					Proteïna associada lisosomal (237-253)	endocítica	Q1357	2,1	no		
1779,9	17	I	K	E	K	Y	G	K	D	A	T	N	V	G	D	E	G	G					Enolasa alfa (196-212)	citoplasmàtica	PR00148	4,2	no		
1565,8	14	I	E	K	F	E	K	E	A	A	E	M	G	K	G								Factor d'elongació 1 (1-16)	citoplasmàtica	P24534	0,9	N-ter		

Taula XVI Seqüències identificades del repertori associat a DR4 en les B-LCL. La taula està organitzada igual que les taules IX, X, XI i XII del capítol de resultats III.

D'altra banda, l'anàlisi de la localització de les proteïnes que originaven els lligands de DR4 també mostrava clares diferències entre els dos tipus cel·lulars. A l'histograma de la figura 54 es mostra la comparació de la proporció de lligands derivats de les proteïnes localitzades en les diferents localitats subcel·lulars en les dues cèl·lules. Tal com mostra la comparació:

- El 59% dels lligands de DR4 identificats en el repertori de la línia endocrina derivaven de proteïnes de superfície o de la via endocítica, mentre que aquesta proporció augmentava fins al 95% dels lligands identificats en el repertori de les LCL.
- El 34% dels lligands de DR4 en les cèl·lules endocrines derivaven de proteïnes citoplasmàtiques i secretades mentre que les proteïnes d'aquestes localitats només donaven lloc al 5% dels lligands identificats en el repertori de les LCLs
- La proporció de lligands derivats de proteïnes exògenes era semblant en els dos repertoris estudiats

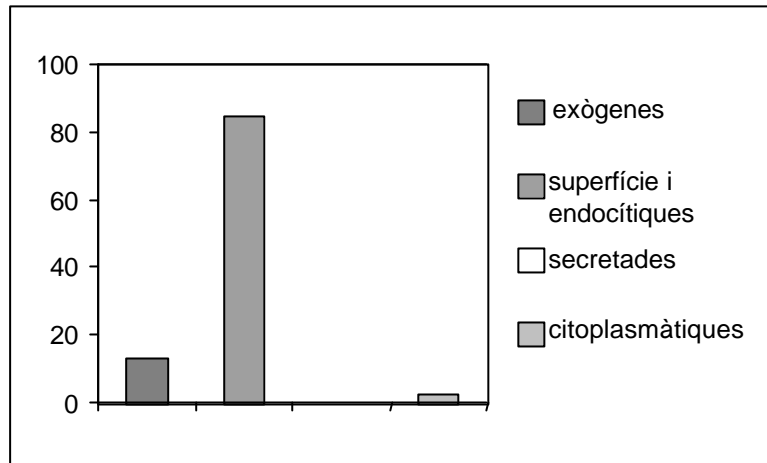


Figura 54. Els lligands de DR4 expressat en la LCL deriven principalment de proteïnes de la superfície cel·lular. Histograma amb la distribució de la localització subcel·lular de les proteïnes origen dels epítops associats a DR4, identificats en la LCL. L'histograma mostra el percentatge dels lligands derivats de proteïnes exògenes (gris fosc), de proteïnes de la superfície cel·lular o endocítiques (ratllat), de proteïnes secretades (blanc), i de proteïnes citoplasmàtiques (gris clar).

En global, els dos repertoris de lligands per DR4 eren dominats per proteïnes endògenes de la cèl·lula hoste. Les LCL presentaven un repertori més homogeni en les proteïnes origen dels lligands però amb més variants en longitud dels epítops associats. El repertori en les cèl·lules endocrines representava una major espectre de proteïnes origen tant superficials com citoplasmàtiques.

6.4. Els lligands identificats en els repertoris de les línies DR4liDM i LCL presenten diferències en els residus d'ancoratge i en l'índex d'afinitat per DR4

L'anàlisi comparatiu dels residus d'ancoratge presentats en les P1, P4, P6 i P9 dels lligands identificats en els dos repertoris es realitzà sobre el millor alineament obtingut per cada seqüència en la matriu de Hammer (Hammer i col., 1994), considerant totes les variants en longitud. A la figura 55 es mostren els histogrames que representen el percentatge de lligands que presenten un determinat AA en les quatre posicions d'ancoratge analitzades, en els dos tipus cel·lulars. Els resultats mostraven que:

- La P1 del repertori eluït de la línia endocrina era dominada pels AA aromàtics (78%) enfront dels alifàtics (22%), mentre que la meitat (49%) dels lligands de la LCL presentaven Val en la P1
- La P4 dels lligands identificats en els dos repertoris era dominada per AA negativament carregats, però en la seva absència, els lligands de la cèl·lula LCL presentaven Ala i els epítops de la cèl·lula endocrina presentaven una major variabilitat d'AA.

- S'observà una major restricció dels AA preferits en la P6 i P9 del repertori de la LCL. La P6 era dominada per Thr i Asp en la LCL, mentre que la presència de Asn i Gly també era important en els repertori de les cèl·lules endocrines

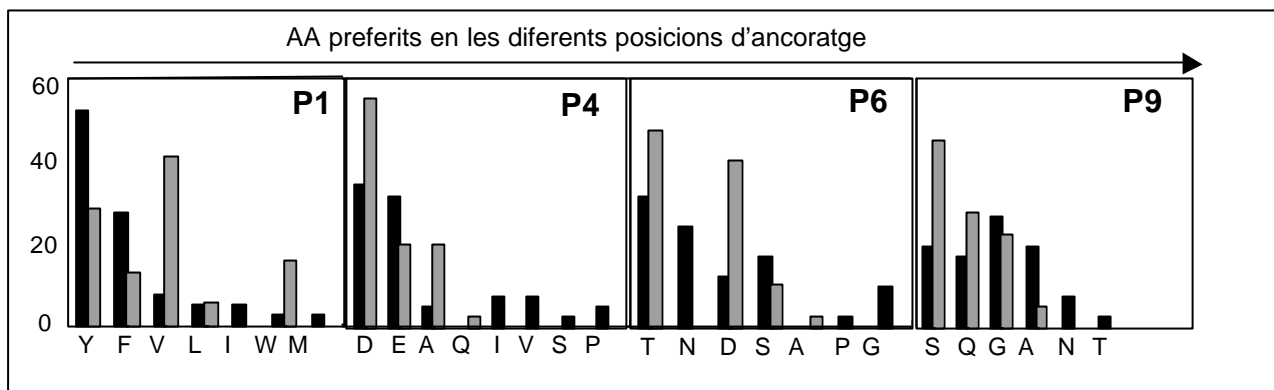


Figura 55 Les LCL presentaven un repertori més homogeni en els AA d'ancoratge a DR4 que les cèl·lules LCL. Proporció relativa dels AA preferits en les principals posicions d'ancoratge a DR4 en els repertoris peptídics eluïts de les cèl·lules DR4liDM (negres) i de les B-LCL (barrat). La quantificació es realitzà incloent totes les variants en longitud dels grups de pèptids retallats

En resum, el repertori eluït de les DR4 expressades en la línia B limfoblastoid, presentava una major restricció en els residus identificats en les posicions d'ancoratge que el repertori de les DR4 expressades en les cèl·lules DR4liDM.

Al repetir l'anàlisi dels AA preferits en cada posició d'ancoratge prenent els grups de pèptids retallats com a seqüències úniques s'obtingueren els resultats mostrats a la taula XVII.

	P1							P4							
	Y	F	V	L	I	W	M	D	E	A	Q	I	V	L	S
DM+	43	32	8	8	3	3	3	40	36	6	0	6	10	0	0
LCL	31	23	23	8	0	15	0	50	17	25	8	0	0	0	0

	P6							P9							Total	
	T	N	D	S	A	P	G	S	G	A	Q	M	N	T		V
DM+	21	24	14	21	0	3	14	24	17	10	21	0	10	3	0	29
LCL	50	0	10	30	10	0	0	20	20	20	30	10	0	0	0	10

Taula XVII Percentatge de cada AA en les diferents posicions d'ancoratge a DR4 dels lligands identificats en la LCL i les cèl·lules DR4liDM (DM+). La quantificació es realitzà agrupant els grups de pèptids retallats com una seqüència única. A la darrera columna es mostra el nombre total de seqüències core considerades en l'anàlisi.

En aquest segon anàlisi, l'eliminació dels grups de pèptids retallats permeté despreciar la influència de l'abundància de les diferents proteïnes en la via endocítica de la LCL (sobretot MHC I i Ig). Les diferències més grans s'observaren en la P1 i P6, ja que al igual que en les cèl·lules DR4liDM, els residus aromàtics eren preferits en P1 per davant dels alifàtics i la dominància de l'Asp en P6 es perdia per donar pas a una preferència per Thr. No hi havia diferències importants entre els AA preferits en P4 i P9 entre els dos anàlisi.

La comparació de l'afinitat mitja dels lligands identificats en els dos repertoris i mostrada a la Taula XVII, indicava que els lligands de DR4 en la línia LCL presentaven una afinitat mitjana major que els lligands de DR4 en la línia endocrina (5.3 i 4.5 respectivament, $p=0.05$, test t de student).

	Mitja PS	Dev Stan
DR4liDM	4.5	1.8
LCL	5,3	1.6
p-value	0.05	

Taula XVIII. Comparació dels índexs d'afinitat per DR4 dels lligands identificats en els repertoris de les línies DR4liDM i LCL

El repertori de lligands de DR4 en la LCL presentava un rang d'AA més reduït en les posicions d'ancoratge que les cèl·lules DR4liDM, com a conseqüència de la poca variabilitat en els epítops associats. Tot i així, els AA preferits per a l'associació amb DR4, eren semblants en ambdues cèl·lules independentment del llinatge cel·lular i de l'expressió de chaperones diferents, com ara HLA-DO. L'homogeneïtat del repertori de la LCL, també feia disminuir la variabilitat dels índexs d'afinitat dels diferents lligands que en la LCL eren lleugerament superiors que en les cèl·lules DR4liDM.

Durant la progressió de les respostes autoimmunitàries, les cèl·lules B de l'infiltrat limfocitari i les cèl·lules endocrines, expressen MHC II a la seva superfície (Botazzo GF i col., 1983; Hanafusa T i col., 1987; Somoza, N i col., 1994; Roep BO i col., 1990). S'han suggerit diferències en els tipus de lligands generats per ambdós llinatges cel·lulars per diferències en la reactivitat de cèl·lules T, en assaigs funcionals on s'usaren els dos tipus cel·lulars per separat com a APCs (Quarantino S i col., 1996). Mitjançant la comparació dels repertoris peptídics associats a DR4 i l'organització de la via endocítica en les cèl·lules DR4liDM, com a model d'una cèl·lula β -pancreàtica, i d'una LCL homozigota per DR4, com a model de cèl·lula d'expressió constitutiva de MHC II, s'han establert diferències en les capacitats per processar autoantigens i per tant, per presentar-los a les cèl·lules T CD4⁺ efectores.

L'anàlisi general dels repertoris d'espècies moleculars associades a DR4 en els dos tipus cel·lulars mostra semblances com la restricció en la mida dels lligands associats a DR4 i en el rang de longitud abarcat per aquests en les dues cèl·lules. Aquestes semblances suggereixen que els lligands es generen en compartiments endocítics amb característiques semblants en els dos tipus cel·lulars. L'homologia morfològica dels diferents compartiments endocítics i la concordància en la proporció de MIICs en la via endocítica de les dues cèl·lules recolza aquesta hipòtesi i suggereix que la necessitat de realitzar una funció comú pels dos tipus cel·lulars, com és la presentació d'Ag per MHC II, explicaria l'organització de la via endocítica dels dos tipus cel·lulars. A més, la detecció de dos epítops comuns en els dos repertoris de DR4 (transferrina i MHC I) indica que els mecanismes de processament, actius en els dos tipus cel·lulars, poden generar lligands semblants per les DR4, al menys, pels antigens derivats de proteïnes exògenes i de les proteïnes d'expressió ubíqua de la superfície cel·lular.

L'absència de marcatge per Cer-CLIP a la superfície de les cèl·lules endocrines i la detecció de complexos DR4 associats a CLIP a la superfície de les LCL sembla la primera indicació de les diferències en la composició dels dos repertoris de lligands associats a DR4. L'especificitat de l'Ac Cer-CLIP que reconeix els complexos DR-CLIP, i el fet que les dues cèl·lules expressin el mateix al·lel DR4 en homozigot, descarta la possibilitat que en la LCL s'estigués detectant l'associació d'altres al·lells de MHC II a CLIP, però si podria estar associat a les isoformes coexpressades amb DR4 com DR53. Tot i la detecció de complexos DR4-CLIP per citometria de flux a la superfície de les LCL, no s'identificà cap seqüència corresponent a aquests epítops entre els lligands identificats en el repertori de la LCL, confirmant els estudis previs dels repertoris associats a DR4 en les LCL (Rudensky A i col., 1991; Rammensee HG i col., 1995; Falk K i col., 1994; Hammer J i col., 1994; Friede i col., 1996), i encara que algunes seqüències del CLIP s'han descrit associades a altres al·lells de DR (Rudensky A i col., 1991), possiblement com a reflex de les diferències específiques d'al·lel en l'afinitat per CLIP (Bikkof EK i col., 1995).

La identificació d'alguns dels lligands més abundants en els dos repertoris confirma la menor variabilitat, en seqüència i en origen, del repertori associat a DR4 en les LCL suggerida pel perfil d'HPLC. En contraposició, un nombre major d'espècies moleculars eren detectades per MALDI en aquesta cèl·lula. La diferència en el nombre d'espècies moleculars diferents detectades en els dos repertoris es podria atribuir a la diferència en sensibilitat i resolució en els aparells de MALDI usats i al nivell d'expressió de DR4 en ambdós tipus cel·lulars, que al ser més alt en les LCL augmentaria la concentració d'alguns lligands menys abundants fins als límits de detecció de la tècnica emprada. En treballs anteriors s'ha descrit que l'expressió d'HLA-DO indueix una edició més estricta del repertori de lligands associats a les MHC II (Pinet V i col., 1995; 1998). L'expressió d'aquesta cochaperona en les LCL (Pathak SS i col., 2001) i no en les cèl·lules endocrines podria explicar l'homogeneïtat més elevada del repertori eluït de les LCLs. La interacció del complex DM-DO amb DR4, no influenciaria els AA preferits per la unió amb DR4 però podria exercir una pressió més astringent sobre els lligands seleccionats, limitant l'accés a aquells lligand d'alta afinitat que confereixen una elevada estabilitat al complex amb DR4.

Pràcticament la totalitat dels lligands identificats per DR4 en les LCL, deriven de proteïnes presents a la superfície cel·lular i a la via endocítica, i que per tant, poden interceptar fàcilment la ruta de biosíntesi de les DR4. La majoria d'aquests lligands corresponen a variants en longitud derivades de dos epítops concrets de proteïnes altament expressades per les LCL: MHC I₂₈₋₄₈ i Igk₁₈₇₋₂₀₅, aquesta darrera específica de llinatge cel·lular. Els lligands derivats de proteïnes residents en altres localitats cel·lulars com el citosol, el nucli o la via secretora es troben pràcticament absents del repertori associat a DR4 en les LCL i els lligands d'origen exogen només representen el 5% del total identificat, d'acord amb els resultats prèviament reportats en altres treballs (Rudensky A i col., 1991; Falk K i col., 1994; Hammer J i col., 1994; Rammensee HG i col., 1995; Friede i col., 1996). En contraposició, una meitat dels lligands de DR4 identificats en les cèl·lules endocrines DR4liDM s'originen a partir de proteïnes citoplasmàtiques residents en la via secretora, el citosol o el nucli cel·lular, mentre que l'altre meitat deriva de proteïnes superficials o bé residents en la via endocítica. L'arribada de proteïnes citoplasmàtiques a la via endocítica s'ha explicat per mecanismes d'autofagia i mitjançant mecanismes específics de translocació poc coneguts, des del citosol al lumen dels compartiments endocítics tardans (Jaraquemada D i col., 1990; Karlsson L i col., 1991; Tich J i col., 2000). També s'ha descrit la fusió dels endosomes amb els grànuls de secreció (Aniento i col., 1993) permetent l'arribada de les proteïnes secretades a la via de biosíntesi de les MHC II. L'elevada proporció de lligands d'origen citoplasmàtic i de molècules secretades en el repertori de la cèl·lula endocrina, suggereix una major eficiència dels mecanismes que permeten l'arribada de d'aquestes molècules a la via endocítica, en comparació amb la LCL.

Una altra diferència entre els dos repertoris estudiats és el número de components dels grups de pèptids retallats. El repertori de la LCL està format per grans grups de pèptids mentre que en la cèl·lula endocrina, la major variabilitat en les seqüències core dels lligands associats a DR4 es compensa amb la formació de grups més petits de pèptids amb els extrems retallats. La chaperona HLA-DM actua com un enzim de baixa eficiència segons la cinètica de Michaelis-Menten, amb la capacitat de catalitzar la maduració seqüencial de fins a 12 molècules de MHC II per minut (Ramachandra L i col., 1996; Kropshofer H i col., 1997). Per facilitar la interacció seqüencial de MHC II i DM, aquestes molècules s'organitzen en microdominis rics en proteïnes tetraspan a la membrana cel·lular de les LCL (Hammond C i col., 1998). A més, s'ha demostrat que les diferents molècules MHC II presents en un microdomini determinat estan associades a variants en longitud del mateix epítip, facilitant així la concentració de diferents complexos MHC II-pèptid antigènic en una zona de la superfície cel·lular (Kropshofer H i col., 2002). Curiosament, la major densitat de DR4 en els compartiments primerencs: EE i Mvb de les LCL es correlaciona amb la presència de grups més nombrosos de seqüències retallades, mentre que la menor densitat de DR4 en aquests compartiments de la cèl·lula endocrina correlaciona amb l'efecte contrari i per tant, en la formació de grups més reduïts de pèptids retallats i una major variabilitat en l'origen dels lligands associats a DR4. Aquesta diferència suggereix que en les cèl·lules transfectades l'organització de DR4 i DM en els compartiments endocítics seria diferent a la dels dominis tetraspan de les LCL, ja sigui per característiques específiques de llinatge cel·lular o per característiques implícites a la natura heteròloga del model, en el que les molècules tetraspan expressades serien de rata i les DR4, li i DM humanes. Fins al moment, no s'ha estudiat la presència de microdominis tetraspan en les cèl·lules endocrines ni l'organització de les MHC II a la superfície d'aquestes cèl·lules.

Tot i les diferències en densitat, una proporció important de les tres molècules DR4, li i DM així com del material endocitat es colocalitzen en els compartiments Mvbs d'ambdós tipus cel·lulars, convertint-los en els principals candidats per la unió de DR4 al lligand peptídic. L'editora del repertori associat a DR4, HLA-DM, també s'acumula en els Mvbs de les dues cèl·lules, tot i que en les LCL la seva localització queda restringida a la membrana perifèrica de les vesícules Mvbs mentre que en les cèl·lules transfectades es distribueix també en les membranes de les vesícules internes. Recentment, s'ha descrit que HLA-DO és la molècula responsable de l'acumulació preferent de DM en la membrana perifèrica dels Mvbs en cèl·lules dendrítiques (Vogt A i col., 1999; Kleijmeer M i col., 2001). L'expressió d'HLA-DO en les LCLs i no en les cèl·lules endocrines explicaria les diferències en la distribució de DM en els Mvbs de les dues cèl·lules, influint en la composició dels lligands de DR4. En les cèl·lules B, la menor presència d'li nativa a la superfície conjuntament amb una acumulació majoritària a nivell de Mvbs, indica que la principal porta d'entrada a la via endocítica dels complexos MHC-li de nova síntesi es

produeix a nivell de Mvbs, tal com s'ha descrit en la bibliografia (Amigorena S i col., 1994). D'altra banda, l'elevada presència d'li nativa a la superfície de les cèl·lules endocrines, indica que la principal porta d'entrada dels complexos MHC-li de nova síntesi a la via endocítica en aquest tipus cel·lular és la internalització des de la superfície cel·lular. Ambdues vies d'entrada a la via endocítica han estat descrites amb importàncies relatives en diferents APCs (Watts C i col., 2001) i podria ser una característica dependent del llinatge cel·lular.

Tot i l'acumulació preferent de DR4 en els Mvbs, la localització i distribució de DR4, li i DM també és diferent en els compartiments EE i Mlbs de les dues línies cel·lulars. El fenotip de cèl·lula activada que caracteritza les cèl·lules B transformades amb l'herpesvirus Epstein Barr facilita una major localització de les MHC II a la superfície d'aquestes cèl·lules. Un reciclatge de material més eficient des dels EE podria afavorir la sortida de complexos DR4-CLIP cap a la superfície cel·lular en la LCL i també podria facilitar que una proporció de les DR4 unís pèptids en els EE. La major proporció d'EE i densitat de DR4 en els compartiments EE de la LCL en comparació amb les cèl·lules endocrines, recolza aquesta possibilitat que s'havia suggerit en estudis previs (Engelhard VH i col., 1994; Pierre P i col., 1998; Lich JD i col., 2000).

En resum, les dades indicaven que les LCL presenten un repertori de lligands de DR4 caracteritzat per grans grups de pèptids retallats derivats de pocs epítops de proteïnes molt abundants a la superfície de la cèl·lula, mentre que les cèl·lules endocrines presenten un repertori més variat constituït per grups més petits de pèptids retallats que deriven d'un espectre més ampli de proteïnes origen, tant de la superfície cel·lular com de diferents compartiments del citoplasma. Aquesta major variabilitat dels lligands endògens associats a DR4 en les cèl·lules endocrines, les assenyalaria com a bones cèl·lules presentadores en les situacions d'autoimmunitat, ja que la majoria d'autoantigen T descrits deriven de proteïnes específiques dels grànuls de secreció o de la superfície de les cèl·lules endocrines. Contràriament, les LCL no presentarien una gran capacitat per a presentar autoantigen ja que els lligands endocitats de l'exterior només eren una petita proporció dels epítops associats a DR4 i el repertori estava dominat per dues proteïnes de la superfície de la mateixa LCL. Aquesta característica reduiria les possibilitats de les cèl·lules B a actuar com a cèl·lules presentadores d'autoantigen *in situ*, ja que només aquelles cèl·lules amb BCR específic per algun autoantigen podrien augmentar la presentació d'aquest a la seva superfície, mentre que totes les cèl·lules endocrines ho farien simultàniament.

El paradigma de la tolerància al que és propi el componen les malalties autoimmunitàries en les que l'organisme hoste és el responsable de l'activació, manteniment i cronificació de respostes immunitàries autoespecífiques. En les malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan la resposta immunològica afecta a un sol òrgan, molt freqüentment d'origen neuroendocrí. Aquestes malalties es caracteritzen pel seu caràcter crònic i per la presència d'autoanticossos i d'una resposta cel·lular contra antigens d'expressió restringida a l'òrgan afectat. Per això, la resolució de l'origen de l'autoimmunitat endocrina està íntimament lligada a l'elucidació dels mecanismes que mantenen la tolerància als antigens endocrins perifèrics.

Amb el descobriment que les cèl·lules endocrines tiroïdals, sota l'estímul adequat, tenien la capacitat d'expressar molècules MHC II (Pujol-Borrell i col., 1983) i que en glàndules afectades d'AITDs hiperexpressaven MHC I i expressaven ectòpicament MHC II (Hanafusa i col., 1983), es va suggerir que aquestes cèl·lules podien actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen i presentar els seus autoantigens a les cèl·lules T autorreactives (Botazzo GF i col., 1983). Posteriorment, l'expressió ectòpica de MHC II es va demostrar en les cèl·lules diana d'altres malalties autoimmunitàries endocrines com en les cèl·lules β -pancreàtiques dianes de la DM1 (Botazzo GF i col., 1985; Foulis AK i col., 1986; Somoza N i col., 1994). Els estudis fenotípics s'han centrat en demostrar l'expressió de les molècules implicades en el processament i la presentació d'antigen en les cèl·lules endocrines. En el nostre laboratori, s'ha demostrat que els tiròcits de malalts amb Graves-Basedow expressen MHC II i les molècules associades Ii i HLA-DM, i que l'expressió d'aquestes molècules és modulada per la presència d'IFN γ . Els complexos MHC II-pèptid expressats a la superfície d'aquestes cèl·lules són estables, suggerint que es troben establement associats a pèptids antigènics (Catálfamo M i col., 1999). La dificultat en l'obtenció de material *ex vivo* i la pèrdua d'expressió de les MHC II i de variats dels antigens expressats, durant el cultiu *in vitro* de les cèl·lules endocrines, ha limitat l'estudi del seu rol com a cèl·lules presentadores d'antigen per MHC II durant la progressió de la resposta autorreactiva, així com del tipus de lligands presentats per aquest llinatge cel·lular.

La primera part d'aquest treball ha volgut anar més enllà en l'estudi de les capacitats de les cèl·lules endocrines com a cèl·lules presentadores d'antigen per MHC II i en les influències derivades de l'expressió d'Ii i DM. L'objectiu s'ha analitzat des de dos punts de vista diferents però relacionats: i) l'estudi dels compartiments endocítics implicats en la biogènesi de DR4 en les cèl·lules endocrines, per tècniques de microscòpia electrònica, ii) la detecció i identificació dels lligands més abundants de DR4 en les dues cèl·lules endocrines, per tècniques d'espectrometria de masses. S'ha estudiat un model de cèl·lula endocrina generat en el laboratori per Serradell L, mitjançant la transfecció de la línia RINm5F derivada d'un insulinoma de rata amb les molècules humanes: DR4, Ii i DM (Serradell L i col., 1999). L'elecció de la cèl·lula endocrina de rata

fou determinada pel fet que la majoria de les línies endocrines humanes, establertes per mètodes com la transformació amb SV-40 o bé derivades de tumors, es troben altament des-diferenciades, descartant-les com a models per a l'estudi representatiu del repertori peptídic associat a les MHC II. A més, el fet que la línia RINm5F hagi estat àmpliament usada per l'estudi de la DM1 en humans (Roep BO i col., 1990) recolzava l'elecció. La limitació dels estudis sobre els nivells d'expressió de les MHC II, li i DM en cèl.lules primàries no transformades (Moses H i col., 1992; Rigaud G i col., 1996; Wu Z i col., 1999) i la manca de dades sobre aquests en les cèl.lules endocrines durant les diferents etapes dels processos inflamatoris, va impossibilitar la selecció de transfectants en base als nivells d'expressió dels gens MHC. La transfecció seqüencial de les molècules en la línia RINm5F permeté la generació de línies transfectades amb les diferents combinacions possibles: RIN-DR4, RIN-DR4li, RIN-DR4DM i RIN-DR4liDM (Serradell L i col., 1999) que ens han permès assessorar els efectes que es produeixen com a conseqüència de la seva presència o absència en aquestes cèl.lules. Les dades presentades en aquest treball mostren la capacitat de les cèl.lules endocrines per a presentar antígens endògens d'expressió restringida a teixit, i per reorganitzar la via endocítica per assolir una presentació eficient d'aquests antígens per MHC II.

Com a punt de partida s'ha analitzat l'organització de la via endocítica i el repertori de pèptids associat a DR4 en absència d'li i de DM (cèl.lules DR4) en la línia RINm5F. En aquestes cèl.lules l'expressió de DR4 induïx una reorganització de la via endocítica en la que augmenta el nombre de compartiments MIIC, sobretot de tipus MIb. L'anàlisi general dels pèptids associats a DR4 en aquestes cèl.lules mostra un repertori altament heterogeni en contingut i en rang de masses/longitud, suggerint que possiblement aquests lligands es generen i s'uneixen en localitzacions subcel.lulars on els pèptids poden no complir les característiques estàndard dels lligands a MHC II i els requeriments per l'associació amb DR4 són menys estrictes. Recolzant aquesta visió, trobem la manca d'estabilitat a la superfície cel.lular dels complexos DR4-pèptid presentats per les cèl.lules DR4 (Serradell L i col., 1999) i el fet que aproximadament la meitat de les seqüències identificades en aquest repertori no compleixen amb el motiu d'unió a DR4. S'ha descrit que en absència d'li, els DR recent sintetitzats i translocats a l'ER, són inestables i queden retenguts (Busch R i col., 1996) fins que ocasionalment uneixen un lligand que els estabilitza, permetent la seva sortida a la superfície cel.lular, o bé són degradats. L'heterogeneïtat i la poca abundància de la majoria de les espècies moleculars detectades en aquest repertori augmenta la dificultat de la seva identificació degut als límits de sensibilitat de la tècnica emprada, però els pocs lligands identificats presenten característiques molt particulars. La majoria de seqüències deriven dels extrems N- o C-terminal de proteïnes citosòliques. La meitat dels lligands citosòlics no respecten el motiu d'unió a DR4 i l'altre meitat ho fa però amb una afinitat teòrica mitja menor que l'obtinguda quan s'expressa li i/o DM. Aquestes particularitats suggereixen que aquests lligands podrien associar-se a DR4 en l'ER on s'han descrit canals com el

complex TAP o el transposó Sec61, que permetrien l'arribada de pèptids citosòlics a l'abast de les DR4, i on l'ambient físico-químic i les chaperones residents difereixen molt dels de la via endocítica. Un dels lligands identificats en aquestes cèl·lules deriva d'una proteïna de la superfície cel·lular i respecta el motiu d'unió amb DR4. Aquest podria ser un exemple de pèptids que podrien associar-se a les molècules DR4 recirculants des de la superfície cel·lular cap a la via endocítica. La inestabilitat dels complexos DR4-pèptid formats a l'ER, facilitaria l'intercanvi dels lligands adquirits en aquell compartiment per d'altres abundants en la via endocítica, com el determinant de les MHC I. La limitació en el nombre de lligands d'aquest tipus ("intercanviats") i l'abundància de compartiments Mlbrics en DR4 en aquesta línia cel·lular suggereix que la majoria dels complexos DR4-pèptid internalitzats de la superfície cel·lular no aconsegueix l'intercanvi productiu amb un lligand estable, quedant acumulats en els compartiments Mlb, com pas previ a la degradació.

Tot i que no s'ha descrit una situació fisiològica comparable a aquest model, l'estudi de la línia DR4 podria reflectir l'escenari trobat a la superfície de les vacunes epitelials transfectades amb MHC II singènic, assajades en models animals d'immunitat anti-tumoral (Zarour HM i col., 2000; Jager E i col., 2000) o bé, a la superfície de les APCs tímiques dels ratolins KO per li i DM (Kovats S i col., 1998). En aquests ratolins doble KO, es produeix una reducció dels complexos MHC II-pèptid a la superfície de les APCs tímiques que dona lloc a la selecció d'un repertori de cèl·lules T CD4⁺ molt reduït, fet que s'ha relacionat amb la inestabilitat de la majoria dels complexos. És possible que només els lligands intercanviats durant el reciclatge de les MHC II en la via endocítica, que compleixen els requisits de seqüència i afinitat per DR4, tinguin una vida mitja prou llarga per a permetre la selecció d'alguns timòcits, deixant a la resta de timòcits morir per negligència. Contràriament, a perifèria, les cèl·lules epitelials transfectades amb MHC II i B7 sense li ni DM, s'han descrit com a inductores potents de la resposta T CD4 anti-tumoral (Zarour HM i col., 2000; Jager E i col., 2000). La diferència entre la capacitat de les cèl·lules epitelials MHC II⁺ d'aquests estudis es podria explicar per les diferències en els requisits de reconeixement en el microambient tímic i a perifèria, encara que no es poden descartar diferències en la dependència d'li i DM per assolir l'estabilitat dels dos al·lels emprats, o bé a diferències en nivells d'expressió entre les cèl·lules d'expressió constitutiva de classe II i les cèl·lules que expressen classe II per transfecció.

L'estudi sobre les influències de l'expressió d'li en absència de DM realitzat en la línia DR4li, permet confirmar, en el context de les cèl·lules endocrines, les diverses observacions de treballs anteriors pel que fa al rol d'aquesta chaperona en altres tipus cel·lulars (Cresswell P i col., 1996). En les cèl·lules RINm5F, l'expressió d'li facilita la sortida dels dimers DR4 de l'ER i la seva arribada a la superfície cel·lular (Brachet V i col., 1997). Amb la presència d'li, l'adquisició del pèptid antigènic en l'ER queda impedita per la unió d'aquesta chaperona al solc d'unió a antigen de les DR4 que no tornarà a quedar lliure per associar pèptid fins que es produeixi la degradació d'li a la via endocítica. Al igual que les MHC II d'altres APCs mutades on la interacció de les MHC II i DM està

impedida (Riberdy JM i col., 1992), la majoria dels complexos DR4-pèptid a la superfície de les cèl·lules DR4li són inestables i es troben associats al pèptid CLIP (Serradell L i col., 1999). La dominància d'aquestes seqüències sobre la resta de lligands ha permès la seva identificació per degradació d'Edman. Aquesta dominància suggereix que en absència de DM, el reciclatge d'una part dels complexos DR4-CLIP des dels compartiments primerencs de la via endocítica es produeix amb una cinètica prou ràpida per impedir l'alliberació espontània del CLIP o l'intercanvi amb altres lligands presents en la via. D'altra banda, la detecció en el repertori d'un nombre semblant d'espècies moleculars a l'observat en absència d'ambdues chaperones (cèl·lules DR4) indica que al menys alguns complexos DR4-CLIP s'alliberen de CLIP en la via endocítica, permetent l'associació d'altres lligands. Els pocs pèptids diferents del CLIP identificats deriven de proteïnes exògenes i endògenes. Mentre la fetuïna, únic lligand exògen, es troba representat per un grup de pèptids retallats, les proteïnes endògenes de la superfície o citosòliques, es troben representades per una única seqüència. L'augment de la proporció de lligands exògens i de superfície, i la desaparició de les seqüències N- i C-terminal en comparació amb el repertori associat a DR4 en absència d'Ii i DM, recolza l'adquisició d'aquests lligands a la via endocítica. A més, el fet que les cèl·lules DR4li tinguin augmentada la densitat de Mvbs i que més d'un 15% del repertori en aquestes cèl·lules presenti una longitud superior als 30 AA, suggereix que la majoria de seqüències diferents de CLIP s'associarien a DR4 en els compartiments EE o Mvbs de les cèl·lules endocrines.

La sobreexpressió d'Ii i MHC II en determinats tumors s'ha proposat com un mecanisme per suprimir la resposta anti-tumor de l'hoste (Ishigami S i col., 2001; Pulaski BA i col., 1998) mitjançant la reducció dels antígens presentats a la superfície cel·lular, que es troben dominats pel CLIP. D'altra banda, en els ratolins KO per DM, l'expressió en timus d'una elevada proporció de MHC II associades a CLIP (Wolf PR i col., 1998) dóna lloc a un repertori de cèl·lules T reduït a perifèria que presenta un elevat potencial autorreactiu davant de cèl·lules singèniques del ratolí no mutat (Brocke P i col., 2002), suggerint que els complexos MHC II-CLIP són capaços de suportar la selecció positiva dels timòcits en maduració però no permeten la selecció negativa de les cèl·lules autorreactives.

La influència de la coexpressió de DM en absència d'Ii, s'ha estudiat en la línia endocrina que coexpressa DR4 i DM. Les cèl·lules DR4DM presenten una organització de la via endocítica semblant a l'observada en les cèl·lules DR4li i caracteritzada per l'augment en la proporció de Mvbs i la disminució de Mlbs, respecte les cèl·lules DR4. En aquestes cèl·lules, l'absència d'Ii no impedeix que part dels DR4 recent sintetitzats siguin estabilitzats en l'ER per algun pèptid o chaperona que permeti la seva arribada a la via endocítica, on DM els estabilitzarà fins a l'adquisició d'un lligand estable o fins la degradació. En la caracterització bioquímica de les DR4, realitzada prèviament al laboratori, ja s'observà que DM era capaç de catalitzar l'associació d'un percentatge important de DR4 a pèptids estables en absència d'Ii (Serradell L i col., 1999). En

aquestes cèl.lules, l'expressió de DM facilita la sortida d'una major proporció de dímers de DR4 del RE i indueix la retenció de DR4 i DM en els compartiments Mvbs i Mlbs. El repertori de pèptids associats a DR4 detectat en aquestes transfectants confirma l'efecte editor de DM (Ramachandra L i col., 1996; Kropshofer H i col., 1996), ja que amb la seva expressió es redueixen substancialment el nombre d'espècies moleculars associades a DR4 i apareixen els grups de pèptids retallats com a lligands habituals. En les cèl.lules DR4DM, els lligands identificats són iguals als detectats en les cèl.lules DR4liDM, que presenten una majoria de complexes DR4-pèptid estables i per tant, formarien part dels lligands capaços de conferir estabilitat al complex. L'anàlisi global del repertori mostra que només el 54% dels pèptids de les DR4DM respecten la longitud estàndard i per tant la resta haurien estat adquirits en condicions de menor astringència (en absència de DM) o en un compartiment no endocític, generant complexes DR4-pèptid no estables. La importància d'Ii en la correcta biosíntesi dels complexes MHC II-pèptid també es reflecteix en els ratolins KO per Ii. En aquests animals hi ha un nombre reduït de cèl.lules T i B a perifèria que expressen nivells baixos de MHC II com a conseqüència de la ineficiència del transport de les MHC II de nova síntesi. D'acord amb els resultats d'aquest treball, la capacitat de presentació d'alguns antigens decreix en les APCs d'aquests animals mentre que d'altres són presentats igual que en els animals no mutats (Bikoff EK i col., 1993; Viville S i col., 1993).

En contraposició amb els anteriors, el repertori associat a DR4 en les cèl.lules DR4liDM és més homogeni tant pel que fa a l'estabilitat com a la longitud dels lligands, ja que més del 70% respecten la longitud estàndard dels lligands per MHC II. Paral·lelament a l'augment de l'estabilitat, també s'incrementa la restricció en longitud dels pèptids associats a DR4 i la proporció de Mvbs a la via endocítica. Aquestes dades demostren que la presència de Ii facilita que una proporció més important de les DR4 i DM colocalitzi en els Mvbs, on els pèptids generats presentarien les característiques adequades per a la formació de complexes estables. El fet que la proporció de Mvbs augmenti en el citoplasma de les diferents transfectants paral·lelament a l'aparició de complexes estables a la superfície, recolza aquesta hipòtesi que assenyala als Mvbs com el compartiment "preferit" per la captació de lligands per les MHC II en les cèl.lules endocrines. Aquests compartiments ja s'han postulat com a MIIC preferents en altres línies cel.lulars com les cèl.lules B i les cèl.lules dendrítiques (Kleijmeer M i col., 2000; Lankar D i col., 2002). A més, són els únics endosomes tardans amb capacitat per fusionar-se amb la membrana cel.lular i exportar els complexes MHC II-pèptid (Raposo G i col., 1996; Kleijmeer MJ, 2001) i amb capacitat per fusionar-se amb grànuls de la via secretora (Arkema i col., 1991) permetent així que determinants de les molècules d'aquesta via siguin lligands potencials per les MHC II.

Els estudis sobre la reorganització de la via endocítica, en les cèl.lules B i en les cèl.lules dendrítiques, mostren com en estat de repòs cel.lular els Mlbs actuen com a magatzems de molècules DM i MHC II. Durant l'activació, aquests compartiments podrien

transferir el seu contingut als Mvbs de nova formació, ja que minuts després la majoria de les MHC II i DM es localitzen en compartiments Mvbs abans de ser exportats a la superfície per vesícules de transport retrògrad (Kleijmeer MJ, 2001; Lankard D i col., 2002). Dins d'aquest esquema, els compartiments MIbs actuarien com a magatzems de les molècules implicades en la presentació d'antigen per MHC II, que quan és necessari, poden ser reciclades cap als Mvbs pel carregament del pèptid. El transport retrògrad de molècules dels MIbs fins a la superfície cel.lular és molt poc probable i l'ambient altament proteolític d'aquests compartiments suggereix que és més probable la degradació, que no pas formació, de lligands per les MHC II.

La disminució de l'expressió de DM s'ha postulat com un mecanisme que afavoriria el manteniment de la resposta en artritis reumatoide afavorint la presentació d'un rang major d'autoantigens (Louis-Plence P i col., 2000). Recolzant aquesta hipòtesi, un altre treball mostra com en l'esclerosi múltiple, l'expressió de DM impedeix la presentació de d'autoepitops de la MBP a les cèl.lules T (Arndt SO i col., 2000). En tiròcits de pacients amb Graves-Basedow l'expressió de DM també s'ha demostrat inferior a la detectada en cèl.lules B però suficient per impedir la presentació a la superfície dels tiròcits de complexes DR4-CLIP (Catálfamo M i col., 1999). Per tant, seria possible que en cèl.lules endocrines la regulació dels gens de MHC II, diferent a la d'altres tipus cel.lulars, facilités la presentació d'un major rang d'autoantigens. Mitjançant assajos funcionals amb clons T aïllats d'infiltrats autoimmunitaris s'ha demostrat que el processament i la presentació de determinats lligands és dependent de llinatge cel.lular i del grau de diferenciació de cada cèl.lula (Papadopoulos KP i col., 1996; 1997; Harris PE i col., 1996; Qi L i col., 2000). A més, alguns autoantigens només són generats per les cèl.lules endocrines i no per altres APCs (Quarantino S i col., 1996). Tanmateix, fins ara no s'han fet estudis comparatius dels repertoris presentats pels diferents llinatges cel.lulars implicats en respostes autorreactives.

En la segona part d'aquest estudi s'ha comparat la línia DR4liDM, com a model de cèl.lula endocrina, amb una línia B-LCL homozigota per DR4 com a model de cèl.lula amb expressió constitutiva de MHC II. L'elecció de la B-LCL com a model es basà en l'ampli coneixement existent sobre els mecanismes de processament i presentació d'antigens en aquest tipus cel.lular.

Els repertoris peptídics associats a DR4 en la LCL i en les cèl.lules DR4liDM mostren característiques generals semblants, amb pèptids que abarquen el mateix rang de masses, on aproximadament el 70% dels lligands presenten la longitud estàndard dels lligands de les MHC II. Igualment, el 85% de les seqüències identificades en els dos repertoris deriven de proteïnes autòlogues, mentre que els lligands d'origen exògen tenen poca representació en els dos tipus cel.lulars. En ambdós casos, els lligands identificats respecten el motiu d'unió de DR4 (Chizc RM i col., 1993), resultant en complexes DR4-pèptid estables (Serradell L i col., 1999). Tot i aquestes semblances s'han detectat diferències importants en l'origen dels lligands presentats i en el nombre de seqüències

que componen els diferents grups de pèptids retallats. En les LCLs, el 77% dels epítops identificats deriven de dues famílies de molècules altament expressades en les cèl.lules B com són les MHC I i les Ig, prèviament descrites com a lligands dominants de DR4 en aquest llinatge cel.lular (Rammensee HG i col., 1995). La resta de seqüències representen proteïnes residents en altres compartiments subcel.lulars com la via endocítica o el citosol. En contraposició, el repertori de pèptids associats a DR4 en les cèl.lules RIN-DR4liDM deriva d'un ventall més ampli de proteïnes autòlogues tant de la superfície cel.lular com del citosol i de la via secretora. Tot i l'associació de l'al·lel estudiat a la DM1, el grau de desdiferenciació de la línia cel.lular endocrina i potser la natura heteròloga del sistema, ha dificultat la identificació d'epítops derivats dels autoantigens majoritaris de la diabetis, amb l'excepció de l'epítop de la CPH (Castaño L i col., 1991). D'altra banda, l'elevat nombre de lligands derivats de proteïnes de la superfície cel.lular i dels grànuls secretors, específiques de teixit, permet suggerir que en una situació d'inflamació fisiològica, les cèl.lules endocrines de les glàndules afectades presentarien majoritàriament determinants generats de les proteïnes més abundants. Tenint present que la síntesis proteica de les cèl.lules endocrines està centrada en poques proteïnes específiques (hormones i els enzims necessaris per a la síntesi d'aquestes) localitzades als grànuls de secreció regulada, és fàcil suposar que, probablement, pèptids derivats d'aquestes proteïnes predominin en els repertoris de lligands de les MHC II. Recolzant aquesta hipòtesi, el treball de Suri A i col.laboradors, en el que s'analitza un ampli repertori de pèptids naturalment associats a I-A⁹⁷, demostra que no es dona una correlació entre l'afinitat de cada pèptid per les I-A⁹⁷ i la seva abundància en el repertori, suggerint que les quantitats en que un lligand és presentat per I-A⁹⁷ estaria més condicionada als nivells d'expressió i accessibilitat d'aquestes proteïnes endògenes a la via endocítica que no per la seva afinitat (Suri A i col., 2002).

Pel que fa a les B-LCL, l'elevada proporció de lligands autòlegs associats a DR4 suggereix que les cèl.lules B en estat de repòs presents en els infiltrats autoimmunitaris estarien presentant antigens endògens mentre que només aquelles cèl.lules B específiques que haguessin internalitzat els autoantigens pancreàtics via el BCR podrien mediar-ne la presentació. S'ha demostrat que la interacció i internalització d'un determinat antigen pel BCR dirigeix els seu tràfic cap als Mvbs (Amigorena S i col., 1998) i influeix en el seu patró de degradació, afavorint la presentació de epítops diferents als generats per la internalització de l'antigen per endocitosis constitutiva (Watts C, 1997). Per tant, és probable que els lligands generats per la degradació dels antigens pancreàtics en les cèl.lules B siguin diferents dels generats per les pròpies cèl.lules endocrines, sobretot tenint en compte que el patró de proteases de cada tipus cel.lular també afecta els lligands que es poden generar (Vidard, 1991, Fineschi, 1995, Bevec, 1996).

Una segona diferència important és que el repertori eluït de la LCL està dominat per grups de lligands retallats, compostats per 2-5 seqüències que presenten un *core* comú i diferents variants de longitud en els extrems N- i C-terminals. En el repertori de les

cèl.lules DR4iDM, aquests grups estan formats per menys seqüències i amb una major variabilitat de les seqüències *core*. Per tant, mentre la variabilitat en els lligands de la LCL queda limitada als extrems flanquejants (PFR) de la regió *core*, la variabilitat en el repertori presentat per les cèl.lules endocrines es reparteix de manera igual entre els extrems flanquejants i les seqüències *core*. S'ha demostrat que la presència d'abundants seqüències amb diferents PFRs indueix un augment del reconeixement per les cèl.lules T (Carson RT i col., 1997) i que les MHC II s'agrupen en microdominis a la superfície cel.lular de les cèl.lules B, de manera que les diferents seqüències retallades derivades d'un mateix antigen s'exposen localitzades en un mateix punt de la superfície, facilitant el reconeixement i l'activació de les cèl.lules T (Kropshofer H i col., 2002). A més, els PFRs poden fer variar el tipus d'activació assolida, ja que variants en longitud d'un determinat lligand poden actuar com agonistes parcials (Vidal K i col., 1996). Així doncs, les diferències en els PFRs dels lligands generats pels dos llinatges cel.lulars estudiats també podrien influir en el repertori de cèl.lules T activat i el tipus d'activació exercida per les dues APCs. La producció d'aquests PFRs és altament dependent de les exopeptidases presents en la via endocítica (Nelson CA i col., 1996) i de l'estructura terciària de l'antigen (Landry S i col., 2000), per tant pot variar fàcilment entre els diferents estats d'activació i de diferenciació de les cèl.lules que actuen com a APCs.

Les diferències en els repertoris presentats pels dos tipus cel.lulars limiten l'opció que les cèl.lules B actuïn com les primeres APCs que activarien les cèl.lules T autorreactives i assenyalen l'opció prèviament anotada en que les cèl.lules dendrítiques i els macròfags serien les APC professionals amb capacitat de presentar per MHC II els antigens desencadenants de l'autorreactivitat (Dongre A i col., 2001). En les interpretacions d'aquesta comparació no es pot oblidar que la transformació de les cèl.lules B amb l'EBV, indueix moltes variacions en el metabolisme de les cèl.lules hoste com la sobreexpressió de les MHC (Pai S i col., 2002; Staeger MS i col., 2002), que podrien alterar el repertori de lligands presentats en comparació amb les cèl.lules B fisiològiques presents en els teixts. L'elevada quantitat de cèl.lules necessàries per als experiments d'anàlisi dels repertoris presentats per les MHC II ha dificultat l'estudi de models més fisiològics. L'únic treball sobre el repertori presentat per les cèl.lules B de la melsa d'un pacient amb artritis reumatoide indicava, tot i les limitades seqüències identificades, que els lligands més abundants en les MHC II purificades de la melsa derivaven de molècules endògenes de la membrana cel.lular i en menor proporció de proteïnes exògenes. Únicament s'identificaren dues seqüències d'origen citosòlic, i per tant, els resultats semblaven confirmar la dominància del repertori de lligands de les MHC II per epítops derivats de proteïnes de la superfície (Gordon RD i col., 1995) situació semblant a l'observada en les LCL, d'aquest i d'altres estudis.

Tot i les diferències evidents en les proteïnes origen dels lligands de DR4 de les cèl.lules endocrines DR4iDM i de les LCLs, la via endocítica d'ambdós tipus cel.lulars presentava una organització semblant, siguent més abundants els compartiments

clàssicament considerats com a MIICs. L'elevada homologia morfològica i en la cinètica d'internalització de BSA dels compartiments de les dues cèl·lules recolza una funcionalitat semblant dels MIIC Mvb i Mlb. L'elevada quantitat d'Ii nativa present a la superfície de la cèl·lula endocrina en comparació amb l'observada en la LCL, suggereix que la importància de les diferents vies d'entrada a la via endocítica descrites pels complexos DR4-Ii de nova síntesi, directament als EE o indirectament per internalització des de la superfície, difereix entre els dos tipus cel·lulars. Aquesta diferència però no impedeix que les tres molècules implicades en la presentació antigènica per MHC II: DR4, Ii i DM colocalitzin en els Mvbs, assenyalant-los com a MIIC preferents en els dos llinatges cel·lulars. A més, els Mlbs es caracteritzen per l'absència d'Ii mentre mantenen la colocalització de MHC II i DM, en les dues cèl·lules. L'abundància de lligands de DR4 citosòlics i secretats en la cèl·lula endocrina suggereix que en aquest llinatge cel·lular l'accés d'aquestes proteïnes als MIICs és més eficient que en les LCL. Si els mecanismes de translocació de proteïnes del citosol als lisosomes que es trobessin augmentats en les cèl·lules endocrines facilitarien la presentació d'aquest tipus d'epítops. D'altra banda, l'expressió diferencial de DO en les LCL (Taxman D i col., 2000, JI) i no en les APCs no professionals (Walter W i col., 2000) també influeix en la composició del repertori associat a DR4, modulant l'acció de DM (Jensen PE i col., 1998; Kropshofer H i col., 1999), afavorint la presentació dels antigens internalitzats pel BCR en front dels antigens captats per endocitosis de fluid, i promovent la presentació de complexos DR4-pèptid estables. A més la localització del complex de DM-DO (Kropshofer H i col., 1998) en la via endocítica ve determinat primerament per les senyals presents en la cadena DM β que guien el complex fins als endosomes (Copier JP i col., 1998) i en segon lloc per les senyals de la cua citoplasmàtica de DO β que afavoreix la localització del complex a la membrana perifèrica dels Mvbs (van Lith M i col., 2001) poguent condicionar els lligands acceptats.

Així doncs, mecanismes de degradació i transport intracel·lular específics de llinatge cel·lular poden ser cabdals en la formació dels repertoris que s'associïn a les molècules de MHC-II per la seva expressió en superfície. Aquestes diferències són especialment rellevants en processos que involucren interaccions entre cèl·lules epitelials i limfòcits T, com poden ser l'autoimmunitat endocrina i també la pròpia selecció positiva o negativa en el timus.

CONCLUSIONS

Objectiu 1

1. En la línia endocrina RINm5F, l'expressió d'Ii afavoreix l'arribada de DR a la superfície cel·lular
2. L'expressió de DM en absència d'Ii en la línia RINm5F, facilita la sortida de DR de l'ER i indueix una retenció de DR4 a la via endocítica

Objectiu 2

1. L'expressió de DR4 indueix una reorganització a la via endocítica de les cèl·lules RINm5F afavorint la formació de compartiments MIIC de tipus Mlb
2. La coexpressió de DR4 amb la Ii o amb DM afavoreix la formació de compartiments MIIC de tipus Mvb i Mlb, en la línia RINm5F
3. En les cèl·lules endocrines RINm5F, la expressió de DR4 conjuntament amb Ii i DM afavoreix la formació de compartiments MIIC de tipus Mvb.
4. La proporció de Mvbs augmenta en les cèl·lules endocrines que presenten complexes MHC-pèptid estables a la superfície.
5. El nombre de Mlbs augmenta en les línies endocrines que presenten complexes MHC II-pèptid inestables
6. DR4 es localitza al llarg de tota la via endocítica però s'acumula preferentment en els MIIC, en totes les cèl·lules RINm5F transfectades independentment de l'expressió d'Ii o DM.
7. En la línia RINm5F, al menys un terç de la Ii nativa arriba a la via endocítica internalitzada des de la superfície cel·lular i és degradada a nivell de Mvbs
8. Quan s'expressa per transfecció HLA-DM en les cèl·lules endocrines RINm5F, aquesta s'acumula preferentment en els compartiments MIIC, independentment de l'expressió d'Ii

Objectiu 3

1. El 85% dels pèptids identificats del repertori associat a DR4 en les cèl·lules DR4IiDM deriven de proteïnes autòlogues, tant de la superfície com citoplasmàtiques
2. Una proporció important dels lligands identificats de DR4 en la línia DR4IiDM deriven de proteïnes específiques de teixit, i en molts casos de la via secretora.
3. Els lligands de DR4, quan és expressat en absència de les chaperones de classe II, són majoritàriament autòlegs i derivats d'extrems N i C-terminals de proteïnes citoplasmàtiques.

4. Amb la coexpressió d'Ii en absència de DM, el repertori de DR4 està dominat per les seqüències de CLIP, tot i que també hi ha un ventall ampli de pèptids poc representats derivats majoritàriament de proteïnes citoplasmàtiques i exògenes.
5. En les cèl.lules endocrines, la chaperona HLA-DM restringeix el pool de lligands de DR4 pel que fa al número, a l'origen i als requisits de seqüència, independentment de l'expressió d'Ii.
6. En la línia RINm5F, l'expressió d'ambdues chaperones afavoreix un repertori de DR4 més homogeni, en seqüència i longitud dels pèptids, reflectint la major astringència de la selecció

Objectiu 4.

1. En les LCL i en les cèl.lules endocrines RINm5F que expressen DR4, Ii, i DM, la majoria dels lligands de DR4 són d'origen endogen.
2. El repertori associat a DR4 en la B-LCL està format per diversos grups de pèptids retallats derivats majoritàriament de MHC I i Ig de la superfície cel.lular.
3. El repertori de DR4 de les cèl.lules DR4IiDM presenta una major variabilitat que el de les B-LCL, pel que fa a les proteïnes origen dels lligands, i als residus usats preferentment com a ancoratges al dímer DR4.
4. En les B-LCL la variabilitat de les PFR dels lligands de DR4 és més elevada que en els de la línia DR4IiDM
5. La via endocítica presenta una organització semblant en els dos tipus cel.lulars amb una majoria de compartiments MIIC.
6. La localització i distribució de DR4 és homòloga en els dos tipus cel.lulars amb una acumulació preferent en els MIIC de tipus Mvb.
7. La línia DR4IiDM presenta una major proporció de Ii que es localitza a la superfície cel.lular que les B-LCL. A la via endocítica la Ii s'acumula bàsicament en compartiments de tipus EE i MIIC Mvb.
8. La chaperona DM es distribueix pels Mvbs i Mlbs dels dos tipus cel.lulars, però en la LCL es localitza en la membrana perifèrica dels Mvbs mentre que en la cèl.lula endocrina es localitza en les membranes internes i també en la perifèrica d'aquests endosomes.

- Abbas, A. K., S. Haber, and K. L. Rock. 1985. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. II. Specificity and properties of antigen-presenting B lymphocytes, and function of immunoglobulin receptors. *J Immunol* 135:1661.
- Acha-Orbea, H., and H. O. McDevitt. 1987. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:2435.
- Alfonso, C., M. Liljedahl, O. Winqvist, C. D. Surh, P. A. Peterson, W. P. Fung-Leung, and L. Karlsson. 1999. The role of H2-O and HLA-DO in major histocompatibility complex class II-restricted antigen processing and presentation. *Immunol Rev* 172:255.
- Allison, J. P. 1994. CD28-B7 interactions in T-cell activation. *Curr Opin Immunol* 6:414.
- Amigorena, S., J. R. Drake, P. Webster, and I. Mellman. 1994. Transient accumulation of new class II MHC molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* 369:113.
- Amigorena, S., P. Webster, J. Drake, J. Newcomb, P. Cresswell, and I. Mellman. 1995. Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J Exp Med* 181:1729.
- Amigorena, S., and C. Bonnerot. 1998. Role of B-cell and Fc receptors in the selection of T-cell epitopes. *Curr Opin Immunol* 10:88.
- Aniento, F., N. Emans, G. Griffiths, and J. Gruenberg. 1993. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol* 123:1373.
- Arkema, J. M., I. L. Schadee-Eestermans, D. M. Broekhuis-Fluitsma, and E. C. Hoefsmit. 1991. Localization of class II molecules in storage vesicles, endosomes and lysosomes in human dendritic cells. *Immunobiology* 183:396.
- Arndt, S. O., A. B. Vogt, S. Markovic-Plese, R. Martin, G. Moldenhauer, A. Wolpl, Y. Sun, D. Schadendorf, G. J. Hammerling, and H. Kropshofer. 2000. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *Embo J* 19:1241.
- Arnush, M., A. L. Scarim, M. R. Heitmeier, C. B. Kelly, and J. A. Corbett. 1998. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 160:2684.
- Askew, D., R. S. Chu, A. M. Krieg, and C. V. Harding. 2000. CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. *J Immunol* 165:6889.
- Atkinson, M. A., and N. K. Maclaren. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331:1428.
- Avva, R. R., and P. Cresswell. 1994. In vivo and in vitro formation and dissociation of HLA-DR complexes with invariant chain-derived peptides. *Immunity* 1:763.
- Badenhoop, K., G. Schwarz, P. Bingley, J. Trowsdale, K. H. Usadel, E. A. Gale, and G. F. Bottazzo. 1989. TNF-alpha gene polymorphisms: association with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J Immunogenet* 16:455.
- Badenhoop, K., G. Schwarz, J. Trowsdale, V. Lewis, K. H. Usadel, E. A. Gale, and G. F. Bottazzo. 1989. TNF-alpha gene polymorphisms in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 32:445.
- Badenhoop, K., G. Schwarz, H. Schleusener, A. P. Weetman, S. Recks, H. Peters, G. F. Bottazzo, and K. H. Usadel. 1992. Tumor necrosis factor beta gene polymorphisms in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 74:287.
- Bakke, O., and B. Dobberstein. 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63:707.
- Barnden, M. J., A. W. Purcell, J. J. Gorman, and J. McCluskey. 2000. Tapasin-mediated retention and optimization of peptide ligands during the assembly of class I molecules. *J Immunol* 165:322.
- Bevec, T., V. Stoka, G. Pungercic, I. Dolenc, and V. Turk. 1996. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J Exp Med* 183:1331.
- Bikoff, E. K., L. Y. Huang, V. Episkopou, J. van Meerwijk, R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med* 177:1699.
- Bikoff, E. K., R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* 2:301.
- Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506.

- Bohley, P., and P. O. Seglen. 1992. Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* 48:151.
- Bonnerot, C., M. S. Marks, P. Cosson, E. J. Robertson, E. K. Bikoff, R. N. Germain, and J. S. Bonifacio. 1994. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *Embo J* 13:934.
- Bottazzo, G. F., R. Pujol-Borrell, T. Hanafusa, and M. Feldmann. 1983. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 2:1115.
- Bottazzo, G. F., B. M. Dean, J. M. McNally, E. H. MacKay, P. G. Swift, and D. R. Gamble. 1985. In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med* 313:353.
- Bottazzo, G. F., I. Todd, R. Mirakian, A. Belfiore, and R. Pujol-Borrell. 1986. Organ-specific autoimmunity: a 1986 overview. *Immunol Rev* 94:137.
- Brachet, V., G. Raposo, S. Amigorena, and I. Mellman. 1997. Invariant chain controls the transport of major histocompatibility complex class II molecules to and from lysosomes. *J Cell Biol* 137:51.
- Bremnes, B., T. Madsen, M. Gedde-Dahl, and O. Bakke. 1994. An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J Cell Sci* 107:2021.
- Bretscher, P., and M. Cohn. 1970. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science* 169:1042.
- Brocke, P., N. Garbi, F. Momburg, and G. J. Hammerling. 2002. HLA-DM, HLA-DO and tapasin: functional similarities and differences. *Curr Opin Immunol* 14:22.
- Brodsky, F. M., and L. E. Guagliardi. 1991. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* 9:707.
- Brookes, S. M., E. J. Price, P. J. Venables, and R. N. Maini. 1995. Interferon-gamma and epithelial cell activation in Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 34:226.
- Brown, J. H., T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33.
- Brown, T. R., G. Zhao, K. C. Palmer, and R. S. Sundick. 1998. Thyroid injury, autoantigen availability, and the initiation of autoimmune thyroiditis. *Autoimmunity* 27:1.
- Busch, R., I. Cloutier, R. P. Sekaly, and G. J. Hammerling. 1996. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *Embo J* 15:418.
- Calafat, J., M. Nijenhuis, H. Janssen, A. Tulp, S. Dusseljee, R. Wubbolts, and J. Neeffjes. 1994. Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures. *J Cell Biol* 126:967.
- Campbell, R. D., and C. M. Milner. 1993. MHC genes in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 5:887.
- Carlsson, S. R., J. Roth, F. Piller, and M. Fukuda. 1988. Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *J Biol Chem* 263:18911.
- Carrasco-Marin, E., J. Shimizu, O. Kanagawa, and E. R. Unanue. 1996. The class II MHC I-Ag7 molecules from non-obese diabetic mice are poor peptide binders. *J Immunol* 156:450.
- Carrasco-Marin, E., O. Kanagawa, and E. R. Unanue. 1999. The lack of consensus for I-A(g7)-peptide binding motifs: is there a requirement for anchor amino acid side chains? *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8621.
- Carson, R. T., K. M. Vignali, D. L. Woodland, and D. A. Vignali. 1997. T cell receptor recognition of MHC class II-bound peptide flanking residues enhances immunogenicity and results in altered TCR V region usage. *Immunity* 7:387.
- Castano, L., E. Russo, L. Zhou, M. A. Lipes, and G. S. Eisenbarth. 1991. Identification and cloning of a granule autoantigen (carboxypeptidase-H) associated with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 73:1197.
- Castellino, F., and R. N. Germain. 1995. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 2:73.
- Castellino, F., R. Han, and R. N. Germain. 2001. The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur J Immunol* 31:841.
- Catalfamo, M., L. Serradell, C. Roura-Mir, E. Kolkowski, M. Sospedra, M. Vives-Pi, F. Vargas-Nieto, R. Pujol-Borrell, and D. Jaraquemada. 1999. HLA-DM and invariant chain are expressed by thyroid follicular cells, enabling the expression of compact DR molecules. *Int Immunol* 11:269.

- Catálfamo, M. 1997. Caracterización de la especificidad de células T autorreactivas en la enfermedad de Graves-Basedow. Papel de las células foliculares del tiroides en la presentación de autoantígeno. In *Unitat d'Immunologia*. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782.
- Challoner, P. B., K. T. Smith, J. D. Parker, D. L. MacLeod, S. N. Coulter, T. M. Rose, E. R. Schultz, J. L. Bennett, R. L. Garber, M. Chang, and et al. 1995. Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7440.
- Chan, A. C., M. Iwashima, C. W. Turck, and A. Weiss. 1992. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* 71:649.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, W. S. Lane, J. C. Gorga, L. J. Stern, D. A. Vignali, and J. L. Strominger. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 358:764.
- Chicz, R. M., R. G. Urban, J. C. Gorga, D. A. Vignali, W. S. Lane, and J. L. Strominger. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J Exp Med* 178:27.
- Cho, S. G., M. Attaya, and J. J. Monaco. 1991. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* 353:573.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156.
- Chothia, C., D. R. Boswell, and A. M. Lesk. 1988. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *Embo J* 7:3745.
- Chou, C. L., and S. Sadegh-Nasseri. 2000. HLA-DM recognizes the flexible conformation of major histocompatibility complex class II. *J Exp Med* 192:1697.
- Copier, J., M. J. Kleijmeer, S. Ponnambalam, V. Oorschot, P. Potter, J. Trowsdale, and A. Kelly. 1996. Targeting signal and subcellular compartments involved in the intracellular trafficking of HLA-DMB. *J Immunol* 157:1017.
- Cresswell, P. 1996. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 84:505.
- Cresswell, P., N. Bangia, T. Dick, and G. Diedrich. 1999. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* 172:21.
- Davies, M., and J. Day. 1994. Screening for diabetes. *Bmj* 308:1160.
- Dayan, C. M., M. Londei, A. E. Corcoran, B. Grubeck-Loebenstein, R. F. James, B. Rapoport, and M. Feldmann. 1991. Autoantigen recognition by thyroid-infiltrating T cells in Graves disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7415.
- de la Salle, H., D. Hanau, D. Fricker, A. Urlacher, A. Kelly, J. Salamero, S. H. Powis, L. Donato, H. Bausinger, M. Laforet, and et al. 1994. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 265:237.
- Demotz, S., H. M. Grey, E. Appella, and A. Sette. 1989. Characterization of a naturally processed MHC class II-restricted T-cell determinant of hen egg lysozyme. *Nature* 342:682.
- Denzer, K., M. van Eijk, M. J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot, and H. J. Geuze. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol* 165:1259.
- Denzin, L. K., N. F. Robbins, C. Carboy-Newcomb, and P. Cresswell. 1994. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1:595.
- Denzin, L. K., and P. Cresswell. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82:155.
- Denzin, L. K., C. Hammond, and P. Cresswell. 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J Exp Med* 184:2153.
- Deussing, J., W. Roth, P. Saftig, C. Peters, H. L. Ploegh, and J. A. Villadangos. 1998. Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4516.
- Dick, T. P., S. Stevanovic, W. Keilholz, T. Ruppert, U. Koszinowski, H. Schild, and H. G. Rammensee. 1998. The making of the dominant MHC class I ligand SYFPEITHI. *Eur J Immunol* 28:2478.
- Dodi, A. I., S. Brett, T. Nordeng, S. Sidhu, R. J. Batchelor, G. Lombardi, O. Bakke, and R. I. Lechler. 1994. The invariant chain inhibits presentation of endogenous antigens by a human fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 24:1632.

- Doebele, C. R., R. Busch, M. H. Scott, A. Pashine, and D. E. Mellins. 2000. Determination of the HLA-DM interaction site on HLA-DR molecules. *Immunity* 13:517.
- Dong, X., B. An, L. Salvucci Kierstead, W. J. Storkus, A. A. Amoscato, and R. D. Salter. 2000. Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *J Immunol* 164:129.
- Dongre, A. R., S. Kovats, P. deRoos, A. L. McCormack, T. Nakagawa, V. Paharkova-Vatchkova, J. Eng, H. Caldwell, J. R. Yates, 3rd, and A. Y. Rudensky. 2001. In vivo MHC class II presentation of cytosolic proteins revealed by rapid automated tandem mass spectrometry and functional analyses. *Eur J Immunol* 31:1485.
- Douek, D. C., and D. M. Altmann. 1997. HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression. *Int Immunol* 9:355.
- Driessen, C., A. M. Lennon-Dumenil, and H. L. Ploegh. 2001. Individual cathepsins degrade immune complexes internalized by antigen-presenting cells via Fc γ receptors. *Eur J Immunol* 31:1592.
- Dunham, I., C. A. Sargent, J. Trowsdale, and R. D. Campbell. 1987. Molecular mapping of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7237.
- Elliott, E. A., J. R. Drake, S. Amigorena, J. Elsemore, P. Webster, I. Mellman, and R. A. Flavell. 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* 179:681.
- Engelhard, V. H. 1994. How cells process antigens. *Sci Am* 271:54.
- Engler-Blum, G., M. Meier, J. Frank, and G. A. Muller. 1993. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than 32P-based hybridizations. *Anal Biochem* 210:235.
- Fairchild, P. J., and D. C. Wraith. 1996. Lowering the tone: mechanisms of immunodominance among epitopes with low affinity for MHC. *Immunol Today* 17:80.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290.
- Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1994. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* 39:230.
- Fernandes, D. M., L. Vidard, and K. L. Rock. 2000. Characterization of MHC class II-presented peptides generated from an antigen targeted to different endocytic compartments. *Eur J Immunol* 30:2333.
- Finegood, D. T., L. Scaglia, and S. Bonner-Weir. 1995. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44:249.
- Fineschi, B., L. S. Arneson, M. F. Naujokas, and J. Miller. 1995. Proteolysis of major histocompatibility complex class II-associated invariant chain is regulated by the alternatively spliced gene product, p41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10257.
- Fling, S. P., B. Arp, and D. Pious. 1994. HLA-DMA and -DMB genes are both required for MHC class II/peptide complex formation in antigen-presenting cells. *Nature* 368:554.
- Forgac, M. 1998. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *FEBS Lett* 440:258.
- Foulis, A. K., and M. A. Farquharson. 1986. Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin-containing beta-cells in recent-onset type I diabetes mellitus. *Diabetes* 35:1215.
- Fremont, D. H., F. Crawford, P. Marrack, W. A. Hendrickson, and J. Kappler. 1998. Crystal structure of mouse H2-M. *Immunity* 9:385.
- Friede, T., V. Gnau, G. Jung, W. Keilholz, S. Stevanovic, and H. G. Rammensee. 1996. Natural ligand motifs of closely related HLA-DR4 molecules predict features of rheumatoid arthritis associated peptides. *Biochim Biophys Acta* 1316:85.
- Garbi, N., P. Tan, A. D. Diehl, B. J. Chambers, H. G. Ljunggren, F. Momburg, and G. J. Hammerling. 2000. Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat Immunol* 1:234.
- Garboczi, D. N., P. Ghosh, U. Utz, Q. R. Fan, W. E. Biddison, and D. C. Wiley. 1996. Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384:134.
- Garcia, K. C., M. Degano, R. L. Stanfield, A. Brunmark, M. R. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton, and I. A. Wilson. 1996. An alpha beta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science* 274:209.

- Garcia, K. C., M. Degano, L. R. Pease, M. Huang, P. A. Peterson, L. Teyton, and I. A. Wilson. 1998. Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* 279:1166.
- Garin, J., R. Diez, S. Kieffer, J. F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon, R. Sadoul, C. Rondeau, and M. Desjardins. 2001. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152:165.
- Gazdar, A. F., W. L. Chick, H. K. Oie, H. L. Sims, D. L. King, G. C. Weir, and V. Lauris. 1980. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:3519.
- Gelman, M. S., E. S. Kannegaard, and R. R. Kopito. 2002. A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277:11709.
- Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76:287.
- Geuze, H. J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* 19:282.
- Ghosh, P., M. Amaya, E. Mellins, and D. C. Wiley. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378:457.
- Godkin, A., T. Friede, M. Davenport, S. Stevanovic, A. Willis, D. Jewell, A. Hill, and H. G. Rammensee. 1997. Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3.2). *Int Immunol* 9:905.
- Godkin, A. J., K. J. Smith, A. Willis, M. V. Tejada-Simon, J. Zhang, T. Elliott, and A. V. Hill. 2001. Naturally processed HLA class II peptides reveal highly conserved immunogenic flanking region sequence preferences that reflect antigen processing rather than peptide-MHC interactions. *J Immunol* 166:6720.
- Goodfellow, P. N., E. A. Jones, V. Van Heyningen, E. Solomon, M. Bobrow, V. Miggiano, and W. F. Bodmer. 1975. The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* 254:267.
- Gordon, R. D., J. A. Young, S. Rayner, R. W. Luke, M. L. Crowther, P. Wordsworth, J. Bell, G. Hassall, J. Evans, S. A. Hinchliffe, and et al. 1995. Purification and characterization of endogenous peptides extracted from HLA-DR isolated from the spleen of a patient with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 25:1473.
- Gorga, J. C., J. H. Brown, T. Jardetzky, D. C. Wiley, and J. L. Strominger. 1991. Crystallization of HLA-DR antigens. *Res Immunol* 142:401.
- Grande, A. G., 3rd, T. N. Golovina, S. E. Hamilton, V. Sriram, T. Spies, R. R. Brutkiewicz, J. T. Harty, L. C. Eisenlohr, and L. Van Kaer. 2000. Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in Tapasin mutant mice. *Immunity* 13:213.
- Gresser, O., E. Weber, A. Hellwig, S. Riese, and A. Regnier-Vigouroux. 2001. Immunocompetent astrocytes and microglia display major differences in the processing of the invariant chain and in the expression of active cathepsin L and cathepsin S. *Eur J Immunol* 31:1813.
- Griffin, J. P., R. Chu, and C. V. Harding. 1997. Early endosomes and a late endocytic compartment generate different peptide-class II MHC complexes via distinct processing mechanisms. *J Immunol* 158:1523.
- Gromme, M., F. G. Uytdehaag, H. Janssen, J. Calafat, R. S. van Binnendijk, M. J. Kenter, A. Tulp, D. Verwoerd, and J. Neefjes. 1999. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10326.
- Gruenberg, J., and K. E. Howell. 1989. Membrane traffic in endocytosis: insights from cell-free assays. *Annu Rev Cell Biol* 5:453.
- Guerra, C. B., R. Busch, R. C. Doebele, W. Liu, T. Sawada, W. W. Kwok, M. D. Chang, and E. D. Mellins. 1998. Novel glycosylation of HLA-DRalpha disrupts antigen presentation without altering endosomal localization. *J Immunol* 160:4289.
- Hammer, J., P. Valsasini, K. Tolba, D. Bolin, J. Higelin, B. Takacs, and F. Sinigaglia. 1993. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. *Cell* 74:197.
- Hammer, J., E. Bono, F. Gallazzi, C. Belunis, Z. Nagy, and F. Sinigaglia. 1994. Precise prediction of major histocompatibility complex class II-peptide interaction based on peptide side chain scanning. *J Exp Med* 180:2353.
- Hammer, J., F. Gallazzi, E. Bono, R. W. Karr, J. Guenot, P. Valsasini, Z. A. Nagy, and F. Sinigaglia. 1995. Peptide binding specificity of HLA-DR4 molecules: correlation with rheumatoid arthritis association. *J Exp Med* 181:1847.
- Hammond, C., L. K. Denzin, M. Pan, J. M. Griffith, H. J. Geuze, and P. Cresswell. 1998. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol* 161:3282.

- Hanafusa, T., R. Pujol-Borrell, L. Chiovato, R. C. Russell, D. Doniach, and G. F. Bottazzo. 1983. Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity. *Lancet* 2:1111.
- Hanafusa, T., H. Fujino-Kurihara, A. Miyazaki, K. Yamada, H. Nakajima, J. Miyagawa, N. Kono, and S. Tarui. 1987. Expression of class II major histocompatibility complex antigens on pancreatic B cells in the NOD mouse. *Diabetologia* 30:104.
- Hanninen, A., S. Jalkanen, M. Salmi, S. Toikkanen, G. Nikolakaros, and O. Simell. 1992. Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 90:1901.
- Harding, C. V., J. France, R. Song, J. M. Farah, S. Chatterjee, M. Iqbal, and R. Siman. 1995. Novel dipeptide aldehydes are proteasome inhibitors and block the MHC-I antigen-processing pathway. *J Immunol* 155:1767.
- Harding, C. V. 1995. Intracellular organelles involved in antigen processing and the binding of peptides to class II MHC molecules. *Semin Immunol* 7:355
- Harris, P. E., A. Maffei, A. I. Colovai, J. Kinne, S. Tugulea, and N. Suciuc-Foca. 1996. Predominant HLA-class II bound self-peptides of a hematopoietic progenitor cell line are derived from intracellular proteins. *Blood* 87:5104.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19:47.
- Herrera, P. L., D. M. Harlan, and P. Vassalli. 2000. A mouse CD8 T cell-mediated acute autoimmune diabetes independent of the perforin and Fas cytotoxic pathways: possible role of membrane TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:279.
- Hill, C. M., A. Liu, K. W. Marshall, J. Mayer, B. Jorgensen, B. Yuan, R. M. Cubbon, E. A. Nichols, L. S. Wicker, and J. B. Rothbard. 1994. Exploration of requirements for peptide binding to HLA DRB1*0101 and DRB1*0401. *J Immunol* 152:2890.
- Honey, K., M. Duff, C. Beers, W. H. Brissette, E. A. Elliott, C. Peters, M. Maric, P. Cresswell, and A. Rudensky. 2001. Cathepsin S regulates the expression of cathepsin L and the turnover of gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase in B lymphocytes. *J Biol Chem* 276:22573.
- Humphrey, M., J. Mosca, J. R. Baker, Jr., J. J. Drabick, F. E. Carr, D. S. Burke, L. Wartofsky, Y. Y. Djuh, and K. D. Burman. 1991. Absence of retroviral sequences in Graves' disease. *Lancet* 337:17.
- Hunt, D. F., R. A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A. L. Cox, E. Appella, and V. H. Engelhard. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255:1261.
- Ishigami, S., S. Natsugoe, K. Tokuda, A. Nakajo, H. Iwashige, K. Aridome, S. Hokita, and T. Aikou. 2001. Invariant chain expression in gastric cancer. *Cancer Lett* 168:87.
- Jacobson, S., R. P. Sekaly, C. L. Jacobson, H. F. McFarland, and E. O. Long. 1989. HLA class II-restricted presentation of cytoplasmic measles virus antigens to cytotoxic T cells. *J Virol* 63:1756.
- Jager, W., K. Eibner, B. Loffler, S. Gleixner, and S. Kramer. 2000. Serial CEA and CA 15-3 measurements during follow-up of breast cancer patients. *Anticancer Res* 20:5179.
- Jager, E., D. Jager, J. Karbach, Y. T. Chen, G. Ritter, Y. Nagata, S. Grnjatic, E. Stockert, M. Arand, L. J. Old, and A. Knuth. 2000. Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma. *J Exp Med* 191:625.
- Janeway, C. A., Jr., and K. Bottomly. 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 76:275.
- Jaraquemada, D., M. Marti, and E. O. Long. 1990. An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* 172:947.
- Jardetzky, T. S., W. S. Lane, R. A. Robinson, D. R. Madden, and D. C. Wiley. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353:326.
- Jardetzky, T. S., J. H. Brown, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1996. Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:734.
- Jasanoff, A., S. Song, A. R. Dinner, G. Wagner, and D. C. Wiley. 1999. One of two unstructured domains of Ii becomes ordered in complexes with MHC class II molecules. *Immunity* 10:761.
- Jayawardena-Wolf, J., K. Benlagha, Y. H. Chiu, R. Mehr, and A. Bendelac. 2001. CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain. *Immunity* 15:897.

- Jensen, P. E. 1990. Regulation of antigen presentation by acidic pH. *J Exp Med* 171:1779.
- Jensen, P. E. 1993. Acidification and disulfide reduction can be sufficient to allow intact proteins to bind class II MHC. *J Immunol* 150:3347.
- Jensen, P. E., D. A. Weber, W. P. Thayer, L. E. Westerman, and C. T. Dao. 1999. Peptide exchange in MHC molecules. *Immunol Rev* 172:229.
- Jin, Y., W. K. Shih, and I. Berkower. 1988. Human T cell response to the surface antigen of hepatitis B virus (HBsAg). Endosomal and nonendosomal processing pathways are accessible to both endogenous and exogenous antigen. *J Exp Med* 168:293.
- Kabel, P. J., H. A. Voorbij, M. De Haan, R. D. van der Gaag, and H. A. Drexhage. 1988. Intrathyroidal dendritic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 66:199.
- Kang, S. J., and P. Cresswell. 2002. Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules. *Embo J* 21:1650.
- Karlsson, L., C. D. Surh, J. Sprent, and P. A. Peterson. 1991. A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* 351:485.
- Kaufman, D. L., M. Clare-Salzler, J. Tian, T. Forsthuber, G. S. Ting, P. Robinson, M. A. Atkinson, E. E. Sercarz, A. J. Tobin, and P. V. Lehmann. 1993. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366:69.
- Kelly, A. P., J. J. Monaco, S. G. Cho, and J. Trowsdale. 1991. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 353:571.
- Kenty, G., W. D. Martin, L. Van Kaer, and E. K. Bikoff. 1998. MHC class II expression in double mutant mice lacking invariant chain and DM functions. *J Immunol* 160:606.
- Kleijmeer, M. J., S. Morkowski, J. M. Griffith, A. Y. Rudensky, and H. J. Geuze. 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol* 139:639.
- Kleijmeer, M., G. Ramm, D. Schuurhuis, J. Griffith, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, A. Y. Rudensky, F. Ossendorp, C. J. Melief, W. Stoorvogel, and H. J. Geuze. 2001. Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II antigen presentation by dendritic cells. *J Cell Biol* 155:53.
- Knight, S. C., and A. J. Stagg. 1993. Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol* 5:374.
- Koch, N., G. Moldenhauer, W. J. Hofmann, and P. Moller. 1991. Rapid intracellular pathway gives rise to cell surface expression of the MHC class II-associated invariant chain (CD74). *J Immunol* 147:2643.
- Kopito, R. R. 1997. ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88:427.
- Kovats, S., C. E. Grubin, S. Eastman, P. deRoos, A. Dongre, L. Van Kaer, and A. Y. Rudensky. 1998. Invariant chain-independent function of H-2M in the formation of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes in vivo. *J Exp Med* 187:245.
- Kroncke, K. D., V. Kolb-Bachofen, B. Berschick, V. Burkart, and H. Kolb. 1991. Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem Biophys Res Commun* 175:752.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, L. J. Stern, and G. J. Hammerling. 1995. Self-release of CLIP in peptide loading of HLA-DR molecules. *Science* 270:1357.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, and G. J. Hammerling. 1995. Structural features of the invariant chain fragment CLIP controlling rapid release from HLA-DR molecules and inhibition of peptide binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8313.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, G. Moldenhauer, J. Hammer, J. S. Blum, and G. J. Hammerling. 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *Embo J* 15:6144.
- Kropshofer, H., S. O. Arndt, G. Moldenhauer, G. J. Hammerling, and A. B. Vogt. 1997. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity* 6:293.
- Kropshofer, H., A. B. Vogt, C. Thery, E. A. Armandola, B. C. Li, G. Moldenhauer, S. Amigorena, and G. J. Hammerling. 1998. A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules. *Embo J* 17:2971.
- Kropshofer, H., G. J. Hammerling, and A. B. Vogt. 1999. The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules. *Immunol Rev* 172:267.

- Kropshofer, H., S. Spindeldreher, T. A. Rohn, N. Platania, C. Grygar, N. Daniel, A. Wolpl, H. Langen, V. Horejsi, and A. B. Vogt. 2002. Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide- MHC class II complexes. *Nat Immunol* 3:61.
- Lacour, M., U. Rudolphi, M. Schlesier, and H. H. Peter. 1990. Type II collagen-specific human T cell lines established from healthy donors. *Eur J Immunol* 20:931.
- Lafferty, K. J., and A. J. Cunningham. 1975. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* 53:27.
- Lampson, L. A., and R. Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J Immunol* 125:293.
- Landry, S. J. 2000. Helper T-cell epitope immunodominance associated with structurally stable segments of hen egg lysozyme and HIV gp120. *J Theor Biol* 203:189.
- Lankar, D., H. Vincent-Schneider, V. Briken, T. Yokozeki, G. Raposo, and C. Bonnerot. 2002. Dynamics of major histocompatibility complex class II compartments during B cell receptor-mediated cell activation. *J Exp Med* 195:461.
- Lanzavecchia, A. 1985. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature* 314:537.
- Larsen, S. L., L. O. Pedersen, S. Buus, and A. Stryhn. 1996. T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *J Exp Med* 184:183.
- Laurence, L. 1999. In *Unitat d'Immunologia*. Barcelona, Bellaterra.
- Lehner, P. J., M. J. Surman, and P. Cresswell. 1998. Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* 8:221.
- Lich, J. D., J. F. Elliott, and J. S. Blum. 2000. Cytoplasmic processing is a prerequisite for presentation of an endogenous antigen by major histocompatibility complex class II proteins. *J Exp Med* 191:1513.
- Lightstone, L., R. Hargreaves, G. Bobek, M. Peterson, G. Aichinger, G. Lombardi, and R. Lechler. 1997. In the absence of the invariant chain, HLA-DR molecules display a distinct array of peptides which is influenced by the presence or absence of HLA-DM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5772.
- Liljedahl, M., T. Kuwana, W. P. Fung-Leung, M. R. Jackson, P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1996. HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EmboJ* 15:4817.
- Liljedahl, M., O. Winqvist, C. D. Surh, P. Wong, K. Ngo, L. Teyton, P. A. Peterson, A. Brunmark, A. Y. Rudensky, W. P. Fung-Leung, and L. Karlsson. 1998. Altered antigen presentation in mice lacking H2-O. *Immunity* 8:233.
- Liu, S. H., M. S. Marks, and F. M. Brodsky. 1998. A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. *J Cell Biol* 140:1023.
- Lombardi, G., K. Arnold, J. Uren, F. Marelli-Berg, R. Hargreaves, N. Imami, A. Weetman, and R. Lechler. 1997. Antigen presentation by interferon-gamma-treated thyroid follicular cells inhibits interleukin-2 (IL-2) and supports IL-4 production by B7-dependent human T cells. *Eur J Immunol* 27:62.
- Londei, M., G. F. Bottazzo, and M. Feldmann. 1985. Human T-cell clones from autoimmune thyroid glands: specific recognition of autologous thyroid cells. *Science* 228:85.
- Londei, M., C. M. Savill, A. Verhoef, F. Brennan, Z. A. Leech, V. Duance, R. N. Maini, and M. Feldmann. 1989. Persistence of collagen type II-specific T-cell clones in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:636.
- Lotteau, V., L. Teyton, A. Peleraux, T. Nilsson, L. Karlsson, S. L. Schmid, V. Quaranta, and P. A. Peterson. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348:600.
- Lund, T., L. O'Reilly, P. Hutchings, O. Kanagawa, E. Simpson, R. Gravely, P. Chandler, J. Dyson, J. K. Picard, A. Edwards, and et al. 1990. Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transgenes encoding modified I-A beta-chain or normal I-E alpha- chain. *Nature* 345:727.
- Lybarger, L., Y. Y. Yu, T. Chun, C. R. Wang, A. G. Grandea, 3rd, L. Van Kaer, and T. H. Hansen. 2001. Tapasin enhances peptide-induced expression of H2-M3 molecules, but is not required for the retention of open conformers. *J Immunol* 167:2097.
- M. Costa, A. S., R. Casamitjana, MF Castañer, A. Sanmartí, F Graus, D. Jaraquemada. 2002. T cell reactivity to GAD in Stiff-Man Syndrome and Cerebellar Ataxia associated with polyendocrine Autoimmunity. *Clin Exp Immunol*.
- Mach, B., V. Steimle, E. Martinez-Soria, and W. Reith. 1996. Regulation of MHC class II genes: lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* 14:301.

- Madden, D. R., J. C. Gorga, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70:1035.
- Malnati, M. S., M. Marti, T. LaVaute, D. Jaraquemada, W. Biddison, R. DeMars, and E. O. Long. 1992. Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 357:702.
- Marazuela, M., M. O. De Landazuri, E. Larranaga, and F. Sanchez-Madrid. 1997. Up-regulated beta1-integrin expression in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol* 109:107.
- Marelli-Berg, F. M., A. Weetman, L. Frasca, S. J. Deacock, N. Imami, G. Lombardi, and R. I. Lechler. 1997. Antigen presentation by epithelial cells induces anergic immunoregulatory CD45RO+ T cells and deletion of CD45RA+ T cells. *J Immunol* 159:5853.
- Markmann, J., D. Lo, A. Naji, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, and E. Heber-Katz. 1988. Antigen presenting function of class II MHC expressing pancreatic beta cells. *Nature* 336:476.
- Marks, M. S., P. A. Roche, E. van Donselaar, L. Woodruff, P. J. Peters, and J. S. Bonifacio. 1995. A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol* 131:351.
- Martin, R., D. Jaraquemada, M. Flerlage, J. Richert, J. Whitaker, E. O. Long, D. E. McFarlin, and H. F. McFarland. 1990. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 145:540.
- Mason, M. D., and M. F. Pera. 1992. Immunohistochemical and biochemical characterisation of the expression of a human embryonal carcinoma cell proteoglycan antigen in human germ cell tumours and other tissues. *Eur J Cancer*:1090.
- Mason, D. 1992. Autoimmunity. *Sci Prog* 76:125.
- Matsumura, M., D. H. Fremont, P. A. Peterson, and I. A. Wilson. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science* 257:927.
- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991.
- McFarland, B. J., C. Beeson, and A. J. Sant. 1999. Cutting edge: a single, essential hydrogen bond controls the stability of peptide-MHC class II complexes. *J Immunol* 163:3567.
- Mellins, E., L. Smith, B. Arp, T. Cotner, E. Celis, and D. Pious. 1990. Defective processing and presentation of exogenous antigens in mutants with normal HLA class II genes. *Nature* 343:71.
- Mellman, I. 1996. Membranes and sorting. *Curr Opin Cell Biol* 8:497.
- Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:575.
- Miyazaki, T., M. Uno, M. Uehira, H. Kikutani, T. Kishimoto, M. Kimoto, H. Nishimoto, J. Miyazaki, and K. Yamamura. 1990. Direct evidence for the contribution of the unique I-ANOD to the development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 345:722.
- Morel, P. A., J. S. Dorman, J. A. Todd, H. O. McDevitt, and M. Trucco. 1988. Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: a family study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8111.
- Morris, P., J. Shaman, M. Attaya, M. Amaya, S. Goodman, C. Bergman, J. J. Monaco, and E. Mellins. 1994. An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature* 368:551.
- Moses, H., R. B. Panek, E. N. Benveniste, and J. P. Ting. 1992. Usage of primary cells to delineate IFN-gamma-responsive DNA elements in the HLA-DRA promoter and to identify a novel IFN-gamma-enhanced nuclear factor. *J Immunol* 148:3643.
- Mosyak, L., D. M. Zaller, and D. C. Wiley. 1998. The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9:377.
- Mouritsen, S., A. S. Hansen, B. L. Petersen, and S. Buus. 1992. pH dependence of the interaction between immunogenic peptides and MHC class II molecules. Evidence for an acidic intracellular compartment being the organelle of interaction. *J Immunol* 148:1438.
- Mouritsen, S., M. Meldal, O. Werdelin, A. S. Hansen, and S. Buus. 1992. MHC molecules protect T cell epitopes against proteolytic destruction. *J Immunol* 149:1987.
- Mueller, C., W. Held, M. A. Imboden, and C. Carnaud. 1995. Accelerated beta-cell destruction in adoptively transferred autoimmune diabetes correlates with an increased expression of the genes coding for TNF-alpha and granzyme A in the intra-islet infiltrates. *Diabetes* 44:112.
- Nakagawa, T., W. Roth, P. Wong, A. Nelson, A. Farr, J. Deussing, J. A. Villadangos, H. Ploegh, C. Peters, and A. Y. Rudensky. 1998. Cathepsin L: critical role in li degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280:450.

- Nakagawa, T. Y., W. H. Brissette, P. D. Lira, R. J. Griffiths, N. Petrushova, J. Stock, J. D. McNeish, S. E. Eastman, E. D. Howard, S. R. Clarke, E. F. Rosloniec, E. A. Elliott, and A. Y. Rudensky. 1999. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 10:207.
- Neefjes, J. J., V. Stollorz, P. J. Peters, H. J. Geuze, and H. L. Ploegh. 1990. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* 61:171.
- Neefjes, J. 1999. CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading. *Eur J Immunol* 29:1421.
- Neisig, A., R. Wubbolts, X. Zang, C. Melief, and J. Neefjes. 1996. Allele-specific differences in the interaction of MHC class I molecules with transporters associated with antigen processing. *J Immunol* 156:3196.
- Nepom, G. T. 1990. Molecular biology of immune diseases and the immune response. *Immunol Today* 11:150.
- Nepom, G. T. 1990. Mutagenesis and expression of putative class II susceptibility genes: a "reverse immunogenetics" approach to analysis of HLA and disease. *Autoimmunity* 7:189.
- Nepom, G. T., and W. W. Kwok. 1998. Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes* 47:1177.
- Neumann, J., N. Schach, and N. Koch. 2001. Glycosylation signals that separate the trimerization from the mhc class II-binding domain control intracellular degradation of invariant chain. *J Biol Chem* 276:13469.
- Nuchtern, J. G., W. E. Biddison, and R. D. Klausner. 1990. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 343:74.
- Ortmann, B., J. Copeman, P. J. Lehner, B. Sadasivan, J. A. Herberg, A. G. Grandea, S. R. Riddell, R. Tampe, T. Spies, J. Trowsdale, and P. Cresswell. 1997. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277:1306.
- Oxenius, A., M. F. Bachmann, P. G. Ashton-Rickardt, S. Tonegawa, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1995. Presentation of endogenous viral proteins in association with major histocompatibility complex class II: on the role of intracellular compartmentalization, invariant chain and the TAP transporter system. *Eur J Immunol* 25:3402.
- Oxenius, A., M. F. Bachmann, D. Mathis, C. Benoist, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1997. Functional in vivo MHC class II loading by endogenously synthesized glycoprotein during viral infection. *J Immunol* 158:5717.
- Pai, S., B. J. O'Sullivan, L. Cooper, R. Thomas, and R. Khanna. 2002. RelB nuclear translocation mediated by C-terminal activator regions of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 and its effect on antigen-presenting function in B cells. *J Virol* 76:1914.
- Papadopoulos, K. P., A. I. Colovai, A. Maffei, D. Jaraquemada, N. Suci-Foca, and P. E. Harris. 1996. Tissue-specific self-peptides bound by major histocompatibility complex class I molecules of a human pancreatic beta-cell line. *Diabetes* 45:1761.
- Papadopoulos, K. P., N. Suci-Foca, C. S. Hesdorffer, S. Tugulea, A. Maffei, and P. E. Harris. 1997. Naturally processed tissue- and differentiation stage-specific autologous peptides bound by HLA class I and II molecules of chronic myeloid leukemia blasts. *Blood* 90:4938.
- Parra-Lopez, C. A., R. Lindner, I. Vidavsky, M. Gross, and E. R. Unanue. 1997. Presentation on class II MHC molecules of endogenous lysozyme targeted to the endocytic pathway. *J Immunol* 158:2670.
- Patel, S. D., A. P. Cope, M. Congia, T. T. Chen, E. Kim, L. Fugger, D. Wherrett, and G. Sonderstrup-McDevitt. 1997. Identification of immunodominant T cell epitopes of human glutamic acid decarboxylase 65 by using HLA-DR(alpha1*0101,beta1*0401) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8082.
- Pathak, S. S., J. D. Lich, and J. S. Blum. 2001. Cutting edge: editing of recycling class II:peptide complexes by hla-dm. *J Immunol* 167:632.
- Peakman, M., E. J. Stevens, T. Lohmann, P. Narendran, J. Dromei, A. Alexander, A. J. Tomlinson, M. Trucco, J. C. Gorga, and R. M. Chicz. 1999. Naturally processed and presented epitopes of the islet cell autoantigen IA-2 eluted from HLA-DR4. *J Clin Invest* 104:1449.
- Perron, H., J. A. Garson, F. Bedin, F. Beseme, G. Paranhos-Baccala, F. Komurian-Pradel, F. Mallet, P. W. Tuke, C. Voisset, J. L. Blond, B. Lalande, J. M. Seigneurin, and B. Mandrand. 1997. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7583.
- Peters, P. J., J. J. Neefjes, V. Oorschot, H. L. Ploegh, and H. J. Geuze. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349:669.
- Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R. M. Steinman, and I. Mellman. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388:787.

- Pierre, P., and I. Mellman. 1998. Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93:1135.
- Pierre, P., I. Shachar, D. Matza, E. Gatti, R. A. Flavell, and I. Mellman. 2000. Invariant chain controls H2-M proteolysis in mouse splenocytes and dendritic cells. *J Exp Med* 191:1057.
- Pieters, J., H. Horstmann, O. Bakke, G. Griffiths, and J. Lipp. 1991. Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J Cell Biol* 115:1213.
- Pinet, V., M. Vergelli, R. Martin, O. Bakke, and E. O. Long. 1995. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* 375:603.
- Pinet, V. M., and E. O. Long. 1998. Peptide loading onto recycling HLA-DR molecules occurs in early endosomes. *Eur J Immunol* 28:799.
- Pipeleers, D., and M. Van de Winkel. 1986. Pancreatic B cells possess defense mechanisms against cell-specific toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5267.
- Pugliese, A., M. Zeller, A. Fernandez, Jr., L. J. Zalcberg, R. J. Bartlett, C. Ricordi, M. Pietropaolo, G. S. Eisenbarth, S. T. Bennett, and D. D. Patel. 1997. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* 15:293.
- Pujol-Borrell, R., T. Hanafusa, L. Chiovato, and G. F. Bottazzo. 1983. Lectin-induced expression of DR antigen on human cultured follicular thyroid cells. *Nature* 304:71.
- Pulaski, B. A., and S. Ostrand-Rosenberg. 1998. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Res* 58:1486.
- Punt, J. A., J. L. Roberts, K. P. Kearse, and A. Singer. 1994. Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR alpha, one TCR beta, and two CD3 epsilon chains. *J Exp Med* 180:587.
- Purcell, A. W., J. J. Gorman, M. Garcia-Peydro, A. Paradelo, S. R. Burrows, G. H. Talbo, N. Laham, C. A. Peh, E. C. Reynolds, J. A. Lopez De Castro, and J. McCluskey. 2001. Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J Immunol* 166:1016.
- Qi, L., J. M. Rojas, and S. Ostrand-Rosenberg. 2000. Tumor cells present MHC class II-restricted nuclear and mitochondrial antigens and are the predominant antigen presenting cells in vivo. *J Immunol* 165:5451.
- Quaranta, V., O. Majdic, G. Stingl, K. Liszka, H. Honigsman, and W. Knapp. 1984. A human Ia cytoplasmic determinant located on multiple forms of invariant chain (gamma, gamma 2, gamma 3). *J Immunol* 132:1900.
- Quarantino, S., M. Feldmann, C. M. Dayan, O. Acuto, and M. Londei. 1996. Human self-reactive T cell clones expressing identical T cell receptor beta chains differ in their ability to recognize a cryptic self-epitope. *J Exp Med* 183:349.
- Rabinowitz, J. D., M. Vrljic, P. M. Kasson, M. N. Liang, R. Busch, J. J. Boniface, M. M. Davis, and H. M. McConnell. 1998. Formation of a highly peptide-receptive state of class II MHC. *Immunity* 9:699.
- Radrizzani, L., E. Bono, A. B. Vogt, H. Kropshofer, F. Gallazzi, T. Sturniolo, G. J. Hammerling, F. Sinigaglia, and J. Hammer. 1999. Identification of destabilizing residues in HLA class II-selected bacteriophage display libraries edited by HLA-DM. *Eur J Immunol* 29:660.
- Ramachandra, L., S. Kovats, S. Eastman, and A. Y. Rudensky. 1996. Variation in HLA-DM expression influences conversion of MHC class II alpha beta: class II-associated invariant chain peptide complexes to mature peptide-bound class II alpha beta dimers in a normal B cell line. *J Immunol* 156:2196.
- Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanovic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178.
- Raposo, G., H. M. van Santen, R. Leijendekker, H. J. Geuze, and H. L. Ploegh. 1995. Misfolded major histocompatibility complex class I molecules accumulate in an expanded ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Biol* 131:1403.
- Raposo, G., H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Leijendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183:1161.
- Raposo, G., D. Tenza, S. Mecheri, R. Peronet, C. Bonnerot, and C. Desaymard. 1997. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 8:2631.
- Ratanachaiyavong, S., L. Lloyd, C. Darke, and A. M. McGregor. 1993. MHC-extended haplotypes in families of patients with Graves' disease. *Hum Immunol* 36:99.

- Reich, Z., J. D. Altman, J. J. Boniface, D. S. Lyons, H. Kozono, G. Ogg, C. Morgan, and M. M. Davis. 1997. Stability of empty and peptide-loaded class II major histocompatibility complex molecules at neutral and endosomal pH: comparison to class I proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2495.
- Reits, E. A., J. C. Vos, M. Gromme, and J. Neefjes. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404:774.
- Riberdy, J. M., J. R. Newcomb, M. J. Surman, J. A. Barbosa, and P. Cresswell. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360:474.
- Ridgway, W. M., H. Ito, M. Fasso, C. Yu, and C. G. Fathman. 1998. Analysis of the role of variation of major histocompatibility complex class II expression on nonobese diabetic (NOD) peripheral T cell response. *J Exp Med* 188:2267.
- Riese, R. J., P. R. Wolf, D. Bromme, L. R. Natkin, J. A. Villadangos, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1996. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4:357.
- Rigaud, G., A. De Lerma Barbaro, M. Nicolis, T. Cestari, D. Ramarli, A. P. Riviera, and R. S. Accolla. 1996. Induction of CIITA and modification of in vivo HLA-DR promoter occupancy in normal thymic epithelial cells treated with IFN-gamma: similarities and distinctions with respect to HLA-DR-constitutive B cells. *J Immunol* 156:4254.
- Roche, P. A., and P. Cresswell. 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 345:615.
- Roche, P. A., M. S. Marks, and P. Cresswell. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354:392.
- Roche, P. A., C. L. Teletski, E. Stang, O. Bakke, and E. O. Long. 1993. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8581.
- Rodriguez, G. M., and S. Diment. 1995. Destructive proteolysis by cysteine proteases in antigen presentation of ovalbumin. *Eur J Immunol* 25:1823.
- Roep, B. O., S. D. Arden, R. R. de Vries, and J. C. Hutton. 1990. T-cell clones from a type-1 diabetes patient respond to insulin secretory granule proteins. *Nature* 345:632.
- Roura-Mir, C. 2000. Caracterització fenotípica i funcional de les diferents subpoblacions de cèl·lules T autoreactives a les malalties autoimmunitàries de la tiroides. In *Unitat d'Immunologia*. Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.
- Rubinstein, E., F. Le Naour, C. Lagaudriere-Gesbert, M. Billard, H. Conjeaud, and C. Boucheix. 1996. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol* 26:2657.
- Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, S. C. Hong, A. Barlow, and C. A. Janeway, Jr. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353:622.
- Runnels, H. A., J. C. Moore, and P. E. Jensen. 1996. A structural transition in class II major histocompatibility complex proteins at mildly acidic pH. *J Exp Med* 183:127.
- Sanderson, F., M. J. Kleijmeer, A. Kelly, D. Verwoerd, A. Tulp, J. J. Neefjes, H. J. Geuze, and J. Trowsdale. 1994. Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* 266:1566.
- Sanderson, F., C. Thomas, J. Neefjes, and J. Trowsdale. 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity* 4:87.
- Sant, A. J., L. R. Hendrix, J. E. Coligan, W. L. Maloy, and R. N. Germain. 1991. Defective intracellular transport as a common mechanism limiting expression of inappropriately paired class II major histocompatibility complex alpha/beta chains. *J Exp Med* 174:799.
- Santambrogio, L., A. K. Sato, G. J. Carven, S. L. Belyanskaya, J. L. Strominger, and L. J. Stern. 1999. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15056.
- Saudrais, C., D. Spehner, H. de la Salle, A. Bohbot, J. P. Cazenave, B. Goud, D. Hanau, and J. Salamero. 1998. Intracellular pathway for the generation of functional MHC class II peptide complexes in immature human dendritic cells. *J Immunol* 160:2597.
- Schaiff, W. T., K. A. Hruska, Jr., D. W. McCourt, M. Green, and B. D. Schwartz. 1992. HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J Exp Med* 176:657.

- Schubert, U., L. C. Anton, J. Gibbs, C. C. Norbury, J. W. Yewdell, and J. R. Bennink. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770.
- Schwartz, R. H. 1996. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J Exp Med* 184:1.
- Serradell, L., A. Muntasell, M. Catalfamo, M. Marti, M. Costa, C. de Preval, and D. Jaraquemada. 1999. HLA-DM can partially replace the invariant chain for HLA-DR transport and surface expression in transfected endocrine epithelial cells. *Tissue Antigens* 53:447.
- Sette, A., S. Southwood, D. O'Sullivan, F. C. Gaeta, J. Sidney, and H. M. Grey. 1992. Effect of pH on MHC class II-peptide interactions. *J Immunol* 148:844.
- Sette, A., and H. M. Grey. 1992. Chemistry of peptide interactions with MHC proteins. *Curr Opin Immunol* 4:79.
- Sette, A., S. Ceman, R. T. Kubo, K. Sakaguchi, E. Appella, D. F. Hunt, T. A. Davis, H. Michel, J. Shabanowitz, R. Rudersdorf, and et al. 1992. Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen- processing mutant. *Science* 258:1801.
- Sette, A., J. Sidney, C. Oseroff, M. F. del Guercio, S. Southwood, T. Arrhenius, M. F. Powell, S. M. Colon, F. C. Gaeta, and H. M. Grey. 1993. HLA DR4w4-binding motifs illustrate the biochemical basis of degeneracy and specificity in peptide-DR interactions. *J Immunol* 151:3163.
- Shackelford, D. A., L. A. Lampson, and J. L. Strominger. 1981. Analysis of HLA-DR antigens by using monoclonal antibodies: recognition of conformational differences in biosynthetic intermediates. *J Immunol* 127:1403.
- Sherman, M. A., D. A. Weber, and P. E. Jensen. 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* 3:197.
- Shi, G. P., J. A. Villadangos, G. Dranoff, C. Small, L. Gu, K. J. Haley, R. Riese, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 1999. Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10:197.
- Shi, G. P., R. A. Bryant, R. Riese, S. Verhelst, C. Driessen, Z. Li, D. Bromme, H. L. Ploegh, and H. A. Chapman. 2000. Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med* 191:1177.
- Shimizu, J., E. Carrasco-Marin, O. Kanagawa, and E. R. Unanue. 1995. Relationship between beta cell injury and antigen presentation in NOD mice. *J Immunol* 155:4095.
- Siemasko, K., and M. R. Clark. 2001. The control and facilitation of MHC class II antigen processing by the BCR. *Curr Opin Immunol* 13:32.
- Simons, P. J., F. G. Delemarre, and H. A. Drexhage. 2000. A functional and phenotypic study on immune accessory cells isolated from the thyroids of Wistar and autoimmune-prone BB-DP rats. *J Autoimmun* 15:417.
- Sloan, V. S., P. Cameron, G. Porter, M. Gammon, M. Amaya, E. Mellins, and D. M. Zaller. 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375:802.
- Somoza, N., F. Vargas, C. Roura-Mir, M. Vives-Pi, M. T. Fernandez-Figueras, A. Ariza, R. Gomis, R. Bragado, M. Marti, D. Jaraquemada, and et al. 1994. Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *J Immunol* 153:1360.
- Song, W., N. M. Wagle, T. Banh, C. C. Whiteford, E. Ulug, and S. K. Pierce. 1997. Wortmannin, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, blocks the assembly of peptide-MHC class II complexes. *Int Immunol* 9:1709.
- Sospedra, M., E. Tolosa, P. Armengol, Y. Ashhab, S. Urlinger, A. Lucas-Martin, M. Foz-Sala, D. Jaraquemada, and R. Pujol-Borrell. 1997. Hyperexpression of transporter in antigen processing-1 (TAP-1) in thyroid glands affected by autoimmunity: a contributing factor to the breach of tolerance to thyroid antigens? *Clin Exp Immunol* 109:98.
- Sospedra, M., X. Ferrer-Francesch, O. Dominguez, M. Juan, M. Foz-Sala, and R. Pujol-Borrell. 1998. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol* 161:5918.
- Spitzweg, C., W. Joba, and A. E. Heufelder. 1999. Expression of thyroid-related genes in human thymus. *Thyroid* 9:133.
- Staeger, M. S., S. P. Lee, T. Frisan, J. Mautner, S. Scholz, A. Pajic, A. B. Rickinson, M. G. Masucci, A. Polack, and G. W. Bornkamm. 2002. MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4550.

- Stebbins, C. C., G. E. Loss, Jr., C. G. Elias, A. Chervonsky, and A. J. Sant. 1995. The requirement for DM in class II-restricted antigen presentation and SDS-stable dimer formation is allele and species dependent. *J Exp Med* 181:223.
- Steimle, V., C. A. Siegrist, A. Mottet, B. Lisowska-Grospierre, and B. Mach. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 265:106.
- Steinman, L. 1996. A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2253.
- Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191:411.
- Stenszky, V., L. Kozma, C. Balazs, S. Rochlitz, J. C. Bear, and N. R. Farid. 1985. The genetics of Graves' disease: HLA and disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* 61:735.
- Strubin, M., C. Berte, and B. Mach. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *Embo J* 5:3483.
- Strubin, M., E. O. Long, and B. Mach. 1986. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* 47:619.
- Stumptner, P., and P. Benaroch. 1997. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *Embo J* 16:5807.
- Suri, A., I. Vidavsky, K. van der Drift, O. Kanagawa, M. L. Gross, and E. R. Unanue. 2002. In APCs, the autologous peptides selected by the diabetogenic I-Ag7 molecule are unique and determined by the amino acid changes in the P9 pocket. *J Immunol* 168:1235.
- Surman, S., T. D. Lockey, K. S. Slobod, B. Jones, J. M. Riberdy, S. W. White, P. C. Doherty, and J. L. Hurwitz. 2001. Localization of CD4+ T cell epitope hotspots to exposed strands of HIV envelope glycoprotein suggests structural influences on antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4587.
- Tandon, N., D. R. Jayne, A. M. McGregor, and A. P. Weetman. 1992. Analysis of anti-idiotypic antibodies against anti-microsomal antibodies in patients with thyroid autoimmunity. *J Autoimmun* 5:557.
- Taxman, D. J., D. E. Cressman, and J. P. Ting. 2000. Identification of class II transcriptional activator-induced genes by representational difference analysis: discoordinate regulation of the DN alpha/DO beta heterodimer. *J Immunol* 165:1410.
- Teyton, L., D. O'Sullivan, P. W. Dickson, V. Lotteau, A. Sette, P. Fink, and P. A. Peterson. 1990. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* 348:39.
- Thomas, H. E., R. Darwiche, J. A. Corbett, and T. W. Kay. 1999. Evidence that beta cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. *J Immunol* 163:1562.
- Thomas, H. E., R. Darwiche, J. A. Corbett, and T. W. Kay. 2002. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes* 51:311.
- Thomas-Vaslin, V., D. Damotte, M. Coltey, N. M. Le Douarin, A. Coutinho, and J. Salaun. 1997. Abnormal T cell selection on nod thymic epithelium is sufficient to induce autoimmune manifestations in C57BL/6 athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4598.
- Ting, J. P., and A. S. Baldwin. 1993. Regulation of MHC gene expression. *Curr Opin Immunol* 5:8.
- Ting, J. P., and J. Trowsdale. 2002. Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109:S21.
- Tisch, R., X. D. Yang, S. M. Singer, R. S. Liblau, L. Fugger, and H. O. McDevitt. 1993. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature* 366:72.
- Tisch, R., and H. McDevitt. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85:291.
- Todd, J. A., J. I. Bell, and H. O. McDevitt. 1987. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329:599.
- Tolosa, E., C. Roura, M. Marti, A. Belfiore, and R. Pujol-Borrell. 1992. Induction of intercellular adhesion molecule-1 but not of lymphocyte function-associated antigen-3 in thyroid follicular cells. *J Autoimmun* 5:119.
- Tourne, S., T. Miyazaki, P. Wolf, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1997. Functionality of major histocompatibility complex class II molecules in mice doubly deficient for invariant chain and H-2M complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9255.
- Townsend, A., and H. Bodmer. 1989. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 7:601.

- Townsend, A., C. Ohlen, L. Foster, J. Bastin, H. G. Ljunggren, and K. Karre. 1989. A mutant cell in which association of class I heavy and light chains is induced by viral peptides. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54:299.
- Trudeau, J. D., J. P. Dutz, E. Arany, D. J. Hill, W. E. Fieldus, and D. T. Finegood. 2000. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* 49:1.
- Tulp, A., D. Verwoerd, B. Dobberstein, H. L. Ploegh, and J. Pieters. 1994. Isolation and characterization of the intracellular MHC class II compartment. *Nature* 369:120.
- Turnquist, H. R., H. J. Thomas, K. R. Prilliman, C. T. Lutz, W. H. Hildebrand, and J. C. Solheim. 2000. HLA-B polymorphism affects interactions with multiple endoplasmic reticulum proteins. *Eur J Immunol* 30:3021.
- Ullrich, H. J., K. Doring, U. Gruneberg, F. Jahng, J. Trowsdale, and S. M. van Ham. 1997. Interaction between HLA-DM and HLA-DR involves regions that undergo conformational changes at lysosomal pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13163.
- Urban, R. G., R. M. Chicz, D. A. Vignali, and J. L. Strominger. 1993. The dichotomy of peptide presentation by class I and class II MHC proteins. *Chem Immunol* 57:197.
- van Endert, P. M. 1999. Genes regulating MHC class I processing of antigen. *Curr Opin Immunol* 11:82.
- van Ham, M., M. van Lith, B. Lillemeier, E. Tjin, U. Gruneberg, D. Rahman, L. Pastoors, K. van Meijgaarden, C. Roucard, J. Trowsdale, T. Ottenhoff, D. Pappin, and J. Neeffes. 2000. Modulation of the major histocompatibility complex class II-associated peptide repertoire by human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO. *J Exp Med* 191:1127.
- van Lith, M., M. van Ham, A. Griekspoor, E. Tjin, D. Verwoerd, J. Calafat, H. Janssen, E. Reits, L. Pastoors, and J. Neeffes. 2001. Regulation of MHC class II antigen presentation by sorting of recycling HLA-DM/DO and class II within the multivesicular body. *J Immunol* 167:884.
- van Noort, J. M., S. M. Anderton, J. P. Wagenaar, M. H. Wauben, C. van Holten, and C. J. Boog. 1994. Differential rat T cell recognition of cathepsin D-released fragments of mycobacterial 65 kDa heat-shock protein after immunization with either the recombinant protein or whole mycobacteria. *Int Immunol* 6:603.
- van Noort, J. M., and M. J. Jacobs. 1994. Cathepsin D, but not cathepsin B, releases T cell stimulatory fragments from lysozyme that are functional in the context of multiple murine class II MHC molecules. *Eur J Immunol* 24:2175.
- Vargas, F., E. Tolosa, M. Sospedra, M. Catalfamo, A. Lucas-Martin, G. Obiols, and R. Pujol-Borrell. 1994. Characterization of neural cell adhesion molecule (NCAM) expression in thyroid follicular cells: induction by cytokines and over-expression in autoimmune glands. *Clin Exp Immunol* 98:478.
- Verreck, F. A., C. A. Fargeas, and G. J. Hammerling. 2001. Conformational alterations during biosynthesis of HLA-DR3 molecules controlled by invariant chain and HLA-DM. *Eur J Immunol* 31:1029.
- Vidal, K., B. L. Hsu, C. B. Williams, and P. M. Allen. 1996. Endogenous altered peptide ligands can affect peripheral T cell responses. *J Exp Med* 183:1311.
- Vidard, L., K. L. Rock, and B. Benacerraf. 1991. The generation of immunogenic peptides can be selectively increased or decreased by proteolytic enzyme inhibitors. *J Immunol* 147:1786.
- Vidard, L., K. L. Rock, and B. Benacerraf. 1992. Heterogeneity in antigen processing by different types of antigen-presenting cells. Effect of cell culture on antigen processing ability. *J Immunol* 149:1905.
- Villadangos, J. A., R. J. Riese, C. Peters, H. A. Chapman, and H. L. Ploegh. 1997. Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J Exp Med* 186:549.
- Villadangos, J. A., R. A. Bryant, J. Deussing, C. Driessen, A. M. Lennon-Dumenil, R. J. Riese, W. Roth, P. Saftig, G. P. Shi, H. A. Chapman, C. Peters, and H. L. Ploegh. 1999. Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 172:109.
- Villadangos, J. A., and H. L. Ploegh. 2000. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* 12:233.
- Villadangos, J. A., C. Driessen, G. P. Shi, H. A. Chapman, and H. L. Ploegh. 2000. Early endosomal maturation of MHC class II molecules independently of cysteine proteases and H-2DM. *Embo J* 19:882.
- Villadangos, J. A. 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* 38:329.
- Villadangos, J. A., M. Cardoso, R. J. Steptoe, D. van Berkel, J. Pooley, F. R. Carbone, and K. Shortman. 2001. MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity* 14:739.

- Vives, M., G. Soldevila, L. Alcalde, C. Lorenzo, N. Somoza, and R. Pujol-Borrell. 1991. Adhesion molecules in human islet beta-cells. De novo induction of ICAM- 1 but not LFA-3. *Diabetes* 40:1382.
- Vives-Pi, M., M. P. Armengol, L. Alcalde, M. Costa, N. Somoza, F. Vargas, D. Jaraquemada, and R. Pujol-Borrell. 1996. Expression of transporter associated with antigen processing-1 in the endocrine cells of human pancreatic islets: effect of cytokines and evidence of hyperexpression in IDDM. *Diabetes* 45:779.
- Vives-Pi, M., F. Vargas, R. F. James, J. Trowsdale, M. Costa, M. Sospedra, N. Somoza, G. Obiols, R. Tampe, and R. Pujol-Borrell. 1997. Proteasome subunits, low-molecular-mass polypeptides 2 and 7 are hyperexpressed by target cells in autoimmune thyroid disease but not in insulin-dependent diabetes mellitus: implications for autoimmunity. *Tissue Antigens* 50:153.
- Viville, S., J. Neefjes, V. Lotteau, A. Dierich, M. Lemeur, H. Ploegh, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72:635.
- Vogt, A. B., H. Kropshofer, G. Moldenhauer, and G. J. Hammerling. 1996. Kinetic analysis of peptide loading onto HLA-DR molecules mediated by HLA-DM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9724.
- Vogt, A. B., S. O. Arndt, G. J. Hammerling, and H. Kropshofer. 1999. Quality control of MHC class II associated peptides by HLA-DMH2-M. *Semin Immunol* 11:391.
- Wakkach, A., T. Guyon, C. Bruand, S. Tzartos, S. Cohen-Kaminsky, and S. Berrih-Aknin. 1996. Expression of acetylcholine receptor genes in human thymic epithelial cells: implications for myasthenia gravis. *J Immunol* 157:3752.
- Waldburger, J. M., T. Suter, A. Fontana, H. Acha-Orbea, and W. Reith. 2001. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med* 194:393.
- Walter, W., C. Scheuer, K. Lingnau, T. E. Reichert, E. Schmitt, M. Loos, and M. J. Maeurer. 2000. H2-M, a facilitator of MHC class II peptide loading, and its negative modulator H2-O are differentially expressed in response to proinflammatory cytokines. *Immunogenetics* 51:794.
- Watts, C., and A. Lanzavecchia. 1993. Suppressive effect of antibody on processing of T cell epitopes. *J Exp Med* 178:1459.
- Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15:821.
- Watts, C., A. Antoniou, B. Manoury, E. W. Hewitt, L. M. McKay, L. Grayson, N. F. Fairweather, P. Emsley, N. Isaacs, and P. D. Simitsek. 1998. Modulation by epitope-specific antibodies of class II MHC-restricted presentation of the tetanus toxin antigen. *Immunol Rev* 164:11.
- Watts, C. 2001. Antigen processing in the endocytic compartment. *Curr Opin Immunol* 13:26.
- Weetman, A. P. 1986. Regulation and role of thyroid cell class II antigen expression. *Immunol Res* 5:89.
- Weetman, A. P., and A. M. McGregor. 1994. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr Rev* 15:788.
- Wekerle, H., M. Bradl, C. Linington, G. Kaab, and K. Kojima. 1996. The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol Rev* 149:231.
- Werdelin, O. 1986. Determinant protection. A hypothesis for the activity of immune response genes in the processing and presentation of antigens by macrophages. *Scand J Immunol* 24:625.
- Winqvist, O., A. Soderbergh, and O. Kampe. 1996. The autoimmune basis of adrenocortical destruction in Addison's disease. *Mol Med Today* 2:282.
- Wolf, P. R., S. Tourne, T. Miyazaki, C. Benoist, D. Mathis, and H. L. Ploegh. 1998. The phenotype of H-2M-deficient mice is dependent on the MHC class II molecules expressed. *Eur J Immunol* 28:2605.
- Wraight, C. J., P. van Endert, P. Moller, J. Lipp, N. R. Ling, I. C. MacLennan, N. Koch, and G. Moldenhauer. 1990. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J Biol Chem* 265:5787.
- Wu, Z., P. A. Biro, R. Mirakian, F. Curcio, F. S. Ambesi-Impiombato, and G. F. Bottazzo. 2000. Transcriptional regulation of the MHC II gene DRA in untransformed human thyrocytes. *Int Immunol* 12:405.
- Yanagawa, T., A. Manglabruks, Y. B. Chang, Y. Okamoto, M. E. Fisfalen, P. G. Curran, and L. J. DeGroot. 1993. Human histocompatibility leukocyte antigen-DQA1*0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 76:1569.
- Yanagawa, T., K. Ito, E. L. Kaplan, N. Ishikawa, and L. J. DeGroot. 1995. Absence of association between human spumaretrovirus and Graves' disease. *Thyroid* 5:379.

- York, I. A., A. L. Goldberg, X. Y. Mo, and K. L. Rock. 1999. Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 172:49.
- Zarour, H. M., J. M. Kirkwood, L. S. Kierstead, W. Herr, V. Brusic, C. L. Slingluff, Jr., J. Sidney, A. Sette, and W. J. Storkus. 2000. Melan-A/MART-1(51-73) represents an immunogenic HLA-DR4-restricted epitope recognized by melanoma-reactive CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:400.
- Zarutskie, J. A., R. Busch, Z. Zavala-Ruiz, M. Rushe, E. D. Mellins, and L. J. Stern. 2001. The kinetic basis of peptide exchange catalysis by HLA-DM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12450.
- Zhong, G., C. Reis e Sousa, and R. N. Germain. 1997. Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13856.
- Zimmermann, V. S., P. Rovere, J. Trucy, K. Serre, P. Machy, F. Forquet, L. Leserman, and J. Davoust. 1999. Engagement of B cell receptor regulates the invariant chain-dependent MHC class II presentation pathway. *J Immunol* 162:2495.
- Zinkernagel, R. M., S. Ehl, P. Aichele, S. Oehen, T. Kundig, and H. Hengartner. 1997. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time- dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev* 156:199.
- Zipris, D., A. R. Crow, and T. L. Delovitch. 1991. Altered thymic and peripheral T-lymphocyte repertoire preceding onset of diabetes in NOD mice. *Diabetes* 40:429.