

**Propiedades moleculares e  
inmunológicas de HLA-B14 y su papel  
en la espondilitis anquilosante.**

*Elena Merino Rodríguez, 2008*

*A mi padre, a mi madre y a mi hermana, por toda su confianza, apoyo constante y amor sinceros.*

# AGRADECIMIENTOS

Puff!!!!, ha habido momentos en los que me ha costado pensar que algún día me encontraría escribiendo estas líneas, ahí van....

José Antonio, gracias por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en tu laboratorio, el largo camino ha sido de un aprendizaje y disfrute realmente buenos. He aprendido mucho de ti, sobre todo, como científico y también como persona.

Bego, primero compañera y amiga y después codirectora. He disfrutado mucho de mi andanza a tu lado.

Habitantes del C-208 (biológicas), mutados a lab-220 (en el centro de élite), ¿qué deciros?; algunos ya no estáis y otros perduráis (por poco tiempo ya eh!!!) y, sin embargo, a todos os llevo en mi corazón. Alberto, Manolo, Laura, Mar, Miriam, Vero, Miguel, Susana, Patri, Juanjo, Noel, Carla, Uge...Hemos vivido un montón de momentos; buenos, malos y sin duda, TODOS INTENSOS. Dentro y fuera del laboratorio...Algunos inolvidables, otros entrañables, otros de morirse de la risa...Cada uno de vosotros me habéis enseñado algo; científico, amistoso, de la vida... y de cada uno me llevo un trocito... Habéis sido un apoyo constante...Gracias también a ti, Luis, que siempre me has escuchado y sabido aconsejar. Tampoco puedo olvidar a toda la gente que hemos conocido en nuestro compartir, como Iñaki, Mercé...A otros compañeros del centro e incluso amigos; Juanfran, Fede, Horacio, Olga, los primos de Marisa Toribio...Tampoco las REPAS!!, los congresos convertidos en aventura de aprender y vivir...

Gracias Pepe Almendral, porque me diste la primera oportunidad de meter la cabeza en el CBM, y a todos los compañeros con los que compartí mi beca de colaboración ese año.

Gracias a los Servicios del centro; Proteómica, que fue un pilar durante toda la primera parte de mi tesis y con los que me eché mis risas...Radioactividad, ay niñas radioactivas!!!, como amenizábais mis marcajes isotópicos, primero supervisoras de mi trabajo en la segunda parte, pero después también amigas. Y a los chicos de informática, Diego y Santi, que en los últimos momentos de esta "locura", me ayudaron un montón.

Hay tanta gente a la que agradecer algo, una palabra, una mirada, un escuchar...que no veo el final. Africa, Juani, Isabel, los chicos de mantenimiento...A mi profe y compañeras de Yoga, otro pilar importante en mi vida y que me han ayudado a seguir adelante en momentos difíciles. A mi amiga Ana, por esas reuniones...

A mis compañeros de carrera, Tania, Ruth, Isra, sin vosotros este objetivo cumplido no hubiera sabido igual...

A Nacho, por ser alguien muy importante en mi vida, antes, durante y espero, después de mi tesis...Y a toda su familia, porque siempre habéis estado ahí.

Por último, pero no por eso menos importante a toda mi familia, toda, toda, pero **SOBRE TODO** a mi hermana Cristina, a mi padre y a mi madre. Sin vosotros, esta historia no habría comenzado nunca, gracias por vuestro apoyo incondicional, por vuestro esfuerzo y saber hacer...

**A TODOS VA DEDICADA ESTA TESIS QUE HA SALIDO A FLOTE CON MI  
ESFUERZO Y TENACIDAD, PERO TAMBIÉN CON EL CONJUNTO DE  
VUESTRAS PEQUEÑAS-GRAN APORTACIONES.**



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular

# Propiedades moleculares e inmunológicas de HLA-B14 y su papel en la espondilitis anquilosante.

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias  
presentada por: *Elena Merino Rodríguez*

**Director:** Dr. *Jose Antonio López de Castro Álvarez*  
Profesor de investigación del C.S.I.C.

**Codirectora:** Dra. *Begoña Galocha Iragüen*  
Contratada postdoctoral del C.S.I.C.

**Tutor:** Dr. *Balbino Alarcón Sánchez*  
Profesor de investigación del C.S.I.C.

Madrid, Mayo de 2008

# ABSTRACT

The association of HLA-B27 with ankylosing spondylitis (AS) is the strongest one between an HLA class I molecule and any disease. HLA-B\*1403 was strongly associated to AS in the Togolese population, where both this disease and HLA-B27 are unfrequent. B\*1402, which differs from B\*1403 only at residue 156 (L156R), was found only in the healthy controls. Thus, the availability of two closely related HLA-B14 molecules differentially associated with AS, allowed us for the first time to look for molecular properties that may correlate with disease susceptibility in a non-B27 system. Current research on AS pathogenesis is focused on a few hypothetical mechanisms. The ones in which this thesis is focused are the arthritogenic peptide and the misfolding hypotheses.

On the basis of the arthritogenic peptide hypothesis, we comparatively analyzed the peptide binding specificity of B\*1402, B\*1403 and B\*2705. Although differing by a single residue, B\*1402 and B\*1403 shared only 32-35% of their peptide repertoires. Subtype-related differences observed in multiple peptide positions, including P3 and P7, were largely explained by a direct effect of the L156R change on peptide specificity. The HLA-B14 subtypes shared only 3% of their peptide repertoires with B\*2705. Shared ligands between B\*1403 and B\*2705 were positively identified by sequencing. Antigenic overlap analyzed by CTLs was similar to the peptide overlap, suggesting that shared ligands tend to maintain their antigenic features when bound to the different allotypes. In conclusion, our results indicate that B\*1403 and B\*2705 can present common peptides.

On the basis of the misfolding hypothesis, we comparatively analyzed folding, export, and stability of B\*1402, B\*1403 and B\*2705. B14 folding was faster and more efficient than B\*2705, and similar for B\*1402 and B\*1403, but some unfolded heavy chain (HC) from both B14 subtypes remained in the endoplasmic reticulum with a long half life. The export rate of B\*1402 and B\*1403 was slow, and the heterodimers partially dissociated after exiting the endoplasmic reticulum, as revealed by significant amounts of Endo H-resistant and surface-expressed free HC. Both interaction with tapasin and thermostability decreased in the order: B\*2705>B\*1402>B\*1403, suggesting that the B\*1402 and, specially, B\*1403-bound peptide repertoires were less optimized than that of B\*2705. So, folding, maturation and stability of B\*1403 differ more from B\*2705 than from B\*1402.

# ABREVIATURAS

<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>CTL</b>	Linfocito T citotóxico
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>HC</b>	Cadena pesada
<b><math>\beta_2m</math></b>	Beta 2-microglobulina
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>P2</b>	Posición 2
<b>DRiPs</b>	Productos defectivos de la síntesis proteica
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>TAP</b>	Transportador asociado al procesamiento de antígenos
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferón $\gamma$
<b>Tpn</b>	Tapasina
<b>PLC</b>	Complejo de carga peptídico
<b>ERAD</b>	Degradación asociada al RE
<b>COPI</b>	<i>Coatomer protein complex I</i>
<b>UPR</b>	<i>unfolded protein response</i>
<b>OR</b>	<i>Overload response</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear- $\kappa$ B
<b>EA</b>	Espondilitis anquilosante
<b>AGE</b>	<i>Advanced glycation end-products</i>
<b>DMEN</b>	<i>Dulbeco's modified Eagle's</i>
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino
<b>PBS</b>	Tampón salino de fosfato
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo
<b>MS</b>	<i>Mass spectrometry</i>
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TA</b>	Acetonitrilo
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>IL2r</b>	Interleukina 2 recombinante
<b>IMDM</b>	<i>Iscove's modified Dulbecco with Glutamax I</i>
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida de dodecil sulfato sódico

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Estructura de las moléculas del MHC de clase I.	2
2. Ruta de procesamiento de las moléculas de MHC de clase I y presentación de antígenos de clase I.	4
3. Plegamiento proteico y control de calidad en el retículo endoplásmico.	7
3.1 Eventos tempranos en el ensamblaje de las moléculas de clase I.	7
3.2 Organización del complejo de carga peptídico.	8
3.3 Glicosilación de las moléculas de clase I.	8
3.4 Control de calidad en el retículo endoplásmico.	9
3.5 Consecuencias del plegamiento anómalo y respuestas de estrés.	10
4. Las espondiloartropatías y los antígenos de histocompatibilidad de clase I.	11
4.1 HLA-B27 y su asociación a espondiloartropatías.	11
4.2 Subtipos de HLA-B27: asociación diferencial a espondilitis anquilosante y especificidad peptídica	11
4.3 HLA-B14: y su asociación a enfermedad.	13
5. Hipótesis patogénicas.	14
5.1 Hipótesis del péptido artritogénico.	14
5.2 Hipótesis del plegamiento anómalo de HLA-B27.	17
5.3 Otras hipótesis	19
5.3.1 Modulación de la respuesta inmune por homodímeros en superficie.	19
5.3.2 Depósitos de $\beta_2m$ .	29
<b>OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>22</b>
1. Líneas celulares y transferencia de genes mediante DNA.	22
2. Anticuerpos monoclonales.	22
3. Citometría de flujo.	23
4. Aislamiento y fraccionamiento de los péptidos unidos a HLA-B*1402, -B*1403 y -B*2705.	23
5. Espectrometría de masas y secuenciación.	24
6. CTLs.	25
7. Análisis estadístico.	26
8. Western Blot.	26
9. Marcaje metabólico e inmunoprecipitación de los antígenos de MHC de clase I.	26
<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS DE B*1402, B*1403 Y B*2705.	28
1.1 B*1402 y B*1403 presentan una gran disparidad entre sus repertorios	



peptídicos constitutivos.	28
1.2 HLA-B14 y HLA-B27 presentan un bajo solapamiento peptídico.	31
1.3 Los ligandos de B*1402 y B*1403 poseen una heterogeneidad restringida en múltiples posiciones peptídicas.	33
1.4 Rasgos estructurales de los ligandos compartidos entre B*1402 y B*1403.	36
1.5 Los ligandos específicos de subtipo en HLA-B14 presentan motivos diferentes en múltiples posiciones.	37
1.6 Rasgos diferenciales entre los ligandos de B*1402, B*1403 y B*2705.	38
1.7 HLA-B*2705 comparte ligandos con B*1402 y B*1403.	40
1.8 La reactividad cruzada mediada por CTLs alorreactivos entre B*1402, B*1403, y B*2705 es paralela al solapamiento peptídico.	41
2. PLEGAMIENTO, MADURACIÓN Y ESTABILIDAD DE B*1402, B*1403 Y B*2705.	43
2.1 Los subtipos de HLA-B14 muestran una cinética de plegamiento rápida.	44
2.2 Disociación intracelular y plegamiento incompleto de los subtipos de HLA-B14.	45
2.3 Los subtipos de HLA-B14 expresan altos niveles de cadena pesada libre en la superficie celular.	48
2.4 El transporte y la maduración de los subtipos de HLA-B14 son más lentos que en HLA-B27.	48
2.5 Los subtipos de HLA-B14 difieren en su interacción con la tapasina y en la estabilidad de sus repertorios peptídicos.	50
2.6 Las diferencias en la expresión de la cadena pesada entre los transfectantes no explican las propiedades diferenciales de HLA-B14 y HLA-B27.	53
<i>DISCUSIÓN</i>	55
HLA-B14 y la hipótesis del péptido artritogénico.	55
HLA-B14y la hipótesis del plegamiento anómalo.	59
<i>CONCLUSIONES</i>	63
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	65
<i>ANEXOS</i>	

# *Introducción*

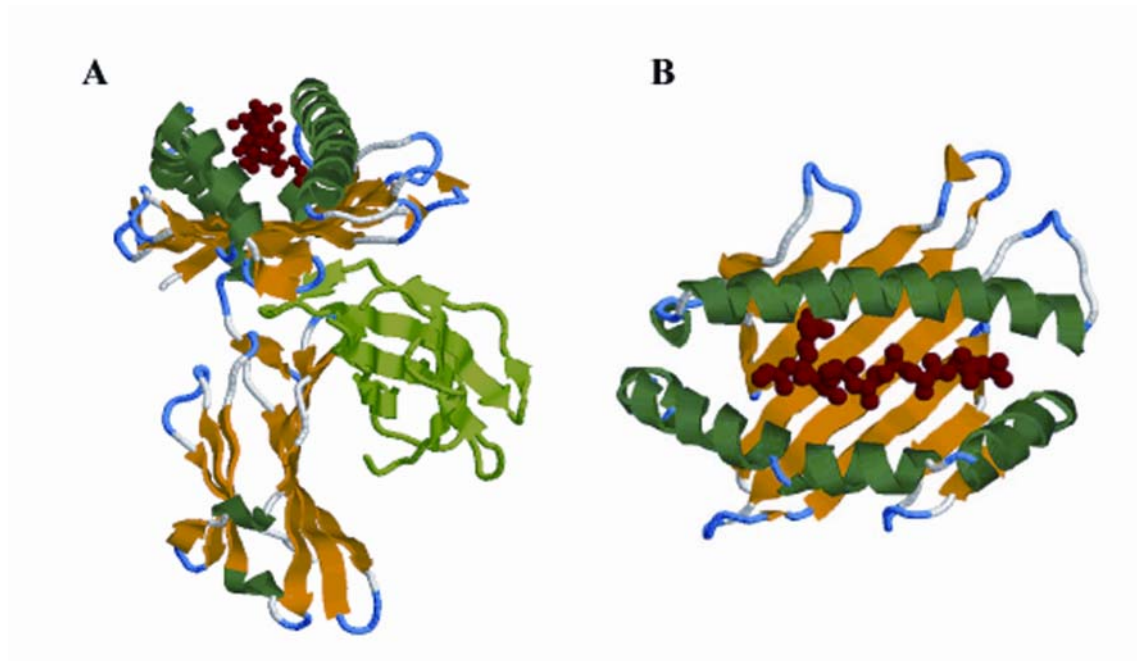
# INTRODUCCIÓN

La función del sistema inmune es proteger al organismo de las enfermedades y más específicamente de las enfermedades infecciosas. Esta función la lleva a cabo reconociendo, respondiendo y eliminando lo extraño y a la vez, no reaccionando perjudicialmente frente a lo propio.

El individuo sano se encuentra protegido contra los microorganismos por medio de diferentes mecanismos, que se engloban en dos tipos de respuestas inmunitarias: la innata y la adquirida o específica. La innata, engloba a los fagocitos (neutrófilos y macrófagos), eosinófilos, basófilos, células dendríticas, células NK (*natural killer*) y al complemento. La adquirida está mediada por los linfocitos B y T. Ambas respuestas forman un sistema integrado de defensa, en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas. La inmunidad innata, aparte de proporcionar una primera línea de defensa contra microorganismos, también desempeña un papel fundamental en la inducción de respuestas inmunitarias adquiridas. La respuesta específica está dividida, a su vez, en la inmunidad humoral, en la que participan los linfocitos B, productores de anticuerpos y la inmunidad celular, en la que participan los linfocitos T citotóxicos (CTLs CD8<sup>+</sup>). Estos reconocen sólo péptidos antigénicos unidos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I. Ambas respuestas están reguladas por los CTLs CD4<sup>+</sup>, que reconocen péptidos antigénicos en el contexto de moléculas del MHC de clase II. Las respuestas humoral y celular tienen una serie de características fundamentales: especificidad, diversidad, memoria inmunológica, especialización, auto-limitación y discriminación de lo propio y lo extraño. La falta de respuesta inmunológica se denomina tolerancia. Las anomalías en inducción o en mantenimiento de la tolerancia, dan como resultado respuestas inmunitarias contra antígenos propios, ocasionando las enfermedades autoinmunes. Entre todos los genes asociados a autoinmunidad, las asociaciones más fuertes corresponden a los genes del MHC. Una de las correlaciones más fuertes que se conocen es entre la espondilitis anquilosante (EA), una enfermedad inflamatoria, probablemente autoinmune y HLA-B27.

## 1. ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS DEL MHC DE CLASE I.

Las moléculas del MHC de clase I se expresan en todas las células nucleadas. Son glicoproteínas de membrana formadas por la asociación no covalente de una cadena pesada (HC), de 44 kDa, una cadena ligera de 12 kDa, denominada beta 2-microglobulina ( $\beta_2m$ ) y un péptido generalmente de entre 8 y 13 aminoácidos (Figura 1A).



**Figura 1. Estructura de las moléculas de MHC de clase I.** (A) Vista lateral. En amarillo y verde oscuro se representa la cadena pesada, en verde claro, la  $\beta_2m$  y en rojo el péptido. Sólo se representa la porción extracelular. (B) Vista apical del sitio de unión de péptido. En verde oscuro se representan las hélices  $\alpha$ , en amarillo las láminas  $\beta$  y en rojo el péptido unido.

Un amplio número de estudios cristalográficos ha permitido analizar en detalle la estructura de los antígenos de clase I (Achour et al., 1998; Balendiran et al., 1997; Bjorkman et al., 1987b; Bouvier et al., 1998; Fremont et al., 1992; Fremont et al., 1995; Garboczi et al., 1996; Garrett et al., 1989; Guo et al., 1992; Hillig et al., 2001; Loll et al., 2005; Madden et al., 1993; Madden et al., 1991; Madden et al., 1992; Saper et al., 1991; Silver et al., 1992; Smith et al., 1996a; Smith et al., 1996b; Uchanska-Ziegler et al., 2003; Young et al., 1994; Zawacka et al., 2005). La HC consta de una región extracelular de 274 aminoácidos formada por tres dominios ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ), un segmento transmembrana de unos 25 aminoácidos y una región citoplásmica de alrededor de 30 aminoácidos. El dominio  $\alpha_3$ , el más próximo a la membrana plasmática, y  $\beta_2m$ , poseen

una estructura similar a la de los dominios constantes de las inmunoglobulinas (Orr et al., 1979).  $\beta_2m$ , interacciona con  $\alpha_3$ , así como con los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , contribuyendo decisivamente a la estabilidad de la molécula (Madden, 1995) (Figura 1A). La HC tiene dos puentes disulfuro conservados que se encuentran en los dominios  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  y que son esenciales para el plegamiento correcto de la molécula de clase I (Creighton, 1988; Koch and Tampe, 2006).

Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  conforman una cavidad conocida como el sitio de unión de péptido. Dicha cavidad consta de una base formada por 8 láminas  $\beta$  antiparalelas y 2 hélices  $\alpha$  sobre ella (Figura 1B). Una hélice  $\alpha$  y cuatro láminas  $\beta$  provienen de  $\alpha_1$  y la otra hélice  $\alpha$  con las otras cuatro láminas  $\beta$  restantes, de  $\alpha_2$ . Las dimensiones del sitio de unión (25 Å de longitud y 12 Å de anchura) permiten alojar un péptido de entre 8 y 13 aminoácidos en su interior, con los extremos amino y carboxilo anclados mediante puentes de hidrógeno. Los residuos situados en la región central del péptido suelen estar orientados hacia el solvente, determinando la interacción con el receptor de células T (TCR). Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son altamente polimórficos, lo que confiere propiedades únicas en la unión del péptido y del TCR a cada molécula del MHC (Bjorkman and Parham, 1990; Bjorkman et al., 1987a; Garrett et al., 1989; Saper et al., 1991). Un análisis detallado del sitio de unión revela la existencia de una serie de subcavidades (A-F) cuya forma, tamaño y polaridad vienen determinados por las cadenas laterales de los residuos que las componen (Garrett et al., 1989; Saper et al., 1991). En estas subcavidades se acomodan las cadenas laterales de los aminoácidos del péptido unido, así como los extremos amino y carboxilo del mismo (figura 1B) La mayor parte del polimorfismo descrito para las moléculas de clase I afecta a residuos localizados en el interior del sitio de unión de péptidos y modula la especificidad de unión de los mismos. Los péptidos adoptan una conformación extendida con los extremos N- y C-terminales interaccionando con las subcavidades A y F, respectivamente. En HLA-B27 las subcavidades C y F forman una única subcavidad C/F (Madden et al., 1991). El residuo en posición 2 (P2) del péptido se aloja en la subcavidad B, el residuo 3 en la subcavidad D, y el residuo 7 (en general  $\Omega$ -2) en la subcavidad E. Algunas cavidades suelen ser muy restrictivas para un aminoácido o un tipo determinado de aminoácidos. Estas posiciones peptídicas que interaccionan fuertemente con la molécula de clase I, se denominan posiciones de anclaje. Así, los péptidos eluidos de un determinado alotipo comparten una serie de residuos comunes en posiciones fijas (Huczko et al., 1993;

Jardetzky et al., 1991; Rammensee et al., 1993). El resto de posiciones del péptido (para nonúmeros los residuos 4, 5, 6 y 8) interactúan débilmente con la molécula de HLA, están expuestos en la superficie molecular para su reconocimiento por el TCR y muestran mayor variabilidad de residuos, permitiendo a un único alotipo unir muchos péptidos, lo que posibilita la presentación de gran diversidad de epítomos a los linfocitos T.

## **2. RUTA DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE CLASE I.**

La inmunidad celular se desencadena por la interacción de los TCRs con los péptidos antigénicos presentados en el contexto del MHC de clase I. Aunque tradicionalmente se consideró que los ligandos de clase I derivan de proteínas endógenas maduras que son degradadas al final de su vida útil, actualmente se admite que los principales sustratos de esta vía son productos defectivos de la síntesis proteica (DRiPs, defective ribosomal products) (Qian et al., 2006; Reits et al., 2000; Yewdell et al., 1996). La degradación de las proteínas se lleva a cabo de modo general, previa ubiquitinación de las mismas (Arendt and Hochstrasser, 1997; Ciechanover, 1994) por una compleja estructura multicatalítica denominada proteasoma, en un proceso dependiente de ATP (Niedermann et al., 1995; Rock et al., 1994).

Los péptidos generados en el citosol son transportados al retículo endoplásmico (RE) por el transportador asociado al procesamiento de antígenos (TAP). Este es un heterodímero formado por las subunidades TAP-1 y TAP-2, codificadas por genes localizados en el MHC e inducibles por interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (Lankat-Buttgereit and Tampe, 2002). La ausencia de cualquiera de estas dos subunidades origina una profunda inhibición de la expresión de moléculas de clase I en la superficie celular (de la Salle et al., 1994). El tamaño de los péptidos transportados por TAP varía entre 8 y 16 aminoácidos (Momburg et al., 1994) y la eficiencia del proceso de translocación está modulada por la secuencia del péptido, fundamentalmente por los tres residuos amino terminales y el residuo carboxilo terminal (Momburg et al., 1994). Para los nonúmeros, estos residuos tienen un efecto significativo en la unión del péptido a TAP (Uebel et al., 1997; Van Endert et al., 1995). Los residuos ácidos en las posiciones C-terminal, P1 y P3 de un nonúmero reducen significativamente la afinidad de unión (Uebel et al., 1997). Prolina en P2 impide en gran medida la unión. Ciertos alotipos de HLA de clase I se

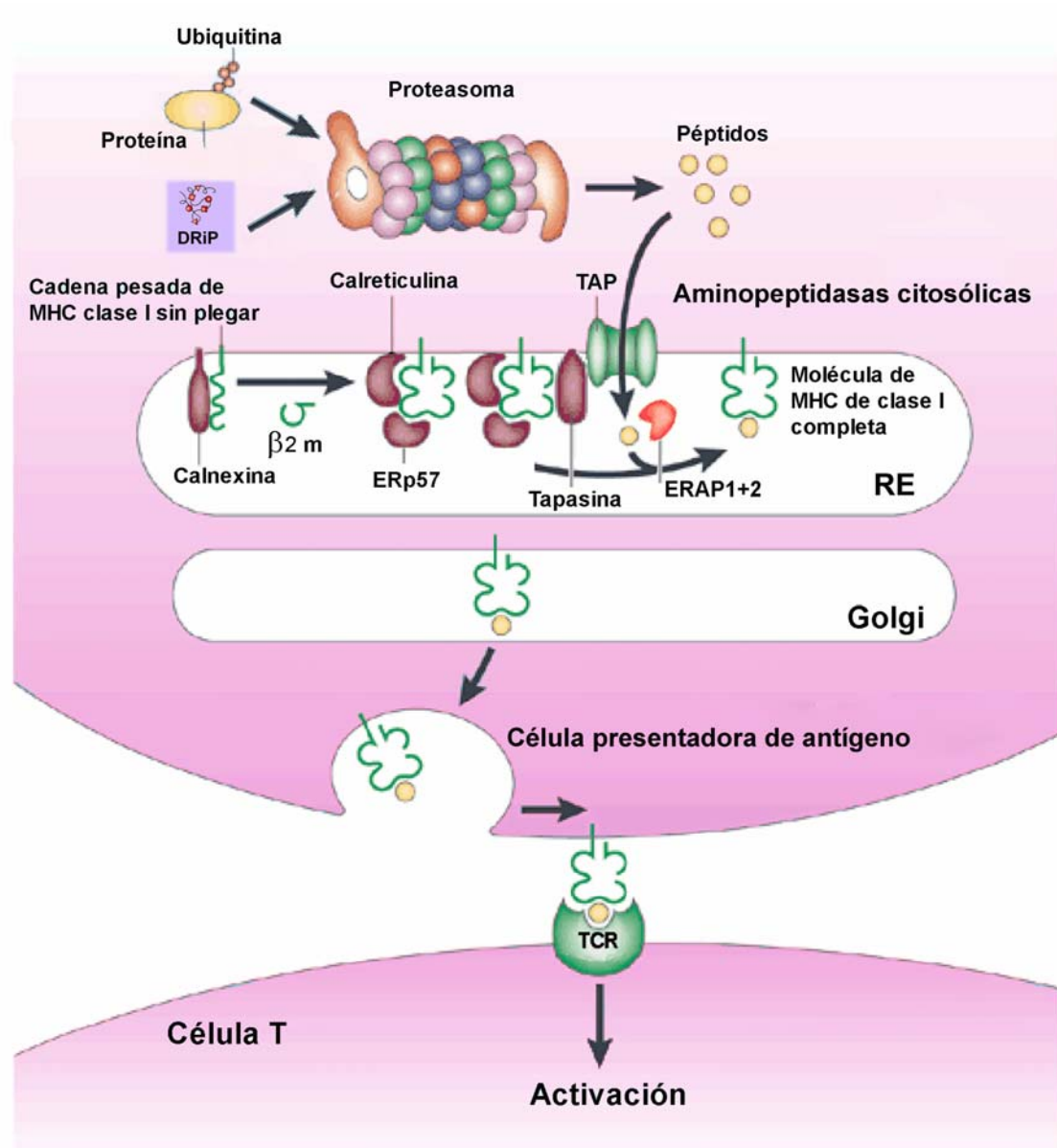
asocian pobremente con TAP, y se ha sugerido que los residuos 116 y 156, localizados en la región  $\alpha 2$  del sitio de unión de péptido de la molécula de clase I, podrían estar implicados en esta asociación (Neisig et al., 1996).

Algunos alotipos de clase I presentan ligandos con secuencias incompatibles con el transporte por TAP, asumiéndose que proceden del recorte (*trimming*) de precursores con extensiones amino terminales. Este recorte puede tener lugar en el RE, mediante aminopeptidasas como ERAP1 (Saric et al., 2002; York et al., 2002) y ERAP2 (Tanioka et al., 2003), ambas inducibles por IFN- $\gamma$ , con funciones complementarias y asociadas físicamente (Saveanu et al., 2005). En el citosol, se han identificado varias aminopeptidasas, como la bleomicín hidrolasa, la aminopeptidasa sensible a puromicina (Stoltze et al., 2000), la leucin aminopeptidasa (Beninga et al., 1998) y la tripeptidil peptidasa II. Sin embargo, el consenso actual es que estas aminopeptidasas citosólicas juegan un papel limitado en la generación de ligandos de clase I, siendo su función principal la degradación de péptidos.

Una vez transportados al RE a través de TAP, los péptidos se unen a las moléculas de clase I. La carga peptídica está asistida por una chaperona residente en el RE denominada tapasina (Tpn), que interacciona por un lado con TAP y por otro con la HC (Bangia et al., 1999; Ortmann et al., 1997; Sadasivan et al., 1996) que ya se encuentra unida a la  $\beta_2m$ , y que está estabilizada por otras chaperonas del RE. Una vez formados los complejos trimoleculares (HC- $\beta_2m$ -péptido), las moléculas del MHC de clase I salen del RE a la superficie celular a través de la vía secretoria constitutiva.

La Tpn es una chaperona cuyo papel dentro de la ruta de procesamiento de clase I no está del todo clara. Incrementa los niveles de TAP y permite una mayor translocación de péptidos al RE (Lehner et al., 1998), al tiempo que favorece la unión de péptidos a TAP (Li et al., 2000). Además, tiene un papel fundamental en el control de calidad de los péptidos que se unen a las moléculas de clase I, ya que retiene a los heterodímeros HC- $\beta_2m$  vacíos o cargados con péptidos subóptimos hasta que adquieren péptidos de alta afinidad. Por lo tanto, la Tpn contribuye a la edición y a la optimización del repertorio peptídico (Momburg and Tan, 2002; Williams et al., 2002; Zarling et al., 2003). En ausencia de Tpn, al igual que ocurre en ausencia de TAP, la expresión en superficie de muchos alotipos de clase I está claramente disminuida; éste es el caso de B\*4402, B\*3501, A\*3001 y G\*0101 (Park et al., 2003) Sin embargo, otros alelos como B\*2705, mantienen una expresión alta en ausencia de esta chaperona (Peh et al., 1998; Peh et al., 2000). Los residuos 114 y 116 juegan un papel importante a este respecto, ya

que la dependencia de Tpn de ciertos alotipos para su expresión en superficie varía drásticamente con mutaciones puntuales en estas posiciones (Park et al., 2003; Turnquist et al., 2000; Williams et al., 2002).



**Figura 2. Ruta de procesamiento y presentación de antígeno de las moléculas del MHC de clase I.** Las proteínas endógenas son degradadas, principalmente por el proteasoma. Los péptidos generados se transportan al lumen del retículo endoplasmático vía TAP, donde pueden sufrir un recorte en su extremo amino terminal mediado por las proteasas ERAP1+2, y se unen a la molécula de clase I y el  $\beta_2m$  con la ayuda de varias chaperonas residentes en retículo, como son la calnexina, la calreticulina, la Erp57 y la tapasina. Una vez formado el complejo trimolecular péptido-MHC, éste se exporta a la superficie celular, donde es presentado a los CTLs. (Kloetzel, 2001).



Un análisis más exhaustivo revela que, aunque la expresión en superficie de ciertos alotipos se mantenga en ausencia de Tpn, el repertorio generado presenta ciertas diferencias cuantitativas y cualitativas (Purcell et al., 2001).

Esta ruta (esquemática en la figura 2) se conoce con el nombre de vía de procesamiento clásica y es la responsable de la generación y presentación de la mayoría de los ligandos peptídicos. Sin embargo, hay otras vías alternativas que aunque no aportan gran cantidad de péptidos al repertorio, permiten la presentación de ligandos que pueden ser de gran importancia inmunológica (Gromme and Neefjes, 2002). Una de estas vías independiente de TAP, permite la presentación de péptidos generados por proteasas del RE o por proteasas residentes en la ruta secretoria, como la furina (Gil-Torregrosa et al., 2000).

### **3. PLEGAMIENTO PROTEICO Y CONTROL DE CALIDAD EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.**

El ensamblaje de las moléculas del MHC de clase I con los péptidos, y su posterior presentación a los linfocitos T en la superficie celular, es la culminación de un proceso regulado y ordenado que tiene lugar en el RE y que incluye una serie de interacciones con chaperonas residentes de este compartimento que asisten en el plegamiento de las proteínas. El RE tiene muchas funciones, entre ellas el plegamiento, control de calidad (Ellgaard and Helenius, 2001; Sitia and Braakman, 2003) y degradación de proteínas. Aunque la conformación nativa de éstas depende de su estructura primaria, el RE determina de manera significativa su eficiencia de plegamiento (Anfinsen, 1973). Mientras las proteínas plegadas correctamente son exportadas del RE, las proteínas plegadas de forma anómala son retenidas y degradadas selectivamente.

#### **3.1 EVENTOS TEMPRANOS EN EL ENSAMBLAJE DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE I.**

Las moléculas de clase I recién sintetizadas se translocan cotraduccionalmente desde el ribosoma al RE para ser glicosiladas y, completar su maduración. Los primeros pasos del ensamblaje de la molécula de HLA de clase I están regulados por interacciones con las chaperonas calnexina y calreticulina (Sadasivan et al., 1996; Vassilakos et al., 1996) capaces de reconocer, a través de sus dominios lectina, N-

oligosacáridos monoglucosilados. La HC recién sintetizada se asocia en el interior del RE con la calnexina, que promueve su plegamiento y la unión a la  $\beta_2m$ . Esta asociación se establece a través del grupo carbohidrato monoglucosilado (N-oligosacárido)  $Glc_1Man_9GlcNAc_2$  (Glc, glucosa; Man, manosa y GlcNAc, N-acetilglucosamina) que está unido a la Asn86 de la HC (Hammond et al., 1994). Una vez que la HC se asocia con la  $\beta_2m$ , la calnexina es sustituida por la calreticulina (Sugita and Brenner, 1994).

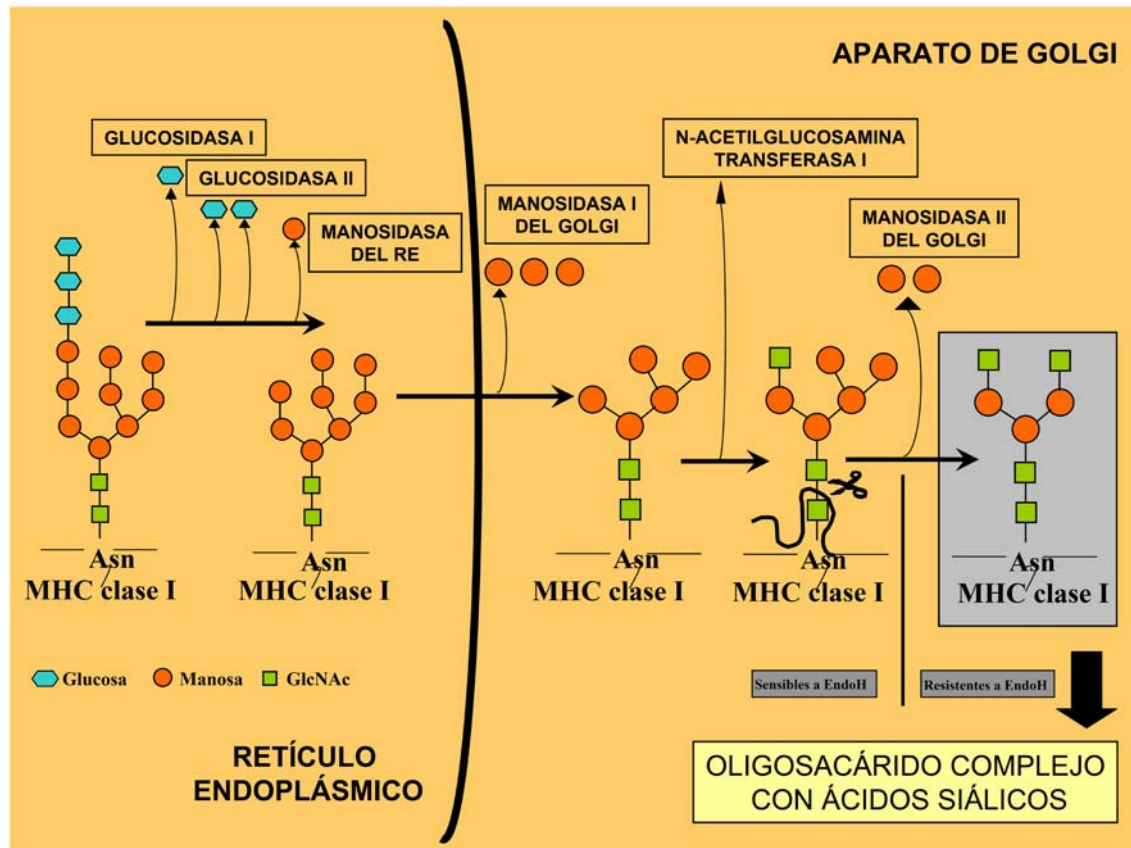
### **3.2 ORGANIZACIÓN DEL COMPLEJO DE CARGA PEPTÍDICO.**

El complejo de carga peptídico (PLC) está compuesto por la HC de clase I,  $\beta_2m$ , calreticulina, ERp57, TAP y Tpn. Esta juega un papel decisivo en la formación y mantenimiento de la estabilidad del complejo de carga. Es capaz de reunir al resto de los componentes en las proximidades de TAP (Ortmann et al., 1997) y su interacción covalente con ERp57 es crítica para la formación de los puentes disulfuro intracatenarios que estabilizan a las moléculas de clase I (Dick et al., 2002; Peaper et al., 2005). Después de la unión con los péptidos, las moléculas de clase I sufren un cambio conformacional que facilita su disociación de la Tpn y del resto de los componentes del PLC (Lie et al., 1990; Rigney et al., 1998; Townsend et al., 1989; Yu et al., 1999), salen del RE y entran en el aparato de Golgi, desde donde, tras completar su maduración a través de modificaciones en el oligosacárido, son transportadas a la superficie celular.

### **3.3 GLICOSILACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE I.**

En el RE, a las moléculas de clase I se les añade un mismo tipo de N-oligosacárido,  $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ . Este oligosacárido sufre un recorte por la acción sucesiva de las glucosidasas I y II, que eliminan los residuos de glucosa. A continuación, una manosidasa de la membrana del RE elimina un determinado residuo de manosa. En el Golgi, la manosidasa I elimina tres residuos más de manosa y la N-acetilglucosamina transferasa I añade un residuo de GlcNAc, lo que permite que la manosidasa II elimine dos residuos más de manosa. Así, se obtiene el núcleo final de tres residuos de manosa que se presenta en un oligosacárido complejo. En este momento, el enlace que existe entre los dos residuos de GlcNAc del núcleo del oligosacárido se vuelve resistente al ataque de una endoglucosidasa altamente específica (Endo H). Todas las estructuras posteriores son resistentes a Endo H, por lo que se utiliza el tratamiento con esta enzima para distinguir los oligosacáridos complejos de los ricos en manosa. Por último, se añaden residuos de GlcNAc, de galactosa y de ácido

siálico (Balch et al., 1984; Helenius and Aebi, 2001). A medida que las moléculas de clase I van adquiriendo ácidos siálicos, disminuye su movilidad electroforética. De esta manera las moléculas de clase I terminan de madurar en el aparato de Golgi antes de ser exportadas a la superficie celular. La glicosilación aparece esquematizada en la figura 3.



**Figura 3. Glicosilación de las moléculas de clase I.** El proceso comienza en el RE con la eliminación de los residuos de glucosa del oligosacárido inicialmente transferido a la proteína. A continuación, la manosidasa del RE elimina un residuo de manosa. En el Golgi, la manosidasa I elimina tres residuos más de manosa y la N-acetilglucosamina transferasa I añade un residuo de GlcNAc, que permite que la manosidasa II elimine dos residuos más de manosa. Así, se obtiene el núcleo final de tres residuos de manosa que se presenta en un oligosacárido complejo. En este estadio, el enlace que existe entre los dos residuos de GlcNAc del núcleo del oligosacárido se vuelve resistente al ataque de una endoglucosidasa altamente específica (EndoH).

### 3.4 CONTROL DE CALIDAD EN EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO.

Como ya se ha comentado, en el RE tienen lugar una serie de acontecimientos que aseguran que solamente se exporten las moléculas de clase I que estén correctamente plegadas. Las proteínas mal plegadas son reconocidas por diferentes sensores que las retienen en el RE, las someten a nuevos ciclos de plegamiento y si éstos resultan fallidos, son degradadas mediante un proceso conocido como degradación asociada al RE (ERAD).

Las moléculas de clase I que no han adquirido una conformación correcta en el RE, son sometidas a ciclos de reglucosilación mediados por la UDP-glucosa: glicoproteína glucosiltransferasa (GT) que actúa como sensor del plegamiento (Parodi, 2000; Trombetta and Parodi, 1992). Así, la proteína es marcada para interactuar de nuevo con calnexina y calreticulina. Esto incrementa la eficiencia de plegamiento y previene un ensamblaje prematuro de la proteína y la exportación de moléculas de clase I mal plegadas. Sin embargo, algunas proteínas mal plegadas no son retenidas en el RE en su totalidad y ciclan entre el compartimento intermedio del aparato de Golgi y el RE (Raposo et al., 1995). Además, se ha demostrado que existe una recuperación selectiva de proteínas, que no están bien plegadas, por transporte retrógrado desde el compartimento intermedio del Golgi o el *cis*-Golgi (Hammond and Helenius, 1994) a través de unas vesículas denominadas COPI (*Coatomer protein complex I*) (Bednarek et al., 1996; Letourneur et al., 1994; Rothman, 1996)}. Así, las moléculas de clase I mal plegadas y que han escapado de la retención en el RE, son recuperadas a este compartimento.

### **3.5 CONSECUENCIAS DEL PLEGAMIENTO ANÓMALO Y RESPUESTAS DE ESTRÉS.**

Las moléculas de clase I mal plegadas se dislocan al citosol a través del translocón Sec61 (Wiertz et al., 1996b). Posteriormente, son deglicosiladas por una N-glicanasa, ubiquitinadas y degradadas por el proteasoma (Wiertz et al., 1996a). Este proceso se conoce como ERAD. La acumulación en el RE de proteínas mal plegadas puede desencadenar estrés celular induciendo dos tipos de rutas de señalización. Por un lado, la respuesta de proteína mal plegada (*unfolded protein response*: UPR), que pone en marcha un complejo sistema de adaptaciones destinadas a aliviar el estrés celular (Schroder and Kaufman, 2005), y la respuesta de sobrecarga (*overload response*: OR) que, por mecanismos desconocidos, desencadena la activación del factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Pahl and Baeuerle, 1997). Algunas de las proteínas inducidas en la UPR están implicadas en ERAD (Travers et al., 2000). La inducción de NF- $\kappa$ B está mediada por la respuesta IRE1 y TRAF2, hasta ahora atribuida solamente a la ruta de UPR (Kaneko et al., 2003), por lo que UPR y OR probablemente no son independientes. La inducción de NF- $\kappa$ B está relacionada con la transcripción de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, e IL-6.

## **4. LAS ESPONDILOARTROPATÍAS Y LOS ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I.**

### **4.1 HLA-B27 Y SU ASOCIACIÓN A ESPONDILOARTROPATÍAS.**

Las espondiloartropatías engloban a un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas que incluyen la espondilitis anquilosante (EA) (Brewerton et al., 1973b) y la artritis reactiva (Brewerton et al., 1973a). HLA-B27 está fuertemente asociado a este grupo de enfermedades. Su asociación más fuerte es con EA, una enfermedad crónica que afecta a las articulaciones sacroilíacas, a la columna vertebral y a las articulaciones periféricas. Aproximadamente, el 90-95% de los pacientes con esta enfermedad son HLA-B27 positivos. Este antígeno presenta una amplia distribución entre las distintas poblaciones humanas, aunque está ausente en algunos grupos étnicos como los nativos de América Central y Meridional, África Ecuatorial y Meridional, Polinesia y Australia (Lopez-Larrea et al., 1998). HLA-B27 está directamente implicado en la patogénesis de las espondiloartropatías. La asociación ocurre en múltiples grupos étnicos independientemente del haplotipo particular. Además ratas transgénicas que expresan HLA-B27 y  $\beta_2m$  humana desarrollan espontáneamente una enfermedad inflamatoria similar a la EA (Hammer et al., 1990), que es dependiente del número de copias del transgén (Taurog et al., 1993) y ratones transgénicos que expresan B27 y son deficientes en  $\beta_2m$  murina, pero expresan  $\beta_2m$  humana también desarrollan artritis (Khare et al., 1997; Khare et al., 1996). Sin embargo, aunque la implicación de HLA-B27 parece clara, se desconoce aún cual es el mecanismo patogénico.

### **4.2 SUBTIPOS DE HLA-B27: ASOCIACIÓN DIFERENCIAL A ESPONDILITIS ANQUILOSANTE Y ESPECIFICIDAD PEPTÍDICA.**

Hasta el momento, se han identificado 38 variantes estructurales y funcionales de HLA-B27 que se diferencian en varios aminoácidos, generalmente situados en el sitio de unión de péptidos, y que se denominan subtipos. Entre éstos existe una asociación diferencial a EA. Así, mientras que B\*2705, B\*2702, B\*2704, B\*2707 (Armas et al., 1999; Gonzalez-Roces et al., 1997) se asocian a enfermedad, aunque se ha encontrado una excepción en la población grecochipriota en la que B\*2707 no está asociado a EA, (Varnavidou-Nicolaidou et al., 2004), B\*2706 y B\*2709 no lo hacen o lo hacen débilmente (D'Amato et al., 1995b; Lopez-Larrea et al., 1995; Nasution et al., 1997; Ren et al., 1997). La no asociación de B\*2709 a EA ha suscitado cierta

controversia. Este subtipo prevalece en Cerdeña, donde no está asociado a EA (D'Amato et al., 1995a; Paladini et al., 2005). También B\*2709 está presente en la Italia Continental en una frecuencia baja, donde se han encontrado pocos individuos con espondiloartropatías, y ninguno con EA (Ramos and Lopez de Castro, 2002). Recientemente, más estudios han complicado la epidemiología de este subtipo. Primero, se han encontrado dos individuos B\*2709 con EA (Cauli et al., 2007) (Olivieri et al., 2007). Segundo, en Cerdeña B\*2705 y B\*2709 segregan en diferentes haplotipos del MHC, lo que sugiere que genes no B27 del MHC podrían modular la falta de asociación de este alotipo a EA en esta población. Tercero, algunos marcadores del MHC, que mapean en regiones relacionadas con las NK, aparecen incrementados en los individuos B\*2705 y B\*2709 sanos, en comparación a los pacientes de EA B\*2705 positivos, sugiriendo un papel protector de estos genes (Cascino et al., 2007). Todos estos hallazgos apuntan a que B\*2709, por sí solo, no carece de papel patogénico. Sin embargo, hay que tener en cuenta otros factores. De los dos pacientes de EA B\*2709 positivos, uno era también B\*1403 (Cauli et al., 2007), que está asociado a enfermedad en Africa (Lopez-Larrea et al., 2002). El otro paciente presentaba colitis ulcerosa (Olivieri et al., 2007). La prevalencia de HLA-B27 entre pacientes de EA con enfermedad inflamatoria del intestino es más baja que entre pacientes sin dicha inflamación sugiriendo así, de nuevo, la presencia de genes no B27 en este paciente que pudieran ser responsables de la susceptibilidad a enfermedad. Que B\*2705 y B\*2709 segregan en diferentes haplotipos en Cerdeña, no parece explicar de manera fehaciente la falta de asociación de B\*2709 a enfermedad en esta población. Esto implicaría que el MHC contiene genes protectores capaces de anular el efecto patogénico de HLA-B27. El hallazgo del incremento entre individuos sanos B\*2705 y B\*2709 de genes relacionados con las NK sugiere que existen genes protectores responsables de la falta de asociación de B\*2709 a EA. Sin embargo, estos estudios tienen que ser confirmados en un número mayor de individuos y los efectos de los genes protectores en B\*2705 deben ser confirmados en más poblaciones.

La especificidad de HLA-B27 se caracteriza por la unión, casi siempre, de Arg en P2. Esta especificidad se debe al carácter polar de la subcavidad B, que está conservada en todos los subtipos, y viene principalmente determinada por el residuo Glu45 (Madden et al., 1992).

La posición C-terminal es la segunda posición más importante de anclaje de los péptidos de HLA-B27 y se acomoda en la subcavidad F. Sin embargo, no está tan

conservada como la P2. B\*2705 une péptidos con residuos C-terminales básicos, alifáticos y aromáticos. Esta flexibilidad se relaciona con la presencia de Asp77 y Asp116 (Madden et al., 1992). B\*2702 y B\*2704 tienen una especificidad en el residuo C-terminal restringida a residuos alifáticos y aromáticos. Sin embargo, B\*2704 es capaz de unir algunos péptidos con Arg (Lopez de Castro et al., 2004). La preferencia disminuida hacia residuos básicos que presentan estos dos alotipos, se debe a la ausencia de Asp77. B\*2702 presenta Asn77 y B\*2704, Ser77. B\*2706, B\*2707, y B\*2709 tienen una especificidad C-terminal restringida solamente a residuos alifáticos y aromáticos (excluyendo Tyr). B\*2709 puede ocasionalmente admitir péptidos con Tyr y quizás Arg en la posición C-terminal, con una frecuencia muy baja (Lopez de Castro et al., 2004). La especificidad restringida que tienen estos alotipos es debida a la falta de D116, que está cambiado a Y116 en B\*2706 y B\*2707 y a H116 en B\*2709. Los subtipos no asociados a EA unen casi exclusivamente péptidos con residuos C-terminales apolares, mientras que la mayoría de los asociados unen además péptidos con residuos básicos y Tyr. B\*2707 se comporta como los subtipos no asociados a EA en lo que respecta a su preferencia por residuos C-terminales apolares, pero difiere significativamente de B\*2706 y B\*2709 en su repertorio peptídico, debido a preferencias dispares en otras posiciones de anclaje (Gomez et al., 2006; Tieng et al., 1997). Esto sugiere que las diferencias en las propiedades de unión y presentación de péptidos entre estos subtipos podrían estar relacionadas con la asociación diferencial a enfermedad.

#### **4.3 HLA-B14 Y SU ASOCIACIÓN A ENFERMEDAD.**

Como se ha dicho, un rasgo principal de los ligandos de B27 es la presencia de Arg en P2 (Jardetzky et al., 1991), que se une a la subcavidad B del sitio de unión de péptido (Madden et al., 1991; Madden et al., 1992). Entre los antígenos de clase I, esta subcavidad está formada por residuos polimórficos por lo que pocos alotipos unen péptidos con Arg2. Por este motivo es interesante B\*3901, un alotipo que también une péptidos con este residuo (Falk et al., 1995), une algunos ligandos de HLA-B27 *in vitro* (Sobao et al., 1999) y se encuentra asociado a EA en Japón, en pacientes que son HLA-B27 negativos (Yamaguchi et al., 1995). En pacientes caucasoides, HLA-B39 está asociado con un tipo de artritis psoriásica que afecta a la columna vertebral (Crivellato and Zacchi, 1987), una forma que está muy asociada a HLA-B27 (Khan, 2002). Además el desarrollo de las espondiloartropatías en gorilas se ha correlacionado en estos

animales con la expresión de moléculas de clase I, que presentan péptidos con Arg2 (Urvater et al., 2001).

Recientemente, se ha determinado que B\*1403, un alotipo que sólo se ha encontrado en las poblaciones africanas de Camerún y Togo (Ellis et al., 2000; Lopez-Larrea et al., 2002), está fuertemente asociado a EA en la población togolesa, donde tanto la existencia de HLA-B27 como de la enfermedad son raros (Lopez-Larrea et al., 2002). En este estudio se evaluaron de forma clínica y genética 7 pacientes de EA y 4 (57%) eran B\*1403 positivos. La prevalencia de este alotipo en la población togolesa es menor del 1%. El alotipo B\*1402, que difiere de B\*1403 sólo en la posición 156 (Leu en B\*1402 y Arg en B\*1403), se encontró en el 2% de los controles sanos y ausente entre los pacientes de EA. B\*1402 tiene una amplia distribución poblacional, incluida la caucásica y nunca se ha visto asociado a enfermedad. B\*1402 une preferentemente péptidos con Arg en P2 (DiBrino et al., 1994). En el comienzo de esta tesis la especificidad peptídica de B\*1403 era desconocida. La disponibilidad de dos moléculas de HLA-B14 estructuralmente similares pero asociadas diferencialmente a enfermedad, permite estudiar diferentes parámetros relacionados con la susceptibilidad a enfermedad, en un sistema no B27.

## **5. HIPÓTESIS PATOGÉNICAS.**

La investigación actual sobre la patogenia de las espondiloartropatías se desarrolla generalmente en el marco conceptual de cuatro hipótesis básicas que se describen a continuación.

### **5.1 HIPÓTESIS DEL PÉPTIDO ARTRITOGÉNICO.**

Esta hipótesis surgió en 1990 (Benjamin and Parham, 1990) y está basada en la propiedad de HLA-B27 como molécula presentadora de antígenos, en el concepto de mimetismo molecular y en la idea de que la activación de respuestas de linfocitos T por medio de un antígeno externo puede resultar en autoinmunidad. HLA-B27 podría unir uno o más péptidos provenientes de proteínas bacterianas que generarían una respuesta de CTLs. Éstos podrían reaccionar cruzadamente con algún péptido propio que presentara mimetismo antigénico con péptidos bacterianos, rompiéndose de este modo la tolerancia. La respuesta contra el péptido propio produciría daño tisular e inflamación. Esta hipótesis está apoyada por múltiples evidencias indirectas, como la

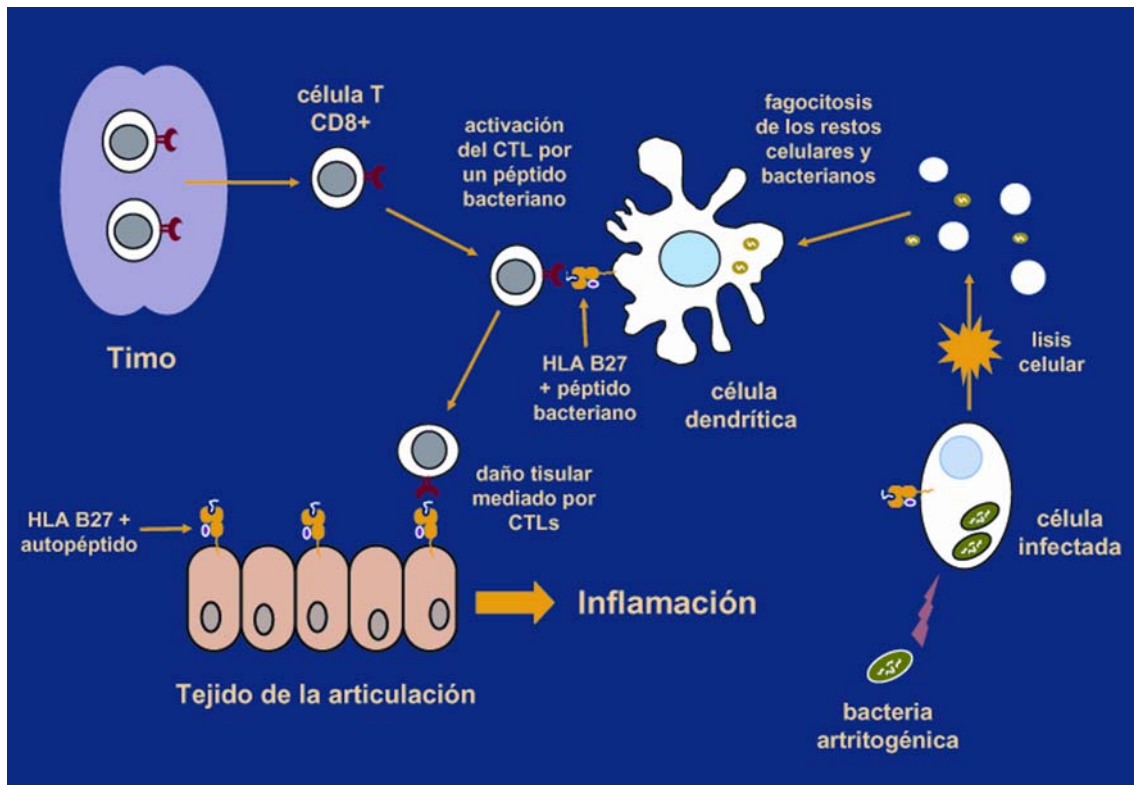


presencia de células T CD8<sup>+</sup> autorreactivas restringidas por HLA-B27 (Fiorillo et al., 2000; Hermann et al., 1993), o específicas de antígenos bacterianos, en líquidos sinoviales de pacientes (Hermann et al., 1993; Kuon et al., 2001; Ugrinovic et al., 1997) y la existencia de expansiones oligoclonales de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en articulaciones de individuos B27<sup>+</sup> con artritis reactiva iniciada poco después de un proceso infeccioso (Dulphy et al., 1999). Se han encontrado receptores de linfocitos T comunes entre pacientes con EA (May et al., 2002), lo que sugiere la existencia de un mismo agente activador en estos linfocitos, que podría ser el complejo formado por HLA-B27 y un péptido bacteriano.

La asociación diferencial de los subtipos de HLA-B27 a EA sugiere una implicación de los péptidos en la patogenia de la enfermedad, debido a la especificidad diferencial de unión de péptidos que presentan los distintos subtipos. Un péptido, ya sea bacteriano o propio, con características que posibiliten la unión a los subtipos asociados a EA, e impidan la unión a los subtipos no asociados, sería un candidato ideal a “péptido artrítogénico”. Alternativamente, se ha propuesto que un péptido presentado más eficientemente por los subtipos no asociados a enfermedad, y peor por los subtipos asociados, podría inducir tolerancia en los individuos B\*2706 y B\*2709, pero no en los individuos con subtipos asociados a EA. Así, la respuesta autoinmune inducida por un antígeno externo se daría en individuos en los que la expresión del autopéptido fuera muy baja, y no se hubiera producido tolerancia. Además, no habría reacción cruzada en individuos en los que se habrían eliminado los CTL autorreactivos, como consecuencia de la tolerancia generada hacia el autopéptido (Fiorillo et al., 2000).

La asociación diferencial de subtipos de HLA-B27 a EA ha suscitado numerosos estudios comparativos (Gomez et al., 2006; Ramos et al., 2002b; Sesma et al., 2002), de los respectivos repertorios peptídicos. Una variante de la hipótesis del péptido artrítogénico se basa en la presentación por HLA-B27 de péptidos provenientes de su propia molécula. HLA-B27 presenta en el dominio  $\alpha 2$  de su HC, una región (residuos 168-176) homóloga con proteínas de bacterias gram-negativas, lo que sugiere que el péptido artrítogénico podría ser un péptido derivado de la propia molécula de HLA-B27, presentado como ligando natural (Scofield et al., 1993). Se han encontrado dos péptidos derivados de dicha región entre los ligandos naturales de HLA-B27, el que incluye los residuos 169-179 y otro relacionado, con los residuos 169-181 (Alvarez et al., 2001; Boisgerault et al., 1996; Garcia et al., 1997). El primero de ellos es un ligando bastante abundante, pero tiene un papel patogénico cuestionable porque su presentación

por los distintos subtipos no se correlaciona con la asociación a enfermedad (Boisgerault et al., 1996; Ramos et al., 2002a). El péptido B27 (169-181) se ha identificado como ligando natural en B\*2705, B\*2704 y no se ha encontrado en B\*2706 y B\*2709 (Alvarez et al., 2001), pero su relación con la asociación a EA es incompleta, porque no se presenta por B\*2702 (Alvarez et al., 2001).



**Figura 4.** Esquema de la hipótesis del péptido artritogénico. Un CTL CD8<sup>+</sup> con especificidad por un antígeno bacteriano restringido por HLA-B27 puede ser activado por una célula dendrítica que le presente el péptido bacteriano, que puede adquirir tras fagocitar restos bacterianos. El mimetismo molecular entre el péptido bacteriano y un autopéptido podría desencadenar una respuesta cruzada del CTL contra células propias.

Adicionalmente, se ha identificado un péptido proveniente de la región intracitoplásmica de HLA-B27, como ligando natural de al menos tres de los subtipos asociados a enfermedad (B\*2702, B\*2704, B\*2705), que además no está presente en los repertorios de B\*2706 y B\*2709 (Ramos et al., 2002b). Dicho péptido presenta una gran homología con proteínas de *Chlamydia trachomatis* y otras bacterias artritogénicas. En un estudio reciente, la expresión de proteínas procedentes de *Chlamydia trachomatis* en células humanas HLA-B27 positivas, ha permitido identificar péptidos bacterianos que son procesados de manera endógena, presentados

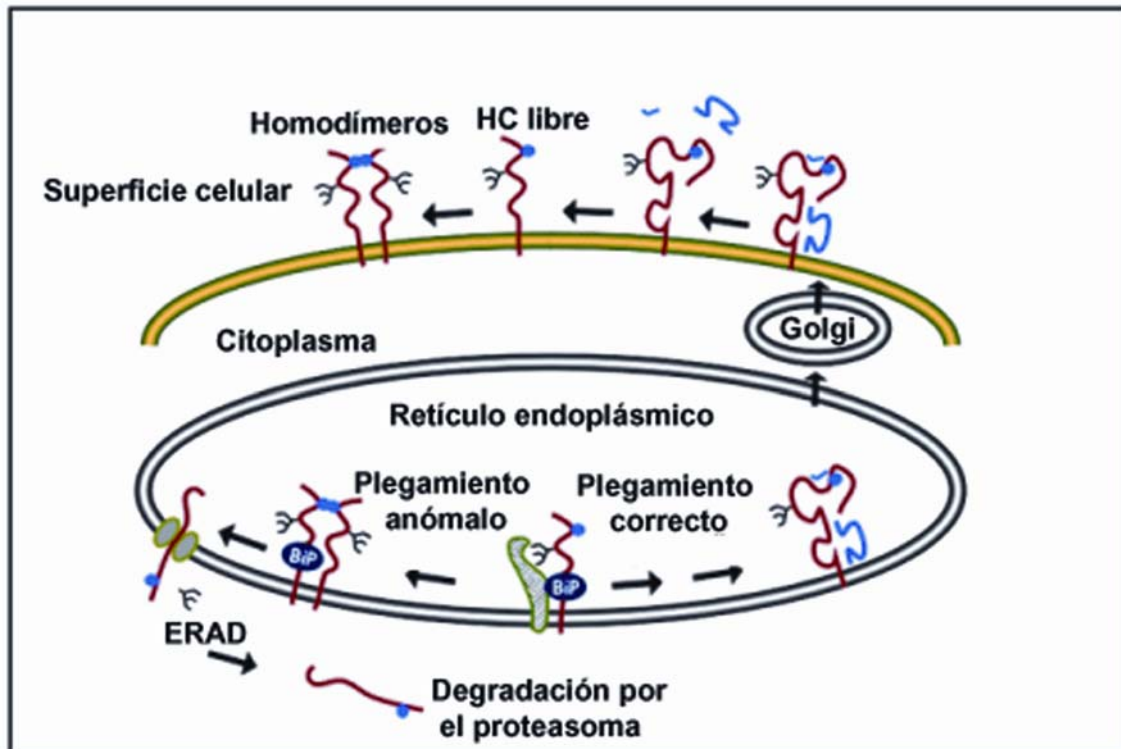
por B27 y que muestran mimetismo molecular con ligandos propios conocidos de esta molécula y con proteínas humanas (Cragnolini and Lopez de Castro, 2008).

A pesar de la abundante evidencia circunstancial, no se ha podido constatar la existencia de péptidos artritogénicos. La presencia de CTL autoinmunes en pacientes con espondiloartritis podría ser causa o consecuencia de la enfermedad y el papel de CTLs CD8<sup>+</sup> en la artritis inflamatoria asociada a HLA-B27 en ratas transgénicas ha sido seriamente cuestionado (May et al., 2003), al menos en este modelo animal. Esta hipótesis está esquematizada en la figura 4.

## **5.2 HIPÓTESIS DEL PLEGAMIENTO ANÓMALO DE HLA-B27.**

Esta hipótesis está basada en propiedades biológicas de HLA-B27 que son independientes de su capacidad de presentar antígenos. HLA-B\*2705 madura lentamente y su plegamiento tiende a ser anómalo, lo que provoca el acúmulo de HC libre en el RE (Mear et al., 1999). Este acúmulo puede señalar respuestas de estrés en el RE como ya se ha explicado. De esta manera, se desencadenarían procesos inflamatorios que pueden tener un papel patogénico en el desarrollo de la EA. En modelos de animales transgénicos de HLA-B27, tanto la necesidad de un alto número de copias (Taurog et al., 1993), como la ausencia de  $\beta_2m$  (Khare et al., 1996) para el desarrollo de la artritis inflamatoria, conducen a una acumulación de la HC en el RE y, por tanto, se explicarían por esta hipótesis. La HC mal plegada que se acumula en el RE forma homodímeros y multímeros (Dangoria et al., 2002) en los que participa la Cys67 y al menos la Cys164 (Antoniou et al., 2004). Estos homodímeros interactúan con el sensor de estrés BiP (Tran et al., 2004; Turner et al., 2005). Se ha sugerido que las características de maduración y plegamiento están determinadas, al menos parcialmente, por la estructura de la subcavidad B (Mear et al., 1999). No obstante, los subtipos de B27 no asociados a enfermedad tienen la misma subcavidad B. Recientemente, se ha descrito que existe una correspondencia incompleta entre la eficiencia de plegamiento de los subtipos de HLA-B27 y su asociación a EA (Galocha and Lopez de Castro, 2008). Así: B\*2705, B\*2702 y B\*2704 se pliegan más lenta e ineficientemente que B\*2706 Y B\*2709. Sin embargo, B\*2707 se pliega con la misma eficiencia que los subtipos no asociados a enfermedad. Entre los subtipos de HLA-B27 la eficiencia de plegamiento se correlaciona con la naturaleza del residuo 116, pero el efecto de dicho residuo es dependiente del contexto estructural y, por sí sólo, no determina exclusivamente la eficiencia de plegamiento (Galocha and Lopez de Castro, 2008). El

plegamiento lento no es exclusivo de HLA-B27. Existen diferencias importantes en las cinéticas de plegamiento de los alotipos de clase I (Hill et al., 1993; Neefjes and Ploegh, 1988). Por ejemplo, HLA-B51, -B52 y -B78 son más lentos en su plegamiento que HLA-B27, aunque estos alotipos carecen de Cys67 y la formación de homodímeros en el RE no ha sido analizada.



**Figura 5. Hipótesis del plegamiento anómalo.** Las cadenas pesadas de HLA-B27 recién sintetizadas son retenidas en el RE y permanecen asociadas a BiP y a calnexina y formando homodímeros. Los círculos azules indican las Cys67 expuestas. Éstas estarán más expuestas cuando las HC están mal plegadas. ERAD indica el proceso de retrotranslocación del RE al citosol, y está asociado con la deglicosilación de las moléculas de clase I y con la degradación por el proteasoma. La disociación del péptido o de la  $\beta_2m$  en la superficie celular puede dar lugar al malplegamiento de la HC y a la exposición de la Cys67, lo que favorece la formación de los homodímeros. La dimerización podría ocurrir en la superficie celular tras reciclamiento endosómico (Colbert, 2004).

La hipótesis del plegamiento anómalo no explicaría el papel demostrado de los linfocitos T  $CD4^+$  en la artritis inflamatoria espontánea en ratas transgénicas (Breban et al., 1996) ni el componente inmune de las espondiloartropatías humanas. Además, la acumulación de la cadena pesada mal plegada de B27 y la UPR se revirtieron mediante la sobreexpresión de  $\beta_2m$  humana en ratas transgénicas B27/ $\beta_2m$  humana. Estos animales desarrollan artritis, espondilitis y entesitis en igual o mayor grado que las ratas transgénicas convencionales, aunque no desarrollan colitis (Tran et al., 2006). La

hipótesis del péptido artritogénico y la del plegamiento anómalo no son necesariamente excluyentes. En la figura 5 se esquematiza la hipótesis del plegamiento anómalo.

### **5.3 OTRAS HIPÓTESIS:**

#### **5.3.1 MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR HOMODÍMEROS EN SUPERFICIE.**

Esta hipótesis de los homodímeros en superficie (Bowness, 2002) se basa en la capacidad que tiene B27 para formar homodímeros (Bird et al., 2003; Bowness, 2002) y multímeros de cadena pesada en superficie tras su disociación de la  $\beta_2m$  durante el reciclamiento endosomal (Kollnberger et al., 2002). Estas formas no canónicas de B27 son reconocidas por receptores leucocitarios como KIR3DL1, KIR3DL4 e ILT4 (Allen et al., 2001; Kollnberger et al., 2002). Se ha propuesto que las interacciones entre estos receptores y los homodímeros podrían tener un papel inmunomodulador y alterar las respuestas normales mediadas por el HLA de clase I. En tejidos donde se dan situaciones de tensión, como en las articulaciones puede haber una modulación mediada por citoquinas (Edwards et al., 2000). Estos datos han sugerido que el desarrollo de la espondiloartritis podría venir determinado por una regulación anómala de la respuesta inmune contra bacterias artritogénicas u otros posibles patógenos. Esta hipótesis no explica la asociación diferencial de subtipos de HLA-B27 con EA, ya que los subtipos no asociados a enfermedad poseen también las características estructurales necesarias para formar homodímeros, especialmente residuos de Cys libres, como Cys67.

#### **5.3.2 DEPÓSITOS DE $\beta_2m$ .**

Relacionada con la aparición de un proceso inflamatorio independiente de la función presentadora de antígeno de HLA-B27, se ha formulado una hipótesis que postula la aparición de inflamación por depósito de  $\beta_2m$  en las articulaciones (Uchanska-Ziegler and Ziegler, 2003). La base de esta hipótesis es el potencial inflamatorio de  $\beta_2m$  potencialmente acumulada en el sinovio y cierto paralelismo existente entre la EA y la amiloidosis por depósito de  $\beta_2m$  asociada a hemodiálisis. Se postula que la estabilidad del heterodímero HLA-B27- $\beta_2m$ , sería distinta en los subtipos diferencialmente asociados a EA. Los subtipos asociados a enfermedad experimentarían una disociación relativamente alta de los complejos HLA-B27/péptido en la superficie

celular. La  $\beta_2m$  se acumularía de modo progresivo y quedaría atrapada en el tejido sinovial, lo que conduciría a la formación de amiloide y a la modificación de éste por AGE (*advanced glycation end-products*). Se produciría una interacción entre el receptor para AGE (RAGE) expresado en la superficie de fagocitos mononucleares, y amiloide de  $\beta_2m$  o de AGE- $\beta_2m$  que induciría la activación de NF $\kappa$ B, y éste de citoquinas proinflamatorias. B\*2706 y B\*2709 serían más estables, sin embargo, no hay evidencia de depósitos amiloides de  $\beta_2m$  en las articulaciones afectadas ni en la espondiloartropatía humana ni en la artritis asociada a HLA-B27 en ratas transgénicas. Tampoco hay evidencia de una disociación diferencial significativa de los subtipos de HLA-B27, puesto que la expresión de HC libre en la superficie celular es similar en todos los subtipos analizados (Vazquez and Lopez de Castro, 2005). En esta hipótesis, tampoco se explica la participación de linfocitos T en las espondiloartropatías humanas y en la artritis en ratas transgénicas. Por otra parte, a pesar de ciertas analogías, la amiloidosis de  $\beta_2m$  y las espondiloartropatías tienen condiciones clínicas y patológicas muy distintas.

# *Objetivos*

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de esta tesis ha sido estudiar la base molecular y el posible papel patogénico de HLA-B\*1403 en la espondilitis anquilosante, mediante el análisis molecular y comparativo con B\*1402 y B\*2705.

### **OBJETIVO 1:**

1.1- Analizar la especificidad de unión peptídica de los subtipos de HLA-B\*1402 y HLA-B\*1403, para determinar el solapamiento de sus repertorios peptídicos y las características estructurales de los ligandos compartidos y específicos de subtipo.

1.2- Determinar el solapamiento peptídico entre B\*1403 y B\*2705 para establecer posibles características comunes a los ligandos compartidos entre los dos subtipos asociados a enfermedad.

1.3- Analizar la relación entre el solapamiento peptídico y el solapamiento antigénico de B\*1402, B\*1403 y B\*2705.

### **OBJETIVO 2:**

Analizar las propiedades de plegamiento, maduración y estabilidad de B\*1402 y B\*1403, comparándolas con las de B\*2705.



# *Materiales y Métodos*

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. LÍNEAS CELULARES Y TRANSFERENCIA DE GENES MEDIANTE DNA.

HMy2.C1R (C1R) es una línea celular linfóide humana que presenta bajos niveles de expresión de sus antígenos de clase I endógenos (Zemmour et al., 1992). El transfectante C1R-B\*2705, con una expresión de HLA-B27 alta, ha sido descrito previamente (Calvo et al., 1990). Los transfectantes C1R-B\*1402 y B\*1403 se han obtenido de la siguiente manera. Se purificó RNA de la línea celular linfoblastoide (LCL) R56 (HLA-A2, A11; B\*1402, B\*2702). Se obtuvo el cDNA completo de B\*1402 mediante PCR, utilizando dos oligonucleótidos específicos del *locus* B que hibridan con los extremos 5' y 3': 5'-GCG GAG CAG CGG AGA GCC TAC-3' y 3'-GTA GGC TCT CCG CTG CTC CGC-5' (Isogen Sintesis Report). Se clonó el fragmento de cDNA en el vector pCRII (Invitrogen) y se confirmó que la secuencia era la correspondiente a B\*1402. Después se subclonó en el vector pCDNA3 (Invitrogen), en los sitios de restricción BamHI y EcoRV, se confirmó la secuencia de nuevo y se transfectó en las células C1R por electroporación a 250 V y a 960  $\mu$ F como se ha descrito previamente (Calvo et al., 1990). B\*1402 y B\*1403 se diferencian en un único nucleótido en la posición 156 (CTG a CGG). El gen que codifica para B\*1403 se obtuvo por mutagénesis dirigida a partir del cDNA de B\*1402 obtenido de la línea celular R56 y se procedió de forma similar a la descrita para B\*1402. Los transfectantes se cultivaron en medio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM) suplementado con 7.5% de suero fetal bovino (FBS) (ambos de Invitrogen) o en medio RPMI-1640 suplementado con 2 mM L-glutamina (Gibco., Life Technologies, Paisley, U. K.) y 10% de FBS.

## 2. ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Se han utilizado los anticuerpos monoclonales (mAb) W6/32 (IgG2a, específico para un determinante monomórfico de HLA-A, -B y C) (Barnstable et al., 1978). BBM1 (IgG2b, específico para  $\beta_2m$  humana) (Brodsky et al., 1979). HC10 (IgG2a, que reconoce las formas monoméricas y oligoméricas de HC libre de MHC de clase I). AF8

(IgG1 específico para calnexina humana) y PaSta-1 (mAb de ratón crecido contra baculovirus que expresa Tpn, y reconoce Tpn) (Dick et al., 2002). También se ha utilizado el mAb anti- $\gamma$ -tubulina (IgG1) GTU88 (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany).

### **3. CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Apróximadamente  $6 \times 10^4$  células de los transfectantes de C1R-B\*1402, -B\*1403 y B\*2705 se lavaron con PBS dos veces, se incubaron durante 30 minutos con concentraciones saturantes de W6/32 (sobrenadante de cultivo), BBM1 o HC10 (anticuerpos purificados) en un volumen final de 50  $\mu$ l. Tras dos lavados con PBS las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de antisuero de conejo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC, Calbiochem). Después de 30 minutos de incubación las células se lavaron dos veces con tampón salino de fosfato (PBS). Todo el proceso se realizó a 4 °C. La citometría de flujo se llevó a cabo en un equipo FACSCalibur usando el software CellQuest (Beckton Dickinson, Mountain View, CA).

### **4. AISLAMIENTO Y FRACCIONAMIENTO DE LOS PÉPTIDOS UNIDOS A HLA-B\*1402, -B\*1403 Y -B\*2705.**

Los ligandos de HLA-B14 y -B27 se aislaron a partir de  $10^{10}$  células de los transfectantes C1R-B\*1402, -B\*1403 y -B\*2705 (cultivadas en DMEM suplementado con 7.5 % de FBS). Las células se lisaron en TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%,  $\text{NaN}_3$  0.2% pH 7.5 en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (leupeptina 10  $\mu$ g/ml, pepstatina 2  $\mu$ g/ml, aprotinina 2.5  $\mu$ g/ml, iodoacetamida 18.5  $\mu$ g/ml, EDTA 1 mM y PMSF 2 mM) durante 1 hora a 4°C. El lisado se sometió a centrifugación diferencial durante 10 minutos a 1000 xg y durante 1 hora a 100000 xg. El sobrenadante se aplicó sobre una precolumna de sefarosa bloqueada con TRIS pH 7.5 y, posteriormente, sobre una columna de sefarosa en la que está acoplado el mAb W6/32. Tras lavar exhaustivamente la columna se eluyeron las moléculas de HLA-B27 con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1% y se filtraron a través de un centricon 3 (Amicon, Beverly, MA) para separar los péptidos de la  $\beta_2$ m y la HC. La mezcla peptídica se fraccionó mediante HPLC de fase reversa en un equipo Waters Alliance (Waters, Milford, MA) mediante una columna Vydac 218TP52  $\text{C}_{18}$  (0.21 $\times$ 25 cm) con un tamaño de poro de 5 $\mu$ m (Vydac, Hesperia, CA). La separación se realizó a un flujo constante de 100  $\mu$ l/min en un gradiente consistente en condiciones isocráticas de solvente A (TFA

0.08% en agua) durante 10 minutos, un incremento lineal de 0 a 44% de solvente B (acetonitrilo 80% y TFA 0.075% en agua) durante 90 minutos y un segundo incremento de 44 a 100% de solvente B durante 35 minutos. La cromatografía se monitorizó midiendo la absorbancia a 210 y 280 nm simultáneamente. Se recogieron fracciones de 50  $\mu$ l y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

## 5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SECUENCIACIÓN.

Los ligandos de HLA-B14 y B\*2705 aislados de las fracciones de HPLC se analizaron mediante espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*) MALDI-TOF utilizando un equipo MALDI-TOF Reflex III<sup>TM</sup> equipado con una fuente SCOUT<sup>TM</sup> (ambos de Bruker Daltoniks, Bremen, Alemania) operando en modo reflector positivo. Las fracciones de HPLC se secaron en un *SpeedVac* y se resuspendieron en 0.5  $\mu$ l de TA (acetonitrilo 33% y TFA 0.1% en agua). Posteriormente se cargaron sobre una placa MTP AnchorChip<sup>TM</sup> 600/384 TF (Bruker Daltoniks) y, una vez secas, se añadieron 0.5  $\mu$ l de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico a una concentración de 1 mg/ml en TA.

La secuenciación peptídica por MS/MS se llevó a cabo mediante nanoelectrospray acoplado a una trampa iónica cuadrupolar en un equipo LCQ usando el software Xcalibur 2.0 (Finnigan Thermoquest, San Jose, CA) como se describió anteriormente (Marina et al., 1999; Yague et al., 1998). Algunas secuencias se obtuvieron en un espectrómetro de masas Esquire 3000<sup>Plus</sup> después de separar las muestras por cromatografía en línea. Las muestras se disolvieron en solvente A (ácido acético al 0.5%), se cargaron en una columna (100 nm X 100  $\mu$ M de diámetro interno) empaquetada con bolas Kromasil C18 de 5  $\mu$ M (EKA Chemicals, Bohus, Sweden) y se fraccionaron en un sistema de cromatografía Famos-Switchos-Ultimate (LCPackings, the Netherlands) con un gradiente lineal de 45 minutos al 5-30% de solvente B (acetonitrilo 90%, ácido acético al 0.5%) a 500 nl/min. Los espectros MS/MS se obtuvieron acoplando los modos MS con MS/MS mediante exclusión dinámica. Algunas muestras se analizaron usando el modo Multiple Reaction Monitoring, que permite secuenciar las masas seleccionadas. La secuenciación se hizo utilizando el software Biotools 2.2 (Bruker Daltoniks). La interpretación de los espectros MS/MS de fragmentación se realizó manualmente pero asistida por varios paquetes de software que incluyen la herramienta MASCOT 2.1 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com), Matrix Science Ltd., London) y el *MSProduct*, una herramienta del paquete del Protein Prospector (Clauser

et al., 1999). La asignación de proteínas parentales a los ligandos secuenciados de B14 y B27 se realizó basándose en la obtención de una identidad total entre el ligando y una única secuencia proteica de la base de datos UniProtKB ([www.expasy.org/sprot](http://www.expasy.org/sprot)), utilizando la aplicación Fasta ([www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html](http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html)). Si alguna secuencia presentaba ambigüedad, se confirmó mediante la fragmentación del correspondiente péptido sintético.

## 6. CTLs.

Los CTLs alorreactivos que se generaron contra B\*1402 se obtuvieron de varios donantes HLA-B14 negativos tras la estimulación con la LCL LWAGS (HLA-A\*3301, B\*1402), a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificadas con gradiente de Ficoll. La primera semana se estimularon alrededor de  $10^6$  PBMC *in vitro* con una mezcla de  $10^5$  LCL como estimuladoras y  $10^6$  PBMC, previamente irradiadas con 50 y 80 Gy. La LCL es la célula diana que presenta constitutivamente el alotipo de HLA estimulador. Después de una semana, las células se clonaron por dilución límite de las células T estimuladas en placas de 96 pocillos que contenían 2000 LCL irradiadas como estimuladoras y 20000 PBMCs irradiadas por pocillo, en presencia de 30 unidades/ml de interleukina 2 recombinante (IL2r) (por cortesía de Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ). Tras analizar a qué dilución teórica estaban clonadas las células, se expendieron los pocillos seleccionados y su especificidad se determinó mediante ensayos de citotoxicidad con  $^{51}\text{Cr}$  contra dianas C1R-B\*1402. Se seleccionaron los CTLs capaces de lisar la célula C1R transfectada sin lisar la célula no transfectada.

Tanto los cultivos de linfocitos como los clones de CTLs generados, fueron crecidos en suspensión en, medio *Iscove's modified Dulbecco* con Glutamax I (IMDM) con glutamax I (Life Technologies), suplementado con 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de sulfato de estreptomina y 0.05 mg/ml de gentamicina (todos de Sigma-Aldrich) y 14% de FBS (Life Technologies). Los CTLs se crecieron en el mismo medio y se reestimularon semanalmente en presencia de IL2r. Los clones contra B\*2705 se generaron de la misma forma con algunos cambios. Las PMBCs se estimularon con R15 (HLA-A3, B\*2705, B35) o con LG15 (HLA-A32, B\*2705). Otros clones descritos previamente también se utilizaron (Lopez et al., 1994).

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo aplicando el test  $\chi^2$  con la corrección de Yates o el test exacto de Fisher, dependiendo del tamaño de las muestras comparadas. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 8. WESTERN BLOT.

Se lisaron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células en 0.5% NP-40, Tris-HCl 50 mM pH 7.4,  $MgCl_2$  5 mM, en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche, Mannheim, Germany). Los lisados se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% en condiciones reductoras y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se reveló la HC de clase I y  $\gamma$ -tubulina con HC10 o con el mAb anti  $\gamma$ -tubulina, respectivamente, usando un antisuero de cabra anti-ratón (Ig (H+L)-HRP) conjugado con peroxidasa (Southern Biotech).

## 9. MARCAJE METABÓLICO E INMUNOPRECIPITACIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE MHC DE CLASE I.

Aproximadamente  $3 \times 10^7$  células crecidas en RPMI-1640 suplementado con 2 mM L-glutamina al 10% de FBS, se incubaron en DMEM (Gibco) sin metionina ni cisteína, durante 45 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, las células se marcaron (pulso) en el mismo medio, con 500-1000  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $[^{35}\text{S}]\text{Met/Cys}$ , (Amersham) a 37°C durante los tiempos indicados y se hicieron cazas a distintos tiempos, en RPMI suplementado con Met/Cys 1mM no radiactiva a 37°C. Tras cada caza las células se centrifugaron (16000xg), se resuspendieron en 50  $\mu\text{l}$  de PBS, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior análisis. Las células se lisaron en 0.5% NP-40, Tris-HCl 50 mM pH 7.4,  $MgCl_2$  5 mM en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) durante 20 minutos a 4°C. Los lisados se centrifugaron (16000 xg, 10 minutos, 4°C) y se pre-aclararon tres veces, con 80  $\mu\text{l}$  de bolas de sefarosa CL-4B (Sigma), y 3  $\mu\text{l}$  de suero de ratón durante 60 minutos a 4°C. Seguidamente, se inmunoprecipitaron con el mAb específico indicado y 70  $\mu\text{l}$  de bolas de proteína A sefarosa (Sigma) durante 60 minutos. Los lisados, se normalizaron a igual cantidad de proteína marcada con  $^{35}\text{S}$ , mediante la valoración de la

radioactividad presente en las precipitaciones, previa incubación con ácido tricloroacético al 5% de una parte de cada una de las muestras por triplicado. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con 0.5% NP-40, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM y las proteínas, extraídas en el tampón de carga (TRIS-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0.1% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1%), se desnaturalizaron a 95°C y se separaron mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones reductoras. En los ensayos de deglicosilación la Endoglicosidasa H<sub>f</sub> (Endo H) (New England Biolabs, Beverly, MA) se añadió a los inmunoprecipitados siguiendo el protocolo de la casa comercial. Los geles se procesaron por fluorografía usando DMSO-PPO y se expusieron a películas AGFA-CURIS RP2 PLUS<sup>®</sup>. Las autorradiografías se escanearon y cuantificaron usando el software TINA 2.09e<sup>®</sup> (Isotopenmeßgeräte. GmbH).

# *Resultados*



# RESULTADOS

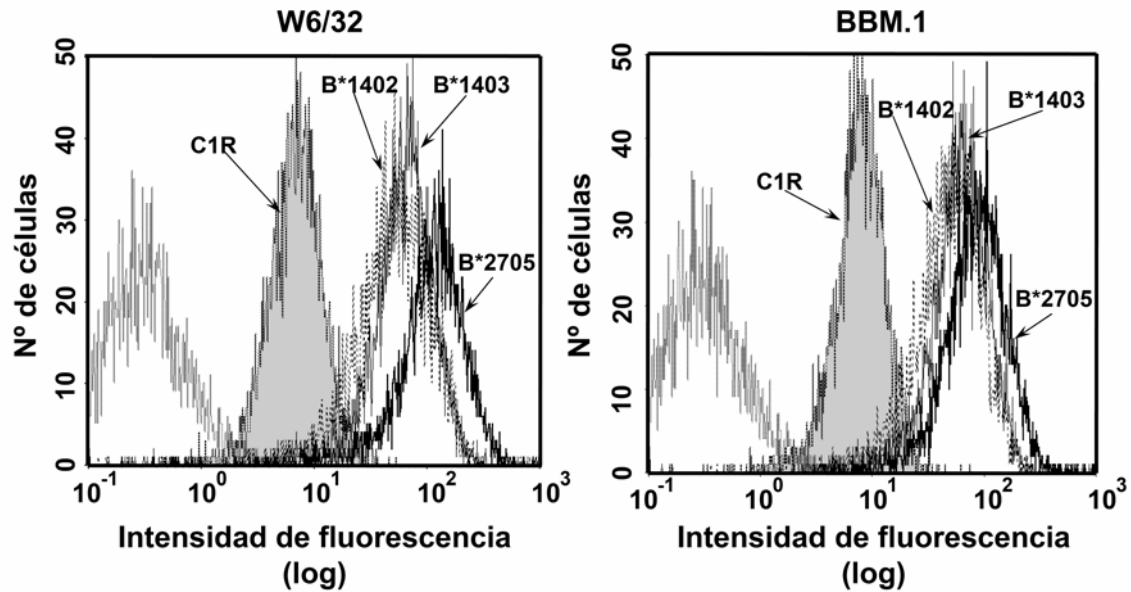
## 1. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS DE B\*1402, B\*1403 Y B\*2705.

La disponibilidad de dos subtipos de HLA-B14 estructuralmente similares pero asociadas diferencialmente a EA, permite buscar diferencias peptídicas que puedan correlacionarse con la susceptibilidad a enfermedad en un sistema distinto al de HLA-B27. De igual manera, permite buscar similitudes entre HLA-B27 y otra molécula de clase I relativamente distante (B\*1403 y B\*2705 difieren en 19 aminoácidos localizados en la región extracelular de la molécula en las regiones  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), pero asociada a enfermedad.

En la primera parte de esta tesis se compararon las especificidades de unión peptídica de B\*1402 y B\*1403 para determinar el solapamiento entre sus repertorios peptídicos constitutivos y los rasgos estructurales de los ligandos compartidos y específicos de subtipo. También, se determinó que el solapamiento peptídico entre B\*1403 y B\*2705 es muy bajo, aunque hay algunos péptidos comunes y se definieron las bases moleculares de sus diferencias peptídicas. Finalmente, se utilizaron CTLs aloespecíficos para analizar la relación entre el solapamiento peptídico y de epítomos entre B\*1402, B\*1403 y B\*2705. Los CTLs alorreactivos reconocen un amplio espectro de los péptidos unidos constitutivamente a los antígenos de clase I (Heath et al., 1991; Rotzschke et al., 1991; Wang et al., 1998).

### 1.1 B\*1402 Y B\*1403 PRESENTAN UNA GRAN DISPARIDAD ENTRE SUS REPERTORIOS PEPTÍDICOS CONSTITUTIVOS.

Los repertorios peptídicos de B\*1402 y B\*1403 se aislaron de sus correspondientes transfectantes de C1R por inmunoprecipitación y extracción ácida. La expresión en superficie de B\*1402 y B\*1403 en dichos transfectantes fue similar (Figura 6).

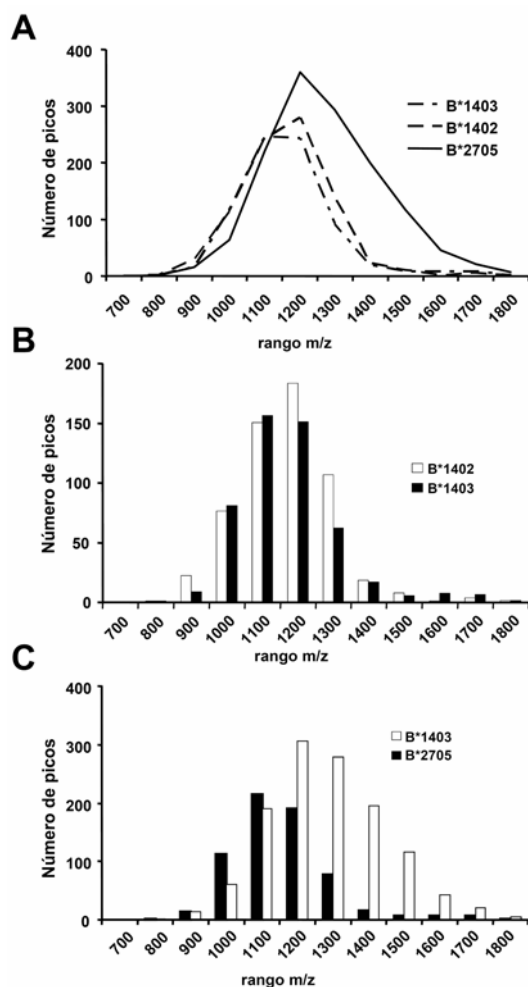


**Figura 6. Análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de los transfectantes C1R-B\*1402, -B\*1403 y -B\*2705 usando los anticuerpos monoclonales W6/32 y BBM.1.** Los controles incluyen las células sin transfectar teñidas con antisuero de conejo anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (histogramas de la izquierda) y las células sin transfectar (sombreadas) teñidas con los anticuerpos monoclonales indicados. Se muestra un experimento representativo de tres independientes. Los valores medios de la fluorescencia de los tres experimentos con sus desviaciones estándar fueron los siguientes: Con W6/32: C1R,  $7 \pm 1$ ; B\*1402,  $49 \pm 7$ ; B\*1403,  $71 \pm 7$ ; B\*2705,  $129 \pm 10$ . Con BBM.1: C1R,  $9 \pm 2$ ; B\*1402,  $44 \pm 6$ ; B\*1403,  $61 \pm 7$ ; B\*2705,  $91 \pm 4$ .

Los repertorios peptídicos se separaron por HPLC en carreras consecutivas en las mismas condiciones y la composición peptídica de las fracciones individuales se analizó por espectrometría de masas de MALDI-TOF. El espectro de cada fracción de HPLC de un subtipo se comparó con el de la equivalente en el otro subtipo y también con los de las fracciones anterior y posterior. Esto se hizo para tener en cuenta las ligeras variaciones en los tiempos de retención que pudiese haber entre ambas cromatografías. Los picos con el mismo valor de masa/carga ( $m/z$ )  $\pm 0.8$  se asignaron como la misma especie molecular y los picos que sólo aparecían en uno de los dos subtipos, como específicos de aquél en donde se encontraban. Los péptidos con la misma  $m/z$  de estos repertorios peptídicos serían ligandos idénticos, aunque ésto debe ser confirmado formalmente mediante secuenciación. Cuando hablamos de  $m/z$  en espectrometría de masas de MALDI-TOF, en realidad podemos hablar de masa ( $M+H^+$ ) porque las señales corresponden principalmente a péptidos de carga uno. Esta estrategia experimental se ha usado en varios estudios en nuestro laboratorio para determinar el solapamiento

peptídico entre subtipos de HLA-B27 (Gomez et al., 2006; Ramos et al., 2002b; Sesma et al., 2002).

Se llevaron a cabo dos comparaciones independientes y el solapamiento peptídico entre B\*1402 y B\*1403 se presentó como la media de los dos experimentos (Tabla 1). Se contabilizaron un total de 846 especies moleculares en el caso de B\*1402 y 771 en el caso de B\*1403. De éstos, 272 se detectaron en ambos repertorios (32-35%), 574 (68%) se detectaron sólo en el repertorio de B\*1402, y 499 (65%) sólo en él de B\*1403. La distribución de tamaños de los ligandos de B\*1402 y B\*1403 es muy parecida y muestran la distribución gaussiana típica de los ligandos que se unen a MHC de clase I (Figura 7A), con una media de masa molecular de 1113 y 1109 Da para B\*1402 y B\*1403, respectivamente. Además, tanto la media de las masas moleculares (Tabla 1) como la distribución de tamaños de los ligandos específicos de subtipo son muy similares en ambos grupos (Figura 7B).



Estos resultados indican que B\*1402 y B\*1403 unen repertorios peptídicos muy diferentes a pesar de la similitud estructural tan estrecha que presentan, sin embargo,

esto tiene un efecto pequeño en el tamaño de los péptidos. El cambio del residuo 156 entre B\*1403 y B\*1402, permite que sólo un 32% de los ligandos de este último subtipo se siga uniendo a B\*1403, impide la unión del 68%; y además, hace que un 65% de los ligandos no se encuentren en B\*1402.

	Experimento 1		Experimento 2		Media	
	B*1402	B*1403	B*1402	B*1403	B*1402	B*1403
<b>Péptidos totales comparados</b>	782	742	909	800	<b>846</b>	<b>771</b>
<b>Péptidos compartidos</b>	319 (41%)	319 (43%)	225 (25%)	225 (28%)	<b>272 (32%)</b>	<b>272 (35%)</b>
<b>Péptidos específicos</b>	463 (59%)	423 (57%)	684 (75%)	575 (72%)	<b>574 (68%)</b>	<b>499 (65%)</b>
<b>Masa media de los péptidos totales</b>	1113 Da	1104 Da	1112 Da	1114 Da	<b>1113 Da</b>	<b>1109 Da</b>
<b>Masa media de los péptidos compartidos</b>	1100 Da	1100 Da	1092 Da	1092 Da	<b>1096 Da</b>	<b>1096 Da</b>
<b>Masa media de los péptidos específicos</b>	1122 Da	1108 Da	1119 Da	1123 Da	<b>1121 Da</b>	<b>1116 Da</b>

**Tabla 1. Comparación de los ligandos naturales unidos a B\*1402 y B\*1403.** Se hicieron dos comparaciones independientes de los repertorios peptídicos de los dos subtipos de HLA-B14 y los resultados finales se dieron como la media de ambos experimentos. En la comparación se contabilizó el total de péptidos comparados, los péptidos compartidos, los péptidos específicos de subtipo. Se calcularon: las masas medias de los péptidos totales, compartidos y específicos.

## 1.2 HLA-B14 y HLA-B27 PRESENTAN UN BAJO SOLAPAMIENTO PEPTÍDICO.

Los repertorios peptídicos de B\*1402 y B\*1403 se compararon con el de B\*2705 usando la misma estrategia que para los dos subtipos de HLA-B14. Se contabilizaron un total de 1.343 especies moleculares para B\*2705 y, tras el análisis comparativo se vio que B\*1402 y B\*1403 difieren de B\*2705 en un 88% y 85% de sus repertorios peptídicos, respectivamente (Tabla 2). Estos resultados sugieren que B\*1402 y B\*1403 comparten sólo el 12% y el 15% de sus ligandos, respectivamente, con B\*2705. Aún así, esta estimación es mínima porque una comparación basada en tiempos de retención y masas moleculares es tanto más inexacta en reflejar identidad peptídica cuanto más diferentes sean los repertorios peptídicos que se comparan. Se hizo un estudio de seis pares peptídicos que habían sido secuenciados de B\*1403 y B\*2705 atendiendo a su tiempo de retención y a sus masas moleculares y se vio que 2 (33%) y 4 (66.7%) correspondían a péptidos idénticos y diferentes, respectivamente. Cuando estos resultados se extrapolaron al total del repertorio peptídico, se vio que el solapamiento real entre el repertorio de B\*2705 y B\*1403 sería:  $(8 \times 0.333)\% = 2.7\%$  y el solapamiento entre B\*1403 y B\*2705:  $(15 \times 0.333)\% = 5\%$ . La media de las masas moleculares del total de los ligandos unidos a B\*2705 es significativamente más alta (1222 Da) que la de los péptidos unidos a B\*1402 y B\*1403 (1113 y 1110 Da,

respectivamente). Estos resultados sugieren que hay diferencias notorias en la composición de la cadena lateral de los ligandos, en la longitud peptídica, o en ambas características, entre los repertorios unidos a B14 y B27 (figura 7A). Ello se aprecia de forma clara en la distribución de tamaños de los péptidos unidos diferencialmente a B\*2705 y a B\*1402 o B\*1403 (Figura 7C). Los péptidos específicos de B14 se distribuyen principalmente en la zona de bajo peso molecular y los de B\*2705 en la zona de alto peso molecular. La media de las masas moleculares de los ligandos compartidos entre B14 y B\*2705 (1127 y 1145 Da, respectivamente) es algo mayor que la media del total de los ligandos de B\*1402 y B\*1403 y claramente menor que en B\*2705 (Tabla 2).

	Experimento 1		Experimento 2		Media	
<b>B*1402/B*2705</b>	B*1402	B*2705	B*1402	B*2705	<b>B*1402</b>	<b>B*2705</b>
<b>Péptidos totales comparados</b>	782	1132	909	1553	<b>846</b>	<b>1343</b>
<b>Péptidos compartidos</b>	90 (12%)	90 (8%)	114 (13%)	114 (7%)	<b>102 (12%)</b>	<b>102 (8%)</b>
<b>Péptidos específicos</b>	692 (88%)	1042 (92%)	795 (87%)	1439 (93%)	<b>744 (88%)</b>	<b>1241 (92%)</b>
<b>Masa media de los péptidos totales</b>	1113 Da	1216 Da	1112 Da	1227 Da	<b>1113 Da</b>	<b>1222 Da</b>
<b>Masa media de los péptidos compartidos</b>	1136 Da	1136 Da	1118 Da	1118 Da	<b>1127 Da</b>	<b>1127 Da</b>
<b>Masa media de los péptidos específicos</b>	1110 Da	1223 Da	1112 Da	1236 Da	<b>1111 Da</b>	<b>1230 Da</b>
	Experimento 1		Experimento 2		Media	
<b>B*1403/B*2705</b>	B*1403	B*2705	B*1403	B*2705	<b>B*1403</b>	<b>B*2705</b>
<b>Péptidos totales comparados</b>	739	1132	776	1553	<b>758</b>	<b>1343</b>
<b>Péptidos compartidos</b>	125 (17%)	125 (11%)	95 (12%)	95 (6%)	<b>110 (15%)</b>	<b>110 (8%)</b>
<b>Péptidos específicos</b>	614 (83%)	1007 (89%)	681 (88%)	1458 (94%)	<b>648 (85%)</b>	<b>1233 (92%)</b>
<b>Masa media de los péptidos totales</b>	1105 Da	1216 Da	1115 Da	1227 Da	<b>1110 Da</b>	<b>1222 Da</b>
<b>Masa media de los péptidos compartidos</b>	1132 Da	1132 Da	1157 Da	1157 Da	<b>1145 Da</b>	<b>1145 Da</b>
<b>Masa media de los péptidos específicos</b>	1100 Da	1227 Da	1109 Da	1232 Da	<b>1105 Da</b>	<b>1230 Da</b>

**Tabla 2. Comparación de los ligandos naturales unidos a B\*1402, B\*1403 y B\*2705.** Las comparaciones entre los subtipos de HLA-B14 y B\*2705 se llevaron a cabo realizando dos comparaciones independientes y dando los resultados finales como la media de los dos experimentos. Se compararon los repertorios peptídicos de B\*1402 y B\*2705 y los repertorios peptídicos de B\*1403 y B\*2705. El conteo se llevó a cabo de la misma manera que para los subtipos de HLA-B14 (ver tabla 1).

El número de iones que se contabilizaron en B\*1402 y B\*1403 fue consistentemente menor que en B\*2705 en todos los experimentos (Tabla 2). Hay varias explicaciones posibles para este resultado. Podría ser consecuencia de la mayor expresión en superficie de B\*2705 comparada con la de los subtipos de HLA-B14 (Figura 6). Sin embargo, esta alternativa es improbable pues los rendimientos peptídicos obtenidos con los diferentes repertorios fueron similares (datos no mostrados). La segunda posibilidad sería que una fracción significativa de los péptidos unidos a B14 no pudiera disolverse en el TFA usado para la extracción de péptidos. Esto es improbable

porque el TFA es un disolvente muy eficaz para péptidos cortos, en el rango de los ligandos de MHC de clase I, cuya carga neta es siempre positiva, ya que los grupos ácidos están protonados a pH ácido. La tercera posibilidad sería que un número significativo de ligandos de B14 escapase a la detección por espectrometría de masas de MALDI-TOF debido a la carga positiva relativamente baja que presentan. Aunque no existe una razón obvia para este supuesto, no se puede excluir formalmente y no se ha comprobado en este estudio. Por último, es posible que el repertorio peptídico de B14 sea realmente más pequeño que el de B\*2705. Esto podría ser consecuencia de un uso restringido de los residuos en un gran número de posiciones entre los ligandos de B\*1402 y B\*1403, como se mostrará posteriormente. En conjunto, estos resultados indican que B\*2705 comparte con los subtipos de B14 una porción pequeña de su repertorio peptídico constitutivo y que una péptidos de mayor masa molecular. Además, los resultados son consistentes con que B\*2705 una un repertorio peptídico constitutivo mayor que B\*1402 y B\*1403.

### **1.3 LOS LIGANDOS DE B\*1402 Y B\*1403 POSEEN UNA HETEROGENEIDAD RESTRINGIDA EN MÚLTIPLES POSICIONES PEPTÍDICAS.**

Se secuenciaron un total de 34 ligandos de HLA-B14 mediante espectrometría de masas de nanoelectrospray que incluyen 17 ligandos compartidos, 7 específicos de B\*1402 y 10 específicos de B\*1403 (Figura 8). Para establecer los motivos peptídicos de ambos subtipos se analizó la frecuencia de cada aminoácido en cada posición, de todos los nonúmeros de cada subtipo. El estudio de residuos se hizo sólo con los nonúmeros porque era el único grupo de péptidos que proporcionaba un número significativo de ligandos con el mismo tamaño. Así, los motivos peptídicos de B\*1402 se determinaron a partir de 16 nonúmeros que incluían 11 ligandos compartidos con B\*1403 y 5 específicos para este subtipo. De igual forma, se establecieron los motivos peptídicos de B\*1403 a partir de 19 nonúmeros que comprendían 11 compartidos con B\*1403 y 8 específicos. Se consideró, arbitrariamente, que una posición muestra heterogeneidad restringida cuando un residuo dado o un tipo de residuos químicamente análogos (por ejemplo; ácidos, básicos, polares, alifáticos o aromáticos), aparecen en esa posición en, al menos, el 40% de los nonúmeros de un subtipo (Figura 9). En base a este análisis B\*1402 y B\*1403 muestran un uso restringido de residuos en 6 y 8 de las 9 posiciones, respectivamente. Ambos subtipos tienen 4 posiciones con los mismos

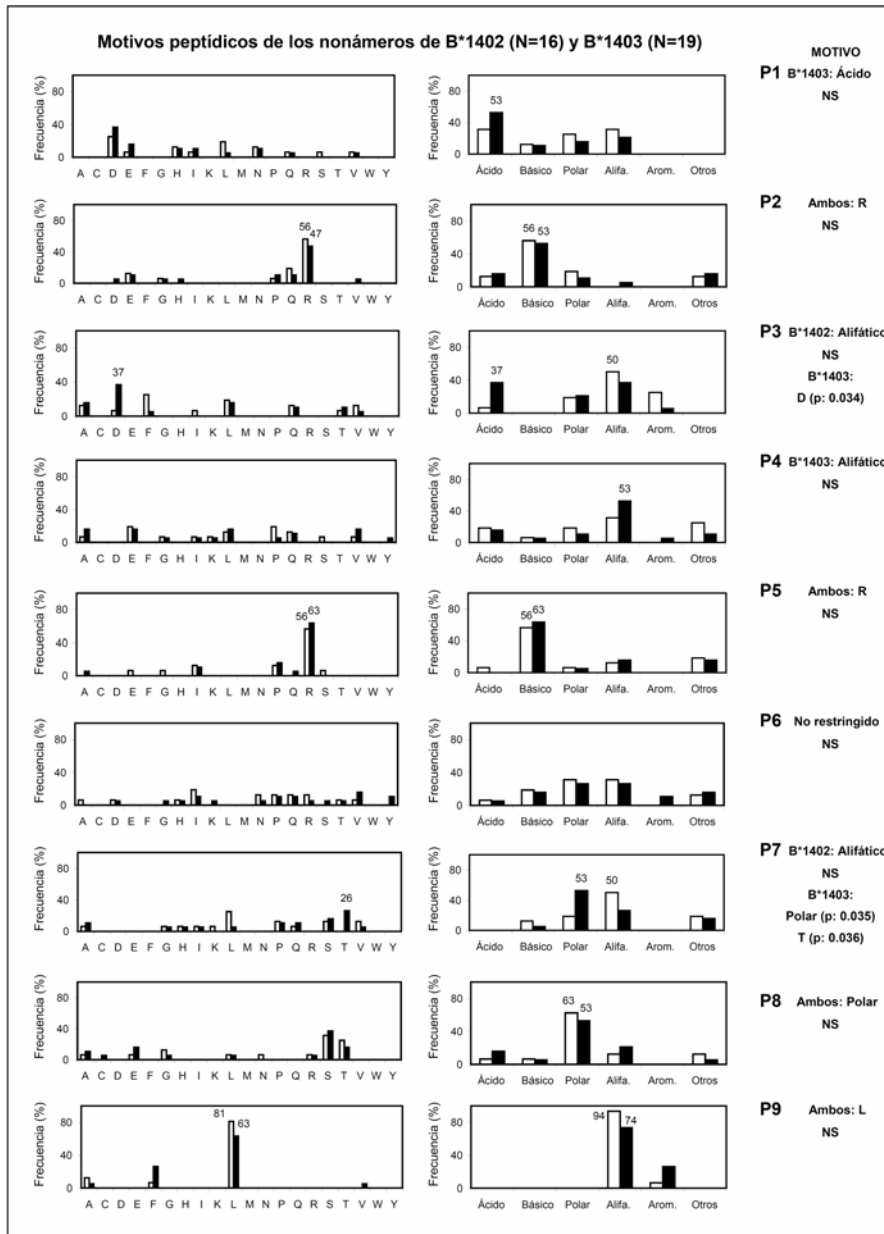
motivos predominantes: en P2, arginina; en P5, arginina; en P8, residuos polares; y en P9, residuos alifáticos (principalmente, leucina).

Péptidos	Proteína	Nº. Acceso	Secuenciado de
<b>Compartidos</b>			
<b>Octámeros (N=4)</b>			
DRMVGQVL	Eukariotic translation initiation factor 2 subunit 3	P41091	Ambos
ERVVHYEI (*)	NADH-ubiquinone oxidoreductase ASH1 subunit	O95169	B*1402
LRDRPLLL	MHC class II transactivator CIITA	Q29675	Ambos
VEMHHEAL	EEF1A1 protein	Q61Q15	B*1402
<b>Nonámeros (N=11)</b>			
DEFLRISTA	Guanine nucleotide-binding protein	O75632	B*1402
DGQVRVAEL	H326 protein	Q12839	B*1403
DQTIRIHGL	Hypothetical protein	Q9BU59	Ambos
ERLKIRGSL	40 S ribosomal protein S25	P25111	B*1402
HEAERNIAL	Ran-binding protein 2	P49792	Ambos
HRDQRDVSL	KIAA1463 protein (Fragment)	Q9P265	Ambos
IRAAAPPPLF	Cathepsin A	Q9BR08	Ambos
LRLLIHQSL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	B*1403
NPQERTLTL	Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	Ambos
QRLPRPSSL	Unc-112 related protein 2	Q86UX7	Ambos
VRVGPQPSL	Hypothetical protein FLJ22659	Q9H627	B*1402
<b>Decámeros (N=1)</b>			
GRVGFPPRSY	GRB2-related adaptor protein	Q13588	B*1403
<b>Dodecámeros (N=1)</b>			
DRYRNPKGFSTL	Splice isophorm short of P40259	P40259	B*1402
<b>Específicos de B*1402</b>			
<b>Octámeros (N=1)</b>			
MRNVIMAI	CDNA FLJ20733 fis clone HEP08550	AK000740	B*1402
<b>Nonámeros (N=5)</b>			
DQFERIKTL	Protein kinase A-alpha (fragment)	Q15136	B*1402
LQIQRNVTTL	Insulin-induced protein 1	O15503	B*1402
LRFPGQLNA	TUBB protein (fragment)	Q96B85	B*1402
NRVSSRLGL	Origin recognition complex subunit 1	Q13415	B*1402
SRFPEALRL	26S proteasome regulatory subunit S2	Q13200	B*1402
<b>Decámeros (N=1)</b>			
SYDPTIENTF	GTP-binding protein Rheb	Q15382	B*1402
<b>Específicos de B*1403</b>			
<b>Octámeros (N=1)</b>			
FQQGHEEL	Centaurin beta 1	Q15027	B*1403
<b>Nonámeros (N=8)</b>			
DDTVRYTSL	WD-repeat protein 1 (Actin interacting protein 1)	O75083	B*1403
DHDVROSEF	KIAA1007 protein (fragment)	Q8TB53	B*1403
DQDYRVTCF	Phorbolin-like protein MDS019	Q9HC16	B*1403
DVDQRSTTF	COP9 signalosome complex subunit 1	Q13098	B*1403
EPDLRVTSV	Beta-1,3-galactosyltransferase	Q9NY97	B*1403
ERDAAQRL	Protocadherin beta 7 precursor	Q9Y5E2	B*1403
IRDEQYDAL	Leucyl-cystinyl-aminopeptidase	Q9UIQ6	B*1403
NRAAPGAEF	54 KDa nuclear RNA and DNA-binding protein	Q15233	B*1403
<b>Decámeros (N=1)</b>			
SPNFVSPVPL	Boule-like protein	Q8N9W6	B*1403

**Figura 8. Secuencias de aminoácidos de los ligandos unidos a B\*1402 y B\*1403.** Los ligandos están clasificados en compartidos, específicos de B\*1402 y específicos de B\*1403. Dentro de cada categoría, están ordenados por tamaño y orden alfabético. Se indica el nombre de su proteína parental y el número de acceso en la base de datos (Fasta, [www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html](http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html)). También, está indicado el subtipo o subtipos de los que proceden los péptidos secuenciados. Aquellos péptidos que se secuenciaron en un solo subtipo, pero que tenían el mismo tiempo de retención y la misma m/z en la fracción equivalente del otro subtipo en los espectros de MALDI-TOF, se consideraron como ligandos compartidos. Un ligando compartido de B\*1402 que previamente se había publicado como ligando de B\*1402 (DiBrino et al., 1994) está marcado con un asterisco.

El resto de las posiciones toleran múltiples tipos de residuos, excepto P9 que está totalmente restringida a residuos alifáticos y aromáticos. Ambos subtipos tienen en común una ausencia de restricciones en el uso de residuos en P6. Debido a la contribución de los péptidos específicos de subtipo, cuyos rasgos diferenciales se comentan más abajo, ambos subtipos muestran diferencias en el uso de residuos en 4 posiciones: P1, P3, P4, y P7. B\*1402 no muestra preferencia por ningún residuo ( $\geq 40\%$ ) en P1 y P4, y sí lo hace en P3 y P7 por residuos alifáticos. Por el contrario, B\*1403 muestra preferencia por un motivo ácido en P1; una frecuencia, estadísticamente incrementada, de Asp en P3 (aunque es un poco menor del 40% y acepta también residuos alifáticos); un motivo alifático en P4, y uno polar en P7. Sin embargo, debido a

la gran contribución de los ligandos compartidos en las dos series no había diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias de los residuos salvo en P3 y P7. Los motivos peptídicos de B\*1402 se analizaron en un estudio previo (Dibrino et al, 1994). En este estudio, se encontró un enriquecimiento de residuos ácidos en P1, arginina en P2, alifáticos/aromáticos en P3, arginina en P5, leucina/isoleucina en P6, y leucina en P $\Omega$ . Estos resultados están de acuerdo con los de este estudio a excepción de lo encontrado para las restricciones en P6, que no se confirmaron en nuestros análisis.

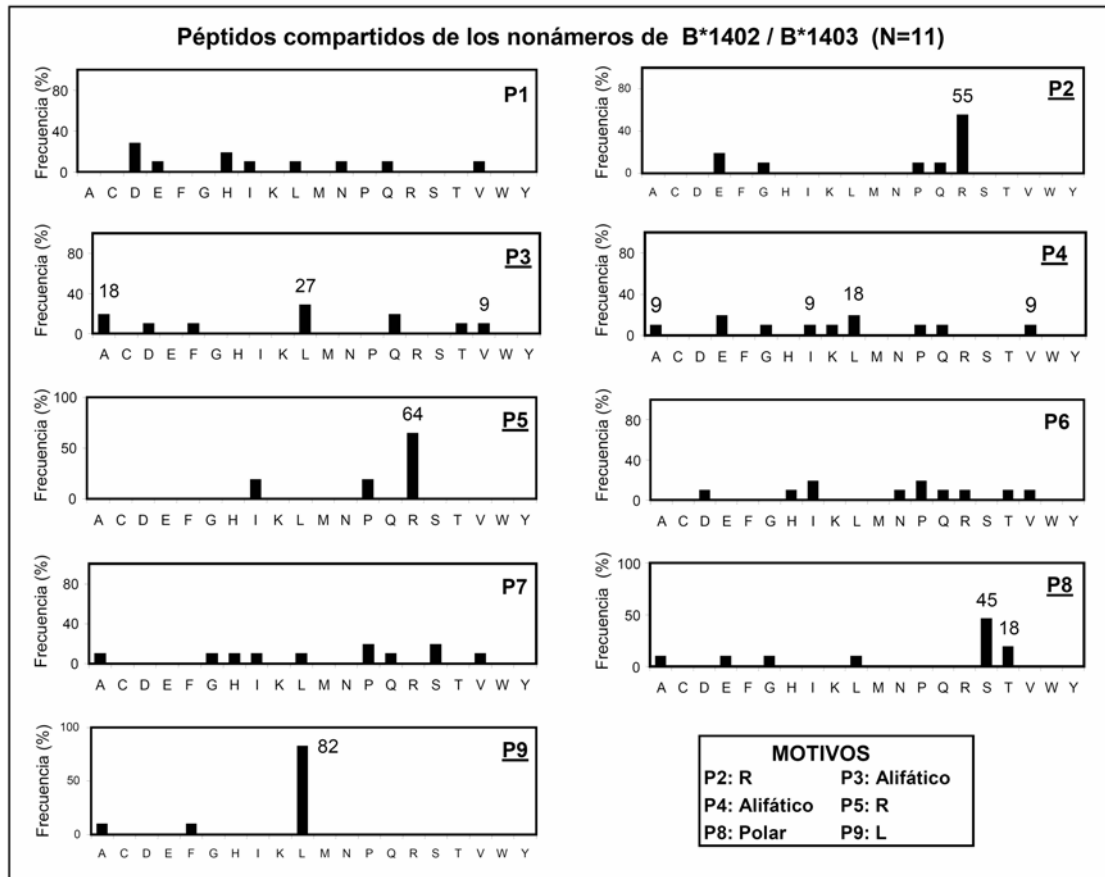


**Figura 9. Motivos peptídicos de los ligandos de B\*1402 (barras blancas) y de B\*1403 (barras negras).** Se indican las frecuencias de los residuos en cada posición de los nonámeros secuenciados de cada subtipo (Figura 8). Las frecuencias están calculadas para residuos individuales o para grupos de residuos (ácidos: Asp y Glu; básicos: His, Lys y Arg; polares: Asn, Gln, y Thr; alifáticos: Ala, Cys, Ile, Leu, Met y Val; aromáticos: Phe, Trp, y Tyr; otros: Gly y Pro). Se indican los residuos o tipos de residuos que tienen una frecuencia  $\geq 40\%$  y que se asignaron como motivos peptídicos. Se tuvieron también en cuenta los residuos con una frecuencia menor pero con diferencias estadísticamente significativas entre subtipos (D-3 y T-7 en B\*1403). Las diferencias estadísticamente significativas entre ambos subtipos ( $p < 0.05$ ) se dieron en base al test exacto de Fisher. NS, no significativo.



#### 1.4 RASGOS ESTRUCTURALES DE LOS LIGANDOS COMPARTIDOS ENTRE B\*1402 Y B\*1403.

El mismo tipo de análisis de secuencias se llevó a cabo para el grupo de los nonúmeros compartidos entre B\*1402 y B\*1403 (Figura 10).



**Figura 10. Motivos peptídicos de los ligandos compartidos entre B\*1402 y B\*1403.** Se indican las frecuencias de los residuos en cada posición de los ligandos compartidos entre los dos subtipos. Se indican los residuos o tipo de residuos (ver leyenda de la figura 9) que tenían una frecuencia  $\geq 40\%$  y que se asignaron como motivos predominantes en la posición correspondiente.

Aquellas posiciones que en la comparación global discutida en el párrafo anterior (figura 9) tenían un tipo de restricción parecida (P2, P5, P8, y P9) o que no estaban restringidos (P6) en ambos subtipos, muestran un patrón muy similar entre los ligandos compartidos. En aquellas posiciones que presentaban un uso de residuos diferente entre subtipos, se observó un patrón mixto en el grupo de los ligandos compartidos. Al igual que en B\*1402, P1 no está restringido y P3 muestra preferencia por motivos alifáticos. Como en B\*1403, un motivo alifático prevalece en P4. En P7, donde ambos subtipos mostraban restricciones diferentes (alifáticos/polares), no aparece ningún motivo

predominante. Los ligandos compartidos muestran una heterogeneidad restringida en 6 de 9 posiciones, estando el motivo más conspicuo en P9.

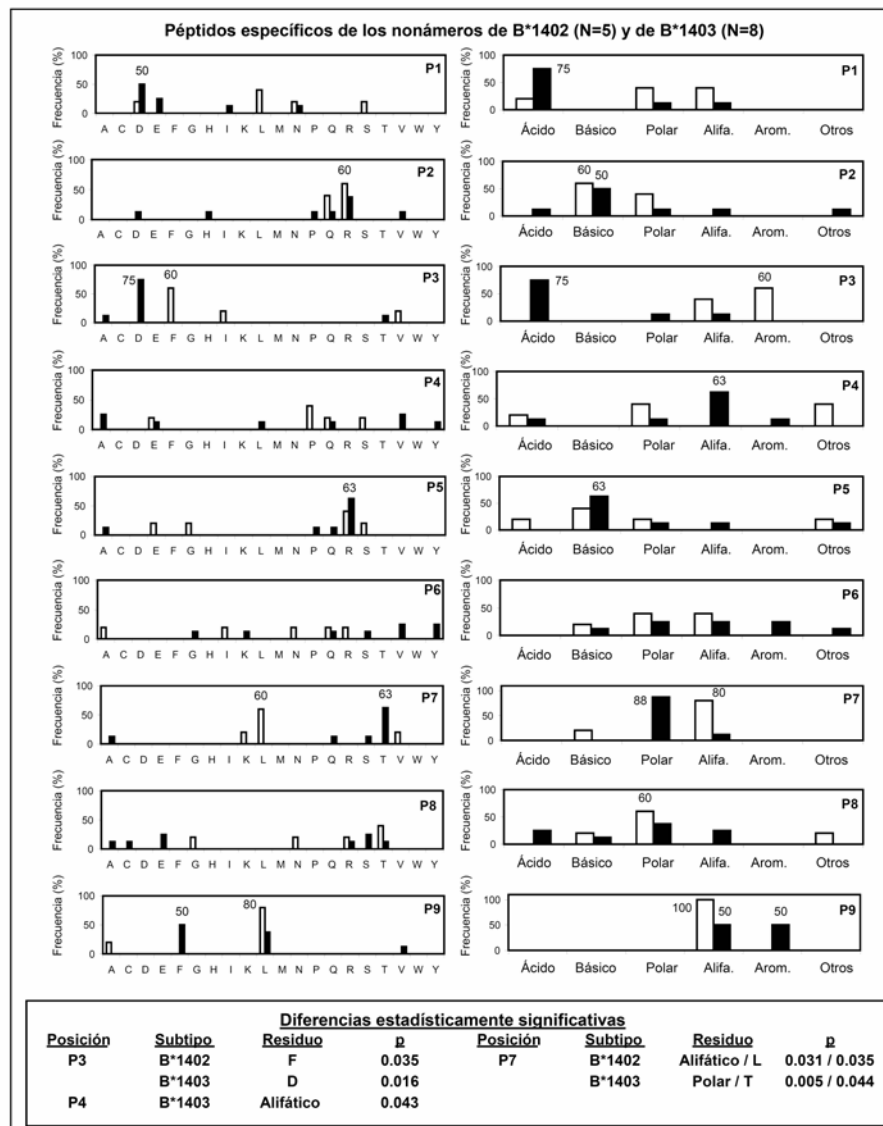


Figura 11. Motivos peptídicos de los ligandos específicos de B\*1402 (barras blancas) y de B\*1403 (barras negras). Se indican las frecuencias de los residuos en cada posición de los ligandos específicos para cada subtipo (figura 8) y se indican como residuos individuales o tipo de residuos (ver leyenda de la figura 9). Se muestran los residuos o tipos de residuos que tenían una frecuencia  $\geq 50\%$ , y también aquellas posiciones que tenían unas diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

### 1.5 LOS LIGANDOS ESPECÍFICOS DE SUBTIPO EN HLA-B14 PRESENTAN MOTIVOS DIFERENTES EN MÚLTIPLES POSICIONES.

Para analizar las bases de la disparidad que presentan los repertorios peptídicos unidos a B\*1402 y a B\*1403 se compararon los rasgos estructurales de los ligandos específicos de subtipo. La comparación de las frecuencias de residuos entre los nonámeros correspondientes reveló varias diferencias significativas (Figura 11). P1 muestra principalmente una restricción hacia residuos ácidos entre los nonámeros específicos de B\*1403, pero no en el grupo específico de B\*1402. P2 está restringida a arginina y glutamina en los ligandos específicos de B\*1402, pero está más degenerada en B\*1403. Sin embargo, las diferencias en estas dos posiciones no alcanzaban un valor

estadísticamente significativo. Se observa una diferencia dramática en P3, donde B\*1402 presenta residuos alifáticos o fenilalanina y B\*1403, ácido aspártico. Ambas diferencias fueron estadísticamente significativas. En P4, los residuos alifáticos aparecen estadísticamente incrementados para los nonámeros específicos de B\*1403. Otra diferencia drástica se observa en P7: residuos alifáticos, predominantemente leucina, en B\*1402 y motivos polares, principalmente treonina, en B\*1403. Estas preferencias mostraban una diferencia estadísticamente significativa. El incremento de residuos polares en P8 en B\*1402, relativo a B\*1403 no era estadísticamente significativo. En P9, se observa en ambos grupos una restricción total hacia residuos no polares. En B\*1402, aparece principalmente leucina y en B\*1403, también aparece fenilalanina con un 50% de frecuencia. Estas diferencias no eran estadísticamente significativas. Estos resultados indican que el cambio en la posición 156 modula la especificidad peptídica alterando la preferencia de residuos en, al menos, tres posiciones: P3, P4, y P7. Las diferencias que se observaban en otras posiciones (P1, P2, P5, P8, y P9) podrían reflejar preferencias de residuo alteradas o ser el resultado del bajo número de secuencias disponible para esta comparación.

### **1.6 RASGOS DIFERENCIALES ENTRE LOS LIGANDOS DE B\*1402, B\*1403 Y B\*2705.**

Un total de 13 péptidos secuenciados en este estudio (2 octámeros, 10 nonámeros, y 1 decámero) se encontraron en B\*1403 pero no en B\*2705 (Figura 12). Estos péptidos eran compartidos o específicos de B\*1403 en la comparación de B\*1402/B\*1403 (Figura 8). Además, se secuenciaron 8 ligandos de B\*2705 (4 nonámeros y 4 decámeros) que no se encontraban en B\*1403. De éstos, 5 fueron previamente identificados como ligandos de HLA-B27 (Lopez de Castro et al., 2004) y los demás se identificaron por primera vez en este estudio (Figura 12). Se analizaron las bases de la gran disparidad entre los repertorios peptídicos de B\*1403 y B\*2705, haciendo una comparación estadística del uso de residuos entre las secuencias de B\*1403 y un registro de 108 nonámeros unidos a B\*2705 publicado previamente por nuestro grupo (Lopez de Castro et al., 2004), (Tabla 3). Se analizó el conjunto de los 19 nonámeros secuenciados de B14, incluidos los compartidos y los específicos de los dos subtipos (Figura 8) y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre B\*1403 y B\*2705 en la mayoría de las posiciones excepto P4 y P6. Así, en P1

encontramos residuos ácidos en B\*1403 y arginina y glicina en B\*2705. En P2, B\*2705 es claramente más selectivo para la arginina que B\*1403.

Péptidos	Proteína	Nº. Acceso	Secuenciado de	Encontrado en B*1402
<b>Compartidos (N=2)</b>				
IRAAPPPLF (*)	Cathepsin A	Q9BR08	B*1403 B*2705	Si
GRVGFPPRSY (*)	GRB2-related adaptor protein	Q13588	B*1403 B*2705	Si
<b>Específicos de B*1403</b>				
<b>Octámeros (N=2)</b>				
DRMVGQVL	Eukariotic translation initiation factor 2 subunit 3	P41091	B*1403	Si
FQQGHEEL	Centaurin beta 1	Q15027	B*1403	No
<b>Nonámeros (N=10)</b>				
DDTVRYTSL	WD-repeat protein 1 (Actin interacting protein 1)	O75083	B*1403	No
DHDVRRQSEF	KIAA1007 protein (fragment)	Q8TB53	B*1403	No
DQDYRVTCF	Phorbolin-like protein MDS019	Q9HC16	B*1403	No
DQTIRIHGL	Hypothetical protein	Q9BU59	B*1403	Si
DVDQRSTTF	COP9 signalosome complex subunit 1	Q13098	B*1403	No
EPDLRVTSV	Beta-1,3-galactosyltransferase	Q9NY97	B*1403	No
ERDAARQRL	Protocadherin beta 7 precursor	Q9Y5E2	B*1403	No
IRDEQYTAL	Leucyl-cysteinyl aminopeptidase	Q9UIQ6	B*1403	No
LRLLIHQSL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	B*1403	Si
QRLPRPSSL	Unc-112 related protein 2	Q86UX7	B*1403	Si
<b>Decámeros (N=1)</b>				
SPNPVSPVPL	Boule-like protein	Q8N9W6	B*1403	No
<b>Específicos de B*2705</b>				
<b>Nonámeros (N=4)</b>				
ARLKEVLEY (*)	Farnesyl pyrophosphate syntase	P14324	B*2705	No
GRIPGIYGR (*)	Chromosome-associated polypeptide C	O95752	B*2705	No
GRYPGVSNY (*)	Amyloid protein binding protein 1	Q13564	B*2705	No
LRFPGLNA	TUBB protein (fragment)	Q96B85	B*2705	Si
<b>Decámeros (N=4)</b>				
GRIKAIQLEY (*)	Regulatory subunit S3	O43242	B*2705	No
GRISDFHETY	BCL-6 corepressor short isoform	Q9H232	B*2705	No
HRFEQAFYTY (*)	PM5 protein	Q15155	B*2705	No
SRYPYHVNL	proteasome endopeptidase complex	S55040	B*2705	No

**Figura 12. Secuencias de aminoácidos de los ligandos compartidos y específicos entre B\*1403 y B\*2705.** Los ligandos están clasificados en compartidos, específicos de B\*1403 y específicos de B\*2705. Dentro de cada categoría, están clasificados por tamaño y orden alfabético. Se indica el nombre de su proteína parental y el número de acceso en la base de datos (Fasta, [www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html](http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html)). También, está indicado el subtipo o subtipos de los que proceden los péptidos secuenciados y si están o no en B\*1402 (Figura 8). Los péptidos de HLA-B27 publicados previamente, están indicados con un asterisco.

En B\*1403 en las posiciones P3 y P5, estaban más favorecidos ácido aspártico y arginina, respectivamente. Finalmente, se observó en P9 un incremento estadísticamente significativo de leucina en B\*1403 y de residuos básicos en B\*2705. Una comparación similar entre los 16 ligandos de B\*1402 y los 108 de B\*2705 mostraron, en general, un patrón de diferencias similares, aunque en P3 y P7 se perdió la significación estadística. Tal disparidad en el uso de residuos en múltiples posiciones explica el bajo solapamiento peptídico observado entre B\*1402 o B\*1403 y B\*2705. En B\*1402 y B\*1403 hay más posiciones con un uso restringido de residuos (5 y 7 posiciones,

respectivamente) que en B\*2705 (3 posiciones). Como ya se ha comentado, este fenómeno podría reducir la diversidad de los repertorios peptídicos unidos a B\*1402 y B\*1403, relativo a B\*2705, y explicar por qué se detectaron por espectrometría de masas de MALDI-TOF menos ligandos unidos a HLA-B14 que a B27. Para B\*1402 se definió previamente un número alto de posiciones peptídicas con un uso restringido de residuos, relativo a otras moléculas de HLA de clase I (DiBrino et al., 1994).

Posición	Diferencias estadísticamente significativas <sup>a</sup>		Diferencias estadísticamente significativas <sup>a</sup>	P	
	B*1402	B*1403	B*2705	B*1402 <sup>b</sup>	B*1403 <sup>b</sup>
	%				
P1	<b>Asp: 25</b> Glu: 6 Arg + Gly: 0	<b>Asp: 37</b> <b>Glu: 16</b> 0	Asp: 0 Glu: 0 <b>Arg + Gly: 43.5</b>	<b>6.07 x10<sup>-6</sup></b> NS <sup>c</sup> <b>0.002</b>	<b>2.78 x10<sup>-9</sup></b> <b>0.0008</b> <b>0.0008</b>
P2	<b>Glu: 13</b> Pro: 6 <b>Gln: 19</b> Arg: 56	<b>Glu: 11</b> <b>Pro: 11</b> Gln: 11 Arg: 47	Glu: 0 Pro: 0 Gln: 1.9 <b>Arg: 98.1</b>	<b>0.008</b> NS <b>0.012</b> <b>3.54 x10<sup>-8</sup></b>	<b>0.016</b> <b>0.016</b> NS <b>5.64 x10<sup>-11</sup></b>
P3	Asp: 6	<b>Asp: 37</b>	Asp: 0.9	NS	<b>5.62 x10<sup>-8</sup></b>
P4	Ninguno	Ninguno	Ninguno	NS	
P5	<b>Arg: 56</b>	<b>Arg: 63</b>	Arg: 2.8	<b>3.00 x10<sup>-10</sup></b>	<b>9.69 x10<sup>-13</sup></b>
P6	Ninguno	Ninguno	Ninguno	NS	
P7	Thr: 0	<b>Thr: 26</b>	Thr: 6	NS	<b>0.021</b>
P8	<b>Ser: 31</b>	<b>Ser: 37</b>	Ser: 7.4	<b>0.014</b>	<b>0.001</b>
P9	<b>Leu: 81</b> Básico: 0	<b>Leu: 63</b> Basic: 0	Leu: 25.9 <b>Básico: 25.9</b>	<b>4.04 x10<sup>-5</sup></b> <b>0.046</b>	<b>0.003</b> <b>0.027</b>

**Tabla 3. Diferencias estadísticamente significativas en el uso de residuos entre los nonámeros unidos a B\*1402, B\*1403 y B\*2705.** Los nonámeros secuenciados de B\*1402 y B\*1403, 16 y 19, respectivamente (Figura 8) se compararon con 108 nonámeros unidos a B\*2705, previamente publicados (Lopez de Castro et al., 2004). Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) se determinaron con el test de  $\chi^2$  y la corrección de Yates.

<sup>a</sup> Porcentaje de frecuencia con diferencia estadísticamente significativa en el uso de residuos entre los nonámeros unidos a B\*1402 o B\*1403 y B\*2705. Las frecuencias estadísticamente incrementadas y sus residuos correspondientes están indicados en negrita.

<sup>b</sup> Valores p correspondientes a las comparaciones B\*1402/B\*2705 y B\*1403/B\*2705, respectivamente. Para la comparación de B\*1402/B\*1403 ver figura 9.

<sup>c</sup> NS, no significativo.

### 1.7 HLA-B\*2705 COMPARTE LIGANDOS CON B\*1402 y B\*1403.

Se secuenciaron dos ligandos comunes a B\*1403 y B\*2705 (Figura 12). Ambos péptidos eran también comunes entre B\*1402 y B\*1403. Sin embargo, no se

identificaron ligandos comunes entre los dos subtipos asociados a enfermedad (B\*1403 y B\*2705), pero que estén ausentes en B\*1402. Al contrario, sí se encontraron dos péptidos compartidos entre B\*1402 y B\*2705 pero que no se presentan en B\*1403 (Figura 8). Estos dos ligandos son: LRFPGQLNA, secuenciado del repertorio de B\*2705 en este estudio y de B\*2707 en un estudio previo (Gomez et al., 2006) (Figura 12), y SRFPEALRL, publicado previamente como ligando natural de B\*2705, B\*2706 y B\*2707 (Gomez et al., 2006; Lopez de Castro et al., 2004). El resumen de los ligandos compartidos entre HLA-B14/B27 identificados en este estudio se muestra en la tabla 4. Los 4 péptidos presentan motivos peptídicos típicos de HLA-B27: arginina en P2 y residuos alifáticos y aromáticos en P3 y en el PΩ, respectivamente.

Péptido	B*2705 <sup>a</sup>	B*1402 <sup>b</sup>	B*1403 <sup>b</sup>	Otros subtipos de B27
GRVGGFFRSY	Sí	Sí	Sí	B*2704
IRAAPPPLF	Sí	Sí	Sí	
LRFPGQLNA	Sí	Sí	No se ha encontrado	B*2707
SRFPEALRL	Sí	Sí	No se ha encontrado	B*2706, B*2707

**Tabla 4. Ligandos naturales compartidos entre HLA-B27 y HLA-B14.** En esta tabla están representadas 4 secuencias compartidas entre B\*2705 y B\*1402 y sólo dos de ellas son comunes a B\*1403.

<sup>a</sup> Ver figura 12.

<sup>b</sup> Ver figura 8.

### **1.8 LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE B\*1402, B\*1403, Y B\*2705 MEDIADA POR CTLs ALORREACTIVOS ES PARALELA AL SOLAPAMIENTO PEPTÍDICO.**

Las respuestas mediadas por CTL alorreactivos se caracterizan por una gran diversidad clonal (Sherman and Maleckar, 1988). Esto se debe principalmente al hecho de que los CTLs reconocen un gran número de péptidos constitutivamente unidos a la molécula del MHC alogénico (Heath et al., 1991; Rotzschke et al., 1991; Wang et al., 1998). De esta manera, el estudio de la reactividad cruzada de los CTLs aloespecíficos nos permite analizar los rasgos antigénicos compartidos entre dos moléculas de MHC relacionadas en función de sus repertorios peptídicos constitutivos. Se obtuvieron 74 CTLs alorreactivos anti-B\*1402 de varios donantes diferentes y se analizó su capacidad para lisar células transfectadas con B\*1403 (Tabla 5).

$\alpha$ -B*1402 CTLs		Lisis relativa con B*1403			
Donante <sup>a</sup>	Número de CTLs	<30%	30-70%	>70%	Reacción cruzada de CTLs con B*1403
1	42	30 (71.4%)	9 (21.4%)	3 (7.1%)	12 (28.6%)
2	23	16 (69.6%)	4 (17.4%)	3 (13%)	7 (30.4%)
3	3	2 (66.7%)	0	1 (33.3%)	1 (33.3%)
4	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)	0	1 (16.7%)
<b>TOTAL</b>	<b>74</b>	<b>53 (71.6%)</b>	<b>14 (18.9%)</b>	<b>7 (9.5%)</b>	<b>21 (28.4%)</b>
$\alpha$ -B*1402 CTLs		Lisis relativa con B*2705			
Donante	Número de CTLs	<30%	30-70%	>70%	Reacción cruzada de CTLs con B*2705
1	42	42 (100%)	0	0	0
2	22	20 (90.9%)	1 (4.5 %)	1 (4.5%)	2
3	3	3 (100 %)	0	0	0
4	3	3 (100 %)	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>70</b>	<b>68 (97.1 %)</b>	<b>1 (1.4%)</b>	<b>1 (1.4%)</b>	<b>2 (2.9%)</b>

**Tabla 5. Reacción cruzada entre B\*1402, B\*1403 y B\*2705 con CTL alorreactivos.** El tipaje del HLA de clase I para los donantes es el siguiente: Donante 1 (HLA-A1, A2; B7, B18; Cw5, Cw7); Donante 2 (HLA-A2, A23; B44, B62; Cw2, Cw4); Donante 3 (HLA-A23, 24; B51, B\*1503; Cw4, Cw5); y Donante 4 (HLA-A24, A29; B44, B57; Cw7).

La especificidad de los CTLs se estableció como su incapacidad de lisar células C1R sin transfectar y su capacidad de lisar células C1R transfectadas con B\*1402. La reactividad cruzada se analizó como la lisis de las células diana B\*1403, relativa a la lisis de los transfectantes de B\*1402. Los valores de lisis relativa menores del 30% se asignaron como ausencia de reactividad cruzada. Los valores mayores del 70%, se consideraron como valores de reactividad cruzada completa, indicando una conservación total del epítipo aloespecífico. Las lisis relativas entre ambos valores indican reactividad cruzada parcial, reflejando un epítipo parcialmente alterado como consecuencia, de una presentación disminuida o de una conformación alterada del correspondiente péptido aloespecífico. De todos los clones anti-B\*1402 analizados, sólo 21 (28.4%) mostraron una reactividad cruzada total o parcial con B\*1403. Este porcentaje varía muy poco con respecto al calculado para el solapamiento peptídico

entre B\*1402 y B\*1403 (32-35%). Puesto que los CTLs reconocen péptidos unidos constitutivamente a B\*1402, estos resultados sugieren que muchos de los ligandos compartidos entre los dos subtipos de B14 mantienen sus rasgos antigénicos, adoptando, presumiblemente, una conformación similar cuando están unidos a ambos subtipos. No se obtuvieron clones anti-B\*1403 porque no se pudo disponer de ninguna LCL B\*1403<sup>+</sup> para usarla como línea estimuladora. Los intentos de crecer CTLs alorreactivos usando la línea C1R-B\*1403 resultaron fallidos.

Se llevó a cabo un análisis similar para determinar el solapamiento antigénico entre HLA-B14 y B\*2705. En este caso se analizó el reconocimiento de dianas B\*2705<sup>+</sup> por CTLs anti-B\*1402. Se analizaron un total de 70 clones anti-B\*1402 y sólo 2, (2.9%) del mismo donante, lisaron de forma total o parcial B\*2705. El porcentaje del solapamiento antigénico se asemeja bastante al solapamiento peptídico obtenido entre B\*1403 y B\*2705, 2.7 -5% (ver más arriba). Aunque no se llevó a cabo un análisis similar entre B\*1402 y B\*2705, parece razonable suponer que los resultados han de ser parecidos, dada la similitud en los porcentajes obtenidos en la comparación de B\*1402/B\*2705 y B\*1403/B\*2705. Los dos clones anti-B\*1402 que tenían reactividad cruzada con B\*2705, presentaban una reactividad cruzada marginal con B\*1403 (27 y 30% de lisis relativa, respectivamente), sugiriendo que reconocen péptidos compartidos entre B\*1402 y B\*2705, que están ausentes o alterados antigénicamente en B\*1403. En este estudio se han identificado dos péptidos con dichas características (Tabla 4). Por otra parte, un estudio cristalográfico realizado con un péptido común entre B\*1402 y B\*2705 (IRAAPPPLF, Tabla 4) ha revelado que los dos alotipos presentan de forma muy similar el mismo péptido (Pravin Kumar et al, manuscrito en preparación). Este péptido se encontró también en B\*1403 en las comparaciones realizadas en esta tesis pero no se ha podido estudiar mediante cristalografía. Además, se analizaron 28 clones anti-B\*2705 contra B\*1402 y B\*1403 y no hubo lisis para ninguna de las dianas de B14. Es posible que el número de clones anti-B\*2705 analizado sea demasiado bajo, para la gran disparidad peptídica entre B14 y B\*2705.

## **2. PLEGAMIENTO, MADURACIÓN Y ESTABILIDAD DE B\*1402, B\*1403 Y B\*2705.**

HLA-B\*2705 presenta unas propiedades biológicas inusuales. Tiene una cinética de maduración lenta, una tendencia a plegarse de forma anómala y la capacidad de



formar homodímeros y multímeros de HC tanto en el RE como en la superficie celular. En esta segunda parte de la tesis se estudió si HLA-B14 se comporta de forma parecida a la de B27 en estos aspectos. Se analizaron el transporte intracelular y la maduración de B\*1402 y B\*1403, sus propiedades de plegamiento, su interacción con la calnexina y la tapasina y su termoestabilidad. Se compararon estas características con las de B\*2705 para evaluar el posible significado en la asociación de B\*1403 y B\*2705 a enfermedad.

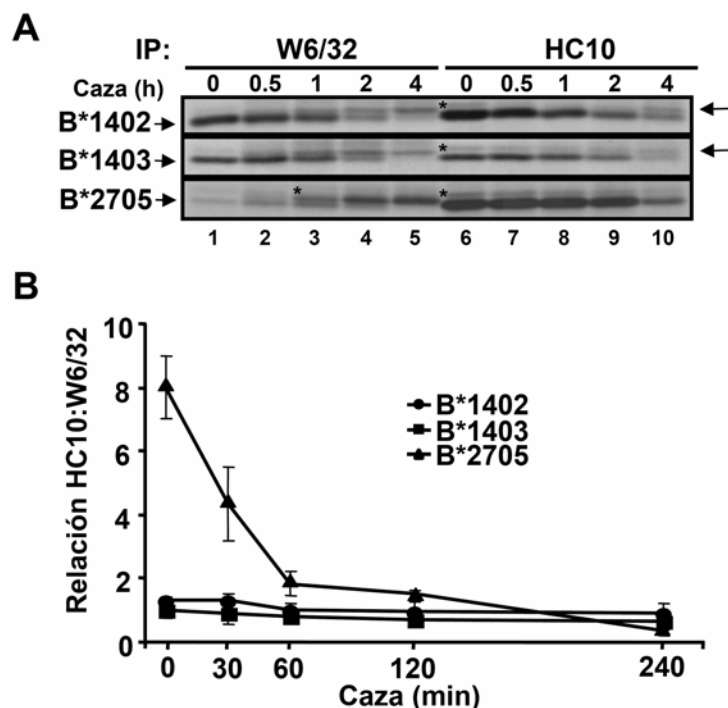
## **2.1 LOS SUBTIPOS DE HLA-B14 MUESTRAN UNA CINÉTICA DE PLEGAMIENTO RÁPIDA.**

Para estudiar la cinética de plegamiento, se analizó la formación de los heterodímeros maduros de B\*1402, B\*1403 y B\*2705 de la siguiente manera. Los transfectantes de C1R se marcaron con [<sup>35</sup>S]Met/Cys durante 15 minutos y se cazaron a distintos tiempos hasta 4 horas (Figura 13A). La mitad de cada muestra se inmunoprecipitó con W6/32 y la otra mitad con HC10. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se examinó la asociación de la HC con la  $\beta_2m$  midiendo en el tiempo la desaparición de la HC libre frente a la aparición de los heterodímeros maduros. Tanto en los dos subtipos de B14 como en B\*2705, la HC está unida a la  $\beta_2m$  al comienzo de la caza (Figura 13A, línea 1). Sin embargo, el material inmunoprecipitado con W6/32 de B\*1402 y B\*1403 decrece con el tiempo mientras que en B\*2705, aumenta a lo largo de la caza (figura 13A, líneas 1-5). Además, en los dos subtipos de B14 y en B\*2705, se observa una alta proporción de HC libre, precipitada con HC10, a lo largo de la caza (figura 13A, líneas 6-10), sugiriendo un acúmulo de HC en el RE.

A tiempos tardíos de caza se detectó una disminución característica en la movilidad electroforética, que se observa cuando los oligosacáridos de alto contenido en manosa se modifican a oligosacáridos complejos durante su transporte a través del aparato de Golgi, en las muestras de ambos subtipos de B14 precipitadas con HC10. Sin embargo, esto no se observó en B\*2705 (figura 13A, línea 10). Estos resultados sugieren que una fracción de las moléculas de HLA-B14 podría disociarse después de salir del RE.

Los análisis cuantitativos de los datos de pulso y caza indican que no hay diferencias en la proporción de HC libre inmunoprecipitada con HC10 relativa a la HC correctamente plegada inmunoprecipitada con W6/32 (expresado como relación HC10:W6/32) entre los subtipos de B14. Dicha relación fue mayor para B\*2705, al menos, en los primeros tiempos de caza (figura 13B). Estos resultados indican que la

eficiencia de plegamiento de ambos subtipos de B14 es similar y significativamente más rápida que la de B\*2705.

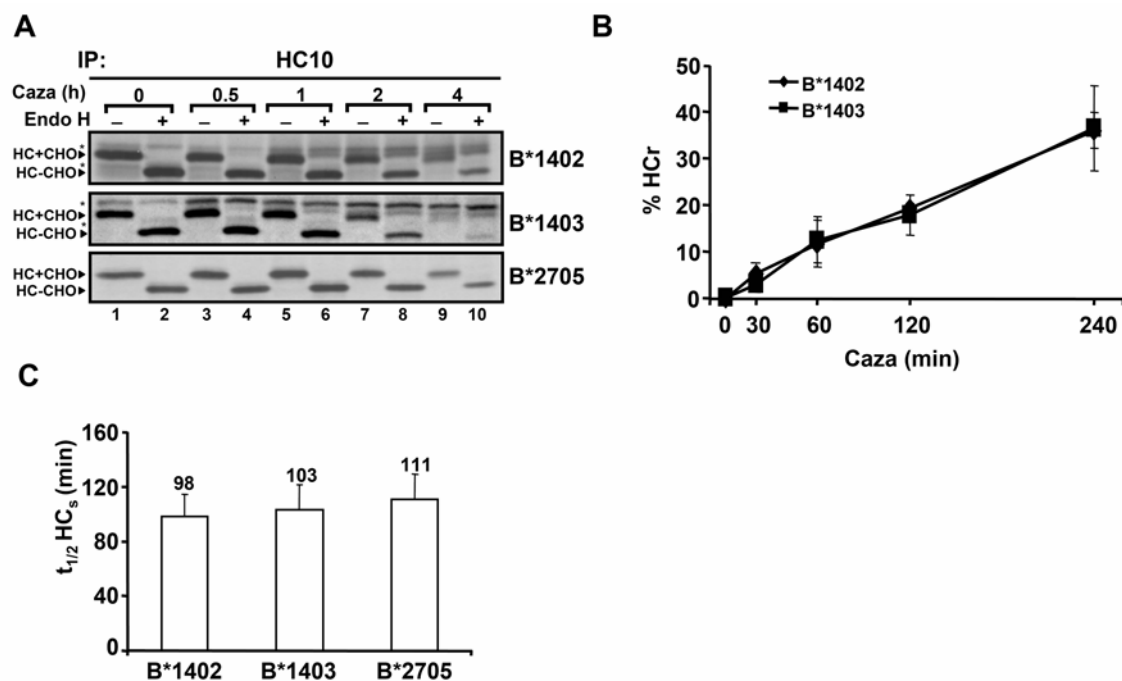


**Figura 13. Plegamiento rápido de los subtipos de HLA-B14.** (A) Las células C1R se marcaron durante 15 minutos. Los heterodímeros de HLA-B14 y B27 y la HC libre se inmunoprecipitaron con los mAb W6/32 (líneas 1-5) y HC10 (líneas 6-10), respectivamente y se analizaron mediante SDS-PAGE. Los asteriscos señalan polipéptidos inespecíficos. Las flechas de la derecha y de la izquierda indican la HC antes y después de la modificación del oligosacárido a oligosacárido complejo. (B) Las señales radioactivas del material plegado (W6/32) y de la HC libre (HC10) se cuantificaron mediante densitometría y los valores se expresaron como la relación HC10:W6/32, a los tiempos indicados. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 y 5 experimentos independientes para B\*2705 y B14, respectivamente.

## 2.2 DISOCIACIÓN INTRACELULAR Y PLEGAMIENTO INCOMPLETO DE LOS SUBTIPOS DE HLA-B14.

La disminución de los heterodímeros de HLA-B14 con el tiempo (figura 13A) y la aparición de una banda extra, de menor movilidad electroforética precipitada con HC10 a tiempos de caza tardíos (figura 13A), sugieren que B\*1402 y B\*1403 podrían disociarse después de salir del RE. Para estudiar esta posibilidad, se analizó la presencia de HC libre resistente a Endo H. Los transfectantes de C1R de B\*1402, B\*1403 y B\*2705, se marcaron con [ $^{35}$ S]Met/Cys durante 15 minutos y se cazaron hasta las 4 horas a distintos tiempos. Seguidamente, cada muestra se inmunoprecipitó con el mAb HC10, capaz de reconocer las HC libres de HLA-B14 y -B27, se trató la mitad de cada

muestra con Endo H y la otra mitad se dejó sin tratamiento (figura 14A). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Se observa HC resistente a Endo H a partir de los 30 minutos de caza en B\*1402 y B\*1403 pero no en B\*2705 (figura 14A, líneas 4, 6, 8 y 10). Puesto que la HC libre une exclusivamente oligosacáridos con alto contenido en manosa, (Hirsch et al., 2003) es muy probable que la HC resistente al tratamiento con EndoH provenga de la disociación de los heterodímeros maduros en superficie o en compartimentos tardíos de la ruta secretoria.

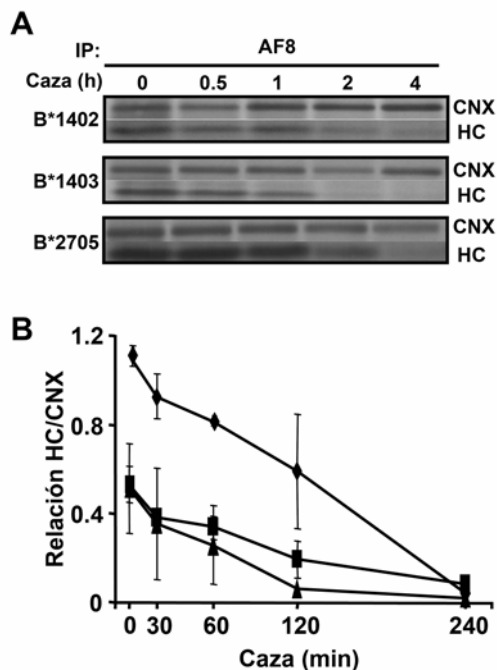


**Figura 14. Disociación intracelular de HLA-B14.** (A) Las células C1R se marcaron durante 15 minutos y se cazaron a los tiempos indicados. La HC libre se inmunoprecipitó con HC10. La mitad de la muestra se digirió con Endo H (líneas 2, 4, 6, 8 y 10) antes del análisis mediante SDS-PAGE. Las formas Endo H resistentes (HC+CHO) y Endo H sensibles (HC-CHO) de la HC están indicadas. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. Los asteriscos indican polipéptidos inespecíficos. Los datos referidos a B\*2705 ya están publicados (Galocha and Lopez de Castro, 2008) y se muestran sólo para compararlos con los de B14. (B) Las señales radioactivas de la HC libre resistente a Endo H (HCr) e inmunoprecipitada con HC10, se cuantificaron por densitometría y los valores se expresaron como el porcentaje HCr a los tiempos indicados. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. (C) Vida media de la HC Endo H sensible (HCs) calculada a partir de los datos de pulso y caza (Panel A: líneas 2, 4, 6, 8, 10). Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes.

La cantidad de HC libre resistente a Endo H, aumenta con el tiempo, alcanzando niveles significativos a las 4h ( $36 \pm 4$  % y  $37 \pm 9$  % para B\*1402 y B\*1403, respectivamente) (figura 14B). Además la presencia de una cantidad significativa de HC libre precipitada con HC10 y sensible a Endo H, incluso a las 4h de caza (figura 14A),

indica que, al igual que en B\*2705, una fracción de B\*1402 y B\*1403 permanece sin plegarse en el RE. La vida media de la HC libre en el RE (figura 14C), calculada cuantificando la intensidad de las bandas sensibles a Endo H en función del tiempo fue similar para los tres alotipos.

Dos chaperonas de tipo lectina que residen en el RE, la calnexina y la calreticulina promueven el plegamiento uniéndose transitoriamente a las glicoproteínas recién sintetizadas. Las proteínas que no están completamente plegadas permanecen asociadas con estas chaperonas y son retenidas en el RE antes de ser degradadas. Este mecanismo de “control de calidad” asegura sólo el transporte de las proteínas correctamente plegadas. Para estudiar las interacciones de los subtipos de HLA-B14 con la calnexina los transfectantes de B14 y B\*2705 se marcaron con [<sup>35</sup>S]Met/Cys durante 15 minutos, se cazaron hasta las 4 horas y las muestras se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal AF8 (figura 15A). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y se vio en todos los casos que la calnexina coinmunoprecipitaba con la HC (expresado como relación HC/CNX) (figura 15B), pero que la cantidad de HC unida a la chaperona es mayor para B\*2705 y que las tres moléculas se disocian de ella con una cinética similar. Estos resultados confirman que una fracción de la HC de B\*1402 y B\*1403 permanece sin plegarse en el RE.



**Figura 15. Plegamiento incompleto de los subtipos de HLA-B14.** (A) Los transfectantes de C1R se marcaron durante 15 minutos y se cazaron a los tiempos indicados. La cadena pesada mal plegada coinmunoprecipitada con el mAb AF8 se analizó mediante SDS-PAGE. Se muestra un experimento representativo. (B) Las señales radioactivas de la HC unida a calnexina se cuantificaron mediante densitometría y la relación HC/CNX se representó en función del tiempo. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 y 7 experimentos independientes para B14 y B\*2705, respectivamente.

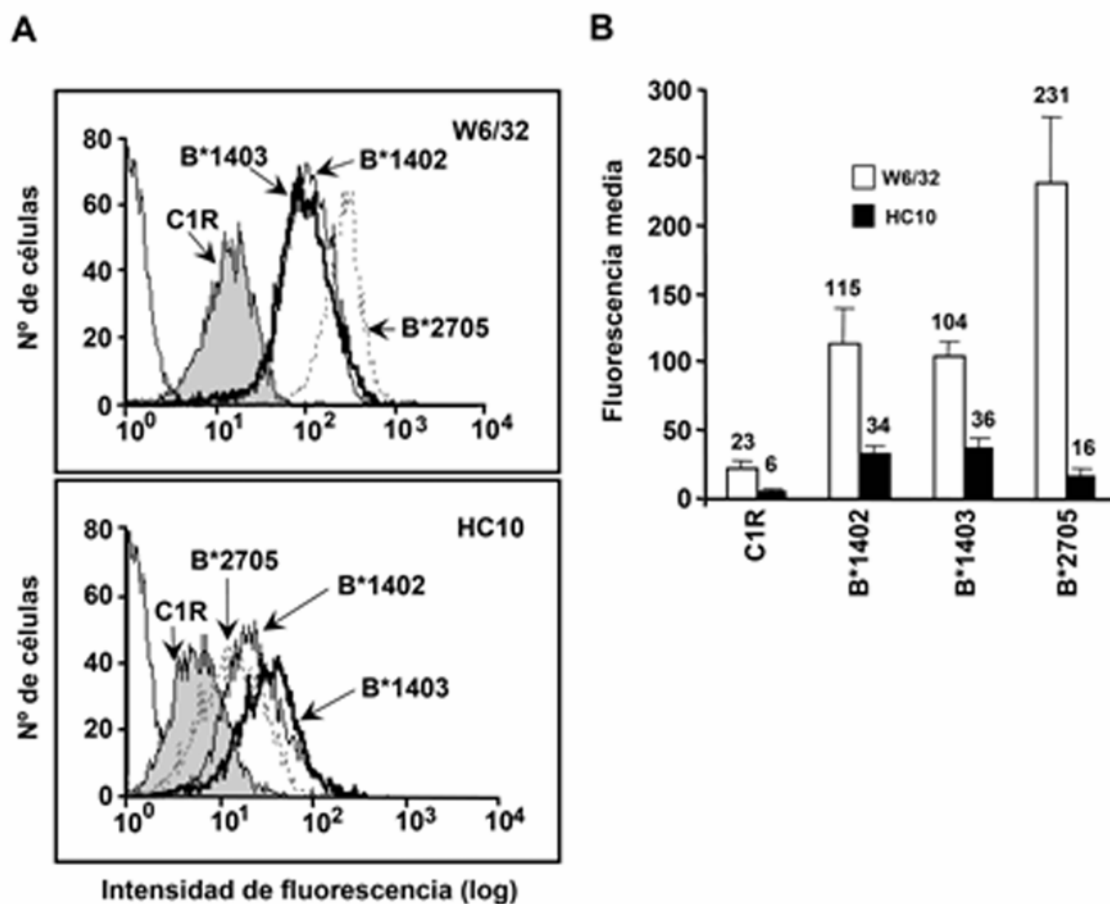
### **2.3 LOS SUBTIPOS DE HLA-B14 EXPRESAN ALTOS NIVELES DE CADENA PESADA LIBRE EN LA SUPERFICIE CELULAR.**

La expresión en la superficie celular de HC de HLA-B27 en forma de homodímeros, reactivos con HC10, ocurre tras el reciclamiento endosómico (Bird et al., 2003) y, presumiblemente, tras la disociación de los heterodímeros canónicos. En las células C1R-B\*2705, la expresión en superficie de HC libre es alrededor del 5% respecto a la expresión total de los heterodímeros (Vazquez and Lopez de Castro, 2005). De esta forma, si los heterodímeros de HLA-B14 fueran globalmente menos estables que los de HLA-B27 y se disociaran más, la expresión en la superficie celular de las moléculas reactivas con HC10 relativa a la de los heterodímeros, podría ser mayor que en HLA-B27. Para analizar si esto ocurría así en HLA-B14, se analizó por citometría de flujo la expresión en superficie de los heterodímeros maduros y de la HC libre en B\*1402, B\*1403 y B\*2705, tiñendo los transfectantes con W6/32 y con HC10 (figura 16A). La expresión de la HC libre relativa al heterodímero (figura 16B) es similar para B\*1402 y B\*1403 (aproximadamente 0.30 y 0.35, respectivamente medida como la relación HC10:W6/32) y 4-5 veces mayor que para B\*2705 (0.07) (figura 16B). Estos resultados sugieren de manera fehaciente que los heterodímeros de HLA-B14 son globalmente menos estables que los de HLA-B27.

### **2.4 EL TRANSPORTE Y LA MADURACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE HLA-B14 SON MÁS LENTOS QUE EN HLA-B27.**

El transporte al exterior del RE y la maduración intracelular de los subtipos de HLA-B\*1402, -B\*1403 y -B\*2705 se analizaron examinando la adquisición de resistencia a Endo H, que se adquiere en el Golgi medio, mediante inmunoprecipitación del complejo HC/ $\beta_2m$ /péptido, con W6/32, en experimentos de pulso y caza. Esta aproximación se modificó para los subtipos de HLA-B14, teniendo en cuenta la HC resistente a Endo H precipitada con HC10 y que procede, presumiblemente, de la disociación de los heterodímeros en el compartimento endosómico. Los transfectantes de C1R-B\*1402, C1R-B\*1403 y C1R-B\*2705 se marcaron durante 15 minutos con [<sup>35</sup>S]Met/Cys y se analizaron a los tiempos de caza indicados. Cada muestra se inmunoprecipitó con W6/32, se trató la mitad de cada muestra con Endo H y la otra mitad se dejó sin tratamiento. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 17A). Para HLA-B\*2705 se analizó la cinética de salida

del RE calculando el tiempo que tarda cada subtipo en convertir en resistente a Endo H el 50% del heterodímero maduro. Para B\*1402 y B\*1403 se siguió el mismo procedimiento pero teniendo en cuenta la HC resistente a Endo H precipitada tanto con W6/32 como con HC10 (figura 14A). De esta forma, las cinéticas de maduración para B\*1402, B\*1403 y B\*2705 son de  $113 \pm 2$ ,  $113 \pm 6$  y  $69 \pm 5$  minutos, respectivamente (figura 17B). Estos resultados indican que ambos subtipos de B14 tienen cinéticas de salida del RE similares y que éstas son aproximadamente 1.6 más lentas que la de B\*2705. Este parámetro no se correlaciona con la asociación diferencial de los subtipos de B14 a EA, ya que ambos presentan los mismos tiempos de adquisición de resistencia a Endo H.

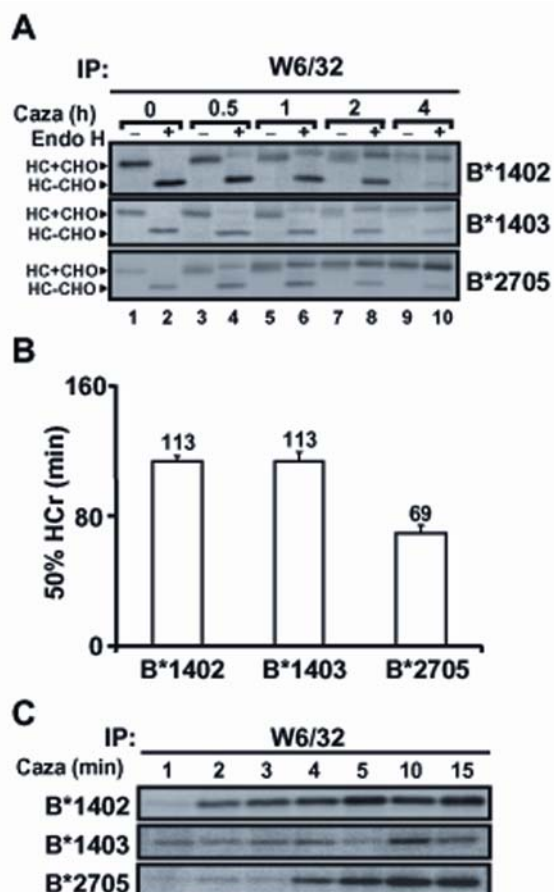


**Figura 16. Expresión en superficie de HC libre de HLA-B14 Y -B27.** (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de HC libre y heterodímeros en los transfectantes B\*1402, B\*1403 y B\*2705 teñidos con W6/32 y HC10, respectivamente. Las células sin transfectar se utilizaron como control. Se muestra un experimento representativo. (B) Comparación de la expresión en superficie de los heterodímeros (barras blancas) frente a la HC libre (barras negras) en los transfectantes correspondientes. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 6 o más experimentos.

Para descartar que la maduración lenta que presentan los subtipos de B14, relativa a B27 pudieran ser una consecuencia de diferencias en la cinética de ensamblaje de los complejos HC/ $\beta_2m$ /péptido, se analizó la generación de heterodímeros de HLA-B14 y -B27 a tiempos tempranos. Se marcaron los transfectantes de B14 y B\*2705 con [ $^{35}S$ ]Met/Cys durante 1 minuto para permitir la síntesis completa de la HC y se analizaron a los tiempos indicados inmunoprecipitando con W6/32. Los complejos de clase I correctamente plegados se observaron en todos los casos en la caza de 1 minuto (figura 17C), indicando que las diferencias en la cinética de maduración entre B14 y B27 no se explican por diferencias en el tiempo de formación del heterodímero.

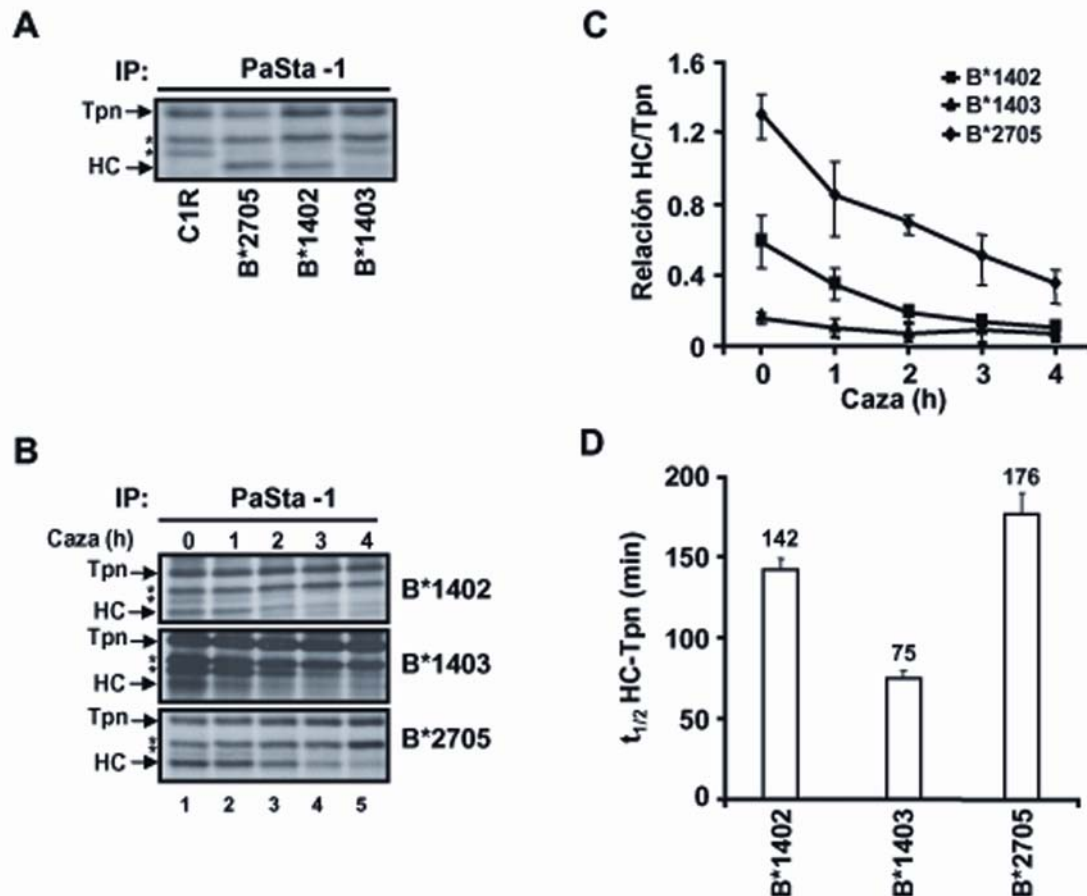
## 2.5 LOS SUBTIPOS DE HLA-B14 DIFIEREN EN SU INTERACCIÓN CON LA TAPASINA Y EN LA ESTABILIDAD DE SUS REPERTORIOS PEPTÍDICOS.

B\*1402 y B\*1403 se diferencian en la posición 156 donde B\*1402 tiene leucina y B\*1403, arginina. Se ha sugerido que esta posición podría influir en la interacción con TAP, que está mediada por la Tpn (Ortmann et al., 1997). Para estudiar si el polimorfismo en la posición 156 influye en las interacciones con el complejo de carga



**Figura 17. Los subtipos de HLA-B14 maduran de forma lenta.** (A) Las células C1R se marcaron 15 minutos y se cazaron a los tiempos indicados. Los complejos plegados se inmunoprecipitaron de los lisados con el mAb W6/32. La mitad de las muestras se digirieron con Endo H (líneas 2, 4, 6, 8, y 10) antes del análisis mediante SDS-PAGE. Las formas de la HC resistentes a Endo H (HC+CHO) y las sensibles (HC-CHO) están indicadas. (B) Las señales radioactivas de las formas resistentes y sensibles se cuantificaron por densitometría y se utilizaron para calcular el tiempo que tarda el heterodímero en convertir el 50% de su material en resistente a Endo H. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos. (C) Las células se marcaron metabólicamente durante 1 minuto y se cazaron a los tiempos indicados. Los complejos plegados se inmunoprecipitaron con W6/32, y se analizaron mediante SDS-PAGE. Se muestra un experimento representativo de 3 independientes.

peptídica, analizamos la asociación de la HC con la Tpn en los B\*1402, B\*1403 y B\*2705. Los transfectantes se marcaron con [ $^{35}$ S]Met/Cys durante 2 horas, se inmunoprecipitaron con el mAb PaSta-1 y se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (figura 18A). Se analizó la cantidad de HC coimmunoprecipitada con la Tpn como la relación HC/Tpn y se observó que hay diferencias drásticas entre los tres alotipos, disminuyendo en el siguiente orden: B\*2705>B\*1402>B\*1403 ( $1.3\pm 0.1$ ,  $0.6\pm 0.2$  y  $0.16\pm 0.03$ , respectivamente).



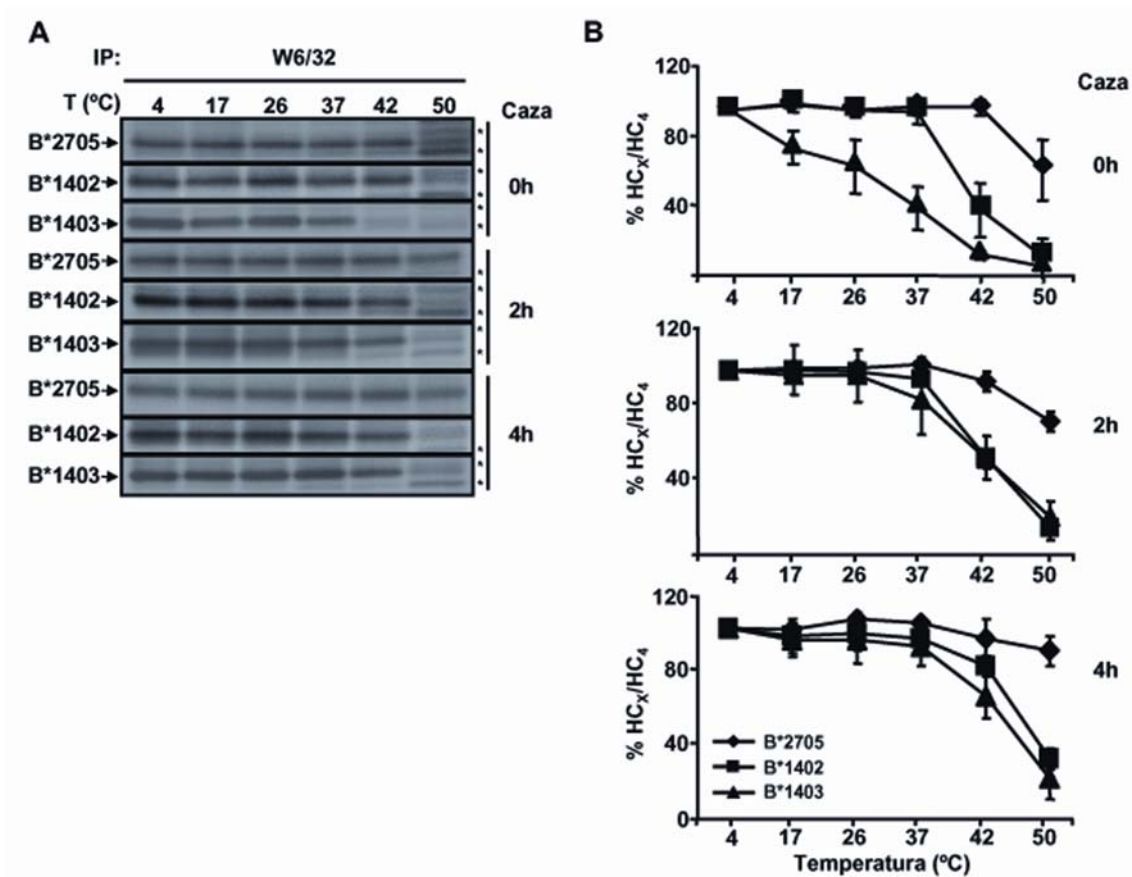
**Figura 18. Unión de los subtipos de HLA-B14 a la tapasina.** (A) Los transfectantes de C1R se marcaron durante 2 horas. Los lisados se inmunoprecipitaron con el mAb PaSta-1 y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. La HC coprecipitada y la Tpn están indicadas mediante flechas. Los asteriscos señalan polipéptidos inespecíficos. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes. (B) Las células se marcaron durante 2 horas, se cazaron a los tiempos indicados, la HC se coimmunoprecipitó con el mAb PaSta-1 (líneas 1-5) y se analizaron mediante SDS-PAGE. La flechas y los asteriscos hacen referencia a la Tpn, HC y a polipéptidos inespecíficos, respectivamente. Se muestra un experimento representativo. (C) Las señales radioactivas de la HC y la Tpn coprecipitadas con PaSta-1 (líneas 1-5) se cuantificaron mediante densitometría y se representaron como la relación HC/Tpn. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 y 5 experimentos para B14 y B27, respectivamente. (D) La vida media ( $t_{1/2}$ ) de la HC unida a la Tpn se calculó a partir de los experimentos de pulso y caza (Panel B: líneas 1-5). Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 y 4 experimentos para B14y B27, respectivamente.



Para analizar con más detalle las diferencias en la unión de la HC a Tpn, se marcaron los transfectantes de C1R con [<sup>35</sup>S]Met/Cys durante 2 horas y se hicieron cazas hasta 4 horas. Las muestras se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-Tpn. Las HC de B\*1402, B\*1403 y B\*2705 se asocian a Tpn en todos los tiempos de caza (figura 18B), pero las relaciones HC/Tpn son más altas para B\*2705, intermedios para B\*1402 y más bajas para B\*1403 (figura 18C). La vida media ( $t_{1/2}$ ) de la HC unida a Tpn para B\*1403 es dos veces menor ( $75\pm 4$  min) que para B\*1402 ( $142\pm 17$  min) o para B\*2705 ( $176\pm 13$  min) (figura 18D). Estos resultados indican que la interacción de B\*1403 con la Tpn es más débil, más corta o ambas cosas, que en B\*1402 y B\*2705.

El papel de la Tpn es facilitar la carga de péptidos en las moléculas del MHC de clase I y optimizar sus repertorios peptídicos (Dick et al., 2002). Para investigar si las diferencias en la unión a Tpn modulan la estabilidad de los repertorios peptídicos, analizamos la termoestabilidad de las moléculas de clase I. Los transfectantes de B14 y B\*2705 se marcaron durante 15 minutos con [<sup>35</sup>S]Met/Cys y tras incubar los lisados celulares durante 1 hora a diferentes temperaturas, se inmunoprecipitaron con W6/32 y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 19A). La cantidad del heterodímero precipitado a cada temperatura se expresó como el porcentaje respecto a la cantidad de heterodímero precipitado a 4°C, en cada tiempo de caza (Figura 19B). En la caza de 0 horas correspondiente a moléculas de clase I recién ensambladas, la termoestabilidad de los tres subtipos muestra diferencias claras (B\*2705>B\*1402>B\*1403), siendo B\*1403 quien muestra la menor termoestabilidad.

Se observó una optimización progresiva para este subtipo a tiempos de caza de 2 y 4 horas, donde su termoestabilidad se acercó a la de B\*1402. El aumento progresivo de termoestabilidad también ocurrió en B\*2705, fenómeno que se observa particularmente a 50°C. Sin embargo, la termoestabilidad de ambos subtipos de B14 es menor que la de B\*2705 en todos los tiempos de caza. Estos resultados indican que



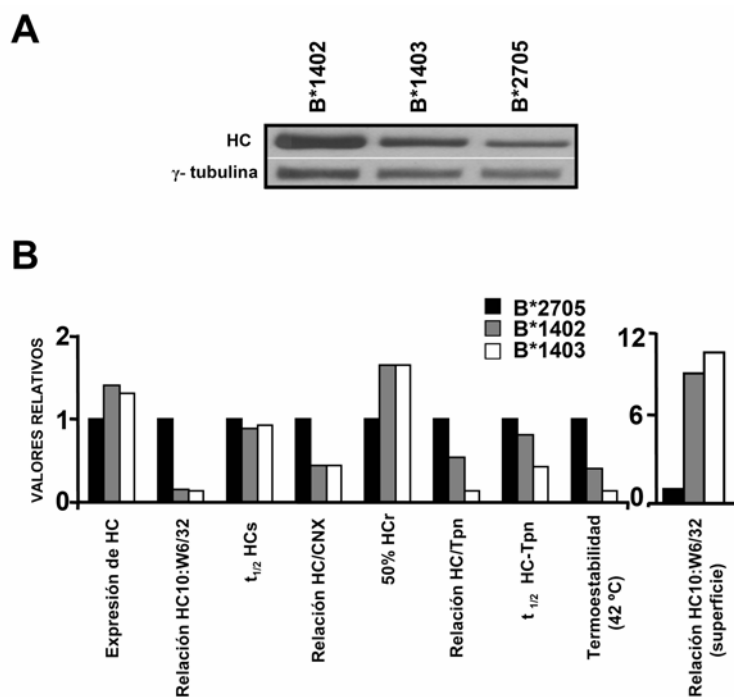
**Figura 19. Termoestabilidad de los subtipos de HLA-B14 y B\*2705.** (A) Los transfectantes se marcaron durante 15 minutos y se cazaron a los tiempos indicados. Los lisados se incubaron a las temperaturas indicadas durante 1 hora, antes de la inmunoprecipitación con el mAb W6/32. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los asteriscos señalan polipéptidos inespecíficos. Las flechas de la izquierda indican la HC. (B) El porcentaje de los complejos de HLA inmunoprecipitados con W6/32, después de las incubaciones a tiempo de caza 0, 2 ó 4 horas, se representó como el porcentaje respecto a la cantidad de heterodímero precipitado a 4°C a cada tiempo de caza. Se representa la media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos para B\*2705 y B\*1402, y 5 experimentos para B\*1403.

B\*1403 es globalmente menos estable que B\*1402 inmediatamente tras el ensamblaje en el RE y, aunque la termoestabilidad de ambos subtipos aumenta con el tiempo, no alcanzan la de B\*2705

## 2.6 LAS DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE LA CADENA PESADA ENTRE LOS TRANSFECTANTES NO EXPLICAN LAS PROPIEDADES DIFERENCIALES DE HLA-B14 Y HLA-B27.

Para descartar que las diferencias en los parámetros de plegamiento y maduración analizados en este estudio pudieran ser debidas simplemente a diferentes niveles de expresión de la HC, éstos se cuantificaron mediante *Western Blot* de lisados

totales, revelados con HC10 (Figura 20A). La expresión de la HC en B\*1402 y B\*1403, relativa a B\*2705 fue  $1.4\pm 0.3$  y  $1.3\pm 0.1$ , respectivamente. Los valores relativos de los parámetros analizados en este estudio para los tres alotipos se compararon con los respectivos niveles de HC y se representaron en un diagrama de barras (Figura 20B). A partir de este análisis se pueden sacar dos conclusiones. Primero, no existe correlación entre los niveles de expresión de la HC y los parámetros estudiados salvo para la cinética de maduración (50% Endo Hr). Segundo, la única diferencia entre los subtipos de B14 está en aquellos parámetros relativos al control de calidad de la carga peptídica, concretamente la interacción con Tpn (relación HC/Tpn y  $t_{1/2}$  de la HC unida a la Tpn) y la termoestabilidad de los complejos MHC-peptido. En estos dos parámetros, los alotipos asociados a EA (B\*1403 y B\*2705) muestran la máxima disparidad entre los tres comparados.



**Figura 20. Valores relativos de los parámetros estudiados comparados con la expresión de la HC.** (A) Se muestra un *Western Blot* representativo de 3 experimentos independientes (ver Materiales y Métodos). La expresión de la HC de B\*1402, B\*1403 relativa a B\*2705 fue:  $1,4\pm 0,3$  y  $1,3\pm 0,1$ , respectivamente. (B) Los valores relativos de la mayoría de los parámetros analizados en este estudio para B\*1402, B\*1403 y B\*2705 están resumidos y comparados con la expresión de la proteína de la HC de los diferentes transfectantes.

# *Discusión*

# DISCUSIÓN

## **HLA-B14 Y LA HIPÓTESIS DEL PÉPTIDO ARTRITOGÉNICO.**

El análisis de especificidad peptídica de los subtipos de HLA-B14, demostró que B\*1402 y B\*1403 presentan repertorios peptídicos muy dispares. Estos resultados son llamativos porque las dos moléculas poseen una gran similitud estructural, diferenciándose sólo en la posición 156 (L156R). Un estudio realizado con B\*4402 y B\*4403 que difieren también en un solo cambio (D156L), reveló que ambos subtipos comparten el 95% de sus repertorios peptídicos (Macdonald et al., 2003).

El polimorfismo en la posición 156 podría modular la especificidad peptídica al menos a través de dos mecanismos. Primero, modulando directamente la unión del ligando, ya que este residuo forma parte de las subcavidades D y E del sitio de unión de péptido, donde se unen los residuos de las posiciones 3 y 7, respectivamente (Garrett et al., 1989; Madden et al., 1992). Segundo, modulando la carga peptídica a través de interacciones con el complejo de carga. Se ha sugerido que el residuo 156 podría estar implicado en la interacción con TAP, que está mediada por la tapasina (Ortmann et al., 1997). Estudios en B\*4402 y B\*4403 han revelado diferencias en la eficiencia que estos dos subtipos presentan en su unión a TAP (Gauchat-Feiss et al., 1994; Neisig et al., 1996). Este mecanismo no se correlaciona con el alto solapamiento peptídico que presentan estos dos subtipos (Macdonald et al., 2003), pero no excluye que en los subtipos de B14 el polimorfismo afecte de forma diferente a las interacciones con el complejo de carga, ya que el cambio en la posición 156 es distinto.

Las notables diferencias en el uso de residuos de los péptidos específicos de B\*1402 y B\*1403 se pueden explicar a través del primer mecanismo. Dichas diferencias se encontraron en tres posiciones, dos de las cuales, P3 y P7, se unen a las subcavidades en las que participa el residuo 156. La preferencia de B\*1402 por residuos no polares en estas dos posiciones y la de B\*1403 por residuos ácidos (aspártico) en P3 y por residuos polares (treonina) en P7, es perfectamente consistente con la presencia de leucina y arginina en la posición 156 de B\*1402 y B\*1403, respectivamente. Sin embargo, la razón de la preferencia incrementada de B\*1403 por residuos alifáticos en P4 no es tan obvia en ausencia de datos de difracción de rayos X. Esta preferencia

podría ser consecuencia de reajustes en la orientación de la cadena lateral del péptido y en los contactos establecidos en el entorno del residuo 156 de B\*1403.

B\*1403 mostró una preferencia clara, aunque no estadísticamente significativa, por residuos ácidos en P1, respecto a B\*1402. Se ha sugerido que el uso de residuos ácidos en P1 podría estar favorecido por la presencia de asparagina en la posición 63 en HLA-B14 (DiBrino et al., 1994). Sin embargo, puesto que este residuo está conservado en los dos subtipos, no explica la mayor preferencia de B\*1403 por residuos ácidos en P1. Esta preferencia tampoco se puede explicar por un efecto directo de la arginina en la posición 156 de B\*1403, debido a que esta posición está muy distante. La única alternativa sería un efecto indirecto del residuo 156 cuya naturaleza ha de explicarse mediante análisis cristalográfico.

Alternativamente, la preferencia de B\*1403 por residuos ácidos en P1 podría reflejar una dependencia menor de este alotipo por TAP ya que los motivos ácidos de los péptidos, tanto en P1 como en P3, están desfavorecidos para la unión de éstos con TAP (Daniel et al., 1998; Daniel et al., 1997; Lankat-Buttgereit and Tampe, 2002; Van Endert et al., 1995). De 8 nonámeros específicos de B\*1403; 5 tenían residuos ácidos en P1 y P3 y todos menos uno, tenían un residuo ácido en al menos una de las dos posiciones mencionadas. Dos posibilidades podrían explicar estos resultados. Por un lado, que B\*1403 interaccionase o se asociase menos a las proteínas del complejo de carga y por otro, que la preferencia incrementada hacia residuos ácidos en P3, resultante de una interacción directa entre la arginina en la posición 156 y el aspártico en P3, evitase los requerimientos de unión de TAP para la carga peptídica e indirectamente favoreciese también la unión de péptidos con residuos ácidos en P1.

Los estudios comparativos de coimmunoprecipitación de la cadena pesada con Tpn y de termoestabilidad de las moléculas de clase I estudiadas son consistentes con esta posibilidad. Tanto, la cantidad de HC unida a Tpn a lo largo del tiempo como la termoestabilidad de los complejos MHC/péptido fueron menores para B\*1403 que para B\*1402. Por tanto el polimorfismo en la posición 156 está, no sólo modulando directamente la especificidad peptídica sino también la carga peptídica, haciendo que el subtipo asociado a enfermedad una péptidos más subóptimos que B\*1402. A lo largo del tiempo se observa una optimización progresiva de los repertorios peptídicos de B\*1402 y B\*1403, que ocurre también en el repertorio de B\*2705, pero en menor medida. La optimización dependiente del tiempo en B14 se ha observado también para B\*2705 en células deficientes en Tpn (Williams et al., 2002). Esto es consistente con la

posibilidad de que la optimización en el tiempo que ocurre en los subtipos de B14 sea, al menos parcialmente, independiente de Tpn.

Es interesante añadir que uno de los péptidos comunes a los tres alotipos analizados en esta tesis, IRAAPPPLF, es independiente de TAP (datos no publicados de nuestro laboratorio), como confirmó su aislamiento del repertorio peptídico de B\*2705 en células T2, que son deficientes en TAP. Este péptido deriva de la catepsina A, una proteína del compartimento endosómico y que se procesa por una ruta proteasoma-independiente (Marcilla et al., 2007). Por tanto, es posible que este ligando se incorpore a HLA-B14 y HLA-B27 fuera del RE durante una fase más tardía de la optimización de sus repertorios peptídicos.

Aparte del papel de la posición 156 como modulador de la especificidad y de la carga peptídica, es posible que ligandos compartidos se presenten de manera diferente, aumentando así la disparidad antigénica entre los dos subtipos. Para analizar esta posibilidad se utilizaron CTLs alorreactivos, cuyo uso se basa en tres principios. Primero, que los CTLs reconocen péptidos constitutivos unidos al aloantígeno. Segundo, que la gran diversidad clonal de las respuestas de los CTLs está basada en el reconocimiento de un espectro de péptidos amplio donde virtualmente cada clon reconocerá a un péptido diferente (Heath et al., 1991; Rotzschke et al., 1991). Tercero, que aunque los CTLs pueden presentar reacción cruzada con péptidos diferentes con una homología mínima en sus secuencias (Evavold et al., 1995), es razonable inferir que la reacción cruzada entre alotipos con un grado substancial de solapamiento, estará basada en el reconocimiento de péptidos comunes. Esto es difícil de demostrar ya que, en general, los péptidos reconocidos por los CTLs son desconocidos. Sin embargo, hay un caso formalmente demostrado para subtipos de HLA-B27 (Paradela et al., 2000) y además, algunos ligandos comunes de B\*2705 y B\*2709 muestran una alta similitud en su estructura cristalográfica cuando se unen a ambos subtipos (Hulsmeyer et al., 2005; Pohlmann et al., 2004). El hecho de que los porcentajes de solapamiento peptídico y de solapamiento antigénico entre B\*1402 y B\*1403 sean parecidos sugiere que la mayoría de los ligandos comunes mantendrían sus características antigénicas y, probablemente, una conformación similar cuando se unen a cualquiera de los dos subtipos de B14. Nuestros resultados relativos al alorreconocimiento de HLA-B14 difieren de los publicados para B\*4402 y B\*4403. En este par de subtipos, el cambio D156L tiene un efecto limitado en la especificidad peptídica y muy drástico en alorreactividad (Macdonald et al., 2003). Una mutación diferente en la misma posición en los subtipos

de B14 (L156R) tiene efectos significativos en la especificidad peptídica pero no parece tenerlos en el alorreconocimiento de los péptidos compartidos. Por lo tanto, el efecto de un polimorfismo en un subtipo no puede ser generalizado, porque depende de la naturaleza de la mutación, del contexto molecular en el que se da o de ambas cosas. Por ejemplo, B\*3508 y B\*3501 que también se diferencian en una sola posición (L156R), unen un epítipo compartido con una conformación similar, pero la inmunodominancia y el reconocimiento por el TCR de este epítipo son dependientes de subtipo, debido a un efecto del polimorfismo en la conformación del sitio de unión de péptido (Tynan et al., 2005).

Si la susceptibilidad a EA está basada en el reconocimiento de péptidos específicos por parte de las células T, como propone la teoría del péptido artrítogénico (Benjamin and Parham, 1990), sería esperable encontrar péptidos compartidos y con los mismos rasgos estructurales entre los subtipos asociados a enfermedad, B\*1403 y B\*2705. La existencia de péptidos comunes entre estos dos alotipos ha sido formalmente demostrada en este estudio. Sin embargo, es obvio que la existencia de ligandos comunes compartidos con HLA-B27, no implica por sí misma una predisposición a la enfermedad. Un ejemplo que ilustra bien esto es la falta de asociación a enfermedad de los subtipos de B\*2706 y B\*2709 a pesar del gran solapamiento que tienen con otros subtipos que sí están asociados (Ramos et al., 2002b; Sesma et al., 2002). En este estudio también se han encontrado 4 péptidos comunes entre B\*2705 y B\*1402.

En el estudio con CTLs se vio que había alguna reactividad cruzada entre B\*1402 y B\*2705 paralela al bajo solapamiento peptídico entre ambos alotipos. Por lo tanto, podría ser que algunos de los péptidos compartidos entre HLA-B27 y HLA-B14 mantuviesen sus características antigénicas. Este sería el caso del péptido IRAAPPPLF que se presenta de la misma forma por B\*1402 y B\*2705 como han revelado recientes estudios cristalográficos (Pravin Kumar et al., manuscrito en revisión). De manera alternativa, podría ocurrir que la reactividad cruzada reflejara un reconocimiento de péptidos diferentes en cada alotipo y esto implicaría que los ligandos presentaran mimetismo molecular. Aunque la reactividad cruzada entre B\*1403 y B\*2705 no se ha estudiado, parece probable que sea muy similar a la existente entre B\*1402 y B\*2705. El hallazgo de ligandos compartidos y de reactividad cruzada con CTLs entre HLA-B14 y HLA-B27 sugiere que B\*1403 y B\*2705 presentan péptidos compartidos con los mismos rasgos antigénicos o péptidos diferentes que presentan mimetismo molecular.



Esta sería la predicción de la hipótesis del péptido artrítogénico (Benjamin and Parham, 1990). Deben considerarse otros dos aspectos relevantes. Primero, en este estudio no se encontraron péptidos comunes a B\*1403 y B\*2705 ausentes en B\*1402 y aunque nuestros resultados no excluyen su existencia, deben de ser escasos. Segundo, las bases de las diferencias en la especificidad peptídica entre los dos alotipos asociados a enfermedad (B\*1403 y B\*2705) se explican por el uso diferente de residuos en múltiples posiciones y por el hecho de que muchos residuos favorecidos en un alotipo son raros o no se encuentran entre los ligandos del otro alotipo. Esto no excluye la existencia de ligandos comunes a los subtipos asociados a EA y ausentes en el no asociado, que serían buenos candidatos a péptidos artrítogénicos. Alternativamente, podría ocurrir que se presentaran péptidos comunes a los tres subtipos de forma antigénicamente alterada en el subtipo no asociado a enfermedad. Por tanto, al análisis comparativo de los repertorios peptídicos de B\*1402, B\*1403 y B\*2705 indica que a pesar de la elevada disparidad de dichos repertorios entre B\*1403 y B\*2705, existen ligandos y epítomos antigénicos comunes que se ajustan a las predicciones de la hipótesis del péptido artrítogénico.

### **HLA-B14 Y LA HIPÓTESIS DEL PLEGAMIENTO ANÓMALO.**

En la segunda parte de esta tesis se examinaron el plegamiento, transporte, maduración y estabilidad de los subtipos de HLA-B14 asociados diferencialmente a enfermedad y se compararon con B\*2705 para tratar de definir características diferenciales entre ambos subtipos de B14 y comunes a B\*1403 y B\*2705, que pudieran explicar la asociación a EA.

B\*2705 mostró una cinética de plegamiento lenta, una tendencia de la HC a plegarse de forma anómala y acumularse en el RE y una cinética de salida del RE relativamente lenta, en consonancia con estudios previos (Dangoria et al., 2002; Galocha and Lopez de Castro, 2008; Goodall et al., 2006; Mear et al., 1999).

B\*1402 y B\*1403 mostraron una cinética de plegamiento y de maduración y transporte parecidas, que diferían significativamente de B\*2705. La diferencia principal fue que la cantidad de HC libre mal plegada, sensible a Endo H y presumiblemente, en el RE era menor en los dos subtipos de B14 que en B\*2705. Esto indica un plegamiento más rápido y eficiente de las moléculas de B14. Sin embargo, la cantidad de HC que no está plegada de forma correcta permanecía en el RE tanto tiempo como la de B27. Por lo tanto, no hay correlación entre la cantidad o la vida media de la HC que está plegada

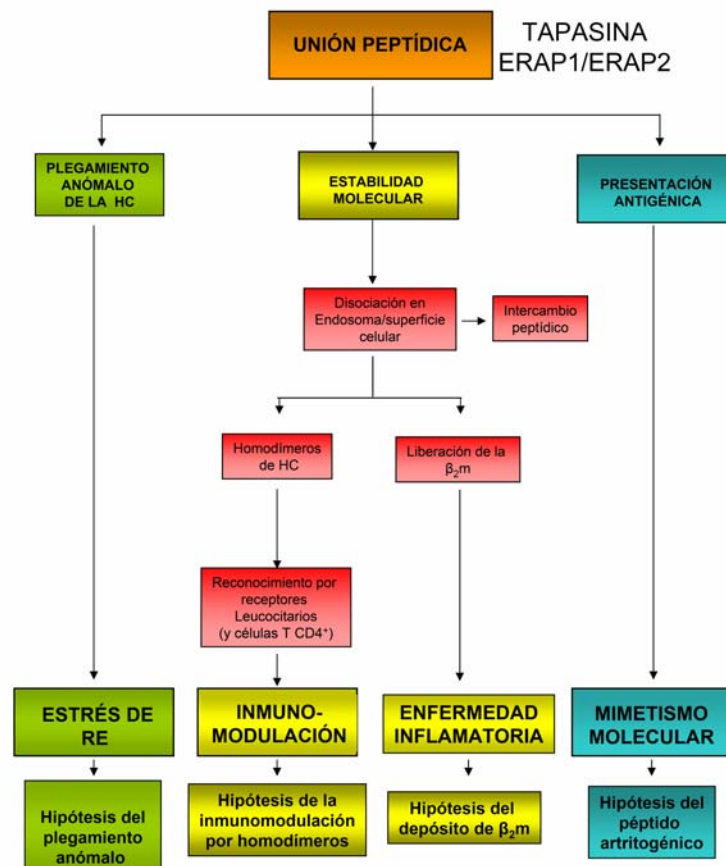
de forma anómala en el RE y la asociación (B\*2705, B\*1403) o no (B\*1402) a EA. Estos resultados sugieren que el plegamiento anómalo de la HC no explica la asociación de B\*1403 a EA.

Al contrario de lo que ocurre con la cinética de plegamiento, en su maduración y transporte, medidos mediante la adquisición de la resistencia a Endo H, los subtipos de B14 eran más lentos que B\*2705. Esto es consistente con el hecho de que los heterodímeros de B14 necesiten más tiempo que B\*2705 para alcanzar el nivel de optimización de la carga peptídica requerida para salir del RE, quizás como consecuencia de su interacción menos eficiente con la Tpn. La presencia de HC libre Endo H resistente y una tasa de aparición inversamente proporcional a la tasa de desaparición de los heterodímeros maduros sugiere que, incluso después de salir del RE, el repertorio peptídico de B14 está menos optimizado, en términos de estabilidad peptídica, que el de B27. Probablemente, esto ocurre porque los heterodímeros de B14 se disocian en fases tardías de maduración en el endosoma durante su reciclamiento entre este compartimento y la superficie celular, como se ha descrito para HLA-B27 (Bird et al., 2003). Dicha disociación estaría propiciada por el bajo pH endosomal. De hecho, B14 presentó una importante cantidad de HC libre en superficie comparada con la de B\*2705. Estos resultados sugieren que ni el transporte, ni la tasa de disociación intracelular del heterodímero exportado, ni la expresión de HC libre en superficie, son relevantes para la asociación de B\*1403 y B\*2705 a EA.

La menor estabilidad de los repertorios peptídicos unidos a B14 comparada con B\*2705 explica tanto la disociación intracelular como la expresión alta de HC libre en superficie en los subtipos B\*1402 y B\*1403. La HC disociada en superficie, que no es capaz de reasociarse, podría formar homodímeros similarmente a HLA-B27 (Bird et al., 2003). Como en este alotipo, HLA-B14 posee un residuo de cisteína libre en la posición 67, que es crítico para la formación de homodímeros en HLA-B27 (Allen et al., 1999). La formación de homodímeros de HC en HLA-B14 no se ha estudiado en esta tesis.

Existen al menos dos mecanismos por los que un repertorio subóptimo unido a B\*1403 podría tener efectos patogénicos. Tras la disociación intracelular de B\*1403 puede ocurrir: a), un intercambio de péptidos que permita la unión de ligandos con tasas de disociación menores, tales como péptidos de proteínas exógenas o péptidos propios procesados fuera del RE, y su posterior expresión en la superficie celular, b), que se formen homodímeros covalentes de HC y se expresen en la superficie celular. El primer mecanismo permitiría que B\*1403 presentase ligandos bacterianos generados en el

compartimento endosómico, que podrían desencadenar posibles respuestas de CTLs contra bacterias artritogénicas u otros antígenos. El segundo mecanismo, favorecería la formación de homodímeros, como se ha propuesto para HLA-B27 (Allen and Trowsdale, 2004; Kollnberger et al., 2002) y podría inducir una modulación de respuestas celulares mediada por receptores leucocitarios. Sin embargo, ninguna de estas posibilidades explica la asociación diferencial de los subtipos de B14 a EA. En los parámetros en los que estos subtipos se comportan de manera diferente, B\*1402 y B\*2705, presentan más similitudes. Por razones parecidas, un mecanismo basado en el acúmulo de  $\beta_2m$  tras la disociación de los heterodímeros (Uchanska-Ziegler and Ziegler, 2003) parece poco probable a la vista de la termoestabilidad relativa de los tres alotipos estudiados.



**Figura 21. Papel central de la especificidad peptídica.** En esta figura se muestra el papel central de la especificidad peptídica en determinar otras propiedades moleculares y funcionales de HLA-B14 y B27. Se ha propuesto que varias características de la molécula de B27 pueden desencadenar EA, a través de diferentes mecanismos. La unión peptídica influye de manera importante en cada una de estas características y, a su vez, está modulada por la acción de una serie de proteínas de la ruta de procesamiento de los antígenos de clase I. Significativamente, ERAP1 se ha identificado recientemente como uno de los principales factores de susceptibilidad a EA, además de HLA-B27 (Brown, 2008; Consortium., 2007). (Modificado de Marcilla et al, 2008, in press).

En conclusión, si asumimos que el mecanismo patogénico de B\*1403 y B\*2705 en EA ha de ser el mismo, nuestro estudio no es consistente con el posible papel del plegamiento anómalo o de la expresión en superficie de HC libre en la patogénesis de esta enfermedad. La existencia de un péptido común entre B\*1403 y B\*2705, en línea con la hipótesis del péptido artritogénico, se revela, por tanto, como la única alternativa patogénica consistente con la biología comparada de B\*1402, B\*1403 y B\*2705 analizada en esta tesis. Nuestros resultados indican, asimismo, el papel central de la unión de péptidos en determinar, no sólo la especificidad de presentación antigénica, sino el conjunto de la biología celular de HLA-B14 y HLA-B27.

Estas interrelaciones se presentan esquemáticamente en la figura 21 (Marcilla et al 2008, en prensa), en la que se muestra cómo la unión de péptidos determina otras propiedades de las moléculas de HLA de clase I, que han servido de base para las distintas hipótesis que intentan explicar el mecanismo de asociación de HLA-B27 (y B\*1403) con las espondiloartropatías.

***Conclusiones***

## CONCLUSIONES

1. Los subtipos B\*1402 y B\*1403 presentan una disparidad significativa (aproximadamente el 65%) en sus repertorios peptídicos a pesar de diferir estructuralmente en un solo residuo de su secuencia de aminoácidos (R156L).
2. La naturaleza de las diferencias peptídicas entre los subtipos de HLA-B14 se explica esencialmente por el efecto de la posición 156 al menos sobre las posiciones de anclaje 3 y 7.
3. El polimorfismo en la posición 156 entre B\*1402 y B\*1403 tiene una influencia directa limitada en el reconocimiento por células T, el cual parece consecuencia principalmente del efecto de esta posición sobre el repertorio peptídico.
4. La similitud entre los porcentajes de péptidos comunes y de epítomos alorreactivos comunes sugiere que la mayoría de los ligandos compartidos se presentan con una conformación similar en las células T.
5. La existencia de ligandos y epítomos de células T comunes entre B\*1403 y B\*2705 sugiere, a pesar de su bajo porcentaje, la posibilidad de que un ligando artritogénico común pudiera ser presentado por ambos alotipos.
6. Los subtipos de HLA-B14 presentan cinéticas de plegamiento y maduración similares, que difieren de las de B\*2705.
7. B\*1402 y B\*1403 sólo difieren en sus propiedades de unión a la tapasina y en su termoestabilidad. B\*1403 se une con una eficiencia menor a la tapasina y tiene un repertorio peptídico menos optimizado, que se refleja en una menor termoestabilidad, con respecto a B\*1402.

8. Las características de plegamiento y de termoestabilidad de B\*1402, B\*1403 y B\*2705 no se correlacionan con la asociación de estos alotipos a EA.
  
9. La especificidad de unión de péptidos de B\*1402, B\*1403 y B\*2705 determina no sólo la presentación antigénica sino toda la biología celular de estas moléculas y emerge como la propiedad básica que integra la biología y el papel patogénico de estas moléculas.

# *Bibliografía*



## BIBLIOGRAFÍA

Achour, A., K. Persson, R.A. Harris, J. Sundback, C.L. Sentman, Y. Lindqvist, G. Schneider, and K. Karre. 1998. The crystal structure of H-2D(d) MHC class I complexed with the HIV-1-derived peptide P18-I10 at 2.4 angstrom resolution: Implications for T cell and NK cell recognition. *Immunity*. 9:199-208.

Alvarez, I., L. Sesma, M. Marcilla, M. Ramos, M. Martí, E. Camafeita, and J.A. Lopez de Castro. 2001. Identification of Novel HLA-B27 Ligands Derived from Polymorphic Regions of its own or Other Class I Molecules Based on Direct Generation by 20S Proteasome. *J.Biol.Chem.* 276:32729-32737.

Allen, R.L., C.A. O'Callaghan, A.J. McMichael, and P. Bowness. 1999. Cutting edge: HLA-B27 can form a novel b2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure *J.Immunol.* 162:5045-5048.

Allen, R.L., T. Raine, A. Haude, J. Trowsdale, and M.J. Wilson. 2001. Leukocyte receptor complex-encoded immunomodulatory receptors show differing specificity for alternative HLA-B27 structures. *J.Immunol.* 167:5543-5547.

Allen, R.L., and J. Trowsdale. 2004. Recognition of classical and heavy chain forms of HLA-B27 by leukocyte receptors. *Curr.Mol.Med.* 4:59-65.

Anfinsen, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 181:223-30.

Antoniou, A.N., S. Ford, J.D. Taurog, G.W. Butcher, and S.J. Powis. 2004. Formation of HLA-B27 homodimers and their relationship to assembly kinetics. *J.Biol.Chem.* 279:8895-8902.

Arendt, C.S., and M. Hochstrasser. 1997. Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:7156-7161.

Armas, J.B., S. Gonzalez, J. Martinez-Borra, F. Laranjeira, E. Ribeiro, J. Correia, M.L. Ferreira, M. Toste, A. Lopez-Vazquez, and C. Lopez-Larrea. 1999. Susceptibility to ankylosing spondylitis is independent of the Bw4 and Bw6 epitopes of HLA-B27 alleles. *Tissue Antigens*. 53:237-243.

Balch, W.E., W.G. Dunphy, W.A. Braell, and J.E. Rothman. 1984. Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell*. 39:405-16.

Balendiran, G.K., J.C. Solheim, A.C. Young, T.H. Hansen, S.G. Nathenson, and J.C. Sacchettini. 1997. The three-dimensional structure of an H-2Ld-peptide complex explains the unique interaction of Ld with beta-2 microglobulin and peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:6880-6885.

Bangia, N., P.J. Lehner, E.A. Hughes, M. Surman, and P. Cresswell. 1999. The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *Eur J Immunol.* 29:1858-70.

Barnstable, C.J., W.F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A.F. Williams, and A. Ziegler. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens. New tools for genetic analysis. *Cell*. 14:9-20.

Bednarek, S.Y., L. Orci, and R. Schekman. 1996. Traffic COPs and the formation of vesicle coats. *Trends Cell Biol.* 6:468-73.

Beninga, J., K.L. Rock, and A.L. Goldberg. 1998. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N-terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J.Biol.Chem.* 273:18734-18742.

Benjamin, R., and P. Parham. 1990. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol.Today.* 11:137-142.

Bird, L.A., C.A. Peh, S. Kollnberger, T. Elliott, A.J. McMichael, and P. Bowness. 2003. Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling. *Eur.J.Immunol.* 33:748-759.

Bjorkman, P.J., and P. Parham. 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem.* 59:253-88.

Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987a. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature.* 329:512-518.

Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987b. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature.* 329:506-512.

Boisgerault, F., V. Tieng, M.C. Stolzenberg, N. Dulphy, I. Khalil, R. Tamouza, D. Charron, and A. Toubert. 1996. Differences in endogenous peptides presented by HLA-

**B\*2705 and B\*2703 allelic variants: implications for susceptibility to spondylarthropathies. *J.Clin.Invest.* 98:2764-2770.**

**Bouvier, M., H.C. Guo, K.J. Smith, and D.C. Wiley. 1998. Crystal structures of HLA-A\*0201 complexed with antigenic peptides with either the amino- or carboxyl-terminal group substituted by a methyl group. *Proteins.* 33:97-106.**

**Bowness, P. 2002. HLA B27 in health and disease: a double-edged sword? *Rheumatology.(Oxford).* 41:857-868.**

**Breban, M., J.L. Fernandez-Sueiro, J.A. Richardson, R.R. Hadavand, S.D. Maika, R.E. Hammer, and J.D. Taurog. 1996. T cells, but not thymic exposure to HLA-B27, are required for the inflammatory disease of HLA-B27 transgenic rats. *J.Immunol.* 156:794-803.**

**Brewerton, D.A., M. Caffrey, A. Nicholls, D. Walters, J.K. Oates, and D.C. James. 1973a. Reiter's disease and HL-A 27. *Lancet.* 2:996-998.**

**Brewerton, D.A., F.D. Hart, A. Nicholls, M. Caffrey, D.C. James, and R.D. Sturrock. 1973b. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *Lancet.* 1:904-907.**

**Brodsky, F.M., W.F. Bodmer, and P. Parham. 1979. Characterization of a monoclonal anti-beta 2-microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens. *Eur.J.Immunol.* 9:536-545.**

**Brown, M.A. 2008. Breakthroughs in genetic studies of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford).* 47:132-7.**

**Calvo, V., S. Rojo, D. Lopez, B. Galocha, and J.A. Lopez de Castro. 1990. Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J.Immunol.* 144:4038-4045.**

**Cascino, I., F. Paladini, F. Belfiore, A. Cauli, C. Angelini, M.T. Fiorillo, A. Mathieu, and R. Sorrentino. 2007. Identification of previously unrecognized predisposing factors for ankylosing spondylitis from analysis of HLA-B27 extended haplotypes in Sardinia. *Arthritis. Rheum.* 56:2640-51.**

**Cauli, A., A. Vacca, A. Mameli, G. Passiu, M.T. Fiorillo, R. Sorrentino, and A. Mathieu. 2007. A Sardinian patient with ankylosing spondylitis and HLA-B\*2709 co-occurring with HLA-B\*1403. *Arthritis. Rheum.* 56:2807-9.**

**Ciechanover, A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell.* 79:13-21.**

Clauser, K.R., P. Baker, and A.L. Burlingame. 1999. Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Anal Chem.* 71:2871-82.

Colbert, R.A. 2004. The immunobiology of HLA-B27: variations on a theme. *Curr.Mol.Med.* 4:21-30.

Consortium., W. 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 447:661-78.

Cragolini, J.J., and J.A. Lopez de Castro. 2008. Identification of endogenously presented peptides from *Chlamydia trachomatis* with high homology to human proteins and to a natural self-ligand of HLA-B27. *Mol Cell Proteomics.* 7:170-80.

Creighton, T.E. 1988. Disulphide bonds and protein stability. *Bioessays.* 8:57-63.

Crivellato, E., and T. Zacchi. 1987. HLA-B39 and the axial type of psoriatic arthritis. *Acta .Derm.Venereol.* 67:249-250.

D'Amato, M., M.T. Fiorillo, C. Carcassi, A. Mathieu, A. Zuccarelli, P.P. Bitti, R. Tosi, and R. Sorrentino. 1995a. Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur.J.Immunol.* 25:3199-3201.

D'Amato, M., M.T. Fiorillo, M. Galeazzi, M. Martinetti, A. Amoroso, and R. Sorrentino. 1995b. Frequency of the new HLA-B\*2709 allele in ankylosing spondylitis patients and healthy individuals. *Dis. Markers.* 12:215-7.

Dangoria, N.S., M.L. DeLay, D.J. Kingsbury, J.P. Mear, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler, and R.A. Colbert. 2002. HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum. *J. Biol .Chem.* 277:23459-68.

Daniel, S., V. Brusic, S. Caillat-Zucman, N. Petrovsky, L. Harrison, D. Riganelli, F. Sinigaglia, F. Gallazzi, J. Hammer, and P.M. Van Endert. 1998. Relationship between peptide selectivities of human transporters associated with antigen processing and HLA class I molecules. *J.Immunol.* 161:617-624.

Daniel, S., S. Caillat-Zucman, J. Hammer, J.F. Bach, and P.M. van Endert. 1997. Absence of functional relevance of human transporter associated with antigen processing polymorphism for peptide selection. *J Immunol.* 159:2350-7.

de la Salle, H., D. Hanau, D. Fricker, A. Urlacher, A. Kelly, J. Salamero, S.H. Powis, L. Donato, H. Bausinger, and M. Laforet. 1994. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science.* 265:237-241.

DiBrino, M., K.C. Parker, D.H. Margulies, J. Shiloach, R.V. Turner, W.E. Biddison, and J.E. Coligan. 1994. The HLA-B14 peptide binding site can accommodate peptides with different combinations of anchor residues. *J.Biol.Chem.* 269:32426-32434.

Dick, T.P., N. Bangia, D.R. Peaper, and P. Cresswell. 2002. Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity.* 16:87-98.

Dulphy, N., M.A. Peyrat, V. Tieng, C. Douay, C. Rabian, R. Tamouza, S. Laoussadi, F. Berenbaum, A. Chabot, M. Bonneville, D. Charron, and A. Toubert. 1999. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J.Immunol.* 162:3830-3839.

Edwards, J.C., P. Bowness, and J.R. Archer. 2000. Jekyll and Hyde: the transformation of HLA-B27. *Immunol.Today.* 21:256-260.

Ellgaard, L., and A. Helenius. 2001. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol.* 13:431-7.

Ellis, J.M., S.J. Mack, R.F. Leke, I. Quakyi, A.H. Johnson, and C.K. Hurley. 2000. Diversity is demonstrated in class I HLA-A and HLA-B alleles in Cameroon, Africa: description of HLA-A\*03012, \*2612, \*3006 and HLA- B\*1403, \*4016, \*4703. *Tissue Antigens.* 56:291-302.

Evavold, B.D., J. Sloan-Lancaster, K.J. Wilson, J.B. Rothbard, and P.M. Allen. 1995. Specific T cell recognition of minimally homologous peptides: evidence for multiple endogenous ligands. *Immunity.* 2:655-663.

Falk, K., O. Rotzschke, M. Takiguchi, V. Gnau, S. Stevanovic, G. Jung, and H.G. Rammensee. 1995. Peptide motifs of HLA-B38 and B39 molecules. *Immunogenetics.* 41:162-164.

Fiorillo, M.T., M. Maragno, R. Butler, M.L. Dupuis, and R. Sorrentino. 2000. CD8 + T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J.Clin.Invest.* 106:47-53.

Fremont, D.H., M. Matsumura, E.A. Stura, P.A. Peterson, and I.A. Wilson. 1992. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science.* 257:919-927.

Fremont, D.H., E.A. Stura, M. Matsumura, P.A. Peterson, and I.A. Wilson. 1995. Crystal structure of an H-2K b -ovalbumin peptide complex reveals the interplay of primary and secondary anchor positions in the major histocompatibility complex binding groove. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:2479-2483.

Galocha, B., and J.A. Lopez de Castro. 2008. Folding of HLA-B27 subtypes is determined by the global effect of polymorphic residues and shows incomplete correspondence to ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 58:401-12.

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.* 384:134-141.

Garcia, F., B. Galocha, J.A. Villadangos, J.R. Lamas, J.P. Albar, A. Marina, and J.A. Lopez de Castro. 1997. HLA-B27 (B\*2701) specificity for peptides lacking Arg2 is determined by polymorphism outside the B pocket. *Tissue Antigens.* 49:580-587.

Garrett, T.P., M.A. Saper, P.J. Bjorkman, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature.* 342:692-696.

Gauchat-Feiss, D., B.S. Breur-Vriesendorp, N. Rufer, M. Jeannet, E. Roosnek, and J.M. Tiercy. 1994. Sequencing of a novel functional HLA-B44 subtype differing in two residues in the alpha 2 domain. *Tissue Antigens.* 44:261-264.

Gil-Torregrosa, B.C., A.R. Castano, D. Lopez, and M. Del Val. 2000. Generation of MHC class I peptide antigens by protein processing in the secretory route by furin. *Traffic.* 1:641-651.

Gomez, P., V. Montserrat, M. Marcilla, A. Paradela, and J.A. López de Castro. 2006. B\*2707 differs in peptide specificity from B\*2705 and B\*2704 as much as from HLA-B27 subtypes not associated to spondyloarthritis. *Eur.J.Immunol.* 36:1867-1881.

Gonzalez-Roces, S., M.V. Alvarez, S. Gonzalez, A. Dieye, H. Makni, D.G. Woodfield, L. Housan, V. Kononkov, M.C. Abbadi, N. Grunnet, E. Coto, and C. Lopez-Larrea. 1997. HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens.* 49:116-123.

Goodall, J.C., L. Ellis, and J.S. Hill Gaston. 2006. Spondylarthritis-associated and non-spondylarthritis-associated B27 subtypes differ in their dependence upon tapasin for surface expression and their incorporation into the peptide loading complex. *Arthritis Rheum.* 54:138-147.

Gromme, M., and J. Neefjes. 2002. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol.* 39:181-202.

Guo, H.C., T.S. Jardetzky, T.P. Garrett, W.S. Lane, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1992. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature.* 360:364-366.

Hammer, R.E., S.D. Maika, J.A. Richardson, J.P. Tang, and J.D. Taurog. 1990. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human b2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell*. 63:1099-1112.

Hammond, C., I. Braakman, and A. Helenius. 1994. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:913-7.

Hammond, C., and A. Helenius. 1994. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol.* 126:41-52.

Heath, W.R., K.P. Kane, M.F. Mescher, and L.A. Sherman. 1991. Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:5101-5105.

Helenius, A., and M. Aebi. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*. 291:2364-9.

Hermann, E., D.T. Yu, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and B. Fleischer. 1993. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet*. 342:646-650.

Hill, A., M. Takiguchi, and A. McMichael. 1993. Different rates of HLA class I molecule assembly which are determined by amino acid sequence in the alpha 2 domain. *Immunogenetics*. 37:95-101.

Hillig, R.C., P.G. Coulie, V. Stroobant, W. Saenger, A. Ziegler, and M. Hulsmeier. 2001. High-resolution structure of HLA-A\*0201 in complex with a tumour- specific antigenic peptide encoded by the MAGE-A4 gene. *J.Mol.Biol.* 310:1167-1176.

Hirsch, C., D. Blom, and H.L. Ploegh. 2003. A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *Embo J.* 22:1036-46.

Huczko, E.L., W.M. Bodnar, D. Benjamin, K. Sakaguchi, N.Z. Zhu, J. Shabanowitz, R.A. Henderson, E. Appella, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 1993. Characteristics of endogenous peptides eluted from the class I MHC molecule HLA-B7 determined by mass spectrometry and computer modeling. *J.Immunol.* 151:2572-2587.

Hulsmeier, M., K. Welfle, T. Pohlmann, R. Misselwitz, U. Alexiev, H. Welfle, W. Saenger, B. Uchanska-Ziegler, and A. Ziegler. 2005. Thermodynamic and structural equivalence of two HLA-B27 subtypes complexed with a self-peptide. *J.Mol.Biol.* 346:1367-1379.

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*. 353:326-329.

Kaneko, M., Y. Niinuma, and Y. Nomura. 2003. Activation signal of nuclear factor-kappa B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *Biol Pharm Bull.* 26:931-5.

Khan, M.A. 2002. Update on spondyloarthropathies. *Ann.Intern.Med.* 136:896-907.

Khare, S.D., M.J. Bull, J. Hanson, H.S. Luthra, and C.S. David. 1997. Spontaneous inflammatory disease in HLA-B27 transgenic mice is independent of MHC class II molecules: a direct role of B27 heavy chains and not B27 derived peptides. *J.Immunol.* In press.

Khare, S.D., J. Hansen, H.S. Luthra, and C.S. David. 1996. HLA-B27 heavy chains contribute to spontaneous inflammatory disease in B27/human b2-microglobulin (b2m) double transgenic mice with disrupted mouse b2m. *J.Clin.Invest.* 98:2746-2755.

Kloetzel, P.M. 2001. Antigen processing by the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2:179-187.

Koch, J., and R. Tampe. 2006. The macromolecular peptide-loading complex in MHC class I-dependent antigen presentation. *Cell Mol Life Sci.* 63:653-62.

Kollnberger, S., L. Bird, M.Y. Sun, C. Retiere, V.M. Braud, A. McMichael, and P. Bowness. 2002. Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers. *Arthritis Rheum.* 46:2972-2982.

Kuon, W., H.G. Holzhutter, H. Appel, M. Grolms, S. Kollnberger, A. Traeder, P. Henklein, E. Weiss, A. Thiel, R. Lauster, P. Bowness, A. Radbruch, P.M. Kloetzel, and J. Sieper. 2001. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the Chlamydia trachomatis proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J.Immunol.* 167:4738-4746.

Lankat-Buttgereit, B., and R. Tampe. 2002. The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol Rev.* 82:187-204.

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.* 8:221-231.

Letourneur, F., E.C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S.D. Emr, H. Riezman, and P. Cosson. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell.* 79:1199-207.

Li, S., K.M. Paulsson, S. Chen, H.O. Sjogren, and P. Wang. 2000. Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing. *J.Biol.Chem.* 275:1581-1586.



Lie, W.R., N.B. Myers, J. Gorka, R.J. Rubocki, J.M. Connolly, and T.H. Hansen. 1990. Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the Ld class I MHC molecule. *Nature*. 344:439-41.

Loll, B., A. Zawacka, J. Biesiadka, C. Petter, C. Ruckert, W. Saenger, B. Uchanska-Ziegler, and A. Ziegler. 2005. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals from the recombinantly expressed human major histocompatibility antigen HLA-B\*2704 in complex with a viral peptide and with a self-peptide. *Acta Crystallograph.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun.* 61:939-941.

Lopez-Larrea, C., S. Gonzalez, and J. Martinez-Borra. 1998. The role of HLA-B27 polymorphism and molecular mimicry in spondylarthropathy. *Mol Med Today*. 4:540-9.

Lopez-Larrea, C., M. Mijiyawa, S. Gonzalez, J.L. Fernandez-Morera, M.A. Blanco-Gelaz, J. Martinez-Borra, and A. Lopez-Vazquez. 2002. Ankylosing spondylitis is associated with HLA-B\*1403 in a West African population. *Arthritis Rheum*. 46:2968-2971.

Lopez-Larrea, C., K. Sujirachato, N.K. Mehra, P. Chiewsilp, D. Isarangkura, U. Kanga, O. Dominguez, E. Coto, M. Peçã, F. Setien, and S. Gonzalez-Roces. 1995. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis. Evidence for new associations. *Tissue Antigens*. 45:169-176.

Lopez, D., R. Garcia Hoyo, and J.A. Lopez de Castro. 1994. Clonal analysis of alloreactive T cell responses against the closely related B\*2705 and B\*2703 subtypes. Implications for HLA-B27 association to spondyloarthropathy. *J.Immunol.* 152:5557-5571.

Lopez de Castro, J.A., I. Alvarez, M. Marcilla, A. Paradela, M. Ramos, L. Sesma, and M. Vazquez. 2004. HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens*. 63:424-445.

Macdonald, W.A., A.W. Purcell, N.A. Mifsud, L.K. Ely, D.S. Williams, L. Chang, J.J. Gorman, C.S. Clements, L. Kjer-Nielsen, D.M. Koelle, S.R. Burrows, B.D. Tait, R. Holdsworth, A.G. Brooks, G.O. Lovrecz, L. Lu, J. Rossjohn, and J. McCluskey. 2003. A naturally selected dimorphism within the HLA-B44 supertype alters class I structure, peptide repertoire, and T cell recognition. *J Exp Med*. 198:679-91.

Madden, D.R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu.Rev.Immunol.* 13:587-622.

Madden, D.R., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley. 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2 [published erratum appears in *Cell* 1994 Jan 28;76(2):following 410]. *Cell*. 75:693-708.

Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature*. 353:321-325.

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*. 70:1035-1048.

Marcilla, M., J.J. Cragnolini, and J.A. Lopez de Castro. 2007. Proteasome-independent HLA-B27 ligands arise mainly from small basic proteins. *Mol.Cell Proteomics*.

Marina, A., M.A. Garcia, J.P. Albar, J. Yague, J.A. Lopez de Castro, and J. Vazquez. 1999. High-sensitivity analysis and sequencing of peptides and proteins by quadrupole ion trap mass spectrometry. *J.Mass Spectrom*. 34:17-27.

May, E., M.L. Dorris, N. Satumtira, I. Iqbal, M.I. Rehman, E. Lightfoot, and J.D. Taurog. 2003. CD8 alpha-beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J.Immunol*. 170:1099-1105.

May, E., N. Dulphy, E. Frauendorf, R. Duchmann, P. Bowness, J.A. Lopez de Castro, A. Toubert, and E. Marker-Hermann. 2002. Conserved TCR  $\alpha$  chain usage in reactive arthritis; evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens*. 60:299-308.

Mear, J.P., K.L. Schreiber, C. Munz, X. Zhu, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, S.L. Rowland-Jones, and R.A. Colbert. 1999. Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J.Immunol*. 163:6665-6670.

Momburg, F., J. Roelse, J.C. Howard, G.W. Butcher, G.J. Hammerling, and J.J. Neefjes. 1994. Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature*. 367:648-651.

Momburg, F., and P. Tan. 2002. Tapasin-the keystone of the loading complex optimizing peptide binding by MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Mol.Immunol*. 39:217-233.

Nasution, A.R., A. Mardjuadi, S. Kunmartini, N.G. Suryadhana, B. Setyohadi, D. Sudarsono, N.M. Lardy, and T.E. Feltkamp. 1997. HLA-B27 subtypes positively and negatively associated with spondyloarthritis. *J.Rheumatol*. 24:1111-1114.

Neefjes, J.J., and H.L. Ploegh. 1988. Allele and locus-specific differences in cell surface expression and the association of HLA class I heavy chain with beta 2-microglobulin: differential effects of inhibition of glycosylation on class I subunit association. *Eur.J.Immunol*. 18:801-810.

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.* 156:3196-3206.

Niedermann, G., S. Butz, H.G. Ihlenfeldt, R. Grimm, M. Lucchiari, H. Hoschutzky, G. Jung, B. Maier, and K. Eichmann. 1995. Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity.* 2:289-299.

Olivieri, I., S. D'Angelo, E. Scarano, V. Santospirito, and A. Padula. 2007. The HLA-B\*2709 subtype in a woman with early ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 56:2805-7.

Orr, H.T., J.A. Lopez de Castro, D. Lancet, and J.L. Strominger. 1979. Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7. 2. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry.* 18:5711-5720.

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.* 277:1306-1309.

Pahl, H.L., and P.A. Baeuerle. 1997. The ER-overload response: activation of NF- $\kappa$ B. *Trends Biochem.Sci.* 22:63-67.

Paladini, F., E. Taccari, M.T. Fiorillo, A. Cauli, G. Passiu, A. Mathieu, L. Punzi, G. Lapadula, R. Scarpa, and R. Sorrentino. 2005. Distribution of HLA-B27 subtypes in Sardinia and continental Italy and their association with spondylarthropathies. *Arthritis Rheum.* 52:3319-3321.

Paradela, A., I. Alvarez, M. Garcia-Peydro, L. Sesma, M. Ramos, J. Vazquez, and J.A. Lopez de Castro. 2000. Limited diversity of peptides related to an alloreactive T cell epitope in the HLA-B27-bound peptide repertoire results from restrictions at multiple steps along the processing-loading pathway. *J.Immunol.* 164:329-337.

Park, B., S. Lee, E. Kim, and K. Ahn. 2003. A single polymorphic residue within the peptide-binding cleft of MHC class I molecules determines spectrum of tapasin dependence. *J.Immunol.* 170:961-968.

Parodi, A.J. 2000. Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem.* 69:69-93.

Peaper, D.R., P.A. Wearsch, and P. Cresswell. 2005. Tapasin and ERp57 form a stable disulfide-linked dimer within the MHC class I peptide-loading complex. *Embo J.* 24:3613-23.

Peh, C.A., S.R. Burrows, M. Barnden, R. Khanna, P. Cresswell, D.J. Moss, and J. McCluskey. 1998. HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity*. 8:531-542.

Peh, C.A., N. Laham, S.R. Burrows, N.Z. Zhu, and J. McCluskey. 2000. Distinct functions of tapasin revealed by polymorphism in MHC class I peptide loading. *J.Immunol.* 164:292-299.

Pohlmann, T., R.A. Bockmann, H. Grubmuller, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler, and U. Alexiev. 2004. Differential peptide dynamics is linked to major histocompatibility complex polymorphism. *J.Biol.Chem.* 279:28197-28201.

Purcell, A.W., J.J. Gorman, M. Garcia-Peydro, A. Paradela, 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.* 166:1016-1027.

Qian, S.B., E. Reits, J. Neefjes, J.M. Deslich, J.R. Bennink, and J.W. Yewdell. 2006. Tight linkage between translation and MHC class I peptide ligand generation implies specialized antigen processing for defective ribosomal products. *Journal of Immunology*. 177:227-233.

Rammensee, H.G., K. Falk, and O. Rotzschke. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol.* 11:213-44.

Ramos, M., I. Alvarez, L. Sesma, A. Logean, D. Rognan, and J.A. Lopez de Castro. 2002a. Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins. *J.Biol.Chem.* 277:37573-37581.

Ramos, M., and J.A. Lopez de Castro. 2002. HLA-B27 and the pathogenesis of spondyloarthritis. *Tissue Antigens*. 60:191-205.

Ramos, M., A. Paradela, M. Vazquez, A. Marina, J. Vazquez, and J.A. Lopez de Castro. 2002b. Differential association of HLA-B\*2705 and B\*2709 to ankylosing spondylitis correlates with limited peptide subsets but not with altered cell surface stability. *J.Biol.Chem.* 277:28749-28756.

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.* 131:1403-19.

Reits, E.A.J., J.C. Vos, M. Gromme, and J. Neefjes. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*. 404:774-778.

Ren, E.C., W.H. Koh, D. Sim, M.L. Boey, G.B. Wee, and S.H. Chan. 1997. Possible protective role of HLA-B\*2706 for ankylosing spondylitis. *Tissue Antigens*. 49:67-69.

Rigney, E., M. Kojima, A. Glithero, and T. Elliott. 1998. A soluble major histocompatibility complex class I peptide-binding platform undergoes a conformational change in response to peptide epitopes. *J Biol Chem*. 273:14200-4.

Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 78:761-771.

Rothman, J.E. 1996. The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci*. 5:185-94.

Rotzschke, O., K. Falk, S. Faath, and H.G. Rammensee. 1991. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J.Exp.Med*. 174:1059-1071.

Sadasivan, B., P.J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies, and P. Cresswell. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity*. 5:103-114.

Saper, M.A., P.J. Bjorkman, and D.C. Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J.Mol.Biol*. 219:277-319.

Saric, T., S.C. Chang, A. Hattori, I.A. York, S. Markant, K.L. Rock, M. Tsujimoto, and A.L. Goldberg. 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat.Immunol*. 3:1169-1176.

Saveanu, L., O. Carroll, V. Lindo, M. Del Val, D. Lopez, Y. Lepelletier, F. Greer, L. Schomburg, D. Fruci, G. Niedermann, and P.M. Van Endert. 2005. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat.Immunol*. 6:689-697.

Scofield, R.H., W.L. Warren, G. Koelsch, and J.B. Harley. 1993. A hypothesis for the HLA-B27 immune dysregulation in spondyloarthritis: contributions from enteric organisms, B27 structure, peptides bound by B27, and convergent evolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. 90:9330-9334.

Schroder, M., and R.J. Kaufman. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu.Rev.Biochem*. 74:739-789.

Sesma, L., V. Montserrat, J.R. Lamas, A. Marina, J. Vazquez, and J.A. Lopez de Castro. 2002. The peptide repertoires of HLA-B27 subtypes differentially associated to spondyloarthritis (B\*2704 and B\*2706) differ by specific changes at three anchor positions. *J.Biol.Chem*. 277:16744-16749.

Sherman, L.A., and J.R. Maleckar. 1988. Genetic and environmental regulation of the cytolytic T lymphocyte receptor repertoire specific for alloantigen. *Immunol.Rev.* 101:115-131.

Silver, M.L., H.C. Guo, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1992. Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide. *Nature.* 360:367-369.

Sitia, R., and I. Braakman. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* 426:891-4.

Smith, K.J., S.W. Reid, K. Harlos, A.J. McMichael, D.I. Stuart, J.I. Bell, and E.Y. Jones. 1996a. Bound water structure and polymorphic amino acids act together to allow the binding of different peptides to MHC class I HLA-B53. *Immunity.* 4:215-228.

Smith, K.J., S.W. Reid, D.I. Stuart, A.J. McMichael, E.Y. Jones, and J.I. Bell. 1996b. An altered position of the alpha 2 helix of MHC class I is revealed by the crystal structure of HLA-B\*3501. *Immunity.* 4:203-213.

Sobao, Y., N. Tsuchiya, M. Takiguchi, and K. Tokunaga. 1999. Overlapping peptide-binding specificities of HLA-B27 and B39. Evidence for a role of peptide supermotif in the pathogenesis of spondylarthropathies. *Arthritis Rheum.* 42:175-181.

Stoltze, L., M. Schirle, G. Schwarz, C. Schroter, M.W. Thompson, L.B. Hersh, H. Kalbacher, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, and H. Schild. 2000. Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nature Immunology.* 1:413-418.

Sugita, M., and M.B. Brenner. 1994. An unstable beta 2-microglobulin: major histocompatibility complex class I heavy chain intermediate dissociates from calnexin and then is stabilized by binding peptide. *J Exp Med.* 180:2163-71.

Tanioka, T., A. Hattori, S. Masuda, Y. Nomura, H. Nakayama, S. Mizutani, and M. Tsujimoto. 2003. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase: the third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J.Biol.Chem.* In press (published online on June 10 as manuscript M305076200).

Taurog, J.D., S.D. Maika, W.A. Simmons, M. Breban, and R.E. Hammer. 1993. Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression. *J.Immunol.* 150:4168-4178.

Tieng, V., N. Dulphy, F. Boisg, rault, R. Tamouza, D. Charron, and A. Toubert. 1997. HLA-B\*2707 peptide motif: Tyr C-terminal anchor is not shared by all disease-associated subtypes. *Immunogenetics.* 47:103-105.

Townsend, A., C. Ohlen, J. Bastin, H.G. Ljunggren, L. Foster, and K. Karre. 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature*. 340:443-448.

Tran, T.M., M.L. Dorris, N. Satumtira, J.A. Richardson, R.E. Hammer, J. Shang, and J.D. Taurog. 2006. Additional human beta2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats. *Arthritis Rheum*. 54:1317-27.

Tran, T.M., N. Satumtira, M.L. Dorris, E. May, A. Wang, E. Furuta, and J.D. Taurog. 2004. HLA-B27 in transgenic rats forms disulfide-linked heavy chain oligomers and multimers that bind to the chaperone BiP. *J.Immunol*. 172:5110-5119.

Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman, and P. Walter. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101:249-58.

Trombetta, S.E., and A.J. Parodi. 1992. Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J Biol Chem*. 267:9236-40.

Turner, M.J., D.P. Sowders, M.L. DeLay, R. Mohapatra, S. Bai, J.A. Smith, J.R. Brandewie, J.D. Taurog, and R.A. Colbert. 2005. HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response. *J Immunol*. 175:2438-48.

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*. 30:3021-3028.

Tynan, F.E., N.A. Borg, J.J. Miles, T. Beddoe, D. El Hassen, S.L. Silins, W.J. van Zuylen, A.W. Purcell, L. Kjer-Nielsen, J. McCluskey, S.R. Burrows, and J. Rossjohn. 2005. The high resolution structures of highly bulged viral epitopes bound to the major histocompatibility class I: Implications for T-cell receptor engagement and T-cell immunodominance. *J.Biol.Chem*. 280:23900-23909.

Uchanska-Ziegler, B., U. Alexiev, R. Hilling, M. Hulsmeyer, T. Pihlmann, W. Saenger, A. Volz, A. Ziegler, J.A. Hansen, and B. Dupont. 2003. X-ray crystallography and dynamic studies of HLA-B\*2705 and B\*2709 molecules complexed with the same peptide. *In HLA 2002. Immunobiology of the Human MHC*. IHWG Press, Seattle. in press.

Uchanska-Ziegler, B., and A. Ziegler. 2003. Ankylosing spondylitis: a beta2m-deposition disease? *Trends Immunol*. 24:73-76.

Uebel, S., W. Kraas, S. Kienle, K.H. Wiesmuller, G. Jung, and R. Tampe. 1997. Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94:8976-8981.

Ugrinovic, S., A. Mertz, P. Wu, J. Braun, and J. Sieper. 1997. A single nonamer from the Yersinia 60Kd heat shock protein is the target of HLA-B27 restricted CTL response in Yersinia-induced reactive arthritis. *J.Immunol.* 159:5715-5723.

Urvater, J.A., H. Hickman, J.L. Dzuris, K. Prilliman, T.M. Allen, K.J. Schwartz, D. Lorentzen, C. Shufflebotham, E.J. Collins, D.L. Neiffer, B. Raphael, W. Hildebrand, A. Sette, and D.I. Watkins. 2001. Gorillas with spondyloarthropathies express an MHC class I molecule with only limited sequence similarity to HLA-B27 that binds peptides with arginine at P2. *J.Immunol.* 166:3334-3344.

Van Endert, P.M., D. Riganelli, G. Greco, K. Fleischhauer, J. Sidney, A. Sette, and J.F. Bach. 1995. The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J.Exp.Med.* 182:1883-1895.

Varnavidou-Nicolaidou, A., K. Karpasitou, D. Georgiou, G. Stylianou, A. Kokkofitou, C. Michalis, C. Constantina, C. Gregoriadou, and G. Kyriakides. 2004. HLA-B27 in the Greek Cypriot population: Distribution of subtypes in patients with ankylosing spondylitis and other HLA-B27-related diseases. The possible protective role of B\*2707. *Hum.Immunol.* 65:1451-1454.

Vassilakos, A., M.F. CohenDoyle, P.A. Peterson, M.R. Jackson, and D.B. Williams. 1996. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *Embo Journal.* 15:1495-1506.

Vazquez, M.N., and J.A. Lopez de Castro. 2005. Similar cell surface expression of beta2-microglobulin-free heavy chains by HLA-B27 subtypes differentially associated with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 52:3290-9.

Wang, W., S. Man, P.H. Gulden, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 1998. Class I-restricted alloreactive cytotoxic T lymphocytes recognize a complex array of specific MHC-associated peptides. *J.Immunol.* 160:1091-1097.

Wiertz, E.J., T.R. Jones, L. Sun, M. Bogyo, H.J. Geuze, and H.L. Ploegh. 1996a. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell.* 84:769-779.

Wiertz, E.J., D. Tortorella, M. Bogyo, J. Yu, W. Mothes, T.R. Jones, T.A. Rapoport, and H.L. Ploegh. 1996b. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature.* 384:432-438.



Williams, A.P., C.A. Peh, A.W. Purcell, J. McCluskey, and T. Elliott. 2002. Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity*. 16:509-520.

Yague, J., J. Vazquez, and J.A. Lopez de Castro. 1998. A single amino acid change makes the peptide specificity of B\*3910 unrelated to B\*3901 and closer to a group of HLA-B proteins including the malaria-protecting allotype HLA-B53. *Tissue Antigens*. 52:416-421.

Yamaguchi, A., N. Tsuchiya, H. Mitsui, M. Shiota, A. Ogawa, K. Tokunaga, S. Yoshinoya, T. Juji, and K. Ito. 1995. Association of HLA-B39 with HLA-B27-negative ankylosing spondylitis and pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis in Japanese patients. Evidence for a role of the peptide-anchoring B pocket. *Arthritis Rheum*. 38:1672-1677.

Yewdell, J.W., L.C. Anton, and J.R. Bennink. 1996. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J.Immunol*. 157:1823-1826.

York, I.A., S.C. Chang, T. Saric, J.A. Keys, J.M. Favreau, A.L. Goldberg, and K.L. Rock. 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat.Immunol*. 3:1177-1184.

Young, A.C.M., W.G. Zhang, J.C. Sacchettini, and S.G. Nathenson. 1994. The 3-Dimensional Structure of H-2D(B) at 2.4 Angstrom Resolution - Implications for Antigen-Determinant Selection. *Cell*. 76:39-50.

Yu, Y.Y., N.B. Myers, C.M. Hilbert, M.R. Harris, G.K. Balendiran, and T.H. Hansen. 1999. Definition and transfer of a serological epitope specific for peptide-empty forms of MHC class I. *Int Immunol*. 11:1897-906.

Zarling, A.L., C.J. Luckey, J.A. Marto, F.M. White, C.J. Brame, A.M. Evans, P.J. Lehner, P. Cresswell, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and V.H. Engelhard. 2003. Tapasin is a facilitator, not an editor, of class I MHC Peptide binding. *J.Immunol*. 171:5287-5295.

Zawacka, A., B. Loll, J. Biesiadka, W. Saenger, B. Uchanska-Ziegler, and A. Ziegler. 2005. X-ray diffraction analysis of crystals from the human major histocompatibility antigen HLA-B\*2706 in complex with a viral peptide and with a self-peptide. *Acta Crystallograph.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun*. 61:1097-1099.

Zemmour, J., A.M. Little, D.J. Schendel, and P. Parham. 1992. The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J.Immunol*. 148:1941-1948.

***Anexo***

Publicaciones generadas durante la realización de esta tesis.

**Elena Merino**, Verónica Montserrat, Alberto Paradela, and José A. López de Castro. Two HLA-B14 Subtypes (B\*1402 and B\*1403) Differentially Associated with Ankylosing Spondylitis Differ Substantially in Peptide Specificity but Have Limited Peptide and T-cell Epitope Sharing with HLA-B27. **The Journal of Biological Chemistry**, 2005.

**Elena Merino**, Begoña Galocha, Miriam N. Vázquez, and José A. López de Castro. Disparate folding and stability of the ankylosing spondylitis-associated HLA-B\*1403 and B\*2705. **Arthritis and Rheumatism**, 2008. Enviado.

Kumar P, Vahedi-Faridi A, **Merino E**, Lopez de Castro JA, Volz A, Ziegler A, Saenger W, Uchanska-Ziegler B.

Expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of the human major histocompatibility antigen HLA-B\*1402 in complex with a viral peptide and with a self-peptide. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**. 2007. Sólo *abstract* disponible.

# Two HLA-B14 Subtypes (B\*1402 and B\*1403) Differentially Associated with Ankylosing Spondylitis Differ Substantially in Peptide Specificity but Have Limited Peptide and T-cell Epitope Sharing with HLA-B27\*

Received for publication, May 23, 2005, and in revised form, August 8, 2005. Published, JBC Papers in Press, August 22, 2005, DOI 10.1074/jbc.M505641200

Elena Merino, Verónica Montserrat, Alberto Paradela, and José A. López de Castro<sup>1</sup>

From the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, 28049 Madrid, Spain

The peptide specificity of HLA-B\*1403, an allotype associated with ankylosing spondylitis (Lopez-Larrea, C., Mijiyawa, M., Gonzalez, S., Fernandez-Morera, J. L., Blanco-Gelaz, M. A., Martinez-Borra, J., and Lopez-Vazquez, A. (2002) *Arthritis Rheum.* 46, 2968–2971) was compared with those of the non-associated B\*1402 and the prototypic disease-associated B\*2705 allotypes. Although differing by a single residue (L156R), B\*1402 and B\*1403 shared only 32–35% of their peptide repertoires. Subtype-related differences observed in multiple peptide positions, including P3 and P7, were largely explained by a direct effect of the L156R change on peptide specificity. The HLA-B14 subtypes shared only ~3% of their peptide repertoires with B\*2705. This was due to distinct residue usage at most positions, as revealed by statistical comparison of B\*1402, B\*1403, and B\*2705-bound nonamers. Nevertheless, shared ligands between B\*2705 and B\*1403 were formally identified, although ligands common to B\*2705 and B\*1403, but absent from B\*1402, were not found. Alloreactive T-cells were used as a tool to analyze epitope sharing among B\*1402, B\*1403, and B\*2705. The percentage of cross-reactive T-cell clones closely paralleled peptide overlap, suggesting that shared ligands tend to maintain their antigenic features when bound to the different allotypes. Our results indicate that B\*1403 and B\*2705 can present common peptides. However, both the disparity of their peptide repertoires and the lack of binding features shared by these two allotypes, but not B\*1402, argue against, although do not exclude, a mechanism of spondyloarthritis mediated by specific ligands of B\*2705 and B\*1403.

The association of HLA-B27 with spondyloarthropathies and, in particular, ankylosing spondylitis (AS)<sup>2</sup> is, by far, the strongest one between an HLA class I molecule and any disease (1, 2). The property of HLA-B27 that determines disease susceptibility remains unknown, and several pathogenetic mechanisms are currently being considered as a basis for various research lines (3, 4). One of these mechanisms is proposed by

the arthritogenic peptide hypothesis (5), which assumes that an initial pathogenetic event would be a cytotoxic T lymphocyte (CTL) response against an external antigen, whose molecular mimicry with a constitutive peptide ligand of HLA-B27 would elicit an autoimmune reaction against this molecule, leading to tissue damage and inflammation. This hypothesis, which emphasizes the antigen-presenting specificity of HLA-B27 as a critical pathogenetic feature, has stimulated studies on the nature of HLA-B27-bound peptide repertoires and their relationship to those presented by other class I molecules. A major feature of HLA-B27 ligands is the presence of R2 (6, 7), which binds tightly into the B pocket of the peptide-binding site (8, 9). Because this pocket is made up of residues that are polymorphic among HLA class I molecules, few allotypes other than HLA-B27 bind peptides with R2. For this reason, it was of interest that B\*3901, an allotype that also accepts peptides with this motif (10) and binds *in vitro* some HLA-B27 ligands (11), was significantly increased among HLA-B27-negative AS patients in a study carried out in Japan (12). In Caucoid patients, HLA-B39 was associated with the axial type of psoriatic arthritis (13), a form of this disease that is strongly linked to HLA-B27 (14). In addition, development of spondyloarthropathies in gorillas has been correlated with these animals expressing MHC class I molecules that bind peptides with R2 (15).

Recently, B\*1403, an allotype reported only in the African populations of Cameroon and Togo (16, 17), was found strikingly associated to AS in the Togolese population, where both this disease and HLA-B27 are rare (17). Of 7 HLA-B27-negative AS patients that could be clinically and genetically evaluated, 4 (57%) were of the B\*1403 allotype. The prevalence of this allotype in the normal Togolese population was <1%. The closely related allotype B\*1402, which differs from B\*1403 only at residue 156 (Leu in B\*1402; Arg in B\*1403), was found in 2% of the healthy controls, but was absent among AS patients. B\*1402 has a widespread distribution, including among Caucasians, and has never been found associated with AS. Sequence analysis of B\*1402-bound peptides (18) revealed a strong preference of this allotype for peptides with R2. Because the B pockets of B\*1402 and B\*1403 are identical, it was expected that this allotype would also bind peptides with this motif.

The availability of two closely related HLA-B14 molecules differentially associated with AS, allowed us for the first time to look for peptide differences that may correlate with disease susceptibility in a non-B27 system. It was also possible to look for similarities in peptide presentation between HLA-B27 and another relatively distant but AS-associated class I molecule, because B\*1403 differs from B\*2705 in 15 amino acid residues in the extracellular region of the molecule, all of which are located in the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains. Thus, in this study we comparatively analyzed the peptide binding specificity of B\*1402 and B\*1403, to determine the overlap between their constitutive peptide repertoires and the

\* This work was supported by Grants SAF2002/00125 and SAF2003-02213 from the Ministry of Science and Technology, 08.3/0005/2001.1 from the Comunidad Autónoma de Madrid, and an institutional grant of the Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-91-497-8050; Fax: 34-91-497-8087; E-mail: aldecastro@cbm.uam.es.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: AS, ankylosing spondylitis; CTL, cytotoxic T lymphocyte; C1R, Hmy2.C1R; LCL, lymphoblastoid cell line; mAb, monoclonal antibody; HPLC, high performance liquid chromatography; MS, mass spectrometry; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; *m/z*, mass-to-charge ratio; TAP, transporter associated with antigen processing.

structural features of shared and differentially bound ligands. We also determined that peptide sharing between B\*1403 and B\*2705 is very low, although both allotypes bind some common ligands, and defined the molecular basis of their differential peptide specificity. Finally, alloreactive CTLs, which recognize a wide spectrum of the peptides constitutively bound to the allo-MHC molecule (19–21), were used to analyze the relationship between epitope and peptide sharing among B\*1402, B\*1403, and B\*2705.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Cell Lines and DNA-mediated Gene Transfer**—HMγ2.C1R (C1R) is a human lymphoid cell line with low expression of its endogenous HLA class I molecules (22, 23). B\*2705-C1R transfectants with high expression of HLA-B27 were described elsewhere (24). C1R transfectant cells expressing B\*1402 and B\*1403 were obtained as follows. RNA was purified from the lymphoblastoid cell line (LCL) R56 (HLA-A2, A11); B\*1402, B\*2702). Full-length cDNA of B\*1402 was obtained by PCR, using two HLA-B locus-specific primers hybridizing in the 5'-flanking and 3'-untranslated regions, respectively. The DNA fragment was cloned into the pCRII vector (Invitrogen), sequenced to confirm that it corresponded to the correct B\*1402 sequence, subsequently cloned into pCDNAIII (Invitrogen), sequenced again, and transfected into C1R cells by electroporation at 250 V and 960 microfarads, as previously described (24). One single nucleotide change, at codon 156, differentiates B\*1403 from B\*1402 (CTG to CGG). The gene encoding B\*1403 was obtained by PCR-mediated site-directed mutagenesis of the B\*1402 cDNA obtained from R56 cells. Two independent PCR reactions were performed. In the first one, an oligonucleotide hybridizing in the 5'-end region and an "upstream" primer containing the desired mutation were used. The second PCR reaction used an oligonucleotide hybridizing in the 3'-untranslated region and a "downstream" primer with the mutation. A third PCR reaction was then performed using both DNA fragments and cDNA from R56. The full-length cDNA fragment obtained was cloned into pCRII and fully sequenced to confirm that it corresponded to the B\*1403 gene. Finally, the gene was cloned into pCDNAIII and sequenced again before transfecting it into C1R cells as above. These cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 7.5% fetal bovine serum (both from Invitrogen).

**Monoclonal Antibodies**—The mAbs used in this study were W6/32 (IgG2a, specific for a monomorphic HLA class I determinant) (25) and BBM1 (IgG2b, specific for human  $\beta_2m$ ) (26).

**Flow Cytometry**—About  $6 \times 10^4$  untransfected or B\*1402-, B\*1403-, or B\*2705-C1R-transfectant cells were washed twice in 200  $\mu$ l of phosphate-buffered saline and resuspended in 50  $\mu$ l of undiluted mAb supernatant. After incubating for 30 min, cells were washed twice in 200  $\mu$ l of phosphate-buffered saline, resuspended in 50  $\mu$ l of fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG rabbit antiserum (Calbiochem-Norabiochem GMBH, Schwalbach, Germany), incubated for 30 min, and washed twice in 200  $\mu$ l of phosphate-buffered saline. All operations were done at 4 °C. Flow cytometry was done in an Epics Profile XL instrument (Coulter Electronics Inc., Hiialeah, FL), using the System II software.

**Isolation of B\*1402-, B\*1403-, and B\*2705-bound Peptides**—B27- and B14-bound peptides were isolated from about  $10^{10}$  of the corresponding C1R transfectant cells as previously described (27). Briefly, cells were lysed in 1% Nonidet P-40 in the presence of a mixture of protease inhibitors. After centrifugation, cell lysates were subjected to affinity chromatography using the W6/32 mAb. HLA-B27- and HLA-B14-bound peptide pools were eluted with 0.1% aqueous trifluoroacetic acid at

room temperature, filtered through Centricon 3 (Amicon, Beverly, MA), concentrated, and subjected to high performance liquid chromatography (HPLC) fractionation. This was conducted in a Waters Alliance system (Waters Milford, MA) using a Vydac 218TP52 column (Vydac, Hesperia, CA) at a flow rate of 100  $\mu$ l/min, as previously described (28). Fractions of 50  $\mu$ l were collected.

**Mass Spectrometry Analysis and Sequencing**—The peptide composition of HPLC fractions was analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) MS using a Bruker Reflex<sup>TM</sup> III MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker- Franzen Analytic GmbH, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT<sup>TM</sup> source in positive ion reflector mode. Dried fractions were resuspended in 0.5  $\mu$ l of 33% aqueous acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid. This was deposited onto the stainless steel MALDI probe and allowed to dry at room temperature. Then 0.5  $\mu$ l of matrix solution ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 33% aqueous acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) at 1 mg/ml was added, and the mixture was allowed to dry again at room temperature.

Peptide sequencing was carried out by quadrupole ion trap nanoelectrospray MS/MS in an LCQ instrument (Finnigan TermoQuest, San Jose, CA), exactly as detailed elsewhere (29, 30). Some sequences were obtained using an Esquire 3000<sup>Plus</sup> ion trap mass spectrometer (Bruker) after online chromatographic separation of samples as follows. Samples were dissolved in Buffer A (0.5% acetic acid in water) and loaded onto a column (100 mm  $\times$  100  $\mu$ m internal diameter) packed with 5  $\mu$ m Kromasil C18 beads (EKA Chemicals, Bohus, Sweden) and fractionated in a Famos-Switchos-Ultimate chromatographic system (LCPackings, the Netherlands) with a 45-min linear gradient of 5–30% Buffer B (90% acetonitrile, 0.5% acetic acid in water) at 500 nl/min. MS/MS spectra were acquired by automatic switching between MS and MS/MS mode using dynamic exclusion. Some samples were analyzed using the Multiple Reaction Monitoring mode, which allows specific peptide masses to be selected. The interpretation of MS/MS spectra was done manually, but assisted by various software packages, including Mascot (Matrix Science Ltd., London) and MSProduct, a facility of the Protein Prospector package (31). In addition, the FASTA software ([www.ebi.ac.uk/ fasta33/index.html](http://www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html)) was used to look for unambiguous matching of candidate peptide sequences with the human genome and proteome databases.

**CTL**—Alloreactive CTL clones directed against B\*1402 were obtained from various unrelated HLA-B14-negative donors upon stimulation with the LCL LWAGS (HLA-A\*3301, B\*1402) as follows. About  $10^6$  peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated *in vitro* with a mixture of  $10^5$  stimulator LCL and  $10^6$  autologous PBMC feeder cells irradiated at 80 and 50 Gy, respectively. After a week cells were directly cloned by seeding serial dilutions of stimulated T cells in U-bottomed 96-well plates containing 2,000 irradiated stimulator LCL and 20,000 irradiated PBMCs per well in the presence of 30 units/ml recombinant interleukin-2 (a kind gift of Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ). Cells in wells growing below the statistical limit of clonality were tested for HLA-B14 reactivity, using a standard <sup>51</sup>Cr release cytotoxicity assay against B\*1402-C1R targets, and untransfected C1R cells as a negative control. Mixed lymphocyte cultures were grown in Iscove's modified Dulbecco's medium with Glutamax I (Invitrogen), supplemented with 100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin sulfate, and 0.05 mg/ml gentamicin (all from Sigma-Aldrich) and 14% fetal bovine serum (Invitrogen). T-cell clones were grown in the same medium and restimulated weekly in the presence of interleukin-2, as described above.

Alloreactive CTL clones directed against B\*2705 were obtained by the same procedure, with the following modifications. PBMCs from



## Peptide Specificity of HLA-B\*1402, B\*1403, and B\*2705

various unrelated HLA-B27-negative donors were stimulated *in vitro* with either the R15 (HLA-A3, B\*2705, B35) or LG15 (HLA-A32, B\*2705) LCL for a week, re-stimulated with the alternative LCL in secondary mixed lymphocyte culture for another week, and cloned with the initial LCL by limiting dilution. Other previously described B\*2705-specific CTL clones were also used (32).

**Statistical Analysis**—This was carried out by the  $\chi^2$  with Yates correction or the Fisher's exact test, depending on the size of the samples being compared. *p* values of <0.05 were considered as statistically significant.

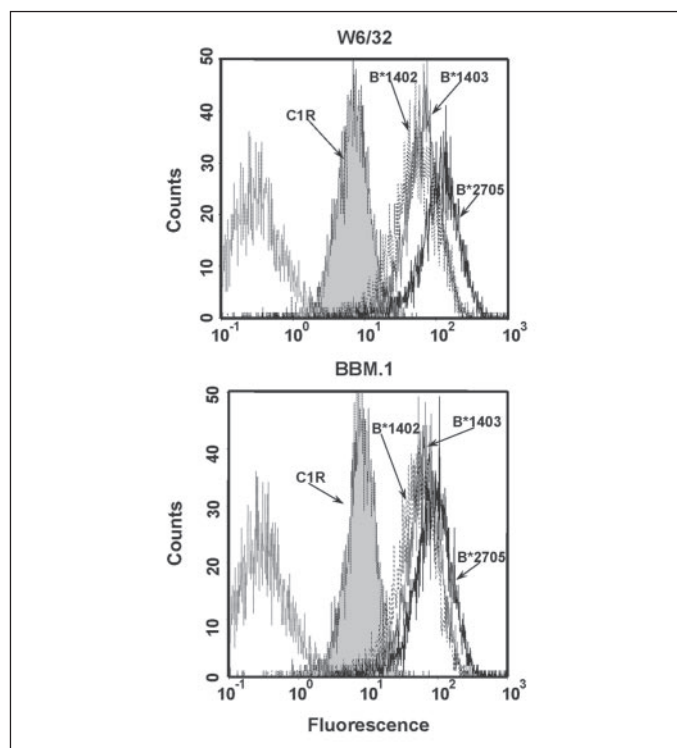
### RESULTS

**Large Disparity between the Constitutive Peptide Repertoires of B\*1402 and B\*1403**—The peptide pools from both subtypes were isolated, after immunoaffinity purification with W6/32 and acid extraction, from the corresponding C1R transfectant cells, whose surface expression of B\*1402 and B\*1403 was very similar (Fig. 1). Both peptide

pools were fractionated by HPLC in consecutive runs under identical conditions, and each of the peptide-containing fractions was analyzed by MALDI-TOF MS. The MS spectrum of each HPLC fraction from one subtype was compared with the correlative, previous, and following fractions from the other subtype, to take into account small shifts in the retention time of peptides that may occur even in consecutive chromatographic runs. Ion peaks with the same ( $\pm 0.8$ ) mass-to-charge (*m/z*) ratio in this comparison, were considered to reflect identical ligands of both subtypes. Ion peaks found in only one peptide pool were considered to reflect subtype-specific ligands. This strategy has been previously used to determine the overlap between HLA-B27 subtype-bound peptide repertoires in several studies from our laboratory (33, 34). Two independent comparisons were carried out, and the overlap between the B\*1402 and B\*1403 peptide repertoires was established as the mean of the two experiments (TABLE ONE). On the basis of this analysis B\*1402 and B\*1403 shared only ~32–35% of their peptide repertoires. The peptide size distribution in both pools was very similar and showed a Gaussian distribution typical of MHC class I-bound peptides (Fig. 2A), with an average molecular mass of 1113 and 1109 Da for B\*1402 and B\*1403, respectively. Moreover, both the average molecular mass (TABLE ONE) and size distribution (Fig. 2B) of subtype-specific ligands were very similar between both sets. These results indicate that, despite their close structural similarity, B\*1402 and B\*1403 bind largely distinct peptide repertoires, although this has little effect on peptide size.

**Limited Peptide Sharing between HLA-B14 and HLA-B27**—The B\*1402- and B\*1403-bound peptide repertoires were separately compared with that of B\*2705, using the same strategy as for the two HLA-B14 subtypes. B\*1402 and B\*1403 differed from B\*2705 in 88 and 85% of their peptide repertoires, respectively (TABLE TWO). This is a minimum estimation, because a comparison based on retention times and molecular mass becomes more inaccurate in reflecting peptide identity, the more different are the peptide pools compared. Indeed, of six peptide pairs showing the same retention time and molecular mass that were sequenced from both B\*1403 and B\*2705 (see below), 2 (33.3%) and 4 (66.7%) corresponded to identical and different peptides, respectively. If these results are extrapolated to the total peptide pool, the actual overlap of the B\*2705-bound peptide repertoire with that of B\*1403 would be  $(8 \times 0.333)\% = 2.7\%$ , and the overlap of the B\*1403-bound repertoire with that of B\*2705 would be  $(15 \times 0.333)\% = 5\%$ .

The average molecular mass of the total B\*2705-bound peptides was significantly higher (1222 Da) than those of B\*1402 or B\*1403 ligands (1113 and 1110 Da, respectively), suggesting notorious differences in side-chain composition, peptide length or both between the B14 and B27-bound peptide repertoires (Fig. 2A). This was clear from the size distribution of the differential peptides between B\*2705 and B\*1402 or B\*1403 (Fig. 2C): B14-specific peptides predominated in the lower mass range, and the opposite was true for B\*2705-specific ligands. Peptides shared between B\*2705 and B\*1402 or B\*1403 had an average molecular



**FIGURE 1. Flow cytometry analysis of B\*1402, B\*1403, and B\*2705 expression on C1R transfectant cells using the W6/32 and BBM.1 mAb.** Controls include cells stained only with the fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-mouse IgG antiserum (left histograms) and untransfected C1R cells (shaded). A representative experiment, out of three independent ones, is shown. Mean channel fluorescence values of the three experiments, including their standard deviations, were the following. With W6/32: C1R,  $7 \pm 1$ ; B\*1402,  $49 \pm 7$ ; B\*1403,  $71 \pm 7$ ; B\*2705,  $129 \pm 10$ . With BBM.1: C1R,  $9 \pm 2$ ; B\*1402,  $44 \pm 6$ ; B\*1403,  $61 \pm 7$ ; B\*2705,  $91 \pm 4$ .

**TABLE ONE**

**Comparison of natural peptide ligands from B\*1402 and B\*1403**

	Exp. 1		Exp.2		Mean	
	B*1402	B*1403	B*1402	B*1403	B*1402	B*1403
Total peptides compared	782	742	909	800	846	771
Shared peptides	319 (41%)	319 (43%)	225 (25%)	225 (28%)	272 (32%)	272 (35%)
Differential peptides	463 (59%)	423 (57%)	684 (75%)	575 (72%)	574 (68%)	499 (65%)
Average mass of total peptides	1113 Da	1104 Da	1112 Da	1114 Da	1113 Da	1109 Da
Average mass of shared peptides	1100 Da	1100 Da	1092 Da	1092 Da	1096 Da	1096 Da
Average mass of differential peptides	1122 Da	1108 Da	1119 Da	1123 Da	1121 Da	1116 Da

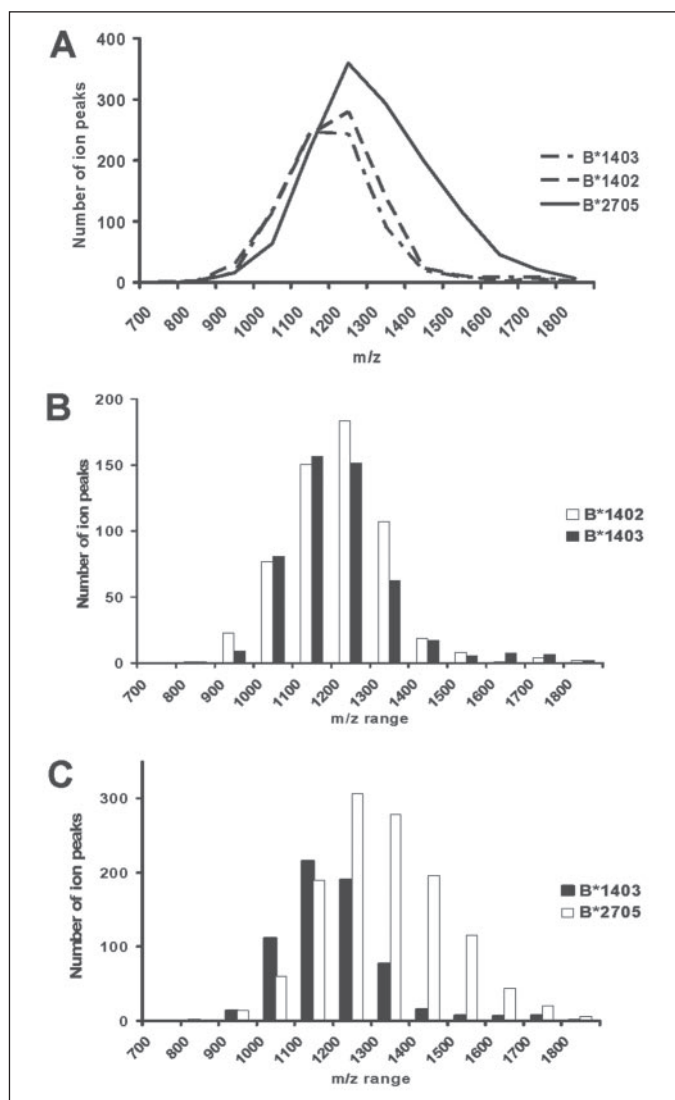


FIGURE 2. Size distribution of B\*1402-, B\*1403-, and B\*2705-bound peptides. A, size range of the peptide pools from the three allotypes. B, size distribution of the peptides differentially bound to B\*1402 or B\*1403. C, size distribution of the peptides differentially bound to B\*1403 or B\*2705. Data are means of two independent experiments.

mass (1127 and 1145 Da, respectively) somewhat higher than the total B\*1402 or B\*1403 ligands and clearly below the total B\*2705 ligands (TABLE TWO).

The number of ion peaks counted from B\*1402 and B\*1403 were consistently lower than those from B\*2705 in all experiments (TABLE TWO). There are several possible explanations for this result. First, it might be a consequence of the higher surface expression of HLA-B27, relative to HLA-B14 subtypes (Fig. 1). However, this possibility was not supported by the fact that the global peptide yields of the B27- and B14-bound pools were similar (data not shown). Second, a significant fraction of the B14-bound peptides might not dissolve in the aqueous trifluoroacetic acid used for peptide extraction. This is also very unlikely, because trifluoroacetic acid is a very efficient solvent for short peptides, in the range of the MHC class I ligands, whose net charge is always positive, because the acidic groups are uncharged at acidic pH. Third, a significantly higher number of B14 than B\*2705 ligands might escape detection by MALDI-TOF MS due to lower positive charge. Although there is no obvious reason for this, we have not experimentally addressed this possibility and cannot formally rule it out. Finally, it is possible that the B14-bound peptide repertoire is actually smaller than that of B\*2705. This might result from restricted residue usage at a large number of peptide positions among B\*1402 and B\*1403 ligands (see below).

Taken together, these results indicate that B\*2705 shares with B\*1402 and B\*1403 only a small fraction of its constitutive peptide repertoire, and that it binds peptides with higher molecular mass. Our results are also consistent with the possibility that the B\*2705-bound peptide repertoire is larger than those of B\*1402 and B\*1403.

*B\*1402 and B\*1403 Ligands Show Restricted Heterogeneity at Multiple Peptide Positions*—A total of 34 HLA-B14 ligands were sequenced by electrospray MS/MS. These include 17 shared ligands of both subtypes, 7 B\*1402-specific, and 10 B\*1403-specific peptides (Fig. 3). To establish the peptide motifs of both subtypes we analyzed the frequency of each amino acid residue at each position among all the nonamers from each subtype, because they were the only ones to provide significant numbers of peptides with the same size. Thus, the peptide motifs of B\*1402 were determined from 16 ligands, including the 11 shared and the 5 B\*1402-specific nonamers. Similarly, the peptide motifs of B\*1403 were established from 19 ligands, including the 11 shared and the 8 B\*1403-specific nonamers. A peptide position was arbitrarily considered to show restricted heterogeneity when a given residue or type of chemically

TABLE TWO  
Comparison of natural peptide ligands from B\*1402, B\*1403 and B\*2705

	Exp. 1		Exp. 2		Mean	
	B*1402	B*2705	B*1402	B*2705	B*1402	B*2705
<b>B*1402/B*2705</b>						
Total peptides compared	782	1132	909	1553	846	1343
Shared peptides	90 (12%)	90 (8%)	114 (13%)	114 (7%)	102 (12%)	102 (8%)
Differential peptides	692 (88%)	1042 (92%)	795 (87%)	1439 (93%)	744 (88%)	1241 (92%)
Average mass of total peptides	1113 Da	1216 Da	1112 Da	1227 Da	1113 Da	1222 Da
Average mass of shared peptides	1136 Da	1136 Da	1118 Da	1118 Da	1127 Da	1122 Da
Average mass of differential peptides	1110 Da	1223 Da	1112 Da	1236 Da	1111 Da	1230 Da
<b>B*1403/B*2705</b>						
Total peptides compared	739	1132	776	1553	758	1343
Shared peptides	125 (17%)	125 (11%)	95 (12%)	95 (6%)	110 (15%)	110 (8%)
Differential peptides	614 (83%)	1007 (89%)	681 (88%)	1458 (94%)	648 (85%)	1233 (92%)
Average mass of total peptides	1105 Da	1216 Da	1115 Da	1227 Da	1110 Da	1222 Da
Average mass of shared peptides	1132 Da	1132 Da	1157 Da	1157 Da	1145 Da	1145 Da
Average mass of differential peptides	1100 Da	1227 Da	1109 Da	1232 Da	1105 Da	1230 Da

## Peptide Specificity of HLA-B\*1402, B\*1403, and B\*2705

Peptide	Protein	Accession N.	Sequenced from
<b>Shared</b>			
<b>Octamers (N=4)</b>			
DRMVGQVL	Eukariotic translation initiation factor 2 subunit 3	P41091	Both
ERVVHYEI (*)	NADH-ubiquinone oxidoreductase ASHI subunit	O95169	B*1402
LRDRPLLL	MHC class II transactivator CIITA	Q29675	Both
VEMHHEAL	EEF1A1 protein	Q6IQ15	B*1402
<b>Nonamers (N=11)</b>			
DEFLRISTA	Guanine nucleotide-binding protein	O75632	B*1402
DGQVRVAEL	H326 protein	Q12839	B*1403
DQTIRIHGL	Hypothetical protein	Q9BU59	Both
ERLKIRGSL	40 S ribosomal protein S25	P25111	B*1402
HEAERNIAL	Ran-binding protein 2	P49792	Both
HRDQRDVSL	KIAA1463 protein (Fragment)	Q9P265	Both
IRAAPPPLF	Cathepsin A	Q9BR08	Both
LRLLIHQSL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	B*1403
NPQERTLTL	Heat shock protein HSP 90-beta	P08238	Both
QRLPRPSSL	Unc-112 related protein 2	Q86UX7	Both
VRVGPQPSL	Hypothetical protein FLJ22659	Q9H627	B*1402
<b>Decamers (N=1)</b>			
GRVGFERSY	GRB2-related adaptor protein	Q13588	B*1403
<b>Dodecamers (N=1)</b>			
DRYRNPKGFSTL	Splice isophorm short of P40259	P40259	B*1402
<b>B*1402-specific</b>			
<b>Octamers (N=1)</b>			
MRNVMTAI	CDNA FLJ20733 fis clone HEP08550	AK000740	B*1402
<b>Nonamers (N=5)</b>			
DQFERIKTL	Protein kinase A-alpha (fragment)	Q15136	B*1402
LQIQRNVTL	Insulin-induced protein 1	O15503	B*1402
LRFPQQLNA	TUBB protein (fragment)	Q96B85	B*1402
NRVSSRLGL	Origin recognition complex subunit 1	Q13415	B*1402
SRFPEALRL	26S proteasome regulatory subunit S2	Q13200	B*1402
<b>Decamers (N=1)</b>			
SYDPTIENTF	GTP-binding protein Rheb	Q15382	B*1402
<b>B*1403-specific</b>			
<b>Octamers (N=1)</b>			
FQQGHEEL	Centaurin beta 1	Q15027	B*1403
<b>Nonamers (N=8)</b>			
DDTVRYTSL	WD-repeat protein 1 (Actin interacting protein 1)	O75083	B*1403
DHDVQRSEF	KIAA1007 protein (fragment)	Q8TB53	B*1403
DQDYRVTCF	Phorbol-like protein MDS019	Q9HC16	B*1403
DVDQRSTTF	COP9 signalosome complex subunit 1	Q13098	B*1403
EPDLRVTSV	Beta-1,3-galactosyltransferase	Q9NY97	B*1403
ERDAAKQRL	Protocadherin beta 7 precursor	Q9Y5E2	B*1403
IRDEQYDAL	Leucyl-cystinyl-aminopeptidase	Q9UIQ6	B*1403
NRAAPGAEF	54 KDa nuclear RNA and DNA-binding protein	Q15233	B*1403
<b>Decamers (N=1)</b>			
SPNFVSEVPL	Boule-like protein	Q8N9W6	B*1403

FIGURE 3. Amino acid sequence of B\*1402 and B\*1403 ligands. These are classified as shared, B\*1402-specific, and B\*1403-specific. Within each category they are listed by size and alphabetical order. The human proteins with which total match was obtained and their accession numbers in the Fasta databases ([www.ncbi.nlm.nih.gov/FASTA/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/FASTA/)) are given. The one or more subtypes from which the peptides were sequenced are indicated. Those peptides sequenced from only one subtype but showing an ion peak with the same retention time and *m/z* in the corresponding MALDI-TOF MS spectrum from the other subtype are listed as shared ligands. A shared octamer previously reported as a B\*1402 ligand (18) is indicated with an asterisk.

analogous residues (*i.e.* acidic, basic, polar, aliphatic, or aromatic) appeared at that position in at least 40% of the nonamers from a given subtype (Fig. 4). On this basis B\*1402 and B\*1403 showed skewed residue usage at 6 and 8 of the 9 peptide positions, respectively. Both subtypes had 4 positions with the same predominant motifs: P2 (Arg), P5 (Arg), P8 (polar residues), and P9 (aliphatic residues, mainly Leu). Except P9, which was fully restricted to aliphatic/aromatic residues, the other positions tolerated multiple residue types. Both subtypes had also in common a lack of significant restrictions in residue usage at P6. Due to the contribution of subtype-specific peptides, whose differential features are analyzed below, both subtypes showed differences in residue

usage at 4 positions: P1, P3, P4, and P7. B\*1402 showed no predominant ( $\geq 40\%$ ) motif at P1 and P4, and aliphatic motifs at P3 and P7. In contrast, B\*1403 showed an acidic motif at P1, a statistically increased frequency of Asp at P3, although this was slightly lower than 40% and aliphatic residues were also allowed at this position, an aliphatic motif at P4, and a polar one at P7. However, due to the large contribution of shared ligands in the 2 series compared, the differences in residue frequencies were not statistically significant, except at P3 and P7. The peptide motifs of B\*1402 were also analyzed in a previous report (18). In that study, an enrichment of particular residues at P1 (acidic), P2 (Arg), P3 (aliphatic/aromatic), P5 (Arg), P6 (Leu/Ile), and P $\Omega$  (Leu) was found.



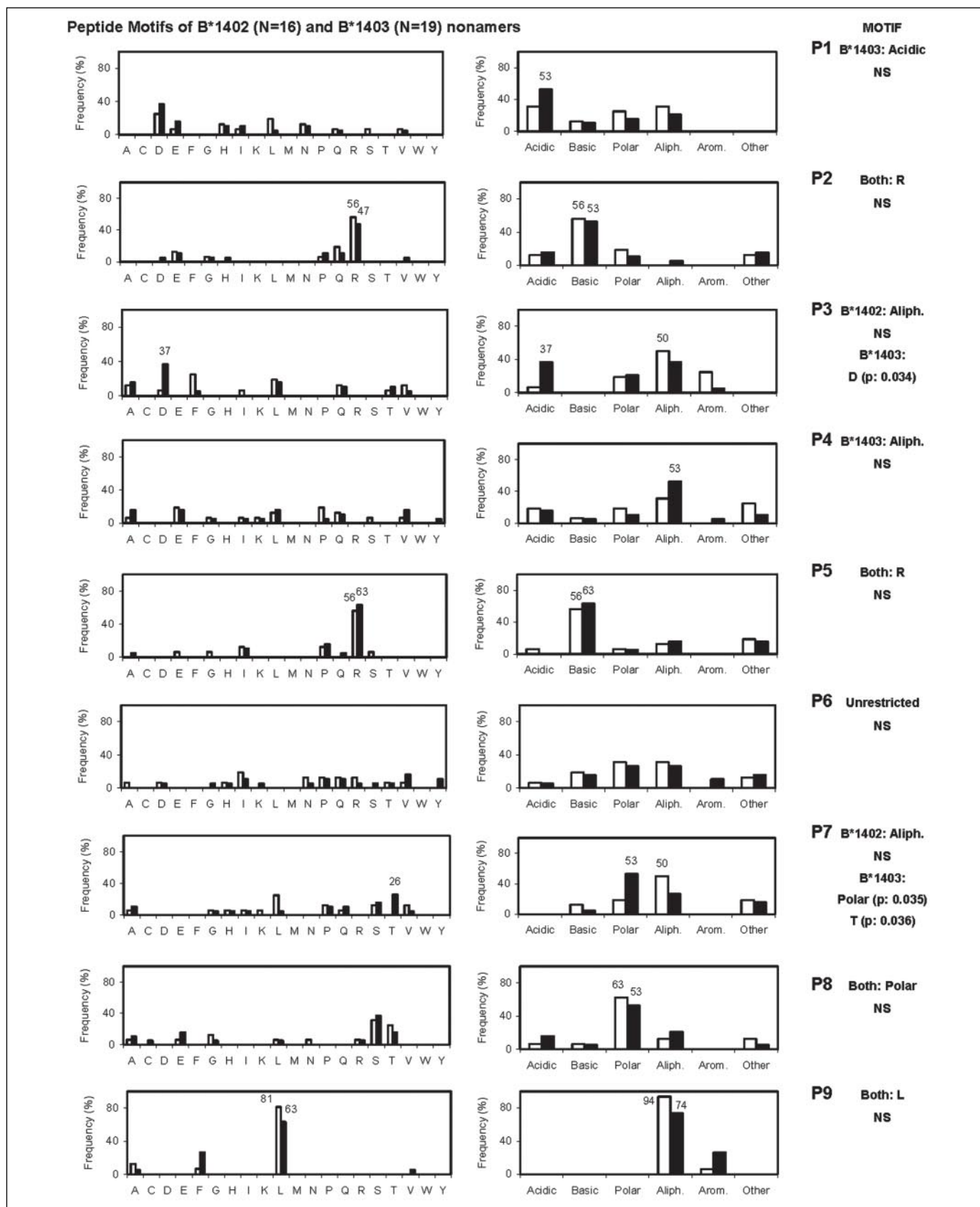


FIGURE 4. Peptide motifs of B\*1402 (white bars) and B\*1403 (black bars) ligands. Residue frequencies at each position among the sequenced nonamers from each subtype (Fig. 3) are indicated both for individual residues and for residue types (acidic: Asp and Glu; basic: His, Lys, and Arg; polar: Asn, Gln, Ser, and Thr; aliphatic: Ala, Cys, Ile, Leu, Met, and Val; aromatic: Phe, Trp, and Tyr; other: Gly and Pro). Residues or residue types showing a frequency  $\geq 40\%$  are indicated and assigned as peptide motifs. Residues showing lower frequency but a statistically significant difference between subtypes (Asp-3 and Thr-7 in B\*1402) are also indicated. Statistically significant differences in residue frequencies among the nonamers from both subtypes ( $p < 0.05$ ) were assessed with the Fisher's exact test. NS, not significant.

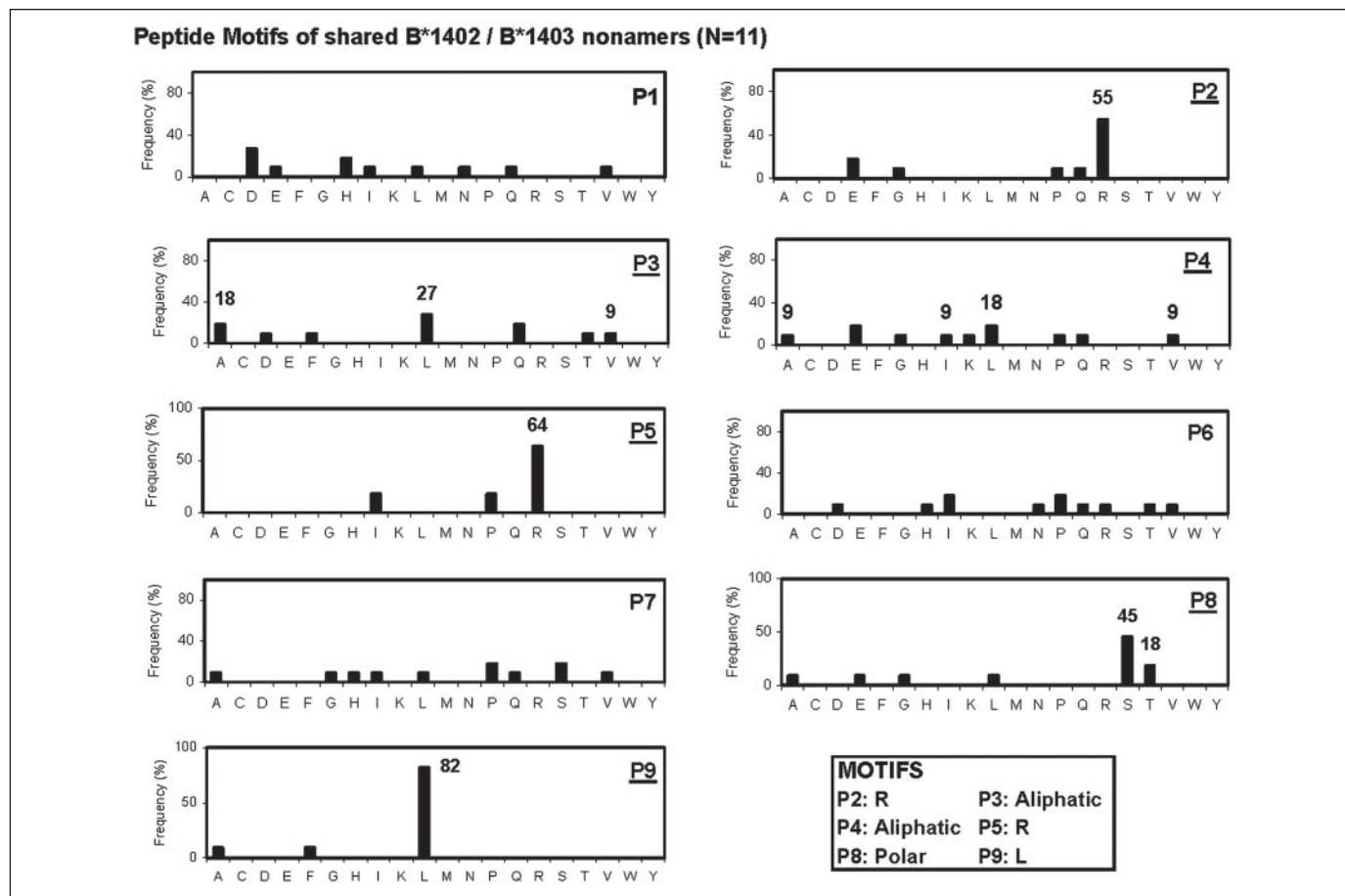


FIGURE 5. Peptide motifs of shared ligands between B\*1402 and B\*1403. Residue frequencies at each position among the sequenced nonamers shared by both subtypes are indicated. Residues or residue types (see legend to Fig. 4) showing a frequency  $\geq 40\%$  are indicated and assigned as predominant motifs of this series at the corresponding position.

Our results are in agreement with these assignments, except for the restrictions at P6, which were not confirmed by our analysis.

**Structural Features of Shared B\*1402/B\*1403 Ligands**—The same analysis of residue frequencies was carried out for only the subset of 11 shared nonamers (Fig. 5). As expected, those positions that had a similar type of restriction (P2, P5, P8, and P9) or were unrestricted (P6) in both subtypes showed a very similar pattern among shared nonamers. In those positions that showed different residue usage among subtypes, a mixed pattern was observed in the subset of shared ligands. As in B\*1402, P1 was unrestricted and P3 showed an aliphatic motif. As in B\*1403, an aliphatic motif emerged at P4. At P7, where both subtypes showed distinct (aliphatic/polar) restrictions, the subset of shared ligands showed no predominant motif. Overall, shared ligands showed restricted heterogeneity at 6 of 9 peptide positions, the most conspicuous motif being at P9.

**Subtype-specific HLA-B14 Ligands Have Distinct Motifs at Multiple Positions**—The basis for the disparity between the B\*1402- and B\*1403-bound peptide repertoires was analyzed by comparing the structural features of subtype-specific ligands. A comparison of residue frequencies between the corresponding nonamers revealed a number of significant differences (Fig. 6). P1 was mainly restricted to acidic residues among B\*1403-specific nonamers but not among the B\*1402-specific set. P2 was restricted to Arg and Gln among B1402-specific nonamers and was more degenerate in the B\*1403-specific set. However, the differences in these two positions did not reach statistical significance. A very dramatic difference was observed at P3, where Phe or aliphatic residues and Asp were the predominant motifs among B\*1402- and

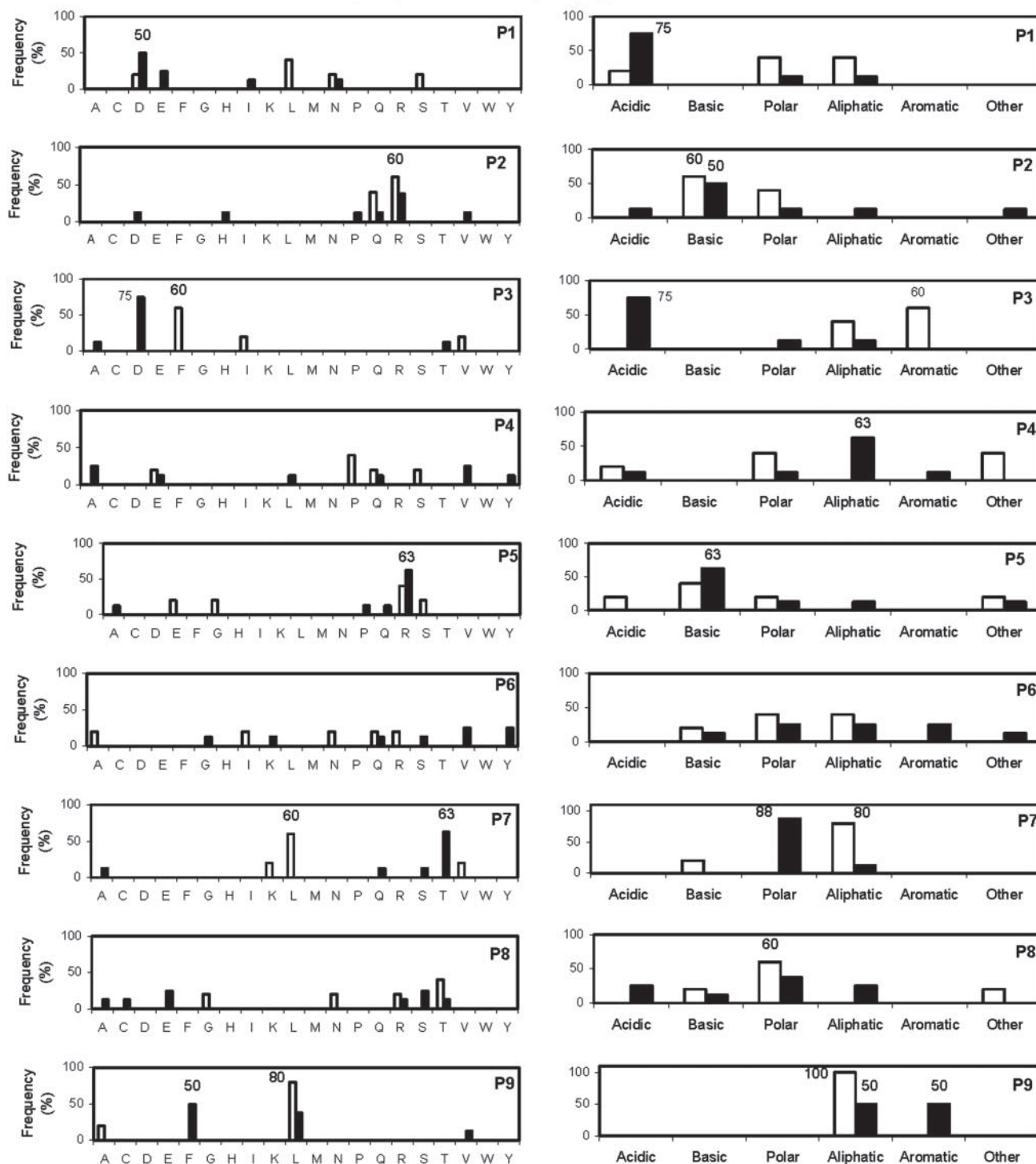
B\*1403-specific nonamers, respectively. Both differences were statistically significant. At P4 aliphatic residues were statistically increased among B\*1403-specific nonamers. Another drastic difference was observed at P7: aliphatic residues, mainly Leu, were predominant in the B\*1402-specific set, whereas a polar motif, mainly Thr, was observed in B\*1403, both showing statistical significance. The increased abundance of polar residues at P8 in B\*1402, relative to B\*1403, was not statistically significant. At P9 a full restriction to nonpolar residues was observed in both sets. Among B\*1402-specific nonamers, only aliphatic residues, mainly Leu, were found, whereas in the B\*1403-specific set Phe was also frequent (50%). These differences were not statistically significant.

Thus, the L156R change between B\*1402 and B\*1403 modulates peptide specificity by altering residue preferences in at least three peptide positions: P3, P4, and P7. The differences in residue frequencies observed at other positions (P1, P2, P5, P8, and P9) might reflect altered residue preferences or result just from the small number of peptide sequences available for comparison.

**Differential Features between HLA-B\*1402, B\*1403, and B\*2705 Ligands**—A total of 13 peptides (2 octamers, 10 nonamers, and 1 decamer) found in B\*1403 but not in B\*2705 were sequenced in this comparison (Fig. 7). All these peptides were sequenced either as shared or as B\*1403-specific ligands in the B\*1402/B\*1403 comparison (Fig. 3). In addition, 8 B\*2705 ligands (4 nonamers and 4 decamers) not found in B\*1403 were also sequenced. Of these, 5 were previously identified HLA-B27 ligands (7) and 3 are reported here for the first time (Fig. 7).

The basis for the large disparity between the B\*1403- and B\*2705-bound peptide repertoires was analyzed by means of a statistical com-

Differential motifs between B\*1402 (N=5) and B\*1403 (N=8)-specific nonamers



Statistically significant differences

Position	Subtype	Residue	p	Position	Subtype	Residue	p
P3	B*1402	F	0.035	P7	B*1402	Aliphatic / L	0.031 / 0.035
	B*1403	D	0.016		B*1403	Polar / T	0.005 / 0.044
P4	B*1403	Aliphatic	0.043				

FIGURE 6. Differential motifs of B\*1402-specific (white bars) and B\*1403-specific (black bars) nonamers. Residue frequencies at each position among the sequenced nonamers from each subtype (Fig. 3) are indicated both for individual residues and for residue types (see legend to Fig. 4). Residues or residue types with a frequency  $\geq 50\%$ , and those positions showing statistically significant differences between both sets are indicated. Statistical significance ( $p < 0.05$ ) was assessed with the Fisher's exact test. NS, not significant.



## Peptide Specificity of HLA-B\*1402, B\*1403, and B\*2705

FIGURE 7. Amino acid sequence of shared and differential ligands between B\*1403 and B\*2705. Within each category peptides are listed by size and alphabetical order. The human proteins with which total match was obtained and their accession numbers in the Fasta data base (www.ebi.ac.uk/fasta33/index.html) are given. The one or more allotypes from which the peptides were sequenced, and their identification or not as B\*1402 ligands (Fig. 3), are indicated. Peptides reported previously as natural ligands of HLA-B27 (7) are labeled with an asterisk.

Peptide	Protein	Accession N.	Sequenced from	Found in B*1402
<b>Shared (N=2)</b>				
IRAAPPPLF (*)	Cathepsin A	Q9BR08	B*1403 B*2705	Yes
GRVGFPPRSY (*)	GRB2-related adaptor protein	Q13588	B*1403 B*2705	Yes
<b>B*1403-specific</b>				
<b>Octamers (N=2)</b>				
DRMVGQVL	Eukariotic translation initiation factor 2 subunit 3	P41091	B*1403	Yes
FQQGHEEL	Centaurin beta 1	Q15027	B*1403	No
<b>Nonamers (N=10)</b>				
DDTVRYTSL	WD-repeat protein 1 (Actin interacting protein 1)	O75083	B*1403	No
DHDVRQSEF	KIAA1007 protein (fragment)	Q8TB53	B*1403	No
DQDYRVTCF	Phorbol-like protein MDS019	Q9HC16	B*1403	No
DQTIRIHGL	Hypothetical protein	Q9BU59	B*1403	Yes
DVDQRSTTF	COP9 signalosome complex subunit 1	Q13098	B*1403	No
EPDLRVTSV	Beta-1,3-galactosyltransferase	Q9NY97	B*1403	No
ERDAAKQRL	Protocadherin beta 7 precursor	Q9Y5E2	B*1403	No
IRDEQYIAL	Leucyl-cysteiny aminopeptidase	Q9UIQ6	B*1403	No
LRLLIHQSL	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	P61978	B*1403	Yes
QRLFRPSSL	Unc-112 related protein 2	Q86UX7	B*1403	Yes
<b>Decamers (N=1)</b>				
SPNEVSPVPL	Boule-like protein	Q8N9W6	B*1403	No
<b>B*2705-specific</b>				
<b>Nonamers (N=4)</b>				
ARLKEVLEY (*)	Farnesyl pyrophosphate syntase	P14324	B*2705	No
GRIPGIYGR (*)	Chromosome-associated polypeptide C	O95752	B*2705	No
GRYPGVSNY (*)	Amyloid protein binding protein 1	Q13564	B*2705	No
LRFFGQLNA	TUBB protein (fragment)	Q96B85	B*2705	Yes
<b>Decamers (N=4)</b>				
GRIKAIQLEY (*)	Regulatory subunit S3	O43242	B*2705	No
GRISDFHETY	BCL-6 corepressor short isoform	Q9H232	B*2705	No
HRFEQAFYTY (*)	PM5 protein	Q15155	B*2705	No
SRYTFYHVNL	proteasome endopeptidase complex	S55040	B*2705	No

TABLE THREE

### Statistical differences in residue usage between B\*1402, B\*1403, and B\*2705-bound nonamers

The 16 and 19 sequenced nonamers from B\*1402 and B\*1403, respectively (Fig. 3) were compared with a published registry of 108 natural B\*2705-bound nonamers (7). Statistical differences ( $p < 0.05$ ) were determined by the  $\chi^2$  test with Yates correction.

Position	Statistically different residues <sup>a</sup>		Statistically different residues, <sup>a</sup> B*2705	<i>p</i>	
	B*1402	B*1403		B*1402 <sup>b</sup>	B*1403 <sup>b</sup>
	%				
P1	Asp: 25 Glu: 6 Arg+Gly: 0	Asp: 37 Glu: 16 0	Asp: 0 Glu: 0 Arg+Gly: 43.5	<b><math>6.07 \times 10^{-6}</math></b> NS <sup>c</sup> <b>0.002</b>	$2.78 \times 10^{-9}$ <b>0.0008</b> <b>0.0008</b>
P2	Glu: 13 Pro: 6 Gln: 19 Arg: 56	Glu: 11 Pro: 11 Gln: 11 Arg: 47	Glu: 0 Pro: 0 Gln: 1.9 Arg: 98.1	<b>0.008</b> NS <b>0.012</b> <b><math>3.54 \times 10^{-8}</math></b>	<b>0.016</b> <b>0.016</b> NS <b><math>5.64 \times 10^{-11}</math></b>
P3	Asp: 6	Asp: 37	Asp: 0.9	NS	<b><math>5.62 \times 10^{-8}</math></b>
P4	None	None	None	NS	
P5	Arg: 56	Arg: 63	Arg: 2.8	<b><math>3.00 \times 10^{-10}</math></b>	<b><math>9.69 \times 10^{-13}</math></b>
P6	None	None	None	NS	
P7	Thr: 0	Thr: 26	Thr: 6.5	NS	<b>0.021</b>
P8	Ser: 31	Ser: 37	Ser: 7.4	<b>0.014</b>	<b>0.001</b>
P9	Leu: 81 Basic: 0	Leu: 63 Basic: 0	Leu: 25.9 Basic: 25.9	<b><math>4.04 \times 10^{-5}</math></b> <b>0.046</b>	<b>0.003</b> <b>0.027</b>

<sup>a</sup> Percent frequency of residues with statistically different usage between B\*1402- or B\*1403- and B\*2705-bound nonamers. Statistically increased frequencies and the corresponding residues are in boldface.

<sup>b</sup> *p* values corresponding to the B\*1402/ B\*2705 and B\*1403/B\*2705 comparisons, respectively. For the B\*1402/B\*1403 comparison see Fig. 4.

<sup>c</sup> NS, not significant.

parison of residue usage between the sequenced B\*1403-bound and a previously published registry (7) of 108 B\*2705-bound nonamers (TABLE THREE). The whole set of 19 sequenced B\*1403 nonamers, including both shared ligands with B\*1402- and B\*1403-specific pep-

tides (Fig. 3), were analyzed. Statistically significant differences in residue usage between B\*1403 and B\*2705 were found in most positions, except P4 and P6. Thus, at P1 acidic residues and R + G predominated in B\*1403 and B\*2705, respectively. At P2 B\*2705 was clearly more selec-

TABLE FOUR

## Natural ligands shared between HLA-B27 and HLA-B14

Peptide	B*2705 <sup>a</sup>	B*1402 <sup>b</sup>	B*1403 <sup>b</sup>	Other B27 subtypes
GRVGFPPRSY	This study and Ref. 7	Yes	Yes	B*2704 (7)
IRAAPPPLF	This study and Ref. 7	Yes	Yes	
LRFPGQLNA	This study	Yes	Not found	
SRFPEALRL	(7)	Yes	Not found	B*2706 (7)

<sup>a</sup> See Fig. 7.<sup>b</sup> See Fig. 3.

TABLE FIVE

## Cross-reaction among B\*1402, B\*1403 and B\*2705 with alloreactive CTL

$\alpha$ -B*1402 CTL		Relative lysis with B*1403			CTLs cross-reactive with B*1403
Donor <sup>a</sup>	Number of CTLs	<30%	30–70%	>70%	
1	42	30 (71.4%)	9 (21.4%)	3 (7.1%)	12 (28.6%)
2	23	16 (69.6%)	4 (17.4%)	3 (13%)	7 (30.4%)
3	3	2 (66.7%)	0	1 (33.3%)	1 (33.3%)
4	6	5 (83.3%)	1 (16.7%)	0	1 (16.7%)
Total	74	53 (71.6%)	14 (18.9%)	7 (9.5%)	21 (28.4%)
$\alpha$ -B*1402 CTL		Relative lysis with B*2705			CTLs cross-reactive with B*2705
Donor	Number of CTLs	<30%	30–70%	>70%	
1	42	42 (100%)	0	0	0
2	22	20 (90.9%)	1 (4.5%)	1 (4.5%)	2
3	3	3 (100%)	0	0	0
4	3	3 (100%)	0	0	0
Total	70	68 (97.1%)	1 (1.4%)	1 (1.4%)	2 (2.9%)

<sup>a</sup> The HLA class I types of the donors are as follows: Donor 1 (HLA-A1, A2; B7, B18; Cw5, Cw7); Donor 2 (HLA-A2, A23; B44, B62; Cw2, Cw4); Donor 3 (HLA-A23, 24; B51, B\*1503; Cw4, Cw5); and Donor 4 (HLA-A24, A29; B44, B57; Cw7).

tive for Arg than B\*1403. At P3 and P5 Asp and Arg, respectively, were much more favored in B\*1403. At P7 and P8, Thr and Ser, respectively, were statistically increased in B\*1403. Finally, at P9 a statistically significant increase of Leu in B\*1403 and basic residues in B\*2705 was observed. A similar comparison between the 16 B\*1402 sequenced nonamers and the registered B\*2705 ligands showed a generally similar pattern of differences, with few exceptions, such as the loss of statistical significance in residue usage at P3 and P7 (TABLE THREE). Such disparity in residue usage at multiple positions explains the low peptide sharing observed between B\*1402 or B\*1403 and B\*2705. It may also be noted that statistically increased residues are found at more positions among B\*1402 and B\*1403 ligands (5 and 7 positions, respectively) than in B\*2705 (3 positions). As suggested above, this might reduce the diversity of the B\*1402- and B\*1403-bound peptide repertoires, relative to B\*2705, and explain that less HLA-B14 than B27 ligands were detected by MALDI-TOF MS. The higher number of peptide positions with restricted residue usage, relative to other HLA class I molecules, was previously noted for B\*1402 (18).

**HLA-B\*2705 Shares Common Ligands with B\*1402 and B\*1403**—Two identical ligands of B\*1403 and B\*2705 were sequenced (Fig. 7). Both peptides were also shared between B\*1402 and B\*1403. No peptides shared by B\*1403 and B\*2705, but absent in B\*1402 were identified by sequence in this study. In contrast, two B\*1402-bound peptides not found in B\*1403 (Fig. 3) were also identified as B\*2705 ligands. These were LRFPGQLNA, sequenced from B\*2705 in this study (Fig. 7), and SRFPEALRL, previously reported as a natural ligand of B\*2705 and B\*2706 (7). A summary of the shared HLA-B14/B27 ligands identified in our study is shown in TABLE FOUR. All four peptides had motifs typical of HLA-B27, namely R2, and aliphatic/aromatic P3 and C-terminal residues.

**Alloreactive CTL Cross-reaction among B\*1402, B\*1403, and B\*2705 Parallels Peptide Sharing**—Alloreactive CTL responses are characterized by large clonal diversity (35). This is mainly due to the fact that the CTL clones recognize a vast array of the peptides constitutively bound to the allo-MHC molecule (19–21). Thus, determining the cross-reactions of allospecific CTL allowed us to analyze the shared antigenic features of related allo-MHC molecules as a function of their constitutive peptide repertoires.

A total of 74 alloreactive CTL clones elicited against B\*1402 from various donors were tested for their capacity to lyse B\*1403-C1R-transfectant cells (TABLE FIVE). The specificity of the CTL clones was established from their lack of killing of untransfected C1R cells and their lysis of B\*1402-C1R transfectants. Cross-reactivity was assessed as the lysis of B\*1403 target cells, relative to the lysis of B\*1402-C1R-transfectant cells. Relative lysis values lower than 30% were considered to indicate lack of cross-reaction. Relative lysis >70% was considered as full cross-reaction, indicating full conservation of the allospecific epitope. Relative lysis values of 30–70% were considered as partial cross-reaction, indicating a partially altered epitope as a consequence of either diminished presentation or altered conformation of the corresponding allospecific peptide. Only 21 of the 74 anti-B\*1402 CTL clones tested (28.4%) showed either partial or full cross-reaction with B\*1403, with little difference among donors. This percentage was only slightly lower than the percentage of peptide overlap between B\*1402 and B\*1403 (32–35%). Because these CTLs recognize constitutive B\*1402-bound peptides, these results suggest that, globally, many of the shared ligands between B\*1402 and B\*1403 maintain their antigenic features, presumably by adopting a similar conformation, when bound to both subtypes.

A similar analysis was performed to analyze allospecific epitope sharing between HLA-B14 and B\*2705. For this purpose we tested alloreactive

## Peptide Specificity of HLA-B\*1402, B\*1403, and B\*2705

tive CTL clones raised against B\*1402 for recognition of B\*2705-C1R targets. Anti-B\*1403 CTL could not be obtained, because B\*1403-positive LCL, to be used as stimulators, were not available, and attempts to raise alloreactive CTL using B\*1403-C1R as stimulator cells were unsuccessful. Of a total of 70 anti-B\*1402 CTL from four donors, only 2 (2.9%), both from the same donor, showed either partial or full cross-reaction with B\*2705. This percentage was very close to the estimated peptide sharing between B\*1403 and B\*2705, when the percent overlap between both allotypes obtained by MALDI-TOF (8–15%) was corrected for the percentage of shared ion pairs confirmed as identical peptides by sequencing (2 of 6: 33.3%), resulting in an estimated peptide overlap between B\*1403 and B\*2705 of 2.7 to 5% (see above). Although a similar analysis was not performed with B\*1402, it is reasonable to infer that the B\*1402/B\*2705 overlap might be similar, because their peptide sharing by MALDI-TOF MS (8–12%) was very similar to the B\*1403/B\*2705 overlap.

The two anti-B\*1402 CTLs that cross-reacted with B\*2705 showed marginal cross-reaction (27 and 30% relative lysis, respectively) with B\*1403, suggesting that they recognized peptides shared by B\*1402 and B\*2705, but absent or antigenically altered in B\*1403. Two peptides with such features were identified in this study (TABLE FOUR).

In addition, 28 and 20 alloreactive CTL clones obtained from various donors against B\*2705 were tested for recognition of B\*1402 and B\*1403, respectively. None of these CTL lysed the B14 targets (data not shown). Given the low peptide sharing, it is possible that the number of anti-B\*2705 CTL tested was not sufficient to detect cross-reaction with HLA-B14.

### DISCUSSION

The B\*1402 and B\*1403 subtypes showed a disparity in their constitutive peptide repertoires that was strikingly large in view of their close structural similarity, with only an L156R change. For instance, B\*4402 and B\*4403, which differ from each other only by the D156L change, share >95% of their peptide repertoires (36). In principle, polymorphism at residue 156 may influence peptide specificity through at least two mechanisms. First, by directly modulating peptide binding, because this residue takes part in the D and E pockets of the peptide-binding site, which accommodate the peptidic P3 and P7 residues, respectively (9, 37). Second, by modulating peptide loading through interactions with the peptide-loading complex. Residue 156 was suggested to influence the interaction with the transporter associated with antigen processing (TAP), which is mediated by the MHC-dedicated chaperone tapasin (38), on the basis of the different TAP binding efficiency of B\*4402 and B\*4403 (39, 40). This mechanism is not supported by the high peptide sharing between the two B44 subtypes (36), but it does not exclude a different effect of the B\*1402/B\*1403 dimorphism on TAP-mediated peptide loading, because the amino acid change at position 156 in these subtypes is different. Although interactions with the peptide-loading complex were not addressed in this study, the peptide differences between B\*1402 and B\*1403 can be explained to a large extent by an effect of residue 156 on peptide-binding specificity. Statistically significant differences in residue usage among differentially bound peptides were found at three positions two of which, P3 and P7, bind in the pockets of which residue 156 is an integral part. The preference for nonpolar residues at both positions in B\*1402 and for acidic (Asp) and polar (mainly Thr) residues at P3 and P7, respectively, in B\*1403 are fully consistent with the hydrophobic Leu-156 in B\*1402 and the basic Arg-156 in B\*1403. The basis for the increased preference of B\*1403 for aliphatic P4 residues is not obvious in the absence of an x-ray diffraction model. It might result from readjustments in side-chain orientation and

contacts in the vicinity of residue 156, indirectly influencing the binding mode and frequency of given P4 residues.

For B\*1402, acidic P1 residues were suggested to be favored by the presence of Asn-63 (18). An increased preference of B\*1403 for this type of residues was evident from the sequences of subtype-specific ligands, although it did not reach statistical significance. This increase is also not readily explained by a direct effect of Arg-156, because B\*1402 and B\*1403 have the same A pocket, including the Asn-63 residue. It is possible that indirect, long-range effects of residue 156 on residues close to the A pocket might modulate P1 residue specificity between B\*1402 and B\*1403, but this can only be properly addressed by crystallographic analysis. Alternatively, the preference of B\*1403 for acidic P1 residues might reflect lower TAP dependence of this allotype, because these, along with acidic P3 residues, are among the most disfavored motifs for TAP binding (41–44). Of the eight B\*1403-specific nonamers sequenced in this study, five had acidic residues at both P1 and P3, and all but one had these types of residues in at least one of these positions. These results might have two explanations. A first possibility is that B\*1403 interacts poorly with proteins in the peptide-loading complex and is more permissive than B\*1402 for peptides with disfavored TAP-binding motifs. A second possibility is that the increased preference for acidic P3 residues, resulting from a direct influence of Arg-156 on Asp pocket interactions, helps to bypass TAP binding requirements for peptide loading, indirectly favoring binding of peptides that also have acidic P1 residues, without involving suboptimal interactions of B\*1403 with other components of the peptide-loading complex. This issue can be addressed by direct analysis of these interactions, which was not pursued in this study. In addition, because many MHC class I ligands enter the endoplasmic reticulum as N-terminally extended precursors and are then subjected to aminopeptidase-mediated trimming (45, 46), the relationship between N-terminal TAP-binding motifs of HLA class I ligands and TAP dependence of the corresponding allotype is not straightforward. However, it is interesting that one of the shared ligands among B\*1402, B\*1403, and B\*2705, IRAAPPPLF, which derives from the signal peptide of cathepsin A, is a TAP-independent ligand, as confirmed by its isolation from the B\*2705-bound peptide pool from the TAP-deficient T2 cells.<sup>3</sup> Thus, the significant quantitative and qualitative differences between the B\*1402- and B\*1403-bound peptide repertoires are largely explained by the concomitant influence of residue 156 on at least two anchor positions of the bound peptides, although additional effects on TAP dependence cannot be formally excluded.

Aside of other putative differences between these two subtypes, which remain to be investigated, such as interaction with the peptide-loading complex, folding kinetics, tendency to misfold, or the capacity to form heavy chain homodimers, it seems clear that the large differences between their peptide repertoires, allow much room for the possibility that the differential association of B\*1402 and B\*1403 to AS may be related to their differential peptide specificity, as proposed by the arthritogenic peptide hypothesis (47). In principle, an additional level of disparity might arise from distinct presentation of shared ligands by these two subtypes, as observed in HLA-B44 (36). To test this issue we used alloreactive CTL clones as probes to analyze peptide-dependent epitope sharing between B\*1402 and B\*1403. This approach was based on three experimentally well supported assumptions. First, that alloreactive CTLs recognize constitutive alloantigen-bound peptides (19–21). Second, that the large clonal diversity of alloreactive CTL responses is due to recognition of a vast array of peptides constitutively bound to the alloantigen molecule, so that virtually every CTL clone recognizes a

<sup>3</sup> M. Ramos and J. A. López de Castro, unpublished observations.



different peptide (19, 21). This is unlike self-restricted CTL responses, where the majority of the CTL clones are directed against one or few immunodominant foreign peptides. Third, although CTLs can cross-react with very distinct peptides showing minimal sequence homology among each other (48), it is reasonable to assume that alloreactive CTL cross-reaction between closely related allotypes with a substantial degree of peptide sharing will be generally based on recognition of shared ligands. This assumption is very difficult to substantiate experimentally because, in general, the allospecific peptide recognized by any given CTL clone is unknown. However, it was formally demonstrated for HLA-B27 subtypes in at least one instance (27). Furthermore, at least some shared ligands of B\*2705 and B\*2709 show a highly similar crystal structure when bound to both allotypes (49, 50). Thus, the finding that the percentage of allospecific CTL clones cross-reacting between B\*1402 and B\*1403 closely reflected peptide sharing, strongly suggests that most of the shared ligands maintain their antigenic features, and presumably a similar conformation, when bound to either subtype. Our results with allorecognition of HLA-B14 subtypes are different from those reported for B\*4402 and B\*4403. In this subtype pair, the D156L change had a limited effect on peptide specificity, and a drastic one on alloreactivity (36). A different mutation in the same position of HLA-B14 (L156R) has significant effects on peptide specificity, but seems to have little effect on allorecognition of shared ligands. Thus, the effects of subtype polymorphism in a given position cannot be generalized, because they may depend strongly on the nature of the mutation, the molecular context in which it occurs, or both. For instance, B\*3508 and B\*3501, which also differ by only the L156R change, bind a shared peptide epitope with a similar conformation, but immunodominance and T-cell receptor engagement of this epitope was subtype-dependent due to an effect of this polymorphism on the conformation of the peptide-binding site (51).

If susceptibility to AS were indeed dependent on T-cell recognition of specific peptides, as proposed by the arthritogenic peptide hypothesis (5), one would expect to find shared ligands and common peptide features between the disease-associated B\*2705 and B\*1403. The existence of shared ligands between these two allotypes was formally confirmed in this study. However, it is obvious that sharing common ligands with HLA-B27 does not, by itself, imply that the corresponding allotype will predispose to AS. This is best illustrated by the lack of association of B\*2706 and B\*2709 with this disease, despite their large peptide sharing with AS-associated subtypes (33, 34) and, in this study, by finding of four ligands shared by B\*2705 and B\*1402.

Despite the low number of shared ligands, it was remarkable that some T-cell cross-reaction between B\*1402 and B\*2705 could be detected, and that the percentage of cross-reactive CTL clones was comparable with the low peptide sharing between B\*1402 or B\*1403 and B\*2705. Thus, regardless of the many amino acid differences between HLA-B27 and HLA-B14, some of the shared ligands may maintain their alloantigenic features on both allotypes. Alternatively, these cross-reactions might reflect recognition of distinct peptides on each allotype, but this would imply that different ligands of HLA-B27 and HLA-B14 show antigenic mimicry, therefore compensating their biochemical distinctness with their immunological similarity. Although anti-B\*1403 CTLs were not analyzed, it seems reasonable to infer that a similar level of CTL cross-reaction may occur between B\*1403 and B\*2705. The joint finding of few shared ligands and cross-reactive CTL clones between HLA-B27 and HLA-B14 suggests that B\*1403 and B\*2705 present either some shared peptides with the same antigenic features or distinct peptides showing antigenic mimicry. This is a basic requirement of the arthritogenic peptide hypothesis (5). However, our results are based on

alloreactive CTLs, which are obviously unrelated to spondyloarthritis, and formal proof of pathogenetically relevant antigenic mimicry between B\*1403 and B\*2705 ligands would require confirmation with self-restricted CTLs.

Two other relevant aspects should be considered. First, no peptides shared by B\*1403 and B\*2705, but absent in B\*1402, were found. Although our results do not exclude the existence of such ligands, they must be rare. Second, the basis for the large differences between the B\*1403- and B\*2705-bound peptide repertoires are clearly explained by the very distinct requirements of the respective peptide ligands at multiple positions, and by the fact that many residues favored for one allotype are rarely or not found among ligands of the other. These findings do not exclude the existence of a common disease-related peptide presented by B\*1403 and B\*2705, but not by B\*1402, but suggest that the likelihood of finding such a peptide may be low.

In conclusion, our study has defined biochemical and immunological relationships between two HLA class I allotypes associated with AS that may set limitations to some assumptions concerning the pathogenesis of this disease, such as involvement of specific peptides. However, molecular correlations among peptide repertoires and the use of alloreactive CTLs that, although useful as probes for the antigenic conservation of shared ligands bound to different MHC molecules are unrelated to AS, cannot provide a direct answer to the mechanism of spondyloarthritis. Ultimately, the pathogenetic features of HLA-B27 and B\*1403 need to be identified through further studies in patients.

*Acknowledgments*—We thank Anabel Marina and Juan P. Albar (Proteomics Dept., Centro de Biología Molecular Severo Ochoa and Centro Nacional de Biotecnología, respectively) and their technical staff for assistance in MS. We also thank our colleagues Miguel Marcilla, Patricia Gomez, and Miriam Vázquez for their help.

## REFERENCES

- Brewerton, D. A., Hart, F. D., Nicholls, A., Caffrey, M., James, D. C., and Sturrock, R. D. (1973) *Lancet* **1**, 904–907
- Schlossstein, L., Terasaki, P. I., Bluestone, R., and Pearson, C. M. (1973) *N. Engl. J. Med.* **288**, 704–706
- Ramos, M., and Lopez de Castro, J. A. (2002) *Tissue Antigens* **60**, 191–205
- Colbert, R. A. (2004) *Curr. Mol. Med.* **4**, 21–30
- Benjamin, R., and Parham, P. (1990) *Immunol. Today* **11**, 137–142
- Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R., and Wiley, D. C. (1991) *Nature* **353**, 326–329
- Lopez de Castro, J. A., Alvarez, I., Marcilla, M., Paradelo, A., Ramos, M., Sesma, L., and Vazquez, M. (2004) *Tissue Antigens* **63**, 424–445
- Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1991) *Nature* **353**, 321–325
- Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1992) *Cell* **70**, 1035–1048
- Falk, K., Rotzschke, O., Takiguchi, M., Gnau, V., Stevanovic, S., Jung, G., and Rammensee, H. G. (1995) *Immunogenetics* **41**, 162–164
- Sobao, Y., Tsuchiya, N., Takiguchi, M., and Tokunaga, K. (1999) *Arthritis Rheum.* **42**, 175–181
- Yamaguchi, A., Tsuchiya, N., Mitsui, H., Shiota, M., Ogawa, A., Tokunaga, K., Yoshinoya, S., Juji, T., and Ito, K. (1995) *Arthritis Rheum.* **38**, 1672–1677
- Crivellato, E., and Zacchi, T. (1987) *Acta Derm. Venereol.* **67**, 249–250
- Khan, M. A. (2002) *Ann. Intern. Med.* **136**, 896–907
- Urvater, J. A., Hickman, H., Dzuris, J. L., Prilliman, K., Allen, T. M., Schwartz, K. J., Lorentzen, D., Shufflebotham, C., Collins, E. J., Neiffer, D. L., Raphael, B., Hildebrand, W., Sette, A., and Watkins, D. I. (2001) *J. Immunol.* **166**, 3334–3344
- Ellis, J. M., Mack, S. J., Leke, R. F., Quakyi, I., Johnson, A. H., and Hurley, C. K. (2000) *Tissue Antigens* **56**, 291–302
- Lopez-Larrea, C., Mijiyawa, M., Gonzalez, S., Fernandez-Morera, J. L., Blanco-Gelaz, M. A., Martinez-Borra, J., and Lopez-Vazquez, A. (2002) *Arthritis Rheum.* **46**, 2968–2971
- DiBrino, M., Parker, K. C., Margulies, D. H., Shiloach, J., Turner, R. V., Biddison, W. E., and Coligan, J. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 32426–32434
- Heath, W. R., Kane, K. P., Mescher, M. F., and Sherman, L. A. (1991) *Proc. Natl. Acad.*

## Peptide Specificity of HLA-B\*1402, B\*1403, and B\*2705

- Sci. U. S. A.* **88**, 5101–5105
20. Rotzschke, O., Falk, K., Faath, S., and Rammensee, H. G. (1991) *J. Exp. Med.* **174**, 1059–1071
21. Wang, W., Man, S., Gulden, P. H., Hunt, D. F., and Engelhard, V. H. (1998) *J. Immunol.* **160**, 1091–1097
22. Storkus, W. J., Howell, D. N., Salter, R. D., Dawson, J. R., and Cresswell, P. (1987) *J. Immunol.* **138**, 1657–1659
23. Zemmour, J., Little, A. M., Schendel, D. J., and Parham, P. (1992) *J. Immunol.* **148**, 1941–1948
24. Calvo, V., Rojo, S., Lopez, D., Galocha, B., and Lopez de Castro, J. A. (1990) *J. Immunol.* **144**, 4038–4045
25. Barnstable, C. J., Bodmer, W. F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A. F., and Ziegler, A. (1978) *Cell* **14**, 9–20
26. Brodsky, F. M., Bodmer, W. F., and Parham, P. (1979) *Eur. J. Immunol.* **9**, 536–545
27. Paradela, A., Garcia-Peydro, M., Vazquez, J., Rognan, D., and Lopez de Castro, J. A. (1998) *J. Immunol.* **161**, 5481–5490
28. Paradela, A., Alvarez, I., Garcia-Peydro, M., Sesma, L., Ramos, M., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2000) *J. Immunol.* **164**, 329–337
29. Yague, J., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (1998) *Tissue Antigens* **52**, 416–421
30. Marina, A., Garcia, M. A., Albar, J. P., Yague, J., Lopez de Castro, J. A., and Vazquez, J. (1999) *J. Mass Spectrom.* **34**, 17–27
31. Clauser, K. R., Baker, P., and Burlingame, A. L. (1999) *Anal. Chem.* **71**, 2871–2882
32. Lopez, D., Garcia Hoyo, R., and Lopez de Castro, J. A. (1994) *J. Immunol.* **152**, 5557–5571
33. Sesma, L., Montserrat, V., Lamas, J. R., Marina, A., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 16744–16749
34. Ramos, M., Paradela, A., Vazquez, M., Marina, A., Vazquez, J., and Lopez de Castro, J. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 28749–28756
35. Sherman, L. A., and Maleckar, J. R. (1988) *Immunol. Rev.* **101**, 115–131
36. Macdonald, W. A., Purcell, A. W., Mifsud, N. A., Ely, L. K., Williams, D. S., Chang, L., Gorman, J. J., Clements, C. S., Kjer-Nielsen, L., Koelle, D. M., Burrows, S. R., Tait, B. D., Holdsworth, R., Brooks, A. G., Lovrecz, G. O., Lu, L., Rossjohn, J., and McCluskey, J. (2003) *J. Exp. Med.* **198**, 679–691
37. Garrett, T. P., Saper, M. A., Bjorkman, P. J., Strominger, J. L., and Wiley, D. C. (1989) *Nature* **342**, 692–696
38. Ortmann, B., Copeman, J., Lehner, P. J., Sadasivan, B., Herberg, J. A., Grandea, A. G., Riddell, S. R., Tampe, R., Spiess, T., Trowsdale, J., and Cresswell, P. (1997) *Science* **277**, 1306–1309
39. Gauchat-Feiss, D., Breur-Vriesendorp, B. S., Rufer, N., Jeannot, M., Roosnek, E., and Tiercy, J. M. (1994) *Tissue Antigens* **44**, 261–264
40. Neisig, A., Wubbolts, R., Zang, X., Melief, C., and Neefjes, J. (1996) *J. Immunol.* **156**, 3196–3206
41. Van Eindert, P. M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A., and Bach, J. F. (1995) *J. Exp. Med.* **182**, 1883–1895
42. Daniel, S., Caillat-Zucman, S., Hammer, J., Bach, J. F., and van Eindert, P. M. (1997) *J. Immunol.* **159**, 2350–2357
43. Daniel, S., Brusic, V., Caillat-Zucman, S., Petrovsky, N., Harrison, L., Riganelli, D., Sinigaglia, F., Gallazzi, F., Hammer, J., and Van Eindert, P. M. (1998) *J. Immunol.* **161**, 617–624
44. Lankat-Buttgereit, B., and Tampe, R. (2002) *Physiol. Rev.* **82**, 187–204
45. Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002) *Nature* **419**, 480–483
46. York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2002) *Nat. Immunol.* **3**, 1177–1184
47. Deleted in proof
48. Evavold, B. D., Sloan-Lancaster, J., Wilson, K. J., Rothbard, J. B., and Allen, P. M. (1995) *Immunity* **2**, 655–663
49. Pohlmann, T., Bockmann, R. A., Grubmuller, H., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., and Alexiev, U. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 28197–28201
50. Hulsmeyer, M., Welfle, K., Pohlmann, T., Misselwitz, R., Alexiev, U., Welfle, H., Saenger, W., Uchanska-Ziegler, B., and Ziegler, A. (2005) *J. Mol. Biol.* **346**, 1367–1379
51. Tynan, F. E., Borg, N. A., Miles, J. J., Beddoe, T., El Hassen, D., Silins, S. L., van Zuylen, W. J., Purcell, A. W., Kjer-Nielsen, L., McCluskey, J., Burrows, S. R., and Rossjohn, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 23900–23909