

## Análisis del repertorio peptídico asociado a HLA-DR10

Álvarez I<sup>1,2</sup>, Collado J<sup>1,2</sup>, Daura X<sup>2</sup>, Colomé N<sup>3</sup>, Rodríguez-García M<sup>4</sup>, Gallart T<sup>4</sup>, Canals F<sup>3</sup>, Jaraquemada D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Inmunología, Universitat Autònoma de Barcelona. <sup>2</sup> Instituto de Biotecnología y Biomedicina, Universidad Autònoma de Barcelona. <sup>3</sup> Laboratorio de Proteómica, Programa de Investigación Médica Oncológica, Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Barcelona. <sup>4</sup> Servicio de Inmunología, Hospital Clínico de Barcelona

### Introducción

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmune asociada con algunos subtipos de HLA-DR4, así como con DR1 y DR10. Todos los alelos asociados con la enfermedad contienen en la tercera región hipervariable una secuencia básica, entre las posiciones aminoacídicas 70 a 74. La hipótesis del epítipo compartido postula que estos residuos podrían definir los ligandos naturales asociados a estos alelos y/o estar directamente expuestos e interaccionar con el TCR. A pesar de que los alotipos relacionados con la enfermedad están identificados, no se conocen los péptidos antigénicos que éstos presentan y que podrían desencadenar o mantener la respuesta autoinmune, aunque se han propuesto varios candidatos.

Los repertorios peptídicos asociados a DR1 y a DR4 se han estudiado extensivamente y se conocen los motivos de anclaje de los péptidos unidos a ellas. También se han resuelto las estructuras cristalográficas de DR1 y DR4 con varios péptidos. Sin embargo sigue sin identificarse el repertorio peptídico asociado a DR10. Un posible solapamiento peptídico entre los repertorios asociados a los alelos de HLA

asociados con RA apoyaría la hipótesis de la existencia de péptidos comunes capaces de desarrollar y mantener la respuesta autoinmune en RA.

### Material y métodos

Se han purificado por cromatografía de afinidad las moléculas de HLA-DR provenientes a DR10 de una línea linfoblastoide homocigota, y el *pool* peptídico asociado a las mismas se ha eluido en medio ácido, fraccionado por HPLC y analizado por espectrometría de masas, tanto MALDI-TOF como nanoESI.

### Resultados

Se han identificado 238 ligandos naturales de DR10, lo que nos ha permitido definir el motivo de anclaje de este alelo. Diez de los ligandos naturales identificados (exactos o con pequeñas diferencias fuera del *core* de unión) se habían descrito previamente asociados a DR1 o DR4 y sólo uno asociado a DR11, un alelo no relacionado con RA. Estos datos indican que DR10 tiene un repertorio peptídico solapante con DR1 y D.

## Detección de la inespecificidad de un anticuerpo policlonal contra la lipoproteína lipasa mediante herramientas proteómicas

Casanovas A<sup>1</sup>, Carrascal M<sup>2</sup>, Abián J<sup>2</sup>, Llobera M<sup>1</sup>, López-Tejero MD<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España. <sup>2</sup> CSIC-UAB Proteomics Laboratory, IIBB-CSIC-IDIBAPS, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España.

### Introducción

Los anticuerpos específicos son una herramienta esencial para el estudio de proteínas. Es-

tudios anteriores describen la producción de una amplia variedad de anticuerpos contra la lipoproteína lipasa (LPL). La LPL es una enzima cuya

forma funcional se encuentra anclada a la superficie luminal del endotelio capilar de diferentes tejidos y es responsable de la hidrólisis de los triacilglicéridos plasmáticos. Un procedimiento clásico para la obtención de anticuerpos contra esta enzima consiste en la purificación de LPL a partir de leche bovina y su uso posterior como inmunógeno para la obtención de anticuerpos en gallina. P66 es un anticuerpo policlonal contra LPL obtenido mediante este procedimiento (Vilella et al., 1993), utilizado en estudios anteriores por distintos laboratorios para la detección de esta enzima (Ricart-Jané et al., 2005). En el presente estudio nos planteamos la puesta a punto del Western blot anti-LPL en 2 dimensiones utilizando LPL bovina comercial como estándar y P66 para la inmunodetección.

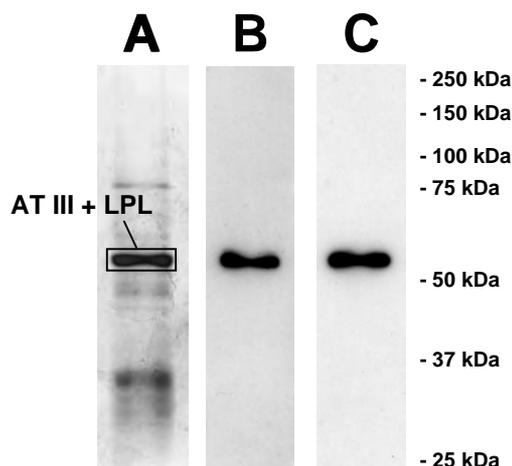
**Material y métodos**

- Muestra– LPL de leche bovina (Sigma, St Louis, MO, USA) y plasma de rata (obtenido de ratas Wistar macho).
- Electroforesis bidimensional– Isoelectroenfoque en gradiente inmovilizado de pH 3-10 (tiras de 7 cm) y segunda dimensión en geles de acrilamida al 9% (p/v). Revelado mediante tinción con plata o Western blot (Wb), utilizando los anticuerpos: P66 (policlonal, cedido por el Dr. T. Olivecrona, Universidad de Umeå, Suecia) o 5D2 (monoclonal, cedido por el Dr. J. D. Brunzell, Universidad de Washington, Seattle, USA).
- Espectrometría de masas– Las proteínas de interés fueron identificadas por mapeo peptídico, mediante un análisis por MALDI-TOF utilizando un equipo Voyager DE-PRO en modo de reflectrón.

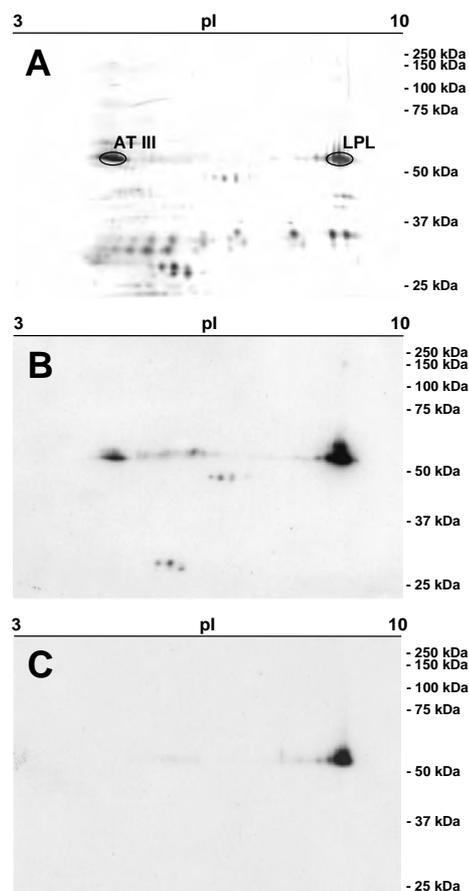
**Conclusiones**

El anticuerpo P66 es inespecífico porque reconoce la LPL, pero también la Antitrombina III. La inespecificidad de P66 podría explicarse por una purificación incompleta de la LPL empleada como inmunógeno similar a la observada en la LPL bovina comercial. Nuestros resultados definen el Wb en 2DE y la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas como el procedimiento más fiable para validar la pureza y la especificidad de anticuerpos contra la LPL.

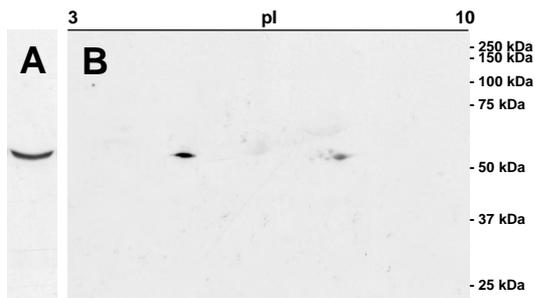
**Resultados:**



**Fig. 1.** Análisis monodimensional de LPL bovina comercial. El gel teñido con plata (A), es comparado con los correspondientes Wb para la inmunodetección de LPL utilizando los anticuerpos P66 (B) o 5D2 (C). AT III, Antitrombina III; LPL, Lipoproteína lipasa.



**Fig. 2.** Análisis bidimensional de LPL bovina comercial. El gel teñido con plata (A), es comparado con los correspondientes Wb para la inmunodetección de LPL utilizando los anticuerpos P66 (B) o 5D2 (C). AT III, Antitrombina III; LPL, Lipoproteína lipasa.



**Fig. 3.** Comparación del Wb en una dimensión (A) y en dos dimensiones (B) en plasma de rata utilizando P66.

## Bibliografía

- Vilella, E., Joven, J., Fernández, M., Vilaró, S., Brunzell, J. D., Olivecrona, T., and Bengtsson-Olivecrona, G. 1993. *J. Lipid Res.* 1993, 34: 1555-1564.
- Ricart-Jané, D., Cejudo-Martin, P., Peinado-Onsurbe, J., López-Tejero, M. D., and Llobera, M.. *J. Appl. Physiol.* 2005, 99: 1343-1351.

## Fragmentos de titina generados durante el proceso de elaboración de jamón curado

Mora L<sup>1</sup>, Sentandreu MA<sup>2</sup>, Koistinen KM<sup>2</sup>, Fraser PD<sup>2</sup>, Bramley PM<sup>2</sup>, Toldrá F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC). Apdo. 73, 46100. Burjassot (Valencia) España. <sup>2</sup> Centre for Chemical and Bioanalytical Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham TW20 0EX, U.K.

### Introducción

Uno de los principales cambios bioquímicos que tienen lugar durante el proceso de elaboración de jamón curado es la degradación de las proteínas musculares, que es más acusada durante los últimos cuatro meses del proceso de curado (V. Larrea et al., 2006). Por otra parte, la titina es una proteína muscular que se encuentra formando parte de la estructura del sarcómero y es responsable de la elasticidad de las miofibrillas durante los ciclos de contracción y extensión muscular.

### Material y métodos

Se tomaron 25 g de músculo *Biceps femoris* de una pieza de jamón curado y se realizó su extracción y posterior desproteinización. 5mL del extracto obtenido se fraccionaron por medio de cromatografía de exclusión molecular en una columna Sephadex G-25. Las fracciones correspondientes a un mayor tamaño molecular se concentraron e inyectaron en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución con una columna Nucleosil C18 (250 x 4.6 mm) y un colector de fracciones automático. Las fracciones 41-44 se combinaron y con ellas se realizó una segunda

separación con un gradiente más lento y colección manual de picos. La determinación de las masas moleculares se realizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Reflex III (Bruker Daltonics) en modo positivo y empleando el ácido 2,5-dihidroxibenzoico como matriz. La identificación de los péptidos más relevantes se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a un sistema de espectrometría de masas tándem con detector de tiempo de vuelo API QStar Pulsar i (Applied Biosystems/MDS-SCIEX) y la interpretación de los espectros se realizó utilizando el algoritmo MASCOT.

### Resultados

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la intensa degradación proteica que tiene lugar durante la elaboración de jamón curado. En este trabajo se han identificado por primera vez los cuatro fragmentos de titina (O97771) que se describen en la tabla 1.

Según estudios previos, la degradación de proteínas miofibrilares durante el proceso de curado podría ser debida a la actividad de las catepsinas, las cuales son bastante estables y permanecen activas durante todo el proceso de curado (Toldrá et al., 1997).