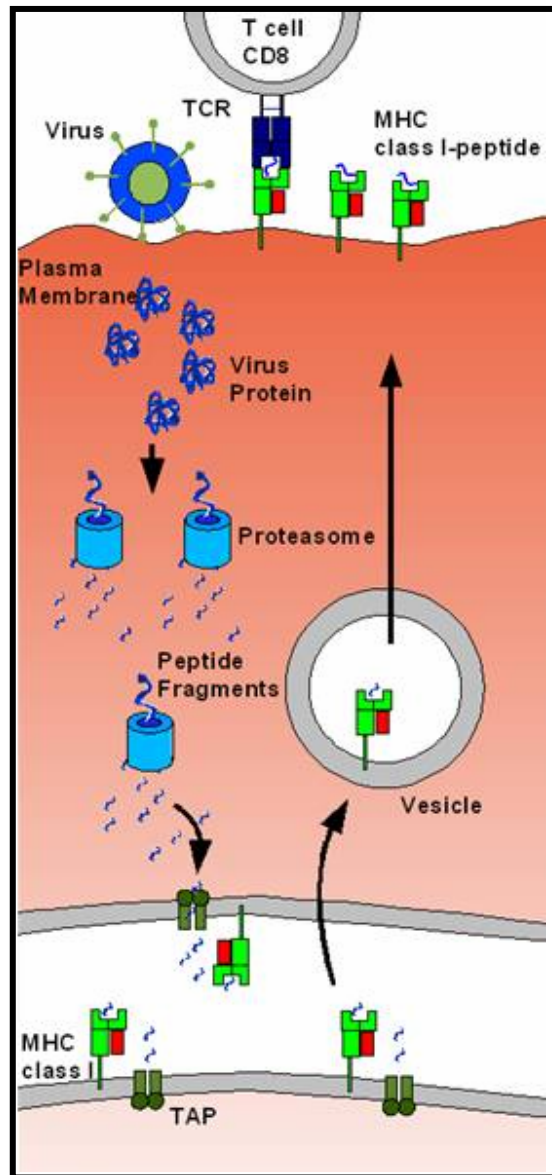


VÍAS DE PROCESAMIENTO INDEPENDIENTES DE TAP DE ANTÍGENOS DE VACCINIA



VÍA CLÁSICA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO



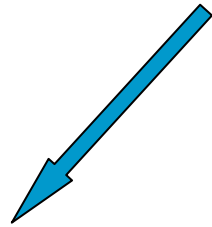
- Los productos ribosomales defectivos (DRIPs) poliubiquitinilados provenientes de proteínas celulares o de origen patogénico son los principales sustratos del proteasoma.
- Algunos de los productos de degradación del proteasoma son transportados desde el citosol hasta el RE, a través de la proteína TAP donde posteriormente se ensamblan con moléculas de MHC de clase I.
- Dichos complejos péptido-MHC se transportan a la superficie celular mediante vesículas exocíticas, donde quedan accesibles a los linfocitos T CD8⁺.

PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA INDEPENDIENTE DE TAP

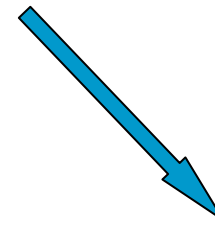
- Individuos con mutaciones en TAP presentan una severa reducción de la expresión de HLA de clase I con infecciones bacterianas crónicas aunque sin infecciones víricas remarcables.
- Los modelos de células deficientes en TAP también presentan una importante reducción de la expresión de MHC de clase I en la membrana celular.
- Se han descrito múltiples vías de procesamiento independientes de TAP, la mayoría de ellas además son independientes del proteasoma e involucrarían a varias proteasas diferentes.

OBJETIVOS

Identificar y caracterizar epítomos de vaccinia presentados independientemente de TAP

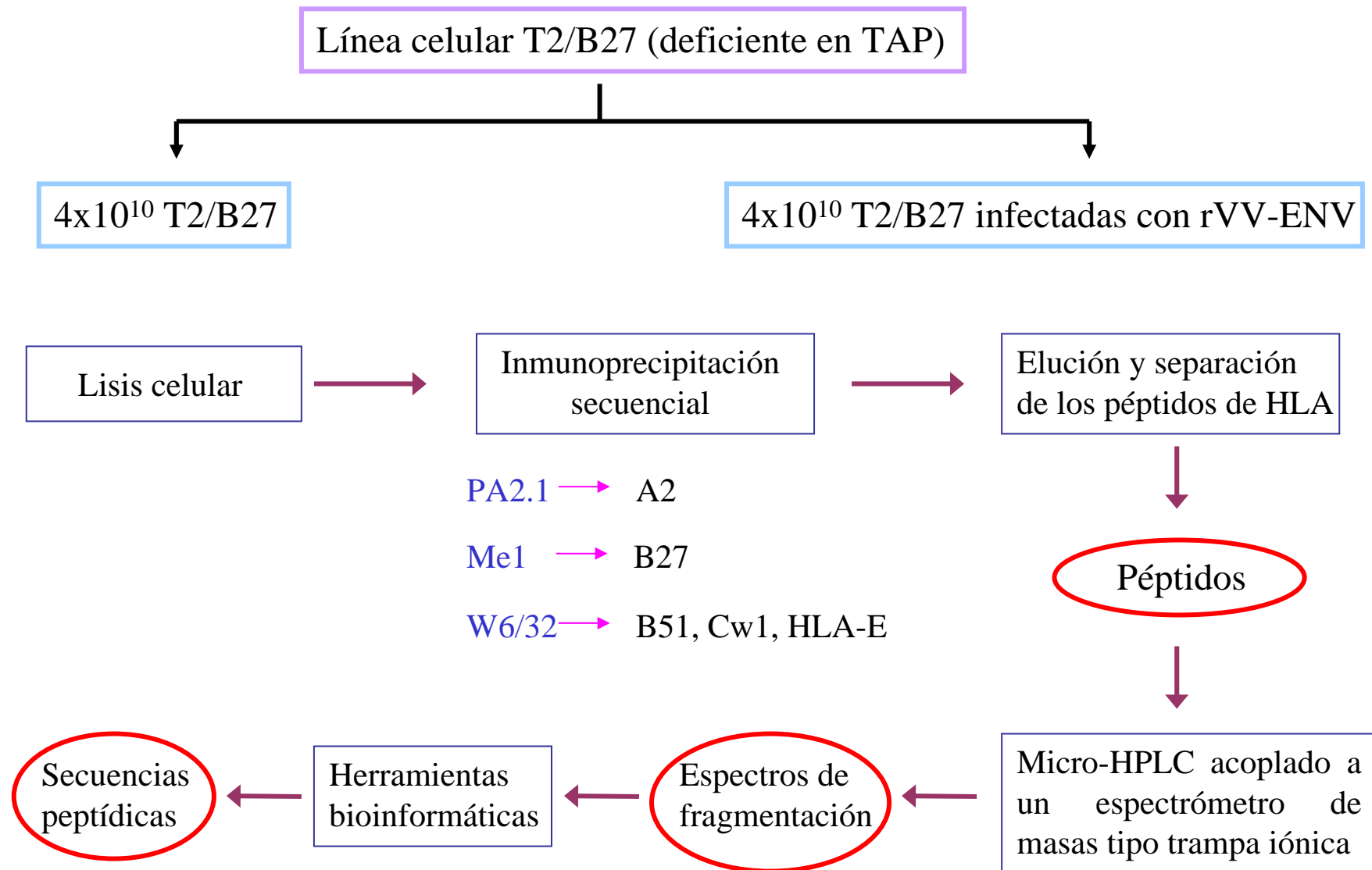


Inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masas de los péptidos unidos a HLA.

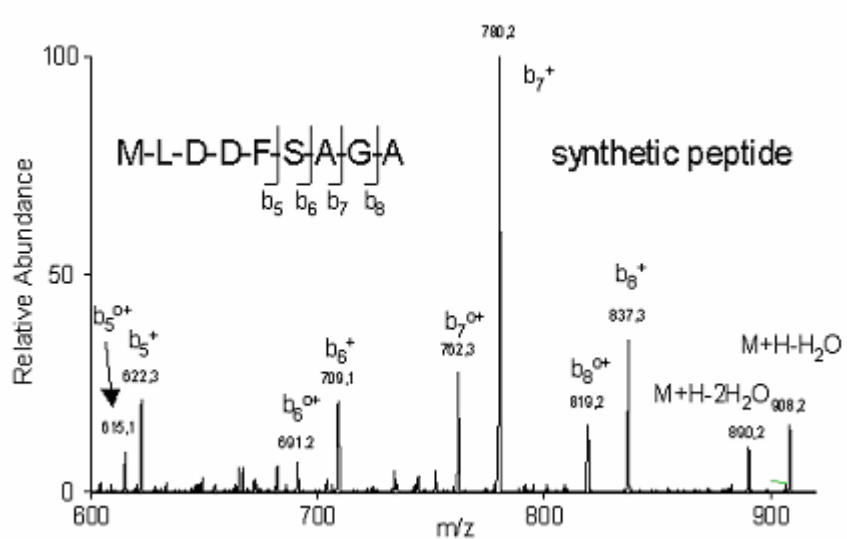
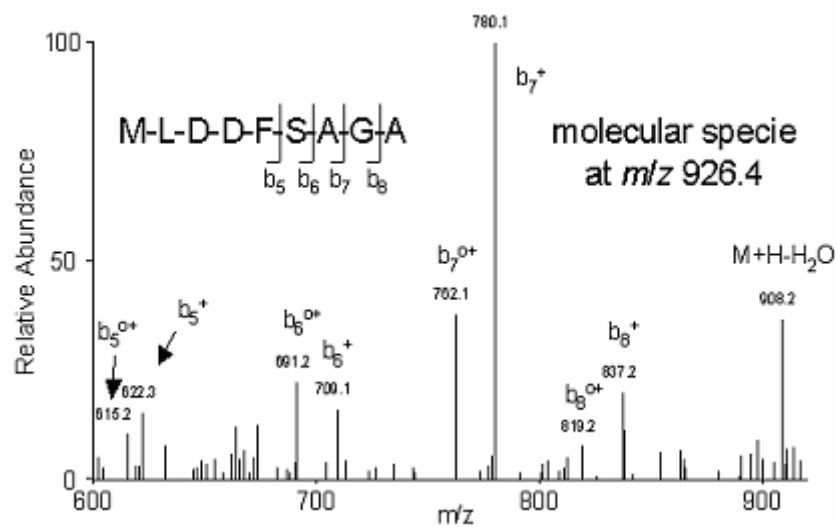
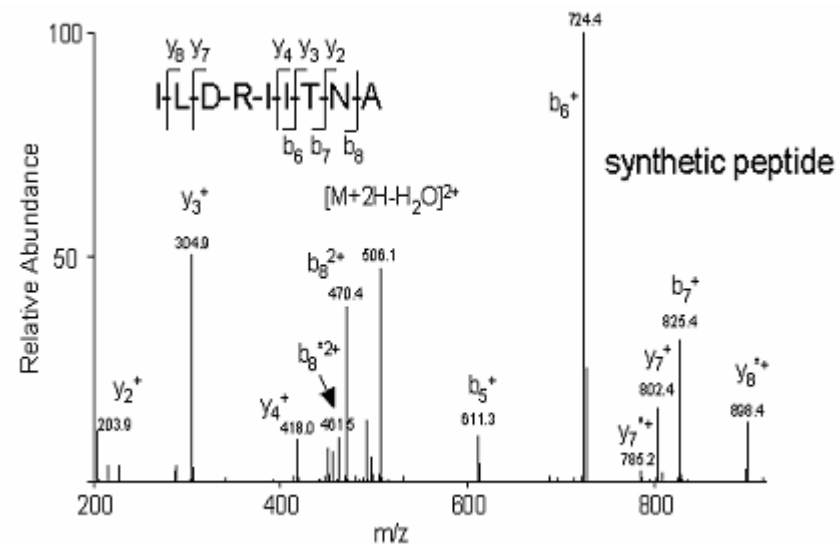
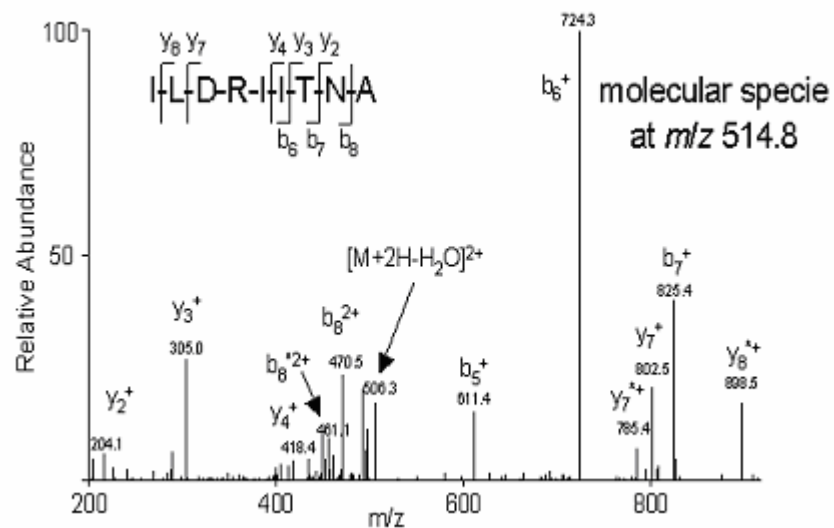


Generación de líneas de CTLs y ensayos de activación con células infectadas en presencia de inhibidores de proteasas.

INMUNOPRECIPITACIÓN DE LOS PÉPTIDOS UNIDOS A HLA



EPÍTOPOS DE VACCINIA INDEPENDIENTES DE TAP PRESENTADOS POR HLA-A2



ILDRIITNA	A10L (688-696)	Major core protein 4a
MLDDFSAGA	A17L (9-17)	IMV membrane protein

A10L 661 afknnlsrfi esgditgedi fcampynild **riitnag** | tct vsigdmldni ttqsdcmtn 720

A17L 1 msylryynml **ddfsag** | **ag** | vl dkdlfteeqq qsfmpkdggm mqndyggmnd ylgifknndv 60

Ansarah-Sobrinho C. 2004

Proteasas vaccinia:

I7L: cistein-proteasa

G1L: metaloproteasa

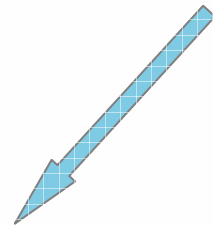


Sitio de corte AG-X

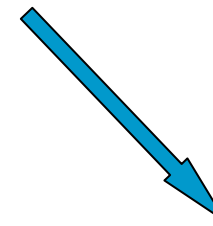


OBJETIVOS

Identificar y caracterizar epítomos de vaccinia presentados independientemente de TAP

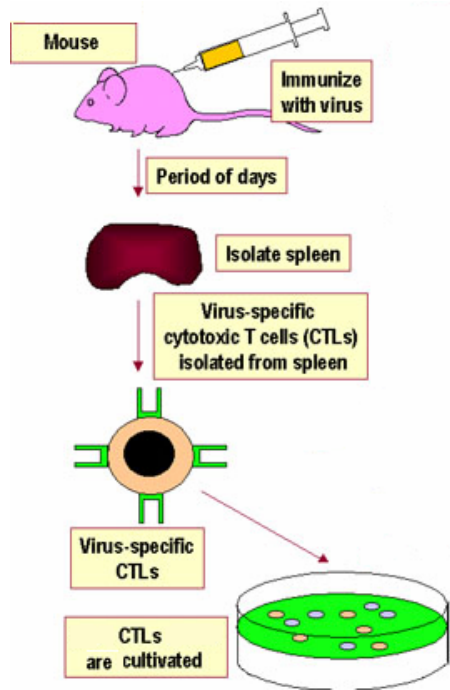


Inmunoprecipitación y análisis por espectrometría de masas de los péptidos unidos a HLA.



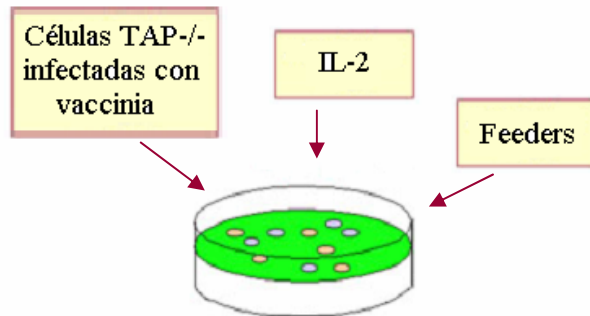
Generación de líneas de CTLs y ensayos de activación con células infectadas en presencia de inhibidores de proteasas.

OBTENCIÓN DE CTLs ESPECÍFICOS DE CÉLULAS DEFICIENTES EN TAP INFECTADAS CON VACCINIA

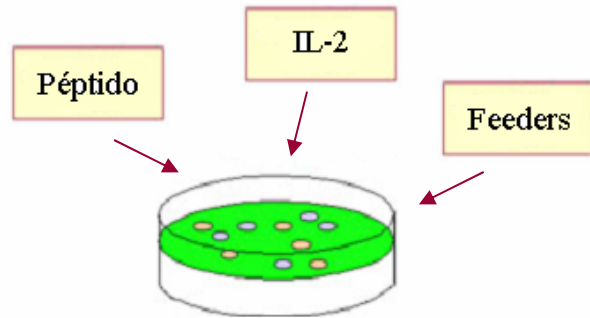


Epítomos de CTLs presentados por HLA-B7 descritos previamente

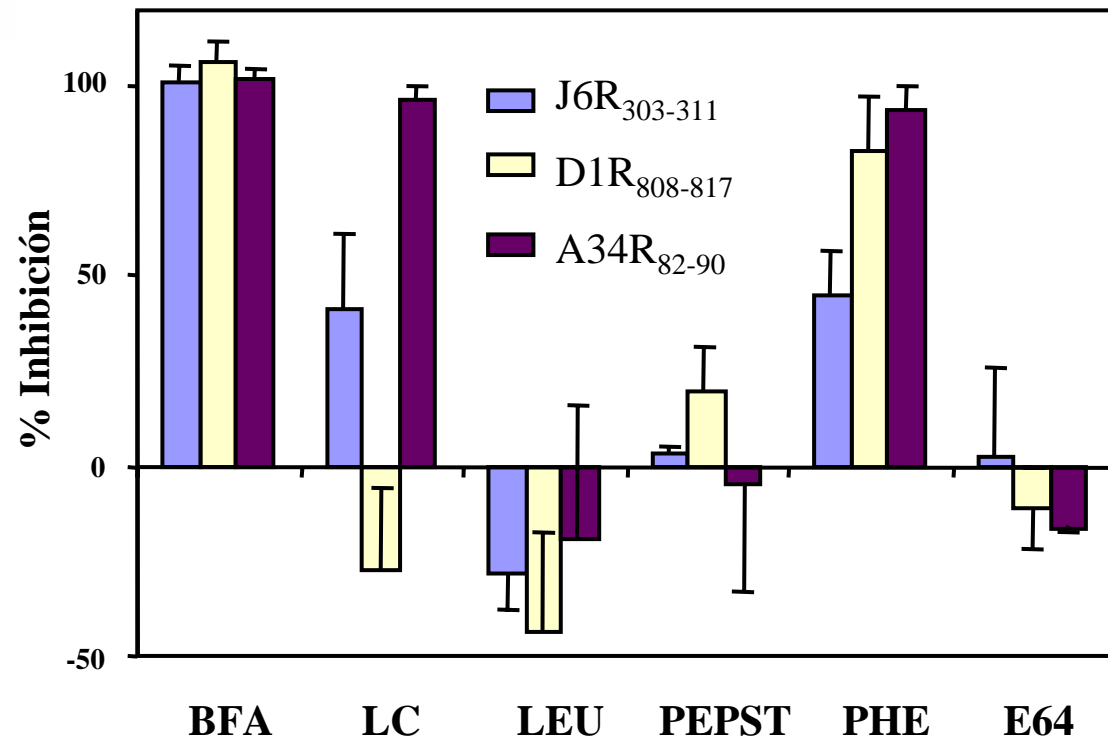
Péptido	Secuencia	% CD8 que responden
F4L (6-14)	APNPNRFVI	0,1 ± 0,2 En humanos inmunizados Oseroff et al. (2005)
C1L (102-111)	KPKPAVRFAI	
D1R (686-694)	HPRHYATVM	
J6R (303-311)	MPAYIRNTL	0,9 ± 0,4
J2R (116-124)	KPFNNILNL	-0,3 ± 0,3 En ratones transgénicos Pasquetto et al. (2005)
A34R (82-90)	LPRPDTRHL	
D1R (808-817)	RPSTRNFFEL	



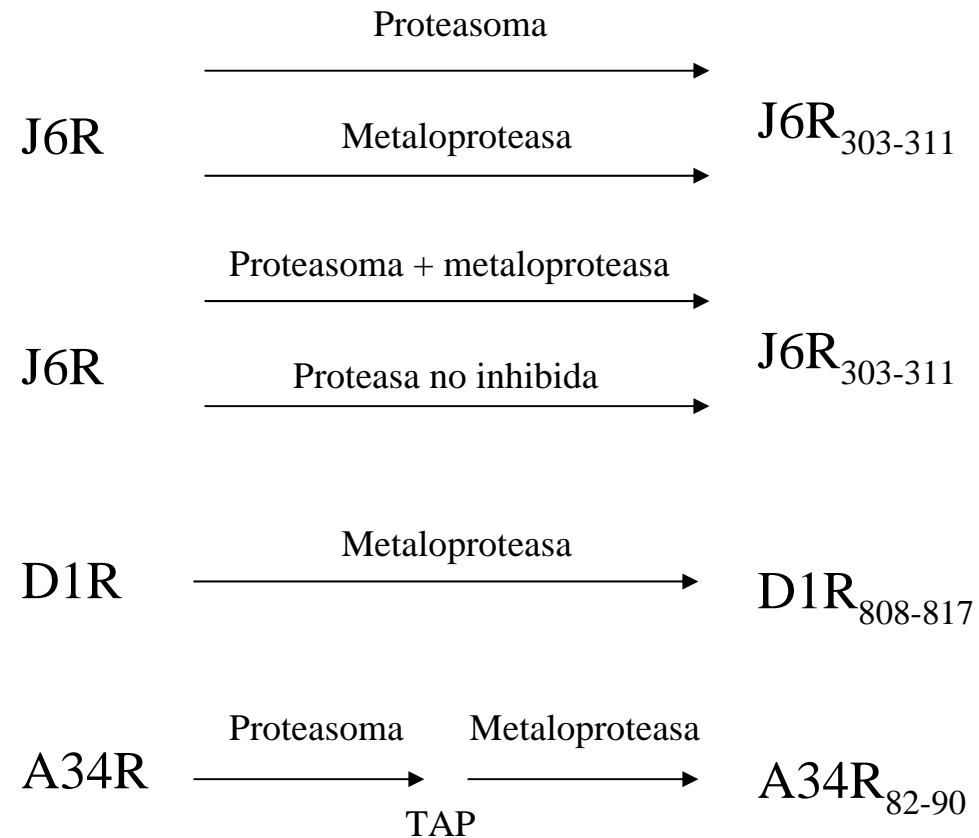
ENSAYOS CON INHIBIDORES DE PROTEASAS



INHIBIDOR	ESPECIFICIDAD
BFA	Ruta exocítica
LC	Proteasoma
LEU	Proteasas tipo tripsin- y cistein-proteasas
PEPST	Aspártico-proteasas
PHE	Metalo-proteasas y caspasa-1
E64	Cistein-proteasas



PROBABLES VÍAS DE PROCESAMIENTO DE LOS DISTINTOS EPÍTOPOS HLA-B7



CONCLUSIONES

- Se han identificado los dos primeros ligandos de HLA TAP-independientes del virus vaccinia: A17L₉₋₁₇ y A10L₆₈₈₋₆₉₆ presentados por HLA-A2.
- Los epítomos D1R₈₀₈₋₈₁₇ y J6R₃₀₃₋₃₁₁ presentados por HLA-B7 pueden procesarse por vías que implica una o varias metaloproteasas.

Diferentes péptidos virales de vaccinia pueden presentarse por vías alternativas asociados a los alelos HLA-A2 y –B7.