

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis del plegamiento anómalo de HLA-B27 y su papel en  
la patogenia de la espondilitis anquilosante**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Sheila Ezquerro Blasco**

Directora

**Begoña Galocha Iragüen**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**ANÁLISIS DEL PLEGAMIENTO ANÓMALO  
DE HLA-B27 Y SU PAPEL EN LA PATOGENIA  
DE LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE**

**SHEILA EZQUERRA BLASCO**

**DIRECTORA: BEGOÑA GALOCHA IRAGÜEN**

**MADRID, 2017**





Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en la Unidad de Inmunología Viral del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, bajo la dirección de la Dra. Begoña Galocha Iragüen.

Tutor: Dr. Javier Lacadena García-Gallo



*A mis abuelos y mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

Quien me iba a decir que este momento llegaría... desde luego yo no era esa persona. Comencé esta andadura con mucha ilusión, una enfermedad tan cercana merecía mi atención y aunque esta ilusión se fue perdiendo por el camino, ahí estabais vosotros dándome el aliento para seguir el arduo camino. Si después de todo el esfuerzo este momento ha llegado, es gracias a vuestro apoyo, sobre todo en aquellos momentos en los que una solo veía las nubes negras y no los claros.

A todos los compañeros del laboratorio que hicisteis esta etapa más enriquecedora y feliz... GRACIAS. A Carmen por aconsejarme siempre, enseñarme la forma de trabajar y transmitirme tu alegría cada día, a Concha por abrirme otras perspectivas y por todos tus sabios consejos, a Elena por ser una gran compañera y mejor amiga, a Barri por estar siempre dispuesto a ayudar y por enseñarme siempre cosas nuevas, también de ámbito cultural, a Adriana por darme ánimos y toda la alegría que transmites, a Daniel por su inspiradora forma de transmitir la ciencia, a Fernando por su apoyo y ser un gran compañero aunque fuera poco tiempo, a Manolo por su colaboración cada vez que surgía un problema, a Miki por toda su paciencia con los problemas informáticos que iban surgiendo, a Laura por aconsejarme siempre y animarme a seguir y a Pilar por apoyar este proyecto y animarme a conseguirlo.

En especial quiero agradecer a Bego por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo a su lado. He aprendido mucho de ti, no solo a nivel profesional sino también personal. Gracias por todo tu esfuerzo para que esta tesis saliera adelante. Me llevo una gran amiga.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia por todo su cariño y comprensión. A mi hermano, por cuidarme desde que era un bebé y enseñarme el camino. A Lourdes por escucharme siempre que lo he necesitado y su apoyo con el inglés. A mi chico Pablo, gracias por acompañarme en este camino en todo momento, por sacarme siempre una sonrisa, por tu apoyo incondicional y por hacerme tan feliz. A mis padres... ¡MUCHAS GRACIAS POR TODO! Por estar siempre ahí, por no dejarme abandonar este camino, por animarme a seguirlo y por darme la oportunidad de hacer lo que realmente me gusta.

A todos los que confiaron y creyeron en mí... ¡GRACIAS!



# ANÁLISIS DEL PLEGAMIENTO ANÓMALO DE HLA-B27 Y SU PAPEL EN LA PATOGENIA DE LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE



*Memoria para optar al título oficial de Doctora en  
Ciencias presentada por:*

**Sheila Ezquerro Blasco**

Licenciada en Biología y Bioquímica

Directora **Dra. Begoña Galocha Iragüen**

Científica Titular del ISCIII

Centro Nacional de Microbiología

Madrid, 2017



# ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.....	1
II.	RESUMEN .....	7
1	Análisis del plegamiento anómalo de HLA-B27 y su papel en la patogenia de la espondilitis anquilosante. ....	9
III.	SUMMARY .....	11
1	HLA-B27 misfolding and its role in ankylosing spondylitis pathogenesis.....	13
IV.	INTRODUCCIÓN.....	15
1	Sistema inmunitario y discriminación entre lo propio y lo extraño.....	17
2	Estructura y función de las moléculas de MHC de clase I.....	17
3	Ruta de procesamiento y presentación de antígenos por MHC de clase I.....	18
4	Espondiloartropatías y los antígenos de histocompatibilidad de clase I.....	21
4.1	HLA-B27 y su asociación a espondiloartropatías.....	21
4.2	Subtipos de HLA-B27: asociación diferencial a la EA y especificidad peptídica.....	22
4.3	HLA-B14 y su asociación a enfermedad.....	23
5	Hipótesis patogénicas.....	23
5.1	Hipótesis del péptido artritogénico.....	23
5.2	Hipótesis del plegamiento anómalo de HLA-B27.....	25
5.3	Hipótesis de la modulación de la respuesta inmunitaria por la expresión en superficie de HC libre y homodímeros.....	27
5.4	Otras hipótesis.....	27
6	Vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD).....	28
6.1	Módulo de reconocimiento y marcaje de sustratos.....	29
6.2	Módulo de inicio de la retrotranslocación.....	33
6.3	Módulo de ubiquitinación.....	34
6.4	Módulo de dislocación.....	37
6.5	Módulo de transporte al proteasoma.....	38
6.6	Módulo del proteasoma.....	39
7	Mecanismos de evasión viral mediados por US2 y US11.....	39
V.	OBJETIVOS.....	43
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1	Líneas celulares y transfectantes.....	49
2	Anticuerpos.....	50
3	Inmunoprecipitación y Western Blot.....	52
4	Marcaje metabólico e inmunoprecipitación.....	53
5	Citometría de flujo (FACS).....	54

VII.	<b>RESULTADOS</b>	55
1	Análisis de la interacción de HLA-B27 con la maquinaria de la vía de ERAD.	57
1.1	Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a la calnexina.	57
1.2	Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de reconocimiento y marcaje de sustratos de la vía de ERAD.	58
1.3	Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de inicio de la retrotranslocación de la vía de ERAD.	59
1.4	Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de ubiquitinación de la vía de ERAD.	60
1.5	Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de dislocación de la vía de ERAD.	61
1.6	Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de la vía de ERAD de transporte al proteasoma.	63
2	Generación de transfectantes estables de las proteínas virales US2 o US11 en células C1R que expresan los distintos subtipos de HLA-B27.	63
3	Modulación de la expresión de HLA-B27 en presencia de US2 y US11.	65
4	Ineficiencia de la vía de ERAD, en presencia de los productos virales US2 y US11, para eliminar las cadenas pesadas mal plegadas de los subtipos de HLA-B27 asociados a enfermedad.	67
VIII.	<b>DISCUSIÓN</b>	71
1	Ensamblaje de HLA-B27.	74
2	ERAD y HLA-B27.	74
3	Degradación mediada por los productos virales US2 y US11.	76
4	Papel del polimorfismo en las posiciones 114 y 116.	77
5	IL-23 y patogenia de la EA.	78
IX.	<b>CONCLUSIONES</b>	81
X.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	85

## **I. ABREVIATURAS**



## ABREVIATURAS

<b>AAA</b>	ATPasas Asociadas con diversas Actividades celulares
<b>ABC</b>	<i>ATP Binding Cassette</i>
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>ATF6</b>	<i>Activating transcription factor 6</i>
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>AUP1</b>	Proteína ubicua antigua 1
<b>BAG6</b>	BCL2 Associated Athanogene 6
<b>BiP</b>	Proteína de unión a cadena pesada de inmunoglobulina
<b>β<sub>2</sub>m</b>	Beta-2-microglobulina
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>C1R</b>	Hmy2-C1R
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	ADN complementario
<b>CHOP</b>	<i>C/EBP homologous protein</i>
<b>CNX</b>	Calnexina
<b>COPII</b>	<i>Coat protein complex II</i> – Complejo proteico de revestimiento
<b>CRISPR</b>	Repeticiones palindrómicas cortas intercaladas agrupadas regularmente
<b>CRT</b>	Calreticulina
<b>CTL</b>	Linfocito T citotóxico
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DRiPs</b>	Productos defectivos de la síntesis ribosomal
<b>EA</b>	Espondilitis anquilosante
<b>EDEM</b>	Proteína tipo α-manosidasa que mejora la degradación del RE
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ERAD</b>	Degradación asociada al retículo endoplásmico
<b>ERAP</b>	Aminopeptidasa asociada al retículo endoplásmico
<b>ERdj</b>	Proteína DNAJ del RE
<b>ERManI</b>	α-1,2-manosidasa I del RE
<b>ERp57</b>	Tiol disulfuro oxidoreductasa ERp57
<b>FACS</b>	Selección de células activadas por fluorescencia
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>GRP94</b>	Proteína regulada por glucosa 94
<b>HC</b>	Cadena pesada

<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>Hrd1</b>	HMG-CoA Reductase Degradation 1
<b>HRP</b>	<i>Horse radish peroxidase</i> – peroxidasa de rábano
<b>Hsp</b>	<i>Heat shock protein</i>
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IRE1</b>	<i>Inositol-requiring enzyme 1</i>
<b>KIR</b>	<i>Killer cell immunoglobulin like receptor</i>
<b>LMP2</b>	<i>Latent membrane protein 2</i>
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>NEF</b>	Factor intercambiador de nucleótidos
<b>NF-κB</b>	Factor nuclear κB
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NLS</b>	<i>Nuclear localization signal</i>
<b>NMS</b>	Suero normal de ratón
<b>Npl4</b>	Proteína de localización de proteínas nucleares 4
<b>NP40</b>	Nonidet P40
<b>OR</b>	Respuesta de sobrecarga
<b>OS9</b>	Osteosarcoma amplificado 9, lectina del RE
<b>OST</b>	Oligosacaril transferasa
<b>PBS</b>	Tampón salino de fosfato
<b>PDI</b>	Proteína disulfuro isomerasa
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PERK</b>	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum</i>
<b>PLC</b>	Complejo de carga peptídico
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PNGasa</b>	Péptido N-glicosidasa
<b>PPO</b>	Difeniloxazol
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>ROR<sub>γT</sub></b>	<i>Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma T</i>
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo “ <i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i> ”
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>Sec61</b>	Proteína de transporte de proteínas Sec61
<b>SEL1L</b>	Supresor/potenciador de tipo Lin-12
<b>SFB</b>	Bacterias filamentosas segmentadas
<b>SPP</b>	Peptidasa del péptido señal
<b>STF</b>	Suero de ternera fetal
<b>TAP</b>	Transportador asociado con procesamiento antigénico
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético

<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>Th17</b>	Células T <i>helper</i> 17
<b>TM</b>	Región transmembrana
<b>TMEM129</b>	Proteína transmembrana 129
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>Tpn</b>	Tapasina
<b>TRAM1</b>	Proteína de membrana asociada a la translocación
<b>TRC8</b>	Translocación en el cáncer renal del cromosoma 8
<b>Trc35</b>	<i>Transmembrane domain recognition complex 35 kDa subunit</i>
<b>UBE2</b>	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2</i>
<b>Ube4a</b>	<i>Ubiquitin conjugation factor E4 A</i>
<b>Ubl4a</b>	<i>Ubiquitin-like protein 4A</i>
<b>UBXD8</b>	<i>UBX domain-containing protein 8</i>
<b>UFD1L</b>	Proteína homóloga 1 de degradación de fusión de ubiquitina
<b>UGGT</b>	UDP-glucosa glucosiltransferasa
<b>UPR</b>	<i>Unfolded protein response</i>
<b>VCP</b>	Proteína que contiene valosina
<b>VIMP</b>	<i>VCP-interacting membrane protein</i>
<b>VIPR1</b>	Receptor 1 del péptido intestinal vasoactivo
<b>XBP-1</b>	X-Box Binding protein 1
<b>XTP3-B</b>	<i>XTP3-transactivated protein B</i>



## **II. RESUMEN**



## **1 Análisis del plegamiento anómalo de HLA-B27 y su papel en la patogenia de la espondilitis anquilosante.**

La Espondilitis Anquilosante (EA) es una enfermedad inflamatoria crónica fuertemente asociada al antígeno leucocitario humano B27 (HLA-B27). Los subtipos de HLA-B27 se asocian de forma diferencial a EA. B\*27:02, B\*27:04 y B\*27:05 se asocian fuertemente, B\*27:07 se asocia aunque no siempre y B\*27:06 y B\*27:09 no se asocian o lo hacen débilmente. Existen varias hipótesis que tratan de explicar el mecanismo que subyace a la asociación de esta molécula con la enfermedad. Este trabajo se basa en la hipótesis del plegamiento anómalo de la molécula de HLA-B27. Esta molécula tiende a plegarse mal y se acumula en el retículo endoplásmico (RE). Esto genera respuestas de estrés que conducen a la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-23 que produce inflamación en las entesis. La vía de degradación asociada al RE (ERAD) debería ser capaz de eliminar las moléculas de B27 mal plegadas del RE. ERAD consiste en el reconocimiento y marcaje de proteínas mal plegadas, su retrotranslocación al citosol, su deglicosilación, ubiquitinación y transporte al proteasoma para su degradación. Nos planteamos analizar en qué paso se interrumpe la vía de ERAD en los subtipos asociados a enfermedad y describir las vías de ERAD que se asocian a B27 mediante la susceptibilidad a la degradación mediada por las proteínas del citomegalovirus humano, US2 y US11, que utilizan la maquinaria de ERAD para eliminar la cadena pesada de los antígenos de clase I del RE.

Hemos demostrado que todos los subtipos de HLA-B27, asociados o no a enfermedad, se pliegan, en distinto grado, de forma anómala. B\*27:05 y B\*27:02 son los subtipos que peor se pliegan y unen mayor cantidad de calnexina en un intento de plegarse correctamente. El subtipo asociado B\*27:04 se pliega mejor y une menos calnexina. Las moléculas de HLA-B27 mal plegadas son reconocidas y marcadas por la maquinaria de ERAD (BiP y EDEM1). B\*27:02 y B\*27:05 unen mayor cantidad de BiP y EDEM1 que B\*27:04, indicando que este último se pliega de modo más eficiente. Ninguno de los subtipos de HLA-B27 analizados se unen a OS9, pero si se unen a SEL1L y a la Derlina-1. B\*27:02 y B\*27:05 unen mayor cantidad de SEL1L y Derlina-1 que B\*27:04, indicando de nuevo, que el plegamiento de B\*27:04 es más eficiente. OS9 probablemente no participa en la degradación de HLA-B27. Otra proteína no identificada podría ejercer el papel de OS9 y transferir las proteínas mal plegadas a SEL1L que a su vez debería transferirlas a Hrd1. A partir de la Derlina-1, una proteína implicada en la retrotranslocación, los subtipos de HLA-B27 no interactúan con la maquinaria de ERAD.

Además, los subtipos asociados a EA no son sensibles a la degradación mediada por US2 o US11, excepto B\*27:07, que además reduce su expresión en superficie. El subtipo no asociado B\*27:06 es sensible a la degradación mediada por US11, disminuyendo su expresión en superficie, pero no por US2. US2 y US11 no son capaces de eliminar las cadenas pesadas de los subtipos asociados a enfermedad.

En conclusión, no existe ninguna asociación entre plegamiento anómalo y enfermedad. Existe un gradiente de mal plegamiento entre los subtipos de B27 analizados. ERAD no es capaz de eliminar las moléculas mal plegadas de HLA-B27. El bloqueo se produce en la transferencia de las cadenas pesadas mal plegadas a la E3 ligasa de membrana Hrd1. Existe una correlación entre la presencia de ácido aspártico en la posición 116 de los subtipos asociados a enfermedad y la resistencia a la degradación mediada por US11. La presencia de tirosina en la posición 116 en B\*27:06 y B\*27:07 se correlaciona con la dislocación mediada por US11.

Estos hallazgos podrían suponer nuevas aproximaciones terapéuticas, fomentando la acción de la E3 ligasa de ubiquitina Hrd1, como se está haciendo actualmente patologías neurodegenerativas.

### **III. SUMMARY**



## **1 HLA-B27 misfolding and its role in ankylosing spondylitis pathogenesis.**

Ankylosing Spondylitis (AS) is a chronic inflammatory disease which is strongly associated with the human leukocyte antigen B27 (HLA-B27). HLA-B27 subtypes are differentially associated with AS. B\*27:05, B\*27:04 and B\*27:02 are strongly associated with AS, B\*27:07 is associated but not always and B\*27:06 and B\*27:09 are not associated. There are several hypotheses trying to explain the mechanism that underlies this association. This work is based on the HLA-B27 misfolding hypothesis. This molecule tends to misfold and as a result of misfolding, it accumulates in the endoplasmic reticulum (ER). This generates stress responses that lead to the release of proinflammatory cytokines such as IL-23 that produces enthesitis. The ER associated degradation pathway (ERAD) should be able to eliminate the misfolded B27 heavy chains from the ER. ERAD encompasses recognition and labelling of misfolded proteins, retrotranslocation to the cytosol, its deglycosylation, ubiquitination and transport to the proteasome for degradation. We aimed to analyse each step of the ERAD pathway, in order to know in which step this pathway is blocked in AS-associated subtypes, and to describe the ERAD pathways that are associated to HLA-B27 in the context of US2 and US11 mediated degradation. The human cytomegalovirus products, US2 and US11 hijack the cellular machinery that operates on endogenous misfolded proteins, the ERAD pathway. They induce a rapid dislocation of newly synthesized class I heavy chains.

We have demonstrated that all HLA-B27 subtypes analysed, AS-associated or not, misfold to different degrees. B\*27:05 and B\*27:02 are the ones with the worst folding phenotype and they bind more calnexin in an attempt to correctly fold. The AS-associated subtype B\*27:04 folds better and binds less calnexin. Misfolded HLA-B27 molecules are recognised and labelled by the ERAD components BiP and EDEM1. B\*27:02 and B\*27:05 bind more BiP and EDEM1 than B\*27:04, indicating that the latter folds more efficiently. None of the HLA-B27 subtypes analysed bind to OS9, but they do bind to the later components SEL1L and Derlin-1. B\*27:02 and B\*27:05 bind more SEL1L and Derlin-1 than B\*27:04, again indicating that B\*27:04 folding is more efficient. OS9 probably does not participate in HLA-B27 degradation. Another unidentified protein could play the role of OS9 and transfer misfolded proteins to SEL1L which, in turn, should transfer them to Hrd1. From Derlin-1, which is a protein involved in retrotranslocation, the interaction of HLA-B27 subtypes with the ERAD machinery is lost.

In addition, AS-associated subtypes are not sensitive to US2 or US11 mediated degradation, with the exception of B\*27:07, which interacts with those reducing its surface expression. The non-associated subtype B\*27:06 is sensitive to US11 mediated degradation decreasing its surface expression.

In conclusion, there is no association between HLA-B27 misfolding and disease. Instead, there is a misfolding gradient between the HLA-B27 subtypes. ERAD is unable to remove HLA-B27 misfolded molecules from the ER. The pathway fails or is blocked when misfolded molecules are transferred to the E3 ubiquitin ligase Hrd1. Furthermore, there is a correlation between the presence of aspartic acid at position 116 of the AS-associated subtypes and its resistance to US11 mediated degradation. A tyrosine residue at position 116 in B\*27:06 and B\*27:07 subtypes correlates with US11 mediated degradation. These findings may result in a new potential treatment of AS, by fostering the action of the E3 ubiquitin ligase Hrd1 as in other neurodegenerative diseases.



## **IV. INTRODUCCIÓN**



## 1 Sistema inmunitario y discriminación entre lo propio y lo extraño.

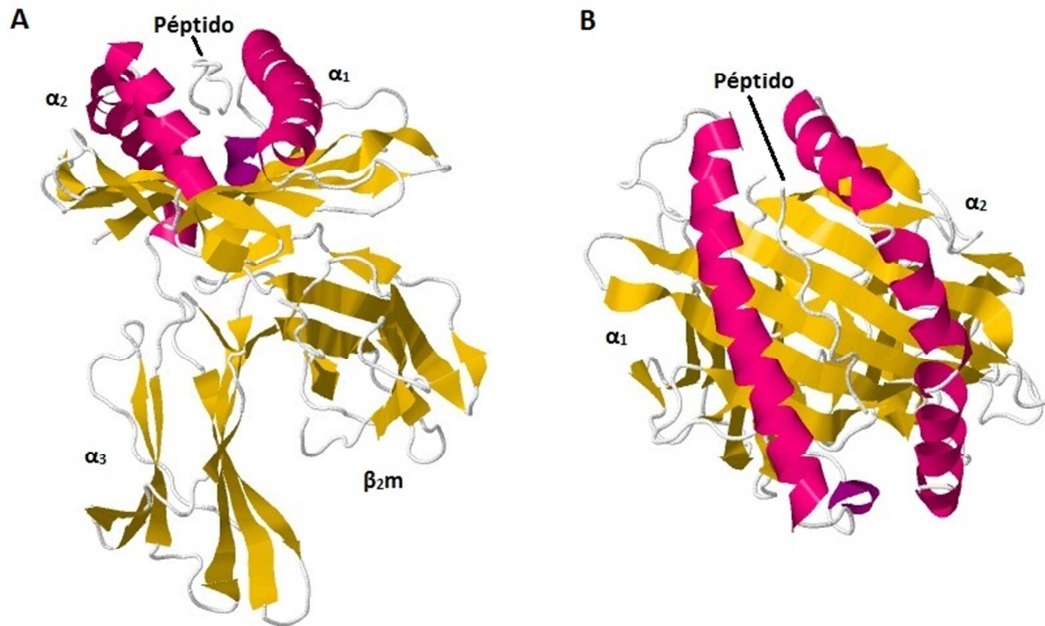
El sistema inmunitario se compone de un conjunto especializado de células y moléculas efectoras. Este sistema protege al organismo frente a agentes patógenos y sustancias perjudiciales. Para desempeñar esa tarea se coordinan múltiples mecanismos que se engloban en dos tipos de respuesta: la respuesta innata y la respuesta adquirida o adaptativa.

Los componentes de la inmunidad innata proporcionan una primera línea de defensa, poco específica, a modo de barrera de contención y estimulan a los componentes de la inmunidad adaptativa. La inmunidad adaptativa proporciona una respuesta específica, con memoria inmunológica, mediada por linfocitos B y T y amplifica los mecanismos de la inmunidad innata. Los linfocitos B se encargan de producir anticuerpos dirigidos a antígenos extracelulares. Los linfocitos T se clasifican principalmente en dos tipos: linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> reconocen a través del receptor de células T (TCR) péptidos antigénicos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y I, respectivamente. La principal función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> consiste en regular las acciones de otras células del sistema inmunitario mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son capaces de detectar patógenos intracelulares y eliminarlos mediante citotoxicidad celular.

De este modo, el sistema inmunitario es capaz de discriminar entre antígenos propios y ajenos. Esta habilidad se lleva a cabo mediante la falta de respuesta inmunológica frente a lo propio (tolerancia) y respuesta inmunológica frente a lo extraño (rechazo). Cuando se produce un fallo en la regulación de este sistema, tiene lugar una pérdida de tolerancia que genera respuestas inmunitarias dirigidas frente a antígenos propios y el desarrollo de autoinmunidad.

## 2 Estructura y función de las moléculas de MHC de clase I.

Las moléculas de MHC de clase I son glicoproteínas transmembrana tipo I que se expresan en todas las células nucleadas y están formadas por la asociación no covalente de una cadena pesada (HC, *Heavy Chain*) de aproximadamente 44 kDa, una cadena ligera denominada  $\beta_2$ microglobulina ( $\beta_2m$ ) de 12kDa y un péptido de entre 8 y 13 aminoácidos (**Figura 1A**). Estas moléculas aparecieron hace 500 millones de años [1] y están presentes en vertebrados [2]. En la especie humana, existen tres genes que codifican las moléculas de MHC de clase I denominados HLA-A, HLA-B y HLA-C [2]. HLA-A y HLA-B exhiben niveles de expresión superiores a HLA-C [3]. Cada individuo presenta de 3 a 6 moléculas de MHC de clase I diferentes. Estas moléculas presentan un gran polimorfismo alélico que es bueno para la supervivencia de la población pero no necesariamente para el individuo. Su principal función consiste en presentar péptidos endógenos en la superficie celular a linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs).



**Figura 1. Estructura molecular del MHC de clase I.** A) Vista lateral de la molécula de MHC de clase I. Se muestran los dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  de la HC, la  $\beta_2m$  y el péptido unido. B) Vista apical del sitio de unión al péptido formado por los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  y el péptido unido. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1HSA&bionumber=2> .

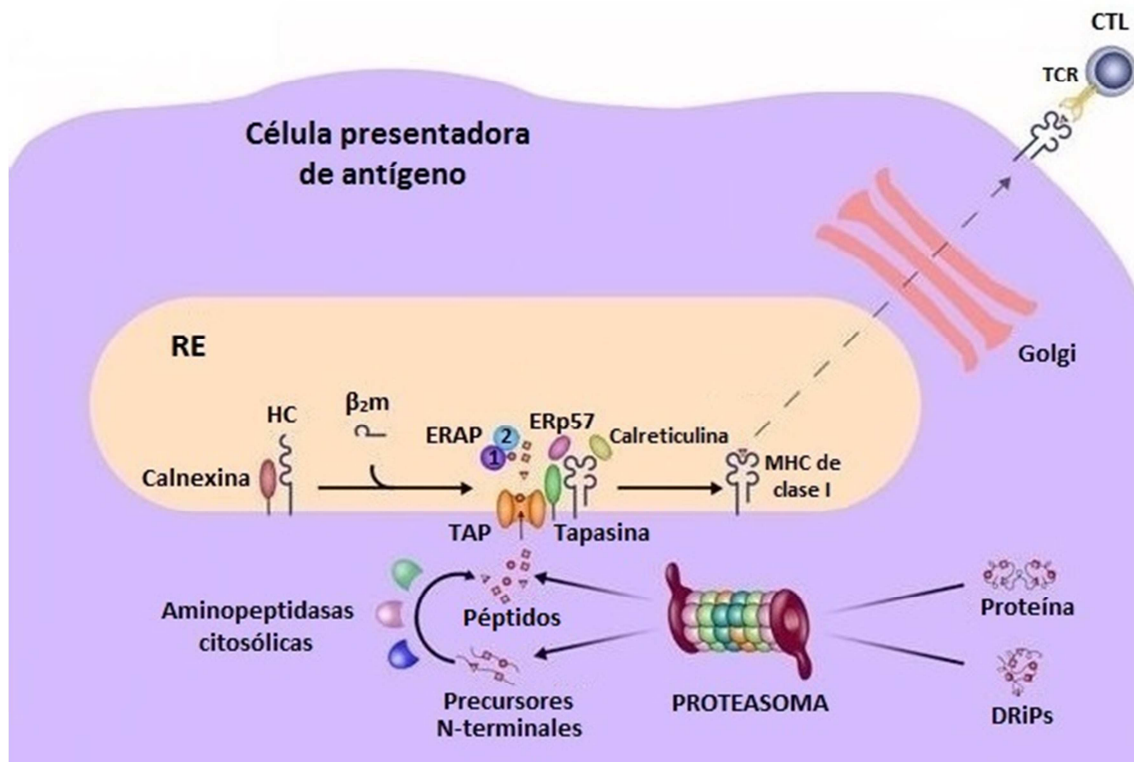
La cadena pesada consta de una región extracelular formada por tres dominios ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ), un segmento transmembrana y una región citoplasmática [4]. Los dominios  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  presentan dos puentes disulfuro conservados y relevantes para la estabilidad de la molécula [5]. El dominio  $\alpha_3$ , próximo a la membrana plasmática, y la  $\beta_2m$ , presentan una estructura similar a los dominios constantes de las inmunoglobulinas [6]. La  $\beta_2m$  es una cadena invariable que interacciona con los tres dominios de la HC [4] proporcionando estabilidad a la molécula.

El polimorfismo de estas moléculas reside fundamentalmente en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  [7, 8] y es la base de la especificidad del TCR por un péptido antigénico y un alelo particular de MHC, fenómeno conocido como restricción por MHC [1]. Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  constituyen una cavidad denominada sitio de unión de péptido cuyas dimensiones (25 Å de longitud y 12 Å de anchura) permiten alojar péptidos de entre 8 y 13 aminoácidos. Esta cavidad está formada por una hoja de 8 láminas  $\beta$  antiparalelas, pertenecientes cuatro a cada dominio, y dos hélices  $\alpha$  sobre dicha hoja, una de cada dominio (**Figura 1B**). Además, el sitio de unión de péptido presenta una serie de subcavidades (A-F) cuyas forma y composición están determinadas por las cadenas laterales de los aminoácidos que las componen [9, 10]. En estas subcavidades se acomodan las cadenas laterales de los residuos del péptido y algunas de estas posiciones son residuos de anclaje del péptido. El péptido se encuentra extendido y sus extremos N- y C-terminales interaccionan mediante puentes de hidrógeno con las subcavidades A y F, respectivamente. Los residuos de la parte central presentan mayor variabilidad y determinan la interacción con el TCR. En HLA-B27, las subcavidades C y F forman una única subcavidad denominada C/F [11] y generalmente los péptidos que une tienen arginina en posición 2 [12]. El péptido unido se considera parte integral de la molécula de MHC de clase I y le proporciona estabilidad cuando la molécula no está unida a las chaperonas [1].

### 3 Ruta de procesamiento y presentación de antígenos por MHC de clase I.

La presentación de antígenos en la superficie celular es el mecanismo que tienen las células para informar de su estado a otros tipos celulares. Esta ruta, permite a la célula

expresar constitutivamente en su superficie péptidos en el contexto del MHC de clase I, para que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> discriminen entre lo propio y lo extraño. Los péptidos presentados son una muestra de las proteínas que la célula está sintetizando o ha ingerido [1, 13]. La generación y procesamiento de los péptidos presentados por clase I ocurre en el interior celular (**Figura 2**). Los péptidos proceden del recambio natural de proteínas endógenas que son ubiquitinadas y degradadas al final de su vida útil [14]. Sin embargo, se considera que una fuente relevante de péptidos deriva de productos defectivos de la síntesis proteica (DRiPs, *Defective Ribosomal Products*) generados por el ribosoma [15-17]. En esta línea, se ha postulado la existencia de mecanismos de acoplamiento entre la síntesis proteica y la degradación por el proteasoma, que permitirían aumentar la eficiencia de la presentación de antígenos [18].



**Figura 2. Ruta de procesamiento y presentación de antígeno restringida por moléculas de MHC de clase I.** Las proteínas endógenas y los productos defectivos de su síntesis (DRiPs) son degradados a péptidos por el proteasoma. Los péptidos generados se transportan al lumen del retículo endoplásmico (RE) a través del transportador TAP, donde pueden ser recortados por las aminopeptidasas ERAP 1 y 2 antes de su unión a la molécula de clase I. Este proceso está facilitado por un complejo de carga formado por tapasina (verde), ERp57 (morado) y calreticulina (amarillo). La unión de un péptido de alta afinidad induce la disociación del complejo de carga y la molécula de MHC de clase I se exporta a la superficie celular.

El proteasoma es el principal complejo proteolítico implicado en la generación de péptidos para la presentación por MHC de clase I [19]. El proteasoma 26S se compone de una subunidad cilíndrica central denominada 20S que alberga en su interior los sitios proteolíticos activos, y dos subunidades reguladoras en los extremos denominadas 19S [20]. La subunidad 19S reconoce proteínas ubiquitinadas destinadas a degradación, elimina la ubiquitina y mediante su actividad ATPasa despliega dichas proteínas y las transloca a la subunidad 20S [2, 21]. La subunidad 20S está formada por cuatro anillos apilados a modo de barril de 7 subunidades cada uno [22]. Los anillos de los extremos se componen de 7 subunidades  $\alpha$  distintas que interaccionan con las subunidades 19S, mientras que los anillos centrales se componen de 7 subunidades  $\beta$ , tres de las cuales  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 5 corresponden a sitios catalíticos activos [22]. Bajo estímulo con interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), las subunidades catalíticas constitutivas

son reemplazadas por subunidades homologas alternativas ( $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  y  $\beta 5i$ ) formando el inmunoproteasoma [23, 24]. Estas subunidades catalíticas aportan al inmunoproteasoma una especificidad de corte distinta a la del proteasoma 26S [2, 25], generando un repertorio peptídico distinto [26]. El proteasoma define el extremo C-terminal de los péptidos [3], generando precursores con extensiones N-terminales que requieren procesamiento posterior por aminopeptidasas [27] del citosol o del retículo endoplásmico (RE) para poder ser presentados por MHC de clase I. La gran mayoría de estos precursores son hidrolizados por peptidasas citosólicas a aminoácidos [27]. Una pequeña fracción de péptidos puede ser estabilizada por chaperonas (como HsP70, *heat shock protein 70*) en el citoplasma para prevenir su rápida degradación [26].

Los péptidos generados en el citosol son transportados al RE por el transportador asociado a procesamiento de antígeno (TAP), mediante un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP. TAP es un heterodímero formado por las subunidades TAP-1 y TAP-2, que pertenece a la familia de proteínas ABC (*ATP binding cassette*) [28]. Cada subunidad presenta una región transmembrana y los dominios de unión a ATP orientados hacia el citosol [29]. El tamaño de los péptidos transportados por TAP es de entre 8 y 16 aminoácidos [3] y la eficiencia del transporte por TAP depende de la secuencia del péptido [25].

Los péptidos que logran alcanzar el RE pueden no ser del tamaño adecuado para su unión a MHC de clase I, por eso requieren ser procesados por las aminopeptidasas del RE. En humanos, se han descrito dos aminopeptidasas del RE denominadas ERAP1 [30, 31] y ERAP2 [32], ambas inducibles por interferón. Estas dos aminopeptidasas tienen funciones complementarias y están asociadas físicamente formando heterodímeros [33]. ERAP1 procesa péptidos de 9 a 16 aminoácidos de forma eficiente, es lenta procesando péptidos de mayor longitud y poco activa con péptidos de menor longitud [34]. Según el modelo de regla molecular, ERAP1 reconoce el extremo C-terminal del péptido mediante un bolsillo hidrofóbico y recorta el extremo N-terminal del péptido en su sitio activo, que se localiza espacialmente a 9 o más residuos de distancia [34]. De este modo, ERAP1 genera péptidos de entre 8 y 9 residuos, adecuados para la presentación por MHC de clase I [31].

En el RE, los péptidos se unen a moléculas de MHC de clase I que se están sintetizando mediante un proceso de carga asistida. La cadena pesada (HC) del MHC de clase I se inserta cotraduccionalmente en la membrana del RE a través del translocón Sec61 [35]. La HC es modificada por la acción de la oligosacaril transferasa (OST) mediante la adición covalente de glicanos pre-ensamblados con la estructura de tres glucosas, nueve manosas y dos residuos de N-acetilglucosamina ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) en residuos de asparagina (Asn) dentro de la secuencia aceptora N-X-S/T (X no puede ser prolina) [36]. La deglucosilación de los glicanos por las  $\alpha$ -glucosidasas I y II permite a la glicoproteína asociarse con una chaperona de tipo lectina denominada calnexina (CNX) que favorece el plegamiento y ensamblaje de la HC a la  $\beta_2m$  [37, 38]. La calnexina es una proteína presente en la membrana del RE que monitoriza tanto los glicanos unidos en N ( $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) como las regiones desplegadas de la proteína naciente [39]. La unión de la  $\beta_2m$  a la HC libera a la CNX que es sustituida por otra chaperona de tipo lectina soluble denominada calreticulina (CRT) [40]. Estas dos chaperonas interactúan de forma transitoria con sustratos N-monoglucosilados formando un andamiaje que facilita su plegamiento oxidativo ayudadas por el reclutamiento, a través de dominios ricos en prolina, de la tiol-disulfuro óxido reductasa ERp57 que media la formación de puentes disulfuro [25, 38, 41]. El heterodímero HC- $\beta_2m$  parcialmente plegado unido a CRT es reclutado al complejo de carga peptídico (PLC). El PLC está formado por la CRT, ERp57, la tapasina (Tpn) y TAP [25].

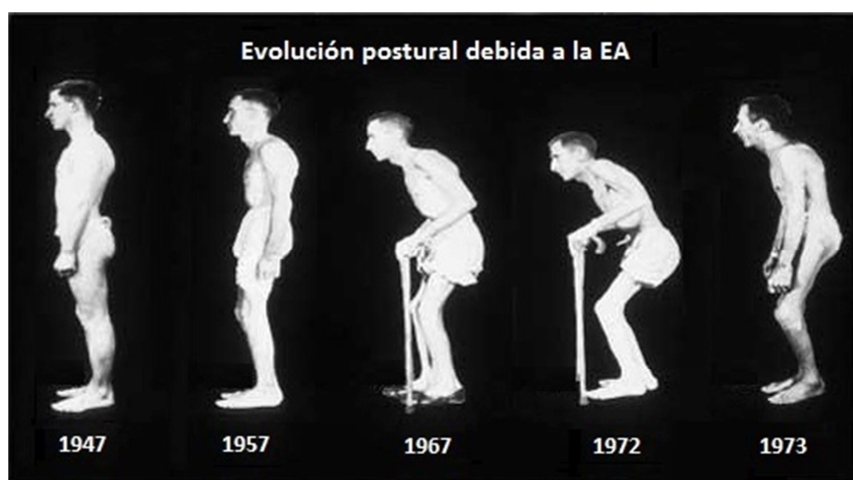
ERp57 forma un enlace disulfuro muy estable con la tapasina y recluta moléculas de MHC de clase I al PLC [13]. La tapasina estabiliza la molécula de MHC de clase I vacía interactuando con la HC y selecciona péptidos de alta afinidad [25] proporcionados por TAP. El PLC contribuye al ensamblaje del péptido a la molécula de MHC de clase I, optimizando la carga de péptidos de alta afinidad [25]. Tras la liberación de la HC/ $\beta_2m$ /péptido del ciclo CNX/CRT, la  $\alpha$ -glucosidasa II elimina la glucosa final creando el sustrato no glucosilado [42]. Las proteínas que no adquieren su conformación nativa son reglucosiladas por la glicoproteína UDP-glucosa glucosiltransferasa (UGGT) y se vuelven a unir a CNX/CRT para someterse a rondas de plegamiento oxidativo [36].

La unión de un péptido de alta afinidad induce la disociación de la molécula de MHC de clase I del PLC y la molécula se exporta desde el RE en vesículas recubiertas por la proteína COPII [25] hacia la vía secretora constitutiva. En su paso por el Golgi se completa la maduración de la molécula, adquiriendo azúcares complejos (ácido siálico). Posteriormente la molécula se dirige a la membrana plasmática para presentar péptidos a las células T CD8<sup>+</sup>.

## 4 Espondiloartropatías y los antígenos de histocompatibilidad de clase I.

### 4.1 HLA-B27 y su asociación a espondiloartropatías.

La posesión del antígeno leucocitario humano B27 (HLA-B27) está fuertemente asociada con el desarrollo de la espondilitis anquilosante (EA) [43]. Sin embargo, el mecanismo por el cual esta molécula predispone a la enfermedad no está claro. La espondilitis anquilosante pertenece a un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas denominadas espondiloartropatías, que incluye a las artritis reactivas [12] (**Figura 3**). Esta enfermedad se desarrolla en la entesis o zona de inserción de los tendones, ligamentos o capsulas articulares al hueso. La EA afecta fundamentalmente a la columna vertebral y a las articulaciones sacroilíacas, aunque también puede afectar a las articulaciones periféricas e incluso presentar otras manifestaciones como la uveítis aguda, la psoriasis o inflamación del intestino entre otras [44]. Se caracteriza por inflamación crónica de las zonas implicadas y un desequilibrio en la homeostasis del hueso hacia la neoformación patológica de hueso, que conduce a la anquilosis o fusión de los componentes articulares [45, 46]. El comienzo de la EA suele ser antes de los 40 años y es más frecuente en hombres [44]. Se estima que un 16% del riesgo genético corresponde a HLA-B27 [47].



**Figura 3. Espondilitis Anquilosante.** Enfermedad inflamatoria crónica que afecta a las articulaciones, principalmente al esqueleto axial, mediante un proceso de osteogénesis que conduce a la anquilosis. Se muestra el cambio postural de un individuo con EA durante un periodo de 26 años. Figura modificada a partir de [48].

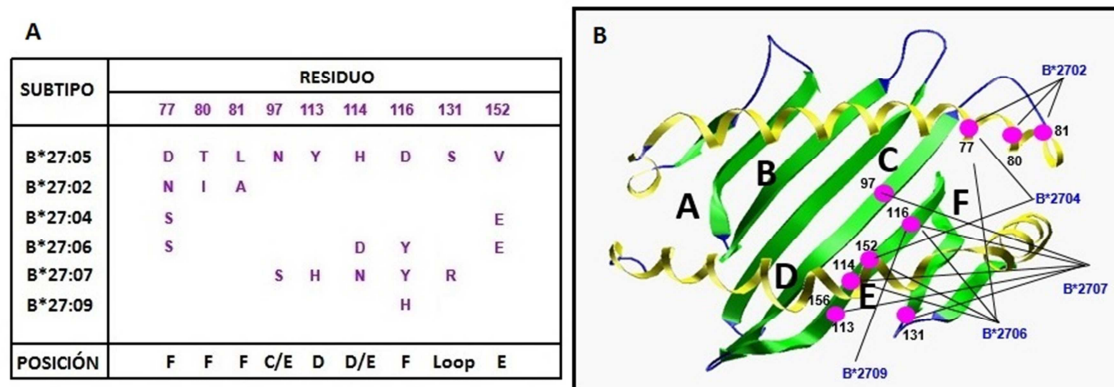
El alelo HLA-B27 está ampliamente distribuido y existe una estrecha correlación entre la presencia de ciertos subtipos de este alelo en la población y la prevalencia de la EA [49]. Aproximadamente el 90% de los pacientes con EA son HLA-B27 positivos y se ha observado que ratas transgénicas para HLA-B27 desarrollan una enfermedad similar a la EA [50] que depende de los niveles de expresión de HLA-B27 [51]. En individuos HLA-B27 positivos, la incidencia de la enfermedad es del 2% y en el caso de presentar antecedentes de EA en la historia familiar, la incidencia asciende al 20% [52]. Esto sugiere que la presencia de HLA-B27 no es determinante y que otros genes podrían estar implicados en el desarrollo de la EA.

Recientemente se han descrito otros genes que aumentan la susceptibilidad a padecer EA, entre ellos IL23R y ARTS1 [53]. El gen IL23R codifica para el receptor de la citoquina IL-23 presente en células T helper 17 (Th17) y contribuye al riesgo genético en un 9%. El gen ARTS1 codifica para ERAP1, implicada en el procesamiento de los péptidos que se unen a MHC de clase I y contribuye al riesgo genético en un 26%, en individuos HLA-B27 positivos. Además, se han encontrado determinados polimorfismos de ERAP2 que también se asocian a la EA en individuos HLA-B27 positivos y negativos [54].

#### **4.2 Subtipos de HLA-B27: asociación diferencial a la EA y especificidad peptídica.**

Hasta el momento, se han descrito 161 subtipos de HLA-B27 [55] con diferencias en el sitio de unión de péptido, que derivan de un ancestro común, probablemente HLA-B\*27:05, puesto que es el más ampliamente distribuido y el más frecuente en la población caucásica [56]. La mayoría de los subtipos de HLA-B27 son extremadamente raros, algunos descritos en un solo individuo, no pudiendo, por tanto, determinarse su relación con la EA [57]. En cambio, entre los subtipos de HLA-B27 más comunes se ha observado que se asocian de modo diferencial a la EA. Los subtipos B\*27:02, B\*27:04, B\*27:05 y B\*27:07 se asocian al desarrollo de la enfermedad [58, 59], aunque en el caso de B\*27:07 se ha descrito una excepción en la población grecochipriota, en la cual este subtipo no se asocia a enfermedad [60]. Por su parte, los subtipos B\*27:06 y B\*27:09 no se asocian a la enfermedad o lo hacen de forma débil [61, 62].

Todos los subtipos de HLA-B27 comparten aminoácidos comunes dentro del bolsillo B, lo que condiciona una fuerte preferencia por arginina en la posición 2 del péptido unido [12]. Además otro residuo de anclaje entre los subtipos de HLA-B27 es la posición omega del péptido. Los residuos que diferencian a los subtipos de HLA-B27 más comunes se muestran en la **Figura 4**. B\*27:09 difiere del subtipo B\*27:05 asociado a enfermedad solamente en el residuo 116, donde el ácido aspártico se sustituye por histidina [56]. El subtipo B\*27:06 difiere del subtipo asociado B\*27:04 en los residuos 114 y 116; la histidina en la posición 114 se sustituye por ácido aspártico y el ácido aspártico en posición 116 por tirosina [56]. Estas sustituciones se encuentran en las cavidades D/E y F de la hendidura de unión al péptido [56].



**Figura 4. Polimorfismo de HLA-B27.** A) Diferencias en los residuos del sitio de unión de péptido entre los subtipos más comunes de HLA-B27 y B) Localización de los residuos que diferencian a los subtipos de HLA-B27 más comunes en las cavidades del sitio de unión al péptido.

El extremo C-terminal del péptido se ancla en la subcavidad C/F de HLA-B27, pero este anclaje no está tan conservado. Se ha descrito que los subtipos B\*27:04 y B\*27:05 se caracterizan por un aumento en la flexibilidad conformacional del sitio de unión al péptido en comparación a los subtipos B\*27:06 y B\*27:09 [63, 64]. B\*27:05 une péptidos con residuos C-terminales básicos, alifáticos y aromáticos [65]. B\*27:04 une con mayor frecuencia péptidos con residuos C-terminales alifáticos que básicos, debido posiblemente a la ausencia de Asp77 [66]. B\*27:06 y B\*27:09 muestran una alta restricción por péptidos con residuos C-terminales no polares [67] posiblemente debido a la ausencia de Asp116 [66]. B\*27:09 une péptidos con residuos alifáticos y Phe (aromático) [66]. Los subtipos asociados a la EA unen péptidos con Tyr C-terminal a excepción de B\*27:07, que además muestra preferencia por residuos C-terminales no polares, como los subtipos no asociados, en lugar de básicos [67]. Estas diferencias en las propiedades de unión de péptidos entre los diferentes subtipos de HLA-B27, podrían estar relacionadas con la asociación diferencial a la EA.

### 4.3 HLA-B14 y su asociación a enfermedad.

En poblaciones africanas, donde la presencia del alotipo HLA-B27 es rara, se ha determinado que el alotipo B\*14:03 está fuertemente asociado a la EA [68]. El alotipo B\*14:02, que une péptidos con Arg en posición 2 [69], tiene una amplia distribución poblacional y no se asocia a enfermedad. B\*14:02 difiere del alotipo B\*14:03 únicamente en la posición 156 (Leu en B\*14:02 y Arg en B\*14:03). El mecanismo que subyace a la asociación diferencial a enfermedad en estos alotipos con diferencias en un único residuo también se desconoce.

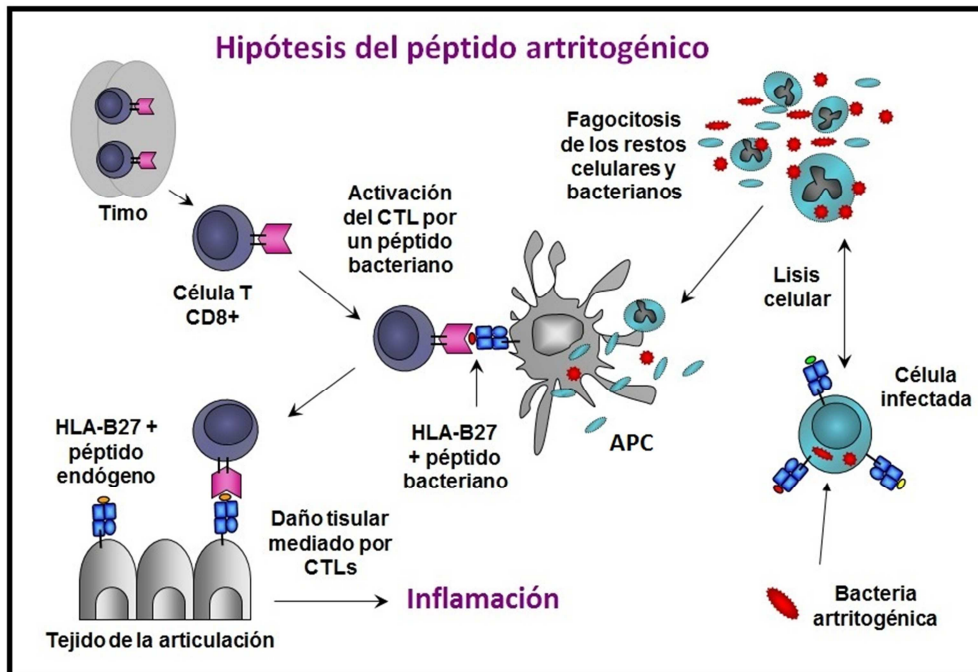
## 5 Hipótesis patogénicas.

La investigación actual sobre la patogenia de la espondilitis anquilosante en base a su asociación con HLA-B27, se desarrolla fundamentalmente en el marco de tres hipótesis patogénicas que se describen a continuación.

### 5.1 Hipótesis del péptido artrítogénico.

La hipótesis del péptido artrítogénico se basa en la propiedad de la molécula de HLA-B27 de presentar antígenos a los CTLs y en el concepto del mimetismo molecular entre un péptido exógeno y un péptido propio. HLA-B27 podría unir un péptido proveniente de proteínas bacterianas o víricas, activar la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que a su vez podría

reaccionar de forma cruzada, debido al mimetismo antigénico, con proteínas propias, rompiendo así la tolerancia y generando daño tisular e inflamación [52] (**Figura 5**). En apoyo de esta hipótesis se ha demostrado la presencia, en líquido sinovial de pacientes con la EA, de células T CD8<sup>+</sup> autoreactivas, que reconocen *in vitro* péptidos bacterianos restringidos por HLA-B27 [70].



**Figura 5. Hipótesis del péptido artrítico.** El mimetismo molecular entre péptidos propios y péptidos bacterianos podría desencadenar una respuesta cruzada contra células propias mediada por CTLs. Una bacteria artrítica infecta una célula humana induciendo su lisis. La fagocitosis de los restos celulares y bacterianos por células presentadoras de antígeno (APCs) permite la presentación de péptidos bacterianos por HLA-B27 a CTLs. Debido al mimetismo molecular, los CTLs activados pueden responder frente a células propias generando daño tisular e inflamación.

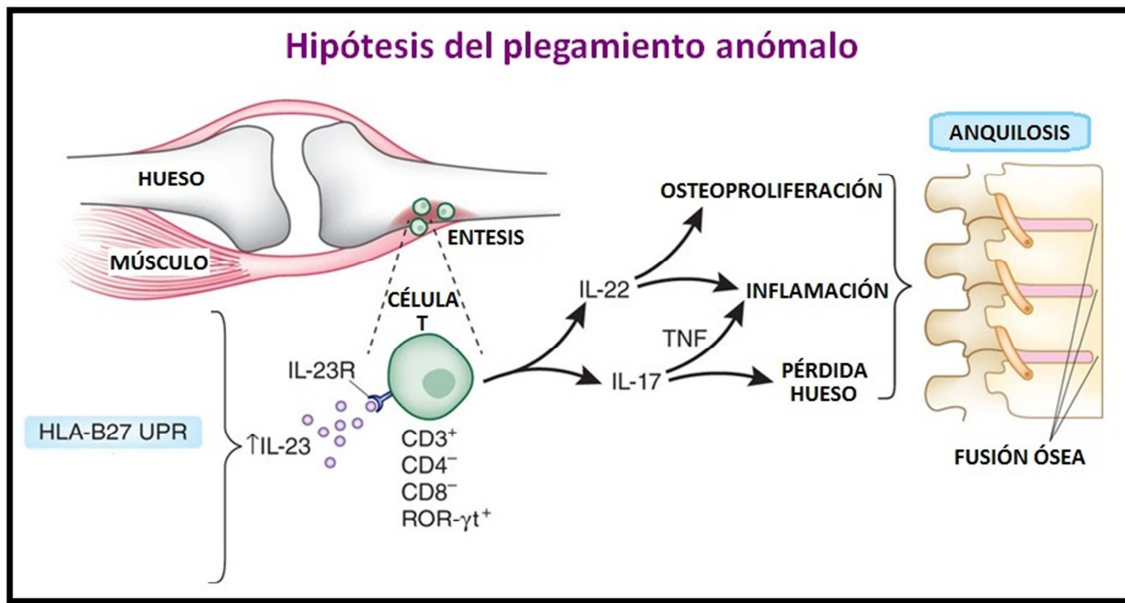
En la búsqueda del péptido artrítico, se demostró que HLA-B27 presenta un péptido derivado de la región intracitoplásmica de la propia molécula de HLA-B27, con gran homología con proteínas de *Chlamydia trachomatis*. Este péptido es presentado de forma constitutiva por tres de los subtipos asociados a la EA (B\*27:02, B\*27:04, B\*27:05), pero no por los subtipos no asociados a enfermedad (B\*27:06 y B\*27:09) [71]. Además, la expresión de proteínas de *Chlamydia trachomatis* en células humanas HLA-B27 positivas, permitió identificar péptidos bacterianos procesados y presentados de forma endógena por HLA-B27, que presentan mimetismo molecular con proteínas humanas, posibles ligandos de HLA-B27 [72, 73].

También se han descrito células T autoreactivas, restringidas por HLA-B27, frente a un péptido de la proteína LMP2 del virus de Epstein-Barr, que presenta alta homología con péptidos endógenos y frente a un péptido propio derivado del receptor 1 del péptido intestinal vasoactivo VIPR1 [74].

Sin embargo, hasta el momento no se ha podido constatar la existencia de péptidos artríticos. Además, el desarrollo de la artritis inflamatoria asociada a HLA-B27 en un modelo animal de ratas transgénicas para HLA-B27, es independiente de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> [75].

## 5.2 Hipótesis del plegamiento anómalo de HLA-B27.

Esta hipótesis se basa en las propiedades biológicas de la molécula de HLA-B27, independientemente de su capacidad como molécula presentadora de antígeno. La hipótesis del plegamiento anómalo sugiere que el mal plegamiento de la HC de HLA-B27, podría inducir estrés del RE y activar la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *unfolded protein response*) y la respuesta de sobrecarga (OR, *overload response*), que mediante la activación de NF- $\kappa$ B desencadenaría la liberación de citoquinas proinflamatorias, produciendo inflamación (Figura 6).



**Figura 6. Hipótesis del plegamiento anómalo.** La acumulación de homodímeros de cadenas pesadas de HLA-B27 en el RE produce estrés en el RE y desencadena la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La UPR induce la expresión de IL-23, que estimula a una población de células T residentes en la entesis. Estas células producen citoquinas proinflamatorias que inducen inicialmente pérdida de hueso y posteriormente inflamación y osteoproliferación, generando la anquilosis de las articulaciones afectadas. Figura modificada a partir de [76].

HLA-B\*27:05, posiblemente debido a la estructura de su bolsillo B, se pliega de forma lenta y anómala, acumulándose su HC libre en el RE [77]. Además, la eficiencia de plegamiento de los distintos subtipos de HLA-B27 está determinada por el efecto global de sus residuos polimórficos también fuera del bolsillo B y muestra una correspondencia incompleta con la EA [78]. B\*27:02, B\*27:04 y B\*27:05 se pliegan de un modo ineficiente, mientras que B\*27:06 y B\*27:09 se pliegan con alta eficiencia. B\*27:07 se comporta como los subtipos no asociados a la EA [78]. La eficacia de plegamiento se correlaciona con la naturaleza del residuo 116, pero el efecto de este residuo depende del contexto estructural en el que se sitúa [78]. También se ha descrito que la HC de HLA-B27 forma homodímeros durante el proceso de plegamiento y ensamblaje, implicando a las Cys67 [79], Cys101 y Cys164 [80, 81]. Los homodímeros de HLA-B27 muestran una vida media prolongada y parecen ser resistentes a la degradación [82]. Las posiciones 114 y 116 de la HC de HLA-B27 pueden afectar a la exposición de las cisteínas y a su reactividad [83]. Los residuos del bolsillo F pueden afectar a la formación de dímeros, a la asociación a chaperonas y a las tasas de maduración de los diferentes subtipos [84]. En concreto, se ha descrito que la tirosina en la posición 116, sola o junto con un residuo de ácido aspártico en la posición 114 (B\*27:06), aumenta la velocidad de ensamblaje e inhibe la dimerización de HLA-B27 [84]. ERp57 no parece influir en el proceso de dimerización [84]. En un modelo de ratas transgénicas para HLA-B27, los homodímeros de HLA-B27 son más propensos a formarse, se unen a la chaperona BiP y esto se correlaciona con la incidencia de

enfermedad [85]. También se ha sugerido que los polimorfismos de ERAP1 asociados con la EA, podrían generar péptidos de menor afinidad, conducir al mal plegamiento del MHC de clase I, aumentando así la capacidad de HLA-B27 de dimerizar y potencialmente sobrecargar la maquinaria celular de degradación asociada al RE (ERAD) [82]. Además, se ha observado que la dislocación de la HC de HLA-B27 es ineficiente y ERAD no puede evitar su acumulación en el RE [78].

La acumulación de proteínas mal plegadas en el RE puede perturbar la homeostasis del RE, desencadenar estrés celular e inducir la UPR y la respuesta de sobrecarga. La UPR consiste en un conjunto de vías de señalización. En vertebrados, existen tres proteínas sensores de estrés en el RE denominadas IRE1, PERK y ATF6 que promueven mecanismos destinados a aliviar el estrés. Las proteínas activadas por los distintos mecanismos operan en ERAD, en la reducción de la afluencia de proteínas al RE y en el plegamiento de proteínas, entre otras funciones [86]. PERK está implicado en la atenuación de la síntesis de proteínas, limitando así la carga de proteínas. ATF6 promueve la sobreexpresión de genes que codifican para chaperonas residentes en el RE y que asisten el plegamiento, como BiP, CNX, CRT y la disulfuro isomerasa PDI [42]. Por su parte, IRE1 activa el factor de transcripción XBP-1, que a su vez induce la expresión de factores que facilitan ERAD (EDEMs) [42]. La señalización de la UPR refleja la intensidad del estrés y cuando el estrés del RE no se mitiga y la homeostasis no es restaurada, la UPR desencadena la apoptosis [86].

La respuesta de sobrecarga consiste en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, mediante la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y la producción de intermediarios reactivos de oxígeno a consecuencia de la acumulación de proteínas en la membrana del RE [87]. NF- $\kappa$ B induce la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 y IL-6 [88]. En ratas transgénicas para HLA-B27 se observó que la activación de la UPR en macrófagos derivados de médula ósea, se producía debido a la acumulación de cadenas pesadas mal plegadas [89, 90], y esto se correlacionaba con un aumento en la producción de IL-23 y la activación de células Th17 [91]. En células dendríticas, la bacteria *Chlamydia trachomatis* puede desencadenar la activación del factor de transcripción inducido por estrés del RE CHOP (*C/EBP homologous protein*) que a su vez, puede inducir la expresión de IL-23 [92]. IL-23 induce la expansión de células Th17 productoras de IL-17 [93]. Cuando la IL-17 se expresa de forma crónica en localizaciones inapropiadas promueve la inflamación y la destrucción del cartílago y hueso mediante la inducción de citoquinas (TNF) en distintos tipos de células (macrófagos, dendríticas, condrocitos y osteoblastos) [94]. Las células Th17 producen además otras citoquinas proinflamatorias como IL-6, TNF, IL-22 y IL-21 [94]. En un estudio reciente, se observó que la IL-23 por si sola es suficiente para el desarrollo de una enfermedad parecida a las espondiloartropatías en ratones, promoviendo la expresión de IL-17 e IL-22 en células T  $\text{CD3}^+$   $\text{CD4}^-$   $\text{CD8}^-$   $\text{ROR}_{\gamma\text{T}}$  residentes en las entesis [95]. En otro estudio, se observó que HLA-B27 promueve la osteoclastogénesis en monocitos derivados de médula ósea de ratas transgénicas para HLA-B27 [96]. Además, en macrófagos derivados de pacientes con la EA hay una sobreexpresión significativa de HLA-B27, de los genes de la UPR (BiP, CHOP y XBP1) y de IL-23 [97].

Sin embargo, otros estudios argumentan en contra de esta hipótesis como mecanismo patogénico en la EA. En el modelo animal de ratas transgénicas para HLA-B27, la introducción de copias adicionales de gen humano de la  $\beta_2\text{m}$  reduce el mal plegamiento de HLA-B27, pero aumenta la severidad de la espondilitis [98]. En otro estudio reciente se ha observado que el mal plegamiento de HLA-B27 en células derivadas del intestino de pacientes con EA, el

aumento de IL-23 está mediado por la autofagia en lugar de por la UPR [99]. Además, los polimorfismos de ERAP1 asociados a la EA no alteran el estrés del RE en pacientes con EA [100]. Sin embargo, en otro estudio se han encontrado niveles altos de la proteína GRP78/BiP en macrófagos de las articulaciones periféricas de pacientes con EA [101].

### **5.3 Hipótesis de la modulación de la respuesta inmunitaria por la expresión en superficie de HC libre y homodímeros.**

La hipótesis de los homodímeros de superficie se basa en la inusual capacidad de la molécula de HLA-B27 de formar homodímeros de HC en la superficie celular tras la disociación de la  $\beta_2m$  durante el reciclamiento endosomal [102]. En la formación de estos homodímeros están implicadas cisteínas libres como la Cys67. En humanos, estos homodímeros pueden ser reconocidos por receptores como KIR3DL1 y KIR3DL2, presentes en una subpoblación de células T y en células NK [103]. La interacción de los homodímeros con KIR3DL2 puede tener efectos proinflamatorios, induciendo la expresión de IL-17 [104]. Sin embargo, esta hipótesis no explicaría la asociación diferencial a la EA de los subtipos de HLA-B27, debido a que todos ellos presentan cisteínas libres como la Cys67, con capacidad para formar homodímeros.

### **5.4 Otras hipótesis.**

#### **5.4.1 Disbiosis microbiana e inflamación aumentada del intestino.**

En casi la mitad de los pacientes con la EA aparece inflamación gastrointestinal subclínica aguda o crónica [105]. Esta hipótesis propone que HLA-B27 altera el microbioma del intestino y este hecho, podría ser la base de la predisposición a esta enfermedad en sujetos HLA-B27 positivos [106]. Algunos autores sugieren que el microbioma alterado produciría un aumento en la permeabilidad del intestino, lo cual permitiría la fuga de productos bacterianos potencialmente artritogénicos, sobre los cuales, HLA-B27 podría ejercer un papel importante [107].

Las ratas transgénicas para HLA-B27 criadas en un ambiente libre de gérmenes no desarrollan la enfermedad inflamatoria en las articulaciones o el intestino [108]. En otro estudio, con ratones criados en un ambiente libre de gérmenes, la colonización intestinal con bacterias filamentosas segmentadas (SFB, *Segmented Filamentous Bacteria*) fue suficiente para inducir el desarrollo de artritis [109]. Posteriormente, el estudio de la composición del microbioma gastrointestinal, en ratas transgénicas para HLA-B27, demostró la presencia de un microbioma cecal distinto en dichas ratas, con aumento de *Prevotellaceae* y *Bacteroides* y disminución de *Rikenellaceae* [110]. Al mismo tiempo, otro estudio describió una colonización bacteriana diferente del íleon terminal, en un número reducido de pacientes con la EA que mostraba un aumento de 5 familias de bacterias (*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae* y *Bacteroidaceae*) y una disminución de dos familias de bacterias (*Veillonellaceae* y *Prevotellaceae*) [111]. También se ha descrito un aumento en la permeabilidad intestinal en ratas transgénicas para HLA-B27 y en pacientes con EA [107].

Recientemente, se ha descrito un control recíproco entre la microbiota del intestino y la inflamación autoinmune [112]. Las bacterias SFB regulan el desarrollo de células Th17 en el tracto gastrointestinal y la señalización a través del receptor de IL-17, regula la abundancia de la microbiota y de SFB al promover la expresión de factores antimicrobianos [112]. Además, se ha observado que en presencia de la microbiota intestinal, el íleon terminal produce de forma constitutiva citoquinas proinflamatorias como la IL-23 [113]. Otros autores sugieren que estas citoquinas podrían verse al torrente sanguíneo y promover la enfermedad [114]. A pesar de la notable evidencia de un papel relevante de la microbiota en el desarrollo de inflamación,

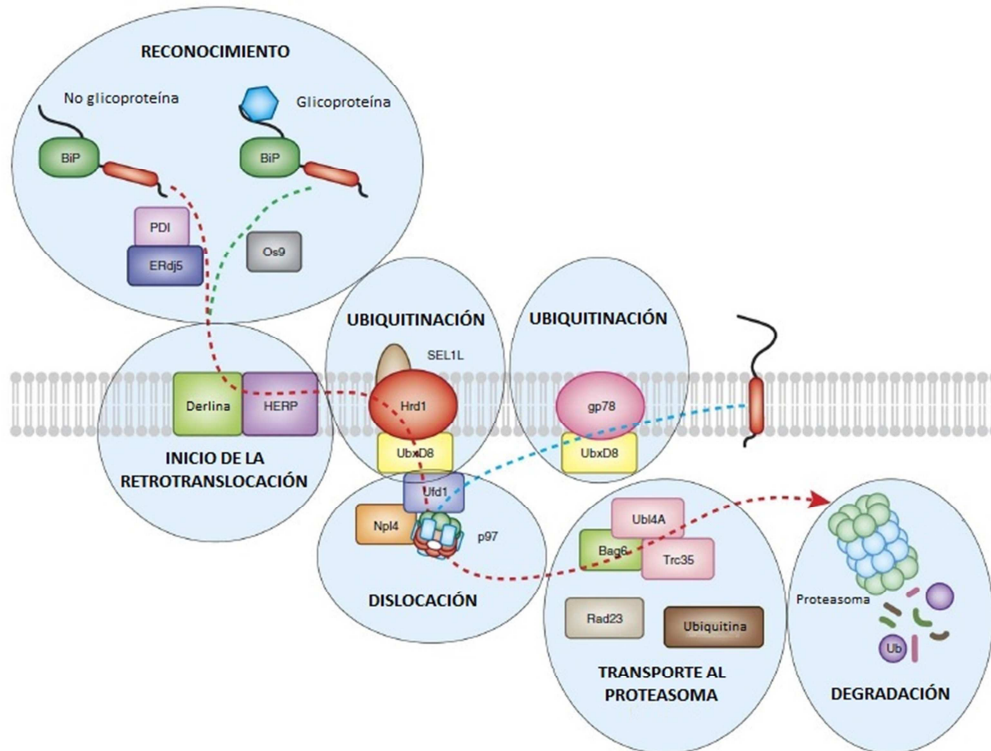
por el momento esta teoría no explica la concreta localización de la enfermedad ni la asociación diferencial de los subtipos de HLA-B27 a enfermedad.

## **6 Vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD).**

Todas las proteínas de nueva síntesis se someten a puntos de control de calidad que previenen la aparición de formas aberrantes que podrían dañar la célula [115]. La degradación asociada al RE o ERAD está involucrada en el control de calidad de proteínas, ya que marca glicoproteínas localizadas en el RE y que no logran alcanzar un plegamiento correcto, para su degradación citosólica por el sistema ubiquitina-proteasoma [116]. ERAD monitoriza el plegamiento de las proteínas cuya biogénesis tiene lugar en el RE [117], tanto de proteínas de secreción o de proteínas integrales de membrana. La mayoría de los sustratos de esta vía son proteínas dañadas o mal plegadas [116].

Se ha postulado la existencia de dos rutas distintas de ERAD, para glicoproteínas y no glicoproteínas, que son intercambiables bajo condiciones de estrés [118]. Sin embargo, otros autores sugieren que ambos tipos de sustratos comparten la misma ruta de ERAD [119]. Por otro lado, en *Saccharomyces cerevisiae*, los sustratos se degradan mediante tres rutas de ERAD diferentes denominadas ERAD-L, -M y -C, dependiendo de si su dominio mal plegado está localizado en el lumen del RE, dentro de la membrana, o en el lado citosólico de la membrana del RE, respectivamente [120]. Los sustratos de las vías ERAD-L y ERAD-M se dirigen al complejo E3 ligasa Hrd1p/Hrd3p y los sustratos de la vía ERAD-C se dirigen a Doa10p [120]. Estas tres vías de ERAD, descritas en levaduras, no están estrictamente conservadas en células de mamíferos, ya que la E3 ligasa gp78 puede funcionar con tres sustratos con lesiones estructurales distintas [121].

ERAD está conservada evolutivamente y entre sus funciones está el mantenimiento de la homeostasis proteica y la regulación fisiológica [122]. Aunque se han identificado muchos componentes individuales de ERAD, la organización funcional de estas proteínas es poco conocida. ERAD implica el reconocimiento de sustratos, su desplazamiento desde el RE al citosol, conocido como retrotranslocación, el marcaje de los mismos por la adición covalente de cadenas de multiubiquitina para su reconocimiento y posterior degradación por el proteasoma 26S [116]. Para una mejor comprensión de este sistema, la ruta de ERAD se subdivide en varios módulos, necesariamente acoplados que se describen a continuación (**Figura 7**).



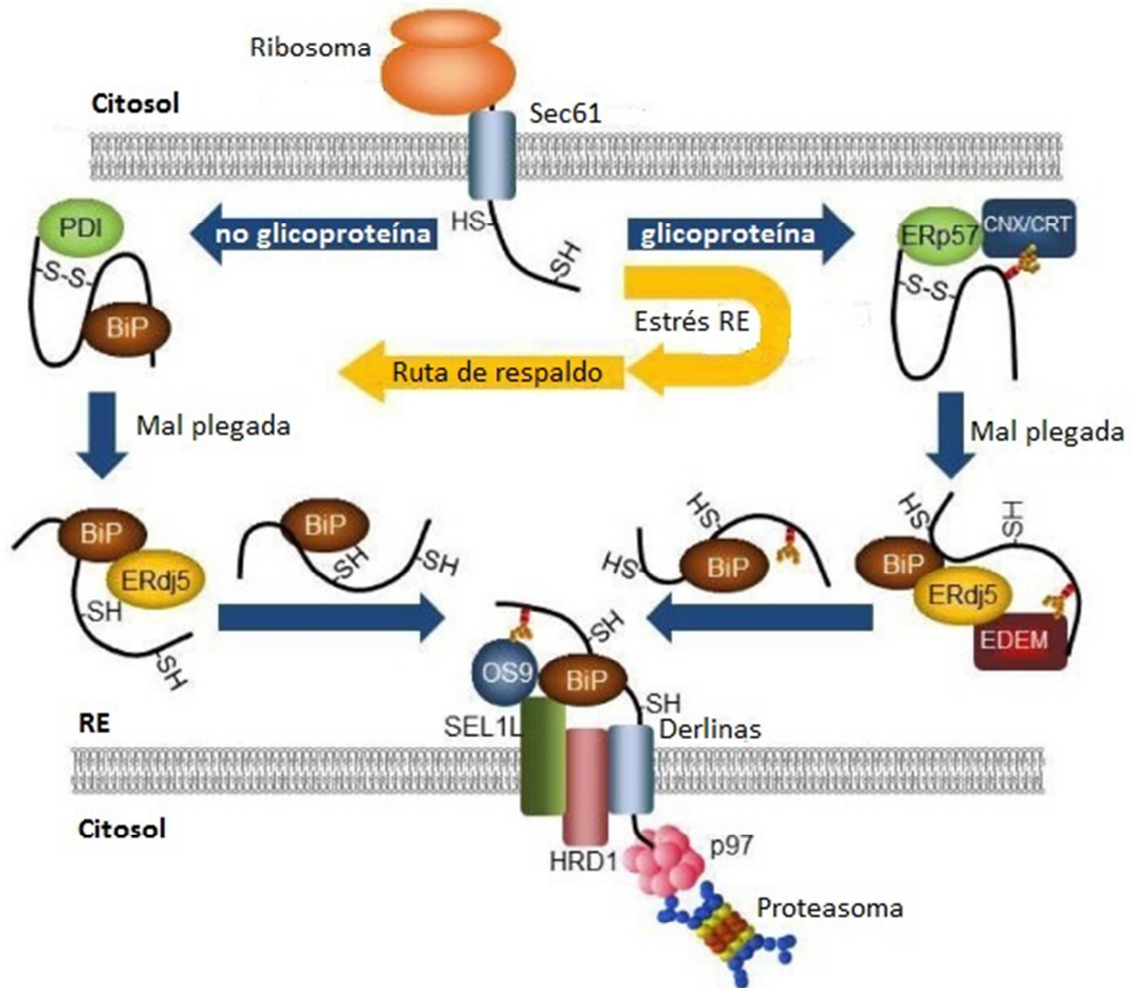
**Figura 7. Organización modular de ERAD.** Los componentes de ERAD se organizan en varios módulos [122]. El primer módulo corresponde al reconocimiento de los sustratos, el segundo módulo al inicio de la retrotranslocación, el tercer módulo a la ubiquitinación, el cuarto módulo a la dislocación, el quinto módulo es el de transporte al proteasoma y el sexto módulo corresponde a la degradación en el proteasoma.

### 6.1 Módulo de reconocimiento y marcaje de sustratos.

En primer lugar, dada la cantidad de proteínas presentes en el RE, el reconocimiento de las glicoproteínas mal plegadas debe ser altamente específico. Una forma común de reconocimiento es mediante chaperonas [115]. Las chaperonas Hsp70s asisten el plegamiento de proteínas, interaccionando con regiones hidrofóbicas expuestas en proteínas no nativas, impidiendo así su agregación [123]. BiP/Grp78 es una chaperona Hsp70 soluble presente en el RE de células de mamíferos, que ayuda a la maduración de las proteínas nacientes desplegadas e identifica y dirige las proteínas desplegadas de forma crónica a degradación [39]. Además, BiP ayuda a mantener la barrera de permeabilidad del RE durante la translocación de proteínas, contribuye a las reservas de calcio del RE y detecta las condiciones de estrés en el RE para activar la UPR [124].

BiP detecta regiones desplegadas de la proteína naciente, tanto en proteínas no glicosiladas como en glicoproteínas, en las que el glicano más N-terminal se produce relativamente tarde en la secuencia lineal [39] (Figura 8). BiP presenta un dominio de unión a sustrato (SBD) y un dominio de unión a nucleótido (NBD). El dominio NBD, mediante la hidrólisis de ATP, regula la unión del sustrato al dominio SBD de BiP. Esta interacción entre los dos dominios, está regulada a su vez por cofactores intercambiadores de nucleótidos (NEF), como BAP [39]. Además, se ha postulado que proteínas DNA-J del RE (ERdjs) controlan las diversas funciones de BiP, de modo que cuando el sustrato está asociado con ERdj3/ERdj6, pueden promover su plegamiento y cuando está unido a ERdj4 o ERdj5 pueden reducir y desplegar el sustrato [39]. La unión de BiP a los sensores de estrés impide su activación espontánea, pero bajo condiciones de estrés, BiP se une a proteínas mal plegadas, liberando a los sensores de estrés del RE de sus inhibidores y activando la UPR [125]. En células

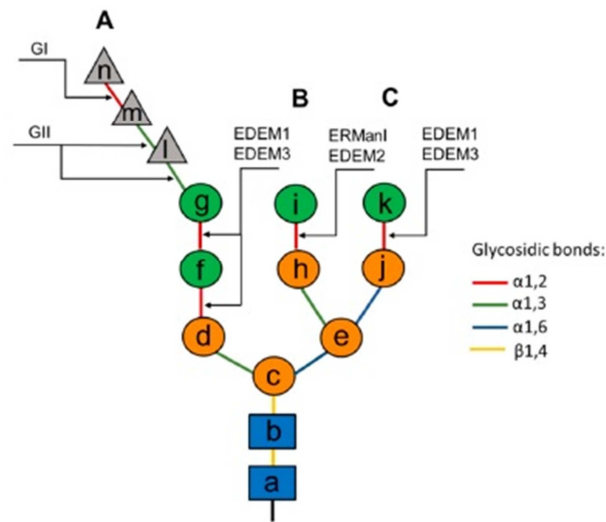
mononucleares adherentes de líquido sinovial de pacientes con espondiloartritis y HLA-B27 positivos, se ha descrito la sobreexpresión de BiP [126].



**Figura 8. Reconocimiento de las proteínas mal plegadas por la maquinaria de ERAD.** Las proteínas nacientes entran en el RE a través del translocón Sec61. Aquellas proteínas que son glicosiladas, son asistidas por las lectinas CNX/CRT junto Erp57 para alcanzar un correcto plegamiento, mientras que las que no son glicosiladas son asistidas por BiP y PDI. Si estas proteínas no consiguen plegarse correctamente, son reclutadas por BiP, ERdj5 y en el caso de glicoproteínas también EDEM1, hacia la maquinaria de ERAD presente en la membrana del RE (OS9, SEL1L, Hrd1, Derlinas) para su dislocación, ubiquitinación y degradación por el proteasoma. Figura modificada a partir de [118].

Otra forma de reconocimiento de glicoproteínas mal plegadas se basa en el estado de los glicanos unidos. Se ha observado que la rama A de los glicanos es más antigua y está implicada en asistir el plegamiento de las proteínas mientras que las ramas B y C son más jóvenes y están implicadas en degradación (**Figura 9**) [36]. Las proteínas escapan del ciclo de la calnexina/calreticulina por acción de manosidasas, que eliminan residuos terminales de manosa de los glicanos [127]. En primer lugar, la ER  $\alpha$ -1,2-manosidasa I (ERManI) lleva a cabo, en el RE, el primer recorte de manosa en N-glicanos, mediante la eliminación de la manosa terminal presente en la rama B de la estructura del glicano [128]. Las  $\alpha$ -manosidasas que aumentan la degradación del RE (EDEMs) incluyen a EDEM1, EDEM2 y EDEM3 y pertenecen a la misma familia que la ERManI [42]. EDEM1 actúa sobre las manosas terminales de las ramas A [129] y C de los N-glicanos [130]. El recorte adicional del residuo de manosa de la rama A

evitará la re-glucosilación por la glucosiltransferasa y por lo tanto, la interacción de la glicoproteína con la calnexina/calreticulina. Además, EDEM1 y EDEM2 podrían reconocer sustratos de forma independiente de glicanos [42, 131]. El reconocimiento de sustratos por EDEM1 y EDEM2 podría estar determinado por el reconocimiento de regiones hidrofóbicas expuestas o regiones transmembrana, en sustratos de ERAD mal plegados [132]. EDEM1 distingue entre glicoproteínas nativas y no nativas, y se une transitoriamente a proteínas aberrantes [131]. Además, EDEM1 inhibe la formación de agregados covalentes tras la liberación de los candidatos de ERAD con mal plegamiento terminal de la calnexina [129].



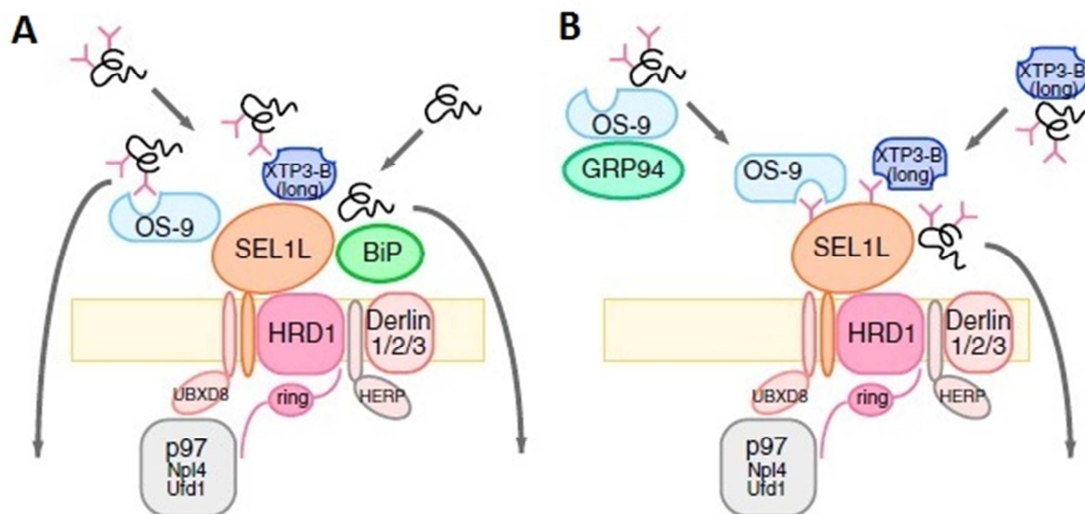
**Figura 9. Estructura de los oligosacáridos  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  unidos en N.** El oligosacárido unido covalentemente a las secuencias Asn-X-Ser/Thr de las cadenas polipeptídicas nacientes está compuesto por tres glucosas (triángulos grises), nueve manosas (círculos verdes y naranjos) y dos N-acetilglucosaminas (cuadrados azules). La glucosa “n” se elimina por la glucosidasa I (GI), los residuos de glucosa “m” y “l” son eliminados por la glucosidasa II (GII). Los residuos de manosa son eliminados por manosidasas del RE (ERMAnI, EDEM1, EDEM2, EDEM3). A, B y C definen la rama del oligosacárido. Las letras a-n especifican residuos de azúcar. Figura obtenida a partir de [42].

En la maduración de EDEM1, la escisión de una secuencia señal genera una forma soluble de EDEM1, que se asocia con ERdj5 y acelera la renovación de sustratos solubles, y otra forma de EDEM1 de membrana tipo II, que se asocia con SEL1L y acelera la renovación de sustratos de membrana [133]. EDEM1 interacciona con la calnexina a través de su dominio intramembrana pero no con la calreticulina y además, EDEM1 acepta glicoproteínas mal plegadas de forma terminal provenientes de la calnexina [134]. EDEM1 también interacciona con la disulfuro reductasa ERdj5, que escinde los puentes disulfuro, impidiendo la formación de multímeros covalentes de proteínas mal plegadas [135]. EDEM1 interacciona de manera dependiente de glicano con la proteína SEL1L, que junto a Hrd1 forma parte del complejo de ubiquitinación y dislocación de ERAD [131]. Se ha propuesto que EDEM1 se une a las glicoproteínas mal plegadas de forma independiente de glicano y gracias a su actividad manosidasa sobre sus glicanos, las marca como sustratos del complejo Hrd1-SEL1L [131]. Además, EDEM1 interacciona con las proteínas Derlina-2 y Derlina-3, que mediarían la unión entre EDEM1 y la ATPasa citosólica p97 [136]. La transcripción de EDEM es inducible por estrés del RE, y su inducción depende de la vía IRE1-XBP1 [137]. Es posible que las proteínas EDEM estén implicadas en la detección inicial de proteínas destinadas a degradación. Se ha descrito que la HC mal plegada de HLA se reconoce en el lumen del RE por EDEM1 de una manera dependiente de glicano y es dirigida al complejo SEL1L/Hrd1/UBE2J1 para su posterior degradación [138]. También se han detectado homodímeros de HLA-B27 y moléculas

monoméricas de MHC de clase I mal plegadas, unidas a EDEM1 de forma independiente de glicano [82]. La sobreexpresión de EDEM1 inhibe la dimerización de HLA-B27 y la inhibición de EDEM1 resulta en la regulación positiva de los homodímeros de HLA-B27 [82].

El oligosacárido procesado por EDEM1 marca a las glicoproteínas para degradación. Para asegurar una correcta identificación de los sustratos de ERAD, este oligosacárido es reconocido por las lectinas del RE, OS9 y XTP3-B, que presentan dominios de homología con el receptor de manosa-6-fosfato (MRH) [139]. OS9 reconoce los N-glicanos producidos por EDEM1 que carecen de la manosa terminal de la rama C [140], en concreto OS9 reconoce las manosas “j”, “e” y “c” [141] (**Figura 9**). También se ha descrito que OS9 se asocia de forma transitoria con las proteínas mal plegadas no glicosiladas, pero la asociación es improductiva [142].

Además, OS9 interactúa con el complejo ubiquitina ligasa Hrd1-SEL1L, en concreto con el dominio luminal de SEL1L [139]. Existen dos modelos de interacción con el complejo Hrd1-SEL1L (Figura 10). Un primer modelo propone que la interacción con el complejo Hrd1-SEL1L es estable [139]. En este modelo, los N-glicanos de las glicoproteínas mal plegadas son reconocidos por el dominio MRH de esta lectina [140] y las proteínas no glicosiladas son reconocidas por el complejo ubiquitina-ligasa de membrana, probablemente a través de BiP [143]. El otro modelo propone que OS9 se asocia de forma dinámica con el complejo Hrd1-SEL1L, mediante el reconocimiento por el dominio MRH de N-glicanos en la proteína adaptadora SEL1L [144]. En este otro modelo, el reconocimiento de las glicoproteínas mal plegadas estaría mediado por chaperonas como GRP94 (chaperona HSP90) o BiP, que formarían complejo con OS9, o por XTP3-B y las glicoproteínas serían transferidas al complejo ubiquitina-ligasa de membrana [144]. OS9 desempeña una doble función en el RE, como promotor de ERAD y secuestrando las proteínas mal plegadas en el RE [142]. La transcripción de OS9 es inducida tras la activación de la vía IRE1/XBP-1 de estrés del RE [142].



**Figura 10. Modelos de interacción de OS9 con el complejo SEL1L-Hrd1.** A) La interacción de OS9 con el complejo SEL1L-Hrd1 es estable. Los glicanos de las glicoproteínas son reconocidos por OS9 y las proteínas no glicosiladas serían reconocidas por BiP. B) La interacción de OS9 con el complejo SEL1L-Hrd1 es dinámica. OS9 reconoce los glicanos de SEL1L y las proteínas mal plegadas serían reconocidas por GRP94, BiP en complejo con OS9 o por XTP3-B. Figura modificada a partir de [139].

SEL1L es una proteína adaptadora que acopla el reconocimiento luminal de sustratos de ERAD con su dislocación. En mamíferos, SEL1L forma auto-oligómeros mediante motivos

SLR (*Sel1 like repeats*) presentes en su estructura [145]. SEL1L interacciona con proteínas de reconocimiento de sustratos de ERAD como OS9 [139] y EDEM1 [131] y a su vez con componentes de ERAD de membrana como Derlina-1, Derlina-2 y Hrd1 [146], formando un complejo capaz de reclutar al complejo formado por VCP/p97 para la dislocación de los sustratos de ERAD.

SEL1L es una proteína de membrana de naturaleza inestable, cuya inestabilidad radica en su dominio transmembrana. La asociación con Hrd1 le proporciona estabilidad [147]. Se ha propuesto que el dominio luminal de SEL1L, a través de su asociación con chaperonas y lectinas, proporciona la plataforma para el reconocimiento de proteínas mal plegadas y que el dominio transmembrana de SEL1L, en asociación con Hrd1, es crítico para el transporte de los sustratos de ERAD a través de la membrana del RE, posiblemente mediante la activación de un canal de dislocación [147]. SEL1L es necesaria para transferir los sustratos de ERAD desde las lectinas a Hrd1 [38]. Además, SEL1L interacciona con UBC6e (UBE2J1), una E2 de conjugación de ubiquitina, que posiblemente actúa en concierto con Hrd1 [148].

## 6.2 Módulo de inicio de la retrotranslocación.

Tras el reconocimiento de los sustratos de ERAD, estas proteínas deben cruzar la membrana desde el lumen del RE al citoplasma, mediante un proceso conocido como retrotranslocación. La búsqueda de un canal de retrotranslocación ha sido objeto de intensa investigación. El translocón Sec61 fue el primer candidato propuesto a canal de retrotranslocación [149], pero los datos obtenidos al respecto son poco concluyentes. La proteína peptidasa del péptido señal (SPP, *Signal Peptide Peptidase*) podría estar implicada en el proceso de retrotranslocación [150]. Otros posibles candidatos serían E3 ligasas de membrana como Hrd1 [151] y la familia de las Derlinas [152].

En mamíferos, la degradación de sustratos de ERAD solubles o integrales de membrana, requiere la participación de las Derlinas [153]. Las Derlinas se han descrito como proteasas inactivas intramembrana de la familia romboide. Presentan seis segmentos transmembrana y se unen a p97/VCP a través de motivos cajas-SHP en su extremo citosólico C-terminal y al sustrato a través del dominio romboide [153]. Las Derlinas son capaces de formar homo- y hetero-oligómeros [146].

La Derlina-1 es una proteína integral de la membrana del RE, homologa a Der1 en levaduras, con sus extremos N- y C-terminales orientados hacia el citosol [154]. La Derlina-1 forma un complejo con la proteína de membrana VIMP (*VCP-interacting membrane protein*), la cual recluta al complejo p97/VCP a través de su dominio citosólico [154]. La Derlina-1 se asocia con diferentes sustratos a medida que se mueven a través de la membrana [154].

La Derlina-1 podría formar un canal a través del cual las glicoproteínas mal plegadas pasaran del RE al citosol [152, 154]. No se puede excluir la participación de otras Derlinas en la formación de dicho canal [146]. Se ha propuesto que la Derlina-1 podría facilitar la liberación de sustratos de la vía de ERAD tras haber cruzado la membrana del RE, promoviendo el desensamblaje de la maquinaria de dislocación o la desestabilización del sustrato [153]. Las Derlinas podrían facilitar la retrotranslocación, en parte reduciendo la barrera de energía para mover dominios hidrófilos de sustratos luminales a través de la membrana [155]. Además, se ha sugerido un papel crítico para el bucle L1, localizado entre el TM1 y el TM2 de la Derlina-1, en el mantenimiento de la solubilidad de las proteínas secretadas mal plegadas durante la dislocación [153].

En levaduras, la Der1 se requiere solo para la degradación de las proteínas del RE con dominios luminales mal plegados [154]. También se ha observado, que la acetilación del extremo N-terminal de la proteína Der1, es esencial para la función de esta proteína en la vía de ERAD-L [155]. Der1 se oligomeriza y es reclutada por Hrd1 en base a su interacción con la proteína Usa1 [156]. Algunos autores proponen que Der1 promueve la inserción de polipéptidos aberrantes en la membrana del RE, dirigiéndolos a la ubiquitinación a través de Hrd1 [156].

La Derlina-2 y la Derlina-3 son proteínas integrales de la membrana del RE, con débil homología con Der1. Atraviesan múltiples veces la membrana y se requieren en la vía de ERAD para la degradación de glicoproteínas mal plegadas [136, 146]. La Derlina-2 se asocia con VIMP y forma un complejo multiproteico con la ATPasa p97 y de forma independiente de VIMP, la Derlina-2 forma complejos con Hrd1/SEL1L [146]. La Derlina-2 y la Derlina-3 se asocian con el sustrato de degradación, EDEM1 y p97 y son reguladas positivamente por la UPR [136]. En concreto, p97 y EDEM1 forman un complejo solo en presencia de la Derlina-2, y la Derlina-2 media la asociación de p97 con el sustrato de degradación [136]. Se ha propuesto que la Derlina-2 podría ser necesaria para la degradación de un subconjunto restringido de sustratos [154].

Derlina-1, Derlina-2 y probablemente Derlina-3 son reguladas por la rama IRE1-XBP1 de la UPR [136]. La degradación de los dímeros de HLA-B27 implica a la Derlina-1 y a la Derlina-2 [82]. En ausencia de XBP-1, Derlina-1 o Derlina-2, se favorece la dimerización de HLA-B27 [82].

La proteína peptidasa del péptido señal (SPP, *Signal Peptide Peptidase*) es una aspartil proteasa de escisión intramembrana. Presenta nueve dominios transmembrana, con el extremo N-terminal orientado hacia el lumen del RE y el C-terminal hacia el citosol [157]. Esta proteína contiene dos motivos de sitio activo conservados, denominados YD y GxGD, en dominios adyacentes en la membrana (TMD6 y TMD7, respectivamente) y un motivo conservado QPALLY en el dominio TMD9 del extremo C-terminal [157, 158]. SPP escinde el dominio transmembrana de algunas proteínas transmembrana de tipo II y su actividad proteolítica no requiere de cofactores adicionales [157, 158]. SPP es capaz de formar homotetrámeros [157]. La actividad proteasa de SPP requiere la escisión previa del dominio luminal de la proteína sustrato y la desestabilización de su dominio transmembrana para permitir el acceso a la SPP [157].

SPP se asocia con proteínas de la membrana del RE mal plegadas, pero estas no son sustrato de la proteólisis mediada por SPP, sino que son estabilizadas [159]. En concreto, SPP se requiere para la dislocación y degradación de determinadas proteínas residentes en el RE ancladas por la cola citoplásmica [160]. Esta proteína se asocia con la E3 ligasa TRC8, tanto en presencia como en ausencia de la proteína viral US2 [161]. Además, se ha descrito que PDI se asocia con SPP independientemente de US2 y por tanto, es un componente de la maquinaria de ERAD mediada por SPP [162]. La actividad de SPP está implicada en la generación de péptidos presentados por MHC de clase I [157].

### **6.3 Módulo de ubiquitinación.**

El proceso de ubiquitinación consiste en el acoplamiento de cadenas de ubiquitina a la proteína sustrato e implica a cuatro tipos de enzimas, conocidas como E1 activadoras de ubiquitina, E2 de conjugación de ubiquitina, E3 ligasas y E4 ligasas de ubiquitina. La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos y 8,5 kDa implicada en funciones esenciales en eucariotas.

Las enzimas activadoras de ubiquitina (E1) activan el extremo C-terminal de la ubiquitina mediante la formación de un enlace tioéster con el grupo carboxilo de la glicina 76, de una manera dependiente de ATP. Posteriormente, las enzimas de conjugación de ubiquitina (E2), conjugan de forma transitoria la ubiquitina activada a través de un enlace tioéster con su residuo esencial de cisteína. Finalmente, las enzimas E3 ligasas de ubiquitina reconocen señales de ubiquitinación en los sustratos y catalizan la formación de un enlace isopeptídico entre un residuo de lisina del sustrato y el extremo C-terminal de la ubiquitina [163]. Las E4 ligasas de ubiquitina se unen al sustrato oligoubiquitinado y catalizan, junto a las otras enzimas, la adición de ubiquitina conduciendo a cadenas de multiubiquitina [164]. Los sustratos destinados a degradación proteasómica, se conjugan generalmente con cadenas de poliubiquitina en las que las ubiquitinas están unidas por enlaces isopeptídicos entre la lisina 48 y la glicina 76 [163]. Esto es específico de la proteína E2 UBC7 en levaduras [165], ortóloga con la E2 UBE2G2 en mamíferos.

La mayoría de los sustratos de la ruta de ERAD son poliubiquitinados en el lado citoplasmático de la membrana del RE, aunque emplean diferentes complejos de E3 ligasas de ubiquitina [166]. Las E3 ligasas de ubiquitina de membrana reconocen el sustrato y facilitan el acoplamiento de múltiples unidades de ubiquitina a la proteína que se va a degradar. En levaduras se han descrito tres E3 ligasas de ubiquitina (Hrd1p, Doa10p y el complejo Asi nuclear). En mamíferos el número es mayor. Entre ellas se encuentran Hrd1, gp78, MARCH6/TEB4, RNF5/RMA1, RNF170, TRC8, TMEM129 y la citosólica CHIP [167, 168]. Tres enzimas E2 de conjugación de ubiquitina funcionan en ERAD de mamíferos: UBE2J1 y UBE2J2 (ortólogos de la de levadura Ubc6p) y UBE2G2 (ortólogos de la de levadura Ubc7p) [169].

La proteína Hrd1 humana, también conocida como sinoviolina, es una proteína transmembrana no glicosilada y estable que contiene un dominio N-terminal con seis dominios transmembrana y en su extremo C-terminal presenta una región citosólica a modo de dedo con un motivo RING-H2 [165]. El motivo RING-H2 consiste en una serie de ocho cisteínas e histidinas conservadas, que se unen a dos átomos de cinc y forman una estructura de anillos "cruzados" con dos histidinas en el medio [165]. La actividad catalítica del motivo RING-H2 no es necesaria para la unión del sustrato [165]. Hrd1 es necesaria para ERAD tanto de sustratos luminales como de membrana [170]. Se ha descrito que Hrd1 interacciona con la Derlina-1 y con p97/VCP [171].

En la vía de ERAD-L en *S. cerevisiae* se requiere la oligomerización de Hrd1p facilitada por la proteína Usa1p [151]. La reconstrucción del proceso de retrotranslocación en proteoliposomas con componentes de ERAD de *S. cerevisiae*, reveló que la autoubiquitinación de lisinas del motivo RING de Hrd1 es esencial para desencadenar la retrotranslocación del dominio luminal mal plegado de una proteína que atraviesa la membrana [166]. Este fenómeno también tiene lugar *in vivo* y además la modificación del dominio RING aumenta la afinidad de Hrd1 por el sustrato [166]. Por otro lado, también en *S. cerevisiae*, se ha descrito que Hrd1p interactúa con sustratos de la vía de ERAD-L a través de su dominio transmembrana y es capaz de discriminar entre polipéptidos plegados y mal plegados [172]. Es posible que el dominio transmembrana de Hrd1 forme un conducto que permita el movimiento del sustrato a través de la membrana, ya que la translocación requiere de un dominio TM de Hrd1 intacto [166].

Se ha descrito que la HC de la molécula de MHC de clase I es un sustrato endógeno de la E3 ligasa Hrd1 puesto que, la ausencia de Hrd1 resulta en la acumulación de homodímeros de HLA-B27 [169]. Cuando se produce un error en el ensamblaje de la HC con la  $\beta_2m$ , la HC es

sustrato de ERAD dependiente de Hrd1. En este proceso participa la enzima E2 de conjugación de ubiquitina UBE2J1, en complejo con SEL1L, Derlina-1 y p97 [169]. La degradación de la HC mal plegada de HLA-B27 es dependiente de Hrd1, incluso en presencia de la  $\beta_2m$  y con la vía de ensamblaje intacta [169]. Hrd1 podría reconocer de forma directa la HC mal plegada de MHC de clase I o indirectamente a través de OS9 y XTP3-B [169]. UBE2J1 podría unirse a Hrd1 en un sitio distinto del motivo RING, o a otro componente del complejo Hrd1 [169]. La poliubiquitinación dependiente de Hrd1 se dirige preferentemente al dominio luminal de la HC de MHC de clase I, a pesar de la presencia de una cola C-terminal citosólica expuesta [138]. Esto precisa una dislocación temprana, que permita la exposición de al menos parte del dominio luminal al citosol, antes del proceso de ubiquitinación [138]. Además, la ubiquitinación del dominio luminal ocurre antes de la extracción de la membrana del RE mediada por la ATPasa p97 y, aunque puede dirigirse a residuos que no sean lisina, generalmente la ubiquitina se conjuga en residuos de lisina en la HC de MHC de clase I [138]. Otras E3 ligasas de ubiquitina podrían dirigir la degradación del MHC de clase I en etapas posteriores de su ensamblaje, así como en la membrana plasmática [169].

La proteína gp78, también conocida como AMFR y RNF45, es una enzima E3 ligasa que atraviesa múltiples veces la membrana del RE y presenta su extremo C-terminal en una región citosólica a modo de dedo, con un motivo RING-H2 donde reside la actividad ligasa de ubiquitina [173, 174]. Esta enzima también presenta un dominio Cue de unión a ubiquitina y un sitio de unión específico para UBE2G2 (G2BR), esenciales para la función de gp78 en ERAD [175]. El reclutamiento de UBE2G2 por G2BR podría posicionar a esta enzima E2, potencialmente cargada con ubiquitina, próxima al dedo con el motivo RING de gp78, facilitando la transferencia de ubiquitina desde la enzima E2 al sustrato [175]. El dominio Cue parece desempeñar un papel esencial en la ubiquitinación de gp78 y del sustrato [175]. Además, en el extremo C-terminal de gp78 se encuentra el dominio VIM (motivo de interacción con VCP) que es el sitio de interacción con la ATPasa VCP (también conocida como p97) [176]. gp78 podría participar en una vía de degradación para proteínas del RE mal plegadas independiente de UFD1L [121, 176]. También se ha descrito que gp78 interacciona con la Derlina-1 y la Derlina-2 [177]. La asociación de gp78 con sus sustratos es independiente de su actividad de E3 ligasa y la ubiquitinación mediada por gp78, es en ERAD un paso previo a la extracción del sustrato del RE [175]. gp78 presenta dos sitios de oligomerización, uno en la región transmembrana y otro en el dominio citosólico, y es capaz de formar oligómeros [178].

En mamíferos también se ha descrito que Hrd1 y gp78 no son funcionalmente redundantes y que actúan secuencialmente para promover la renovación de proteínas mal plegadas [170]. Hrd1 está involucrado en la retrotranslocación y ubiquitinación de sustratos de la vía de ERAD, mientras que gp78 proporciona una función accesoria después de la acción de Hrd1, probablemente a través de la interacción con la chaperona citosólica BAG6 [170]. gp78 se une a través de su dominio transmembrana a UBXD8, un cofactor esencial para las funciones de retrotranslocación y ubiquitinación de gp78 [179]. gp78 interacciona con el complejo citosólico BAG6-Ubl4A-Trc35 [170]. Se ha descrito que el dominio Cue de gp78 interacciona con el dominio UBL de la chaperona citosólica BAG6, y con ayuda de UBXD8 reclutan esta proteína a la membrana del RE [179]. Además, gp78 regula la ubiquitinación de Ubl4a [170].

La proteína TRC8, también conocida como RNF139, es una enzima E3 ligasa residente en el RE con hasta 10 segmentos transmembrana [180]. TRC8 presenta un dominio RING-H2 en su extremo citosólico C-terminal y también un dominio sensor de esteroides (SSD) en su

extremo N-terminal [161, 180]. TRC8 se requiere para la ubiquitinación y dislocación de la molécula de MHC de clase I mediada por US2 [161]. Forma parte integrante de un complejo multiproteico del RE que contiene MHC de clase I, US2 y la proteína SPP [161]. TRC8 es reclutado por la cola citoplasmática de US2 [181]. Se ha descrito que las lisinas de la cola citoplasmática de la molécula de MHC de clase I son prescindibles para la ubiquitinación de la molécula, sugiriendo que TRC8 ubiquitina el dominio luminal de la cadena pesada de MHC de clase I, probablemente una vez dislocada de la membrana del RE [182]. TRC8 interactúa con la proteína SPP incluso en ausencia de US2 [161].

La poliubiquitinación es un proceso crítico para la extracción de los sustratos de ERAD de la membrana del RE por el complejo p97/UFD1L/Npl4 y para el reconocimiento por el proteasoma.

#### **6.4 Módulo de dislocación.**

El proceso de extracción de los sustratos de ERAD de la membrana del RE requiere, que al menos una parte de los sustratos, haya atravesado la membrana del RE [38]. La exportación puede verse favorecida por AAA-ATPasas de la partícula reguladora del proteasoma 19S o por Cdc48p/p97 [183]. El proteasoma podría participar en la liberación del sustrato del RE al citosol en ruta a su degradación [184].

VCP/p97 es una enzima presente en el citosol, que con ayuda de cofactores acopla la hidrólisis de ATP al despliegue y la extracción de proteínas de la membrana de los orgánulos o de complejos multiproteicos [185]. VCP/p97 es una AAA ATPasa de tipo II con estructura hexamérica que presenta un dominio N en el extremo N-terminal, seguido de dos dominios AAA (D1 y D2) y una cola C-terminal corta [186, 187]. Los dominios AAA contienen motivos Walker A y Walker B que median la unión e hidrólisis de ATP, respectivamente [188]. Estos dominios de ATPasa forman dos anillos hexaméricos apilados uno encima del otro con un poro central [188]. Un  $Zn^{2+}$  ocluye el poro central del hexámero, lo que sugiere que el sustrato no pasa a través de él [187]. Los dominios D1 y D2 parecen alternar la hidrólisis de ATP [188]. La hidrólisis de ATP del dominio D2 parece proporcionar la principal fuerza impulsora para el despliegue de las proteínas [187, 189]. El dominio globular N se localiza en la periferia del anillo D1 y es esencial para la unión del sustrato [189]. Además, el dominio N media, no sólo la interacción con los cofactores, sino también la unión de p97 a la membrana [188].

VCP/p97 se asocia con proteínas ubiquitinadas a través de la unión directa de su dominio N-terminal a las cadenas de poliubiquitinadas de los sustratos [190]. VCP/p97 puede interactuar con segmentos del sustrato no modificado a medida que emergen de la membrana del RE [188]. Se une a la membrana del RE al interactuar con la Derlina-1, la Derlina-2 y VIMP, e interactúa directamente con E3 ligasas de ubiquitina como Hrd1 o gp78, facilitando su reclutamiento a la Derlina-1 [171]. Algunos autores sugieren que VCP/p97 podría mediar la asociación entre Hrd1 y la Derlina-1 y de este modo asegurar que la ubiquitinación se restrinja a sustratos sometidos a retrotranslocación [171].

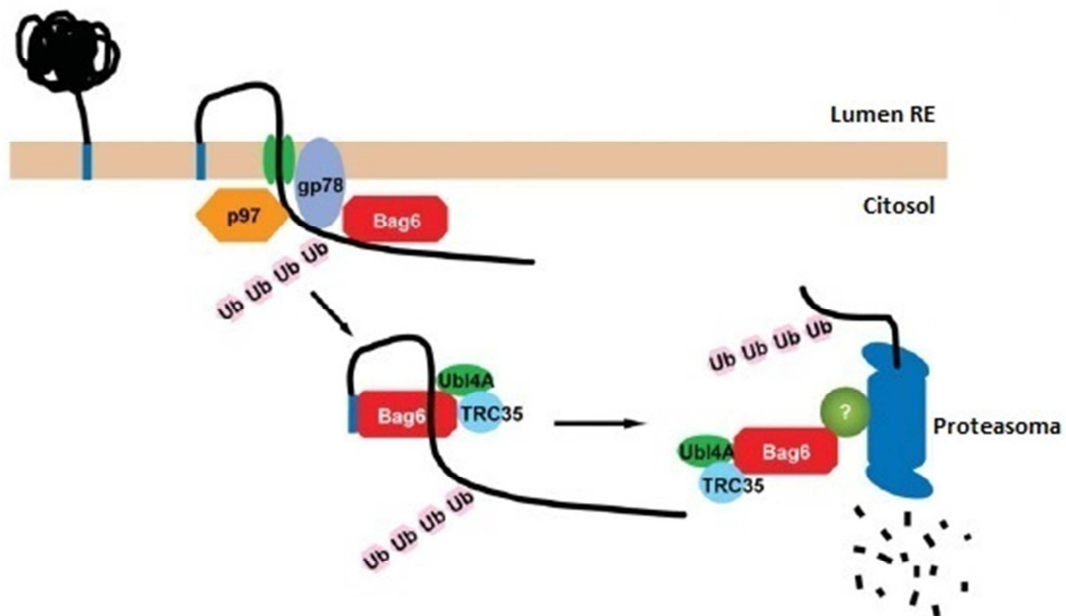
VCP/p97 requiere de la interacción con las proteínas citosólicas UFD1L y Npl4 para exportar proteínas del RE [191, 192]. UFD1L y Npl4 forman un complejo binario que existe solo o unido a p97 [191]. Este complejo actúa como un adaptador, dirigiendo la actividad básica de VCP/p97 a una vía celular concreta [191]. UFD1L interactúa con VCP/p97 y Npl4 de forma independiente, actuando de puente en el complejo [191]. Recientemente se ha descrito que UFD1L interactúa con el dominio N-terminal de VCP/p97 a través de una caja SHP [186]. UFD1L reconoce cadenas de poliubiquitina mediante un sitio de unión a ubiquitina en su

dominio UT3 conservado evolutivamente en su extremo NH<sub>2</sub> [188]. UFD1L une monoubiquitina y poliubiquitina en sitios no solapantes de su extremo N-terminal [193]. UFD1L-Npl4 parece mediar la unión de ubiquitina del complejo ATPasa [188]. VCP/p97 interacciona con proteínas ubiquitín-hidrolasas que podrían editar las cadenas de ubiquitina unidas al sustrato [194] y con una enzima E4 de extensión de ubiquitina (Ube4a) [38]. Esto sugiere que se requieren múltiples rondas de ubiquitinación y una ronda de desubiquitinación para un eficiente proceso de ERAD [38].

El mecanismo que acopla la hidrólisis de ATP a la extracción de sustratos no se comprende bien. Es posible que la acción de VCP/p97 pudiera ser transferida indirectamente a través de la membrana, induciendo cambios conformacionales en los componentes del complejo de dislocación [38]. Se ha propuesto que la dislocación de sustratos requiere la actividad de despliegue VCP/p97 [195]. Algunos autores sugieren que en células de mamífero, el complejo VCP/p97-UFD1L-Npl4 solo se requiere para sustratos de ERAD que retienen su conformación nativa y su unión a sustratos mal plegados retardaría la degradación, al impedir la unión directa con el proteasoma [196]. Otros autores sugieren que VCP/p97 funciona como un cofactor del sistema ubiquitina-proteasoma en procesos independientes de ERAD [197].

### 6.5 Módulo de transporte al proteasoma.

En el caso de que los procesos de dislocación y degradación de proteínas del RE no estén acoplados, probablemente las proteínas mal plegadas son retrotranslocadas al citosol en un estado desplegado y portan motivos hidrofóbicos expuestos que deben ser ocultados en su ruta hacia el proteasoma, para evitar su agregación. Recientemente se ha descrito un complejo multiproteico asociado a ubiquitina ligasa, formado por BAG6, Ubl4A y Trc35 que mantiene la solubilidad de las proteínas retrotranslocadas en estado desplegado [198] (Figura 11). Las proteínas mal plegadas del RE destinadas a degradación son retrotranslocadas en forma glicosilada y una enzima citoplasmática PNGasa es responsable de su deglicosilación [199].



**Figura 11. Transporte de las proteínas retrotranslocadas al proteasoma.** Las proteínas son retrotranslocadas en estado desplegado y requieren la asistencia del complejo formado por BAG6, Ubl4a y Trc35 para su transporte hasta el proteasoma. Figura modificada a partir de [200].

La proteína citosólica BAG6, también conocida como BAT3, se compone de una región central rica en prolina, un dominio de tipo ubiquitina (UBL) en el extremo N-terminal y un dominio BAG y una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo C-terminal [201]. BAG6 interacciona específicamente con proteínas deglicosiladas y podría reconocer residuos hidrofóbicos en la proteína sustrato [198]. La interacción con la proteína sustrato implica, probablemente a región central desordenada rica en prolinas [202]. BAG6 se asocia con el proteasoma e interacciona con proteínas poliubiquitinadas, aunque no está claro si la interacción es directa [203].

BAG6 forma un complejo con Ubl4a (Ubiquitin Like 4A), cuya función en el complejo no está clara y con Trc35, un cofactor que mantiene a BAG6 fuera del núcleo [198]. BAG6 presenta una actividad tipo chaperona que evita la agregación del sustrato [198]. Ubl4a no es necesario para mantener la solubilidad de las proteínas retrotranslocadas en estado desplegado, pero su actividad es estrictamente necesaria para el funcionamiento de ERAD [198]. BAG6 es reclutada al sitio de dislocación por su interacción directa o indirecta con la proteína de membrana Derlina-2 [204]. BAG6 interacciona a través de su dominio UBL con el dominio CUE de gp78 y también interacciona con Hrd1 [198]. Además, el dominio UBL de BAG6 también se une al dominio UBA de UBXD8, un componente esencial de la maquinaria de ubiquitinación de gp78 [179]. El dominio rico en prolinas de BAG6 forma homo-oligómeros para unirse a las proteínas mal plegadas, permitiendo a su vez que el dominio UBL forme interacciones multivalentes con gp78 y UBXD8 [179]. Estas moléculas pueden proporcionar un enlace entre el complejo BAG6 y VCP/p97 [179]. Algunos autores sugieren que BAG6 podría participar en la dislocación de glicoproteínas del RE [204].

## **6.6 Módulo del proteasoma.**

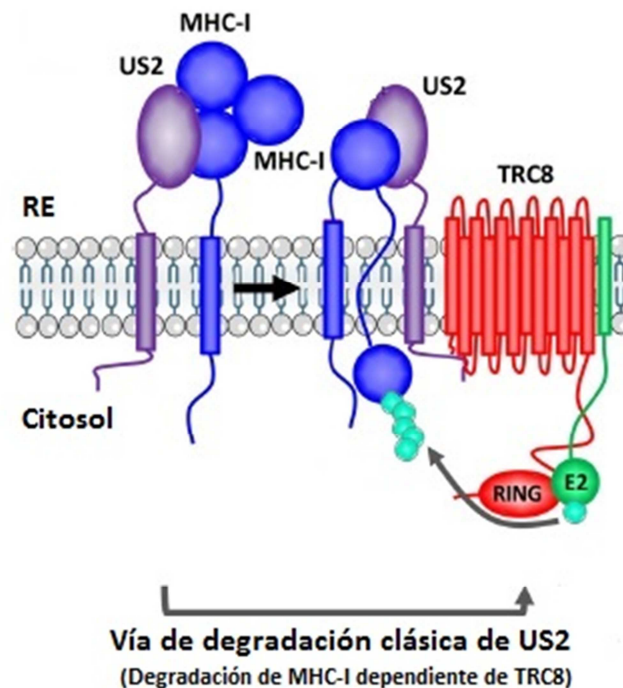
Las proteínas poliubiquitinadas son finalmente reconocidas por la subunidad reguladora 19S del proteasoma 26S. En esta misma subunidad las proteínas son desubiquitinadas y desplegadas para permitir su paso a la cámara catalítica de la subunidad 20S, donde tiene lugar la hidrólisis dependiente de ATP de las proteínas a péptidos. Al mismo tiempo la ubiquitina es reciclada.

## **7 Mecanismos de evasión viral mediados por US2 y US11.**

La maquinaria de ERAD es explotada por ciertos virus para degradar las proteínas del huésped, evitando así la vigilancia inmunológica. El citomegalovirus humano codifica para dos proteínas denominadas US2 y US11 que de forma independiente se unen a la HC de las moléculas de MHC de clase I de nueva síntesis y las dirigen a la vía de ERAD para su degradación por el proteasoma. En consecuencia, las células expresan menos MHC de clase I en la superficie celular y los virus evitan así su reconocimiento por linfocitos T CD8<sup>+</sup> [199, 205]. Los productos génicos virales US2 y US11 han sido fundamentales, tanto en la definición de la ruta de ERAD de mamíferos como en la identificación de nuevos componentes del sistema de ERAD. US2 y US11 interactúan con componentes diferentes de la vía de ERAD.

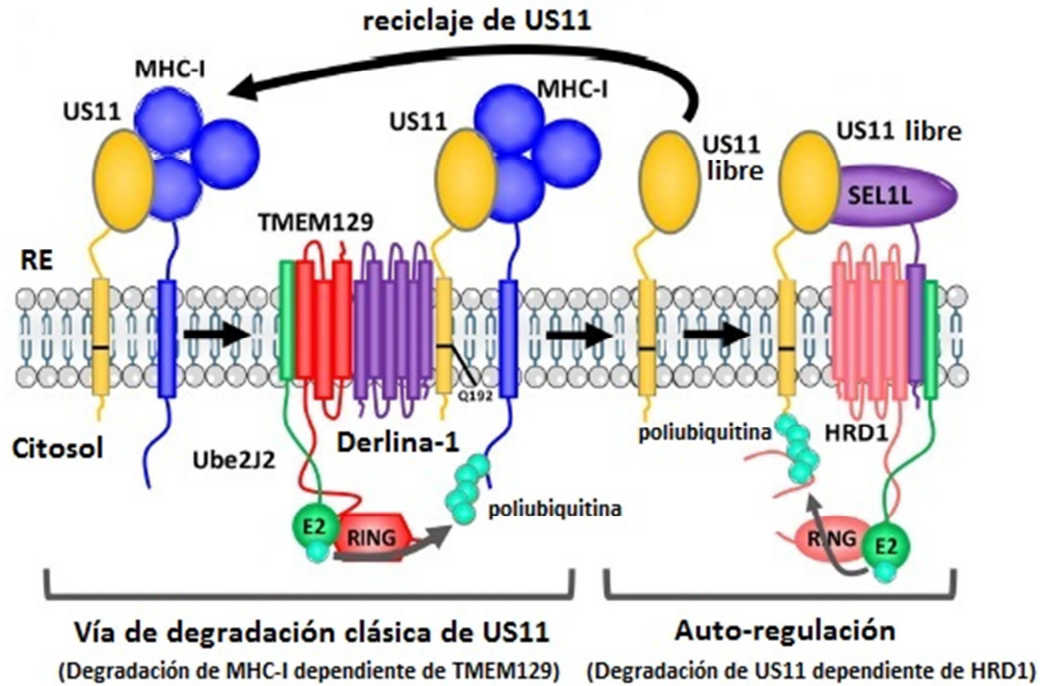
US2 es una glicoproteína de membrana de tipo I con una secuencia señal no escindible, un dominio luminal que dicta una asociación altamente específica con la HC, un segmento transmembrana y una cola citosólica corta [206]. US2 interacciona con el complejo formado por la E3 ligasa TRC8 [161] y la SPP [150] (Figura 12). US2 probablemente se asocia a través de su dominio transmembrana con TRC8 [161] que es reclutado por la cola citoplasmática de US2 [181]. La cola citosólica de US2 interacciona con SPP y la ATPasa p97/VCP [150, 207]. Sin embargo, ni el ratón knock-out de SPP ni deleciones en SPP generadas mediante CRISPR en

diferentes líneas celulares, se ve afectada la degradación de MHC de clase I mediada por US2. Por lo tanto, no parece que se requiera SPP para la dislocación de MHC de clase I mediada por US2 [160].



**Figura 12. Vía de degradación mediada por US2.** La proteína viral US2 interacciona con la HC de la molécula MHC de clase I y la recluta a la E3 ligasa TRC8, la cual marca la HC con cadenas de poliubiquitina para su degradación. Figura modificada a partir de [168].

US11 es una glicoproteína transmembrana tipo I que usa su dominio transmembrana para reclutar a la Derlina-1 a la molécula MHC de clase I [152]. La cola citosólica C-terminal de la molécula de MHC de clase I se requiere para la interacción con la Derlina-1 en la dislocación inducida por US11 [208]. US11 interacciona con MHC de clase I a través de su dominio luminal [209]. Los aminoácidos hidrofóbicos del extremo C-terminal de las moléculas de MHC de clase I humanas podrían ser objetivo del reconocimiento por la Derlina-1 en la dislocación mediada por US11 [208]. SEL1L es necesario para la degradación de MHC de clase I mediada por US11 [210]. La proteína VCP/p97 también participa en la vía de degradación mediada por US11 [171]. Recientemente, se ha descrito una RING E3 ligasa no clásica presente en el RE denominada TMEM129, que junto a la E2 de conjugación UBE2J2, está implicada en la degradación mediada por US11 [211, 212] (Figura 13). TMEM129 es una proteína que atraviesa múltiples veces la membrana y presenta un dominio RING-C2 (con dos cisteínas en el medio) con actividad E3 ligasa intrínseca [211]. TMEM129 reside dentro de un complejo que contiene varios componentes de la vía de ERAD, incluyendo la Derlina-1, la Derlina-2, VIMP y p97/VCP [212] y es reclutada hacia US11 a través de la Derlina-1 [211]. Además, US11 activa la UPR que induce la expresión de genes que facilitan la vía de ERAD [213].



**Figura 13. Vía de degradación mediada por US11.** La proteína viral US11 interacciona con la HC de la molécula MHC de clase I y recluta a la Derlina-1. A continuación, la E3 ligasa TMEM129, en colaboración con la E2 de conjugación Ube2j2 poliubiquitinan la HC de la molécula de MHC de clase I, marcando a esta proteína para su degradación. US11 puede ser reciclada y seguir siendo activa o ser conducida a degradación a través de la E3 ligasa de membrana Hrd1. Figura modificada a partir de [168].

A pesar de estas diferencias, tanto US2 como US11 actúan como adaptadores en la vía de ERAD, enviando para su degradación, la cadena pesada de MHC de clase I a los complejos E3 ligasa correspondientes.



## **V. OBJETIVOS**



## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo principal de la presente memoria de tesis es caracterizar el papel que los mecanismos de control de calidad del RE juegan en la patogenia de la espondilitis anquilosante.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Analizar en qué fase está interrumpido el interactoma de ERAD, impidiendo la degradación de los subtipos de HLA-B27 asociados a enfermedad y que se pliegan de forma anómala.
- 2.- Identificar las vías de ERAD asociadas a HLA-B27 mediante el análisis de la susceptibilidad a la dislocación mediada por las proteínas virales US2 y US11.



## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

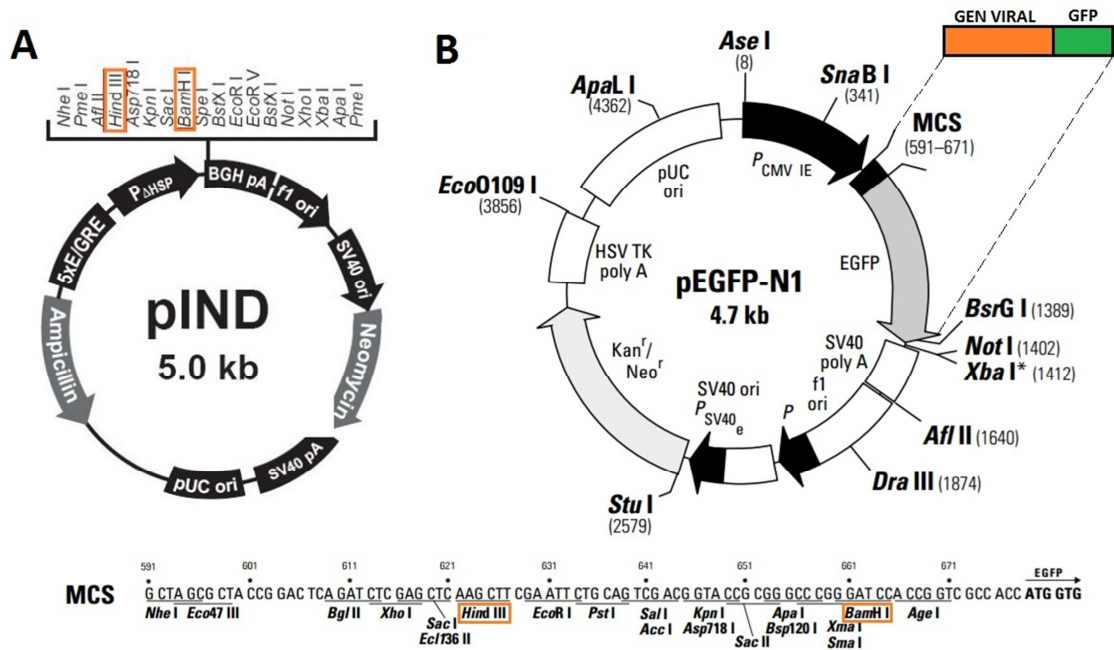


## 1 Líneas celulares y transfectantes.

HMy2-C1R (C1R) es una línea celular linfoblastoide humana, derivada de células B (HMy2), negativa para HLA-A y que presenta bajos niveles de expresión de sus antígenos de clase I endógenos, HLA-B\*35:03 y HLA-Cw4 [214]. Esta línea celular se usó como huésped para la transfección de genes de MHC de clase I. En concreto, se usaron transfectantes estables de C1R que expresan seis subtipos de HLA-B27 (B\*27:02, B\*27:04, B\*27:05, B\*27:06, B\*27:07 y B\*27:09) y que se han descrito previamente [78]. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza) suplementado con un 10% de suero de ternera fetal (STF) (PAN TM, Biotech; GmbH), previamente inactivado durante 30 min a 56 °C, L-glutamina 2 mM, penicilina (100 IU/ml) y estreptomina (100 µg/ml), en atmósfera controlada a 37 °C y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células C1R y los transfectantes estables de C1R que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 se cotransfectaron a su vez, con las construcciones génicas de US2 o US11 clonados en el vector pEGFP-N1 (4,7 kb) (Clontech) y el vector RSV5 [215] modificado con el gen de resistencia a higromicina, para generar transfectantes estables de las proteínas virales. El cDNA de US2 (600 pb) y US11 (639 pb) clonados en el vector pIND (5 kb) (Invitrogen) fueron un regalo del Dr. Miguel López Botet, de la Universidad Pompeu i Fabra, Barcelona.

Para monitorizar la expresión de las proteínas virales US2 y US11 se generaron proteínas de fusión donde US2 y US11 se fusionaron en el extremo N-terminal de la EGFP. Para ello los genes de las proteínas virales se digirieron del vector pIND con las enzimas 5' Hind III (Promega) y 3' Bam HI (Biolabs). Los fragmentos de DNA obtenidos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) y se purificaron mediante el sistema "Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System" de Promega. A continuación, los genes de las proteínas virales se subclonaron en el vector pEGFP-N1 en los sitios de restricción para dichas enzimas (**Figura 14**). Los dos fragmentos previamente digeridos con las enzimas de restricción mencionadas se ligaron con la ligasa de DNA T4 de Promega y se comprobó la ligación mediante digestión con las dos enzimas de restricción. Los plásmidos de interés se obtuvieron a partir de cultivos en bacterias competentes *E.Coli DH5α* (Invitrogen). La purificación se realizó mediante el sistema QIAGEN Plasmid Maxi Kit para la purificación a gran escala. El DNA obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).



**Figura 14. Vectores usados en la generación de proteínas virales fusionadas a GFP.** (A) Vector pIND, es el vector de procedencia del cDNA de US2 y US11. (B) Vector pEGFP-N1, es el vector utilizado para generar las proteínas de fusión. El cDNA de US2 y US11 clonado en el vector pIND se extrajo mediante digestión con las enzimas de restricción Hind III y Bam HI y se ligaron por separado en el vector pEGFP-N1 en los sitios de restricción que presenta el vector para dichas enzimas. Las proteínas virales se fusionaron en el extremo N-terminal de la EGFP.

La transfección se realizó mediante electroporación a 300 V y 950  $\mu$ F en un electroporador Gene Pulser XCell™ (BioRad) como se ha descrito previamente [216]. La transfección con el vector vacío pEGFP-N1 se utilizó como control. Los transfectantes que expresaron EGFP o proteínas de fusión se seleccionaron con higromicina (250  $\mu$ g/ml) (Invitrogen).

## 2 Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados en la presente tesis se mencionan indicando a su vez la técnica en la que fueron empleados. En citometría de flujo se usaron los siguientes anticuerpos:

**ME1:** anticuerpo monoclonal (IgG1 de ratón) que reconoce las proteínas HLA-B27, HLA-B7 y HLA-B22 correctamente plegadas (complejos cadena pesada/ $\beta_2$ m/ péptido) [217].

**F (ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG conjugado con ficoeritrina (PE):** anticuerpo secundario policlonal. Es un fragmento F (ab')<sub>2</sub> de cabra que reconoce las cadenas pesadas y ligeras de IgGs de ratón (eBioscience).

Para la inmunoprecipitación de la cadena pesada de los distintos subtipos de HLA-B27 en las técnicas de western blot y marcaje metabólico se utilizó:

**HC10:** anticuerpo monoclonal (IgG2a de ratón) que reconoce la cadena pesada de MHC de clase I libre de  $\beta_2$ m (locus B) [218], en forma monomérica u oligomérica [79, 219].

Además, en los western blots se emplearon los anticuerpos primarios descritos en la tabla 1 y los anticuerpos secundarios mencionados a continuación.

**Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot y sus respectivos antígenos.**

Antígeno	PM (kDa)	Anticuerpo	Especie	Dilución * <sup>1</sup>	Casa comercial (Referencia)
γ-tubulina	48	GTU-88	Monoclonal IgG1 de ratón	1/10.000	Sigma-Aldrich (T6557)
calnexina	80	AF8	Monoclonal IgG1 de ratón	1/1.000	Cedido por Brenner MK * <sup>3</sup>
GRP78/BiP	75/78	Anti-GRP78/BiP	Policlonal IgG de conejo	1μg/ml	Abcam® (ab21685)
SEL1L	95	Anti-SEL1L	Policlonal IgG de conejo	1/5.000	Sigma-Aldrich (S3699)
EDEM1	75/65	Anti-EDEM1	Policlonal IgG de conejo	0,5-1μg/ml	Sigma-Aldrich (E8406)
OS9	97/88	Anti-OS9	Policlonal IgG de conejo	4μg/ml	Sigma-Aldrich (SAB4200021)
Derlina-1	22	Anti-Derlina-1	Monoclonal IgG1 de ratón	4-10μg/ml	Sigma-Aldrich (SAB4200148)
Derlina-2	21	Anti-Derlina-2	Policlonal IgG de conejo	4μg/ml	Sigma-Aldrich (D1194)
Derlina-3	26	Anti-Derlina-3	Policlonal IgG de conejo	1-5μg/ml 1/5.000	Sigma-Aldrich (D2194)
Hrd1/SYVN1	70	Anti-Hrd1/SYVN1	Policlonal IgG de conejo	4μg/ml 1/1.000	Sigma-Aldrich (H7790)
AMFR/gp78	78	Anti-gp78	Policlonal IgG de conejo	1/500 IP 1/1.000 CC	Sigma-Aldrich (SAB2701125)
p97/VCP	89	Anti-p97/VCP	Monoclonal IgG de conejo	1/5.000 IP 1/10.000 CC	Abcam® (ab109240)
UFD1L	34,5	Anti-UFD1L	Policlonal IgG de conejo	1/250 1/500 * <sup>2</sup>	Sigma-Aldrich (U8884)
BAG6/BAT3	119/150	Anti-BAG6/BAT3	Monoclonal IgG de conejo	1/1.000 IP 1/10.000 CC	Abcam® (ab137076)
SPP	95/45	Anti-SPP	Policlonal IgG de conejo	1/1.000	Abcam® (ab16083)
RNF139/TRC8	80	Anti-TRC8	Policlonal IgG de conejo	1/250 1/500	Sigma-Aldrich (R0407)
Ubiquitina	8,5	Anti-ubiquitina	Policlonal de conejo	1/200	Sigma Aldrich (U5379)
GFP	25	Anti-GFP	Policlonal IgG de conejo	1/10.000	Life technologies (A6455)

\*<sup>1</sup> Cuando la dilución utilizada en las membranas de la inmunoprecipitación (IP) y en las membranas del control de carga (CC) es diferente se especifica.

\*<sup>2</sup> En alguna ocasión se usó la dilución 1/2000 en la inmunoprecipitación.

\*<sup>3</sup> Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Texas Children's Hospital and Houston Methodist Hospital, Houston, TX, United States.

**$\alpha$ -Mouse IgG HRP:** anticuerpo monoclonal (IgG de rata) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), que reconoce preferentemente la forma no reducida de la IgG de ratón (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) frente a la forma reducida desnaturalizada en SDS (ROCKLAND™, Limerick, Irlanda).

**$\alpha$ -Rabbit IgG HRP:** anticuerpo monoclonal (IgG de ratón) conjugado con HRP, que reconoce preferentemente la forma no reducida de la IgG de conejo frente a la reducida desnaturalizada en SDS (ROCKLAND™, Limerick, Irlanda).

### 3 Inmunoprecipitación y Western Blot.

Dependiendo del experimento, se lisaron aproximadamente  $5 \times 10^6$  o  $10^7$  células en tampón de lisis (1% Brij 96, 50mM Tris HCl pH 7.4, 5mM  $MgCl_2$ ), en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas durante 20 minutos a 4 °C con agitación continua. Tras centrifugar durante 10 minutos a 4 °C y 14.000 rpm para eliminar los restos celulares, una parte del lisado se reservó como control de carga, y otra parte del lisado se inmunoprecipitó con el anticuerpo HC10 y proteína A acoplada a bolas de sefarosa (Abbott Laboratories) durante 60 minutos o toda la noche a 4 °C en agitación continua.

Los inmunoprecipitados se lavaron dos veces con tampón de lavado (0.5% Brij 96, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl y 5 mM EDTA). Posteriormente, los inmunoprecipitados y los lisados sin inmunoprecipitar se hirvieron durante 5 min en tampón de carga (0.0625M Tris-HCl pH 6.8, 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol, 10 % glicerol, 4% SDS y azul de bromofenol) y se separaron mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a distintas concentraciones en condiciones reductoras. A continuación, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioRad, Ref. 1704159) con el aparato Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad) (25V, 2.5 A, durante 15 min) y las membranas se incubaron durante toda la noche en tampón de bloqueo (BSA 1.5% en PBS con Tween-20 al 0,05%).

Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1h con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en PBS-Tween-20 al 0,02%, a la concentración indicada en la Tabla 1. Tras 5 lavados de 5 segundos con agua destilada y 1 lavado de 5 min con tampón de lavado (PBS-Tween-20 al 0,5%), las membranas se incubaron otra hora con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa. Las membranas se lavaron de nuevo con agua destilada y tampón de lavado del mismo modo.

En algunos casos, se eliminaron los anticuerpos de las membranas con solución de *stripping* (2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 100mM  $\beta$ -mercaptoetanol) a temperatura ambiente durante 2 horas con el objetivo de reincubar las membranas con otros anticuerpos. Las membranas se lavaron a temperatura ambiente dos veces durante 5 min con tampón de lavado y a continuación se bloquearon e incubaron con los anticuerpos correspondientes.

Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia con el sistema ECL Lumi-Light Plus (Roche) y se expusieron a películas Fuji film Super RX. Las auto-radiografías se escanearon y cuantificaron usando el software Tina 2.09e (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt, Alemania).

Con el programa Tina 2.09e se cuantificó la HC, la  $\gamma$ -tubulina, las proteínas de la vía de ERAD asociadas a la HC y la cantidad total de las distintas proteínas de la vía de ERAD. La cantidad total de las distintas proteínas de la vía de ERAD se relativizó con los valores de  $\gamma$ -tubulina (proteína/tubulina), los datos de expresión de HC se relativizaron con la  $\gamma$ -tubulina (HC/tubulina) y el material inmunoprecipitado se relativizó con la cantidad de HC (IP/HC). El

valor de la IP se multiplicó por los cocientes de proteína/tubulina, HC/tubulina e IP/HC ( $IP \cdot (\text{proteína/tubulina}) \cdot (\text{HC/tubulina}) \cdot (\text{IP/HC})$ ) y el resultado final se relativizó a 100 tomando como referencia B\*27:05 por ser el subtipo principal.

En aquellas proteínas en las que tras la IP se observó una interacción inespecífica con la HC por el valor similar entre las células sin transfectar (C1R) y los transfectantes de HLA-B27, se relativizó a 1, tomando como referencia C1R para poder comparar las gráficas en las que existe una unión específica con las que presentan una inespecífica. En estos casos son irrelevantes los valores de HC/tubulina e IP/HC.

Por último, se hizo la media de los experimentos realizados para cada una de las proteínas de ERAD, se calculó la desviación estándar, y se representó en un gráfico de barras la cantidad de proteína obtenida asociada a la HC.

#### **4 Marcaje metabólico e inmunoprecipitación.**

Aproximadamente  $3 \times 10^7$  células se incubaron en medio DMEM (Gibco, Invitrogen) sin metionina ni cisteína suplementado con 10% de STF y L-glutamina 2 mM durante 45 minutos a 37 °C. A continuación, las proteínas de nueva síntesis se marcaron con 500-1000  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{35}\text{S}$  Met/Cys (Perkin Elmer) a 37 °C en el mismo medio durante 15 minutos. Después se hicieron cazas a 37 °C a distintos tiempos (0 min, 30 min, 1h) en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de STF y L-glutamina 2 mM. En algunos casos se utilizó el inhibidor del proteasoma epoxomicina (2,5  $\mu\text{M}$ ) (Calbiochem, Schwalbach, Alemania) y las células se incubaron durante los 45 minutos previos al marcaje, durante el marcaje y las cazas. Tras las cazas, las células se centrifugaron a 14.000 rpm y 4 °C, se retiró el sobrenadante y se congelaron a -80 °C para su análisis posterior.

Las células se lisaron en 1% Nonidet P40 (NP-40), 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  durante 20 minutos a 4 °C. Los lisados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se pre-aclararon tres veces con 80  $\mu\text{l}$  de bolas de sefarosa CL-4B (Sigma-Aldrich) y 3  $\mu\text{l}$  de suero normal de ratón (NMS) durante 45 minutos a 4 °C. Seguidamente, una parte de cada muestra, por triplicado, se incubó durante 15 minutos con ácido tricloroacético al 5% (TCA) (Sigma-Aldrich) para normalizar la cantidad de proteína marcada con  $^{35}\text{S}$  en los lisados mediante la valoración de la radioactividad en las precipitaciones. A continuación, se inmunoprecipitaron con 60  $\mu\text{l}$  de proteína A acoplada a bolas de sefarosa (Abbott Laboratories) y el anticuerpo monoclonal HC10 durante 60 minutos. Finalmente, los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con 0,5% NP-40, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl y 5 mM EDTA y las proteínas extraídas en el tampón de carga se desnaturalizaron a 95 °C y se separaron mediante geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% en condiciones reductoras. Los geles se procesaron por fluorografía usando DMSO/PPO (Sigma-Aldrich), se secaron y se expusieron a películas de revelado Fuji Film Super RX. Las películas se escanearon y se cuantificaron usando el software TINA 2.09e (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt, Alemania).

Con el programa Tina 2.09e se cuantificó la HC dislocada y la HC presente en el RE en presencia o ausencia de epoxomicina para los distintos transfectantes. El valor de la HC dislocada se multiplicó por 100 y se dividió por la suma de los valores de la HC dislocada y la HC presente en el RE (HC total) para calcular el porcentaje de HC dislocada en cada caso.

En aquellos casos en los que se observó HC dislocada en ausencia de epoxomicina, los valores se relativizaron a 1, tomando como referencia el valor en ausencia de epoxomicina correspondiente en cada caso, para poder comparar las gráficas.

Por último se hizo la media de los experimentos realizados para los transfectantes de los distintos subtipos, se calculó la desviación estándar, y se representó en un gráfico de barras la cantidad de HC dislocada.

## **5 Citometría de flujo (FACS).**

Para detectar la expresión de GFP o de las proteínas de fusión virales en los transfectantes se utilizó la citometría de flujo. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1.500 rpm. La fluorescencia asociada a GFP (excitación 488 nm, emisión 511 nm) se midió en un citómetro de flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson, Mountain View, California) y los datos se analizaron con el software CellQuest. Por otro lado, la citometría de flujo se utilizó para medir la expresión en superficie de HLA-B27 en presencia de US2 y US11. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se lavaron con PBS y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C con el anticuerpo ME1 (10 µg/ml) en un volumen final de 200 µl. Tras dos lavados con PBS las células se resuspendieron en 50 µl del anticuerpo secundario conjugado con PE (dilución 1/100) y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C. Después se lavaron dos veces con PBS. Finalmente, la fluorescencia asociada a PE (excitación 480 nm, emisión 578 nm) se analizó en el citómetro de flujo FACSCalibur usando el software CellQuest.

Los valores obtenidos con ME1 de los distintos transfectantes se relativizaron a 100 tomando como referencia el valor con ME1 de los transfectantes con el vector vacío correspondiente (X-N1).

Finalmente, se hizo la media de los experimentos realizados para cada subtipo, se calculó la desviación estándar, y se representó en un gráfico de barras la expresión de HC en superficie.

## **VII. RESULTADOS**



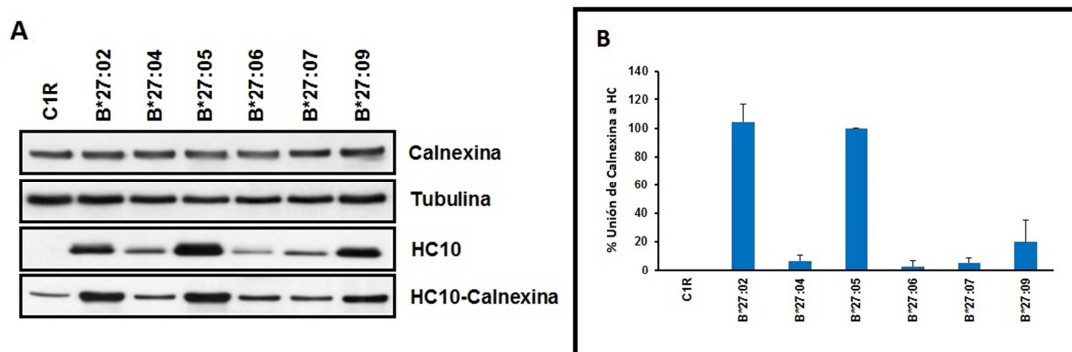
## 1 Análisis de la interacción de HLA-B27 con la maquinaria de la vía de ERAD.

La vía de ERAD es el mecanismo que utilizan las células para eliminar las proteínas mal plegadas del RE. En los siguientes experimentos se analizó mediante coimmunoprecipitación, la asociación de la cadena pesada de los subtipos de HLA-B27 con los distintos componentes de la vía de ERAD, con el objetivo de comprobar si la vía se interrumpe en algún punto y esta es la causa del acúmulo en el RE de la HC de los subtipos asociados a enfermedad.

### 1.1 Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a la calnexina.

La calnexina es una chaperona de tipo lectina que favorece el plegamiento de la cadena pesada y su ensamblaje con la  $\beta_2m$ . La cadena pesada de los subtipos de HLA-B27 que se pliegan de forma anómala, permanece en el RE asociada a la calnexina [78]. Recientemente, se ha descrito que la calnexina participa en la degradación de los dímeros de HLA-B27 [84]. Puesto que en este trabajo se analizará la interacción de los subtipos de HLA-B27 asociados o no a enfermedad, con los distintos componentes de la vía de ERAD, se incluye en este apartado previo, el análisis de la asociación de la cadena pesada de HLA-B27 con la calnexina mediante western blot. Esta técnica se utilizará para estudiar la interacción de la cadena pesada de HLA-B27 con los distintos componentes de la vía de ERAD. En el trabajo mencionado previamente [78] el análisis se realizó con una metodología diferente.

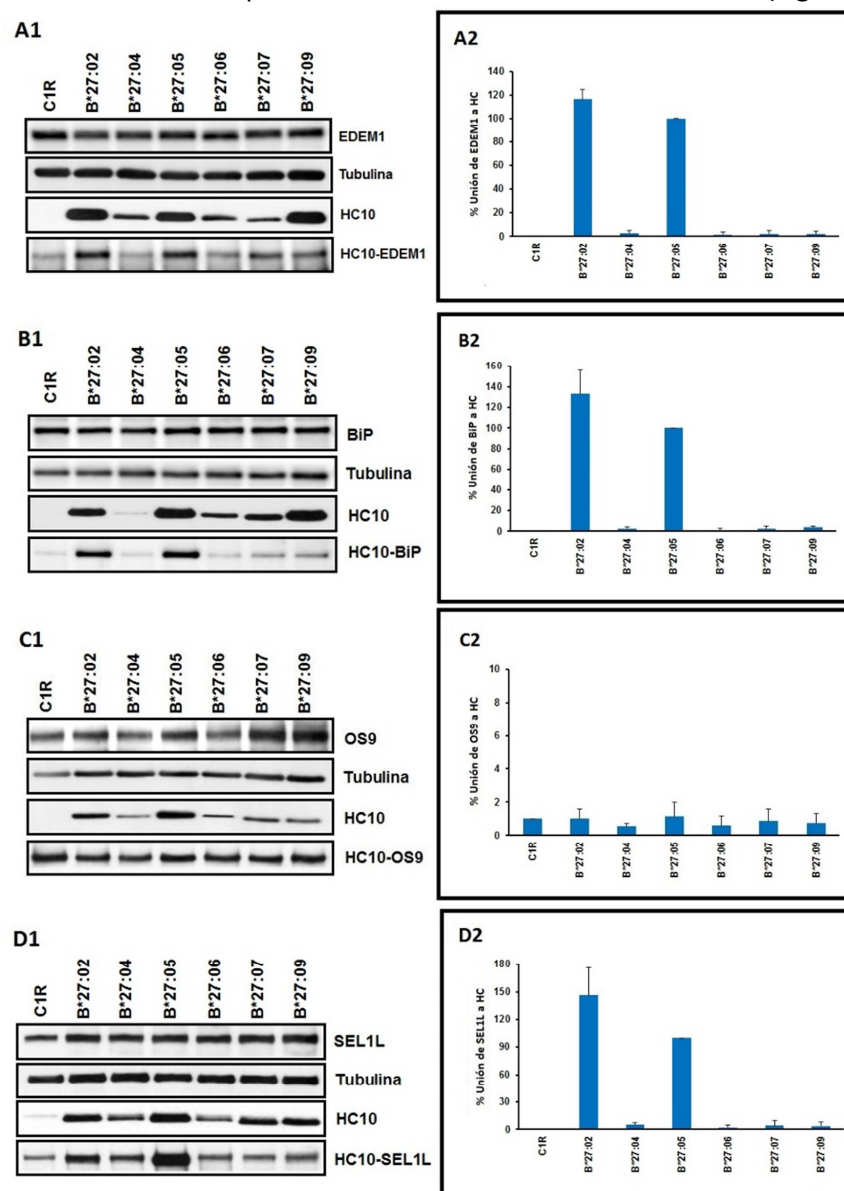
Se analizó la asociación de la calnexina con los distintos subtipos de HLA-B27 mediante la inmunoprecipitación de la cadena pesada con el anticuerpo monoclonal HC10 y la detección mediante western blot de la chaperona calnexina. El subtipo B\*27:05 se tomó como referencia, representando el 100% de unión. La calnexina se une a la HC de todos los subtipos de HLA-B27, aunque en diferente porcentaje. La unión más alta corresponde a la HC de los subtipos asociados a enfermedad y que se pliegan de forma anómala, B\*27:05 y B\*27:02. El subtipo B\*27:02 se une por encima del 100%, mientras que en el resto de subtipos, incluyendo B\*27:04, que también se pliega de forma anómala, la unión es menor del 10%. B\*27:09 que se pliega correctamente se une alrededor de un 20% (**Figura 15**). Estos resultados demuestran que los subtipos de HLA-B27 que se pliegan de forma anómala entran en el ciclo de la calnexina, en un intento de plegarse correctamente.



**Figura 15. Unión de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 a la calnexina.** (A) Los lisados de los transfectantes que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 y las células C1R sin transfectar se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal HC10, se analizaron mediante SDS-PAGE y se realizó un western blot con el anticuerpo  $\alpha$ -calnexina (B) Representación gráfica de las cuantificaciones realizadas tomando como referencia (100%) el valor de B\*27:05. Las gráficas representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

## 1.2 Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de reconocimiento y marcaje de sustratos de la vía de ERAD.

El primer módulo de la vía de ERAD es el de reconocimiento y marcaje de los sustratos mal plegados y en él participan EDEM1, OS9, BiP y SEL1L. EDEM1 es una enzima con actividad de manosidasa que extrae a las proteínas mal plegadas del ciclo de la calnexina, OS9 es una lectina del RE que se une a los glicanos procesados por EDEM1 y BiP es una chaperona Hsp70 que colabora en el reconocimiento de glicoproteínas mal plegadas. SEL1L es una proteína adaptadora que une factores de reconocimiento de sustrato a la E3 ligasa Hrd1 y permite la transferencia del sustrato a la ligasa. El análisis de la interacción con estos componentes se realizó mediante la inmunoprecipitación de la HC con el anticuerpo monoclonal HC10 y la detección de los diferentes componentes asociados mediante western blot (**Figura 16**).



**Figura 16.** Unión de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 a proteínas del módulo de marcaje y reconocimiento de sustratos de la vía de ERAD. Los lisados de los transfectantes que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 y las células C1R sin transfectar se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal HC10 y se realizaron western blots con los anticuerpos (A1)  $\alpha$ -EDEM1, (B1)  $\alpha$ -BiP, (C1)  $\alpha$ -OS9 y (D1)  $\alpha$ -SEL1L por separado y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. (A2, B2, C2, D2) Representación gráfica de las cuantificaciones realizadas a los western blots correspondientes. En (A2, B2, D2) se tomó como referencia (100%) el valor de B\*27:05 mientras que en (C2) se tomó como referencia (1%) el valor de C1R. Las gráficas representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

EDEM1, BiP y SEL1L se unen a la HC de todos los subtipos de HLA-B27, aunque en diferentes proporciones, tratándose de una unión específica. En estos tres casos el subtipo B\*27:05 se tomó como referencia, representando el 100% de unión. La unión más alta corresponde a la HC de los subtipos asociados a enfermedad y que se pliegan de forma anómala, B\*27:05 y B\*27:02. La unión de EDEM1 (**Figura 16A**), BiP (**Figura 16B**) y SEL1L (**Figura 16D**) al subtipo B\*27:02 es superior al 100%, mientras que en el resto de subtipos, incluyendo B\*27:04, que también se pliega de forma anómala, la unión es menor del 10%.

OS9 (**Figura 16C**) se une a la HC de los diferentes subtipos de HLA-B27 en un porcentaje similar a la unión a la HC de las células C1R sin transfectar, indicando que se trata de una unión inespecífica.

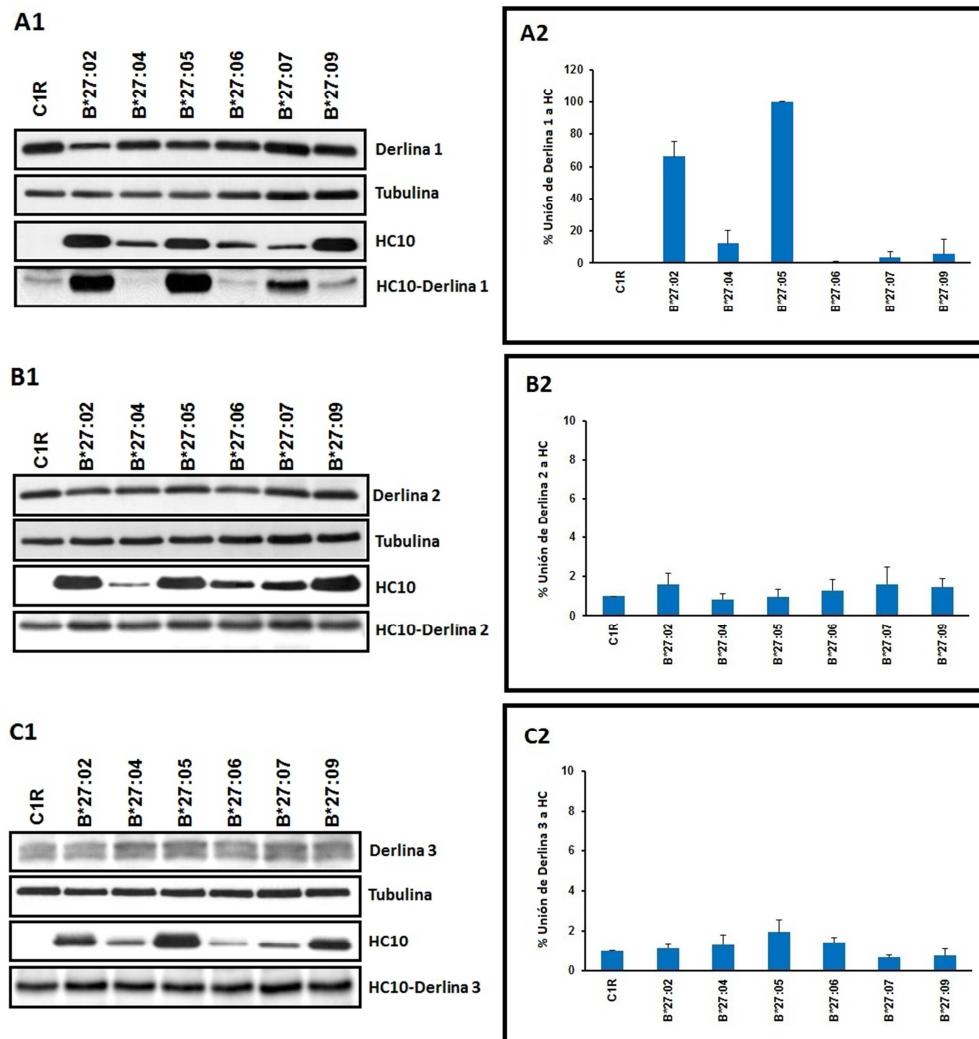
Estos resultados demuestran que los subtipos de HLA-B27 que se pliegan de forma anómala entran en el ciclo de marcaje y reconocimiento de sustratos de la vía de ERAD, en un intento de plegarse correctamente. Probablemente, OS9 no participa en la vía de ERAD encargada de eliminar las cadenas pesadas mal plegadas de los subtipos de HLA-B27.

### **1.3 Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de inicio de la retrotranslocación de la vía de ERAD.**

El segundo módulo de la vía de ERAD es el del inicio de la retrotranslocación y en él participan las Derlinas. Las Derlinas ejercen de adaptadores de sustratos integrados en la membrana y se unen a las E3 ligasas de membrana como Hrd1, gp78 y TRC8. Estas proteínas no actúan necesariamente de forma simultánea. Su interacción con HLA-B27 se analizó mediante la inmunoprecipitación de la HC con el anticuerpo monoclonal HC10 y la detección mediante western blot de los componentes asociados de este módulo (**Figura 17**).

En este módulo, la Derlina-1 se une a todos los subtipos de HLA-B27, aunque con diferente proporción, tratándose de una unión específica (**Figura 17A**). El subtipo B\*27:05 se tomó como referencia y se le asignó el 100% de unión a la Derlina-1. La unión más alta corresponde a la HC de los subtipos asociados a enfermedad y que se pliegan de forma anómala, B\*27:05 y B\*27:02. La unión de la Derlina-1 al subtipo B\*27:02 es de un 66% y a B\*27:04 de un 12%, mientras que la unión al resto de subtipos es inferior al 6%.

La Derlina-2 (**Figura 17B**) y la Derlina-3 (**Figura 17C**) se unen a la HC de todos los subtipos de HLA-B27 en proporción similar a la unión a las células sin transfectar, tratándose de una interacción inespecífica.

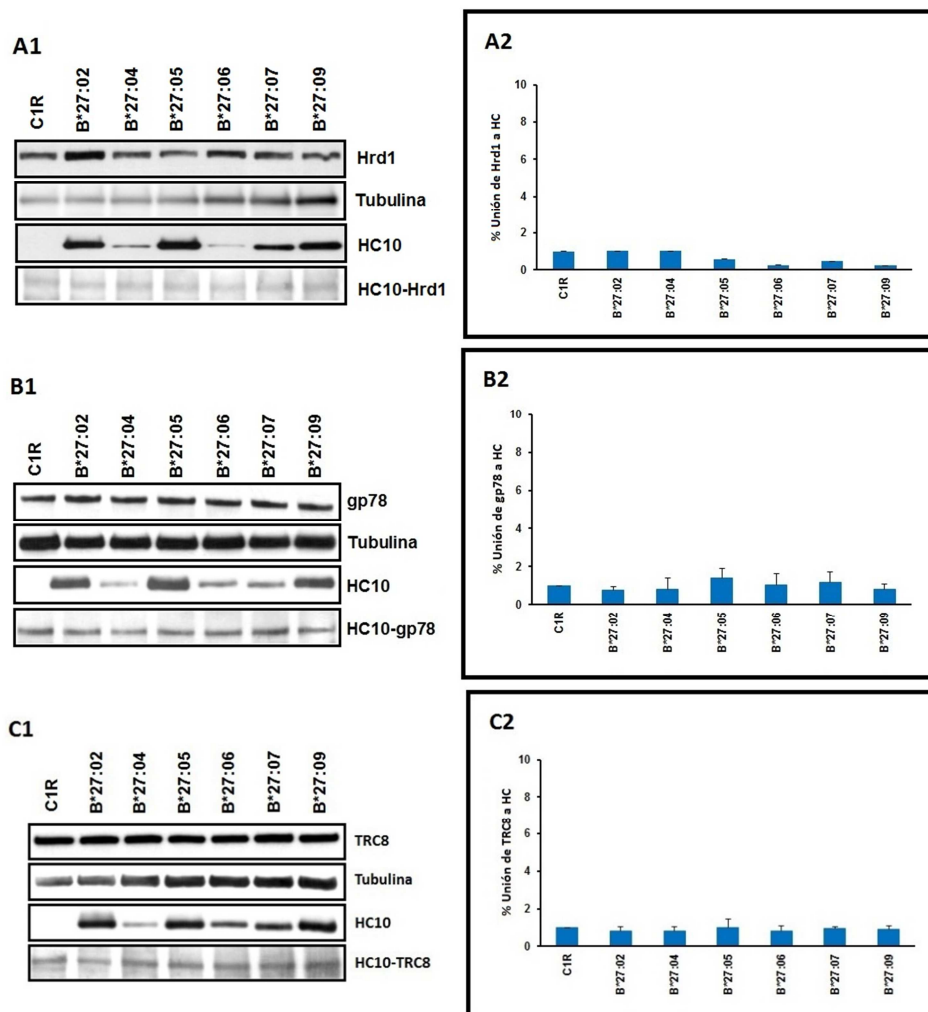


**Figura 17. Unión de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 a proteínas del módulo de inicio de la retrotranslocación de la vía de ERAD.** Los lisados de los transfectantes que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 y las células C1R sin transfectar se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal HC10 y se realizaron western blots con los anticuerpos (A1)  $\alpha$ -Derlina-1, (B1)  $\alpha$ -Derlina-2 y (C1)  $\alpha$ -Derlina-3 por separado y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. (A2, B2, C2) Representación gráfica de las cuantificaciones realizadas a los western blots correspondientes. En (A2) se tomó como referencia (100%) el valor de B\*27:05 mientras que en (B2 y C2) se tomó como referencia (1%) el valor de C1R. Las gráficas representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Estos resultados demuestran que las cadenas pesadas de los subtipos de HLA-B27 que se pliegan de forma anómala se asocian con la Derlina-1 y entran en el ciclo de inicio de la retrotranslocación de la vía de ERAD, en un intento de plegarse correctamente. La Derlina-2 y la Derlina-3 no participan en la vía de ERAD encargada de eliminar las cadenas pesadas mal plegadas de los subtipos de HLA-B27.

#### 1.4 Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de ubiquitinación de la vía de ERAD.

El tercer módulo de la vía de ERAD consiste en la ubiquitinación de las proteínas mal plegadas y en él participan las E3 ligasas de membrana como Hrd1, gp78 y TRC8. Estas E3 ligasas de membrana realizan ciclos de ubiquitinación y desubiquitinación. Para analizar su interacción con HLA-B27 se realizó, como en experimentos anteriores, la inmunoprecipitación de la HC con el anticuerpo monoclonal HC10 y la detección de las E3 ligasas de membrana asociadas mediante western blot (**Figura 18**).



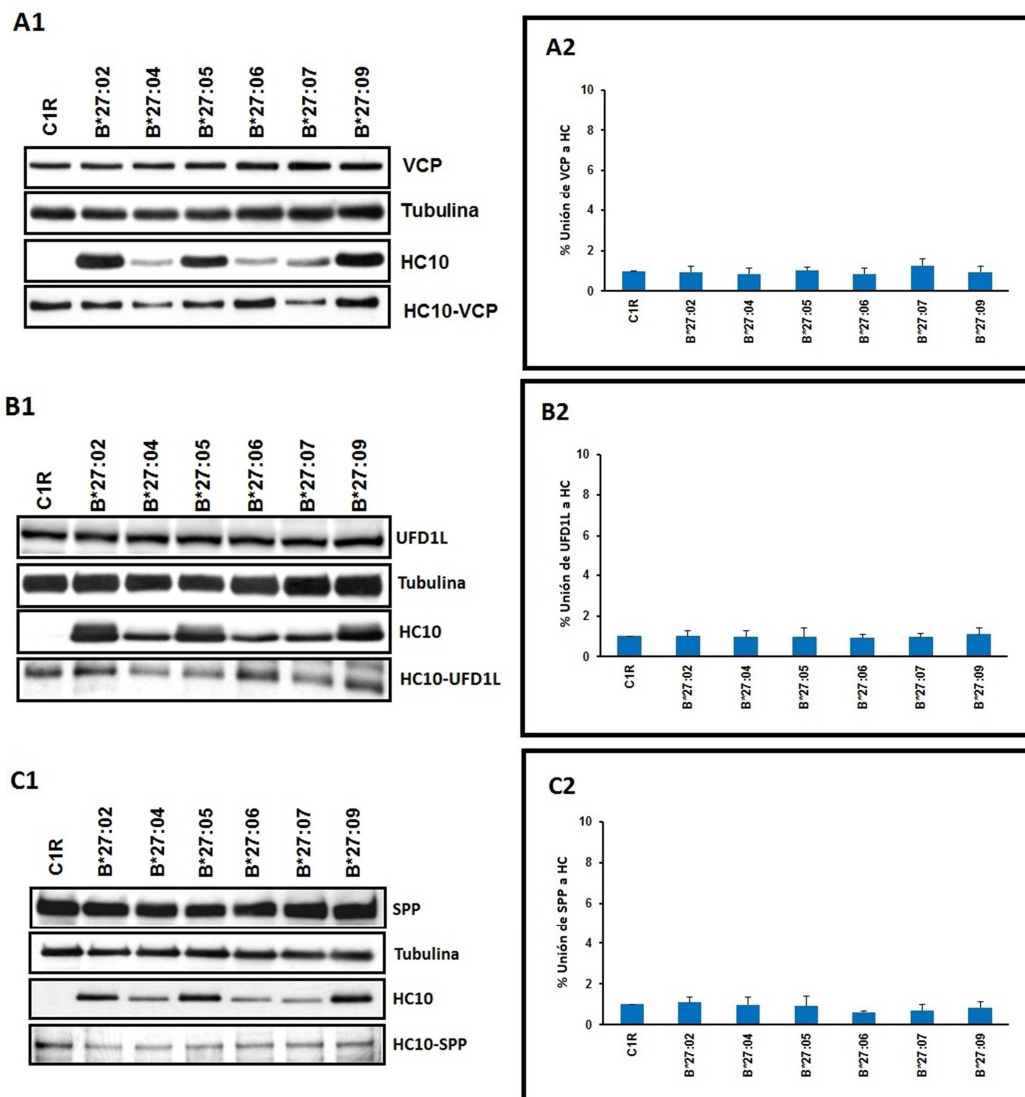
**Figura 18. Unión de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 a proteínas del módulo de ubiquitinación de la vía de ERAD.** Los lisados de los transfectantes que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 y las células C1R sin transfectar se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal HC10 y se realizaron western blots con los anticuerpos (A1)  $\alpha$ -Hrd1, (B1)  $\alpha$ -gp78 y (C1)  $\alpha$ -TRC8 por separado y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. (A2, B2, C2) Representación gráfica de las cuantificaciones realizadas de los western blots correspondientes. Al tratarse de interacciones inespecíficas se tomó como referencia (1%) el valor de C1R. Las gráficas representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

En este estudio se observó que las tres E3 ligasas de membrana estudiadas se unen a la HC de todos los subtipos de HLA-B27 en proporción similar a la unión a células C1R sin transfectar, indicando que se trata de una unión inespecífica. Estos resultados demuestran que las cadenas pesadas de los subtipos de HLA-B27 que se pliegan de forma anómala, no interactúan con las E3 ligasas Hrd1, gp78 y TRC8 y por tanto no son marcadas con ubiquitina para iniciar su degradación por el proteasoma.

### 1.5 Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de dislocación de la vía de ERAD.

El cuarto módulo de la vía de ERAD es el de la dislocación de las proteínas mal plegadas del RE al citosol para su posterior degradación por el proteasoma. En este módulo participan las proteínas VCP y UFD1L. Estas dos proteínas forman parte de un complejo que acopla la hidrólisis de ATP al despliegue y la extracción de las proteínas mal plegadas. SPP se requiere para la dislocación de determinadas proteínas de membrana mal plegadas. Del mismo modo que en módulos anteriores, se inmunoprecipitó la HC de HLA-B27 con el anticuerpo

monoclonal HC10 y se detectaron las proteínas asociadas de este módulo mediante western blot (Figura 19).



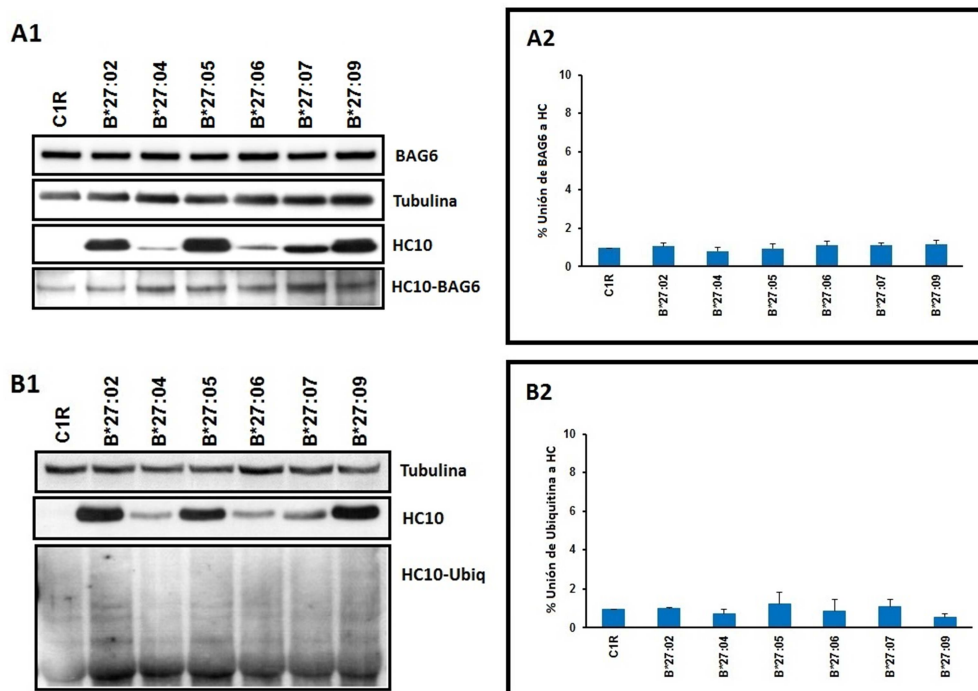
**Figura 19. Unión de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 a proteínas del módulo de dislocación de la vía de ERAD.** Los lisados de los transfectantes que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 y las células C1R sin transfectar se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal HC10 y se realizaron western blots con los anticuerpos (A1)  $\alpha$ -VCP, (B1)  $\alpha$ -UFD1L y (C1)  $\alpha$ -SPP por separado y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. (A2, B2, C2) Representación gráfica de las cuantificaciones realizadas de los western blots correspondientes. Al tratarse de interacciones inespecíficas se tomó como referencia (1%) el valor de C1R. Las gráficas representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

En este estudio se observó que VCP, UFD1L y SPP se unen a la HC de todos los subtipos de HLA-B27 en proporción similar a su unión a células C1R sin transfectar, tratándose de una unión no específica.

Estos resultados demuestran que las cadenas pesadas de los subtipos de HLA-B27 que se pliegan de forma anómala, no interactúan con los componentes del módulo de dislocación de la vía de ERAD y por tanto quedan retenidas en el RE, evitando su degradación por el proteasoma.

## 1.6 Asociación de la cadena pesada de HLA-B27 a los componentes del módulo de la vía de ERAD de transporte al proteasoma.

El quinto módulo de la vía de ERAD consiste en el transporte de las proteínas ubiquitinadas al proteasoma y en él participan proteínas como BAG6. Además, se analizó la ubiquitinación de las cadenas pesadas de los subtipos de HLA-B27. Del mismo modo que en módulos anteriores, se realizó la inmunoprecitación de la HC de HLA-B27 con el anticuerpo monoclonal HC10 y se detectaron las proteínas asociadas de este módulo mediante western blot (**Figura 20**).



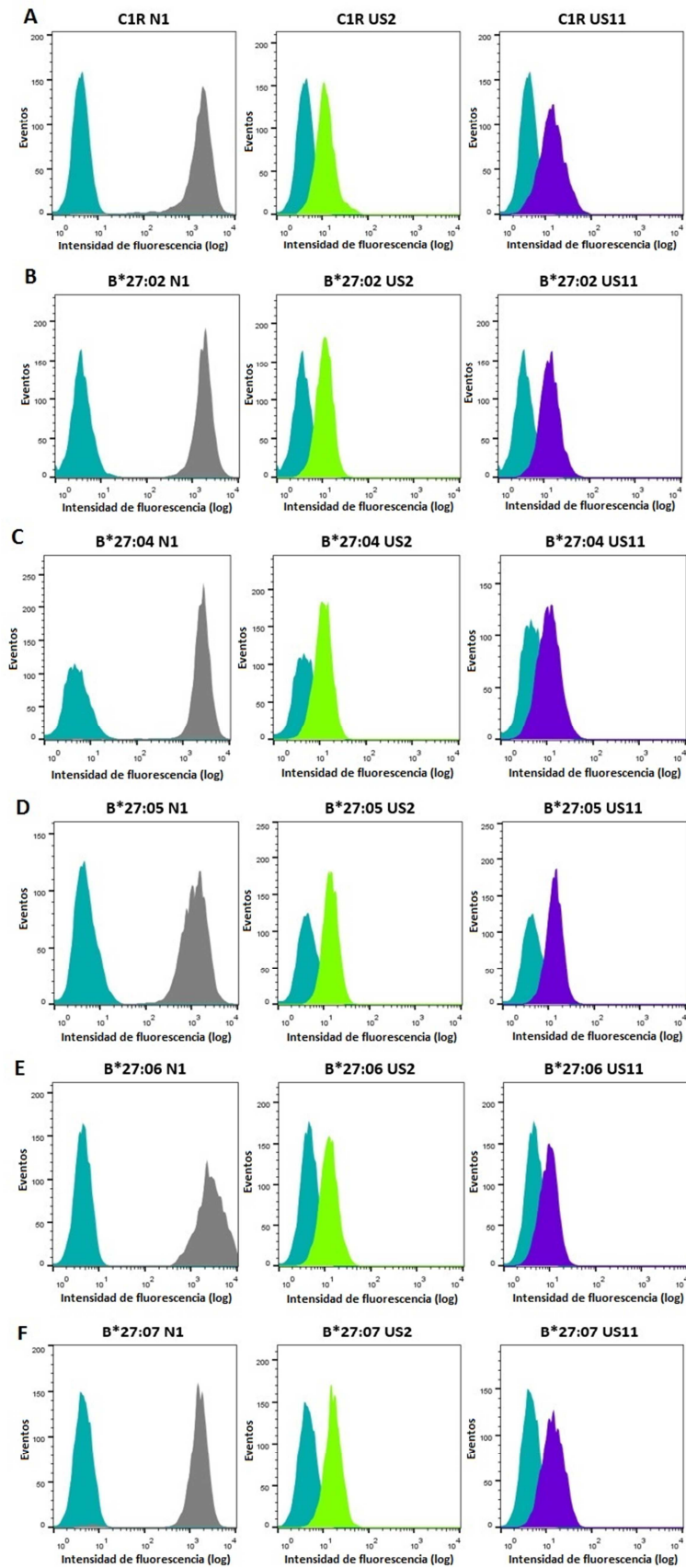
**Figura 20.** Unión de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 a proteínas del módulo de transporte al proteasoma de la vía de ERAD. Los lisados de los transfectantes que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 y las células C1R sin transfectar se inmunoprecitaron con el anticuerpo monoclonal HC10 y se realizaron western blots con los anticuerpos (A1)  $\alpha$ -BAG6 y (B1)  $\alpha$ -ubiquitina por separado y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. (A2, B2) Representación gráfica de las cuantificaciones realizadas de los western blots correspondientes. Al tratarse de interacciones inespecíficas se tomó como referencia (1%) el valor de C1R. Las gráficas representan la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

La unión de BAG6 (**Figura 20A**) y el patrón de ubiquitinación (**Figura 20B**) de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 es similar al observado en células C1R sin transfectar.

Estos resultados demuestran que las cadenas pesadas de los subtipos de HLA-B27 que se pliegan de forma anómala, no interactúan con los componentes del módulo de transporte al proteasoma la vía de ERAD y tampoco son ubiquitinadas evitando así su degradación por el proteasoma.

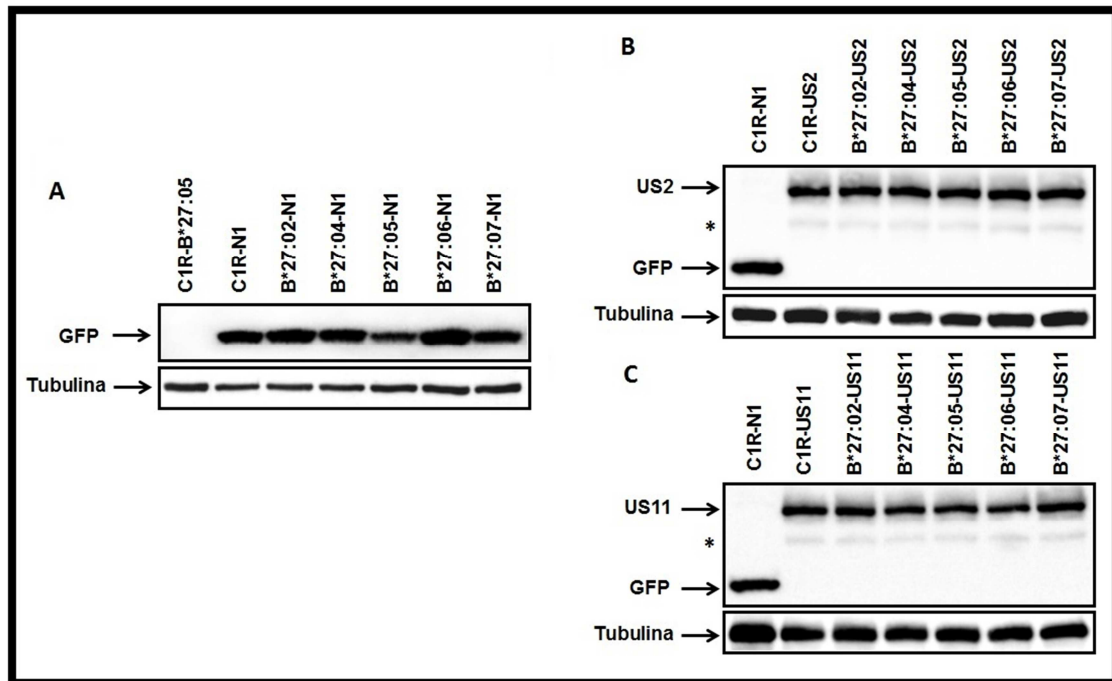
## 2 Generación de transfectantes estables de las proteínas virales US2 o US11 en células C1R que expresan los distintos subtipos de HLA-B27.

La generación de transfectantes estables con el vector pEGFP-N1 permitió monitorizar la expresión de EGFP como control de la transfección y de las proteínas de fusión GFP-US2 y GFP-US11 mediante citometría de flujo. Se obtuvieron transfectantes estables para todos los subtipos de HLA-B27 usados en este estudio a excepción del subtipo B\*27:09 (**Figura 21**). La expresión de US2 y US11 en todos los subtipos analizados es mucho menor que la obtenida con el vector vacío.



**Figura 21. Expresión de las proteínas virales de fusión EGFP-US2 y EGFP-US11.** La expresión de US2, US11 y del vector vacío en los transfectantes que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 y las células C1R sin transfectar se analizó por citometría de flujo. A) C1R, B) C1R-B\*27:02, C) C1R-B\*27:04, D) C1R-B\*27:05, E) C1R-B\*27:06 y F) C1R-B\*27:07. Turquesa: células control sin transfectar; Gris: células con el vector vacío; Verde: células con US2; Morado: células con US11.

La expresión de las proteínas de fusión a EGFP, US2 o US11 en los diferentes transfectantes obtenidos se verificó mediante western blot con el anticuerpo  $\alpha$ -GFP (**Figura 22**). La expresión del vector vacío es diferente en los distintos subtipos de HLA-B27, siendo B\*27:06 el subtipo que más expresa. La expresión de US2 y US11 es similar en todos los transfectantes analizados. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos mediante citometría de flujo.



**Figura 22. Expresión de las proteínas virales de fusión EGFP-US2 y EGFP-US11 por western blot.** Expresión en células C1R sin transfectar y en células C1R que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 A) del vector p-EGFP (N1). Como control se utilizaron las células C1R-B\*27:05. B) de la proteína viral US2 y C) de la proteína viral US11. Como control se utilizaron las células C1R-N1. En los geles de las proteínas de fusión US2 y US11, se cargó diferente cantidad de células para poder mostrar simultáneamente las células control transfectadas con el vector vacío (50.000 células) y las células transfectadas con US2 o US11 (10 millones células). (\*) Señala la presencia de un polipéptido inespecífico.

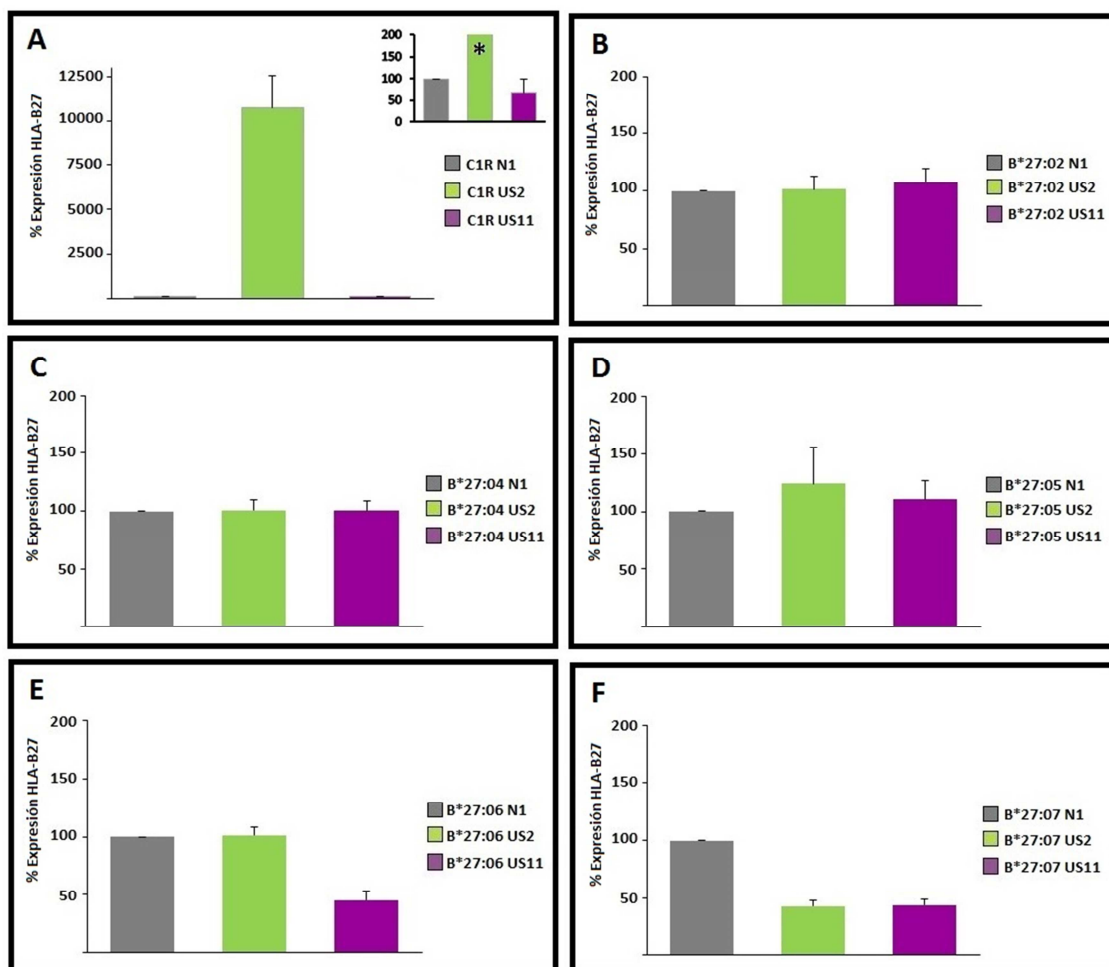
### 3 Modulación de la expresión de HLA-B27 en presencia de US2 y US11.

La presencia de las proteínas virales US2 o US11 en las células que expresan HLA-B27 debería dirigir la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 al citosol para su posterior degradación por el proteasoma y disminuir así su expresión en superficie. En este apartado compararemos el comportamiento de los subtipos asociados a EA (B\*27:05, B\*27:02, B\*27:04 y B\*27:07) y los no asociados B\*27:06 y B\*27:09 en presencia de US2 y US11. La expresión de US2 y US11 se verificó por citometría de flujo, analizando la expresión de EGFP. Concomitantemente, se analizó la expresión en superficie de HLA-B27 con el anticuerpo monoclonal ME1 (**Figura 23**).

En los subtipos B\*27:02, B\*27:04 y B\*27:05, ni la presencia de US2 ni la de US11 disminuye la expresión de HLA-B27 (**Figura 23 B, C y D**), incluso, la expresión de B\*27:05 aumenta ligeramente en presencia de US2 (**Figura 23 D**). En B\*27:06 y B\*27:07, US11 disminuye la expresión de HLA-B27 en más del 50% (**Figura 23 E, F**) y US2 lo hace además en B\*27:07 en aproximadamente un 50% (**Figura 23 F**).

US2 y US11 utilizan dos vías mutuamente excluyentes para eliminar los antígenos de HLA de clase I. US11 utiliza la vía más común, que incluye a las Derlinas, p97, Hrd1 y SEL1L, mientras que US2 utiliza la vía de la peptidasa señal. Estos resultados indican que en los subtipos asociados a la EA, excepto B\*27:07, el acúmulo de HC en el RE obedece a la imposibilidad de utilizar la vía de ERAD para eliminar la cadena pesada de HLA-B27 mal plegada.

En el caso de C1R se observa que en presencia de US2, ME1 reconoce de forma inespecífica algún epítipo que posiblemente aparece en presencia de esta proteína viral. En presencia de US11, disminuye en aproximadamente un 30% el reconocimiento de algún epítipo que aparece en presencia de esta proteína viral (**Figura 23 A**). Este reconocimiento es inespecífico puesto que C1R no expresa HLA-B27.



**Figura 23. Expresión de HLA-B27 en presencia de US2 o US11.** Se analizó la expresión de HLA-B27 por citometría de flujo con el anticuerpo monoclonal ME1. A) Expresión de HLA-B27 en la superficie de células C1R a dos escalas. El resto de gráficas muestra la expresión de HLA-B27 en la superficie de los transfectantes de células C1R que expresan los distintos subtipos de HLA-B27 B) B\*27:02, C) B\*27:04, D) B\*27:05, E) B\*27:06 y F) B\*27:07. Gris: pEGFP (N1); Verde: US2; Morado: US11. \*La expresión de C1R-US2 es superior a la escala de la gráfica representada en la esquina superior derecha.

#### **4 Ineficiencia de la vía de ERAD, en presencia de los productos virales US2 y US11, para eliminar las cadenas pesadas mal plegadas de los subtipos de HLA-B27 asociados a enfermedad.**

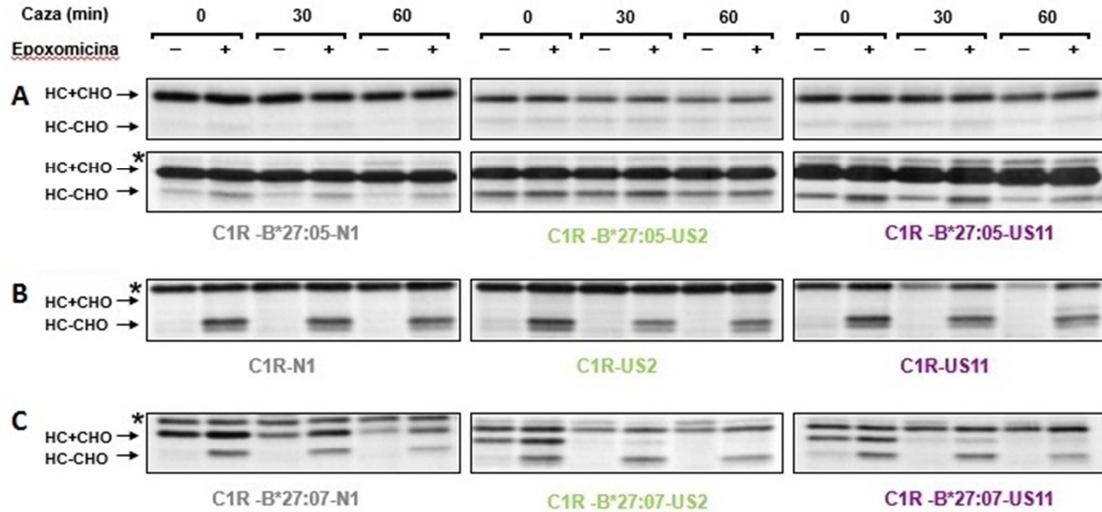
Las proteínas que se pliegan de forma anómala en el RE deberían ser eliminadas mediante la vía de ERAD para evitar su agregación. En resumen, la vía de ERAD disloca las proteínas mal plegadas al citosol, estas se deglicosilan, posteriormente se ubiquitinan y finalmente son degradadas por el proteasoma.

En experimentos previos de pulso y caza, se demostró que la vida media de las cadenas pesadas de B\*27:05, B\*27:02 y B\*27:04 en el RE es aproximadamente de 2 horas, pudiéndose observar en el RE incluso a las 4 horas de caza, mientras que B\*27:06, B\*27:07 y B\*27:09 están ausentes después de 30 minutos de caza y su vida media es menor de 20 minutos [78].

En presencia de US2 o US11, la vida media de la HC de los antígenos de clase I es menor de 1 minuto, por lo tanto se requieren inhibidores del proteasoma para visualizar la HC dislocada al citosol. Para analizar si la cadena pesada mal plegada de HLA-B27 es degradada por el proteasoma en presencia de US2 y US11, se analizó, en presencia de inhibidores del proteasoma, la reacción de dislocación mediante el análisis de la desaparición del glicano unido a la cadena pesada. Este proceso, supone la aparición de un producto de 40 kDa que corresponde a la HC deglicosilada, y la desaparición de la mayoría del producto de 43 kDa que corresponde a la HC glicosilada. Las células C1R y las células C1R transfectadas de forma estable con los distintos subtipos de HLA-B27, US2 y US11 se marcaron metabólicamente, durante 15 minutos con [<sup>35</sup>S] metionina-cisteína en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma, epoxomicina y se cazaron a distintos tiempos. Las células se lisaron y posteriormente se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal HC10. El material inmunoprecipitado se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras.

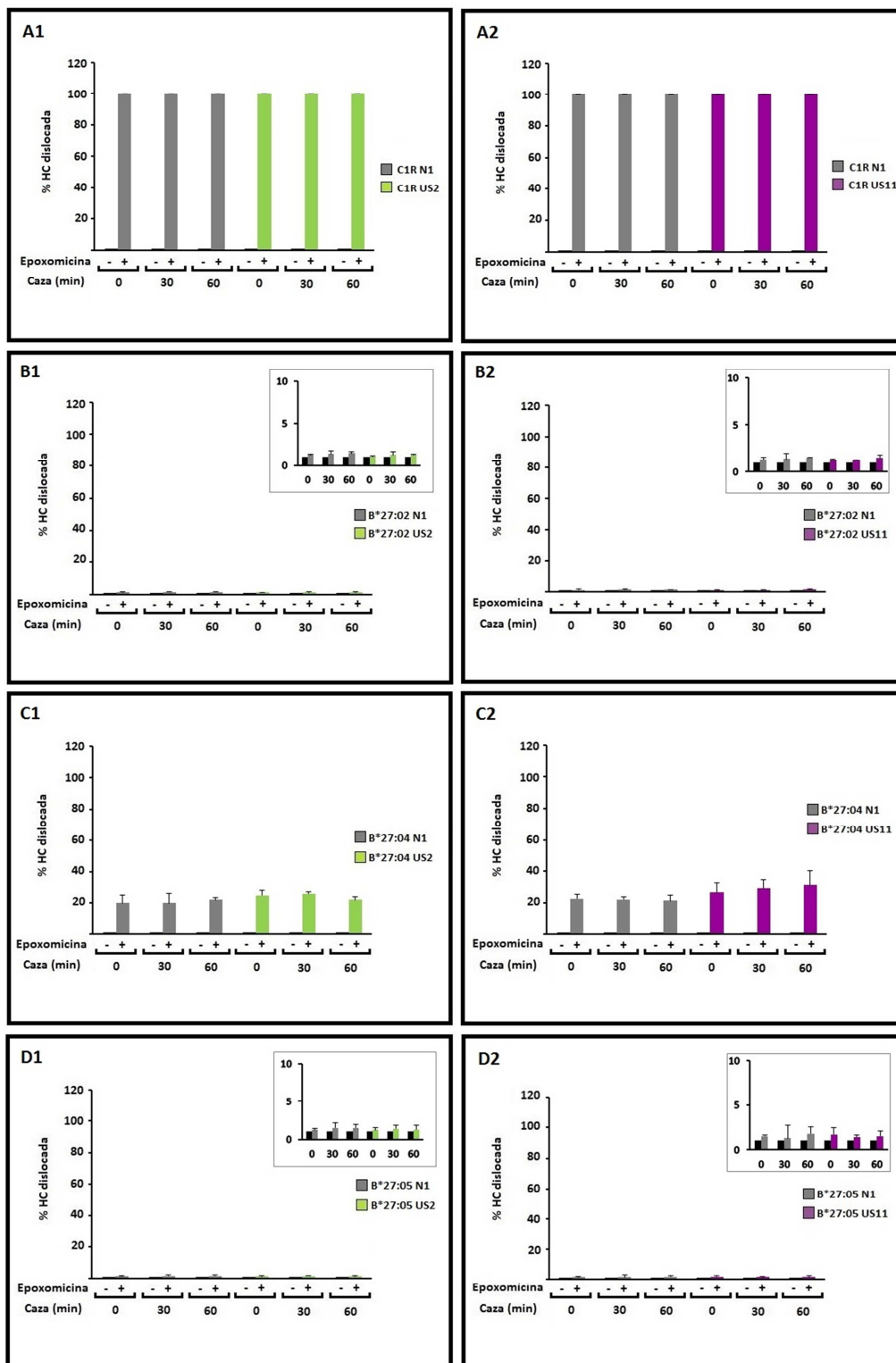
En presencia de epoxomicina, la mayoría de la cadena pesada de B\*27:05 permanece glicosilada, tanto en células control, como en presencia de US2 y US11 (**Figura 24 A**). Solo se detectó una tenue banda de 40 kDa, nunca superior al fondo observado en las células C1R que no expresan HLA-B27. Esta banda puede representar las moléculas de clase I endógenas presentes en C1R. En células C1R, toda la cadena pesada endógena está deglicosilada, tanto en las células control como en presencia de US2 y US11 (**Figura 24 B**). En B\*27:07 la cinética de dislocación es distinta. En presencia de US2 y US11, la cadena pesada deglicosilada sustituye a la glicosilada en el tiempo, fenómeno que no se observa en las células B\*27:07 control (**Figura 24 C**).

En todos los casos se observa una débil banda de 40kDa que aumenta ligeramente en presencia de epoxomicina y que corresponde a los antígenos endógenos de C1R.

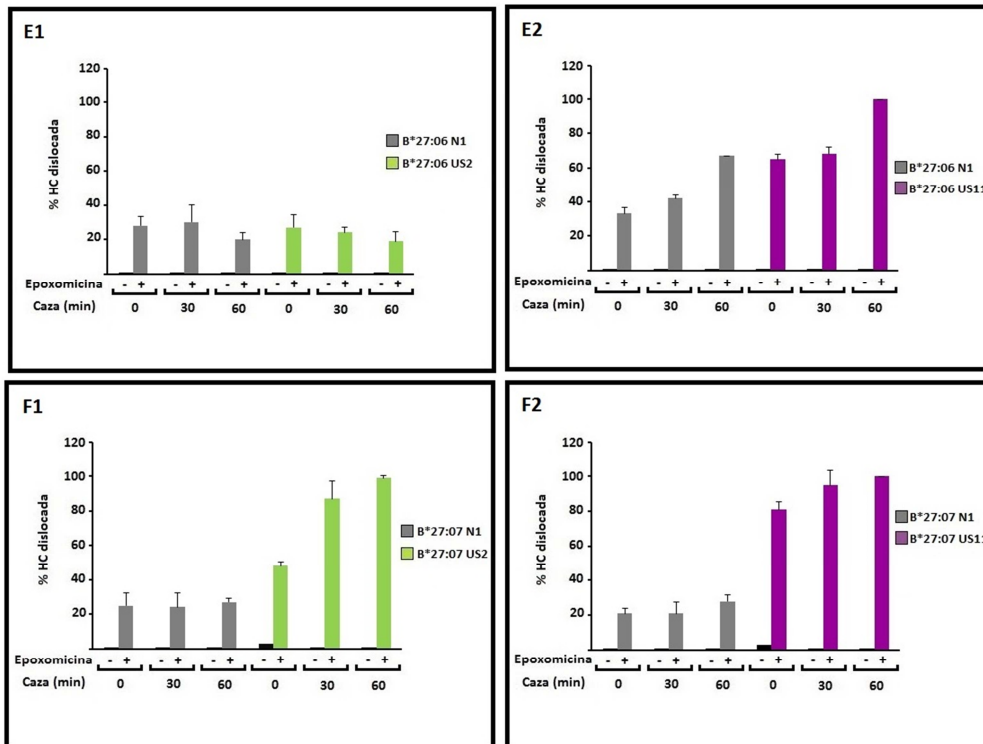


**Figura 24. ERAD de la HC de los subtipos de HLA-B27 en presencia de US2 o US11.** Las células C1R se marcaron durante 15 minutos con [<sup>35</sup>S] metionina-cisteína y se cazaron durante una hora en presencia o ausencia de epoxomicina. La HC se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal HC10 y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. La epoxomicina se usó como se ha descrito en Materiales y Métodos. A) Se muestra el estado de glicosilación en células C1R que expresan B\*27:05 transfectadas con el vector pEGFP y las mismas células transfectadas con US2 o US11. B) Se muestra el estado de glicosilación en células C1R transfectadas con el vector pEGFP (N1) y células C1R transfectadas con US2 o US11. C) Se muestra el estado de glicosilación en células C1R que expresan B\*27:07 transfectadas con el vector pEGFP y las mismas células transfectadas con US2 o US11. Se indican las cadenas pesadas glicosiladas (HC+CHO) y las cadenas pesadas deglicosiladas (HC-CHO). Los asteriscos señalan polipéptidos inespecíficos.

En los subtipos B\*27:02, B\*27:04 y B\*27:05 la HC permanece glicosilada tanto en presencia de US2 como de US11 (**Figura 25, B, C y D**). En cambio, la presencia de US2 supone la deglicosilación de la HC del subtipo B\*27:07 y la presencia de US11 en los subtipos B\*27:06 y B\*27:07 confirmando así el efecto sobre la expresión de la HC en superficie por citometría de flujo (**Figura 26, E y F**).



**Figura 25. Dislocación de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 en presencia de US2 o US11.** Las células C1R se marcaron durante 15 minutos con [<sup>35</sup>S] metionina-cisteína y se cazaron durante una hora en presencia o ausencia de epoxomicina. La HC se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal HC10 y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. La epoxomicina se usó como se ha descrito en Materiales y Métodos. Representación gráfica del porcentaje de HC dislocada en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma epoxomicina en células transfectadas con US2 (verde) y con US11 (morado) en comparación a las células sin transfectar (gris). (A) C1R, (B) B\*27:02, (C) B\*27:04, (D) B\*27:05.



**Figura 26. Dislocación de la HC de los distintos subtipos de HLA-B27 en presencia de US2 o US11.** Las células C1R se marcaron durante 15 minutos con [<sup>35</sup>S] metionina-cisteína y se cazaron durante una hora en presencia o ausencia de epoxomicina. La HC se inmunoprecipitó con el anticuerpo monoclonal HC10 y las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. La epoxomicina se usó como se ha descrito en Materiales y Métodos. Representación gráfica del porcentaje de HC dislocada en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma epoxomicina en células transfectadas con US2 (verde) y con US11 (morado) en comparación a las células sin transfectar (gris). (E) B\*27:06 y (F) B\*27:07.

Estos resultados indican que las cadenas pesadas de los subtipos de HLA-B27 asociados a enfermedad, excepto B\*27:07, permanecen en el RE incluso en presencia de US2 y US11. Por lo tanto, las cadenas pesadas de los subtipos de HLA-B27 que se pliegan mal y están asociados a enfermedad, excepto B\*27:07, permanecen en el RE y no son sustratos de ERAD. Esta vía que regula la homeostasis celular es ineficiente en este caso.

## VIII. DISCUSIÓN



La Espondilitis anquilosante (EA) podría ser el resultado conjunto del plegamiento anómalo del antígeno de histocompatibilidad HLA-B27 y de la imposibilidad de las vías de control de calidad y de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) de eliminar las cadenas pesadas mal plegadas de HLA-B27 del retículo endoplásmico. En estudios previos se sugirió que la estructura del bolsillo B de HLA-B27 implicaba una cinética de plegamiento lento y la tendencia a plegarse mal de este antígeno de clase I y que, aparentemente, la cadena pesada de B\*27:05 mal plegada era degradada por el proteasoma, probablemente utilizando la vía de ERAD [77]. Surgió así la hipótesis del plegamiento anómalo para explicar la patogenia de la EA, apoyada por estudios que confirmaban, en ratas transgénicas, la implicación del plegamiento anómalo de HLA-B27 en la inflamación intestinal, pero no en la artritis y espondilitis en este modelo animal [98]. Ninguno de estos estudios tuvo en cuenta la asociación diferencial de los subtipos de HLA-B27 con la enfermedad, analizándose solo el comportamiento del subtipo mayoritario asociado a la EA, B\*27:05. Posteriormente, se demostró la existencia de una asociación incompleta entre el plegamiento anómalo de los subtipos de HLA-B27 y su asociación con la EA, y como el polimorfismo de los subtipos, que comparten el bolsillo B, influye en su correcto plegamiento [78]. En este estudio se analizaron dos parámetros para monitorizar el plegamiento de HLA-B27, la vida media de la HC en el RE y el cociente HC10/ME1. La vida media define la tendencia a plegarse mal y el acúmulo en el RE, y el cociente HC10/ME1 la eficacia de plegamiento. Los subtipos asociados a enfermedad B\*27:05 y B\*27:02 presentan valores muy altos para estos dos parámetros, mientras que B\*27:04, también asociado a EA se pliega mejor y más rápido que B\*27:05 y B\*27:02, aunque una pequeña fracción de este subtipo es retenida en el RE debido al control de calidad. Considerando estos dos parámetros, B\*27:07, subtipo asociado a enfermedad, se comporta cómo los subtipos no asociados, B\*27:06 y B\*27:09 con valores muy bajos de vida media de la HC en el RE y de cociente HC10/ME1 [78]. Además, y en contradicción con el estudio mencionado anteriormente [77], se demostró que los subtipos de HLA-B27 que se pliegan de forma anómala se acumulan en el RE y no son degradados por el proteasoma, indicando un probable fallo o bloqueo en la vía de ERAD [78].

Por lo expuesto anteriormente y para analizar la vía de ERAD asociada a HLA-B27, en la presente tesis se plantearon dos objetivos: 1) analizar en qué paso se interrumpe la vía de ERAD en los subtipos de HLA-B27 asociados a EA y 2) identificar las vías de ERAD asociadas a la degradación de HLA-B27 mediante el uso de las proteínas virales US2 y US11. Para ello se analizó la interacción de la HC de los subtipos de HLA-B27 con los componentes de los distintos módulos de la vía de ERAD.

En el presente estudio hemos demostrado que: 1) Todos los subtipos de HLA-B27 analizados, asociados o no a la EA, se pliegan en mayor o menor grado de forma incorrecta. 2) La maquinaria celular encargada de eliminar las proteínas mal plegadas es ineficaz cuando se trata de HLA-B27. 3) El fallo radica en la transferencia de los complejos mal plegados al módulo de ubiquitinación, cuyo principal componente es la E3 ligasa de ubiquitina Hrd1. 4) No existe una asociación clara entre plegamiento anómalo y enfermedad. Es probable que una pequeña cantidad de cadena pesada acumulada en el RE no sea capaz de inducir la UPR y por ello B\*27:06 y B\*27:09 no se asocian a la enfermedad. La excepción sería B\*27:07.

## 1 Ensamblaje de HLA-B27.

El ensamblaje coordinado de los antígenos de clase I es un modelo excelente para analizar los mecanismos de control de calidad del RE. Los antígenos de clase I se glicosilan cotraduccionalmente y las formas monoglicosiladas interactúan con BiP, calnexina y ERp57 para favorecer su correcto plegamiento [2].

Un estudio previo señaló que los subtipos que se pliegan de forma anómala (B\*27:05, B\*27:02 y B\*27:04), permanecen unidos a la calnexina durante más tiempo que los que se pliegan bien (B\*27:06, B\*27:07 y B\*27:09), indicando una estancia prolongada de estos subtipos en el RE [78] y recientemente se ha demostrado la influencia de las posiciones 114 y 116 del bolsillo C/F en la unión a calnexina, BiP y ERp57 [84].

En un intento de plegarse correctamente, todos los subtipos de HLA-B27 entran en el ciclo de la calnexina. Una fracción de las cadenas pesadas de todos los subtipos de HLA-B27 analizados en este estudio es reconocida por la calnexina, lo que indica que en estadios iniciales todos los subtipos permanecen en el RE y presentan cierta tendencia a plegarse mal. De los subtipos asociados a enfermedad, B\*27:05 y B\*27:02 son los que más unen calnexina, siendo menor la unión de esta chaperona a B\*27:04. Estos resultados confirman que el plegamiento de B\*27:04 es más eficiente que el de B\*27:05 y B\*27:02 [78] y muestra una estrecha correlación con el tiempo que los subtipos de HLA-B27 tardan en alcanzar la superficie celular, siendo mayor en B\*27:05 y B\*27:02 y mucho menor en los subtipos no asociados a enfermedad y en los asociados B\*27:04 y B\*27:07 [78].

## 2 ERAD y HLA-B27.

Seguidamente, los antígenos de HLA-B27 mal plegados deberían ser dirigidos a la maquinaria de degradación celular por BiP. Todos los subtipos de HLA-B27 se unen a BiP, indicando que han sido reconocidos por la maquinaria de ERAD como sustratos mal plegados y han sido marcados para su degradación. Son los subtipos asociados a la enfermedad, B\*27:05 y B\*27:02 los que unen una mayor cantidad de BiP, siendo menor la unión a B\*27:04. Estos resultados confirman, otra vez, que el plegamiento de B\*27:04 es más eficiente que el de B\*27:05 y B\*27:02 y que el resto de subtipos sufren también cierto grado de mal plegamiento que no se pudo documentar en un estudio previo [78]. Se ha descrito que la expresión de BiP está aumentada en los macrófagos de ratas transgénicas para HLA-B\*27:05, lo cual sugiere un fallo en el plegamiento de HLA-B27 [90]. Además, en macrófagos derivados de pacientes con EA hay una sobreexpresión significativa de los genes de la UPR (BiP, CHOP y XBP-1) e IL-23 [97]. Se ha descrito que la asociación de BiP a proteínas mal plegadas libera sensores de estrés y activa la UPR [125]. El reclutamiento de BiP por los subtipos B\*27:02, B\*27:05 y también B\*27:04, en menor medida, podría desencadenar de este modo respuestas de estrés en el RE, activar la UPR y la OR, aumentar los niveles de IL-23 y producir inflamación al promover la expresión de IL-17 e IL-22 en células T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> ROR<sub>γt</sub> residentes en las entesis. Es probable que la menor unión de B\*27:06 y B\*27:07 a BiP no sea capaz de activar la UPR y la OR.

Se ha descrito que EDEM1 participa en la degradación de homodímeros de HLA-B\*27:05 con la participación de la E3 ligasa de ubiquitina Hrd1 y las proteínas adaptadoras Derlina-1 y Derlina-2. EDEM1 se une a homodímeros y a monómeros mal plegados de HLA-B27 y su actividad de manosidasa no es necesaria para su interacción con HLA-B27. La unión a EDEM1 y la transferencia al complejo Hrd1-SEL1L parece ser el paso limitante en la degradación de los homodímeros de HLA-B\*27:05 [82].

Que los subtipos de HLA-B27 analizados en este estudio interaccionen con EDEM1, supone que ya no pueden plegarse correctamente y que han sido excluidos de los ciclos de unión a calnexina por una extensiva eliminación de los residuos de manosa de su glicano y, por ello, comienza su camino a la degradación. Todos los subtipos de HLA-B27 se unen a EDEM1, indicando que han sido reconocidos por la maquinaria de ERAD como sustratos mal plegados y han sido marcados para su degradación. De los subtipos asociados a enfermedad, B\*27:05 y B\*27:02 son los que unen más EDEM1, siendo menor la unión a B\*27:04. Estos resultados confirman, otra vez, que el plegamiento de B\*27:04 es más eficiente que el de B\*27:05 y B\*27:02, pero indican también que en menor medida el resto de subtipos, que aparentemente se pliegan correctamente, no lo hacen como se sugirió en un estudio previo [78]. Es probable que por la metodología utilizada en este estudio [78] no se hayan detectado las formas mal plegadas de B\*27:06, B\*27:07 y B\*27:09. Además, la acumulación de cadenas pesadas de estos últimos tres subtipos en el RE es mucho menor que en el caso de B\*27:05, B\*27:02 y B\*27:04.

OS9 se une a las glicoproteínas sobre las que ha actuado la manosidasa EDEM1 y transfiere las proteínas terminalmente mal plegadas a SEL1L que las transferirá, para su degradación, al complejo principal de ERAD, cuyo componente central es Hrd1, que es la conexión con el sistema ubiquitina-proteasoma. Ninguno de los subtipos de HLA-B27 analizados se une a OS9, pero si se unen a SEL1L y a la Derlina-1. Puesto que OS9 parece ser un componente esencial de la vía de ERAD y su actuación es previa a la de SEL1L y la Derlina-1, es posible que en el caso de HLA-B27 sea otra proteína adaptadora, todavía no identificada, la encargada de transferir a los subtipos de HLA-B27 mal plegados al complejo SEL1L-Hrd1. Otra vez, el patrón de unión de los subtipos de HLA-B27 a SEL1L y a la Derlina-1 indica que en distinto grado, todos los subtipos de HLA-B27 se pliegan de forma incorrecta.

A partir de la Derlina-1 se interrumpe la comunicación de HLA-B27 con la vía de ERAD. Ninguno de los subtipos de HLA-B27 analizados, asociados o no a enfermedad y que se pliegan todos ellos en mayor o menor medida de forma anómala, de acuerdo a nuestros datos, interaccionan con ninguno de los componentes de la vía de ERAD que actúan después de la Derlina-1. Ni con el resto de las derlinas, ni con Hrd1 (ubiquitinación), gp78, TRC8, VCP y UFD1L (dislocación), ni con BAG6, implicada en el transporte de sustratos mal plegados y ubiquitinados al proteasoma.

Se ha descrito que los antígenos de clase I son sustratos endógenos de la vía de ERAD. HLA-A2 y HLA-B\*27:05 son reconocidos por EDEM1, transferidos por OS9 y XTP3-B al complejo formado por SEL1L, la E3 ligasa Hrd1 y por la enzima que conjuga ubiquitina UBE2J1, extraídos del RE con la asistencia de p97 y posteriormente son degradados por el proteasoma [169] Estos estudios se realizaron en células Hela en las que en condiciones basales estas moléculas no se pliegan de forma anómala ni se acumulan en el RE. Solo al silenciar la  $\beta_2$ microglobulina y los componentes de la vía de ERAD mencionados, se observa el acúmulo de cadenas pesadas en el RE. Es posible que en los transfectantes de HLA-B27 en C1R utilizados en nuestro análisis, se esté produciendo este fenómeno pero de forma tan ineficaz o a tan baja escala que no seamos capaces de documentarlo. En cualquier caso, ERAD no es capaz de aliviar el acúmulo de cadenas pesadas en el RE en nuestros transfectantes. Excepto EDEM1 y SEL1L, ninguno de los componentes de ERAD definidos en el estudio mencionado interacciona con los subtipos de HLA-B27 y como resultado de ello tampoco observamos la ubiquitinación de las cadenas pesadas de HLA-B27.

No creemos que este fenómeno sea un artefacto observado en células C1R, pues también se observa el acúmulo de HLA-B\*27:05, HLA-B\*14:02 y HLA-B\*14:03 en células 721.220 [220] y en otro estudio en el que también se usaron células C1R transfectadas con HLA-B\*27:05, esta molécula se acumula en el RE y contrariamente a lo que señalan los autores, HLA-B\*27:05 no es degradada por ERAD [77]. Los autores obviaron incluir el control de las células C1R sin transfectar. Si es cierto, que una pequeña fracción de HLA-B\*27:05 se localiza en el citoplasma en presencia de inhibidores del proteasoma, pero corresponde a HLA-B35, presente en C1R como se documentó posteriormente [78].

### **3 Degradación mediada por los productos virales US2 y US11.**

Puesto que la maquinaria de ERAD es incapaz de eliminar las cadenas pesadas de HLA-B27 del RE, decidimos forzar esta maquinaria mediante el uso de las proteínas del citomegalovirus humano US2 y US11.

Los antígenos de clase I son degradados por el proteasoma en presencia de US2 y US11. Este proceso guarda un sorprendente parecido con la degradación de proteínas mal plegadas mediado por ERAD. En estadios iniciales, US2 y US11 usan como cofactor la proteína residente en el RE, TRAM1 [221], pero difieren en la maquinaria celular utilizada para dislocar la cadena pesada de los antígenos de MHC de clase I. US2 requiere la presencia de la peptidasa señal (SSP) [150], PDI [162] y también calnexina, calreticulina, BiP y la E3-ligasa TRC8, en lugar de Hrd1 [161]. US11 recluta un complejo de dislocación formado por las Derlinas -1 y -2, la AAA ATPasa p97 [152, 222], la E3 ligasa TMEM129 [211], la proteína adaptadora SEL1L [210] junto con la enzima que conjuga ubiquitina UBC6e (UBE2J1), AUP1, OS9 y UBXD8 [148]. Hasta la fecha no se ha definido un papel claro para la SPP o TRC8 en la ruta natural de degradación de la molécula de MHC de clase I, aunque en ausencia de US2 estas proteínas interactúen entre sí.

En células infectadas con el citomegalovirus humano, es posible además, que se pueda dar un reconocimiento dual, en el cual US2 y US11 interactúen con distintas regiones de la cadena pesada de la molécula de clase I, favoreciendo así la eliminación de un número mayor de antígenos de clase I.

US2 y US11 difieren en su capacidad para interactuar con diferentes alelos de MHC de clase I. Se ha descrito especificidad alélica tanto en modelos murinos como en modelos humanos [223]. HLA-B\*27:05, B\*27:02 y B\*27:04 muestran resistencia a la acción de US2 y US11, mientras que US11 disminuye dramáticamente la expresión de B\*27:06 y B\*27:07 y US2 lo hace solo en B\*27:07 y ello obedece a la degradación de la HC por el proteasoma. En un estudio con antígenos de clase I solubles, se demostró que US2 se une a distintos alelos del locus A (A2 y A68) y que esta unión es a través del dominio luminal de US2, pero US2 es incapaz de unirse a HLA-B7, HLA-B\*27:05, HLA-Cw4 o HLA-E [206]. Además, se ha cristalizado la molécula de HLA-A2 unida a US2. US2 se une a regiones altamente conservadas en los antígenos de clase I, probablemente para maximizar el número de alelos con los que puede interactuar. Se han definido 4 sitios de interacción que comprenden los residuos de A2, 105-107, 176-177, 179-183 y 264-267. La mutación R181E bloquea completamente la dislocación de la cadena pesada de A2 [224].

Puesto que estos residuos no son polimórficos en HLA-B27, es difícil explicar por qué US2 no interactúa con los subtipos que se pliegan con menor eficiencia, B\*27:05, B\*27:02, B\*27:04 y con B\*27:06 y por otro lado, explicar la especificidad de US2 por B\*27:07. Existe una correlación entre la presencia de ácido aspártico en la posición 116 (D116) en B\*27:05,

B\*27:02 y B\*27:04 y la resistencia a la acción de US2. B\*27:07 que es susceptible a la dislocación mediada por US2 presenta en esta posición una tirosina (Y116) que también está presente en B\*27:06. Es posible que las otras posiciones polimórficas de B\*27:06 estén implicadas en el fallo en la dislocación de este subtipo. Sería interesante analizar, en presencia de US2, la unión de OS9, TRC8 y del resto de componentes de la vía de ERAD a B\*27:07, así como su patrón de ubiquitinación. Es de suponer que sería capaz de interactuar con ellos y explicar así el efecto sobre este subtipo.

US11 favorece la degradación de B\*27:07 y también de B\*27:06. No se ha cristalizado ningún antígeno de clase I unido a esta proteína viral y tampoco hay datos relativos a la dislocación de HLA-B27. En el caso de US11 existe una estricta correlación entre la presencia de ácido aspártico en la posición 116 (D116) en B\*27:05, B\*27:02 y B\*27:04 y la resistencia a la acción de US11. Es posible que la tirosina en la posición 116 (Y116) en B\*27:06 y B\*27:07 esté implicada en la dislocación mediada por US11. Sería interesante analizar en presencia de US11 la unión de TMEM129 y del resto de componentes de la vía de ERAD a B\*27:06 y B\*27:07, así como sus patrones de ubiquitinación. Es de suponer que sería capaz de interactuar con ellos y explicar así el efecto sobre estos subtipos.

#### **4 Papel del polimorfismo en las posiciones 114 y 116.**

Se ha demostrado que el plegamiento de HLA-B27 está influenciado por el efecto global de su polimorfismo [78]. Además, en HLA-B27, las posiciones 114 y 116 determinan muchas de las características bioquímicas de los subtipos de HLA-B27 como la naturaleza de su peptidoma [225], la velocidad de salida a la superficie celular, su unión a tapasina y su termoestabilidad. Mejoran estos parámetros la presencia de tirosina (B\*27:06 y B\*27:07) o histidina (B\*27:09) en la posición 116 y la ausencia de histidina en la posición 114 (D114) (B\*27:06 y B\*27:07) [226].

El polimorfismo de HLA-B27 no es responsable de la asociación diferencial con muchos de los componentes de la vía de ERAD analizados en este estudio, puesto que estos reconocen modificaciones estructurales en el glicano unido a HLA-B27. Este sería el caso de la calnexina, de EDEM1 y OS9.

Derlina-1 y SEL1L coinmunoprecipitan con la cadena pesada de clase I en presencia de US11, aunque se desconoce si interactúan directamente con la cadena pesada dentro de los complejos multiproteicos de los que forman parte [146, 152]. Es poco probable que el polimorfismo en las posiciones 114 y 116 (H114 y D116) influya en la unión de B\*27:05 y B\*27:02 a estos componentes de la vía de ERAD. Mientras que B\*27:04 tiene ácido aspártico en la posición 116, B\*27:06, B\*27:07 y B\*27:09 no presentan ácido aspártico en esta posición y la unión de todos ellos a la Derlina-1 y SEL1L es similar. Como ya se ha mencionado, en presencia de US2 y US11 existe una estricta correlación entre la presencia de ácido aspártico en la posición 116 (D116) en B\*27:05, B\*27:02 y B\*27:04 y la resistencia a la acción de estos productos virales. US2 y US11 sí que interactúan directamente con la cadena pesada de los antígenos de clase I.

Nosotros hemos sido incapaces de demostrar la interacción de los subtipos de HLA-B27 con los distintos complejos multiproteicos implicados en la vía de ERAD. Aunque no ha sido analizado en este estudio, suponemos que en presencia de US2 y US11, los subtipos B\*27:06 y B\*27:07, podrían formar parte de estos complejos.

El resto de componentes de la vía de ERAD analizados en este estudio forman complejos supramoleculares para dislocar las proteínas mal plegadas, pero las cadenas pesadas mal plegadas de HLA-B27 no interactúan con ninguno de los componentes analizados de los módulos de dislocación, ubiquitinación y transporte al proteasoma.

Llama la atención que los antígenos de clase I, US2 y US11 hayan sido modelos para analizar la maquinaria de ERAD y gracias a este trio se hayan definido numerosos componentes de esta vía de degradación de proteínas mal plegadas. En la mayoría de estos trabajos se utilizó como modelo HLA-A2, demostrándose que este antígeno de clase I forma parte de los distintos complejos multiproteicos implicados en la vía de ERAD. Por algún motivo difícil de explicar con nuestros datos, HLA-B27 queda excluida de estos complejos, acumulándose en mayor o menor cuantía en el RE.

## 5 IL-23 y patología de la EA.

Numerosos estudios independientes han demostrado que la IL-23 juega un papel central en la patología de la EA y que determinados polimorfismos en el receptor de IL-23 se asocian con una mayor susceptibilidad a padecer esta enfermedad [53].

A pesar de que la asociación de HLA-B27 con la EA es una de las más fuertes entre una enfermedad y un antígeno de clase I, no existen claras evidencias que otorguen a HLA-B27 un papel central en la patología de la enfermedad. En ratas transgénicas para HLA-B27, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> no están implicados en la enfermedad [75], sugiriendo que la capacidad de HLA-B27 como molécula presentadora de antígeno es poco relevante en la patología de la EA.

En los últimos años, en un intento de esclarecer la patología de la EA, ha cobrado gran relevancia el eje IL-23/IL-17 y las células Th17. El plegamiento anómalo de HLA-B27 induce una respuesta de estrés que supone un incremento en los niveles de IL-23 y ésta, al promover la liberación de IL-17 e IL-22 induciría la inflamación observada en la EA [91]. Un estudio reciente, ha demostrado que en ausencia de HLA-B27, el aumento de IL-23 es suficiente para reproducir en las entesis, una enfermedad similar a la EA. La IL-23 induce la inflamación al promover la liberación de IL-17 e IL-22 en una subpoblación de células T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> ROR<sub>γt</sub> residentes en las entesis. Además, se han detectado niveles elevados de IL-23 e IL-17 en el suero de pacientes con EA [227] y de IL-23 en el intestino [99]. De hecho, cuando fallan los tratamientos convencionales, se interviene terapéuticamente sobre el eje IL-23/IL-17.

Desde nuestro punto de vista, este hallazgo crucial consigue unificar todas las hipótesis que se han venido usando para explicar la asociación de HLA-B27 a EA:

- 1) Hipótesis del plegamiento anómalo: el acúmulo de cadenas pesadas mal plegadas de HLA-B27 en el RE, induce la UPR y con ello un aumento de los niveles de IL-23. De hecho, las células que secretan IL-17 e IL-22 están aumentadas en pacientes con EA.
- 2) Hipótesis del péptido artritogénico: se ha demostrado que el estrés de RE inducido por la infección por bacterias artritogénicas, incluida *Chlamydia trachomatis* aumenta los niveles de IL-17 e IL-23 [228].
- 3) Inmunomodulación por homodímeros: Los pacientes con EA presentan una expansión de una población de células T que expresan el receptor KIR3DL2. Estas células reconocen homodímeros de HLA-B27 y expresan además el receptor de IL-23 y en respuesta a la IL-23 liberan IL-17 [229].

Nuestro estudio tiene una implicación potencialmente importante para entender la patología de la EA e intervenir en su tratamiento. Puesto que el acúmulo y la agregación de los

subtipos de HLA-B27 asociados a enfermedad puede ser la causa de las espondiloartropatías asociadas a HLA-B27, se podrían tratar estas enfermedades interviniendo sobre la E3 ligasa Hrd1, como ya se está haciendo en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer [230]. En el caso de patologías asociadas a HLA-B27 habría que potenciar la acción de Hrd1.



## **IX. CONCLUSIONES**



1. Los subtipos de HLA-B27 analizados en este estudio B\*27:05, B\*27:02, B\*27:04, B\*27:06, B\*27:07 y B\*27:09 se pliegan de forma anómala.
2. Existe un gradiente de eficacia de plegamiento: B\*27:05 y B\*27:02 son los subtipos que peor se pliegan, B\*27:04 se encuentra en un grupo intermedio y la eficacia de plegamiento es mejor en B\*27:06, B\*27:07 y B\*27:09.
3. No existe una asociación clara entre plegamiento anómalo y enfermedad. Es probable que una pequeña cantidad de cadena pesada en el RE no sea capaz de inducir la UPR y por ello B\*27:06 y B\*27:09 no se asocian a la enfermedad. La excepción sería B\*27:07.
4. La maquinaria celular encargada de eliminar las proteínas mal plegadas (ERAD) es ineficaz cuando se trata de HLA-B27.
5. El fallo o bloqueo en la vía de ERAD radica en la transferencia de los complejos mal plegados al módulo de ubiquitinación, cuyo principal componente es la E3 ligasa de ubiquitina.
6. Los subtipos asociados a enfermedad B\*27:05, B\*27:02 y B\*27:04, excepto B\*27:07, son refractarios a la degradación mediada por US2 o US11.
7. Los subtipos B\*27:06 y B\*27:07 son susceptibles a la degradación mediada por US11 y éste último también a la degradación mediada por US2.
8. Existe una estricta correlación entre la presencia de ácido aspártico en la posición 116 (D116) en B\*27:05, B\*27:02 y B\*27:04 y la resistencia a la acción de US11.
9. Existe una correlación entre la presencia de tirosina en la posición 116 (Y116) en B\*27:06 y B\*27:07 y la dislocación mediada por US11.



## **X. BIBLIOGRAFÍA**



1. Rock KL, Reits E, Neefjes J: **Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules.** *Trends in immunology* 2016, **37**(11):724-737.
2. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P: **Pathways of antigen processing.** *Annual review of immunology* 2013, **31**:443-473.
3. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O: **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.** *Nature reviews Immunology* 2011, **11**(12):823-836.
4. Madden DR: **The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes.** *Annual review of immunology* 1995, **13**:587-622.
5. Creighton TE: **Disulphide bonds and protein stability.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1988, **8**(2):57-63.
6. Orr HT, Lopez de Castro JA, Lancet D, Strominger JL: **Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen, HLA-B7. 2. Sequence determination and search for homologies.** *Biochemistry* 1979, **18**(25):5711-5720.
7. Bjorkman PJ, Parham P: **Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules.** *Annual review of biochemistry* 1990, **59**:253-288.
8. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC: **The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.** *Nature* 1987, **329**(6139):512-518.
9. Garrett TP, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley DC: **Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68.** *Nature* 1989, **342**(6250):692-696.
10. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC: **Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution.** *Journal of molecular biology* 1991, **219**(2):277-319.
11. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC: **The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation.** *Nature* 1991, **353**(6342):321-325.
12. Bowness P: **Hla-B27.** *Annual review of immunology* 2015, **33**:29-48.
13. Jensen PE: **Recent advances in antigen processing and presentation.** *Nature immunology* 2007, **8**(10):1041-1048.
14. Ciechanover A: **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway.** *Cell* 1994, **79**(1):13-21.
15. Qian SB, Reits E, Neefjes J, Deslich JM, Bennink JR, Yewdell JW: **Tight linkage between translation and MHC class I peptide ligand generation implies specialized antigen processing for defective ribosomal products.** *J Immunol* 2006, **177**(1):227-233.
16. Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neefjes J: **The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins.** *Nature* 2000, **404**(6779):774-778.
17. Yewdell JW, Anton LC, Bennink JR: **Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules?** *J Immunol* 1996, **157**(5):1823-1826.
18. Yewdell JW, Nicchitta CV: **The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension.** *Trends in immunology* 2006, **27**(8):368-373.
19. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL: **Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules.** *Cell* 1994, **78**(5):761-771.
20. Finley D: **Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome.** *Annual review of biochemistry* 2009, **78**:477-513.
21. Glickman MH, Ciechanover A: **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.** *Physiological reviews* 2002, **82**(2):373-428.
22. Maupin-Furlow J: **Proteasomes and protein conjugation across domains of life.** *Nature reviews Microbiology* 2011, **10**(2):100-111.

23. Groettrup M, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM: **The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(17):8970-8975.
24. Griffin TA, Nandi D, Cruz M, Fehling HJ, Kaer LV, Monaco JJ, Colbert RA: **Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits.** *J Exp Med* 1998, **187**(1):97-104.
25. Saunders PM, van Endert P: **Running the gauntlet: from peptide generation to antigen presentation by MHC class I.** *Tissue Antigens* 2011, **78**(3):161-170.
26. Groettrup M, Kirk CJ, Basler M: **Proteasomes in immune cells: more than peptide producers?** *Nature reviews Immunology* 2010, **10**(1):73-78.
27. Saveanu L, Carroll O, Hassainya Y, van Endert P: **Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation.** *Immunological reviews* 2005, **207**:42-59.
28. Lankat-Buttgereit B, Tampe R: **The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases.** *Physiological reviews* 2002, **82**(1):187-204.
29. Pamer E, Cresswell P: **Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing.** *Annual review of immunology* 1998, **16**:323-358.
30. Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL: **An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides.** *Nature immunology* 2002, **3**(12):1169-1176.
31. York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, Rock KL: **The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues.** *Nature immunology* 2002, **3**(12):1177-1184.
32. Tanioka T, Hattori A, Masuda S, Nomura Y, Nakayama H, Mizutani S, Tsujimoto M: **Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase. The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases.** *J Biol Chem* 2003, **278**(34):32275-32283.
33. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, Greer F, Schomburg L, Fruci D, Niedermann G *et al*: **Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum.** *Nature immunology* 2005, **6**(7):689-697.
34. Chang SC, Momburg F, Bhutani N, Goldberg AL: **The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(47):17107-17112.
35. Johnson AE, van Waes MA: **The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane.** *Annual review of cell and developmental biology* 1999, **15**:799-842.
36. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M: **N-glycan structures: recognition and processing in the ER.** *Trends in biochemical sciences* 2010, **35**(2):74-82.
37. Vassilakos A, Cohen-Doyle MF, Peterson PA, Jackson MR, Williams DB: **The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules.** *The EMBO journal* 1996, **15**(7):1495-1506.
38. Olzmann JA, Kopito RR, Christianson JC: **The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system.** *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, **5**(9).
39. Otero JH, Lizak B, Hendershot LM: **Life and death of a BiP substrate.** *Seminars in cell & developmental biology* 2010, **21**(5):472-478.
40. Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P: **Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP.** *Immunity* 1996, **5**(2):103-114.
41. Antoniou AN, Guiliano DB, Lenart I, Burn G, Powis SJ: **The oxidative folding and misfolding of human leukocyte antigen-b27.** *Antioxidants & redox signaling* 2011, **15**(3):669-684.

42. Slominska-Wojewodzka M, Sandvig K: **The Role of Lectin-Carbohydrate Interactions in the Regulation of ER-Associated Protein Degradation.** *Molecules* 2015, **20**(6):9816-9846.
43. Brewerton DA, Hart FD, Nicholls A, Caffrey M, James DC, Sturrock RD: **Ankylosing spondylitis and HL-A 27.** *Lancet* 1973, **1**(7809):904-907.
44. Smith JA: **Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis.** *Current allergy and asthma reports* 2015, **15**(1):489.
45. Schett G: **Bone formation versus bone resorption in ankylosing spondylitis.** *Advances in experimental medicine and biology* 2009, **649**:114-121.
46. Haroon N: **Ankylosis in ankylosing spondylitis: current concepts.** *Clinical rheumatology* 2015, **34**(6):1003-1007.
47. Brown MA, Kennedy LG, MacGregor AJ, Darke C, Duncan E, Shatford JL, Taylor A, Calin A, Wordsworth P: **Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(10):1823-1828.
48. Little H, Swinson DR, Cruickshank B: **Upward subluxation of the axis in ankylosing spondylitis. A clinical pathologic report.** *Am J Med* 1976, **60**(2):279-285.
49. Raychaudhuri SP, Deodhar A: **The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis.** *Journal of autoimmunity* 2014, **48-49**:128-133.
50. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD: **Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders.** *Cell* 1990, **63**(5):1099-1112.
51. Taurog JD, Maika SD, Simmons WA, Breban M, Hammer RE: **Susceptibility to inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rat lines correlates with the level of B27 expression.** *J Immunol* 1993, **150**(9):4168-4178.
52. Benjamin R, Parham P: **Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis.** *Immunology today* 1990, **11**(4):137-142.
53. Wellcome Trust Case Control C, Australo-Anglo-American Spondylitis C, Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, Kwiatkowski DP, McCarthy MI *et al*: **Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants.** *Nature genetics* 2007, **39**(11):1329-1337.
54. International Genetics of Ankylosing Spondylitis C, Cortes A, Hadler J, Pointon JP, Robinson PC, Karaderi T, Leo P, Cremin K, Pryce K, Harris J *et al*: **Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci.** *Nature genetics* 2013, **45**(7):730-738.
55. Robinson J, Halliwell JA, Hayhurst JD, Flicek P, Parham P, Marsh SG: **The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(Database issue):D423-431.
56. Khan MA: **Polymorphism of HLA-B27: 105 subtypes currently known.** *Current rheumatology reports* 2013, **15**(10):362.
57. Powis SJ, Colbert RA: **Editorial: HLA-B27: The Story Continues to Unfold.** *Arthritis & rheumatology* 2016, **68**(5):1057-1059.
58. Armas JB, Gonzalez S, Martinez-Borra J, Laranjeira F, Ribeiro E, Correia J, Ferreira ML, Toste M, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C: **Susceptibility to ankylosing spondylitis is independent of the Bw4 and Bw6 epitopes of HLA-B27 alleles.** *Tissue Antigens* 1999, **53**(3):237-243.
59. Gonzalez-Roces S, Alvarez MV, Gonzalez S, Dieye A, Makni H, Woodfield DG, Housan L, Konenkov V, Abbadi MC, Grunnet N *et al*: **HLA-B27 polymorphism and worldwide susceptibility to ankylosing spondylitis.** *Tissue Antigens* 1997, **49**(2):116-123.
60. Varnavidou-Nicolaidou A, Karpasitou K, Georgiou D, Stylianos G, Kokkofitou A, Michalis C, Constantina C, Gregoriadou C, Kyriakides G: **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* 2004, **65**(12):1451-1454.
61. Ren EC, Koh WH, Sim D, Boey ML, Wee GB, Chan SH: **Possible protective role of HLA-B\*2706 for ankylosing spondylitis.** *Tissue Antigens* 1997, **49**(1):67-69.
  62. D'Amato M, Fiorillo MT, Galeazzi M, Martinetti M, Amoroso A, Sorrentino R: **Frequency of the new HLA-B\*2709 allele in ankylosing spondylitis patients and healthy individuals.** *Disease markers* 1995, **12**(3):215-217.
  63. Abualrous ET, Fritzsche S, Hein Z, Al-Balushi MS, Reinink P, Boyle LH, Wellbrock U, Antoniou AN, Springer S: **F pocket flexibility influences the tapasin dependence of two differentially disease-associated MHC Class I proteins.** *Eur J Immunol* 2015, **45**(4):1248-1257.
  64. Loll B, Fabian H, Huser H, Hee CS, Ziegler A, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A: **Increased Conformational Flexibility of HLA-B\*27 Subtypes Associated With Ankylosing Spondylitis.** *Arthritis & rheumatology* 2016, **68**(5):1172-1182.
  65. Ramos M, Paradela A, Vazquez M, Marina A, Vazquez J, Lopez de Castro JA: **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* 2002, **277**(32):28749-28756.
  66. Lopez de Castro JA, Alvarez I, Marcilla M, Paradela A, Ramos M, Sesma L, Vazquez M: **HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands.** *Tissue Antigens* 2004, **63**(5):424-445.
  67. Lopez de Castro JA: **HLA-B27 y patogenia de las espondiloartropatías.** *Reumatologia clinica* 2007, **3 Suppl 2**:S24-28.
  68. Lopez-Larrea C, Mijiyawa M, Gonzalez S, Fernandez-Morera JL, Blanco-Gelaz MA, Martinez-Borra J, Lopez-Vazquez A: **Association of ankylosing spondylitis with HLA-B\*1403 in a West African population.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(11):2968-2971.
  69. DiBrino M, Parker KC, Margulies DH, Shiloach J, Turner RV, Biddison WE, Coligan JE: **The HLA-B14 peptide binding site can accommodate peptides with different combinations of anchor residues.** *J Biol Chem* 1994, **269**(51):32426-32434.
  70. Hermann E, Yu DT, Meyer zum Buschenfelde KH, Fleischer B: **HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis.** *Lancet* 1993, **342**(8872):646-650.
  71. Ramos M, Alvarez I, Sesma L, Logean A, Rognan D, Lopez de Castro JA: **Molecular mimicry of an HLA-B27-derived ligand of arthritis-linked subtypes with chlamydial proteins.** *J Biol Chem* 2002, **277**(40):37573-37581.
  72. Cragnolini JJ, de Castro JA: **Identification of endogenously presented peptides from Chlamydia trachomatis with high homology to human proteins and to a natural self-ligand of HLA-B27.** *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2008, **7**(1):170-180.
  73. Alvarez-Navarro C, Cragnolini JJ, Dos Santos HG, Barnea E, Admon A, Morreale A, Lopez de Castro JA: **Novel HLA-B27-restricted epitopes from Chlamydia trachomatis generated upon endogenous processing of bacterial proteins suggest a role of molecular mimicry in reactive arthritis.** *J Biol Chem* 2013, **288**(36):25810-25825.
  74. Fiorillo MT, Maragno M, Butler R, Dupuis ML, Sorrentino R: **CD8(+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis.** *J Clin Invest* 2000, **106**(1):47-53.
  75. May E, Dorris ML, Satumtira N, Iqbal I, Rehman MI, Lightfoot E, Taurog JD: **CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats.** *J Immunol* 2003, **170**(2):1099-1105.
  76. Lories RJ, McInnes IB: **Primed for inflammation: enthesis-resident T cells.** *Nature medicine* 2012, **18**(7):1018-1019.
  77. Mear JP, Schreiber KL, Munz C, Zhu X, Stevanovic S, Rammensee HG, Rowland-Jones SL, Colbert RA: **Misfolding of HLA-B27 as a result of its B pocket suggests a novel**

- mechanism for its role in susceptibility to spondyloarthropathies. *J Immunol* 1999, **163**(12):6665-6670.**
78. Galocha B, de Castro JA: **Folding of HLA-B27 subtypes is determined by the global effect of polymorphic residues and shows incomplete correspondence to ankylosing spondylitis.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(2):401-412.
  79. Dangoria NS, DeLay ML, Kingsbury DJ, Mear JP, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Colbert RA: **HLA-B27 misfolding is associated with aberrant intermolecular disulfide bond formation (dimerization) in the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 2002, **277**(26):23459-23468.
  80. Antoniou AN, Ford S, Taurog JD, Butcher GW, Powis SJ: **Formation of HLA-B27 homodimers and their relationship to assembly kinetics.** *J Biol Chem* 2004, **279**(10):8895-8902.
  81. Lenart I, Guiliano DB, Burn G, Campbell EC, Morley KD, Fussell H, Powis SJ, Antoniou AN: **The MHC Class I heavy chain structurally conserved cysteines 101 and 164 participate in HLA-B27 dimer formation.** *Antioxidants & redox signaling* 2012, **16**(1):33-43.
  82. Guiliano DB, Fussell H, Lenart I, Tsao E, Nesbeth D, Fletcher AJ, Campbell EC, Yousaf N, Williams S, Santos S *et al*: **Endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1 targets misfolded HLA-B27 dimers for endoplasmic reticulum-associated degradation.** *Arthritis & rheumatology* 2014, **66**(11):2976-2988.
  83. Fussell H, Nesbeth D, Lenart I, Campbell EC, Lynch S, Santos S, Gould K, Powis SJ, Antoniou AN: **Novel detection of in vivo HLA-B27 conformations correlates with ankylosing spondylitis association.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(11):3419-3424.
  84. Guiliano DB, North H, Panayoitou E, Campbell EC, McHugh K, Cooke FG, Silvestre M, Bowness P, Powis SJ, Antoniou AN: **Polymorphisms in the F Pocket of HLA-B27 Subtypes Strongly Affect Assembly, Chaperone Interactions, and Heavy-Chain Misfolding.** *Arthritis & rheumatology* 2017, **69**(3):610-621.
  85. Tran TM, Satumtira N, Dorris ML, May E, Wang A, Furuta E, Taurog JD: **HLA-B27 in transgenic rats forms disulfide-linked heavy chain oligomers and multimers that bind to the chaperone BiP.** *J Immunol* 2004, **172**(8):5110-5119.
  86. Hetz C: **The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2012, **13**(2):89-102.
  87. Pahl HL, Baeuerle PA: **The ER-overload response: activation of NF-kappa B.** *Trends in biochemical sciences* 1997, **22**(2):63-67.
  88. Colbert RA: **HLA-B27 misfolding: a solution to the spondyloarthropathy conundrum?** *Molecular medicine today* 2000, **6**(6):224-230.
  89. Turner MJ, Delay ML, Bai S, Klenk E, Colbert RA: **HLA-B27 up-regulation causes accumulation of misfolded heavy chains and correlates with the magnitude of the unfolded protein response in transgenic rats: Implications for the pathogenesis of spondylarthritis-like disease.** *Arthritis Rheum* 2007, **56**(1):215-223.
  90. Turner MJ, Sowders DP, DeLay ML, Mohapatra R, Bai S, Smith JA, Brandewie JR, Taurog JD, Colbert RA: **HLA-B27 misfolding in transgenic rats is associated with activation of the unfolded protein response.** *J Immunol* 2005, **175**(4):2438-2448.
  91. DeLay ML, Turner MJ, Klenk EI, Smith JA, Sowders DP, Colbert RA: **HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(9):2633-2643.
  92. Goodall JC, Wu C, Zhang Y, McNeill L, Ellis L, Saudek V, Gaston JS: **Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(41):17698-17703.

93. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL: **Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17.** *J Biol Chem* 2003, **278**(3):1910-1914.
94. Smith JA, Colbert RA: **Review: The interleukin-23/interleukin-17 axis in spondyloarthritis pathogenesis: Th17 and beyond.** *Arthritis & rheumatology* 2014, **66**(2):231-241.
95. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, Gorman DM, Bowman EP, McClanahan TK, Yearley JH *et al*: **IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR-gammat+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells.** *Nature medicine* 2012, **18**(7):1069-1076.
96. Layh-Schmitt G, Yang EY, Kwon G, Colbert RA: **HLA-B27 alters the response to tumor necrosis factor alpha and promotes osteoclastogenesis in bone marrow monocytes from HLA-B27-transgenic rats.** *Arthritis Rheum* 2013, **65**(8):2123-2131.
97. Rezaieanesh A, Mahmoudi M, Amirzargar AA, Vojdani M, Jamshidi AR, Nicknam MH: **Ankylosing spondylitis M-CSF-derived macrophages are undergoing unfolded protein response (UPR) and express higher levels of interleukin-23.** *Modern rheumatology* 2016:1-6.
98. Tran TM, Dorris ML, Satumtira N, Richardson JA, Hammer RE, Shang J, Taurog JD: **Additional human beta2-microglobulin curbs HLA-B27 misfolding and promotes arthritis and spondylitis without colitis in male HLA-B27-transgenic rats.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(4):1317-1327.
99. Ciccia F, Accardo-Palumbo A, Rizzo A, Guggino G, Raimondo S, Giardina A, Cannizzaro A, Colbert RA, Alessandro R, Triolo G: **Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with ankylosing spondylitis and subclinical gut inflammation.** *Annals of the rheumatic diseases* 2014, **73**(8):1566-1574.
100. Kenna TJ, Lau MC, Keith P, Ciccia F, Costello ME, Bradbury L, Low PL, Agrawal N, Triolo G, Alessandro R *et al*: **Disease-associated polymorphisms in ERAP1 do not alter endoplasmic reticulum stress in patients with ankylosing spondylitis.** *Genes and immunity* 2015, **16**(1):35-42.
101. Dong W, Zhang Y, Yan M, Liu H, Chen Z, Zhu P: **Upregulation of 78-kDa glucose-regulated protein in macrophages in peripheral joints of active ankylosing spondylitis.** *Scandinavian journal of rheumatology* 2008, **37**(6):427-434.
102. Bird LA, Peh CA, Kollnberger S, Elliott T, McMichael AJ, Bowness P: **Lymphoblastoid cells express HLA-B27 homodimers both intracellularly and at the cell surface following endosomal recycling.** *Eur J Immunol* 2003, **33**(3):748-759.
103. Kollnberger S, Bird L, Sun MY, Retiere C, Braud VM, McMichael A, Bowness P: **Cell-surface expression and immune receptor recognition of HLA-B27 homodimers.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(11):2972-2982.
104. Bowness P, Ridley A, Shaw J, Chan AT, Wong-Baeza I, Fleming M, Cummings F, McMichael A, Kollnberger S: **Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis.** *J Immunol* 2011, **186**(4):2672-2680.
105. Van Praet L, Van den Bosch FE, Jacques P, Carron P, Jans L, Colman R, Glorieus E, Peeters H, Mielants H, De Vos M *et al*: **Microscopic gut inflammation in axial spondyloarthritis: a multiparametric predictive model.** *Annals of the rheumatic diseases* 2013, **72**(3):414-417.
106. Rosenbaum JT, Davey MP: **Time for a gut check: evidence for the hypothesis that HLA-B27 predisposes to ankylosing spondylitis by altering the microbiome.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**(11):3195-3198.

107. Rosenbaum JT, Lin P, Asquith M, Costello ME, Kenna TJ, Brown MA: **Does the microbiome play a causal role in spondyloarthritis?** *Clinical rheumatology* 2014, **33**(6):763-767.
108. Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE: **The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats.** *J Exp Med* 1994, **180**(6):2359-2364.
109. Wu HJ, Ivanov, II, Darce J, Hattori K, Shima T, Umesaki Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D: **Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells.** *Immunity* 2010, **32**(6):815-827.
110. Lin P, Bach M, Asquith M, Lee AY, Akileswaran L, Stauffer P, Davin S, Pan Y, Cambronne ED, Dorris M *et al*: **HLA-B27 and human beta2-microglobulin affect the gut microbiota of transgenic rats.** *PLoS one* 2014, **9**(8):e105684.
111. Costello ME, Ciccio F, Willner D, Warrington N, Robinson PC, Gardiner B, Marshall M, Kenna TJ, Triolo G, Brown MA: **Intestinal dysbiosis in ankylosing spondylitis.** *Arthritis & rheumatology* 2014.
112. Kumar P, Monin L, Castillo P, Elsegeiny W, Horne W, Eddens T, Vikram A, Good M, Schoenborn AA, Bibby K *et al*: **Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation.** *Immunity* 2016, **44**(3):659-671.
113. Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF: **Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells.** *J Clin Invest* 2003, **112**(5):693-706.
114. Cua DJ, Sherlock JP: **Autoimmunity's collateral damage: Gut microbiota strikes 'back'.** *Nature medicine* 2011, **17**(9):1055-1056.
115. Needham PG, Brodsky JL: **How early studies on secreted and membrane protein quality control gave rise to the ER associated degradation (ERAD) pathway: the early history of ERAD.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1833**(11):2447-2457.
116. Hampton RY, Sommer T: **Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation.** *Current opinion in cell biology* 2012, **24**(4):460-466.
117. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P: **Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond.** *The Journal of cell biology* 2014, **204**(6):869-879.
118. Ushioda R, Hoseki J, Nagata K: **Glycosylation-independent ERAD pathway serves as a backup system under ER stress.** *Molecular biology of the cell* 2013, **24**(20):3155-3163.
119. Shenkman M, Groisman B, Ron E, Avezov E, Hendershot LM, Lederkremer GZ: **A shared endoplasmic reticulum-associated degradation pathway involving the EDEM1 protein for glycosylated and nonglycosylated proteins.** *J Biol Chem* 2013, **288**(4):2167-2178.
120. Carvalho P, Goder V, Rapoport TA: **Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins.** *Cell* 2006, **126**(2):361-373.
121. Ballar P, Pabuccuoglu A, Kose FA: **Different p97/VCP complexes function in retrotranslocation step of mammalian ER-associated degradation (ERAD).** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2011, **43**(4):613-621.
122. Christianson JC, Ye Y: **Cleaning up in the endoplasmic reticulum: ubiquitin in charge.** *Nature structural & molecular biology* 2014, **21**(4):325-335.
123. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M: **Molecular chaperones in protein folding and proteostasis.** *Nature* 2011, **475**(7356):324-332.
124. Hendershot LM: **The ER function BiP is a master regulator of ER function.** *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 2004, **71**(5):289-297.
125. Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Muller L, Zimmermann R: **Functions and pathologies of BiP and its interaction partners.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009, **66**(9):1556-1569.

126. Gu J, Rihl M, Marker-Hermann E, Baeten D, Kuipers JG, Song YW, Maksymowych WP, Burgos-Vargas R, Veys EM, De Keyser F *et al*: **Clues to pathogenesis of spondyloarthritis derived from synovial fluid mononuclear cell gene expression profiles.** *The Journal of rheumatology* 2002, **29**(10):2159-2164.
127. Molinari M, Calanca V, Galli C, Lucca P, Paganetti P: **Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle.** *Science* 2003, **299**(5611):1397-1400.
128. Roth J, Zuber C: **Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9.** *Histochemistry and cell biology* 2017, **147**(2):269-284.
129. Olivari S, Cali T, Salo KE, Paganetti P, Ruddock LW, Molinari M: **EDEM1 regulates ER-associated degradation by accelerating de-mannosylation of folding-defective polypeptides and by inhibiting their covalent aggregation.** *Biochemical and biophysical research communications* 2006, **349**(4):1278-1284.
130. Hosokawa N, Tremblay LO, Sleno B, Kamiya Y, Wada I, Nagata K, Kato K, Herscovics A: **EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans.** *Glycobiology* 2010, **20**(5):567-575.
131. Cormier JH, Tamura T, Sunryd JC, Hebert DN: **EDEM1 recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex.** *Molecular cell* 2009, **34**(5):627-633.
132. Sokolowska I, Pilka ES, Sandvig K, Wegrzyn G, Slominska-Wojewodzka M: **Hydrophobicity of protein determinants influences the recognition of substrates by EDEM1 and EDEM2 in human cells.** *BMC cell biology* 2015, **16**:1.
133. Tamura T, Cormier JH, Hebert DN: **Characterization of early EDEM1 protein maturation events and their functional implications.** *J Biol Chem* 2011, **286**(28):24906-24915.
134. Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K: **EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin.** *Science* 2003, **299**(5611):1394-1397.
135. Ushioda R, Hoseki J, Araki K, Jansen G, Thomas DY, Nagata K: **ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER.** *Science* 2008, **321**(5888):569-572.
136. Oda Y, Okada T, Yoshida H, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K: **Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation.** *The Journal of cell biology* 2006, **172**(3):383-393.
137. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K: **A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response.** *Developmental cell* 2003, **4**(2):265-271.
138. Burr ML, van den Boomen DJ, Bye H, Antrobus R, Wiertz EJ, Lehner PJ: **MHC class I molecules are preferentially ubiquitinated on endoplasmic reticulum luminal residues during HRD1 ubiquitin E3 ligase-mediated dislocation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(35):14290-14295.
139. Hosokawa N, Kamiya Y, Kato K: **The role of MRH domain-containing lectins in ERAD.** *Glycobiology* 2010, **20**(6):651-660.
140. Hosokawa N, Kamiya Y, Kamiya D, Kato K, Nagata K: **Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans.** *J Biol Chem* 2009, **284**(25):17061-17068.
141. Satoh T, Chen Y, Hu D, Hanashima S, Yamamoto K, Yamaguchi Y: **Structural basis for oligosaccharide recognition of misfolded glycoproteins by OS-9 in ER-associated degradation.** *Molecular cell* 2010, **40**(6):905-916.
142. Bernasconi R, Pertel T, Luban J, Molinari M: **A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal.** *J Biol Chem* 2008, **283**(24):16446-16454.

143. Xie W, Kanehara K, Sayeed A, Ng DT: **Intrinsic conformational determinants signal protein misfolding to the Hrd1/Htm1 endoplasmic reticulum-associated degradation system.** *Molecular biology of the cell* 2009, **20**(14):3317-3329.
144. Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR: **OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD.** *Nature cell biology* 2008, **10**(3):272-282.
145. Jeong H, Sim HJ, Song EK, Lee H, Ha SC, Jun Y, Park TJ, Lee C: **Crystal structure of SEL1L: Insight into the roles of SLR motifs in ERAD pathway.** *Scientific reports* 2016, **6**:20261.
146. Lilley BN, Ploegh HL: **Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(40):14296-14301.
147. Hosokawa N, Wada I: **Association of the SEL1L protein transmembrane domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L.** *The FEBS journal* 2016, **283**(1):157-172.
148. Mueller B, Klemm EJ, Spooner E, Claessen JH, Ploegh HL: **SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(34):12325-12330.
149. Plemper RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH: **Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation.** *Nature* 1997, **388**(6645):891-895.
150. Loureiro J, Lilley BN, Spooner E, Noriega V, Tortorella D, Ploegh HL: **Signal peptide peptidase is required for dislocation from the endoplasmic reticulum.** *Nature* 2006, **441**(7095):894-897.
151. Carvalho P, Stanley AM, Rapoport TA: **Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p.** *Cell* 2010, **143**(4):579-591.
152. Lilley BN, Ploegh HL: **A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER.** *Nature* 2004, **429**(6994):834-840.
153. Greenblatt EJ, Olzmann JA, Kopito RR: **Derlin-1 is a rhomboid pseudoprotease required for the dislocation of mutant alpha-1 antitrypsin from the endoplasmic reticulum.** *Nature structural & molecular biology* 2011, **18**(10):1147-1152.
154. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA: **A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol.** *Nature* 2004, **429**(6994):841-847.
155. Zattas D, Adle DJ, Rubenstein EM, Hochstrasser M: **N-terminal acetylation of the yeast Derlin Der1 is essential for Hrd1 ubiquitin-ligase activity toward luminal ER substrates.** *Molecular biology of the cell* 2013, **24**(7):890-900.
156. Mehnert M, Sommer T, Jarosch E: **Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane.** *Nature cell biology* 2014, **16**(1):77-86.
157. Voss M, Schroder B, Fluhrer R: **Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1828**(12):2828-2839.
158. Golde TE, Wolfe MS, Greenbaum DC: **Signal peptide peptidases: a family of intramembrane-cleaving proteases that cleave type 2 transmembrane proteins.** *Seminars in cell & developmental biology* 2009, **20**(2):225-230.
159. Schrul B, Kapp K, Sinning I, Dobberstein B: **Signal peptide peptidase (SPP) assembles with substrates and misfolded membrane proteins into distinct oligomeric complexes.** *The Biochemical journal* 2010, **427**(3):523-534.
160. Boname JM, Bloor S, Wandel MP, Nathan JA, Antrobus R, Dingwell KS, Thurston TL, Smith DL, Smith JC, Randow F *et al*: **Cleavage by signal peptide peptidase is required for the degradation of selected tail-anchored proteins.** *The Journal of cell biology* 2014, **205**(6):847-862.

161. Stagg HR, Thomas M, van den Boomen D, Wiertz EJ, Drabkin HA, Gemmill RM, Lehner PJ: **The TRC8 E3 ligase ubiquitinates MHC class I molecules before dislocation from the ER.** *The Journal of cell biology* 2009, **186**(5):685-692.
162. Lee SO, Cho K, Cho S, Kim I, Oh C, Ahn K: **Protein disulphide isomerase is required for signal peptide peptidase-mediated protein degradation.** *The EMBO journal* 2010, **29**(2):363-375.
163. Pickart CM: **Mechanisms underlying ubiquitination.** *Annual review of biochemistry* 2001, **70**:503-533.
164. Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S: **A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly.** *Cell* 1999, **96**(5):635-644.
165. Kikkert M, Doolman R, Dai M, Avner R, Hassink G, van Voorden S, Thanedar S, Roitelman J, Chau V, Wiertz E: **Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 2004, **279**(5):3525-3534.
166. Baldridge RD, Rapoport TA: **Autoubiquitination of the Hrd1 Ligase Triggers Protein Retrotranslocation in ERAD.** *Cell* 2016, **166**(2):394-407.
167. Kostova Z, Tsai YC, Weissman AM: **Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation.** *Seminars in cell & developmental biology* 2007, **18**(6):770-779.
168. van den Boomen DJ, Lehner PJ: **Identifying the ERAD ubiquitin E3 ligases for viral and cellular targeting of MHC class I.** *Molecular immunology* 2015, **68**(2 Pt A):106-111.
169. Burr ML, Cano F, Svobodova S, Boyle LH, Boname JM, Lehner PJ: **HRD1 and UBE2J1 target misfolded MHC class I heavy chains for endoplasmic reticulum-associated degradation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(5):2034-2039.
170. Zhang T, Xu Y, Liu Y, Ye Y: **gp78 functions downstream of Hrd1 to promote degradation of misfolded proteins of the endoplasmic reticulum.** *Molecular biology of the cell* 2015, **26**(24):4438-4450.
171. Ye Y, Shibata Y, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Rapoport TA: **Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(40):14132-14138.
172. Stein A, Ruggiano A, Carvalho P, Rapoport TA: **Key steps in ERAD of luminal ER proteins reconstituted with purified components.** *Cell* 2014, **158**(6):1375-1388.
173. Fang S, Ferrone M, Yang C, Jensen JP, Tiwari S, Weissman AM: **The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(25):14422-14427.
174. St-Pierre P, Dang T, Joshi B, Nabi IR: **Peripheral endoplasmic reticulum localization of the Gp78 ubiquitin ligase activity.** *J Cell Sci* 2012, **125**(Pt 7):1727-1737.
175. Chen B, Mariano J, Tsai YC, Chan AH, Cohen M, Weissman AM: **The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(2):341-346.
176. Ballar P, Shen Y, Yang H, Fang S: **The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation.** *J Biol Chem* 2006, **281**(46):35359-35368.
177. Christianson JC, Olzmann JA, Shaler TA, Sowa ME, Bennett EJ, Richter CM, Tyler RE, Greenblatt EJ, Harper JW, Kopito RR: **Defining human ERAD networks through an integrative mapping strategy.** *Nature cell biology* 2011, **14**(1):93-105.
178. Li W, Tu D, Li L, Wollert T, Ghirlando R, Brunger AT, Ye Y: **Mechanistic insights into active site-associated polyubiquitination by the ubiquitin-conjugating enzyme Ube2g2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(10):3722-3727.
179. Xu Y, Liu Y, Lee JG, Ye Y: **A ubiquitin-like domain recruits an oligomeric chaperone to a retrotranslocation complex in endoplasmic reticulum-associated degradation.** *J Biol Chem* 2013, **288**(25):18068-18076.

180. Gemmill RM, West JD, Boldog F, Tanaka N, Robinson LJ, Smith DI, Li F, Drabkin HA: **The hereditary renal cell carcinoma 3;8 translocation fuses FHIT to a patched-related gene, TRC8.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(16):9572-9577.
181. Hsu JL, van den Boomen DJ, Tomasec P, Weekes MP, Antrobus R, Stanton RJ, Ruckova E, Sugrue D, Wilkie GS, Davison AJ *et al*: **Plasma membrane profiling defines an expanded class of cell surface proteins selectively targeted for degradation by HCMV US2 in cooperation with UL141.** *PLoS pathogens* 2015, **11**(4):e1004811.
182. Furman MH, Loureiro J, Ploegh HL, Tortorella D: **Ubiquitylation of the cytosolic domain of a type I membrane protein is not required to initiate its dislocation from the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 2003, **278**(37):34804-34811.
183. Romisch K: **Endoplasmic reticulum-associated degradation.** *Annual review of cell and developmental biology* 2005, **21**:435-456.
184. Elkabetz Y, Shapira I, Rabinovich E, Bar-Nun S: **Distinct steps in dislocation of luminal endoplasmic reticulum-associated degradation substrates: roles of endoplasmic reticulum-bound p97/Cdc48p and proteasome.** *J Biol Chem* 2004, **279**(6):3980-3989.
185. Xia D, Tang WK, Ye Y: **Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p.** *Gene* 2016, **583**(1):64-77.
186. Le LT, Kang W, Kim JY, Le OT, Lee SY, Yang JK: **Structural Details of Ufd1 Binding to p97 and Their Functional Implications in ER-Associated Degradation.** *PLoS one* 2016, **11**(9):e0163394.
187. DeLaBarre B, Brunger AT: **Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains.** *Nature structural biology* 2003, **10**(10):856-863.
188. Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA: **Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains.** *The Journal of cell biology* 2003, **162**(1):71-84.
189. Meyer H, Bug M, Bremer S: **Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system.** *Nature cell biology* 2012, **14**(2):117-123.
190. Dai RM, Li CC: **Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation.** *Nature cell biology* 2001, **3**(8):740-744.
191. Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D, Warren G: **A complex of mammalian ufd1 and npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways.** *The EMBO journal* 2000, **19**(10):2181-2192.
192. Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA: **The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol.** *Nature* 2001, **414**(6864):652-656.
193. Park S, Isaacson R, Kim HT, Silver PA, Wagner G: **Ufd1 exhibits the AAA-ATPase fold with two distinct ubiquitin interaction sites.** *Structure* 2005, **13**(7):995-1005.
194. Ernst R, Mueller B, Ploegh HL, Schlieker C: **The otubain YOD1 is a deubiquitinating enzyme that associates with p97 to facilitate protein dislocation from the ER.** *Molecular cell* 2009, **36**(1):28-38.
195. Beskow A, Grimberg KB, Bott LC, Salomons FA, Dantuma NP, Young P: **A conserved unfoldase activity for the p97 AAA-ATPase in proteasomal degradation.** *Journal of molecular biology* 2009, **394**(4):732-746.
196. Nowis D, McConnell E, Wojcik C: **Destabilization of the VCP-Ufd1-Npl4 complex is associated with decreased levels of ERAD substrates.** *Experimental cell research* 2006, **312**(15):2921-2932.
197. Isakov E, Stanhill A: **Stalled proteasomes are directly relieved by P97 recruitment.** *J Biol Chem* 2011, **286**(35):30274-30283.

198. Wang Q, Liu Y, Soetandyo N, Baek K, Hegde R, Ye Y: **A ubiquitin ligase-associated chaperone holdase maintains polypeptides in soluble states for proteasome degradation.** *Molecular cell* 2011, **42**(6):758-770.
199. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL: **The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol.** *Cell* 1996, **84**(5):769-779.
200. Lee JG, Ye Y: **Bag6/Bat3/Scythe: a novel chaperone activity with diverse regulatory functions in protein biogenesis and degradation.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2013, **35**(4):377-385.
201. Kawahara H, Minami R, Yokota N: **BAG6/BAT3: emerging roles in quality control for nascent polypeptides.** *Journal of biochemistry* 2013, **153**(2):147-160.
202. Leznicki P, Roebuck QP, Wunderley L, Clancy A, Krysztofinska EM, Isaacson RL, Warwicker J, Schwappach B, High S: **The association of BAG6 with SGTA and tail-anchored proteins.** *PloS one* 2013, **8**(3):e59590.
203. Minami R, Hayakawa A, Kagawa H, Yanagi Y, Yokosawa H, Kawahara H: **BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates.** *The Journal of cell biology* 2010, **190**(4):637-650.
204. Claessen JH, Ploegh HL: **BAT3 guides misfolded glycoproteins out of the endoplasmic reticulum.** *PloS one* 2011, **6**(12):e28542.
205. Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL: **Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction.** *Nature* 1996, **384**(6608):432-438.
206. Gewurz BE, Wang EW, Tortorella D, Schust DJ, Ploegh HL: **Human cytomegalovirus US2 endoplasmic reticulum-lumenal domain dictates association with major histocompatibility complex class I in a locus-specific manner.** *J Virol* 2001, **75**(11):5197-5204.
207. Chevalier MS, Johnson DC: **Human cytomegalovirus US3 chimeras containing US2 cytosolic residues acquire major histocompatibility class I and II protein degradation properties.** *J Virol* 2003, **77**(8):4731-4738.
208. Cho S, Kim BY, Ahn K, Jun Y: **The C-terminal amino acid of the MHC-I heavy chain is critical for binding to Derlin-1 in human cytomegalovirus US11-induced MHC-I degradation.** *PloS one* 2013, **8**(8):e72356.
209. Cho S, Lee M, Jun Y: **Forced interaction of cell surface proteins with Derlin-1 in the endoplasmic reticulum is sufficient to induce their dislocation into the cytosol for degradation.** *Biochemical and biophysical research communications* 2013, **430**(2):787-792.
210. Mueller B, Lilley BN, Ploegh HL: **SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER.** *The Journal of cell biology* 2006, **175**(2):261-270.
211. van den Boomen DJ, Timms RT, Grice GL, Stagg HR, Skodt K, Dougan G, Nathan JA, Lehner PJ: **TMEM129 is a Derlin-1 associated ERAD E3 ligase essential for virus-induced degradation of MHC-I.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, **111**(31):11425-11430.
212. van de Weijer ML, Bassik MC, Luteijn RD, Voorburg CM, Lohuis MA, Kremmer E, Hoeben RC, LeProust EM, Chen S, Hoelen H *et al*: **A high-coverage shRNA screen identifies TMEM129 as an E3 ligase involved in ER-associated protein degradation.** *Nature communications* 2014, **5**:3832.
213. Tirosh B, Iwakoshi NN, Lilley BN, Lee AH, Glimcher LH, Ploegh HL: **Human cytomegalovirus protein US11 provokes an unfolded protein response that may facilitate the degradation of class I major histocompatibility complex products.** *J Virol* 2005, **79**(5):2768-2779.

214. Zemmour J, Little AM, Schendel DJ, Parham P: **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* 1992, **148**(6):1941-1948.
215. Long EO, Rosen-Bronson S, Karp DR, Malnati M, Sekaly RP, Jaraquemada D: **Efficient cDNA expression vectors for stable and transient expression of HLA-DR in transfected fibroblast and lymphoid cells.** *Hum Immunol* 1991, **31**(4):229-235.
216. Calvo V, Rojo S, Lopez D, Galocha B, Lopez de Castro JA: **Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism.** *J Immunol* 1990, **144**(10):4038-4045.
217. Ellis SA, Taylor C, McMichael A: **Recognition of HLA-B27 and related antigen by a monoclonal antibody.** *Hum Immunol* 1982, **5**(1):49-59.
218. Stam NJ, Spits H, Ploegh HL: **Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products.** *J Immunol* 1986, **137**(7):2299-2306.
219. Allen RL, O'Callaghan CA, McMichael AJ, Bowness P: **Cutting edge: HLA-B27 can form a novel beta 2-microglobulin-free heavy chain homodimer structure.** *J Immunol* 1999, **162**(9):5045-5048.
220. Merino E, Galocha B, Vazquez MN, Lopez de Castro JA: **Disparate folding and stability of the ankylosing spondylitis-associated HLA-B\*1403 and B\*2705 proteins.** *Arthritis Rheum* 2008, **58**(12):3693-3704.
221. Oresic K, Ng CL, Tortorella D: **TRAM1 participates in human cytomegalovirus US2- and US11-mediated dislocation of an endoplasmic reticulum membrane glycoprotein.** *J Biol Chem* 2009, **284**(9):5905-5914.
222. Dougan SK, Hu CC, Paquet ME, Greenblatt MB, Kim J, Lilley BN, Watson N, Ploegh HL: **Derlin-2-deficient mice reveal an essential role for protein dislocation in chondrocytes.** *Mol Cell Biol* 2011, **31**(6):1145-1159.
223. Machold RP, Wiertz EJ, Jones TR, Ploegh HL: **The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains.** *J Exp Med* 1997, **185**(2):363-366.
224. Gewurz BE, Gaudet R, Tortorella D, Wang EW, Ploegh HL, Wiley DC: **Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(12):6794-6799.
225. Marcilla M, Lopez de Castro JA: **Peptides: the cornerstone of HLA-B27 biology and pathogenetic role in spondyloarthritis.** *Tissue Antigens* 2008, **71**(6):495-506.
226. Galocha B, Lopez de Castro JA: **Mutational analysis reveals a complex interplay of peptide binding and multiple biological features of HLA-B27.** *J Biol Chem* 2010, **285**(50):39180-39190.
227. Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, Liao F, Xia G, Wang S, Xu S *et al*: **Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis.** *Clinical rheumatology* 2011, **30**(2):269-273.
228. Frazer LC, Scurlock AM, Zurenski MA, Riley MM, Mintus M, Pociask DA, Sullivan JE, Andrews CW, Jr., Darville T: **IL-23 induces IL-22 and IL-17 production in response to Chlamydia muridarum genital tract infection, but the absence of these cytokines does not influence disease pathogenesis.** *American journal of reproductive immunology* 2013, **70**(6):472-484.
229. Ridley A, Hatano H, Wong-Baeza I, Shaw J, Matthews KK, Al-Mossawi H, Ladell K, Price DA, Bowness P, Kollnberger S: **Activation-Induced Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor 3DL2 Binding to HLA-B27 Licenses Pathogenic T Cell Differentiation in Spondyloarthritis.** *Arthritis & rheumatology* 2016, **68**(4):901-914.
230. Kawada K, Kaneko M, Nomura Y, Mimori S, Hamana H, Ogita K, Murayama T, Fujino H, Okuma Y: **Expression of the ubiquitin ligase HRD1 in neural stem/progenitor cells of the adult mouse brain.** *Journal of pharmacological sciences* 2011, **117**(3):208-212.

