



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD EN LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO POR TÉCNICAS DE INMUNOLOGÍA CELULAR Y PROTEÓMICA

Directores de Tesis

Dr. Jaime Sancho López Dra. Mercedes Zubiaur Marcos Dr. Norberto Ortego Centeno

Memoria presentada por la licenciada **Esther José Pavón Castellero** para optar
al grado de doctor por la Universidad de Granada.

Diciembre 2007

INDICE

RESUMEN

A) INTRODUCCIÓN

1.- LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....	1
1.1.- Factores etiológicos.....	2
-Hormonales.....	2
-Genéticos.....	3
-Ambientales.....	3
1.2.- Alteraciones inmunológicas.....	4
2.- BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MEDIANTE TÉCNICAS DE INMUNOLOGÍA CELULAR Y PROTEÓMICA.....	10
2.1.- Inmunología celular.....	10
-Introducción.....	10
-CD38.....	12
-Localización.....	12
-Estructura.....	13
-Gen de CD38.....	15
-Funciones.....	16
-CD38 y enfermedad.....	17
-Anticuerpos anti-CD38 como diana terapéutica en clínica.....	22
-CD38 soluble.....	23
-Microdominios de membrana (<i>rafts</i>).....	24
-Composición y características	24
-Funciones	27
2.2.- Proteómica.....	29
-Introducción.....	29

2.2.1.- Biomarcadores en suero.....	34
-Haptoglobina.....	34
-Estructura.....	34
-Propiedades.....	38
-Haptoglobina y enfermedad.....	40
2.2.2.- Biomarcadores en células.....	42
-Calgranulina A y B.....	42
-Propiedades y estructura.....	42
-Calgranulina y enfermedad.....	48
-Proteína de choque térmico de 90 Kda.....	52
-Estructura y características moleculares.....	53
-HSP90 y lupus.....	56
B) JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	58
C) DISCUSIÓN.....	59
D) CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	72
E) REFERENCIAS.....	73
F) ABREVIATURAS.....	74
G) ANEXO 1: Artículos publicados	

1.-INCREASED ASSOCIATION OF CD38 WITH LIPID RAFTS IN T CELLS FROM PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND IN ACTIVATED NORMAL T CELLS

Esther J. Pavón, Pilar Muñoz, María del Carmen Navarro, Enrique Raya-Alvarez, José-Luis Callejas-Rubio, Francisco Navarro-Pelayo, Norberto Ortego-Centeno, Jaime Sancho, Mercedes Zubiaur.

Molecular Immunology 43 (2006) 1029-1039

2.- PROTEOMIC ANÁLISIS OF PLASMA FROM PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: INCREASED PRESENCE OF HAPTOGLOBIN α 2 POLYPEPTIDE CHAINS OVER THE α 1 ISOFORMS

Esther J Pavón, Pilar Muñoz, Antonio Lario, Victoria Longobardo, Montserrat Carrascal, Joaquín Abián, Ana B. Martín, Salvador A. Arias, José-Luis Callejas Rubio, Ricardo Sola, Francisco Navarro-Pelayo, Enrique Raya-Alvarez, Norberto Ortego-Centeno, Mercedes Zubiaur, Jaime Sancho.

Proteomics 2006, S282-S292

7) ANEXO 2: Artículos publicados (Colaboraciones)

1.- CD38 SIGNALING IN T CELLS IS INITIATED WITHIN A SUBSET OF MEMBRANE RAFTS CONTAINING LCK AND THE CD3- ζ SUBUNIT OF THE T CELL ANTIGEN RECEPTOR

Muñoz P, Navarro MC, Pavón EJ, Salmerón J, Malavasi F, Sancho J, Zubiaur M.

JBC (2003) 278 (50); 50791-50802

7) ANEXO 3: Resultados aún no publicados

1.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A CALCIO S100A8 (CALGRANULINA A) Y

**S100A9 (CALGRANULINA B) Y DE LA PROTEÍNAS DE
CHOQUE TÉRMICO DE 90 Kda (HSP90) CELULAS
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA
(PBMCs) DE PACIENTS CON LUPUS ERITEMATOSO
SISTÉMICO Y CONTROLES SANOS**

Esther J. Pavón, José-Luis Callejas, Norberto Ortego, Mercedes
Zubiaur, Jaime Sancho.

RESUMEN

En esta tesis hemos buscado biomarcadores de enfermedad en un grupo de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

Para ello hemos utilizado técnicas tanto de **inmunología celular**, como otras más novedosas como es la **proteómica**, por la que ya se viene apostando desde hace algún tiempo para desarrollar estudios de este tipo, en otras enfermedades.

Previamente en nuestro laboratorio se ha venido trabajando con la proteína CD38, viendo tanto su papel como molécula desencadenante de señales para determinadas rutas de señalización celular, como en la asociación a unos microdominios de membrana enriquecidos en lípidos, denominados *rafts*.

Por la bibliografía, se conocía además que CD38 es un marcador de activación, y que ya se está utilizando como tal en el diagnóstico de otras enfermedades como SIDA o la leucemia linfocítica crónica.

Por ello nosotros decidimos estudiarlo en pacientes con LES, y puede decirse que con gran acierto, puesto que hemos encontrado que CD38 está aumentado y de forma estadísticamente significativa tanto en células T como en sus subpoblaciones (CD4⁺, CD8⁺ y CD25⁺), y en células B de sangre periférica de pacientes con LES respecto a controles sanos. En las NK también está incrementado aunque los resultados no son significativos, pero quizás con un mayor número de pacientes se puedan ver mejores resultados, ya que nos acercamos bastante al límite de significación.

Por otro lado, las técnicas de proteómica están sirviendo en muchos casos para encontrar proteínas que puedan estar involucradas en el desarrollo de determinadas enfermedades. Es una herramienta poderosa, puesto que con muy poca cantidad de muestra se pueden identificar un número muy elevado de proteínas, que pueden resultar interesantes en este tipo de análisis.

Nosotros hemos estudiado por proteómica tanto el plasma de pacientes con LES y de controles sanos, como los PBMCs de ambas poblaciones.

En el plasma existe un número menor de proteínas que en las células pero en ambos casos hemos encontrado algunas proteínas que pueden resultar de interés, no para el diagnóstico de la enfermedad como tal, pero quizás sí para que sean

considerados como otro marcador más sumado a los que ya se conocen, y que podrían se estudiados en las pruebas médicas como otra información más.

Decir que por proteómica no solo interesa estudiar aquellas proteínas que están sobre-expresadas en pacientes frente a controles sino que también es importante conocer las que están menos expresadas o las que simplemente no se encuentren.

En este estudio hemos analizado en detalle la HAPTOGLOBINA del plasma, identificando además de sus distintos fenotipos (Hp2-1, Hp2-2, Hp1-1), ya que se sabe que cada uno de ellos está asociado a la gravedad de una determinada patología dentro de la enfermedad, algunas de sus modificaciones post-traduccionales.

En las células nos hemos centrado en el estudio de las proteínas de unión a calcio de la familia S100, CALGRANULINA A y CALGRANULINA B (en la que hemos encontrados también dos tipos de modificaciones post-traduccionales), así como la proteína de choque térmico HSP90 Kda (ya que mediante proteómica podemos analizar por separado las dos isoformas existentes que son la HSP90- α y HSP90- β).

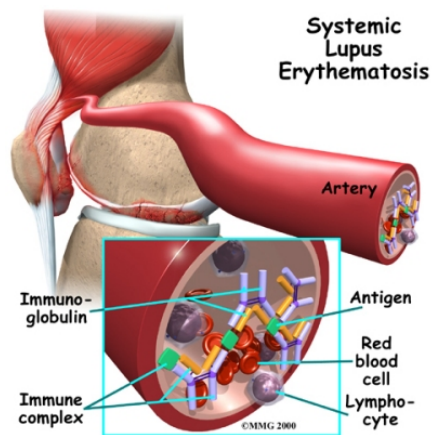
Los datos de proteómica además han sido corroborados por Western-blot.

INTRODUCCIÓN

A) INTRODUCCIÓN

1.- LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El lupus eritematoso sistémico (LES), es un desorden autoinmune del tejido conectivo [1] , que presenta un amplio rango de manifestaciones clínicas, como pueden ser desde problemas en la piel y lesiones mucosas, hasta daños severos en el sistema nervioso central, riñones y otros muchos órganos [2].



Afecta fundamentalmente a las mujeres, cuya edad inicial puede oscilar entre la adolescencia y los 40-50 años, y especialmente a las que pertenecen a determinados grupos étnicos, como serían aquellos cuyos ancestros fueran africanos o asiáticos, y cuyas manifestaciones clínicas podrían ser más severas que en pacientes de raza blanca [1].

Se podría decir que es la enfermedad autoinmune crónica más heterogénea [3] y el índice de prevalencia respecto a los hombres de de 9:1

Presenta una gran complejidad desde el punto de vista clínico dada su gran variedad de patrones de expresión. Evoluciona a través de brotes, alternados con unos períodos de actividad y otros de inactividad [4].

Está caracterizado por la producción de autoanticuerpos contra un rango limitado de antígenos nucleares. Estos anticuerpos resultan de la formación de complejos inmunes que se depositan en los tejidos induciendo la inflamación, y contribuyendo de ese modo a la patología de la enfermedad [5].

Y además, pueden resultar al menos en parte, de una desregulación de la respuesta del linfocito T a autoantígenos [6],[7].

1.1.- FACTORES ETIOLÓGICOS

La etiología y la patogénesis de la enfermedad están pobremente estudiadas o al menos se ha llevado a cabo de un modo incompleto.

Se han descrito al respecto una serie de factores tanto hormonales, genéticos como ambientales [4]:

- **Hormonales**: Los estrógenos desempeñan un papel importante en la etiología de esta enfermedad. Esto se desprende de las siguientes consideraciones:
 - a) Mayor incidencia femenina [8].
 - b) Disminución de ésta en las épocas en que no existen unos niveles de estrógenos elevados, es decir, antes de la menarquia y en la posmenopausia [9-11].
 - c) Agudización de la enfermedad en el puerperio (periodo después del parto durante el cual el aparato reproductor de la mujer vuelve a su estado normal), o con la administración de anticonceptivos orales [1, 12].

Sin embargo el mecanismo de modulación inmunológica de hormonas sexuales no está del todo establecido.

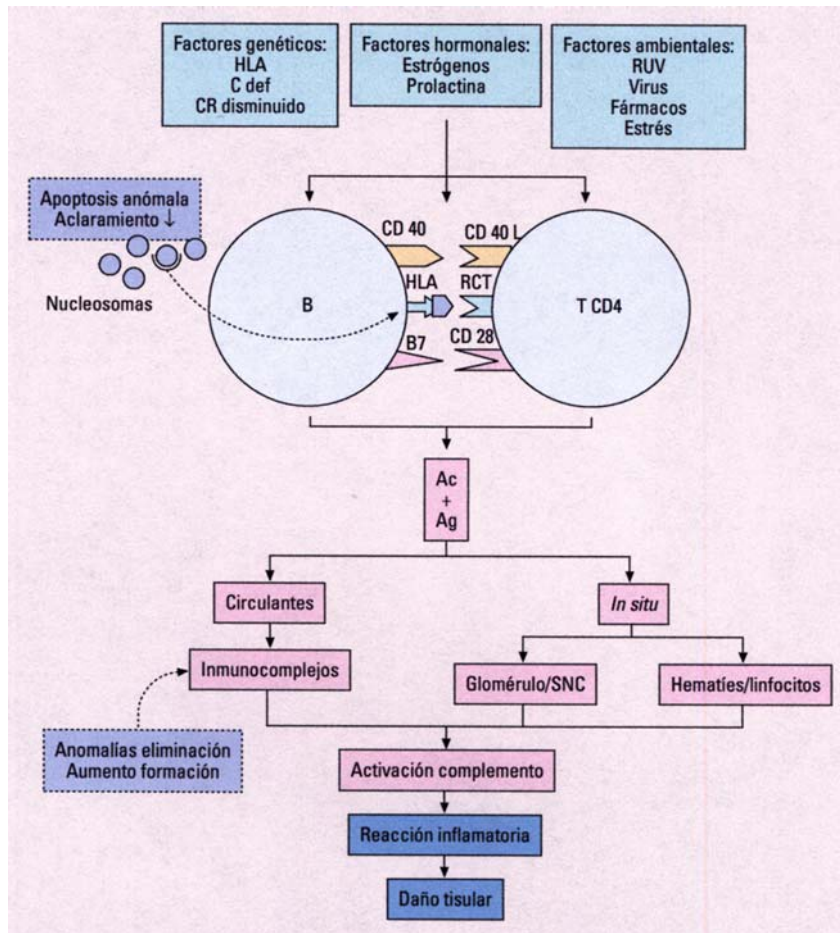
- **Genéticos**: Es probable que el LES resulte de los efectos de cierto número de genes que actúan de forma aditiva. Sin embargo, un individuo podría tener todas las variantes génicas posiblemente requeridas para desarrollar la enfermedad y aun así, no padecerla. Es decir, la penetrancia en el LES es relativamente baja.

Tanto la elevada variación fenotípica dentro de una determinada población (>66%,) [13], el aumento de la concordancia entre gemelos monocigóticos (25-69%), comparados con otros dicigóticos u otros hermanos de sangre (2-3%) [14, 15], la agregación familiar [16], o la asociación con múltiples genes candidatos [17], formarían parte de la componente genética.

Existen algunos locus susceptibles relacionados con la enfermedad, entre ellos está el 4p15 que ha sido identificado en la población europea, la americana y la islandesa [18, 19]. Además esta región es sinténica con el locus Lmb2 del ratón que va unido a la producción de anticuerpos anti-DNA de doble cadena [20]. También un intervalo del brazo largo del cromosoma 1, en concreto el 1q23-24 está relacionado con la enfermedad en distintas poblaciones [1].

- **Ambientales**: La mayoría de los pacientes tienen fotosensibilidad, lo que sugiere una participación de los rayos ultravioletas provenientes del sol en la etiopatogenia de la enfermedad [1, 4]. Otro factor estudiado ha sido el cristal de sílice [21]. También caben destacar los patógenos microbianos, y en particular, los virus donde el de Epstein-Barr (EBV), ha sido identificado como un posible factor en el desarrollo del LES [22], infectando fundamentalmente células B memoria, aunque cabe decir que aunque un 90% de la población puede ser infectada por este tipo de virus, la prevalencia de la enfermedad sigue siendo baja.

Figura 1: G. Espinosa Garriga et al. *Medicine* 2005;9(30) 1942-1952.



Mecanismos etiopatogénicos del LES. SNC: Sistema nervioso central; C del complemento defectuoso; RUV: Radiación ultravioleta; B: Linfocito B; Ac: Anticuerpo; Ag: Antígeno

1.2.- ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS

En la patogenia del LES intervienen principalmente dos factores inmunológicos:

- a) La predisposición genética a una estimulación excesiva en los linfocitos B.
- b) Una elevada respuesta, genéticamente determinada, frente a antígenos linfocitarios o nucleares.

El desarrollo de la autoinmunidad, ha sido atribuido a la pérdida de la auto-tolerancia debida a una deleción periférica o a un silenciamiento de linfocitos auto-reactivos, permitiendo especificidades múltiples de autoanticuerpos [23, 24].

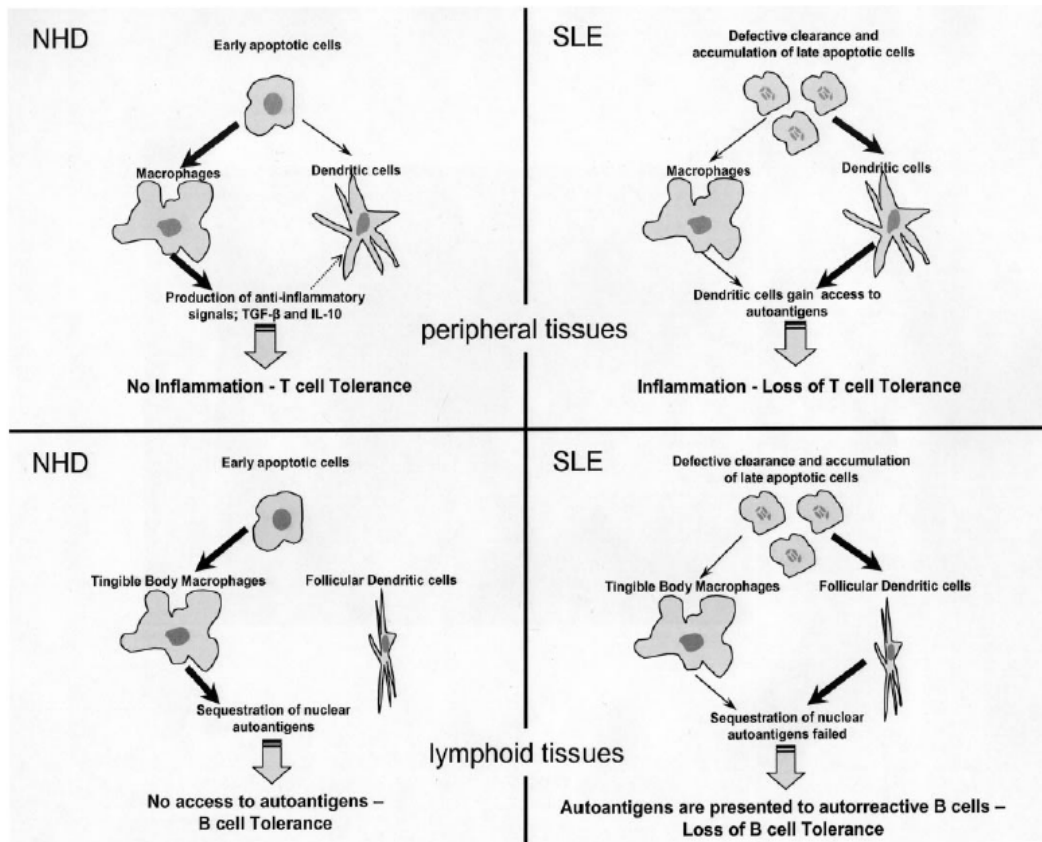
Actualmente va cobrando fuerza la idea de que las **CÉLULAS APOPTÓTICAS** podrían ser las que explicaran el reconocimiento predominante de antígenos intracelulares en esta enfermedad. Los autoantígenos son liberados tanto por células necróticas como apoptóticas. Se han descrito además defectos en el aclaramiento tanto en modelos de ratón [25, 26] como en humanos [27, 28] con LES.

En ratones se ha visto la acumulación de células apoptóticas en tejidos junto con una respuesta inmune contra complejos celulares que contienen DNA [2, 29-32].

En pacientes con LES se encontró una deficiencia en la actividad fagocigótica [2, 33, 34], lo cual podría generar una respuesta inadecuada por parte del macrófago [2, 27], viéndose como en algunos pacientes ha disminuido el número de los mismos estando por tanto afectada la ingesta de material apoptótico en los centros germinales de los nódulos linfáticos. Y sin embargo en controles, este material está asociado con la superficie folicular de las células dendríticas [2, 28].

Todos estos trabajos han sido corroborados mediante estudios recientes [35]. En estos se ha comprobado como los errores en el aclaramiento podrían ser los que expliquen la acumulación de autoantígenos en diferentes tejidos de los pacientes con LES, como por ejemplo en la piel. También se reducen las señales de atracción para macrófagos aproximadamente en un 25% debido a la disminución de la secreción de factores quimiotácticos por parte de las células apoptóticas, y además existe una maduración hacia células B autorreactivas contra anti-ADN de doble cadena, en lugar de células B reactivas hacia este tipo de anticuerpos.

Figura 2: Muñoz L.E. et al. *Rheumatology* 2005;44(9) 1101-1107



El destino de las células apoptóticas en controles sanos (NHD) y pacientes LES. En tejidos periféricos de controles, las células apoptóticas son eliminadas de forma temprana por los macrófagos, que producen citoquinas antiinflamatorias y disminuyen la regulación de la presentación del antígeno de las células dendríticas. En el tejido linfóide las células apoptóticas son eliminadas por macrófagos, que secuestran autoantígenos nucleares lejos de las células dendríticas foliculares (FDC). La consecuencia es la no inflamación y la inducción de tolerancia de células T y B.

En el tejido periférico y linfóide de pacientes LES, las células apoptóticas se acumulan y entran en un estado de necrosis secundaria. Estas células se hacen accesibles a las células dendríticas del tejido, que producen citoquinas inflamatorias y presentan estos autoantígenos mediante señales coestimuladoras a las células T autorreactivas.

En el ser humano se han identificado algunos genes cuya transcripción parece ser crucial en el proceso de aclaramiento. Se sospecha que cambios en la expresión por ejemplo, de Fas y Bcl-2, podrían desempeñar algún papel en la patogenia de las enfermedades autoinmunes, al favorecer la proliferación de determinadas poblaciones celulares de efecto autorreactivo [4, 36].

También se ha visto que las **CÉLULAS DENDRÍTICAS** (DCs) [37, 38], juegan un papel esencial en el mantenimiento de la tolerancia periférica y están completamente caracterizadas con respecto a la respuesta inmune primaria y secundaria.

Estas se encuentran continuamente “al acecho”, buscando bien lugares de inflamación o señales derivadas de patógenos. Después maduran de acuerdo con estas señales y adquieren determinadas características que les permitirán transportar los mensajes precisos, bien de producción o de regulación, a las células T que se encontrarán en los nódulos linfoides.

Cada vez es más evidente que el fallo del mantenimiento de la tolerancia por parte de estas células puede conllevar al padecimiento de cualquier trastorno inflamatorio autoinmune, debido a la activación de células T autorreactivas [39, 40].

Se ha propuesto que las DCs plasmacitoides tienen un papel clave en la patogénesis del LES, principalmente a través de la síntesis continua de IFN- α , el cual estimula la diferenciación de monocitos hacia DCs [41].

Las DCs mieloides también se han estudiado en LES, y existe una disminución de los niveles en sangre periférica así como una alteración del fenotipo de DC derivadas a monocitos [42, 43].

Se ha podido ver también la capacidad de producción de respuesta autoinmune por parte de éstas células, orientada hacia cuerpos nucleares, en modelos animales [37].

Otra de las características del LES desde el punto de vista inmunológico sería la aparición de anticuerpos dirigidos frente al sistema del **COMPLEMENTO** [44].

La significación clínica sin embargo no está clara. Además la mayoría de estos autoanticuerpos también se pueden encontrar en pacientes con otro tipo de enfermedades distintas del LES e incluso se han detectado en individuos sanos. [44, 45]. Más recientemente se ha podido comprobar como los autoanticuerpos están

presentes y se acumulan durante muchos años antes de que los pacientes desarrollen las características clínicas de la enfermedad [44, 46].

Por tanto, individuos aparentemente sanos con autoanticuerpos circulantes podrían llegar a desarrollar las características patológicas asociadas al LES.

Los autoanticuerpos más significativos contra el sistema del complemento son proteínas anti-C1q, que se suelen presentar aproximadamente en un tercio de los pacientes [47].

Lo que si se sabe es que el complemento está implicado en la patogénesis a través de múltiples factores. La deficiencia homocigótica hereditaria de proteínas de la ruta clásica se ha visto fuertemente asociada con la susceptibilidad a padecer la enfermedad, pero también el complemento está implicado en la fase inflamatoria efectora de la respuesta autoinmune que caracteriza al LES [47].

Se sabe que la severidad y la fuerza de la asociación entre las deficiencias genéticas del complemento y el lupus depende de la posición del componente perdido dentro de la ruta clásica de la activación del complemento.

Es decir la pérdida de C1, en concreto el componente C1q, conllevaría a un mayor riesgo a padecer la enfermedad (93%), y por la pérdida de C1s o de C1r (que suelen ir unidas), podrían desarrollarla el 57% de enfermos que ya de por sí tuvieran déficit de complemento. En cuanto a la pérdida de C4 el porcentaje sería del 75% y la de C2 del 10%.

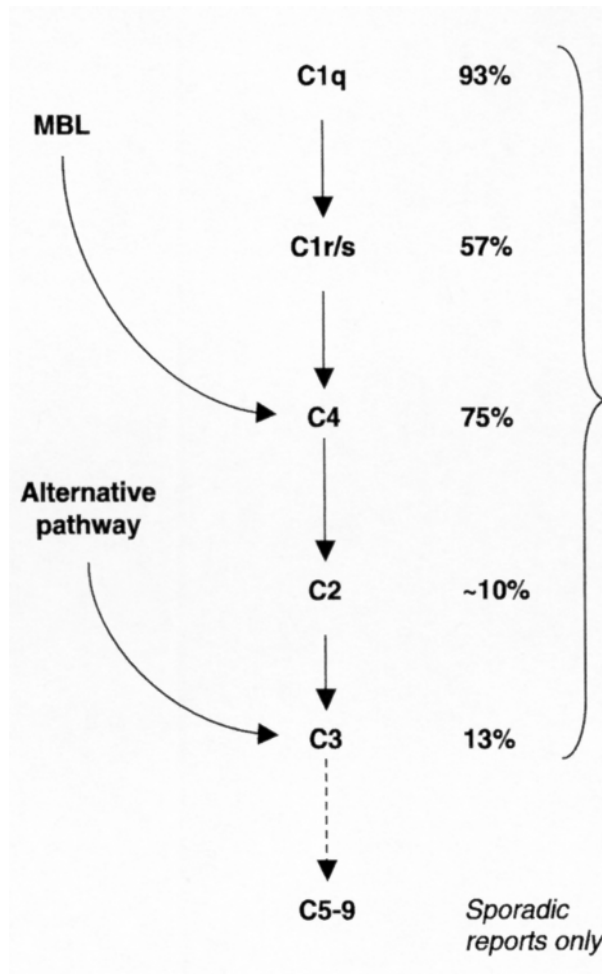
No obstante la pérdida de C1q y de C4 se da en casos extremadamente raros, siendo más común la ausencia de C2 que estaría relacionada con una sintomatología más suave.

Por la vía alternativa, sin embargo no se han observado defectos asociados al desarrollo de la enfermedad tras la pérdida de C3. [47-51].

Figura 3. Lewis MJ and Botto. *Autoimmunity* 2006, 39(5):367-378.

La deficiencia parcial es un factor de riesgo potencial para LES

Defectos no asociados con LES



Jerarquía de susceptibilidad a LES observada en pacientes con deficiencia del complemento

2.- BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES MEDIANTE TÉCNICAS DE INMUNOLOGÍA CELULAR Y PROTEÓMICA

2.1.- INMUNOLOGÍA CELULAR

INTRODUCCION

En nuestro laboratorio se ha venido trabajando en señalización celular a través del TCR desde hace ya algunos años, siendo éste el receptor crucial que controla la activación del linfocito T.

También ha sido bien estudiada la proteína CD38, demostrándose por ejemplo cómo desencadena la activación de las rutas de la quinasa Raf-1/MAP y la cascada dependiente de CD3- ζ /ZAP-70/PLC- γ 1, ambas dependientes de Lck en células T Jurkat debido a que induce la fosforilación en tirosinas de distintos sustratos y algunas proteínas citoplasmáticas, sugiriendo una relación funcional entre distintas señales repartidas entre el CD38 y el TCR [52].

Además se ha visto que la unión de CD38 permite la activación tanto de la quinasa MAP como de la PTK (proteína tirosina quinasa) y que además no necesita de todo el complejo TCR/CD3 para señalizar, sino sólo el módulo CD3- $\gamma\delta\epsilon$. [53].

Más tarde y continuando con el estudio de esta proteína, se pudo ver que estaba asociada a unos microdominios de membrana, denominados *rafts*, los cuales son insolubles en detergentes no iónicos a bajas temperaturas (4°C) y poseen una alta densidad de flotación. Se comprobó que deplecionando el colesterol con metil- β -ciclodextrina, se reducía la activación de la quinasa Akt mediada por CD38 y aumentaba la de Erk, pensándose por tanto que la unión entre CD38 y los *rafts* podría mejorar su capacidad de señalización [54].

Hasta el momento, todos los lisados celulares utilizados, habían sido tratados con detergentes no iónicos como el 1% Nonidet P-40 (NP40), que ejercen su efecto a la temperatura de 4°C, viéndose como constitutivamente el CD38 estaba asociado a los *rafts* resistentes insolubles en este detergente.

Como quedaban aún muchas preguntas por responder, como por ejemplo a que estructuras señalizadoras podía estar unido el CD38 en los microdominios de membrana, se continuó por este camino, pero en este caso haciendo lisados celulares en el detergente Brij98, ya que con éste se puede trabajar a la temperatura fisiológica de 37°C, a la cual las vesículas que se generan son más estables que en NP40. Se demostró que el CD38 está unido a los *rafts* que son insolubles en Brij98, y fue estudiado por el aislamiento de estas vesículas mediante gradientes de sacarosa.

Mediante este estudio se han llegado a diferenciar entre distintos tipos de microdominios de membrana que son insolubles en este detergente, y que son:

- CD38 *rafts*, que están enriquecidos en CD38, CD3- ζ y Lck.
- TCR/CD3 *rafts* que están enriquecidos tanto en CD3- ζ , en CD3- ϵ y en Lck.
- LAT *rafts* enriquecidos principalmente en Lck.
- Lck *rafts* que están contienen todas las moléculas analizadas.

Con estos datos se comprobó que cuando CD38 está unido a los microdominios de membrana es capaz de comenzar a generar señales para distintas rutas de señalización, ya que por ejemplo Lck y LAT se fosforilan en tirosinas solamente en los *rafts*, N-Ras se activa cuando el CD38 se liga a ellos, activando a su vez a Erk y la fosforilación completa tanto de CD3- ζ como de CD3- ϵ ocurre también en estas vesículas [55] (Ver anexo I).

Con todos estos resultados, cuando comenzamos a trabajar con los pacientes, pensamos que teníamos todas las herramientas necesarias para estudiar CD38 en las muestras de sangre que recibíamos, y además la elección de la proteína no fue al azar, sino que ya se sabía que era un marcador de activación, había sido

estudiado como factor pronóstico frente a determinadas enfermedades, y el gen podía ser unos de los candidatos susceptibles a padecer la enfermedad.

De este modo, uno de los objetivos de nuestro estudio fue ver CD38 en los pacientes con LES, pero no tanto para estudiar su señalización, sino mas bien para conocer si CD38 estaba aumentado en células de sangre periférica (en concreto en linfocitos T, B y NK), respecto a controles y si además éste se encontraba asociado a las balsas lipídicas, utilizando para ello lisados en el detergente Brij98, ya que en este caso sí era importante mantener los experimentos a temperatura fisiológica por ser la más parecida a la de la sangre, y estudiando la expresión en superficie de las distintas poblaciones linfocitarias, así como la de las subpoblaciones de linfocitos T. (Ver anexo I).

• **CD38.**

El CD38 humano es una glicoproteína transmembrana tipo II, expresada en superficie por células hematopoyéticas prematuras, que pierden su expresión en la madurez, para después recuperarla tras la activación. [56-58].

• **LOCALIZACIÓN**

Se pueden encontrar en distintos tipos de tejidos: [59]

-Sangre periférica: Linfocitos T y B, células NK, monocitos, eritrocitos, plaquetas.

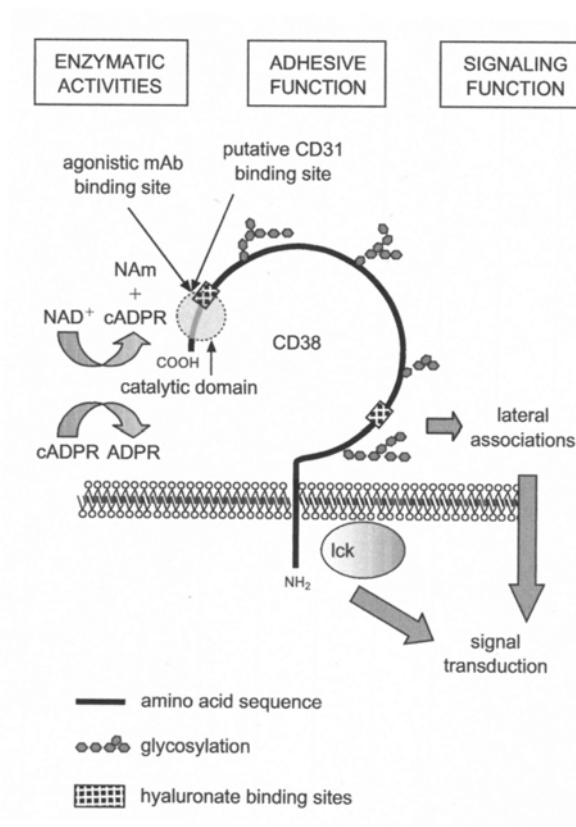
-Subconjuntos de linfocitos de distintas regiones: Médula ósea (Células B hematopoyéticas y células plasmáticas), nódulos linfoides (linfocitos B de centros germinales), timo (Timocitos), mucosa intestinal (intra-epitelial y linfocitos de la lamina propia).

-Tejidos sólidos: Células neuronales, células musculares estriadas y cardiacas y músculo liso, túbulos renales, epitelio prostático e islotes pancreáticos.

• **ESTRUCTURA**

Como proteína transmembrana tiene 45 KDa y su longitud completa es de 300 aminoácidos (aa), repartidos en tres dominios: un corto dominio intracelular N-terminal de 23 aa, un único dominio transmembrana en forma de hélice de 20 aa , y un largo dominio extracelular C-terminal de 256 aa. [56, 60, 61]. Este último presenta cuatro potenciales lugares de glicosilación y dos motivos de unión a ácido hialurónico. [62-64]

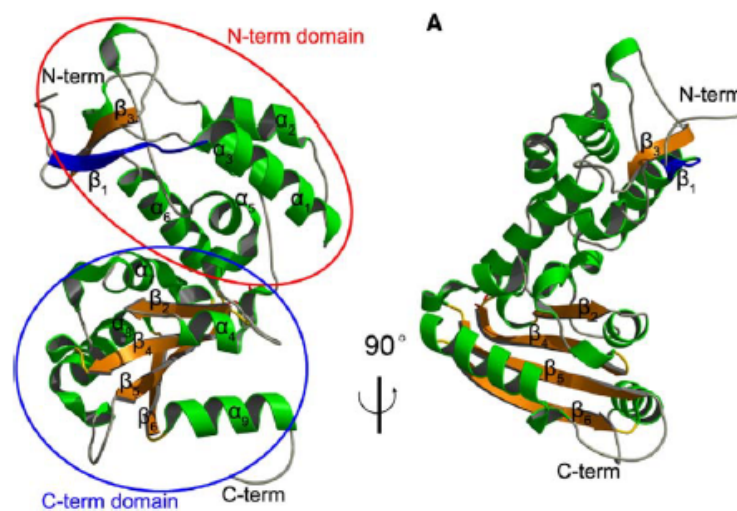
Figura 4 . Savarino A, et al. AIDS 2000, 14:1079-1089.



Modelo hipotético de CD38 humano en superficie. El círculo en el carboxilo terminal indica una región relacionada con la función enzimática así como algunos receptores de actividad (unión a ácido hialurónico y posiblemente CD31). También se indican otras posibles interacciones intermoleculares como por ejemplo asociaciones laterales con otras moléculas de superficie y una asociación intracitoplasmática con la tirosina quinasa Lck.

Hay estudios que han podido cristalizar la estructura cristalina de la parte extracelular de CD38 (figura 5), lo cual ha podido ayudar a comprender las funciones de esta proteína, así como también suministrar una serie de pistas para encontrar drogas potentes para el tratamiento de algunas enfermedades que se han relacionado con CD38 como el SIDA, la leucemia linfocítica crónica (B-CLL) o la diabetes [56].

Figura 5 *Qun Liu, et al. Structure 2005,13(9):1331-1339.*



Estructura del dominio extracelular de CD38:
dos vistas con una rotación de 90° una con respecto a la otra.

Fue identificada inicialmente mediante anticuerpos monoclonales de linfocitos pensándose por tanto que podría ser un antígeno específico frente a estas células. [65, 66].

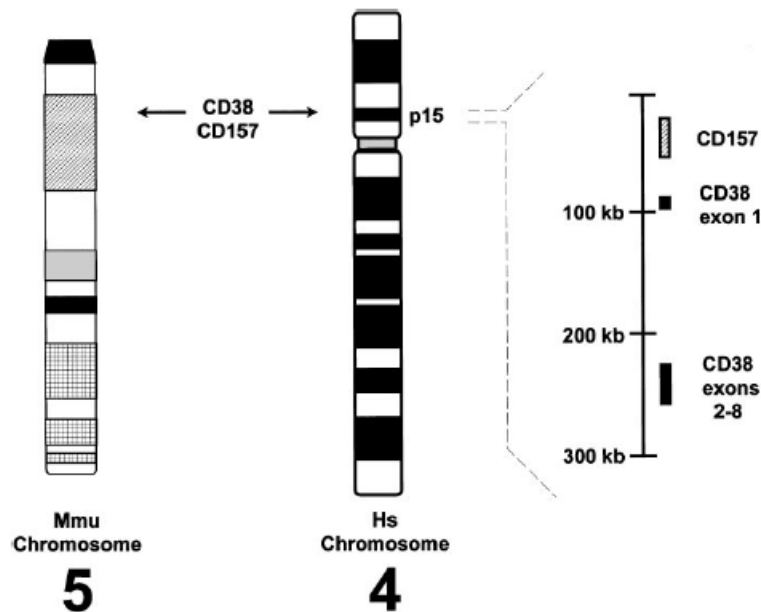
Resultados recientes muestran que CD38 no es específica de linfocitos, ya que se encuentra expresada en otros muchos tejidos [67, 68], pudiendo incluso llegar a encontrarse en varios organelos intracelulares [69, 70], incluyendo el núcleo [71, 72].

• **GEN DE CD38**

El gen que codifica CD38 se encuentra en el brazo pequeño del cromosoma 4p15 en humanos junto a CD157 [73] mientras que en ratones se ha encontrado en el cromosoma 5 [74, 75].

Se ha pensado que ambos genes pueden proceder de un ancestro común ya que no por ser proteínas similares (ambas son ciclasas) tienen que proceder de un mismo gen.

Figura 6 . Ferrero E, et al. J Leukoc Biol 1999, 65(2):151-161.



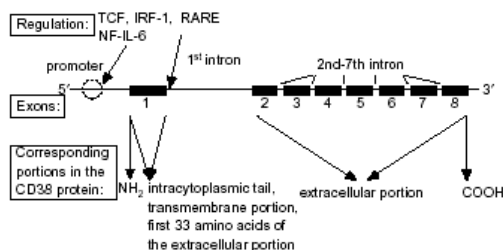
Representación esquemática de la sintenia de los genes de CD38 CD157 en sus respectivos cromosomas humano y murino.

El gen que codifica para la proteína CD38 humana es largo y complejo y se extiende sobre unas 60 kb. La longitud total parece estar establecida tal y como se puede observar en la figura 7. El gen consiste en ocho exones y 7 intrones de longitud variable. La región del promotor presenta sitios relevantes de unión para varios factores de transcripción inmunológicos, factores complejos ternarios (TCF),

factores nucleares activados por IL-6 y el factor regulador de interferón 1 (IRF-1) [76].

Figura 7 . Savarino A, et al. AIDS 2000, 14:1079-1089.

Representación esquemática del gen para CD38 humano.



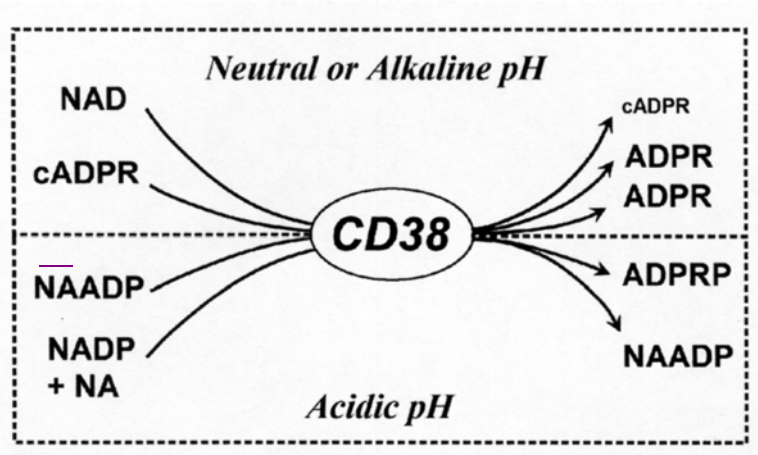
Como ha sido demostrado que los niveles de CD38 en células T y B de pacientes con LES están incrementados frente a los de los controles [19], datos que han sido confirmados por nuestros propios estudios (ver anexo I), se puede suponer o hipotetizar que el gen de CD38 podría ser candidato susceptible a padecer la enfermedad [20].

En concreto se ha encontrado un polimorfismo en la posición 182 del intrón 1 que está relacionado con el desarrollo de erupciones discoides en un grupo de pacientes con LES, de manera que el genotipo CC causa susceptibilidad y el CG confiere protección frente al desarrollo de estas manchas [20].

• **FUNCIONES**

1.- **Ectoenzima:** El descubrimiento inesperado de la homología entre CD38 y la ADP ribosil ciclasa [77], también aportó una nueva perspectiva a la función celular de esta proteína y su uso en nuevos campos de investigación. Incluso, se ha establecido que el CD38 es una enzima multifuncional que cataliza el metabolismo de dos segundos mensajeros de Ca^{2+} distintos, ADP-ribosa cíclica (ADPRc), [78, 79], y ácido nicotínico fosfato adenina dinucleótido (NAADP) [80], a partir de los substratos NAD y NADP respectivamente [81, 82]. La ADPRc y el NAADP pueden movilizar el calcio desde el interior celular y regular la señalización del mismo [56, 83, 84].

Figura 8: Lee H.C. *Molecular Medicine*. 2006:12(11-12). 317-323



Múltiples reacciones enzimáticas catalizadas por CD38

2.- **Molécula de adhesión:** Media la interacción entre leucocitos y el endotelio vascular a través de su ligando que es el CD31.[58, 85, 86].

3.- Es una molécula involucrada en la **señalización transmembrana**, participando en procesos como la movilización del Ca^{2+} , activación celular, y modulando la producción de citoquinas [58]. Además favorece la señalización de otras moléculas como el CD3 en células T [87], el BCR en células B [88] y el CD16 en las células NK.

• **CD38 Y ENFERMEDAD:**

Se ha estudiado la influencia o el efecto de la proteína CD38 en algunas enfermedades utilizando éste como factor pronóstico en: Infección por HIV-1, leucemia linfocítica crónica (B-CLL) y diabetes tipo I.

-SIDA:

Como en la mayoría las infecciones virales, la producida por el VIH-1 causa activación de las células T (CD4 y CD8) y B, las cuales a su vez aumentan la expresión de CD38 y de otros marcadores de activación [76].

Durante este proceso la expresión de CD38 en linfocitos de sangre periférica es alta durante la infección primaria, disminuyendo durante la transición hacia la fase asintomática, y volviendo a verse incrementada durante la progresión hacia el desarrollo del SIDA [89].

En los linfocitos T CD8⁺ el CD38 está sobreexpresado en pacientes [76], pudiendo disminuir en sujetos con niveles de CD4 estables [90]. Aunque de forma general se puede decir que la expresión es más elevada en aquellos que se encuentran en la fase asintomática que en controles sanos [62, 76, 90]. En estas células puede incluso incrementarse de nuevo la expresión antes del desarrollo del SIDA [63]. Aunque otros autores dicen que se mantiene estable durante la progresión de la enfermedad [64].

La expresión elevada en células T CD8⁺ es por tanto un factor pronóstico negativo de la enfermedad aunque los niveles disminuyen gracias a las terapias anti-retrovirales (HAART), tanto en adultos como en niños. [57, 89, 91-93].

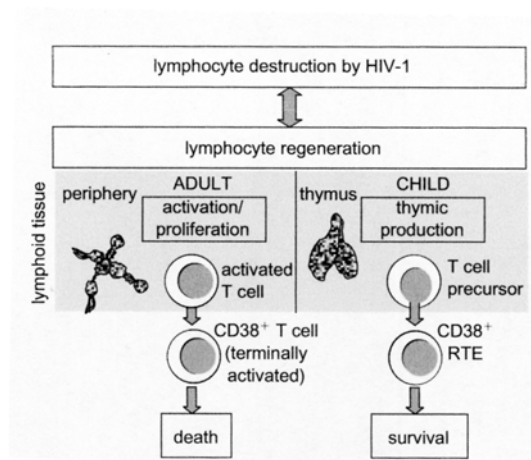
Hay datos que indican que no solo la proporción de linfocitos CD8⁺CD38⁺ tienen valor pronóstico en el desarrollo del SIDA sino que a éste habría que añadir el número de linfocitos T CD4 [76, 94]. Además se ha visto que algunos de estos linfocitos presentan actividad citotóxica contra las células CD4 que expresan antígenos virales, contribuyendo quizás a la depleción de esta población. [64, 76, 95].

Altos niveles de CD38 en la población linfocitaria CD4⁺ también es un factor de mal pronóstico de manera que pueden estar relacionados con una supervivencia corta en aquellos individuos con una infección avanzada [76, 96].

El CD38 está también sobreexpresado en células B CD19⁺ durante la infección por VIH-1. En unos primeros estudios se ha podido ver como la expresión en células B está estrechamente relacionada con la carga viral [64, 76].

Pero los resultados encontrados en niños son totalmente distintos ya que una alta expresión de CD38 sería un marcador pronóstico favorable tanto en células CD8⁺ como en las CD4⁺ [97, 98] (Sirera R, et al. XII International Conference on AIDS, 1998 Geneva).

Figura 9: Savarino et al. AIDS 2000: 14 (9). 1079-1089.



Valor pronóstico de la expresión de CD38 en adultos y niños. El modelo propuesto en 1998 por Martino et al [97], está basado en el supuesto de que los linfocitos T CD38 expandidos por la infección del HIV-1 tienen generalmente un efector de activación de vida corta con bajo potencial de replicación en adultos. Por el contrario, los niños tienen una producción tímica de células CD38⁺ de larga vida (RTE) con alto potencial de replicación.

Todo esto ha podido ser estudiado gracias a la actividad del CD38 como marcador de activación de la respuesta inmune [91].

-LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (B-CLL):

Estudios recientes han corroborado lo que se ha venido diciendo desde hace varios años atrás, pudiéndose confirmar que la alta proporción de células que expresan CD38 entre las células leucémicas está asociada a un mal pronóstico de la enfermedad [99].

Se puede hacer además una distinción según la cantidad de CD38 expresada por las células de estos pacientes, generando grupos con mejor o peor pronóstico [100, 101], o incluso considerando un grupo con mejor pronóstico dentro de otro, donde la enfermedad esté ya realmente avanzada.

En trabajos previos no sólo ya se confirmaban estos resultados sino que se llegaba a decir que debería incluirse la medida por citometría de flujo del CD38 en superficie de las células linfocíticas, en la evaluación de rutina de pacientes con este tipo de leucemia [100].

Se ha visto también que cuando a un cultivo de células B-CLL aisladas se le añade IL-2, la expresión de CD38 aumenta, siendo ésta mayor en células que previamente eran positivas para CD38 que para aquellas que no lo eran. Además el incremento depende de la dosis y del tiempo de exposición [102].

El CD38 es un receptor en células B-CLL y esto se puede traducir en la existencia de determinadas señales de activación y diferenciación en este tipo de células mediada por la IL-2, siendo además el responsable de la adquisición de propiedades de crecimiento que justifican el mal pronóstico de la enfermedad junto a su receptor CD31 que es un potente inhibidor de la apoptosis [103] y que está ampliamente expresado en células B [86].

-DIABETES:

La secreción de insulina es uno de los elementos clave en la homeostasis de la glucosa y es una de las funciones mediada por el CD38 conocida desde el año

1993 [104, 105]. Esta molécula podría ser también diana para una respuesta autoinmune debido a que se han encontrado autoanticuerpos anti-CD38 autorreactivos en el suero de pacientes diabéticos tanto de tipo 1 (insulino-dependientes procedentes de una diabetes de tipo autoinmune) como de tipo 2 (no insulino-dependientes, procedentes de una diabetes generada por la disminución de la sensibilidad a la acción de la insulina) en distintas poblaciones (como la caucásica y la japonesa), y no se han hallado en controles sanos, confirmándose este tipo de resultados mediante distintos trabajos [104, 106, 107].

En células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) la unión de anticuerpos monoclonales anti-CD38 agonistas, induce la liberación de citoquinas proinflamatorias como la Interleuquina 1 (IL-1), IL-6 y el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) [108], y por tanto podrían verse también estos efectos con los autoanticuerpos anti-CD38. La liberación de citoquinas conllevaría una importante contribución a la insulinitis, que es la responsable de una presentación temprana de diabetes tipo 1 y además estaría de acuerdo con los modelos propuestos hasta la fecha, respecto a que la diabetes de tipo 2 sea una enfermedad del sistema inmune innato, aunque aún esto no sean más que especulaciones.

Lo que si está definido es que los autoanticuerpos anti-CD38, constituyen un nuevo marcador de células β autoinmunes en diabetes [104]. Y el daño de éstas células es una de las principales causas para que se produzca la enfermedad [109].

Se ha visto recientemente que los autoanticuerpos anti-CD38 son más prevalentes a largo plazo que en una diabetes inicial y también lo son más en la de tipo 2 que en la de tipo 1. Y que la respuesta humoral contra CD38 podría acompañar a la destrucción de las células β .

Además está comprobado que los autoanticuerpos no juegan ningún papel patológico en el desarrollo de la diabetes, pero el descubrimiento del anti-CD38 podría ser la excepción a esta regla en esta enfermedad [59], pudiendo pensarse además al estar expresada en otro tipo de tejidos, también podría ser la causa de otras enfermedades.

- **ANTICUERPOS ANTI-CD38 COMO DIANA TERAPEUTICA EN CLÍNICA**

El CD38 es una molécula que está representada en la superficie celular de muchos tipos de tumores linfoides, sobre todo en mielomas, en linfomas asociados al SIDA, y en linfoproliferaciones post-transplantes. Por tanto, esta molécula es una importante diana para terapia mediante el uso de anticuerpos monoclonales [110].

A pesar de algunas decepciones relacionadas con su estudio y obtención, han sido descritos anticuerpos anti-CD38 por tres grupos diferentes:

1.- Anticuerpo monoclonal humano IgG anti-CD38, desarrollado por Paul Parren y Michael de Weers (Genmab, Utrecht, Holanda), denominado Humax-CD38 induce tanto una fuerte citotoxicidad dependiente del complemento como una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en líneas celulares de mielomas y cultivos frescos de pacientes con mielomas de médula y leucemias en sangre. Además también es capaz de inhibir la actividad ciclasa de CD38.

También se ha visto la inhibición del crecimiento de células de linfoma de células B en un modelo de ratón con SCID (inmunodeficiencia combinada severa) tratado con este anticuerpo Humax-CD38.

2.- Robert Friesen (MorphoSys AG, Martinsried, Alemania), descubrió un anticuerpo IgG específico para humanos, con alta afinidad y elevada actividad también mediante mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra líneas celulares y cultivos primarios de mielomas.

3.- Finalmente para aumentar la especificidad frente a las células de mieloma se han desarrollado anticuerpos con dos dominios de unión, uno para CD38 y otro para la molécula CD138.

Estudios previos desarrollaron inmunotoxinas anti-CD38 capaces de matar líneas celulares tanto de mieloma como de linfoma. Pero aún no se les ha permitido el uso en aplicaciones clínicas [111].

- **CD38 SOLUBLE:**

Además de la existencia del CD38 de membrana, hay estudios que prueban que se puede detectar CD38 soluble (sCD38) en cultivos celulares de linfocitos T alo-activados, y en varias líneas de tumores celulares. El sCD38 está también presente *in vivo* en fluidos biológicos normales (suero fetal y fluido amniótico) y patológicos (sueros y ascitis de pacientes con múltiples mielomas y en sueros de pacientes con SIDA) Ptitsina et al, Russ J Immunol 1999, Ptitsina et al, Rus J HIV/AIDS 1999, [112, 113].

El sCD38 nativo, mantiene la capacidad de inhibir la actividad de unión de anticuerpos anti-CD38 y cataliza la síntesis y la hidrólisis de ADPRc en la misma proporción que la observada con el CD38 de membrana [113].

Los estudios del sCD38 provienen de la idea de que el CD38 humano está involucrado en interacciones célula-célula [114]: esto permite pensar en la hipótesis de que la molécula pudiera existir en forma soluble, ya que esto es una característica típica de otros receptores de superficie involucrados en señalización transmembrana [115, 116].

Se ha demostrado que el sCD38 deriva del CD38 anclado a la membrana y la presencia de las dos formas parece ser una característica general de esta molécula [113].

La masa del sCD38 es de 38 kDa, mientras que la del CD38 de membrana es de 43.7 kDa. La diferencia de 4.7 kDa corresponde a la masa molecular de la

secuencia de aminoácidos del dominio citoplasmático (21 residuos), y al dominio transmembrana (23 residuos) [60].

El sCD38 se origina por tanto por una segmentación proteolítica cerca de la membrana celular [113, 117, 118].

La interacción entre ambas formas soluble y de membrana podrían contribuir a un fino acercamiento de las interacciones entre CD38 y su ligando CD31 [119].

Se ha descubierto una forma soluble de 78 kDa en sobrenadantes de cultivos de líneas celulares linfoblastoides obtenidas de pacientes con agammaglobulinemia [120]. Esto puede suponer que el CD38 trabaja en forma de dímero y ésta forma es accesible para la detección en fluidos normales y patológicos como por ejemplo en suero [121].

• **MICRODOMINIOS DE MEMBRANA (*rafts*).**

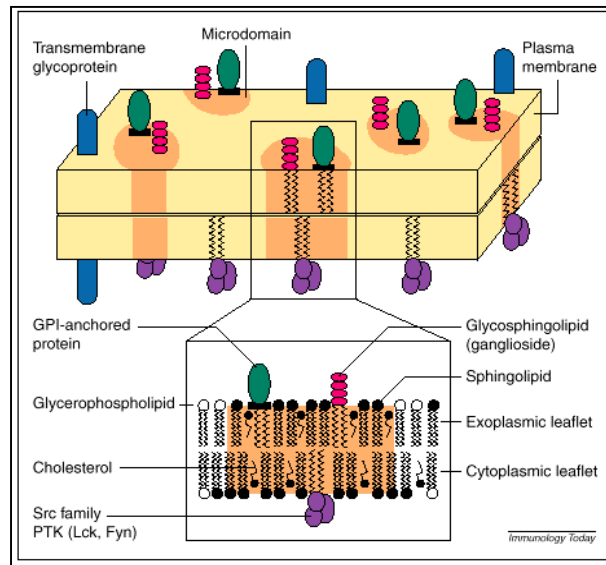
• **COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS**

Un amplio rango de interacciones entre lípidos y proteínas generan heterogeneidades o microdominios dentro de la membrana plasmática. A estos se les conoce por el nombre de *RAFTS*.

Estos están enriquecidos en esfingolípidos, colesterol, proteínas ancladas a la membrana a través de glicosilfofosfatidilinositol (GPI) y fueron descubiertos cuando intentaba explicarse la distribución desigual de las distintas moléculas de superficie que se anclaban a la membrana a través de GPI.

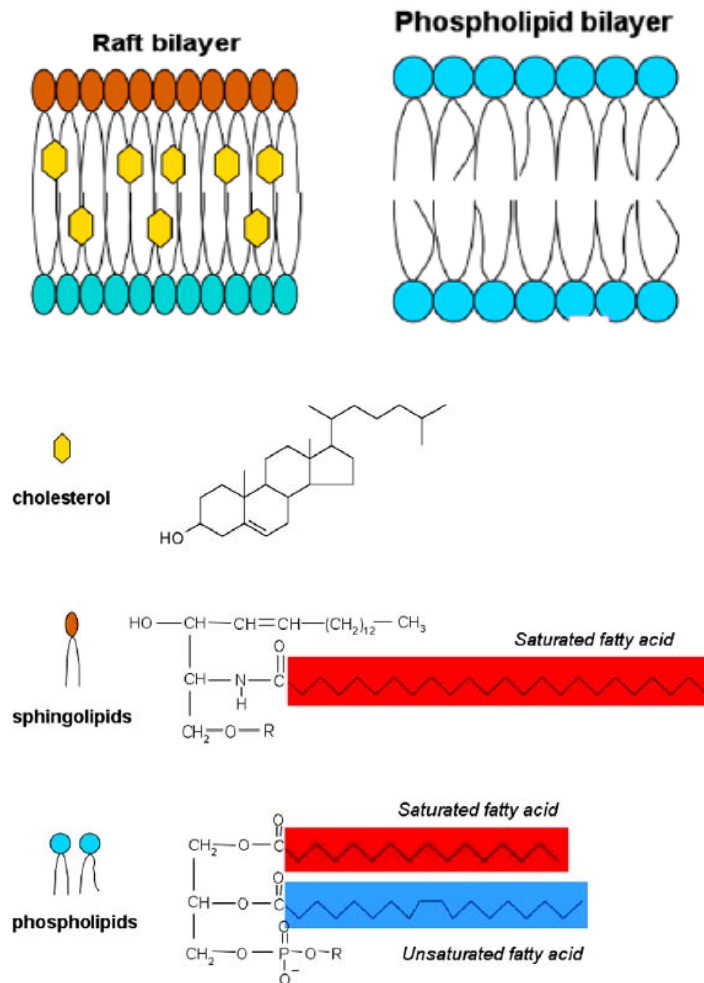
Los *rafts* están presentes en todos los tipos celulares en los que se han podido analizar [122].

Figura 10: Ilangumaran, et al. Immunol Today. 2000. 21(1):2-7



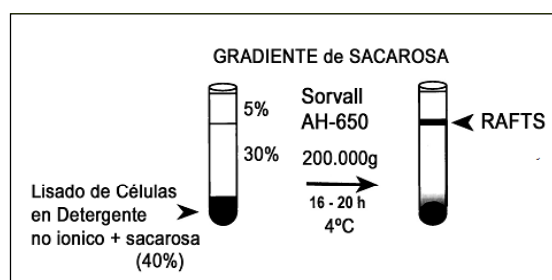
Los glicolípidos se asocian por sus largas cadenas aciladas formando agrupaciones muy compactas estabilizadas por los puentes de hidrógeno que se producen entre sus cabezas azucaradas. De hecho, los esfingolípidos especialmente los glicoesfingolípidos, tienen temperaturas altas de fusión debido a que sus cadenas de hidrocarburos presentan un grado alto de saturación. El colesterol se intercala entre las cadenas hidrocarbonadas donde provoca una disminución de su flexibilidad y de esta forma compacta la bicapa lipídica [123]. Este empaquetamiento lateral de los esfingolípidos y el colesterol conduce a la formación de dominios dispersos que se encuentran en una fase similar a la fase líquida ordenada, que se denominan balsas o *rafts* dentro de la bicapa de las membranas [124].

Figura 11: Pizzo P et al. *Microbes and infection*. 2004. 6(7):696-692.[125]



Composición de los rafts.

La estructura peculiar de los *rafts* les confiere la propiedad de ser insolubles en detergentes no iónicos a baja temperatura como Triton X-100 o NP-40, o a temperatura fisiológica como el Brij98. De esta forma proteínas y lípidos que se encuentran en ellos pueden ser aislados bioquímicamente por centrifugación en gradientes de sacarosa.



Desde que se postuló por primera vez la existencia de los *rafts* [126], ha habido una gran controversia sobre si existían realmente o eran simples artefactos producto de la utilización de detergentes para su aislamiento. Se han realizado numerosos experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*, que confirman su existencia, pero quizás uno de los más definitivos fue el aislamiento en ausencia de detergentes [127]. El posterior análisis determinó que presentaban la misma composición que los aislados por el método tradicional.

Estos microdominios juegan un papel importante en señalización celular a través del receptor de células T (TCR), del receptor de células B, receptores de factores de crecimiento, quemoquinas, receptores de interleuquinas, así como también el receptor de la insulina [128-130].

Tienen además la habilidad de segregar receptores proteicos proporcionando un mecanismo de compartimentalización de componentes de señalización en la membrana plasmática, concentrando ciertos componentes en lípidos *rafts* y excluyendo otros.

Se estima que los *rafts* representan el 40% de la membrana celular de células inmunes, según medidas de fluorescencia [129, 131]. En situaciones de reposo estas estructuras cuyo diámetro está alrededor de los 50 nm, contiene un alto número de lípidos y un pequeño número de proteínas, por ello se les denomina *rafts elementales* [132-134]. Pero por el entrecruzamiento de varios receptores proteicos en células T, pueden alcanzar un tamaño de hasta 100 nm de diámetro, siendo más estables y a menudo van unidos a la actina del citoesqueleto.

- **FUNCIONES**

La activación del linfocito T se desencadena cuando el receptor de la célula T (TCR) reconoce al antígeno asociado con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresado sobre la superficie de la célula presentadora

del antígeno (APCs). Los siguientes eventos en la cascada de señalización del TCR incluyen activación de las proteínas de la familia de las Src quinasas, como Lck y Fyn, fosforilación de motivos ITAM en las cadenas CD3/ζ asociadas con el propio TCR y activación de proteínas asociadas a zeta como la ZAP-70 y Syk tirosin quinasas. Dos sustratos conocidos de ZAP-70 son el adaptador para la activación de células T (LAT) y SLP-76, cuya activación resulta del reclutamiento de otras proteínas involucradas en la activación de Ras y rutas de calcio, permitiendo la proliferación de células T [125].

Además algunas proteínas involucradas en las fases tempranas de la señalización del TCR, como Lck y Fyn [135], la proteína adaptadora LAT [136], fosfoproteínas asociadas a dominios enriquecidos en glicosfingolípidos (PAG) [137] o proteínas activadoras de Csk (Cbp) [138], residen constitutivamente en los *rafts*.

Cuando existe un cambio en las propiedades o composición de estos microdominios de membrana, se puede producir una señalización inapropiada del linfocito T que conllevaría al desarrollo de condiciones patológicas, incluyendo autoinmunidad [6, 139, 140]. Está demostrado por ejemplo que pacientes con LES tienen reducida la expresión de Lck, la cual además está asociada con la actividad de la enfermedad [141]. También en este mismo trabajo observaron un incremento de la ubiquitinización de determinadas proteínas incluyendo Lck, proceso que es independiente de la activación del linfocito T en estos pacientes. Estos resultados son consistentes con otros que han visto cómo existe una disminución de la cadena CD3-ζ frente a un aumento en la ubiquitinización de ésta cadena en células T de pacientes con LES [142].

Al igual que ocurre en linfocitos T, parece ser que los *rafts* también están implicados en la señalización y regulación de las células B. Así mientras el receptor de antígeno de la célula B (BCR), es excluido de los microdominios en células en reposo, son reclutados hacia los mismos por un proceso de señalización independiente [143, 144]. Lyn está expresado en *rafts* de forma constitutiva

mientras que otras proteínas son reclutadas hacia estos microdominios tras la cascada de señalización como Syc, Vav, SHIP y PLC γ .

Otras funciones propuestas son:

La participación de los *rafts* puede ser importante en el transporte dentro de la ruta endocítica tanto de lípidos [145] como de proteínas ancladas por GPI [146] .

Podrían servir como sitios de anclaje para la entrada de ciertos patógenos y toxinas [147].

En ellos podría darse el procesamiento aberrante de la proteína del amiloide que contribuye a la enfermedad del Alzheimer [148].

La proteína asociada a integrinas regulando su función, y las proteínas G heterodiméricas forman un complejo estable dependiente de colesterol que se encuentra enriquecido en los *rafts* [149].

Se polarizan en el frente de células de adenocarcinoma que migran en un gradiente quimiotáctico [150]. El desarrollo de la polaridad que es necesario para la migración directa, es abolido cuando se reducen los niveles de colesterol.

También están involucradas en la presentación del antígeno vía MHC de clase II [151, 152].

2.2.-PROTEÓMICA.

INTRODUCCION

El término “proteoma” fue usado por primera vez en 1995 para describir el conjunto de PROTeínas de un genOMA, una célula o un tejido.

De manera imperceptible, la palabra dio lugar a una nueva disciplina, la PROTEÓMICA, que se puede definir como el estudio a gran escala de los productos génicos de un genoma mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares.

Este término se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante 2D-PAGE.

Según esto, la proteómica comenzó en los años setenta cuando se empezaron a construir bases de datos de proteínas utilizando la electroforesis bidimensional. Sin embargo, la identificación era difícil debido a la falta de métodos analíticos rápidos y sensibles para la caracterización de proteínas.

En los años noventa, la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, ya que elimina la mayoría de las limitaciones del análisis de proteínas. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marca el comienzo de una nueva era.

Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones de proteínas, de modificaciones pos-traduccionales, el análisis funcional de proteínas, y estudios de localización.

Se puede distinguir entre varios tipos de proteómica:

-Proteómica de expresión: es el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable. En esta estrategia se compara la expresión del proteoma total o de subproteomas entre diferentes muestras. La información obtenida puede permitir la identificación de nuevas proteínas implicadas en transducción de señales, la identificación de proteínas específicas de una enfermedad y proteínas de interés en microbiología médica.

-Proteómica del mapa celular o **estructural** es el estudio de la localización subcelular de las proteínas y de las interacciones proteína-proteína mediante la purificación de orgánulos o complejos y la posterior identificación de sus componentes mediante espectrometría de masas.

-Proteómica funcional: Se refiere a diversas aproximaciones proteómicas que permiten el estudio y caracterización de un grupo de proteínas determinado proporcionando información importante sobre señalización, mecanismos de la enfermedad o interacciones proteína-fármaco.

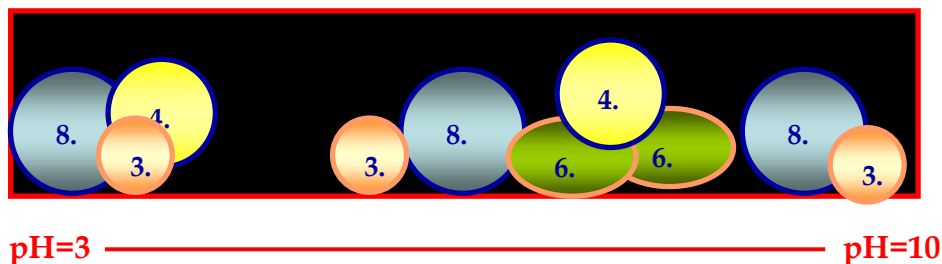
Para desarrollar los objetivos de la proteómica se requiere la implicación de diversas disciplinas como biología molecular, bioquímica, microbiología y bioinformática, siendo esta última de vital importancia.

Hay que tener en cuenta que obtener el proteoma de una célula es como tomar una fotografía de todas las proteínas en un momento determinado debido a que éstas pueden verse alteradas o modificadas bien por modificaciones post-traduccionales, translocación, síntesis o degradación.

La técnica que nosotros utilizamos para llevar a cabo el estudio de las proteínas bien de plasmas o de células, tanto de pacientes como de controles, es mediante **electroforesis bidimensional**. Esto permite distinguir entre mezclas muy complejas de proteínas, basado principalmente en una primera separación en función de la carga (primera dimensión), y a continuación otra en función del peso molecular (segunda dimensión) de la proteína.

Durante la **primera dimensión** se realiza el isoelectroenfoque, mediante el cual las proteínas son disgregadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, es decir, en función de su punto isoeléctrico.

ANTES DEL ISOELECTROENFOQUE

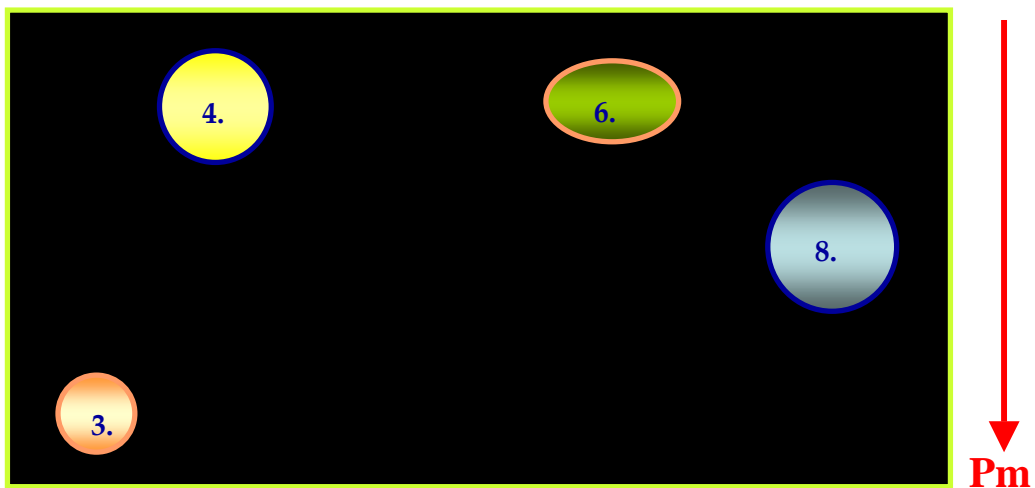


DESPUÉS DEL ISOELECTROENFOQUE



En la segunda dimensión, se separan mediante electroforesis, bien en geles de acrilamida o del polímero bis-tris.

TRAS PONER EN UN GEL PARA LA SEGUNDA DIMENSION



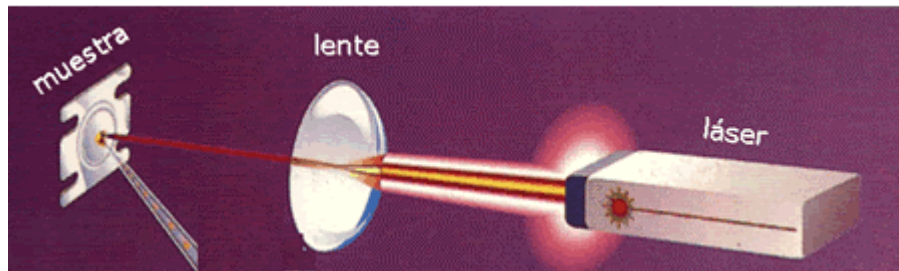
Una vez tenemos revelados los geles nos basamos en el análisis diferencial entre los geles de controles y pacientes, para discernir entre unas proteínas u otras.

Lo que nos interesa principalmente es saber si alguna proteína se encuentra en los pacientes y no en los controles, o viceversa, o bien si existe mayor o menor expresión de la misma, por lo que el análisis que se puede realizar es tanto cualitativo como cuantitativo.

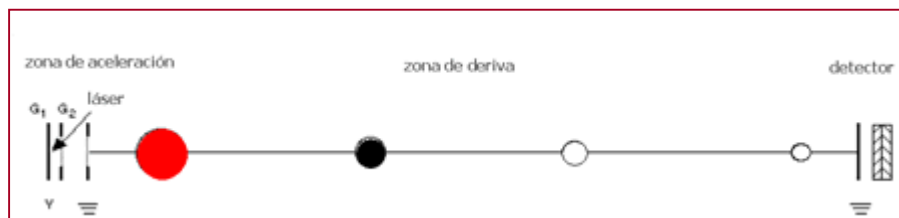
Después las muestras de interés son enviadas a analizar para saber de que proteína estamos hablando.

Para el análisis recurrimos a la espectrometría de masas, donde las muestras deben ser convertidas en péptidos mediante proteólisis con tripsina.

Esta técnica implica por un lado la conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como ionización desorción con láser asistido con matriz (MALDI) a partir de una muestra en estado sólido.



Por otro lado la separación de los iones según su masa (m/z) en un analizador de masas (TOF). Y por último la medida de esas masas en un detector obteniendo un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor m/z .



También hemos tenido que recurrir a la técnica de masas-masas (MS-MS) para poder distinguir en determinados casos entre dos proteínas que tenían el mismo punto isoelectrico y el mismo peso molecular. Con ésta técnica se determina la secuencia de aminoácidos de un determinado ión (Ver anexo I).

Nosotros hemos analizado muestras tanto en plasmas como en lisados de células de pacientes y controles, esperando ver diferencias entre ambas poblaciones.

Desde un principio en el plasma nos llamó mucho la atención la zona baja de pesos moleculares, tanto por no haber sido estudiada en profundidad en trabajos previos, como por los resultados tan interesantes que encontramos. En concreto nuestro estudio se centró en la HAPTOGLOBINA, por los patrones de spots tan diferentes que mostraban los distintos geles, y que posteriormente pudimos comprobar que no eran más que la presencia de distintos haplotipos y las diferencias post-traduccionales que presentaba esta proteína (Anexo I).

A continuación nos centramos en el estudio de lisados celulares, donde comprobamos, que había diferencias en muchas de las proteínas analizadas (hasta 107 proteínas diferentes), pero nos centramos en el estudio de la CALGRANULINA por sus enormes diferencias de expresión entre las distintas muestras y sus posibles modificaciones, en concreto fosforilaciones que posteriormente encontramos (Anexo I).

Otra molécula que nos llamó la atención fue la PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE 90 KDa, también sobre todo por diferencias de expresión entre pacientes y controles (Anexo I).

Decir que en todo momento nosotros comenzábamos a trabajar a ciegas, es decir, antes se hacía el análisis diferencial de geles y a continuación se seleccionaban los spots de interés que mandábamos a analizar, para conocer a que proteína correspondía.

Debido a esto nos llevamos algunas sorpresas como en el caso de las calgranulinas, ya que indagando un poco en la historia de esta molécula nos dimos cuenta que ya había numerosos trabajos que la habían relacionado con procesos inflamatorios, y concretamente con autoinmunidad, lo cual nos alegró mucho por la concordancia de nuestros resultados, aunque aún no se había trabajado con ella desde el punto de vista bidimensional.

2.2.1.- BIOMARCADORES EN SUERO

• HAPTOGLOBINA.

La haptoglobina (hp) es una abundante glicoproteína rica en plasma (0.38-2.08 g/L) [153]. Es también proteína de fase aguda sintetizada por el hígado en respuesta a citoquinas inflamatorias, como la IL-6, IL-1 o el TNF, en procesos infección o inflamación [154-156]. Es capaz de unir hemoglobina (Hb) proteína presente en el plasma de todos los vertebrados y se cree que también participa en su transporte [157, 158], previniendo la pérdida de hierro y el daño renal que podría ser producido por hemoglobina libre durante la hemólisis [154, 155, 159, 160]. Actúa como antioxidante, tiene actividad antibacteriana y juega un papel principal en muchos aspectos de la respuesta de la fase aguda [159].

• ESTRUCTURA Y GENÉTICA.

La haptoglobina está compuesta por dos tipos de cadenas polipeptídicas llamadas alpha y beta, unidas covalentemente por enlaces disulfuro [161] y derivadas de un único polipéptido después de la fragmentación proteolítica [155, 162].

Ambas cadenas están codificadas por el mismo gen localizado en el cromosoma 16q22 [163].

La cadena β de 40 KDa es la más pesada y es idéntica en todos los tipos de haptoglobina. La cadena α se subdivide a su vez en dos tipos caracterizados por la presencia (cadena α_1 , 8.9 KDa) o ausencia (cadena α_2 16 KDa) de una repetición directa de 63 aminoácidos [154, 159, 162].

En un principio se pensó que en humanos existían dos únicos alelos para el gen de la haptoglobina α , el Hp¹ y el Hp², que codificarían para las cadenas α_1 y α_2

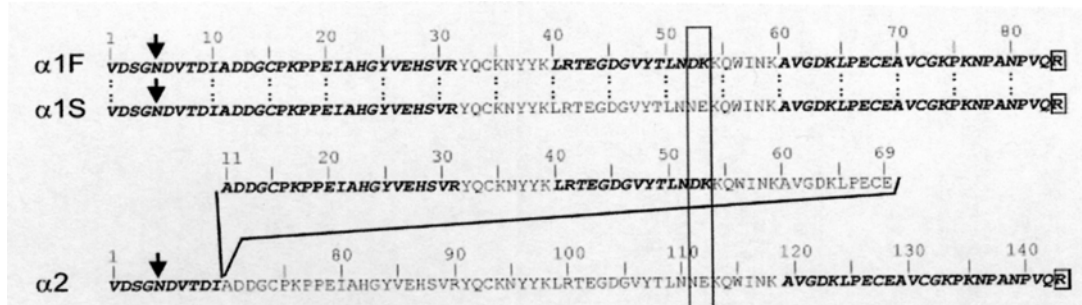
[154, 160, 163, 164], aunque posteriormente se pudo comprobar que el Hp¹ se puede dividir a su vez en Hp^{1S} y Hp^{1F}.

Por tanto dentro de las cadenas $\alpha 1$ tendremos dos tipos distintos que son $\alpha 1S$ y $\alpha 1F$. La diferencia entre ellas, se basa únicamente en una mutación que provoca el cambio de los aminoácidos en posición 52 y 53, que para la forma $\alpha 1F$ son ácido aspártico y lisina y para la forma $\alpha 1S$ son asparragina y ácido glutámico respectivamente.

Con respecto a la cadena $\alpha 2$, estaría codificada por el alelo Hp² y contiene al menos el doble de residuos de aminoácidos que las cadenas $\alpha 1$. Este alelo se origina por la fusión de las dos formas anteriores durante la meiosis.

Los tres alelos Hp², Hp^{1S} Hp^{1F} controlan la síntesis de todas las variantes de haptoglobinas existentes.

Figura 12: Mikkat et al. *Proteomics*. 2004: 4 (12). 3921-3932.



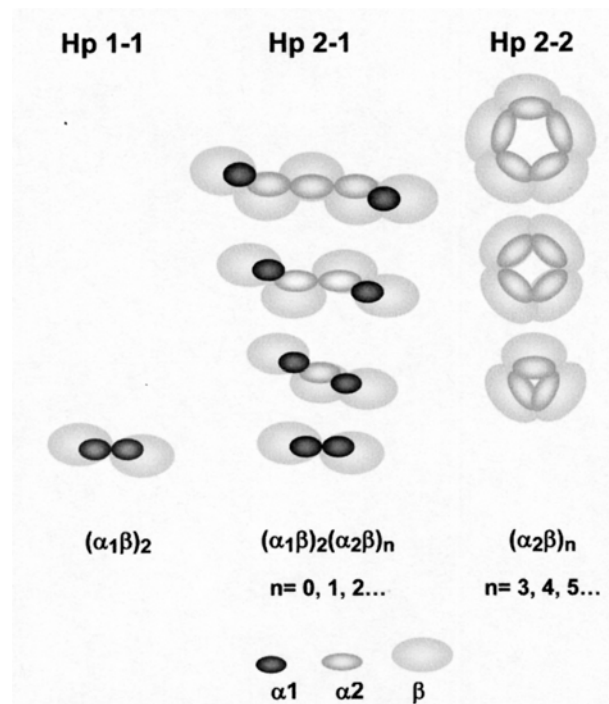
Secuencias de aminoácidos de las cadenas α de la haptoglobina. La $\alpha 1S$ corresponde a las cadenas α de la entrada P00737 de Swiss-Prot. La secuencia de aminoácidos de la haptoglobina $\alpha 1F$ difiere solo en las posiciones 52 y 53, de la haptoglobina $\alpha 1S$. La $\alpha 2$ corresponde a las cadenas α de SwissProt con la entrada P00738. Esta se originó como resultado de una duplicación genética parcial como se muestra en la figura superior.

Las propiedades tanto biofísicas como bioquímicas de esta proteína resultan de las tres combinaciones posibles de estos alelos, que generan tres fenotipos diferentes: Hp 1-1, 2-1 y 2-2 [157, 160, 165], cuya relación entre estructura y función también han podido ser analizadas [154, 160, 165].

Pero en realidad los fenotipos, aunque normalmente se abrevian en los tres grupos anteriores, pueden ser seis: 1F-1F, 1S,1S, 1F-1S, 2-1S, 2-1F, 2-2 [163, 166]. Este polimorfismo sólo está presente en humanos aunque la haptoglobina se encuentre en el suero de todos los mamíferos.

En cuanto a su estructura, la haptoglobina 1-1 homocigota (86 KDa), representa una combinación simple entre cadenas $\alpha_1\beta$ o $(\alpha_1\beta)_2$. La forma Hp 2-2 (>200KDa), también homocigota es algo más heterogénea en tamaño, compuesta por una forma trimérica de $\alpha_2\beta$ ó $(\alpha_2\beta)_3$ o un polímero cíclico. La forma Hp 2-1, que sería heterocigota también es heterogénea pero está compuesta de un dímero simple $(\alpha_1\beta)_2$, trimérico $\alpha\beta$ ó $(\alpha\beta)_3$ u otros polímeros lineales donde α representa la mezcla entre cadenas α_1 y α_2 [154, 165] (Ver figura 13).

Figura 13: *Cheng T.M. et al. Clinical Biochemistry 2007. 40(13-14) :1045-1056*



Modelo esquemático de la estructura de los distintos fenotipos de haptoglobina humanos.

Se ha demostrado que existen diferencias funcionales entre los distintos tipos de haptoglobinas, de manera que el poseer uno u otro fenotipo puede darnos ventajas o no, frente a determinados procesos del organismo, o frente a determinadas enfermedades.

Se ha comprobado cómo la haptoglobina 1-1 tiene una mayor protección antioxidante que la forma 2-2 [160] y se confirmó cuando se vio que el consumo de vitamina C en el plasma *in vitro* de personas con Hp2-2 es más rápido y su nivel de vitamina C más bajo que en personas con Hp1-1 [156].

Existen también diferencias geográficas en cuanto a la distribución fenotípica, viéndose por ejemplo una baja frecuencia alélica Hp¹ en el sureste asiático, y muy alta en África o en América del Sur. El alelo Hp², en cambio se estima que fue originario de la India hace unos 2 millones de años, extendiéndose posteriormente por el mundo y desplazando el monopolio del alelo Hp¹ [154].

La distribución alélica de las distintas formas Hp1-1, Hp2-1 y Hp2-2 se lleva a cabo de forma desigual alrededor del mundo.

Posteriormente mostraré los datos obtenidos en mi estudio, donde parece ser que la población granadina (y alrededores), muestra una distribución muy parecida a los que ya se tienen de poblaciones europeas incluyendo la española, aunque el número de muestras puede no ser demasiado alto para llegar a conclusiones fehacientes.

Existe homología entre la haptoglobina y las serina-proteasas, en cuanto a la estructura primaria de la cadena β . A este grupo pertenecen por ejemplo la tripsina, quimotripsina, trombina, plasmina, elastasa y algunos factores del complemento [167, 168].

- **PROPIEDADES**

-**Unión a hemoglobina** (ya antes mencionada): Se produce una unión tetramérica de una afinidad extremadamente alta y estable [169], formando un complejo con el Fe^{2+} . Esta hace que se reduzca la pérdida de hemoglobina y hierro tras la destrucción de eritrocitos, previniendo un posible daño renal por el depósito de estas sustancias, ya que pasarían directamente al hígado.

-**Protección contra radicales libres**: La hemoglobina libre promueve la acumulación de radicales libres como el súper óxido (O_2^-) y el hidroxilo ($OH\cdot$), moléculas que son extremadamente reactivas y que pueden causar daños como por ejemplo la peroxidación de los lípidos de membrana [170, 171], necrosis tubular, aterosclerosis [172, 173], etc. Al formar complejo con la haptoglobina estos efectos se reducen. La Hp2-2 debido a su tamaño está más restringida en determinados fluidos por lo que puede ser que de ahí venga que sea menos eficiente en su capacidad antioxidante.

-**Inhibición de óxido nítrico**: La hemoglobina libre inhibe la vasodilatación dependiente del endotelio interaccionando directamente con el óxido nítrico. Cuando se forma el complejo Hb-Hp esta reacción no se produce [174-176].

-**Inhibición de la síntesis de prostaglandinas**: Esta tiene importantes consecuencias biológicas, incluyendo la acción antiinflamatoria. La capacidad del efecto inhibitorio es menor pronunciada en las formas Hp2-2 y Hp2-1 que en la forma Hp1-1 [177].

-**Efectos bacteriostáticos**: La captura del ión Fe por parte de la haptoglobina al formar su complejo forma parte de la defensa contra la invasión de bacterias externas ya que este ión es imprescindible para el crecimiento bacteriano [178].

-Angiogénesis: La Hp ha sido identificada como uno de los factores angiogénicos requeridos para la proliferación y diferenciación de células endoteliales en la formación de nuevos vasos sanguíneos, siendo la forma Hp2-2 más angiogénica que los demás fenotipos [179, 180].

-Propiedades “como” anticuerpos: Pueden provocar la aglutinación en suero humano de determinados antígenos como el T4, siendo esta más efectiva por las isoformas Hp2-2 y Hp2-1 que por la Hp1-1. Pero puede que Hp no sea un anticuerpo real, sino que produzca estos efectos más bien por la vía de estructuras tipo lectinas [181, 182].

-Interacción con leucocitos: La cadena β de la Hp se une a las células B mediante una glicoproteína de adhesión que es el CD22, que media en la interacción de estas células con eritrocitos, linfocitos T, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células endoteliales. En plasma humano solamente IgM y Hp pueden unir selectivamente el CD22, teniendo los tres fenotipos igual afinidad [183-187].

• **HAPTOGLOBINA Y ENFERMEDAD**

Los polimorfismos de la haptoglobina han tenido consecuencias clínicas importantes para muchas enfermedades incluyendo desórdenes cardiovasculares, autoinmunes y neurológicos.

Por ejemplo el fenotipo Hp2-2 está más relacionado con enfermedades infecciosas del tipo de la tuberculosis [188] o el HIV [189] y el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular en un enfermo diabético es cinco veces mayor si éste presenta el fenotipo Hp2-2 que si es Hp1-1 [190].

También se ha visto que los niveles en suero de Hp están relacionados con la presencia de aterosclerosis [191, 192], y aunque la forma 1-1 esté más aumentada en este medio, son los que poseen el fenotipo 2-2 los que tienen mayor probabilidad de padecer enfermedades coronarias [193] o procesos graves de infartos de

miocardio con un mayor número de complicaciones [194] (se ha visto en poblaciones europeas, ya que en las asiáticas ocurre lo contrario, es el alelo Hp¹ el que favorece este tipo de enfermedad [195]).

Hp2-2 está sobreexpresado en pacientes con enfermedades autoinmunes, y concretamente artritis reumatoide y en LES y por tanto a estos pacientes se les asocia con una reactividad inmune muy alta.

Relacionado tanto con la forma Hp2-2 como la Hp2-1 podrían estar las complicaciones severas en un infarto cardiaco [196], fallos en riñón [197, 198], diabetes [199], etc.

Enfermedades relacionadas con el fenotipo Hp1-1 pueden ser la hepatitis C [200], cáncer de pecho [201, 202], sensibilidad del sodio [203, 204], etc.

Cabe destacar un trabajo, basado en la distribución fenotípica de la haptoglobina en personas que padecían al síndrome tóxico del aceite [153], ya que para nosotros ha resultado sumamente útil, debido a que nos hemos basado en sus técnicas para determinar el haplotipo de toda nuestra población tanto de enfermos como de controles de un modo más rápido que la técnica puramente bidimensional (donde para saber si un individuo es S ó F hay que hacerlo de forma individual) o el western-blot, que sólo nos permite distinguir entre Hp 2-2, Hp 2-1 y Hp 1-1.

Por MALDI-TOF es bastante fácil distinguir entre estos tres haplotipos, ya que simplemente por reducción de las muestras se rompen los enlaces disulfuro que las mantienen unidas y generan las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Esto nos permitió comparar los datos que teníamos hasta el momento, obtenidos mediante geles de dos dimensiones o western, con la nueva forma de analizarlo comprobando que coincidían de forma exacta.

Aunque lo que realmente nos interesaba era ver cuales eran s ó f, para poder calcular la frecuencia alélica, y para ello la técnica era algo más complicada.

Se basaba en que las diferencias entre ambas cadenas que solo son de 0.043 Da, el MALDI-TOF es incapaz de resolverlas. Pero como la cadena f tiene una lisina

más, se puede guanidar en el grupo amino, resultando con una diferencia de 42 Da y generando la aparición de dos señales diferentes y por tanto dos picos distintos en el espectro, lo que nos ha permitido identificar todas las muestras.

Previamente, ya este grupo publicó otro artículo donde sugerían la relación entre los distintos fenotipos de haptoglobina y la susceptibilidad a padecer este síndrome, producido por la ingestión de aceite comercializado de forma ilegal tras ser adulterado con anilina. Hicieron un análisis diferencial para ver las diferencias de expresión que podrían presentar algunas proteínas y de todas ellas, donde observaron diferencias significativas fue en la distribución de las cadenas α -1s y α -1f entre la población control y la que padecía la enfermedad, sugiriendo las personas que presentaban el alelo Hp^{1S} tenían más riesgo a padecer la enfermedad que las que tenían el Hp^{1F}, que es más bien protector [166].

2.2.2.- BIOMARCADORES EN CÉLULAS.

• CALGRANULINA A y B.

El calcio es un elemento intracelular con importantes funciones como segundo mensajero. Cambios en la concentración del calcio citosólico genera varias respuestas celulares como la conducción del impulso nervioso, la contracción muscular, migración y crecimiento celular, diferenciación y activación, cambios en la actividad enzimática, apoptosis y necrosis. Además las proteínas de unión a calcio son clave en la transducción de la señalización de este elemento [205].

• PROPIEDADES Y ESTRUCTURA

La CALGRANULINA A (S100A8) y la CALGRANULINA B (S100A9), también llamadas MRP8 y MRP14 respectivamente forman parte del grupo de

proteínas de unión a calcio de la familia S100. El grupo de genes que las codifican se encuentran en el cromosoma 1q21.

Ambas se encuentran fundamentalmente en fagocitos y han sido estudiadas desde los años ochenta [206-209]. También ha sido bien descrita la sobreexpresión de S100A8 y S100A9 en lugares de inflamación [206, 208] y los primeros estudios que encontraron relación entre estas dos proteínas, su concentración en suero y el proceso inflamatorio fueron publicados hace 20 años [210, 211]. Desde entonces se han ido sucediendo trabajos que no hacen más que confirmar que las proteínas de unión a calcio S100 son biomarcadores inflamatorios.

Presentan un único patrón de expresión con prevalencia en células de origen mieloide [205]. Muestran capacidad de unión a calcio en estados de diferenciación temprana de monocitos y neutrófilos [212, 213] donde representan aproximadamente el 40% del contenido proteico del citosol [214, 215], no pudiéndose detectar en macrófagos en reposo, o en linfocitos [208, 213, 216].

Promueven la migración de leucocitos polimorfos nucleares (PMNs), y son muy abundantes en el entorno extracelular durante la condiciones inflamatorias [217, 218].

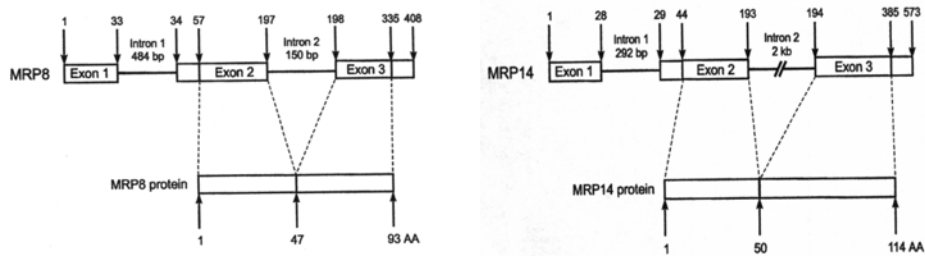
También pueden sobreexpresar la integrina- β 2 y la Mac-1 en PMNs activando la unión de ambas moléculas e induciendo la adhesión de PMN al fibrinógeno.

En ratones, al S100A8 se le denomina CP-10 y es un potente quimioatrayente de PMNs con una óptima actividad quimiotáctica a muy bajas concentración del orden de 10^{-13} M [219, 220].

La calgranulina A tiene 93 aminoácidos y su peso molecular es de 10.8 kDa. La calgranulina B consiste en 114 aminoácidos y su peso es de 13.2 kDa [207, 208, 214]. El bajo peso molecular es también un rasgo característico del grupo de proteínas S100 [221].

El gen que codifica para ambas proteínas se encuentra en el cromosoma 1q21, y sigue el mismo patrón que todas las proteínas de la familia S100, compuesto de 3 exones separado por 2 intrones.

Figura 14: Kerkhoff et al. *Biochim Biophys Acta* 1998;(2) 200- 211 [207].



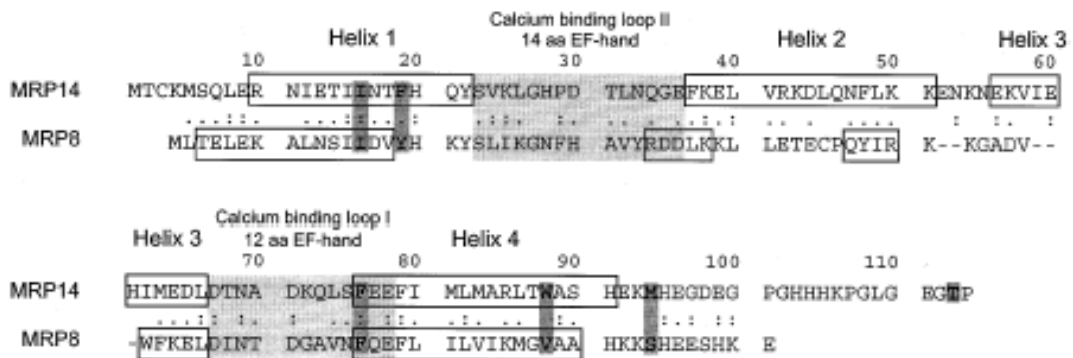
Estructuras exón/intrón de los genes de MRP8 y MRP9

Suelen estar localizadas principalmente en el citosol de los fagocitos pero pueden traslocarse al citoesqueleto o a la membrana celular cuando ocurren aumentos de la concentración de calcio intracelular [205, 216].

Es secretada extracelularmente por neutrófilos estimulados [222] y monocitos [223], o bien es liberada como producto de rotura o muerte celular [201, 224, 225].

Pertencen al grupo de proteínas moduladoras de la señalización del calcio que contienen motivos EF-hand [226].

Figura 15: Kerkhoff et al. *Biochim Biophys Acta* 1998;(2) 200-211.

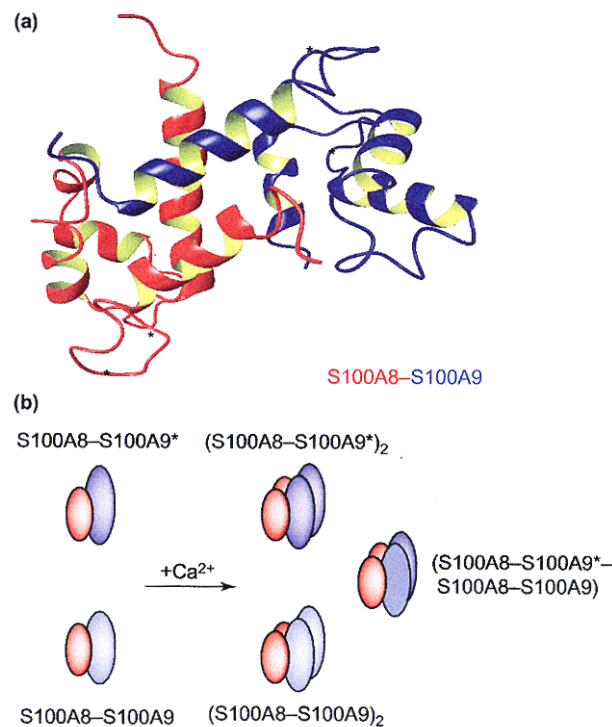


Dominios estructurales dentro de MRP8 y MRP9

Los fagocitos que expresan S100A8 y S100A9, pertenecen a las primeras células que son infiltradas en las lesiones inflamatorias [206, 209], por tanto se ha observado su expresión, en queratinocitos inflamatorios alterados, en la epidermis y en desórdenes malignos [227, 228].

En general ambas proteínas suelen estar formando un heterodímero (S100A8/S100A9) llamado CALPROTECTINA, pero aún así se han podido encontrar diferencias de expresión de ambas moléculas en reacciones inflamatorias crónicas como la glomerulonefritis y en rechazos renales [213, 229]. El conjunto presenta un peso molecular de 36 kDa. Algunas células epiteliales de la mucosa expresan calprotectina en el citoplasma de forma constitutiva [227]. La forma soluble se encuentra en el plasma en un rango de <2mg/L, en personas sanas, en la orina, producidas por las células del riñón [230], en secreciones corporales como la saliva, en el fluido intestinal y en las heces.

Figura 16: Roth et al. *Trenes in immunology*. 2003;24(4) 155- 158



Formación del complejo S100A8/S100A9.

Pueden formar incluso tetrámeros (S100A8/S100A9)₂, en presencia de calcio [231-233]. Aunque en definitiva ambas formaciones son muy importantes funcionalmente en situaciones donde existe una estructura diana de unión a este elemento [234].

Sin embargo existe cierta controversia en cuanto a las formas monoméricas, homodiméricas y triméricas, ya que la existencia de estos complejos no está apoyada por los datos estructurales que se tienen hasta el momento [218, 226, 235-237]

También juegan un importante papel en la regulación del metabolismo del ácido araquidónico de granulocitos y en la regulación de la NADPH oxidasa neutrofílica [205, 238, 239].

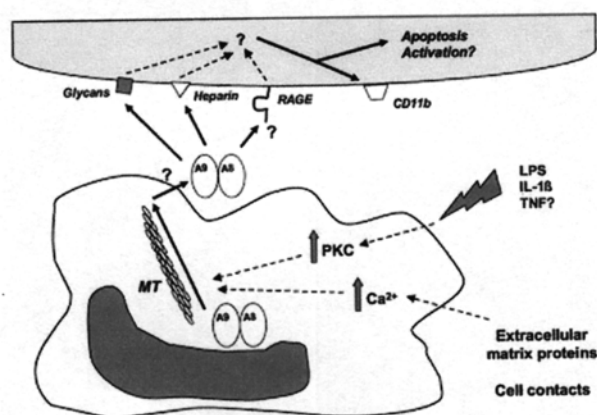
Además aumenta la actividad de unión del receptor de integrinas CD11b/CD18 de los neutrófilos, haciendo que sea mayor la unión de estas células a las endoteliales y proteínas de la matriz extracelular [214, 240].

La secreción del heterodímero S100A8/S100A9 es un proceso dependiente de energía que requiere microtúbulos intactos [223].

Para ello es necesario inducir dos rutas de señalización independientes en fagocitos como son la activación de la proteína quinasa C mediante diferentes estímulos inflamatorios, quemoquinas o productos bacterianos y el aumento de los niveles de calcio intracelular a través de la estimulación del endotelio por contacto con el factor de necrosis tumoral.

Cuando los monocitos entran en contacto en el endotelio en reposo, se inhibe la secreción [218, 241]. Estos datos confirman que la liberación del complejo S100A8/S100A9 tiene lugar durante la interacción entre fagocitos y el endotelio activado.

Figura 17: Foell and Roth. *Arthritis & Rheumatism*. 2004;50 (12). 3762-3771



Secreción de S100A8/S100A9

Datos aún no publicados, sino sólo sugeridos, muestran que estas proteínas ejercen actividades reguladoras en procesos de inflamación a través de efectos en la supervivencia o crecimiento de células que participan en reacciones inflamatorias y en la homeostasis de tejidos.

Tanto el colágeno como la fibronectina inducen la expresión de calprotectina en paralelo con la liberación de citoquinas inflamatorias, factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina-6 (IL-6) y la producción de iones superóxido [242].

El complejo muestra efectos proapoptóticos en fibroblastos, miocitos, y linfocitos *in vitro*, pero no en neutrófilos o monocitos [214].

También presentan propiedades antimicrobianas, generando mecanismos de defensa frente a huéspedes [243].

Dentro del papel fisiológico de estas proteínas cabe destacar su actividad antimicrobica e inducción de apoptosis las cuales podrían revertirse por la adición de zinc. Debido al secuestro de este metal la calprotectina inhibe la metaloproteinasas de la matriz que dependen de él, las cuales presentan un importante papel en el desarrollo embrionario, la angiogénesis, curación de heridas, inflamación, cáncer y destrucción de tejidos. Por ello esta proteína regula

un importante número de procesos en el cuerpo. También inhibe el crecimiento microbiano debido a la competición con el zinc. [225, 244, 245].

- **CALGRANULINA y enfermedad:**

- **Artritis reumatoide:**

Los fagocitos activados que expresan estas proteínas S100, están entre las primeras células que se infiltran en lesiones inflamatorias del sinovio [205, 206, 208].

En pacientes con artritis activa, se expresa tanto la S100A8 como la S100A9 en macrófagos, los cuales muestran una activación y diferenciación alteradas, bajo condiciones inflamatorias. También se han encontrado altas concentraciones en el lugar principal del cartílago donde tiene lugar la destrucción y erosión del hueso [246].

Además la concentración de estas proteínas es diez veces mayor en el fluido sinovial que en suero, obtenidos de forma paralela de distintos pacientes [205, 241, 247].

En resumen podemos ver tres consecuencias obtenidas a partir de los datos obtenidos *in vitro* de los patrones de expresión sinovial:

- 1.- La expresión de S100A8/S100A9 está asociada con inflamación y el tejido sinovial.

- 2.- S100A8/S100A9 se encuentran en lugares de inflamación del endotelio activado y por tanto facilita el reclutamiento de células inflamatorias hacia el tejido sinovial.

- 3.- El incremento en suero de las concentraciones de S100A8/S100A9 puede ser un importante marcador de la inflamación local extendida a las articulaciones afectadas.

Además numerosos estudios en suero de pacientes han confirmado que existe una excelente correlación entre las concentraciones de calgranulina en suero y la actividad de la artritis reumatoide [214, 247-249].

-Artritis psoriática:

Este tipo de artritis no es tan destructiva como la artritis reumatoide, posiblemente debido al bajo grado de infiltración de macrófagos en el sinovio. Sin embargo en datos recientes se ha podido ver cómo el reclutamiento de fagocitos contribuye a la inflamación del mismo en artritis psoriática.

El patrón de expresión de calgranulinas en esta enfermedad es totalmente distinto al que encontramos en artritis reumatoide, ya que ésta se ve reducida en suero y en el sinovio de pacientes tras el tratamiento con metotrexato [247].

-Artritis juvenil idiopática:

Se han detectado tanto S100A8 como S100A9 en suero como en fluido sinovial de pacientes con esta enfermedad. Se ha visto además la correlación entre las cantidades de estas proteínas y la actividad de la enfermedad en estudios con niños que padecían la enfermedad [241, 250-252]. Estudios preliminares sugieren que pacientes con artritis juvenil clínicamente inactiva pero con elevadas cantidades de Calgranulina tienen mayor riesgo de que pasar a un estado de mayor gravedad [251, 253].

Por lo tanto la S100A8 y la S100A9 podrían ser usadas para distinguir el comienzo de la artritis juvenil idiopática sistémica de otras infecciones de este tipo, lo que representa el más importante diagnóstico diferencial.

De un modo interesante se pueden añadir que pacientes con esta enfermedad también presentan expresión de Calgranulina en el epitelio dérmico, lo que indica que estas células presentan un papel activo en el inicio del trastorno autoinmune sistémico [252].

-Dermatomiositis:

Es un proceso inflamatorio de base autoinmune caracterizado por debilidad muscular proximal y simétrica y lesiones cutáneas características.

Existe una clara asociación entre la expresión de las calgranulinas por macrófagos infiltrados con la posterior degeneración de miofibras.

La S100A8 y S100A9 inhiben la proliferación y diferenciación de mioblastos *in vitro* e inducen apoptosis de estas células mediante la vía de activación de la caspasa 3, indicando que la actividad del macrófago promueve la destrucción y daña la regeneración de los miocitos en el curso del proceso inflamatorio [214].

-Lupus eritematoso sistémico:

Se han encontrado elevadas concentraciones en suero de la proteína S100A8/S100A9 y además las cantidades correlacionan con el índice de actividad de la enfermedad [254] en un estudio realizado a 100 pacientes. Se ha podido demostrar mediante análisis inmunohistoquímicos de biopsias renales que la expresión de S100A8/S100A9 por macrófagos infiltrados en el glomérulo de pacientes con LES, se corresponde a la severidad del proceso inflamatorio [214].

-Enfermedad inflamatoria intestinal crónica:

Se han encontrado fagocitos que expresan S100A8 y S100A9 en células proinflamatorias localizadas en lugares donde tiene lugar una inflamación intestinal [255, 256]. Los niveles en suero de la calprotectina se usan para monitorizar la inflamación en pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa [256].

En los últimos años se ha introducido como test diagnóstico la medida de calprotectina fecal [257-264]. Esta prueba tiene importancia debido a que ha sido demostrado que a través de esta medida se han llegado a diagnosticar inflamaciones intestinales locales que no han sido detectadas mediante un examen clínico [265, 266].

Existen potenciales aplicaciones de la medida de la calprotectina fecal como método no invasivo por ejemplo en pediatría y el test sirve para diagnosticar la enfermedad en niños [267].

-Otras enfermedades autoinmunes:

También se han encontrado altas concentraciones de suero de la calprotectina en pacientes con síndrome de Sjögren y con esclerosis sistémica.

-Cáncer:

También se ha asociado la calgranulina con el cáncer, viéndose altos niveles de la proteína en carcinogénesis asociadas a inflamación. La hipótesis viene avalada por el hecho de encontrar células mieloides positivas para S100A8/S100A9 dentro del estroma de tumores malignos epiteliales, así como en cánceres de piel, colorrectales y de próstata [268-270]. Se piensa que esta relación puede venir dada, por la posible función de la calprotectina como citoquina.

Además se ha encontrado una expresión aumentada de los dos genes que codifican para ambas calgranulinas A y B en estados avanzados de cáncer de piel tanto en ratones como en humanos [271-273].

-Otras enfermedades:

Ya desde hace tiempo se detectó el complejo S100A8/S100A9 como un marcador de inflamación en condiciones febriles [210], y en otro tipo de infecciones por ejemplo en HIV [274, 275], en candidiasis oral [276] y en micobacteriosis [277].

Se han observado altas concentraciones en suero del complejo en pacientes con fibrosis quística [205, 211, 278, 279].

En transplante de órganos se ha observado que aumentan los niveles de calprotectina en respuestas frente a infecciones bacterianas en el riñón y el corazón

y durante el curso de rechazo agudo [280] pudiendo ser un marcador muy sensible de complicaciones para trasplantes sobre todo en combinación con otros marcadores inflamatorios como la procalcitonina que es extremadamente específica para infecciones sistémicas bacterianas [281].

• **PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE 90 KDa (HSP90).**

Las proteínas de choque térmico no son más que chaperonas moleculares que pueden estabilizar o desestabilizar el conformero de otra proteína, controlando su unión y liberación, para facilitar de alguna manera un destino correcto *in vivo*. Esto lo hacen por plegamiento, por uniones oligoméricas, por transporte a un particular compartimento celular, o por eliminación por degradación [282, 283]. Las chaperonas no determinan la estructura terciaria de la proteína pero ayuda a que ésta consiga la forma más estable.

El estrés induce la síntesis de muchas chaperonas llamadas de choque térmico o proteínas de estrés, propiamente dichas. Estas juegan además un papel esencial en la etiología de numerosas enfermedades siendo de gran interés en la práctica clínica. Debido al número de procesos en el que pueden estar asociadas, se las clasifica según su peso molecular.

Las funciones características de cada familia de chaperonas muestran que la de 90 kDa es quizás un tanto distinta a las demás, ya que es más “pasiva” ya que en la mayoría de los casos previene solo la agregación de conformeros proteicos inestables [284]. Se encuentra en bacterias y en todas las células eucariotas, aunque parece ser que aparentemente no se han encontrado en arqueas [285].

Además se sabe que constituye el 1% del total proteico de células que se encuentran en situación de no-estrés [286] y su función en estas células es el mantenimiento de los receptores de hormonas esteroideas o el de las tirosina quinasas de la familia Src hasta que un determinado estímulo induzca su activación.

Su papel biológico es importante porque son proteínas que se han mantenido altamente conservadas a lo largo de la evolución [286].

- **ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS MOLECULARES**

La Hsp90 tiene dos isoformas α y β las cuales son idénticas en un 76% de su secuencia. La isoforma Hsp90- β es un tanto más larga que la Hsp90- α , y también son llamadas Hsp86 y Hsp84.

La isoforma β está más expresada constitutivamente siendo menos inducible y lo contrario ocurre con la forma α . Ambas forman mayormente homodímeros, los cuales serán mayormente de la forma β por ser más estables por pequeñas diferencias en la dimerización del C-terminal [287, 288].

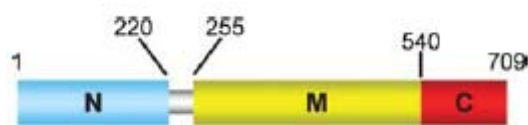
La Hsp90- β fue encontrada en el citoplasma, con una larga porción de proteína localizada en los alrededores de la envuelta nuclear [289]. Además con esta localización, esta isoforma puede ser fosforilada por la proteína quinasa dependiente del ADN de doble cadena en sus residuos de treonina del N-terminal [290].

La Hsp90- α predomina en cerebro y testículos y la β está enriquecida en otros órganos periféricos.

Ha sido esencial el estudio de esta proteína en levaduras para analizar tanto la relación entre estructura y función de la Hsp90 por si misma [285, 291-293],

como para caracterizar otras chaperonas que colaboran funcionalmente con ella [294-298].

Figura 18: Pearl and Prodromou. *Annu Rev Biochem* 2006. 75:271-294



Esquema de los dominios estructurales de Hsp90 en levaduras.

El segmento entre las regiones N y M es altamente variable tanto en longitud como en composición entre las distintas especies.

La Hsp90 es un dímero fosforilado [290, 299-301] que contiene entre 2 y 3 uniones covalentes de moléculas de fosfato por monómero [302]. La dimerización es necesaria para la función vital de la proteína [303].

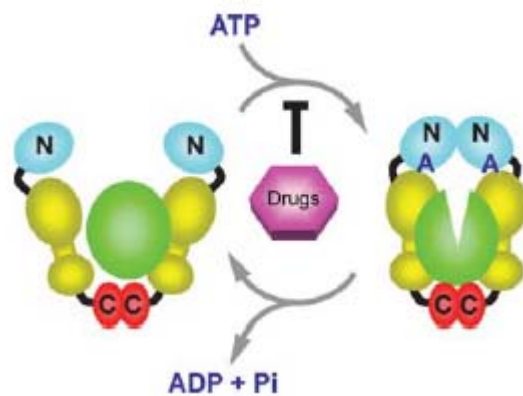
Como otras chaperonas, la Hsp90 es bastante hidrofóbica e incrementa esta hidrofobicidad después del choque térmico.

También forma complejos con numerosas fosfatasa y proteínas quinasas, pero se ha sabido que a pesar de ello no se observan fosforilaciones en tirosinas en nuestra proteína. Además también puede estar unida a otra serie de proteínas como los receptores nucleares hormonales [304], actina [305, 306], tubulina [307-310], factor-1 de choque térmico [311], calmodulina [312], y el proteasoma.

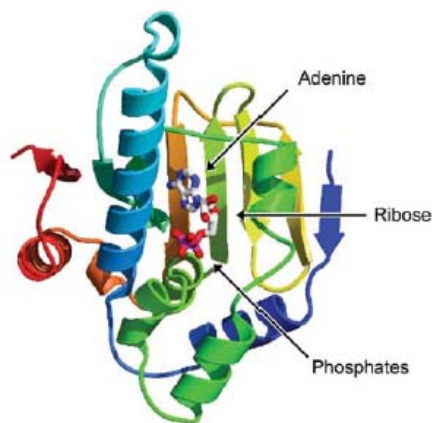
Se ha demostrado por varios estudios que la unión de la Hsp90 junto con Cdc37 a las quinasas, se realiza a través del dominio catalítico de esta [313-317]. En las chaperonas, el dominio usado para la unión incluye regiones que están involucradas en la dinámica de la quinasa durante la activación y el ciclo catalítico [318].

Desde los primeros estudios que se realizaron de esta proteína se demostró que posee un sitio de unión a ATP y que posee la habilidad de fosforilarse por sí misma [319]. La unión a ATP le ocasiona además un gran cambio conformacional [320]. Cuando se purifica presenta actividad ATPasa, pero puede llegar incluso a ser más activa como GTPasa.

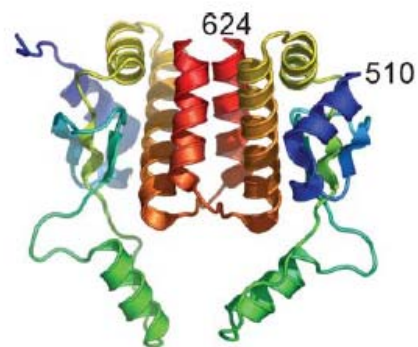
Figura 19: Pearl and Prodromou. *Annu Rev Biochem* 2006. 75:271-294



Esquema del modelo actual para el fuerte cambio conformacional que se produce al interactuar el ATP con la Hsp90. N es la región amino terminal y C la carboxilo terminal.



N-terminal



C-terminal

Aunque la estructura primaria se conoce desde hace bastantes años, aún quedan algunos segmentos cuyo papel funcional se desconoce.

El gen que codifica para la Hsp90- α es el 14q32.3. También se han visto segmentos cromosómicos como el 1q21.2-q22, 4q35 y 11p14.1-p14.2 que probablemente contengan pseudogenes para esta isoforma [321, 322].

La forma Hsp90- β expresada constitutivamente está codificada por el gen 6p21, y también se han encontrado dos pseudogenes en los cromosomas 4q21-q25, y 15pter-q21 [323, 324].

La expresión de estas proteínas está regulada por factores de transcripción específicos denominados **factores de las proteínas de choque térmico**.

De forma general esta expresión es baja en condiciones normales, pero se incrementa en situaciones de estrés [325, 326]. Aunque hay estudios que han demostrado que los niveles basales de algunas proteínas de choque térmico, van aumentando con la edad en PBMC. Además se ha comprobado que los niveles de Hsp90 y otras proteínas de este tipo como Hsp32 o Hsp70, están relacionados con la presencia de citoquinas inflamatorias del tipo de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α [327].

Desde hace años se ha venido desarrollando numerosos inhibidores de Hsp90 para estimular la degradación de las quinasas (aunque no de todas), sobre todo en el aspecto clínico. Uno de ellos es la geldanamicina, que es un antibiótico del tipo de la ansamicina, producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Este ha sido bastante importante en enfermedades como el cáncer ya que actúan fuertemente contra células cancerígenas mientras que lo hace en menor medida en tejidos sanos [328].

• **HSP90 Y LUPUS**

También se ha visto relación entre las proteínas de choque térmico y el LES [329].

De forma general hay más trabajos que han demostrado y establecido que los niveles de Hsp90 están aumentados en pacientes con LES [330-332], tanto en PBMC como en sueros, no observándose incrementos de otras proteínas de choque térmico.

Esto puede conllevar a que al haber una mayor número de Hsp90 se pueda inducir la producción de autoanticuerpos frente a esta proteína.

Por ejemplo, se ha podido ver la presencia de autoanticuerpos frente a Hsp90 en sueros de una significativa proporción de pacientes con esta enfermedad. En concreto se han encontrado anti Hsp90 de clase IgG en un 50% [333] y en un 26% [334] de una población seleccionada de pacientes mientras que del tipo IgM se ha detectado el 35% [334]. Pero cabe decir que también se pueden observar autoanticuerpos de este tipo en personas sanas aunque no en estas proporciones [335].

Esta elevada cantidad fue además correlacionada con daño renal y bajos niveles de C3 [334]. Además se puede confirmar que la presencia de Hsp90 en depósitos renales es característica de lupus ya que en las biopsias de pacientes con glomerulonefritis pero sin LES no aparece esta proteína [329].

Y aunque es una proteína fundamentalmente citoplasmática también se ha podido ver expresada en superficie de PBMC en aproximadamente el 25% de pacientes en el que se hizo el estudio teniendo en cuenta que eran pacientes activos [336].

También se ha visto que el aumento de Hsp90 en PBMCs de pacientes con LES va asociado al incremento de la transcripción del gen para la forma Hsp90- β [337], pudiendo ésta estar inducida por las citoquinas IL-6 [338] e IL-10 [339], que también están aumentadas en pacientes con esta enfermedad [340, 341], y correlacionadas con la actividad de la enfermedad.

Estos datos también están confirmados en la cepa de ratón MRL/lpr donde los datos son prácticamente idénticos [286].

**JUSTIFICACIÓN Y
OBJETIVOS**

B) JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que el CD38 es una molécula señalizadora que además se encuentra asociada a los *rafts* en líneas celulares de linfocitos T. Por tanto, con este resultado, pensamos que esta proteína podría ser un buen marcador de activación en la misma población celular de pacientes con LES.

Por otro lado, pensamos que las técnicas de proteómica podían servirnos para ampliar la búsqueda de biomarcadores, ya que en otras enfermedades habían sido utilizadas con éxito para este mismo fin. Este abordaje tiene la ventaja de que sin necesidad de una hipótesis previa pero con un diseño experimental riguroso, se pueden identificar un mayor número de biomarcadores que con otras técnicas más clásicas.

Los **OBJETIVOS** marcados en este estudio han sido:

Respecto al estudio mediante técnicas de Inmunología Celular:

1. **Determinar si existe relación entre la expresión de CD38, su distribución en balsas lipídicas (rafts), la activación de las propias células y la actividad de la enfermedad en células T de pacientes con LES.**
2. **Estudiar la expresión de CD38, en linfocitos T, así como en sus distintas subpoblaciones (CD25, CD4 y CD8), en células B y en células NK y su correlación con la actividad de la enfermedad.**

Respecto al estudio mediante técnicas de Proteómica:

3. **Hacer un análisis de expresión diferencial de proteínas mediante su separación en geles bidimensionales para estudiar las posibles diferencias entre pacientes con LES y controles sanos, tanto en muestras de plasmas como en células mononucleares de sangre periférica.**
4. **Identificar las proteínas de interés en cada caso, y posibles modificaciones post-traduccionales, mediante técnicas de espectrometría de masas.**

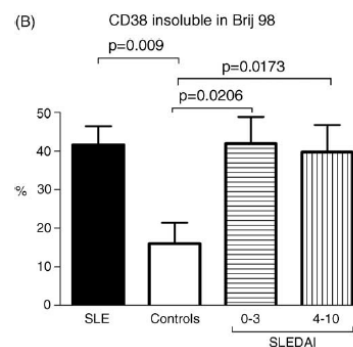
DISCUSIÓN

C) DISCUSIÓN

En el estudio de PBMCs de pacientes con LES respecto a PBMCs de controles sanos, mediante técnicas de Inmunología Celular podemos evidenciar el incremento de la insolubilidad de CD38 en el detergente no iónico Brij98 a temperatura fisiológica. Esta mayor insolubilidad se correlaciona con el incremento de la proporción de CD38 que está asociado a los lípidos *rafts* tanto en PBMC como en células T de pacientes LES.

Figura 1: Anexo I

Esther J. Pavón y cols :
Molecular Immunology 43, 2006

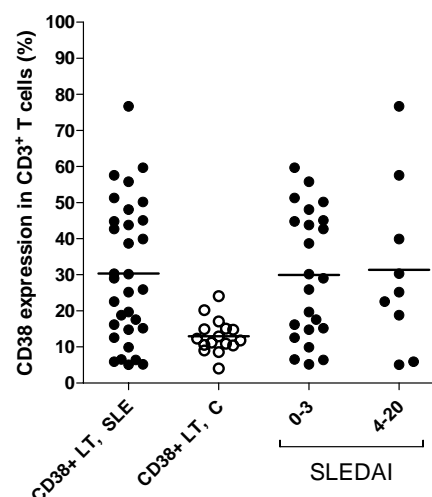


Consistentemente con trabajos previos [342, 343], el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ que expresan a su vez CD38 es significativamente mayor en pacientes que en controles sanos.

Figura: Anexo II

(Nuevos datos, no publicados)

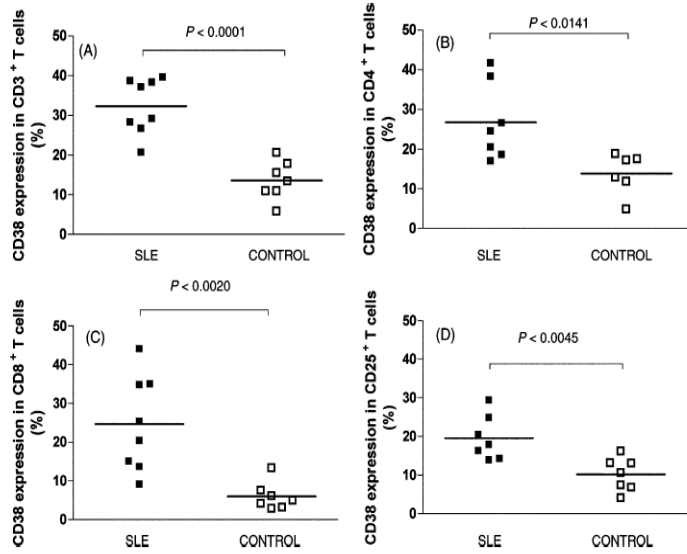
P=0.0009 (LES vs controles)
P=0.0007 (LES 0-3 vs controles)
P=0.0056 (LES 4-20 vs controles)



Además, hemos encontrado un aumento significativo en el porcentaje de CD8⁺CD38⁺, CD4⁺CD38⁺, y CD25⁺CD38⁺ en células T de pacientes con LES comparadas también con controles sanos.

Figura 3: Anexo I

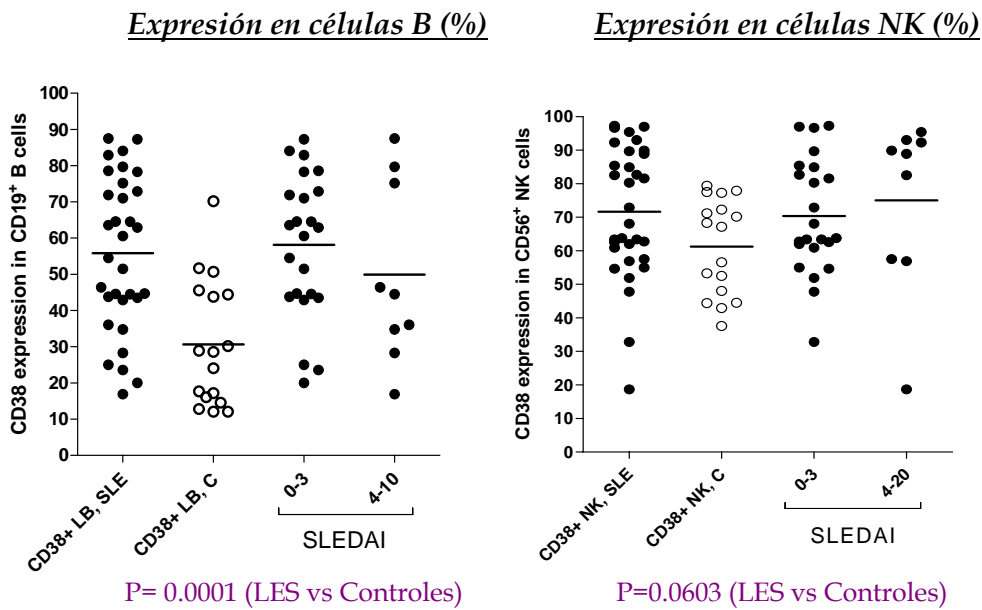
Esther J. Pavón y cols :
Molecular Immunology 43, 2006



Pero no solamente hemos podido ver la expresión aumentada de CD38 en la superficie de linfocitos T o de sus subpoblaciones sino también en células B y células NK, siendo éstas últimas las únicas donde las diferencias de expresión de CD38 no son estadísticamente significativas, posiblemente por la mayor dispersión de los datos.

Figura: Anexo II

(Nuevos datos, no publicados)



Las células T CD8⁺CD38⁺ se suelen encontrar aumentadas en infecciones virales avanzadas [344], y el porcentaje de linfocitos CD8⁺CD38⁺ es un útil marcador inmunológico para monitorizar pacientes infectados de HIV-1 [63]. La contribución al incremento de células T CD8⁺CD38⁺ a la patología del LES no está aún muy clara [345], pero junto con el incremento de las células T CD4⁺CD38⁺ y CD25⁺CD38⁺ indican un fenotipo persistente de activación.

En este sentido la estimulación con PHA de células T normales, induce una reducción de la *ratio* CD4:CD8 y un incremento en la expresión en superficie de CD38, lo cual altera el fenotipo de células T de LES *ex vivo*.

La función de CD38 en células T esta mediada por la asociación con el complejo del TCR/CD3 [52, 53, 87] y la localización de CD38 en dominios *rafts*, es esencial para la señalización mediada por CD38 en líneas de células T murinas transfectadas a su vez con esta proteína,[54], o en células Jurkat, las cuales expresan CD38 de forma constitutiva [55]. En estas líneas celulares, CD38 aparece localizado en los *rafts* sin necesidad de ligación [54, 55]. Por lo tanto, fue una relativa sorpresa que CD38 fuera detectado exclusivamente en la fracción soluble en células T normales de sangre periférica.

No se conoce el mecanismo por el cual CD38 en células T se incluye o no en los *rafts*, pero podría estar relacionado con las diferencias en la composición de las balsas lipídicas y la dinámica entre células T efectoras ya sea en reposo o activadas, y no con los niveles de expresión de CD38.

Hay que tener en cuenta que marcadores típicos de *rafts* como el glicosfingolípido GM1 y Lck, no siempre se localizan en la membrana plasmática. Así en células T humanas de sangre periférica, Lck y GM1 residen en el interior de la célula en vesículas de reciclamiento (endosomas), mientras que en las células T efectoras activadas, estos marcadores se localizan en la plasmática preferentemente [346, 347].

Estos incrementos tan drásticos de la expresión en superficie de GM1 pueden ser observados *in vitro* estimulando los linfocitos T de diversas formas:

PHA [346], TCR-CD3 por “cross-linking” con anticuerpos anti-CD3 [348], o con anti CD3/CD28 [346, 349].

Asimismo, datos de nuestro laboratorio indican que en líneas celulares de células T tanto murinas como humanas que posiblemente tienen un fenotipo efector, expresan altos niveles de GM1 en superficie, y el CD38 se detecta en lípidos *rafts* [54, 55].

Nuestros datos tienen significado en este sentido, ya que los cambios en la distribución de CD38 en las fracciones solubles e insolubles en Brij98 cuando las células T normales se estimulan mitogénicamente (Anexo I: Fig 4B) se correlacionan con el incremento en la expresión en superficie de GM1 (Anexo I: Fig 5A), y la expansión de células T GM1⁺CD38⁺ (Anexo I: Fig 5B).

Figura 4B: Anexo I

Esther J. Pavón y cols :
Molecular Immunology 43, 2006

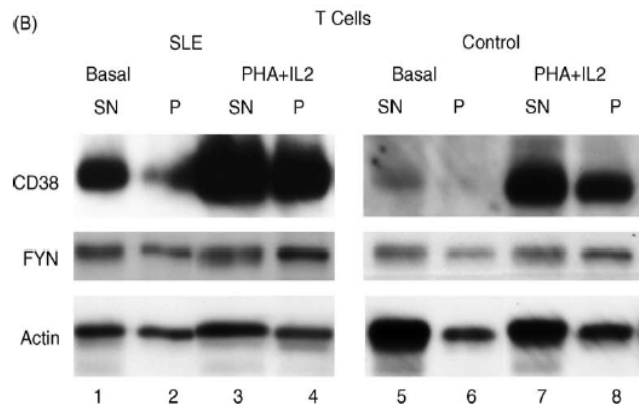
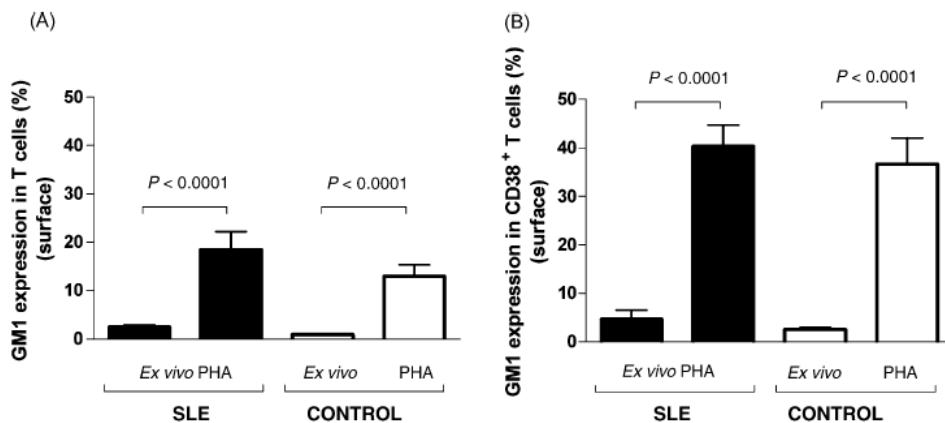


Figura 5A y 5B: Anexo I

Esther J. Pavón y cols : Molecular Immunology 43, 2006



En resumen, las células T de pacientes con LES, tienen una proporción de CD38 asociada a los *rafts* relativamente alta respecto a los controles sanos que correlaciona con el incremento en la expresión basal de GM1 en la superficie celular (Fig 5A). Es importante señalar que nosotros hemos medido la expresión de GM1 en la superficie celular, es decir, que solo es una fracción de la cantidad total de GM1 que se distribuye entre la superficie y la zona intracelular. El incremento en la expresión de total ha sido previamente publicado [6, 350]. Por lo tanto, las células T de LES poseen niveles basales mayores de *rafts* que las células T normales lo cual puede indicar un fenotipo “activado” que podría resultar de la exposición de las células T de pacientes con LES con una mayor proporción de células dendríticas diferenciadas por el efecto de IFN- α [351]. El aumento en la expresión de los lípidos *rafts* en la membrana plasmática, podría constituir la manera por la cual las células T efectoras mejoran su capacidad señalizadora [346].

El estudio de la composición proteica de los *rafts* en líneas celulares de células T Jurkat ha revelado que CD38, Lck y CD3- ζ residen en un subconjunto de *rafts* separados de LAT y otras moléculas señalizadoras [55], lo cual es compatible con otros estudios que muestran que en células T “resting”, Lck y LAT están localizadas en diferentes tipos de *rafts* [349, 352, 353]. Se trata de una situación cambiante ya que después de la activación celular, la coalescencia de los *rafts* permite que Lck y LAT acaben formando parte del mismo tipo de *rafts* [349, 352, 353].

La segregación de CD38 en un determinado subconjunto de *rafts* junto con Lck y CD3- ζ explicaría a nivel molecular cómo se inicia la señalización mediada por CD38 en este compartimiento. Recordar que en estos *rafts* se produce la fosforilación completa de CD3- ζ , CD3- ϵ , Lck y LAT, así como la traslocación de moléculas señalizadoras como Sos y p-85-fosfatidilinositol 3-quinasa en la señalización mediada por CD38 [55].

El número relativamente bajo de células utilizadas en este estudio, nos ha impedido analizar en detalle la composición de los *rafts*, en los que CD38 formaba parte, tanto en células T de pacientes con LES en reposo o activadas. Pero es

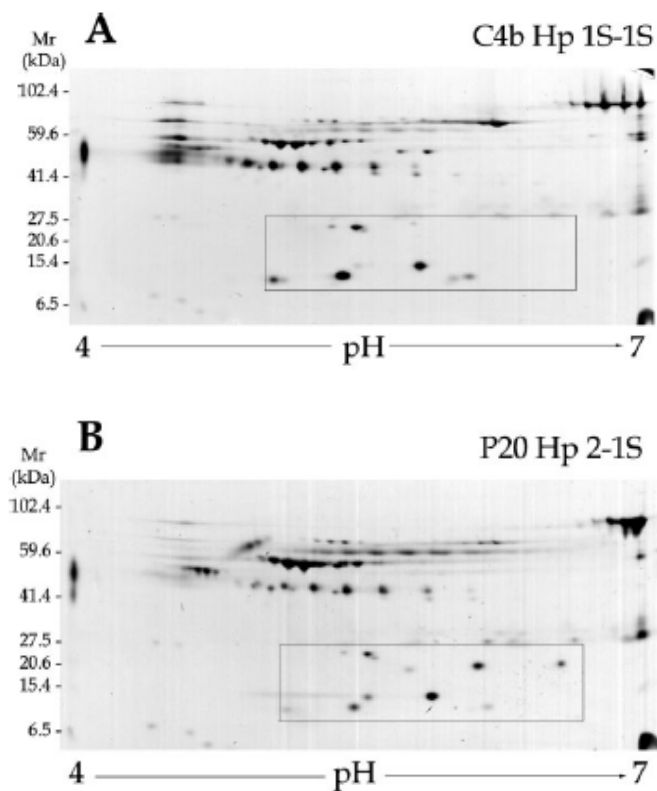
probable que exista una expresión anómala o cambios en la localización de moléculas señalizadoras como CD3- ζ o Lck [141, 350] que favorezcan una señalización anómala.

Finalmente especulamos que el aumento en la expresión de CD38 en los *rafts* de células T de pacientes con LES o de células T activadas podrían modular la señalización de TCR bien, activando o secuestrando moléculas señalizadoras de la cascada del TCR.

Este aspecto requerirá otros estudios que podrían ayudar a buscar nuevos mecanismos moleculares de regulación positiva o negativa en células T.

Por otro lado, mediante el estudio por técnicas de proteómica sobre plasmas de pacientes con LES y controles sanos, se han analizado comparativamente las muestras mediante geles de dos dimensiones y en ellos hemos podido ver diferencias notables en los patrones de expresión de las haptoglobinas.

Figura 1: Anexo I : Esther J Pavón y cols: Proteomics 2006; 6: S282-S292



Del trabajo publicado en 2006 en la revista *Proteomics*, en un número relativamente bajo de pacientes y controles, se observó que la proteína Hp α 1F está solo presente en uno de los pacientes estudiados, mientras que la forma Hp α 2 se detectaba en todos los pacientes excepto en uno.

La frecuencia alélica resultante para Hp² era de 0.733 que era significativamente más alta que la que encontramos en controles sanos (0.625). Además el alelo Hp^{1F} está drásticamente disminuido en pacientes con LES (0.033) respecto a los controles sanos (0.093). Dado que la frecuencia de Hp^{1S} era relativamente normal, la disminución del alelo Hp¹ se debía a una menor presencia del alelo Hp^{1F}.

	Hp²	Hp^{1S}	Hp^{1F}
Controles (n=16)	0.625	0.281	0.093
Pacientes (n=15)	0.733	0.233	0.033

n=número de muestras analizadas

Es interesante resaltar que en un estudio previo al nuestro sobre la distribución de haplotipos de Hp en pacientes con LES de Suecia [354], la frecuencia del alelo Hp¹ en pacientes era de 0.278, siendo muy similar a la de nuestro estudio inicial (0.266). Sin embargo, en el estudio sueco no hacen distinción entre Hp 2-1S y Hp 2-1F ya que solo estudiaron en los tres fenotipos principales (Hp 2-2, Hp 2-1 y Hp 1-1). Además la frecuencia alélica de Hp¹ de la población europea control era de 0.4 [154], incluyendo la población española [355], siendo muy similar a la estudiada por nosotros (0.374).

Ahora con los nuevos datos que tenemos (no publicados), como consecuencia de analizar un mayor número de muestras, podemos decir que los resultados varían considerablemente siendo la frecuencia alélica de la forma Hp^{1F} prácticamente el doble que la de los controles.

Se puede apreciar como prácticamente se iguala la frecuencia alélica de Hp², no se ve afectada prácticamente la de Hp^{1S}, pero en el caso de Hp^{1F} es en los pacientes donde hemos observado un mayor aumento.

Los resultados de las frecuencias alélicas son los siguientes:

	Hp²	Hp^{1S}	Hp^{1F}
Controles (n=73)	0.664	0.260	0.075
Pacientes (n=68)	0.642	0.209	0.149

n=número de muestras analizadas

La distribución fenotípica de la haptoglobina en el estudio de nuestras muestras tanto de pacientes con LES como de controles sanos, expresada en porcentajes es de: (Nuevos datos no publicados)

	Hp2-2	Hp2-1	Hp1-1
Controles (n=73)	43.25%	45.95%	10.81%
Pacientes (n=68)	39.13%	47.83%	13.04%

n=número de muestras analizadas

que corresponden a una frecuencia alélica de:

	Hp²	Hp¹
Controles (n=73)	66.22%	33.78%
Pacientes (n=68)	63.04%	39.95%

Podemos decir que en nuestra población control el alelo Hp1 se encuentra algo reducido si lo comparamos con los porcentajes de otras poblaciones europeas, donde este valor suele rondar el 40% [154]. Resulta paradójico, que al hacer el estudio con un mayor número de muestras, nuestra población control se desvíe de los datos obtenidos con el grupo inicial que coincidían con el resto de estudios en la población europea, aunque por supuesto esto puede ser debido a que necesitamos

analizar un mayor número de controles para un análisis estadístico más fiable. Teniendo en cuenta que el haplotipo Hp1F es minoritario (~10%) respecto a los otros, consideramos que serían necesarios un número mínimo de 200 pacientes y 200 controles para analizarlos estadísticamente.

También nos llama la atención que el fenotipo Hp2-2, no es más alto en los pacientes con LES respecto a controles sanos, contrariamente a lo que se había visto en otros estudios [354], y en nuestra propia publicación (Ver anexo I, [Esther J Pavón y cols: Proteomics 2006; 6: S282-S292](#)) lo cual nos lleva a pensar que no es un fenotipo asociado con la enfermedad, sino que más bien dentro del grupo de pacientes, aquellas personas que sean Hp2-2 podrían verse afectadas de mayor manera frente a determinadas manifestaciones clínicas como pueden ser los desórdenes cardiovasculares graves, vasculitis sistémica o hipergammaglobulinemia.

Además podemos completar nuestro estudio, añadiendo los porcentajes de nuestra población en la distribución fenotípica según sean S o F.

	Controles (n=73)	Pacientes (n=68)
Hp2-2	43.84%	40.30%
Hp2-1S	36.99%	29.85%
Hp2-1F	8.22%	17.91%
Hp1S-1S	5.48%	2.98%
Hp1F-1F	1.37%	2.98%
Hp1S-1F	4.11%	5.97%

De esta forma puede observarse como la forma F de la haptoglobina es más abundante en los tres fenotipos de los que forma parte (Hp2-1F, Hp1F-1F y Hp1S-1F), en la población paciente que en la control. De nuevo en la forma Hp2-2 no observamos grandes diferencias respecto a los controles que nos puedan llevar a pensar que este fenotipo pueda estar involucrado en una mayor susceptibilidad a padecer la enfermedad.

La haptoglobina se une al receptor CD22 en células B humanas [356], el cual está implicado en activación y supervivencia. Aunque la afinidad de la unión es la misma para los tres fenotipos, el número de sitios libres parece ser mayor en individuos Hp2-2.

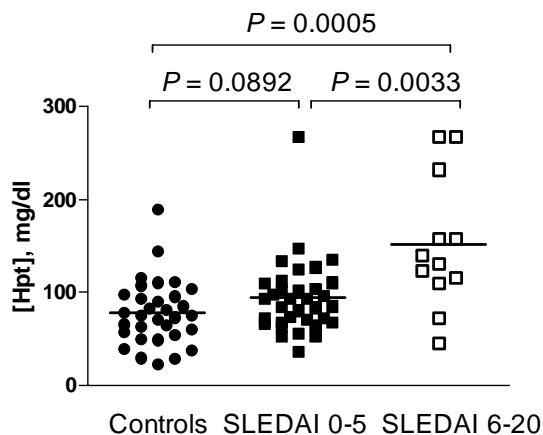
El aumento de células B que expresan CD22 promueve la presencia de células B autorreactivas en células maduras [357].

Además CD22 murino, está localizado dentro del locus de susceptibilidad *sle3* [358] y un polimorfismo de CD22 se ha asociado con LES en un estudio de pacientes japoneses [359].

Es probable que la interacción Hp/CD22 pueda modular la función de las células B. Así la haptoglobina soluble podría inhibir la interacción de células B CD22⁺ con células endoteliales activadas, las cuales al ser tratadas con citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- α , manifiesta un aumento en la expresión de ligandos de superficie de CD22 [185].

Por último, no hay cambios dramáticos en los niveles de Hp en plasma en los pacientes estudiados (Fig 6), aunque los pacientes con actividad alta (medida por el SLEDAI) muestren niveles de Hp significativamente mayores que aquellos con actividad baja o nula.

Figura: Anexo II
(Nuevos datos, no publicados)



A pesar de que habría que incluir un número mayor de muestras, el incremento de los niveles de Hp podría correlacionar con el incremento en la actividad de la enfermedad, que sería además cuando se liberan más citoquinas pro-inflamatorias y podría ocurrir la respuesta de la fase aguda.

Recientemente hemos realizado un estudio de la presencia de citoquinas en plasmas de muestras tanto de controles sanos como de pacientes con LES. Los resultados se muestran en la tabla inferior, donde puede apreciarse cómo prácticamente todos los pacientes tienen niveles altos de citoquinas en plasma respecto a los controles, donde sólo una de las muestras presenta un nivel elevado de citoquinas respecto al resto.

Entre los pacientes, las que se expresan en mayor medida son la IL-6, IL-10, e IL-13.

	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IL-12	IL-13	IFN- γ	TNF- α
P72	*0.09	OOOR <	*0.42	OOOR <	OOOR <	3.17	OOOR <	OOOR <	OOOR <	1.52
P67.2	4.53	21.7	7.13	24.17	95.56	59.71	13.63	24.04	19.75	16.6
P59.2	0.77	6.89	1.54	OOOR <	9.53	11.58	2.07	5.4	0.81	3.92
P34.4	1.07	OOOR <	1.92	OOOR <	OOOR <	12.37	2.78	4.84	1.37	4.61
P73	2.63	18.27	5.69	5.11	36.79	39.92	7.31	18.44	9.99	9.3
P74	1.76	10.79	3.86	OOOR <	15.95	27.42	5.06	12.06	6.32	7.28
P66.2	*0.09	OOOR <	*0.26	OOOR <	OOOR <	3.42	OOOR <	0.87	OOOR <	1.24
P75	10.06	OOOR <	0.68	215.13	228.26	57.64	134.12	9.4	2.27	13.74
C76	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	*0.61	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <
C77	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <
C78	*0.54	*0.04	0.98	OOOR <	OOOR <	5.57	1.84	5.82	OOOR <	3.31
C81	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	*0.41
C82	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <
C84	*0.35	OOOR <	0.65	OOOR <	OOOR <	5.96	OOOR <	3.05	9.19	1.37
C88	2.11	17.15	4.63	6.68	25.81	36.01	7.59	18.15	9.89	8.48
C89	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	OOOR <	*0.38

El polimorfismo de la haptoglobina está relacionado con la prevalencia y el resultado de varias condiciones patológicas, como la alteración en el metabolismo

del hierro, tal como la hemocromatosis, infecciones y enfermedad vascular aterosclerótica.

La hemoglobina libre promueve la acumulación del radical hidroxilo y especies reactivas del oxígeno (radicales libres), porque el hierro puede generar radicales hidroxilo reactivos en presencia de H_2O_2 [359]. No obstante, tanto la capacidad de unión a hemoglobina como la capacidad antioxidante son mayores para la forma $Hp\alpha 1$ que para la $Hp\alpha 2$ [154, 185].

La menor capacidad de unión a hemoglobina en individuos con fenotipo Hp 2-2, puede resultar en un mayor daño renal y mayores niveles de hierro en suero, al menos en hombres [360].

El aumento de la capacidad antioxidante de Hp^1 está pensado para conferir protección frente a angiopatías. Así, siguiendo con los infartos de miocardio, la severidad del daño miocárdial es también mayor en pacientes con fenotipo Hp2-2 que en aquellos Hp2-1 ó Hp2-1 [194], lo que sugiere que este fenotipo protege menos contra el estrés oxidativo en vasos y arterias. En este sentido el fenotipo Hp2-2 es también un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares en enfermos de diabetes [190]. Esto es probable debido al incremento en la generación de la actividad redox del hierro inducida preferencialmente por complejos Hp 2-2-Hb [361].

En ratones sin Hp, se acumula la hemoglobina libre en el riñón predominantemente, en lugar del hígado y el bazo como en ratones silvestres (wild-type) [362]. Además cuando en ratones sin Hp se induce una hemólisis severa por fenilhidracina, se produce mayor mortalidad y daño en tejidos que en ratones normales [363].

Las enfermedades cardiovasculares son una complicación importante en pacientes con LES, y el aumento del riesgo a padecerlas no se explica por los factores de riesgo ateroscleróticos tradicionales [364].

Además, algunos estudios indican que la aterosclerosis es un proceso inflamatorio mediado por el sistema inmune [365], y que esta dislipoproteinemia está caracterizada por altos niveles en suero de triglicéridos y bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad, lo cual correlaciona con el incremento de la actividad de la enfermedad en LES [364].

Los conocimientos de los fenotipos de haptoglobinas, tanto como su huella peptídica por geles bidimensionales y espectrometría de masas en pacientes con LES, pueden ayudar a predecir o prevenir desordenes cardiovasculares y determinar un pronóstico más preciso y un mejor tratamiento.

CONCLUSIONES

D) CONCLUSIONES

1. Existe un incremento de CD38 insoluble en detergentes no iónicos a temperatura fisiológica en linfocitos T de pacientes con LES respecto a controles sanos, que correlacionan con el aumento de la proporción de CD38 asociado a los *rafts*. Este incremento en la cantidad relativa de CD38 asociado a las balsas lipídicas se observa tanto en PBMCs como en células T de pacientes con LES. Además hemos encontrado aumentos significativos en cuanto a la proporción de linfocitos T CD8⁺CD38⁺, CD4⁺CD8⁺ y CD25⁺CD38⁺, así como también en linfocitos B y NK, aunque en esta última población los resultados no son significativos.
2. La estimulación mitogénica de linfocitos T normales induce la expresión de CD38 y su traslocación a los *rafts*. Posiblemente esto sea como consecuencia del aumento en la proporción de la membrana plasmática que adopta una estructura de balsa lipídica (GM1[↑]) y la expansión selectiva de linfocitos T que expresan simultáneamente CD38 y GM1.
3. Los linfocitos de pacientes con LES tienen un fenotipo similar al de los linfocitos T activados (CD38[↑], su traslocación a las balsas lipídicas, GM1[↑], CD4:CD8[↓])
4. Hemos encontrado los seis fenotipos posibles de la haptoglobina aunque con distintas frecuencias entre controles sanos y pacientes con LES, caracterizando todos los spots correspondientes a cada una de las modificaciones postraduccionales de las especies alpha de la haptoglobina (α_2 , α_{1S} , α_{1F}), a través de sus péptidos característicos, mediante técnicas de MALDI-TOF y nESI-ITMS/MS. Además los resultados encontrados en cuanto a frecuencia alélica correlacionan con los ya conocidos en otros estudios de poblaciones europeas incluyendo la española.

5. La concentración de haptoglobina en plasma es significativamente más alta en pacientes con LES con alto nivel de SLEDAI (127.5 mg/dL), que la de los pacientes con un nivel de SLEDAI mas bajo ó que no presentan actividad (69 mg/dL), o que la de los controles sanos.
6. Hemos identificado hasta 107 proteínas diferentes en geles de células mononucleares de sangre periférica tanto de pacientes con LES como de controles, implicadas en señalización, comunicación celular, metabolismo, crecimiento y mantenimiento celular, respuesta inmune, y regulación de ácidos nucleicos, ubicadas en cualquier órgano celular.
7. Mediante análisis diferencial por geles bidimensionales y western blot, hemos encontrado incrementos en la proteínas calgranulina A y calgranulina B, en pacientes con LES respecto a controles, mientras que no hemos observado cambios en las proteínas de choque térmico HSP90- α y HSP90- β . Además hemos podido ver que la albúmina se encuentra drásticamente disminuida en el grupo de pacientes respecto a los controles.
8. Hemos encontrados dos modificaciones post-traduccionales en la calgranulina B, como son la fosforilación en la treonina que posee en el carboxilo terminal, como la pérdida de los cuatro primeros aminoácidos de su secuencia, lo que hace que se genere una proteína truncada con un peso molecular inferior.

PERSPECTIVAS

En este trabajo hemos encontrado algunas proteínas que pueden ayudar al diagnóstico del LES. Decir que quizás nuestro número de pacientes no sea el suficiente para pensar en llevar los resultados directamente a la clínica, con lo que estamos de acuerdo en que un número mayor puede ser de gran ayuda. En concreto es interesante continuar el estudio de CD38, ya que nosotros mismos hemos podido comprobar que a medida que crecía nuestro número de pacientes, también lo hacía la significación de CD38.

En cuanto al proteoma de los pacientes y controles, en esta tesis solo hemos iniciado el análisis, ya que en lo relativo a los PBMCs de sangre periférica, queda aún mucho por hacer, puesto que el número de proteínas que aparecen es tan enorme que un estudio exhaustivo de cada una de ellas conllevaría un largo tiempo.

REFERENCIAS

E) REFERENCIAS

1. D'Cruz, D.P., M.A. Khamashta, and G.R. Hughes, *Systemic lupus erythematosus*. *Lancet*, 2007. **369**(9561): p. 587-96.
2. Munoz, L.E., et al., *SLE--a disease of clearance deficiency?* *Rheumatology (Oxford)*, 2005. **44**(9): p. 1101-7.
3. Gabor G. Illei, E.T., Larissa Lapteva, and Peter E. Lipsky, *Biomarkers in Systemic Lupus Erythematosus*. *Arthritis and Rheumatism*, 2004. **50**(7): p. 2048-2065.
4. G.Espinosa Garriga, R.C.S.y.J.F.F., *Lupus eritematoso sistémico*. *Medicine*, 2005. **9**(30): p. 1942-1952.
5. Rahman, A.H. and R.A. Eisenberg, *The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus*. *Springer Semin Immunopathol*, 2006. **28**(2): p. 131-43.
6. Jury, E.C., et al., *Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(8): p. 1176-87.
7. Morrow, J., Nelson, L., Watts, R, and Isenberg, D. , *Systemic lupus erythematosus*. *Autoimmune rheumatic disease*, 1999: p. 56-103.
8. Font, J., et al., *Clusters of clinical and immunologic features in systemic lupus erythematosus: analysis of 600 patients from a single center*. *Semin Arthritis Rheum*, 2004. **33**(4): p. 217-30.
9. Meier, C.R., et al., *Postmenopausal estrogen replacement therapy and the risk of developing systemic lupus erythematosus or discoid lupus*. *J Rheumatol*, 1998. **25**(8): p. 1515-9.
10. Cutolo, M. and R.L. Wilder, *Different roles for androgens and estrogens in the susceptibility to autoimmune rheumatic diseases*. *Rheum Dis Clin North Am*, 2000. **26**(4): p. 825-39.
11. Sanchez-Guerrero, J., et al., *Postmenopausal estrogen therapy and the risk for developing systemic lupus erythematosus*. *Ann Intern Med*, 1995. **122**(6): p. 430-3.
12. Ruiz-Irastorza, G., M. Khamashta, and G.R. Hughes, *Does SLE flare during pregnancy?* *Scand J Rheumatol Suppl*, 1998. **107**: p. 76-9.
13. Lawrence, J.S., C.L. Martins, and G.L. Drake, *A family survey of lupus erythematosus. 1. Heritability*. *J Rheumatol*, 1987. **14**(5): p. 913-21.

14. Deapen, D., et al., *A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(3): p. 311-8.
15. Reichlin, M., J.B. Harley, and M.D. Lockshin, *Serologic studies of monozygotic twins with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(4): p. 457-64.
16. Sestak, A.L., et al., *Familial aggregation of lupus and autoimmunity in an unusual multiplex pedigree*. *J Rheumatol*, 1999. **26**(7): p. 1495-9.
17. Tan, F.K. and F.C. Arnett, *The genetics of lupus*. *Curr Opin Rheumatol*, 1998. **10**(5): p. 399-408.
18. Gray-McGuire, C., et al., *Genome scan of human systemic lupus erythematosus by regression modeling: evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2*. *Am J Hum Genet*, 2000. **67**(6): p. 1460-9.
19. Lindqvist, A.K. and M.E. Alarcon-Riquelme, *The genetics of systemic lupus erythematosus*. *Scand J Immunol*, 1999. **50**(6): p. 562-71.
20. Gonzalez-Escribano, M.F., et al., *CD38 polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus*. *Hum Immunol*, 2004. **65**(6): p. 660-4.
21. Parks, C.G., et al., *Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: a population-based, case-control study in the southeastern United States*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(7): p. 1840-50.
22. Gross, A.J., et al., *EBV and systemic lupus erythematosus: a new perspective*. *J Immunol*, 2005. **174**(11): p. 6599-607.
23. Weening, J.J., et al., *The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(2): p. 241-50.
24. Mecklenbrauker, I., et al., *Protein kinase Cdelta controls self-antigen-induced B-cell tolerance*. *Nature*, 2002. **416**(6883): p. 860-5.
25. Taylor, P.R., et al., *A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo*. *J Exp Med*, 2000. **192**(3): p. 359-66.
26. Licht, R., et al., *Decreased phagocytosis of apoptotic cells in diseased SLE mice*. *J Autoimmun*, 2004. **22**(2): p. 139-45.
27. Herrmann, M., et al., *Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(7): p. 1241-50.

28. Baumann, I., et al., *Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(1): p. 191-201.
29. Bickerstaff, M.C., et al., *Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity*. *Nat Med*, 1999. **5**(6): p. 694-7.
30. Botto, M., et al., *Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies*. *Nat Genet*, 1998. **19**(1): p. 56-9.
31. Napirei, M., et al., *Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice*. *Nat Genet*, 2000. **25**(2): p. 177-81.
32. Boes, M., et al., *Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(3): p. 1184-9.
33. Svensson, B., *Monocyte in vitro function in systemic lupus erythematosus (SLE). I. A clinical and immunological study*. *Scand J Rheumatol Suppl*, 1980. **31**: p. 29-41.
34. Salmon, J.E., et al., *Defective mononuclear phagocyte function in systemic lupus erythematosus: dissociation of Fc receptor-ligand binding and internalization*. *J Immunol*, 1984. **133**(5): p. 2525-31.
35. Gaip, U.S., et al., *Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE)*. *J Autoimmun*, 2007. **28**(2-3): p. 114-21.
36. Kaplan, M.J., *Apoptosis in systemic lupus erythematosus*. *Clin Immunol*, 2004. **112**(3): p. 210-8.
37. Crispin, J.C. and J. Alcocer-Varela, *The role myeloid dendritic cells play in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *Autoimmun Rev*, 2007. **6**(7): p. 450-6.
38. Manuel, S.L., et al., *Dendritic cells in autoimmune diseases and neuroinflammatory disorders*. *Front Biosci*, 2007. **12**: p. 4315-35.
39. Banchereau, J., V. Pascual, and A.K. Palucka, *Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation*. *Immunity*, 2004. **20**(5): p. 539-50.
40. Mahnke, K., et al., *Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells*. *Immunol Cell Biol*, 2002. **80**(5): p. 477-83.
41. Palucka, A.K., et al., *The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus*. *Immunol Cell Biol*, 2002. **80**(5): p. 484-8.

42. Scheinecker, C., et al., *Alterations of dendritic cells in systemic lupus erythematosus: phenotypic and functional deficiencies*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(4): p. 856-65.
43. Steinbach, F., et al., *Monocytes from systemic lupus erythematosus patients are severely altered in phenotype and lineage flexibility*. *Ann Rheum Dis*, 2000. **59**(4): p. 283-8.
44. Seelen, M.A., A. Roos, and M.R. Daha, *Role of complement in innate and autoimmunity*. *J Nephrol*, 2005. **18**(6): p. 642-53.
45. Dighiero, G., et al., *Natural autoantibodies constitute a substantial part of normal circulating immunoglobulins*. *Ann N Y Acad Sci*, 1986. **475**: p. 135-45.
46. Arbuckle, M.R., et al., *Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(16): p. 1526-33.
47. Lewis, M.J. and M. Botto, *Complement deficiencies in humans and animals: links to autoimmunity*. *Autoimmunity*, 2006. **39**(5): p. 367-78.
48. Pickering, M.C., et al., *Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis*. *Adv Immunol*, 2000. **76**: p. 227-324.
49. Dragon-Durey, M.A., et al., *Molecular basis of a selective C1s deficiency associated with early onset multiple autoimmune diseases*. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7612-6.
50. Rupert, K.L., et al., *The molecular basis of complete complement C4A and C4B deficiencies in a systemic lupus erythematosus patient with homozygous C4A and C4B mutant genes*. *J Immunol*, 2002. **169**(3): p. 1570-8.
51. Stone, N.M., et al., *Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency*. *Br J Dermatol*, 2000. **142**(3): p. 521-4.
52. Zubiaur, M., et al., *CD38 ligation results in activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase and the CD3-zeta/zeta-associated protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes*. *J Immunol*, 1997. **159**(1): p. 193-205.
53. Zubiaur, M., et al., *The CD3-gamma delta epsilon transducing module mediates CD38-induced protein-tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Jurkat T cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(29): p. 20633-42.
54. Zubiaur, M., et al., *CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/protein kinase B and Erk activation in the absence of the CD3-zeta immune receptor tyrosine-based activation motifs*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(1): p. 13-22.

55. Munoz, P., et al., *CD38 signaling in T cells is initiated within a subset of membrane rafts containing Lck and the CD3-zeta subunit of the T cell antigen receptor.* J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50791-802.
56. Liu, Q., et al., *Crystal structure of human CD38 extracellular domain.* Structure, 2005. **13**(9): p. 1331-9.
57. Savarino, A., et al., *Effects of the human CD38 glycoprotein on the early stages of the HIV-1 replication cycle.* Faseb J, 1999. **13**(15): p. 2265-76.
58. Mehta, K., U. Shahid, and F. Malavasi, *Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions.* Faseb J, 1996. **10**(12): p. 1408-17.
59. Mallone, R. and P.C. Perin, *Anti-CD38 autoantibodies in type 2 diabetes.* Diabetes Metab Res Rev, 2006. **22**(4): p. 284-94.
60. Jackson, D.G. and J.I. Bell, *Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation.* J Immunol, 1990. **144**(7): p. 2811-5.
61. Terhorst, C., et al., *Biochemical studies of the human thymocyte cell-surface antigens T6, T9 and T10.* Cell, 1981. **23**(3): p. 771-80.
62. Lenkei, R., et al., *Indicators of T-cell activation: correlation between quantitative CD38 expression and soluble CD8 levels in asymptomatic HIV+ individuals and healthy controls.* Cytometry, 1998. **33**(2): p. 115-22.
63. Mocroft, A., et al., *CD8+, CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients.* J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997. **14**(2): p. 158-62.
64. Bofill, M. and N.J. Borthwick, *CD38 in health and disease.* Chem Immunol, 2000. **75**: p. 218-34.
65. Lee, H.C., *Structure and enzymatic functions of human CD38.* Mol Med, 2006. **12**(11-12): p. 317-23.
66. Reinherz, E.L., et al., *Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(3): p. 1588-92.
67. Takasawa, S., et al., *Synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose by human leukocyte antigen CD38 and inhibition of the hydrolysis by ATP.* J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26052-4.
68. Fernandez, J.E., et al., *Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues.* J Biol Regul Homeost Agents, 1998. **12**(3): p. 81-91.

69. Yamada, M., et al., *Ultrastructural localization of CD38 immunoreactivity in rat brain*. Brain Res, 1997. **756**(1-2): p. 52-60.
70. Sun, L., et al., *A novel mechanism for coupling cellular intermediary metabolism to cytosolic Ca²⁺ signaling via CD38/ADP-ribosyl cyclase, a putative intracellular NAD⁺ sensor*. Faseb J, 2002. **16**(3): p. 302-14.
71. Adebajo, O.A., et al., *A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca²⁺ homeostasis*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(7): p. 409-14.
72. Yalcintepe, L., et al., *Nuclear CD38 in retinoic acid-induced HL-60 cells*. Exp Cell Res, 2005. **303**(1): p. 14-21.
73. Nakagawara, K., et al., *Assignment of CD38, the gene encoding human leukocyte antigen CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase), to chromosome 4p15*. Cytogenet Cell Genet, 1995. **69**(1-2): p. 38-9.
74. Ferrero, E. and F. Malavasi, *The metamorphosis of a molecule: from soluble enzyme to the leukocyte receptor CD38*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(2): p. 151-61.
75. Harada, N., et al., *Expression cloning of a cDNA encoding a novel murine B cell activation marker. Homology to human CD38*. J Immunol, 1993. **151**(6): p. 3111-8.
76. Savarino, A., et al., *Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions?* Aids, 2000. **14**(9): p. 1079-89.
77. States, D.J., T.F. Walseth, and H.C. Lee, *Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(12): p. 495.
78. Lee, H.C., et al., *Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺-mobilizing activity*. J Biol Chem, 1989. **264**(3): p. 1608-15.
79. Lee, H.C., R. Aarhus, and D. Levitt, *The crystal structure of cyclic ADP-ribose*. Nat Struct Biol, 1994. **1**(3): p. 143-4.
80. Lee, H.C. and R. Aarhus, *A derivative of NADP mobilizes calcium stores insensitive to inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose*. J Biol Chem, 1995. **270**(5): p. 2152-7.
81. Howard, M., et al., *Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38*. Science, 1993. **262**(5136): p. 1056-9.
82. Aarhus, R., et al., *ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30327-33.

83. Partida-Sanchez, S., et al., *Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo*. *Nat Med*, 2001. **7**(11): p. 1209-16.
84. Guse, A.H., et al., *Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose*. *Nature*, 1999. **398**(6722): p. 70-3.
85. Dianzani, U., et al., *Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule*. *J Immunol*, 1994. **153**(3): p. 952-9.
86. Deaglio, S., et al., *Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member*. *J Immunol*, 1998. **160**(1): p. 395-402.
87. Morra, M., et al., *CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells*. *Faseb J*, 1998. **12**(7): p. 581-92.
88. Lund, F.E., et al., *Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression*. *J Immunol*, 1996. **157**(4): p. 1455-67.
89. Liu, Z., et al., *Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up*. *Cytometry*, 1996. **26**(1): p. 1-7.
90. Giorgi, J.V., et al., *CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group*. *J Infect Dis*, 1994. **170**(4): p. 775-81.
91. Liu, Z., et al., *CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1998. **18**(4): p. 332-40.
92. Autran, B., et al., *Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease*. *Science*, 1997. **277**(5322): p. 112-6.
93. Vigano, A., et al., *Expression of CD38 on CD8 T cells predicts maintenance of high viraemia in HAART-treated HIV-1-infected children. Highly active antiretroviral therapy*. *Lancet*, 1998. **352**(9144): p. 1905-6.
94. Giorgi, J.V., et al., *Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1993. **6**(8): p. 904-12.

95. Ho, H.N., et al., *Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens.* J Immunol, 1993. **150**(7): p. 3070-9.
96. Giorgi, J.V., et al., *Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage.* J Infect Dis, 1999. **179**(4): p. 859-70.
97. de Martino, M., et al., *Different meaning of CD38 molecule expression on CD4+ and CD8+ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years.* Pediatr Res, 1998. **43**(6): p. 752-8.
98. Schlesinger, M., et al., *Increased expression of activation markers on CD8 lymphocytes in children with human immunodeficiency virus-1 infection.* Pediatr Res, 1995. **38**(3): p. 390-6.
99. Boonstra, J.G., et al., *CD38 as a prognostic factor in B cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL): comparison of three approaches to analyze its expression.* Cytometry B Clin Cytom, 2006. **70**(3): p. 136-41.
100. Ibrahim, S., et al., *CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Blood, 2001. **98**(1): p. 181-6.
101. Zupo, S., et al., *CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis.* Blood, 1996. **88**(4): p. 1365-74.
102. Deaglio, S., et al., *CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells.* Blood, 2003. **102**(6): p. 2146-55.
103. Gao, C., et al., *PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis.* Blood, 2003. **102**(1): p. 169-79.
104. Mallone, R., et al., *Autoantibody response to CD38 in Caucasian patients with type 1 and type 2 diabetes: immunological and genetic characterization.* Diabetes, 2001. **50**(4): p. 752-62.
105. Takasawa, S., et al., *Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells.* Science, 1993. **259**(5093): p. 370-3.
106. Ikehata, F., et al., *Autoantibodies against CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) that impair glucose-induced insulin secretion in noninsulin-dependent diabetes patients.* J Clin Invest, 1998. **102**(2): p. 395-401.
107. Pupilli, C., et al., *Autoantibodies to CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) in Caucasian patients with diabetes: effects on insulin release from human islets.* Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2309-15.

108. Ausiello, C.M., et al., *Secretion of IFN-gamma, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-10 cytokines after activation of human purified T lymphocytes upon CD38 ligation*. *Cell Immunol*, 1996. **173**(2): p. 192-7.
109. Mallone, R., et al., *Anti-CD38 autoantibodies: characterisation in new-onset type I diabetes and latent autoimmune diabetes of the adult (LADA) and comparison with other islet autoantibodies*. *Diabetologia*, 2002. **45**(12): p. 1667-77.
110. Stevenson, G.T., *CD38 as a therapeutic target*. *Mol Med*, 2006. **12**(11-12): p. 345-6.
111. Goldmacher, V.S., et al., *Anti-CD38-blocked ricin: an immunotoxin for the treatment of multiple myeloma*. *Blood*, 1994. **84**(9): p. 3017-25.
112. Levacher, M., et al., *The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value*. *Clin Exp Immunol*, 1992. **90**(3): p. 376-82.
113. Funaro, A., et al., *Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids*. *Int Immunol*, 1996. **8**(11): p. 1643-50.
114. Funaro, A., et al., *Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation*. *J Immunol*, 1990. **145**(8): p. 2390-6.
115. Bazil, V. and J.L. Strominger, *CD43, the major sialoglycoprotein of human leukocytes, is proteolytically cleaved from the surface of stimulated lymphocytes and granulocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(9): p. 3792-6.
116. Mullberg, J., et al., *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. *Eur J Immunol*, 1993. **23**(2): p. 473-80.
117. Horenstein, A.L., et al., *CD38 binding to human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31*. *Biochem J*, 1998. **330** (Pt 3): p. 1129-35.
118. Lebedev, M.J., et al., *Serum levels of different forms of soluble CD38 antigen in burned patients*. *Burns*, 2004. **30**(6): p. 552-6.
119. Deaglio, S., et al., *CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes*. *Chem Immunol*, 2000. **75**: p. 99-120.
120. Mallone, R., et al., *Characterization of a CD38-like 78-kilodalton soluble protein released from B cell lines derived from patients with X-linked agammaglobulinemia*. *J Clin Invest*, 1998. **101**(12): p. 2821-30.
121. Deaglio, S., K. Mehta, and F. Malavasi, *Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors*. *Leuk Res*, 2001. **25**(1): p. 1-12.

122. Ilangumaran, S., H.T. He, and D.C. Hoessli, *Microdomains in lymphocyte signalling: beyond GPI-anchored proteins*. Immunol Today, 2000. **21**(1): p. 2-7.
123. Brown, D.A. and E. London, *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17221-4.
124. Brown, D.A. and E. London, *Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(1): p. 1-7.
125. Pizzo, P. and A. Viola, *Lipid rafts in lymphocyte activation*. Microbes Infect, 2004. **6**(7): p. 686-92.
126. Simons, K. and A. Wandinger-Ness, *Polarized sorting in epithelia*. Cell, 1990. **62**(2): p. 207-10.
127. Smart, E.J., et al., *A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10104-8.
128. Bromley, S.K., et al., *The immunological synapse*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 375-96.
129. Thomas, S., et al., *Analysis of lipid rafts in T cells*. Mol Immunol, 2004. **41**(4): p. 399-409.
130. Paratcha, G. and C.F. Ibanez, *Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme*. Curr Opin Neurobiol, 2002. **12**(5): p. 542-9.
131. Gidwani, A., D. Holowka, and B. Baird, *Fluorescence anisotropy measurements of lipid order in plasma membranes and lipid rafts from RBL-2H3 mast cells*. Biochemistry, 2001. **40**(41): p. 12422-9.
132. Varma, R. and S. Mayor, *GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface*. Nature, 1998. **394**(6695): p. 798-801.
133. Pralle, A., et al., *Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells*. J Cell Biol, 2000. **148**(5): p. 997-1008.
134. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
135. Resh, M.D., *Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter*. Cell, 1994. **76**(3): p. 411-3.
136. Zhang, W., R.P. Tribble, and L.E. Samelson, *LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation*. Immunity, 1998. **9**(2): p. 239-46.

137. Brdicka, T., et al., *Phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains (PAG), a novel ubiquitously expressed transmembrane adaptor protein, binds the protein tyrosine kinase csk and is involved in regulation of T cell activation.* J Exp Med, 2000. **191**(9): p. 1591-604.
138. Kawabuchi, M., et al., *Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases.* Nature, 2000. **404**(6781): p. 999-1003.
139. Salojin, K.V., et al., *T-cell anergy and altered T-cell receptor signaling: effects on autoimmune disease.* Immunol Today, 1998. **19**(10): p. 468-73.
140. Gringhuis, S.I., et al., *Displacement of linker for activation of T cells from the plasma membrane due to redox balance alterations results in hyporesponsiveness of synovial fluid T lymphocytes in rheumatoid arthritis.* J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2170-9.
141. Jury, E.C., et al., *Increased ubiquitination and reduced expression of LCK in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(5): p. 1343-54.
142. Nambiar, M.P., et al., *Abnormal expression of various molecular forms and distribution of T cell receptor zeta chain in patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2002. **46**(1): p. 163-74.
143. Cheng, P.C., et al., *A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting.* J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1549-60.
144. Cheng, P.C., et al., *Translocation of the B cell antigen receptor into lipid rafts reveals a novel step in signaling.* J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3693-701.
145. Mukherjee, S., T.T. Soe, and F.R. Maxfield, *Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails.* J Cell Biol, 1999. **144**(6): p. 1271-84.
146. Danielsen, E.M. and B. van Deurs, *A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells.* J Cell Biol, 1995. **131**(4): p. 939-50.
147. Fivaz, M., L. Abrami, and F.G. van der Goot, *Landing on lipid rafts.* Trends Cell Biol, 1999. **9**(6): p. 212-3.
148. Smart, E.J., et al., *Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction.* Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7289-304.
149. Green, J.M., et al., *Role of cholesterol in formation and function of a signaling complex involving $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, integrin-associated protein (CD47), and heterotrimeric G proteins.* J Cell Biol, 1999. **146**(3): p. 673-82.

150. Manes, S., et al., *Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells*. *Embo J*, 1999. **18**(22): p. 6211-20.
151. Anderson, H.A., E.M. Hiltbold, and P.A. Roche, *Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(2): p. 156-62.
152. Hiltbold, E.M., N.J. Poloso, and P.A. Roche, *MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse*. *J Immunol*, 2003. **170**(3): p. 1329-38.
153. Rodriguez, C., et al., *Proteotyping of human haptoglobin by MALDI-TOF profiling: Phenotype distribution in a population of toxic oil syndrome patients*. *Proteomics*, 2006. **6 Suppl 1**: p. S272-81.
154. Langlois, M.R. and J.R. Delanghe, *Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans*. *Clin Chem*, 1996. **42**(10): p. 1589-600.
155. Koch, W., et al., *Haptoglobin gene subtyping by restriction enzyme analysis*. *Clin Chem*, 2003. **49**(11): p. 1937-40.
156. Langlois, M.R., et al., *Effect of haptoglobin on the metabolism of vitamin C*. *Am J Clin Nutr*, 1997. **66**(3): p. 606-10.
157. Tseng, C.F., et al., *Purification of human haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 using monoclonal antibody affinity chromatography*. *Protein Expr Purif*, 2004. **33**(2): p. 265-73.
158. Kristiansen, M., et al., *Identification of the haemoglobin scavenger receptor*. *Nature*, 2001. **409**(6817): p. 198-201.
159. Wassell, J., *Haptoglobin: function and polymorphism*. *Clin Lab*, 2000. **46**(11-12): p. 547-52.
160. Melamed-Frank, M., et al., *Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin*. *Blood*, 2001. **98**(13): p. 3693-8.
161. Mikkat, S., et al., *Mass spectrometric protein structure characterization reveals cause of migration differences of haptoglobin alpha chains in two-dimensional gel electrophoresis*. *Proteomics*, 2004. **4**(12): p. 3921-32.
162. Maeda, N., et al., *Duplication within the haptoglobin Hp2 gene*. *Nature*, 1984. **309**(5964): p. 131-5.
163. Bowman, B.H. and A. Kurosky, *Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation*. *Adv Hum Genet*, 1982. **12**: p. 189-261, 453-4.

164. Dobryszczycka, W., *Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1997. **35**(9): p. 647-54.
165. Cheng, T.M., et al., *Immunochemical property of human haptoglobin phenotypes: Determination of plasma haptoglobin using type-matched standards*. Clin Biochem, 2007. **40**(13-14): p. 1045-56.
166. Quero, C., et al., *Determination of protein markers in human serum: Analysis of protein expression in toxic oil syndrome studies*. Proteomics, 2004. **4**(2): p. 303-15.
167. Kurosky, A., et al., *Covalent structure of human haptoglobin: a serine protease homolog*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(6): p. 3388-92.
168. Arcoleo, J.P. and J. Greer, *Hemoglobin binding site and its relationship to the serine protease-like active site of haptoglobin*. J Biol Chem, 1982. **257**(17): p. 10063-8.
169. McCormick, D.J. and M.Z. Atassi, *Hemoglobin binding with haptoglobin: delineation of the haptoglobin binding site on the alpha-chain of human hemoglobin*. J Protein Chem, 1990. **9**(6): p. 735-42.
170. Javid, J., *The Effect of Haptoglobin Polymer Size on Hemoglobin Binding Capacity*. Vox Sang, 1965. **10**: p. 320-5.
171. Agil, A., C.J. Fuller, and I. Jialal, *Susceptibility of plasma to ferrous iron/hydrogen peroxide-mediated oxidation: demonstration of a possible Fenton reaction*. Clin Chem, 1995. **41**(2): p. 220-5.
172. Moison, R.M., et al., *Induction of lipid peroxidation of pulmonary surfactant by plasma of preterm babies*. Lancet, 1993. **341**(8837): p. 79-82.
173. Balla, J., et al., *Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(20): p. 9285-9.
174. Edwards, D.H., et al., *Haptoglobin-haemoglobin complex in human plasma inhibits endothelium dependent relaxation: evidence that endothelium derived relaxing factor acts as a local autocooid*. Cardiovasc Res, 1986. **20**(8): p. 549-56.
175. Martin, W., et al., *Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta*. J Pharmacol Exp Ther, 1985. **232**(3): p. 708-16.
176. Collins, P., et al., *Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries in vivo*. Circulation, 1993. **87**(1): p. 80-5.

177. Lange, V., [*Haptoglobin polymorphism--not only a genetic marker*]. *Anthropol Anz*, 1992. **50**(4): p. 281-302.
178. Barclay, R., *The role of iron in infection*. *Med Lab Sci*, 1985. **42**(2): p. 166-77.
179. Cid, M.C., et al., *Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(3): p. 977-85.
180. Cockerill, G.W., J.R. Gamble, and M.A. Vadas, *Angiogenesis: models and modulators*. *Int Rev Cytol*, 1995. **159**: p. 113-60.
181. Kohler, W. and O. Prokop, *Relationship between haptoglobin and Streptococcus pyogenes T4 antigens*. *Nature*, 1978. **271**(5643): p. 373.
182. Prokop, O. and W. Kohler, *Haptoglobins act similar to antibodies. Steps of discovery. Analogous conclusions from pure preparations, umbilical cord sera and animal sera*. *Zentralbl Gynakol*, 1979. **101**(17): p. 1111-6.
183. Oh, S.K., N. Pavlotsky, and A.I. Tauber, *Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences*. *J Leukoc Biol*, 1990. **47**(2): p. 142-8.
184. Stamenkovic, I. and B. Seed, *The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion*. *Nature*, 1990. **345**(6270): p. 74-7.
185. Hanasaki, K., L.D. Powell, and A. Varki, *Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(13): p. 7543-50.
186. Powell, L.D., et al., *Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(10): p. 7019-27.
187. Engel, P., et al., *The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes*. *J Immunol*, 1993. **150**(11): p. 4719-32.
188. Kasvosve, I., et al., *Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2000. **4**(8): p. 771-5.
189. Delanghe, J.R., et al., *Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection*. *Aids*, 1998. **12**(9): p. 1027-32.
190. Levy, A.P., et al., *Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The Strong Heart Study*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **40**(11): p. 1984-90.
191. Bilgrami, G., S.P. Tyagi, and A. Qasim, *Serum haptoglobin in cases of ischemic heart diseases*. *Jpn Heart J*, 1980. **21**(4): p. 505-10.

192. Snyder, S., et al., *Serum glycoproteins in coronary artery disease*. *Circulation*, 1977. **56**(3): p. 359-62.
193. Delanghe, J., et al., *Haptoglobin polymorphism, a genetic risk factor in coronary artery bypass surgery*. *Atherosclerosis*, 1997. **132**(2): p. 215-9.
194. Chapelle, J.P., et al., *Effect of the haptoglobin phenotype on the size of a myocardial infarct*. *N Engl J Med*, 1982. **307**(8): p. 457-63.
195. Golabi, P., G.K. Kshatriya, and A.K. Kapoor, *Association of genetic markers with coronary heart disease (myocardial infarction)--a case-control study*. *J Indian Med Assoc*, 1999. **97**(1): p. 6-7.
196. Engstrom, G., et al., *Lung function and cardiovascular risk: relationship with inflammation-sensitive plasma proteins*. *Circulation*, 2002. **106**(20): p. 2555-60.
197. Miyoshi, H., et al., *Haptoglobin prevents renal dysfunction associated with intravariceal infusion of ethanolamine oleate*. *Am J Gastroenterol*, 1991. **86**(11): p. 1638-41.
198. Burbea, Z., et al., *Role of haptoglobin phenotype in end-stage kidney disease*. *Nephron Exp Nephrol*, 2004. **97**(2): p. e71-6.
199. Hochberg, I., et al., *Haptoglobin phenotype and coronary artery collaterals in diabetic patients*. *Atherosclerosis*, 2002. **161**(2): p. 441-6.
200. Louagie, H.K., et al., *Haptoglobin polymorphism and chronic hepatitis C*. *J Hepatol*, 1996. **25**(1): p. 10-4.
201. Tsamantanis, C., et al., *Haptoglobin types in breast carcinoma*. *Hum Hered*, 1980. **30**(1): p. 44-5.
202. Bartel, U., D. Elling, and G. Geserick, *[Distribution of haptoglobin phenotypes in gynecologic tumors]*. *Zentralbl Gynakol*, 1985. **107**(24): p. 1492-5.
203. Weinberger, M.H., et al., *Association of haptoglobin with sodium sensitivity and resistance of blood pressure*. *Hypertension*, 1987. **10**(4): p. 443-6.
204. Kojima, S., et al., *The association between salt sensitivity of blood pressure and some polymorphic factors*. *J Hypertens*, 1994. **12**(7): p. 797-801.
205. Foell, D., et al., *Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation*. *Clin Chim Acta*, 2004. **344**(1-2): p. 37-51.
206. Zwadlo, G., et al., *Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues*. *Clin Exp Immunol*, 1988. **72**(3): p. 510-5.

207. Lagasse, E. and R.G. Clerc, *Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation*. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(6): p. 2402-10.
208. Odink, K., et al., *Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis*. *Nature*, 1987. **330**(6143): p. 80-2.
209. Dorin, J.R., et al., *A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene*. *Nature*, 1987. **326**(6113): p. 614-7.
210. Sander, J., et al., *Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1984. **44**(4): p. 357-62.
211. Stockley, R.A., et al., *Relationship of neutrophil cytoplasmic protein (L1) to acute and chronic lung disease*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1984. **44**(7): p. 629-34.
212. van den Bos, C., et al., *Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton*. *J Immunol*, 1996. **156**(3): p. 1247-54.
213. Frosch, M., et al., *Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 198-206.
214. Foell, D. and J. Roth, *Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(12): p. 3762-71.
215. Edgeworth, J., P. Freemont, and N. Hogg, *Ionomycin-regulated phosphorylation of the myeloid calcium-binding protein p14*. *Nature*, 1989. **342**(6246): p. 189-92.
216. Roth, J., et al., *Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 is associated with distinct monocytic differentiation pathways in HL-60 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **191**(2): p. 565-70.
217. Lundy, F.T., et al., *Identification of MRP-8 (calgranulin A) as a major responsive protein in chronic periodontitis*. *J Pathol*, 2000. **192**(4): p. 540-4.
218. Roth, J., et al., *Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(4): p. 155-8.
219. Cornish, C.J., et al., *S100 protein CP-10 stimulates myeloid cell chemotaxis without activation*. *J Cell Physiol*, 1996. **166**(2): p. 427-37.

220. Lackmann, M., et al., *Purification and structural analysis of a murine chemotactic cytokine (CP-10) with sequence homology to S100 proteins*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7499-504.
221. Zhang, P., et al., *Alcohol intoxication inhibits pulmonary S100A8 and S100A9 expression in rats challenged with intratracheal lipopolysaccharide*. Alcohol Clin Exp Res, 2007. **31**(1): p. 113-21.
222. Boussac, M. and J. Garin, *Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach*. Electrophoresis, 2000. **21**(3): p. 665-72.
223. Rammes, A., et al., *Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9496-502.
224. Voganatsi, A., et al., *Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(1): p. 130-4.
225. Striz, I. and I. Trebichavsky, *Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation*. Physiol Res, 2004. **53**(3): p. 245-53.
226. Kerkhoff, C., M. Klempt, and C. Sorg, *Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9)*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1448**(2): p. 200-11.
227. Brandtzaeg, P., I. Dale, and M.K. Fagerhol, *Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia*. Am J Clin Pathol, 1987. **87**(6): p. 700-7.
228. Hsieh, H.L., et al., *Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(2): p. 375-81.
229. Goebeler, M., et al., *Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection*. Transplantation, 1994. **58**(3): p. 355-61.
230. Pillay, S.N., J.R. Asplin, and F.L. Coe, *Evidence that calgranulin is produced by kidney cells and is an inhibitor of calcium oxalate crystallization*. Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 2): p. F255-61.
231. Vogl, T., et al., *S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25291-6.
232. Propper, C., et al., *Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 183-8.

233. Strupat, K., et al., *Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis*. J Am Soc Mass Spectrom, 2000. **11**(9): p. 780-8.
234. Heizmann, C.W., G. Fritz, and B.W. Schafer, *S100 proteins: structure, functions and pathology*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1356-68.
235. Vogl, T., et al., *Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 detected by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 1999. **10**(11): p. 1124-30.
236. Hunter, M.J. and W.J. Chazin, *High level expression and dimer characterization of the S100 EF-hand proteins, migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14*. J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12427-35.
237. Berntzen, H.B. and M.K. Fagerhol, *L1, a major granulocyte protein; isolation of high quantities of its subunits*. Scand J Clin Lab Invest, 1990. **50**(7): p. 769-74.
238. Kerkhoff, C., et al., *The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 32672-9.
239. Doussiere, J., F. Bouzidi, and P.V. Vignais, *The S100A8/A9 protein as a partner for the cytosolic factors of NADPH oxidase activation in neutrophils*. Eur J Biochem, 2002. **269**(13): p. 3246-55.
240. Newton, R.A. and N. Hogg, *The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils*. J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1427-35.
241. Frosch, M., et al., *Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(3): p. 628-37.
242. Mahnke, K., R. Bhardwaj, and C. Sorg, *Heterodimers of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 are expressed on the surface of human monocytes upon adherence to fibronectin and collagen. Relation to TNF-alpha, IL-6, and superoxide production*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(1): p. 63-71.
243. Steinbakk, M., et al., *Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin*. Lancet, 1990. **336**(8718): p. 763-5.
244. Loomans, H.J., et al., *Histidine-based zinc-binding sequences and the antimicrobial activity of calprotectin*. J Infect Dis, 1998. **177**(3): p. 812-4.
245. Clohessy, P.A. and B.E. Golden, *Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence*. Scand J Immunol, 1995. **42**(5): p. 551-6.

246. Youssef, P., et al., *Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane.* J Rheumatol, 1999. **26**(12): p. 2523-8.
247. Kane, D., et al., *Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(6): p. 1676-85.
248. Berntzen, H.B., E. Munthe, and M.K. Fagerhol, *A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 1989. **16**(11): p. 1416-20.
249. Brun, J.G., R. Jonsson, and H.J. Haga, *Measurement of plasma calprotectin as an indicator of arthritis and disease activity in patients with inflammatory rheumatic diseases.* J Rheumatol, 1994. **21**(4): p. 733-8.
250. Berntzen, H.B., et al., *The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 1991. **18**(1): p. 133-8.
251. Foell, D., et al., *Monitoring neutrophil activation in juvenile rheumatoid arthritis by S100A12 serum concentrations.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(4): p. 1286-95.
252. Frosch, M., et al., *Expression of myeloid-related proteins 8 and 14 in systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(9): p. 2622-6.
253. Foell, D., et al., *Methotrexate treatment in juvenile idiopathic arthritis: when is the right time to stop?* Ann Rheum Dis, 2004. **63**(2): p. 206-8.
254. Haga, H.J., et al., *Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity.* Lupus, 1993. **2**(1): p. 47-50.
255. Rugtveit, J., et al., *Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease.* Gastroenterology, 1997. **112**(5): p. 1493-505.
256. Lugerling, N., et al., *Immunohistochemical distribution and serum levels of the Ca(2+)-binding proteins MRP8, MRP14 and their heterodimeric form MRP8/14 in Crohn's disease.* Digestion, 1995. **56**(5): p. 406-14.
257. Aadland, E. and M.K. Fagerhol, *Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(8): p. 823-5.
258. Tibble, J.A., et al., *Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease.* Gastroenterology, 2002. **123**(2): p. 450-60.

259. Roseth, A.G., P.N. Schmidt, and M.K. Fagerhol, *Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 1999. **34**(1): p. 50-4.
260. Fagerhol, M.K., *Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality*. Lancet, 2000. **356**(9244): p. 1783-4.
261. Costa, F., et al., *Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation*. Dig Liver Dis, 2003. **35**(9): p. 642-7.
262. Tibble, J.A., et al., *Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2000. **119**(1): p. 15-22.
263. Summerton, C.B., et al., *Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2002. **14**(8): p. 841-5.
264. Roseth, A.G., et al., *Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study*. Scand J Gastroenterol, 1992. **27**(9): p. 793-8.
265. Thjodleifsson, B., et al., *Subclinical intestinal inflammation: an inherited abnormality in Crohn's disease relatives?* Gastroenterology, 2003. **124**(7): p. 1728-37.
266. Limburg, P.J., et al., *Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(10): p. 2831-7.
267. Bunn, S.K., et al., *Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **32**(2): p. 171-7.
268. Hermani, A., et al., *Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(14): p. 5146-52.
269. Stulik, J., et al., *The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass*. Electrophoresis, 1999. **20**(4-5): p. 1047-54.
270. Gebhardt, C., et al., *S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(11): p. 1622-31.

271. Schlingemann, J., et al., *Profile of gene expression induced by the tumour promotor TPA in murine epithelial cells*. *Int J Cancer*, 2003. **104**(6): p. 699-708.
272. Gebhardt, C., et al., *Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis*. *Oncogene*, 2002. **21**(27): p. 4266-76.
273. Hummerich, L., et al., *Identification of novel tumour-associated genes differentially expressed in the process of squamous cell cancer development*. *Oncogene*, 2006. **25**(1): p. 111-21.
274. Strasser, F., P.L. Gowland, and C. Ruef, *Elevated serum macrophage inhibitory factor-related protein (MRP) 8/14 levels in advanced HIV infection and during disease exacerbation*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1997. **16**(4): p. 230-8.
275. Lugerling, N., et al., *Serum 27E10 antigen: a new potential marker for staging HIV disease*. *Clin Exp Immunol*, 1995. **101**(2): p. 249-53.
276. Kleinegger, C.L., D.C. Stoeckel, and Z.B. Kurago, *A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2001. **92**(1): p. 62-7.
277. Pechkovsky, D.V., et al., *Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection in vitro and in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000. **29**(1): p. 27-33.
278. Clohessy, P.A. and B.E. Golden, *Elevated plasma levels of L1L and L1H in CF patients*. *Biochem Soc Trans*, 1996. **24**(2): p. 310S.
279. Golden, B.E., et al., *Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis*. *Arch Dis Child*, 1996. **74**(2): p. 136-9.
280. Striz, I., et al., *MRP 8/14 and procalcitonin serum levels in organ transplantations*. *Ann Transplant*, 2001. **6**(2): p. 6-9.
281. Jaresova, M., et al., *Serum procalcitonin concentrations in transplant patients with acute rejection and bacterial infections*. *Immunol Lett*, 1999. **69**(3): p. 355-8.
282. Csermely, P., et al., *The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review*. *Pharmacol Ther*, 1998. **79**(2): p. 129-68.
283. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. *Nature*, 1996. **381**(6583): p. 571-9.

284. Welch, W.J. and C.R. Brown, *Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding*. Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(2): p. 109-15.
285. Pearl, L.H. and C. Prodromou, *Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 271-94.
286. Stephanou, A., D.S. Latchman, and D.A. Isenberg, *The regulation of heat shock proteins and their role in systemic lupus erythematosus*. Semin Arthritis Rheum, 1998. **28**(3): p. 155-62.
287. Minami, Y., et al., *Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): p. 10099-103.
288. Nemoto, T., et al., *Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein*. Eur J Biochem, 1995. **233**(1): p. 1-8.
289. Perdew, G.H., et al., *Localization and characterization of the 86- and 84-kDa heat shock proteins in Hepa 1c1c7 cells*. Exp Cell Res, 1993. **209**(2): p. 350-6.
290. Lees-Miller, S.P. and C.W. Anderson, *The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17275-80.
291. Panaretou, B., et al., *ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo*. Embo J, 1998. **17**(16): p. 4829-36.
292. Obermann, W.M., et al., *In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis*. J Cell Biol, 1998. **143**(4): p. 901-10.
293. Meyer, P., et al., *Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 647-58.
294. Panaretou, B., et al., *Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1*. Mol Cell, 2002. **10**(6): p. 1307-18.
295. Chang, H.C., D.F. Nathan, and S. Lindquist, *In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60)*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(1): p. 318-25.
296. Dey, B., J.J. Lightbody, and F. Boschelli, *CDC37 is required for p60v-src activity in yeast*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(9): p. 1405-17.
297. Duina, A.A., J.A. Marsh, and R.F. Gaber, *Identification of two Cyp-40-like cyclophilins in Saccharomyces cerevisiae, one of which is required for normal growth*. Yeast, 1996. **12**(10): p. 943-52.

298. Fang, Y., et al., *SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(7): p. 3727-34.
299. Rose, D.W., et al., *The 90-kilodalton peptide of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase has sequence similarity with the 90-kilodalton heat shock protein*. Biochemistry, 1987. **26**(21): p. 6583-7.
300. Lees-Miller, S.P. and C.W. Anderson, *Two human 90-kDa heat shock proteins are phosphorylated in vivo at conserved serines that are phosphorylated in vitro by casein kinase II*. J Biol Chem, 1989. **264**(5): p. 2431-7.
301. Radanyi, C., et al., *Chick heat-shock protein of Mr = 90,000, free or released from progesterone receptor, is in a dimeric form*. J Biol Chem, 1989. **264**(5): p. 2568-73.
302. Iannotti, A.M., D.A. Rabideau, and J.J. Dougherty, *Characterization of purified avian 90,000-Da heat shock protein*. Arch Biochem Biophys, 1988. **264**(1): p. 54-60.
303. Minami, Y., et al., *The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1459-64.
304. Pratt, W.B., *The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 297-326.
305. Koyasu, S., et al., *Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(21): p. 8054-8.
306. Czar, M.J., M.J. Welsh, and W.B. Pratt, *Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton*. Eur J Cell Biol, 1996. **70**(4): p. 322-30.
307. Redmond, T., et al., *Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells*. Eur J Cell Biol, 1989. **50**(1): p. 66-75.
308. Sanchez, E.R., et al., *Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells*. Mol Endocrinol, 1988. **2**(8): p. 756-60.
309. Fostinis, Y., et al., *Heat shock protein HSP90 and its association with the cytoskeleton: a morphological study*. Biochem Cell Biol, 1992. **70**(9): p. 779-86.

310. Williams, N.E. and E.M. Nelsen, *HSP70 and HSP90 homologs are associated with tubulin in hetero-oligomeric complexes, cilia and the cortex of Tetrahymena*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 14)**: p. 1665-72.
311. Nadeau, K., A. Das, and C.T. Walsh, *Hsp90 chaperonins possess ATPase activity and bind heat shock transcription factors and peptidyl prolyl isomerases*. J Biol Chem, 1993. **268(2)**: p. 1479-87.
312. Minami, Y., et al., *The calmodulin-binding domain of the mouse 90-kDa heat shock protein*. J Biol Chem, 1993. **268(13)**: p. 9604-10.
313. Prince, T. and R.L. Matts, *Definition of protein kinase sequence motifs that trigger high affinity binding of Hsp90 and Cdc37*. J Biol Chem, 2004. **279(38)**: p. 39975-81.
314. Prince, T., L. Sun, and R.L. Matts, *Cdk2: a genuine protein kinase client of Hsp90 and Cdc37*. Biochemistry, 2005. **44(46)**: p. 15287-95.
315. Terasawa, K., et al., *Cdc37 interacts with the glycine-rich loop of Hsp90 client kinases*. Mol Cell Biol, 2006. **26(9)**: p. 3378-89.
316. Zhao, Q., et al., *Identification of a conserved sequence motif that promotes Cdc37 and cyclin D1 binding to Cdk4*. J Biol Chem, 2004. **279(13)**: p. 12560-4.
317. Caplan, A.J., A.K. Mandal, and M.A. Theodoraki, *Molecular chaperones and protein kinase quality control*. Trends Cell Biol, 2007. **17(2)**: p. 87-92.
318. Huse, M. and J. Kuriyan, *The conformational plasticity of protein kinases*. Cell, 2002. **109(3)**: p. 275-82.
319. Csermely, P. and C.R. Kahn, *The 90-kDa heat shock protein (hsp-90) possesses an ATP binding site and autophosphorylating activity*. J Biol Chem, 1991. **266(8)**: p. 4943-50.
320. Csermely, P., et al., *ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90)*. J Biol Chem, 1993. **268(3)**: p. 1901-7.
321. Ozawa, K., et al., *Mapping of the gene family for human heat-shock protein 90 alpha to chromosomes 1, 4, 11, and 14*. Genomics, 1992. **12(2)**: p. 214-20.
322. Vamvakopoulos, N.C., et al., *Mapping the intron-containing human hsp90 alpha (HSPCAL4) gene to chromosome band 14q32*. Cytogenet Cell Genet, 1993. **64(3-4)**: p. 224-6.
323. Durkin, A.S., et al., *Assignment of an intron-containing human heat-shock protein gene (hsp90 beta, HSPCB) to chromosome 6 near TCTE1 (6p21) and two intronless pseudogenes to chromosomes 4 and 15 by polymerase chain reaction amplification from a panel of hybrid cell lines*. Genomics, 1993. **18(2)**: p. 452-4.

324. Takahashi, I., et al., *A cosmid clone at the D6S182 locus on human chromosome 6p12 contains the 90-kDa heat shock protein beta gene (HSP90 beta)*. *Mamm Genome*, 1994. **5**(2): p. 121-2.
325. Njemini, R., et al., *Heat shock proteins and chemokine/cytokine secretion profile in ageing and inflammation*. *Mech Ageing Dev*, 2007. **128**(7-8): p. 450-4.
326. Wallin, R.P., et al., *Heat-shock proteins as activators of the innate immune system*. *Trends Immunol*, 2002. **23**(3): p. 130-5.
327. Njemini, R., et al., *Basal and infection-induced levels of heat shock proteins in human aging*. *Biogerontology*, 2007. **8**(3): p. 353-64.
328. Kamal, A., et al., *A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 407-10.
329. Kenderov, A., et al., *Lupus-specific kidney deposits of HSP90 are associated with altered IgG idiotypic interactions of anti-HSP90 autoantibodies*. *Clin Exp Immunol*, 2002. **129**(1): p. 169-76.
330. Ripley, B.J., D.A. Isenberg, and D.S. Latchman, *Elevated levels of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) in SLE correlate with levels of IL-6 and autoantibodies to hsp90*. *J Autoimmun*, 2001. **17**(4): p. 341-6.
331. Latchman, D.S., *Heat shock proteins and human disease*. *J R Coll Physicians Lond*, 1991. **25**(4): p. 295-9.
332. Latchman, D.S. and D.A. Isenberg, *The role of hsp90 in SLE*. *Autoimmunity*, 1994. **19**(3): p. 211-8.
333. Minota, S., et al., *Autoantibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus*. *J Clin Invest*, 1988. **81**(1): p. 106-9.
334. Conroy, S.E., et al., *Detection of autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases*. *Br J Rheumatol*, 1994. **33**(10): p. 923-6.
335. Pashov, A., et al., *Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire*. *Int Immunol*, 2002. **14**(5): p. 453-61.
336. Erkeller-Yuksel, F.M., et al., *Surface expression of heat shock protein 90 by blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus*. *J Autoimmun*, 1992. **5**(6): p. 803-14.
337. Twomey, B.M., et al., *Elevated levels of the 90 kD heat shock protein in patients with systemic lupus erythematosus are dependent upon enhanced transcription of the hsp90 beta gene*. *J Autoimmun*, 1993. **6**(4): p. 495-506.

338. Stephanou, A., et al., *Interleukin 6 activates heat-shock protein 90 beta gene expression*. *Biochem J*, 1997. **321 (Pt 1)**: p. 103-6.
339. Ripley, B.J., et al., *Interleukin-10 activates heat-shock protein 90beta gene expression*. *Immunology*, 1999. **97(2)**: p. 226-31.
340. Linker-Israeli, M., et al., *Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis*. *J Immunol*, 1991. **147(1)**: p. 117-23.
341. Park, Y.B., et al., *Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus*. *Clin Exp Rheumatol*, 1998. **16(3)**: p. 283-8.
342. Alcocer-Varela, J., et al., *Activation markers on peripheral blood T cells from patients with active or inactive systemic lupus erythematosus. Correlation with proliferative responses and production of IL-2*. *J Autoimmun*, 1991. **4(6)**: p. 935-45.
343. al-Janadi, M. and S. Raziuddin, *B cell hyperactivity is a function of T cell derived cytokines in systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 1993. **20(11)**: p. 1885-91.
344. Belles-Isles, M., et al., *Monitoring of cytomegalovirus infections by the CD8+CD38+ T-cell subset in kidney transplant recipients*. *Transplantation*, 1998. **65(2)**: p. 279-82.
345. Erkeller-Yuksel, F.M., P.M. Lydyard, and D.A. Isenberg, *Lack of NK cells in lupus patients with renal involvement*. *Lupus*, 1997. **6(9)**: p. 708-12.
346. Tuosto, L., et al., *Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation*. *Eur J Immunol*, 2001. **31(2)**: p. 345-9.
347. Hare, K.J., et al., *Modeling TCR signaling complex formation in positive selection*. *J Immunol*, 2003. **171(6)**: p. 2825-31.
348. Thomas, S., et al., *Sensitive detection of GM1 lipid rafts and TCR partitioning in the T cell membrane*. *J Immunol Methods*, 2003. **275(1-2)**: p. 161-8.
349. Slaughter, N., et al., *The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation*. *Clin Immunol*, 2003. **108(2)**: p. 138-51.
350. Krishnan, S., et al., *Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus*. *J Immunol*, 2004. **172(12)**: p. 7821-31.
351. Blanco, P., et al., *Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus*. *Science*, 2001. **294(5546)**: p. 1540-3.

352. Drevot, P., et al., *TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts*. *Embo J*, 2002. **21**(8): p. 1899-908.
353. Schade, A.E. and A.D. Levine, *Lipid raft heterogeneity in human peripheral blood T lymphoblasts: a mechanism for regulating the initiation of TCR signal transduction*. *J Immunol*, 2002. **168**(5): p. 2233-9.
354. Rantapaa Dahlqvist, S., G. Beckman, and L. Beckman, *Serum protein markers in systemic lupus erythematosus*. *Hum Hered*, 1988. **38**(1): p. 44-7.
355. Alonso, A., et al., *Haptoglobin subtyping by isoelectric focusing in miniaturized polyacrylamide gels rehydrated in presence of 2-mercaptoethanol*. *Electrophoresis*, 1990. **11**(4): p. 321-4.
356. Van Vlierberghe, H., M. Langlois, and J. Delanghe, *Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease*. *Clin Chim Acta*, 2004. **345**(1-2): p. 35-42.
357. Grimaldi, C.M., et al., *Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(12): p. 1625-33.
358. Morel, L., et al., *Epistatic modifiers of autoimmunity in a murine model of lupus nephritis*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 131-9.
359. Hatta, Y., et al., *Identification of the gene variations in human CD22*. *Immunogenetics*, 1999. **49**(4): p. 280-6.
360. Delanghe, J.R. and M.R. Langlois, *Haptoglobin polymorphism and body iron stores*. *Clin Chem Lab Med*, 2002. **40**(3): p. 212-6.
361. Asleh, R., et al., *Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress in vitro and in vivo*. *Circ Res*, 2005. **96**(4): p. 435-41.
362. Fagoonee, S., et al., *Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading*. *Am J Pathol*, 2005. **166**(4): p. 973-83.
363. Lim, S.K., et al., *Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis*. *Blood*, 1998. **92**(6): p. 1870-7.
364. Ohlenschlaeger, T., et al., *Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(3): p. 260-7.
365. Kao, A.H., J.M. Sabatine, and S. Manzi, *Update on vascular disease in systemic lupus erythematosus*. *Curr Opin Rheumatol*, 2003. **15**(5): p. 519-27.

ABREVIATURAS

F) ABREVIATURAS:

- LES: Lupus Eritematoso Sistémico.
- EBV: Virus de Epstein-Barr.
- DCs: Células dendríticas.
- Aa: Aminoácido.
- ADPRc: ADP-ribosa cíclica.
- ADPR: ADP ribosa.
- NAADP: Ácido nicotínico adenina fosfato dinucleótido.
- NA: Ácido nicotínico.
- ADPRP: ADP ribosa-2'-fosfato.
- NK: Natural killer.
- IL-2: Interleuquina 2.
- B-CLL: Leucemia linfocítica crónica.
- GPI: Glicosilfosfatidilinositol.
- TCR: Receptor de células T
- BCR: Receptor de células B
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica.
- Hb: Hemoglobina
- APC: Célula presentadora del antígeno.
- ITAM:
- Hp: Haptoglobina
- sCD38: CD38 soluble
- S100A8: Calgranulina A ó MRP8
- S100A9: Calgranulina B ó MRP14
- PMNs: Leucocitos polimorfos nucleares.
- Pm: Peso molecular

*ANEXO 1: Artículos
publicados*

Increased association of CD38 with lipid rafts in T cells from patients with systemic lupus erythematosus and in activated normal T cells

Esther J. Pavón^a, Pilar Muñoz^a, María-del-Carmen Navarro^a, Enrique Raya-Alvarez^b, José-Luis Callejas-Rubio^b, Francisco Navarro-Pelayo^b, Norberto Ortego-Centeno^b, Jaime Sancho^{a,*}, Mercedes Zubiaur^a

^a *Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain*

^b *Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain*

Received 15 March 2005

Available online 16 June 2005

Abstract

In this study we have determined whether there is a relationship between CD38 expression on T cells, its distribution in different membrane microdomains, and T cell activation in SLE patients. The data show that CD38 expression is augmented in *ex vivo* CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD25⁺ SLE T cells, which correlates with its increased insolubility in Brij 98 detergent, and its translocation into lipid rafts. Moreover, SLE T cells show an altered CD4:CD8 ratio, which is due to a decreased proportion of CD4⁺ T cells and a concomitant increase in the proportion of CD8⁺ T cells. These data are consistent with the increased CD38 expression and lipid raft formation, and the significant reduction in the CD4:CD8 ratio observed in mitogen-stimulated normal T cells as compared with that in *ex vivo* untouched normal T cells. Increased expression of CD38 in floating rafts from SLE T cells, or from activated normal T cells may modulate TCR signaling by providing or sequestering signaling molecules to the engaged TCR.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: CD38; TCR; Signaling; Lipid rafts; T cells; Lupus; Autoimmunity

1. Introduction

SLE is a multisystemic autoimmune disease characterized by the production of high levels of autoantibodies against nuclear antigens resulting, at least in part, from a dysregulated T lymphocyte response to autoantigens (Janeway et al., 2001; Kammer et al., 2002; Kong et al., 2003). Although SLE etiopathology is poorly understood, there is likely a role for environmental triggers, for instance viruses, acting in the context of susceptibility genes (Rozzo et al., 2001; Wakeland et al., 2001). In both, European-American, and Iceland populations it has been identified a SLE susceptibility locus on human region 4p15 (Gray-McGuire et al., 2000; Lindqvist and Alarcon-Riquelme, 1999). Located within human 4p15

region are a number of interesting candidate genes including CD38 and CD157, which are both ectoenzymes members of the ADP-ribosyl cyclase family that are directly involved with T and B lymphocyte activity (Deaglio et al., 2001; Ortolan et al., 2002). There is an association between a polymorphism located at position 182 of intron 1 of the CD38 gene, and the development of discoid rash in Spanish SLE patients (Gonzalez-Escribano et al., 2004).

Previous studies have defined B cell subsets from inflamed secondary lymphoid tissue, such as tonsil, or the periphery of active-SLE patients that are defined by very high expression of CD38 and the presence of intracellular immunoglobulin (Grammer and Lipsky, 2003). On the other hand, increased expression of CD38 on T cells has been found in SLE patients (Alcocer-Varela et al., 1991; al-Janadi and Raziuddin, 1993; Erkeller-Yuksel et al., 1997). In certain tumor types, up-regulation of CD38 in tumor-associated non-neoplastic T

* Corresponding author. Tel.: +34 958 181664; fax: +34 958 181632.
E-mail address: granada@ipb.csic.es (J. Sancho).

cells could be useful as a marker of persistent T cell activation as well as a surrogate marker of disease progression (Lin et al., 2004). Likewise, up-regulation of CD38 on CD8⁺ T cells could be a marker of ongoing viral replication during acute or chronic viral infections (Belles-Isles et al., 1998; Carbone et al., 2000; Lynne et al., 1998; Ramzaoui et al., 1995).

Plasma membranes of many cell types, including T cells, contain specialized microdomains, or lipid rafts, enriched in sphingolipids, cholesterol, sphingomyelin and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. These membrane domains are characterized by detergent-insolubility at low temperatures and low buoyant density (Brown and London, 2000; Simons and Toomre, 2000). Lipid rafts play a central role in signal-transduction, in the immune response and in many pathological situations on the basis of two important raft properties, their capacity to incorporate or exclude proteins selectively, and their ability to coalesce into larger domains (Manes et al., 2003; Simons and Ehehalt, 2002). The densely packed, liquid-ordered environment of rafts excludes most integral membrane proteins. However, we have demonstrated that in T cells CD38 is constitutively associated with lipid rafts resistant to solubilization in 1% NP-40 at 4 °C (Zubiaur et al., 2002), or in 1% Brij 98 at 37 °C (Munoz et al., 2003). Furthermore, CD38 in rafts is able to initiate and propagate several activating signaling pathways, possibly by facilitating critical associations within other raft subsets, per example LAT rafts, via its capacity to interact with Lck and CD3- ζ (Munoz et al., 2003).

Changes in the properties or composition of lipid rafts may lead to inappropriate T lymphocyte signaling and ultimately to the development of pathological conditions, including autoimmunity (Gringhuis et al., 2000; Salojin et al., 1998). In this sense, in SLE T cells there are qualitative alterations in the protein composition of lipid rafts, alterations in actin dynamics, and increased calcium responses (Krishnan et al., 2004). Moreover, reduced expression of Lck in SLE T cells (Jury et al., 2003) is associated with increased expression of GM1 and increased localization of CD45, a molecule important in regulating Lck activity (Jury et al., 2004).

In this study we found that CD38 expression is augmented in CD3⁺ T cells from patients with SLE, which correlates with its increased translocation into lipid rafts. These data are consistent with increased lipid raft formation in activated normal T cells, and the evidence that SLE T cells display activation phenotypes.

2. Material and methods

2.1. Patients and healthy controls

Fifty-one consecutive outpatients fulfilling the revised American College of Rheumatology (ACR) criteria for the diagnosis of SLE (Tan et al., 1982), and routinely followed in the Systemic Autoimmune Diseases Unit (Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain) could participate in this study

Table 1

Clinical and demographic characteristics of the study subjects

	SLE (N = 51)	Healthy controls (n = 36)
Women	45 (88%)	21 (58%)
Age (y)	38.1 (20–77)	38.1 (20–77)
Caucasian	51 (100%)	36 (100%)
Disease duration (y)	4.1 (1–15)	NA
SLEDAI	3.35 (0–20)	NA
SLEDAI = 0	22 (43.1%)	NA
SLEDAI = 1–4	14 (27.4%)	NA
SLEDAI > 4	15 (29.4%)	NA

between December 2002 and May 2004. Thirty-six healthy, age-matched healthy volunteers served as controls. Disease activity was scored and the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) was calculated (Bombardier et al., 1992). Our study included 22 inactive SLE patients, 29 active patients with SLEDAI ranging from one to 20, and 36 healthy control volunteers (Table 1). All of them were Caucasians. Patients who were being treated with prednisone were asked not to take this medication 24 h before blood was drawn. For each patient, data were recorded on age, duration of the disease defined as the period from the disease onset (time when patients fulfilled the ACR criteria) to the time of the study, current and cumulative gluco-corticoid doses by review of patient records. Complete blood cell count, serum complement and serum anti-nuclear and anti-DNA antibodies were measured in all patients. Because the paucity of cell numbers obtained from the disease group, many of whom were leukopenic, different sets of experiments were performed with different patient groups but care was taken to include patients of SLEDAI score ranging from low (0–4 range) to high (5–20) in each group. Within each group, patient samples were matched with normal samples of similar ages and gender. The study protocol was approved by the Hospital Clínico San Cecilio, and CSIC Review Board and Ethics Committees. Written informed consent was obtained from all participating patients and volunteers according to the Declaration of Helsinki.

2.2. T lymphocyte isolation

PBMC were obtained by density gradient centrifugation over HISTOPAQUE[®]-1077 (Sigma-Aldrich Química, S.A., Spain). T cells were isolated from PBMC by magnetic separation after depletion of non-T cells by negative selection with the Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, GmbH, Germany) following the manufacturer's instructions. In all the cases, the percentage of T cells in the isolated subpopulation was >98% as determined by anti-CD3- ϵ mAb staining and fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. T cells were stimulated with 5 μ g/ml PHA-L and 50 U/ml IL-2 (Sigma-Aldrich, Química, S.A.) for 3 days.

2.3. Antibodies and reagents

Anti-human CD3- ϵ mAb OKT3 (IgG_{2a}), or the CD38 mAbs HB136 (IgG₁) and OKT10 (IgG₁) were prepared, pu-

rified, and labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) as previously described (Zubiaur et al., 1999). Affinity purified anti-human CD4-PE and CD8-FITC antibodies, the CTB-FITC conjugate and the affinity purified mouse mAb to α -Actin (clone AC40) were obtained from Sigma-Aldrich. Affinity purified anti-human mAb CD19-PE (IgG₁ κ), anti-human mAb CD38-PE (IgG₁ κ), and mouse immunoglobulin isotype controls were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Affinity purified mAb anti-human CD56-PE (IgG₁) was purchased from Miltenyi Biotec, GmbH (Germany). Affinity purified, FITC-conjugated, F(ab')₂ fraction of rabbit antibody to mouse immunoglobulins was purchased from DAKO (Glostrup, Denmark). The affinity-purified rabbit polyclonal antibody anti-Fyn was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). An affinity purified rabbit antibody to CD3- ϵ was purchased from Dako (Denmark). Polyclonal antibody anti-LAT was from UBI Upstate Biotechnology (Upstate, NY). Anti-CD3- ζ antiserum 448 was a gift from Dr. B. Alarcón (Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, Spain). Affinity purified goat anti-rabbit IgG (Fc) HRP Conjugate, and goat anti-mouse IgG (H + L) HRP Conjugate were from Promega (Madison, WI). Prestained SDS-PAGE Standards (broad and precision range), and ImmunoStart reagents were from Bio-Rad (Hercules, CA).

2.4. FACS analysis

PBMC or purified T cells were analyzed for surface expression of CD3, CD4, CD8, CD38, CD19 and CD56 by single or double-staining using FITC-, or PE-labeled anti-CD3, anti-CD38, anti-CD19, and anti-CD56 mAbs in the relevant combinations. Compensation settings were adjusted using single stained PBMC, or T cell samples. Isotype-matching labeled antibodies were used to calculate the non-specific staining. PBMC and lymphocytes were gated according with their forward and scatter characteristics (Munoz et al., 2003; Zubiaur et al., 1997). Two color immunofluorescence analysis was performed on a FACScan flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA), using the CellQuest Pro (BD Biosciences), and FlowJo (Tree Star, Inc. San Carlos, CA) software.

2.5. Detergent solubilization of cells at 37°C

Cells ($1-5 \times 10^6$) were lysed in 1% Brij 98 at 37°C as described previously (Munoz et al., 2003). Lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4°C, and supernatant (SN) and pellet (P) were diluted in $3 \times$ non-reducing Laemmli sample buffer. Both fractions were resolved on a 12.5% SDS-PAGE, transferred to PVDF and immunoblotted with specific antibodies, followed by the ECL system, as previously described (Munoz et al., 2003; Zubiaur et al., 2002).

2.6. Fractionation of floating rafts by sucrose gradient ultracentrifugation

Detergent-insoluble and -soluble fractions were separated in a discontinuous sucrose gradient as described (Munoz et

al., 2003; Zubiaur et al., 2002) with minor modifications. Two pools of the sucrose gradient fractions were then collected. First, the low-density fractions corresponding to the 5/30% interface (fractions 2 and 3, along fraction 4) and referred to as *Floating Rafts* (R). Second, the high-density soluble material corresponding to fractions 7 and 8 of the gradient and referred to as *Soluble* (S). The two pools were diluted with $3 \times$ non-reducing Laemmli sample buffer and resolved on 12.5% SDS-PAGE, transferred to PVDF and immunoblotted with specific antibodies, followed by the ECL system, as previously described (Zubiaur et al., 1999). Except where otherwise noted, 27 μ l of each sample was loaded onto gels.

2.7. Densitometric and statistical analysis

Densitometric analysis was performed on a PC using the Quantity One 1-D Analysis Software Version 4.4 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). To compare sample groups statistical analysis were performed using the Student's *t*-test, the Mann-Whitney U test, or the Fisher's exact test when appropriate. *P* values less than 0.05 were considered significant. The tests were performed using the GraphPad Prism software version 4.02 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

3. Results

3.1. A significant percentage of CD38 is insoluble in Brij 98 at 37°C in PBMC from SLE patients

The non-ionic detergent Brij 98 has been successfully used to selective isolate, at physiological temperatures, detergent-insoluble microdomains with the biochemical characteristics of rafts (Drevot et al., 2002; Munoz et al., 2003; Schuck et al., 2003). Therefore, we first investigated in PBMC whether CD38 was associated with the membrane raft vesicles that are recovered as detergent-insoluble complexes upon cell lysis in Brij 98 detergent at 37°C and centrifugation at $13,000 \times g$ for 15 min at 4°C. After this treatment, cytosolic and fully solubilized membrane proteins were found in the supernatant (referred to as SN), whereas lipid rafts and associated proteins, as well as cytoskeletal components remained in the pellet (referred to as P) (Munoz et al., 2003). The presence of CD38 in the P and SN fractions was determined by Western blotting. Equal number of cell equivalents (0.5×10^6) were loaded in patients and control samples, and the proportion of CD38 present in the P fraction relative to the total amount of CD38, (SN + P) was calculated. CD38 was present in the P fraction from either the SLE patients and the healthy controls (Fig. 1A, lanes 2 and 4), although its proportion, relative to the total amount of CD38 was significantly higher in SLE than in controls ($P=0.0090$, Fig. 1B). In contrast, similar proportions of Fyn, or actin relative to controls were detected when the same membranes were re-blotted with anti-Fyn, or anti- α -actin antibodies, respectively (Fig. 1A). Both SLE patients with high or low SLEDAI scores displayed a sta-

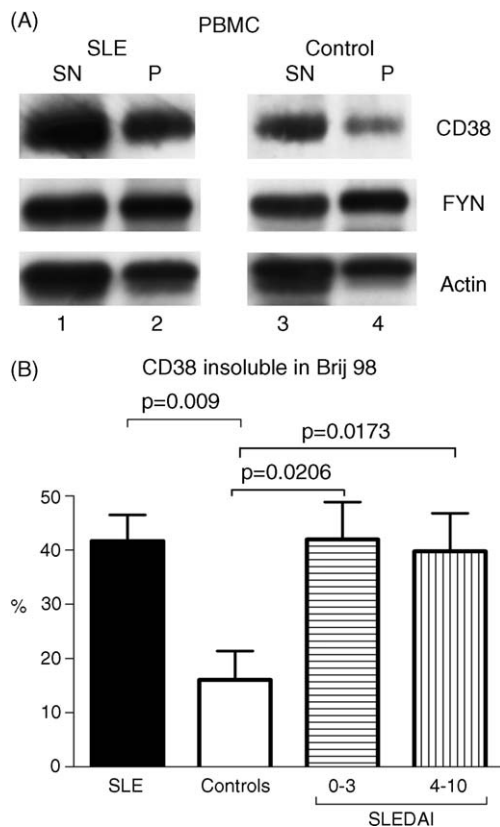


Fig. 1. A significant proportion of CD38 is insoluble in 1% Brij 98 in PBMC from SLE patients. (A) PBMC from SLE patients, or healthy controls were lysed in 1% Brij 98 at 37 °C as described in Section 2, and the detergent-insoluble fraction was separated from the soluble fraction by centrifugation at $13,000 \times g$. Supernatant (SN) and pellet (P) were diluted in $3 \times$ SDS non-reducing sample buffer and proteins were separated by 12% SDS-PAGE, transferred, and immunoblotted for the indicated proteins on the right of each panel. (B) bands intensities were quantified by densitometry, and the densitometric units on CD38 in pellet were presented as percentage of the sum of the densitometric units of supernatant + pellet. Values are the mean and S.E.M. The mean percentage of CD38 insoluble in Brij 98 was significantly increased in 29 SLE patients (black histograms) compared with nine healthy controls (open histograms). Likewise, SLE patients segregated according their SLEDAI scores as low (0–3) (horizontal stripped histograms, $n = 18$), or high (4–10) (vertical stripped histograms, $n = 11$), showed significantly increased percentages of CD38 insoluble in Brij 98 compared with controls (two-tailed unpaired *t*-test).

tistically significant higher proportion of CD38 in the Brij 98-insoluble fraction as compared with that in healthy controls ($P = 0.0173$ and 0.0206 , respectively, Fig. 1B). These results strongly suggested that in SLE PBMC a large fraction of CD38 was associated with the membrane raft vesicles recovered as Brij 98-insoluble complexes.

3.2. Increased association of CD38 with floating rafts in PBMC from SLE patients

Insolubility of a membrane protein in a detergent as Brij 98 can be due to its association with detergent-resistant lipid rafts and/or its anchoring to cytoskeletal elements (Munoz et al., 2003). Proteins associated with detergent-insoluble lipid

rafts float in a sucrose density gradient, while cytoskeleton-associated proteins remain at the bottom of the ultracentrifuge tube (Brown and Rose, 1992; London and Brown, 2000; Simons and Ikonen, 1997). Therefore, if CD38 is associated with Brij 98-insoluble lipid rafts, this CD38 should also float in a sucrose density gradient (Drevot et al., 2002; Munoz et al., 2003). To address this issue, rafts and non-raft fractions were isolated by sucrose gradient ultracentrifugation upon lysis of PBMC in Brij 98 at 37 °C (see Section 2, and (Munoz et al., 2003)). In floating rafts (referred to as R), five out of nine lupus patients studied showed percentages of CD38 above the upper 99% confidence interval (upper CI = 9.9%) of the mean values for six normal individuals (Fig. 2A, left panel 1 and 3). Application of the Fisher's exact test revealed a statistically significant difference (Fig. 2A, right panel, $13.7 \pm 4.6\%$ in SLE, $n = 9$ versus $3.6 \pm 1.6\%$ in controls, $n = 6$, $P = 0.0440$). In contrast, five out of nine patients studied showed percentages of CD38- ζ below the lower 95% confidence interval (lower CI = 4.2%) of the mean values for six normal healthy controls (Fig. 2A, left panel, lanes 1 and 3), although these differences were not statistically significant (Fig. 2B, left panel, $7.0 \pm 2.6\%$ in SLE, $n = 9$ versus $12.7 \pm 3.0\%$ in controls, $n = 6$, $P = 0.2867$, Fisher's exact test). Likewise, LAT that is constitutively associated with lipid rafts (Zhang et al., 1998), was always detected in floating rafts from both SLE patients and controls (Fig. 2A, left panel, lanes 1 and 3), and the minor differences observed between them were not statistically significant (Fig. 2B, right panel, $20.7 \pm 5.9\%$ in SLE, $n = 9$ versus $26.9 \pm 4.1\%$ in controls, $n = 6$). Therefore, these results demonstrate that SLE PBMC express an increased proportion of CD38 associated with floating lipid rafts, while similar proportions of CD38- ζ and LAT were present compared with that in PBMC from healthy controls.

3.3. Increased CD38 expression in SLE T cells and T cell subsets

Highly purified untouched T cells were obtained from PBMC by depletion of non-T cells by magnetic separation (see Section 2). T lymphocytes from eight patients with SLE and seven healthy controls were analyzed for expression of CD38 in CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD25⁺ cells. The proportion of CD38⁺ cells in the whole T cell population (CD3⁺), as well as in the three T cell subsets studied (CD4⁺, CD8⁺, and CD25⁺), was significantly increased in SLE patients as compared with that in healthy controls (Fig. 3). These increases seemed to be specific for T cells since neither the B or the NK cell compartments showed significant differences in CD38 expression between SLE patients and healthy controls when evaluated in PBMC by dual staining for CD38 and CD19 (B cells), or CD38 and CD56 (NK cells) (data not shown). No significant differences were observed in the proportion of CD3, CD19, or CD56 subsets within the PBMC population (data not shown). These results support the observation that the altered distribution and expression

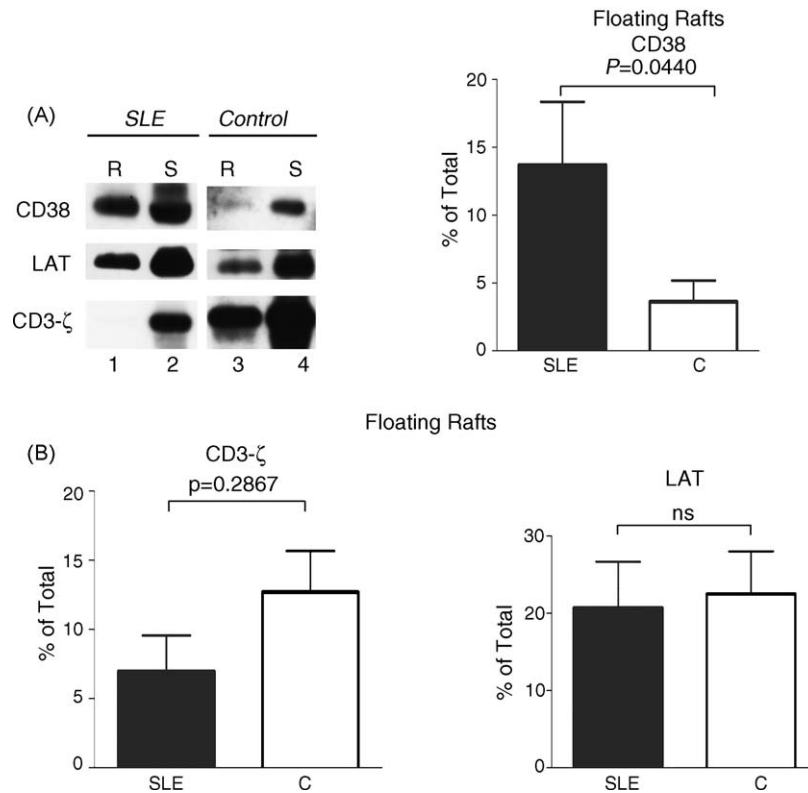


Fig. 2. Increased association of CD38 with floating rafts in PBMC from SLE patients. (A) *Left panel*, floating rafts (R) and soluble (S) fractions from one SLE (lanes 1 and 2) and one healthy control (lanes 3 and 4) PBMC were isolated as described in Section 2. Proteins were separated on SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and immunoblotted with anti-CD38, anti-LAT, or anti-CD3- ζ antibodies. *Right panel*, graph displaying cumulative results for CD38 expression in PBMC floating rafts from nine SLE patients (closed histograms), and five healthy controls (open histograms). Densitometric data on CD38 in floating rafts (R) are presented as percentage of the sum of all sucrose gradient fractions ($P=0.0440$, Fisher's exact text). (B) The mean percentages for CD3- ζ ($P=0.2867$, not significant, Fisher's exact text) and LAT expression (*left and right panels*, respectively) in PBMC floating rafts from SLE patients and healthy controls was calculated as in A.

of CD38 in PBMC from lupus patients are unique to SLE T cells.

3.4. CD38 is associated with floating rafts in ex vivo SLE T cells

3.4.1. Increased CD38 expression and insolubility in Brij 98 upon mitogenic stimulation

Next, we analyzed CD38 distribution in raft and non-raft compartments in untouched T cells in isolation. Floating rafts were isolated by sucrose gradient ultracentrifugation as described for PBMC. A representative experiment is shown in Fig. 4A (*upper panels*, lane 1 versus lane 3). CD38 was readily detected in the floating raft pool from SLE T cells in five out of eight SLE patients ($16.9 \pm 7.5\%$), whereas very little, if any, was detected in eight healthy control T cells ($0.0 \pm 0.0\%$). In contrast, the mean values for the percentages of CD3- ζ ($13.7 \pm 4.8\%$, in SLE versus $17.9 \pm 5.6\%$, in controls), and CD3- ϵ ($7.0 \pm 1.8\%$ in SLE versus $10.8 \pm 4.6\%$ in controls) in floating rafts were somewhat lower in SLE than in normal T cells, although the differences were not statistically significant (either by the Fisher's exact test, or unpaired *t*-test).

PHA acts as a potent and specific T cell activator by binding to cell membrane glycoproteins including the TCR/CD3 complex and the CD2 co-receptor, and exogenous IL-2 provides further T cell expansion (Kay, 1991). Moreover, stimulation of resting human T cells with PHA results in a significant increase in proportion of the plasma membrane that adopts a raft structure as judged by the dramatic increase on the cell surface expression of the raft-associated glycosphingolipid GM1 (Tuosto et al., 2001), which has previously been shown a reliable marker for detection of lipid raft domains (Janes et al., 1999). We next explored whether mitogenic stimulation could affect raft CD38 expression and distribution in SLE T cells compared with normal T cells. Thus, T cells were stimulated in vitro with PHA and IL-2 for 3 days (see Section 2) and then analyzed for CD38 expression by Western blotting of Brij 98-insoluble and -soluble fractions from whole cell extracts. Equal number of cell equivalents (0.5×10^6) were loaded in patients and control samples, and the proportion of CD38 present in the P fraction relative to the total amount of CD38, (SN + P) was calculated. As shown in Fig. 4B, there was a dramatic increase in the total amount of CD38 (SN + P) in PHA-stimulated T cells from both SLE patients (lanes 3 and 4) and healthy controls (lanes 7 and 8)

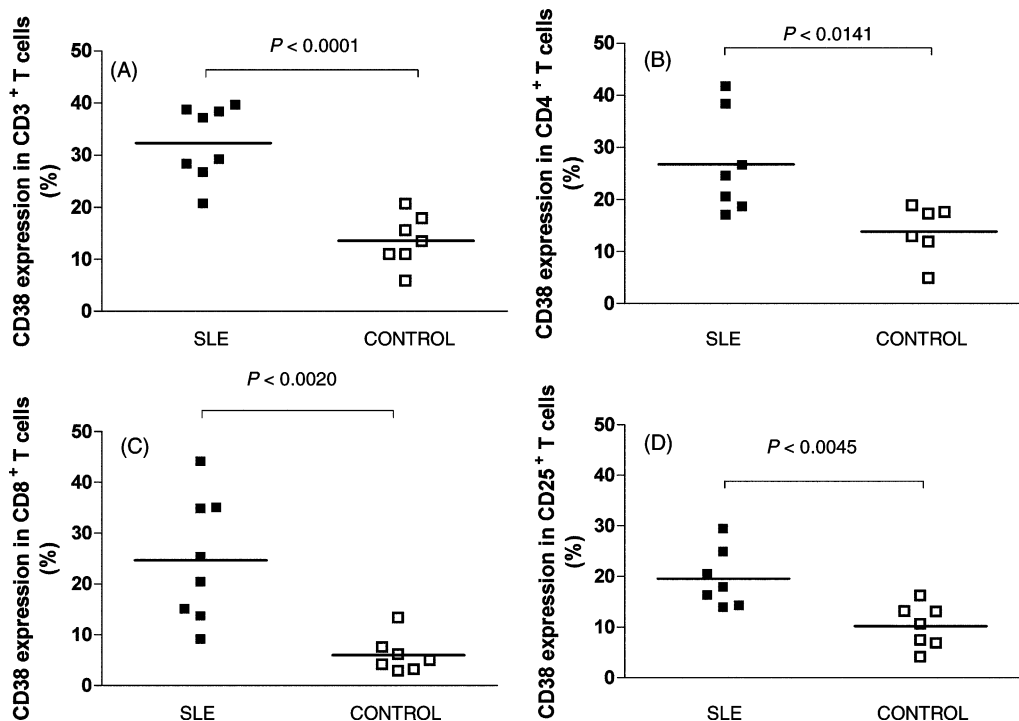


Fig. 3. Increased CD38 expression in SLE T cells and SLE T cell subsets. (A) Percentage of purified CD3⁺ T cells expressing CD38. (B) Percentage of CD4⁺ T cells expressing CD38. (C) Percentage of CD8⁺ T cells expressing CD38. (D) Percentage of CD25⁺ T cells expressing CD38. Scattered plots of percent of double positive cells are shown for SLE patients (filled squares), and healthy controls (open squares). Each symbol represents one patient or control, and the bar within each group represents the mean percentage value. The *P* values are indicated in each panel (two-tailed unpaired Student's *t*-test).

as compared with that in ex vivo untouched T cells (lanes 1, 2, 5, and 6). Moreover, in PHA-stimulated SLE and control T cells there was a significant shift of CD38 into the Brij 98-insoluble fraction (lanes 3 and 7) as compared with that in ex vivo cells (lanes 1 and 5). In contrast, the amount of Fyn, or actin and its distribution between soluble and insoluble fractions remained constant upon PHA stimulation, which was indicative of equal protein loading (Fig. 4B). Therefore, PHA stimulation induced quantitative and qualitative changes in the amount and distribution of CD38 between raft and non-raft fractions.

3.5. Increased lipid raft expression and altered CD4:CD8 ratio in ex vivo SLE T cells

3.5.1. Recapitulation in normal T cells upon mitogenic stimulation

Next, to visualize rafts on the cell surface, ex vivo and mitogen-stimulated T cells were analyzed for GM1 surface expression with fluorescent-labeled CTB and flow cytometry. CTB binds the raft-associated glycosphingolipid GM1, previously shown to be a reliable marker for detection of lipid raft domains (Janes et al., 1999). The analysis (Fig. 5A) revealed an increased proportion of ex vivo SLE T cells that bound CTB compared with that in normal T cells ($2.5 \pm 0.4\%$, $n = 18$, in SLE versus $0.9 \pm 0.1\%$, $n = 10$, in controls, $P = 0.0095$). PHA stimulation resulted in dramatic increases in the percentages of GM1⁺ cells in both SLE and

normal T cells (Fig. 5A). However, although the percentages of GM1⁺ SLE T cells were increased as compared with that in normal T cells, these differences were not statistically significant ($18.5 \pm 3.7\%$, $n = 6$, in SLE versus $13.0 \pm 2.4\%$, $n = 8$, in controls, $P = 0.2180$). Interestingly in PHA-stimulated T cells about 35–40% of the CD38⁺ cells were also GM1⁺ (Fig. 5B), which suggested the selective expansion of a subset that expressed both markers. Moreover, these data were indicative that in both SLE and normal T cells an increased proportion of the plasma membrane adopts a lipid raft structure upon mitogenic stimulation.

Ex vivo and PHA-stimulated T cells were analyzed for CD4:CD8 ratio by flow cytometry. Patients with SLE had a significantly reduced CD4:CD8 ratio compared with that of healthy controls (Fig. 5C, $P = 0.0022$), as described previously (Jury et al., 2004). This was due to a significant reduction in the number (%) of CD4⁺ T cells ($P < 0.0001$, Fig. 5D), and to a significant augmentation in the proportion of CD8⁺ T cells ($P = 0.0447$, Fig. 5E). Interestingly, in healthy controls PHA-stimulated T cells had a significantly reduced CD4:CD8 ratio compared with that of ex vivo T cells (Fig. 5C, $P = 0.0052$), which was caused by a significant reduction in the percentage of CD4⁺ T cells (Fig. 5D, $P = 0.0145$), and an increase in the percentage of CD8⁺ T cells (Fig. 5E, $P = 0.0156$). This altered phenotype paralleled the one obtained in untouched ex vivo SLE T cells. In contrast, in SLE patients, PHA-stimulation did not induce significant changes in the CD4:CD8 ratio, neither in the number

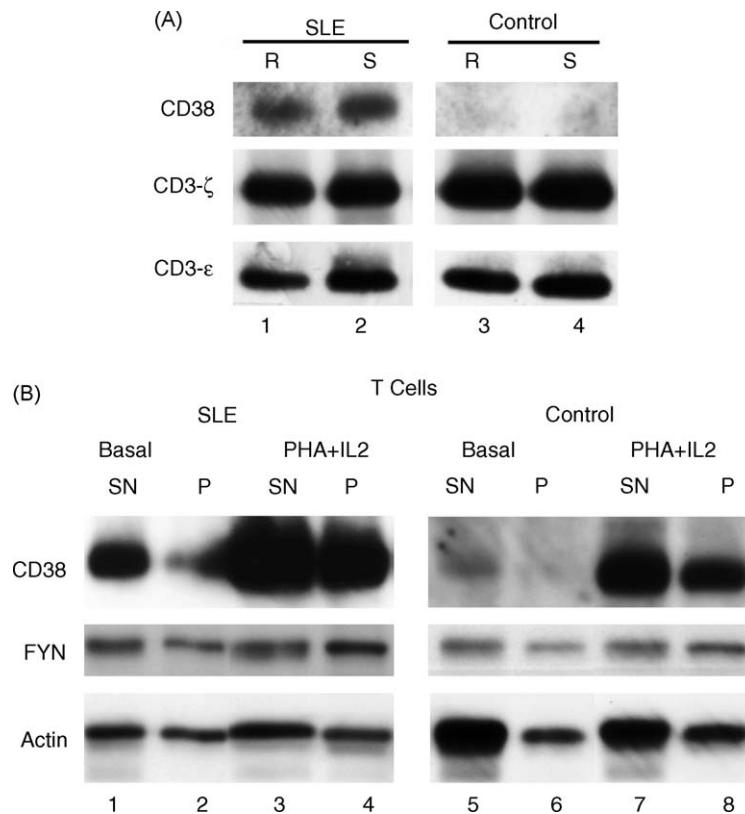


Fig. 4. (A) CD38 is associated with floating rafts in ex vivo SLE T cells. Floating rafts (R), and Soluble fractions (S) were prepared from untouched T cells purified by immunomagnetic depletion of non-T cells (see Section 2) from one SLE patients (lanes 1 and 2) and one healthy control (lanes 3 and 4) without any ex vivo stimulation. Proteins were separated on SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-CD38, anti-CD3-ζ, and anti-CD3-ε antibodies. This is a representative experiment out of eight experiments done in eight different SLE patients and eight healthy controls. Densitometric data on CD38, CD3-ζ, and CD3-ε in floating rafts (R) were calculated as in Fig. 2A (see Section 3 for specific numbers). (B) Increased CD38 expression and translocation into the Brij 98-insoluble fraction in T cells upon PHA stimulation. SN and P fractions were prepared as in Fig. 1A from: ex vivo untouched SLE T cells (lanes 1 and 2), ex vivo normal healthy control T cells (lanes 5 and 6), PHA + IL-2-stimulated SLE T cells (lanes 3 and 4), or PHA + IL-2-stimulated normal T cells (lanes 7 and 8). Proteins were separated by 12% SDS-PAGE, transferred, and analyzed by Western blotting with anti-CD38, anti-Fyn, and anti-α-actin antibodies. This is a representative experiment out of eight experiments done with cells from eight different SLE patients and eight healthy controls.

of CD4⁺, nor CD8⁺ T cells compared with that of ex vivo SLE T cells (Fig. 5C–E, respectively).

Taken together, these results on Figs. 4 and 5 indicate that ex vivo SLE T cells show an increased raft expression and altered phenotype, which can be recapitulated by PHA stimulation of normal T cells. PHA stimulation also induces increased CD38 expression, and active recruitment of CD38 to lipid rafts. This may be associated with an augmentation in the proportion of the plasma membrane adopting a lipid raft structure, as judged by the increased expression of GM1 on the cell surface, and the distinct expansion of the CD38⁺GM1⁺ T cells.

4. Discussion

In this study, we provide evidence of increased insolubility of CD38 in the non-ionic detergent Brij 98 at physiological temperatures in SLE PBMC as compared with normal PBMC, which correlated with an increased propor-

tion of CD38 in floating rafts in both SLE PBMC and T cells. Consistent with previous reports (Alcocer-Varela et al., 1991; al-Janadi and Raziuddin, 1993), the percentage of CD3⁺ T cells that express CD38 is significantly higher in SLE patients than in healthy controls. Moreover, we have found a significant increased percentage of CD8⁺CD38⁺, CD4⁺CD38⁺, and CD25⁺CD38⁺ T cells in patients with SLE in comparison to normal controls. CD8⁺CD38⁺ T cells are increased in advanced viral infections (Belles-Isles et al., 1998), and CD8⁺CD38⁺ lymphocyte percent is a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients (Mocroft et al., 1997). In this regard, PHA-stimulation of normal T cells results in reduced CD4:CD8 ratio and increased CD38 expression, which paralleled the altered phenotype of ex vivo SLE T cells. The contribution of the increased CD8⁺CD38⁺ T cells to the pathology of the SLE disease remains unclear (Erkeller-Yuksel et al., 1997), but together with increased CD4⁺CD38⁺ and CD25⁺CD38⁺ T cells could be indicative of persistent T cell activation.

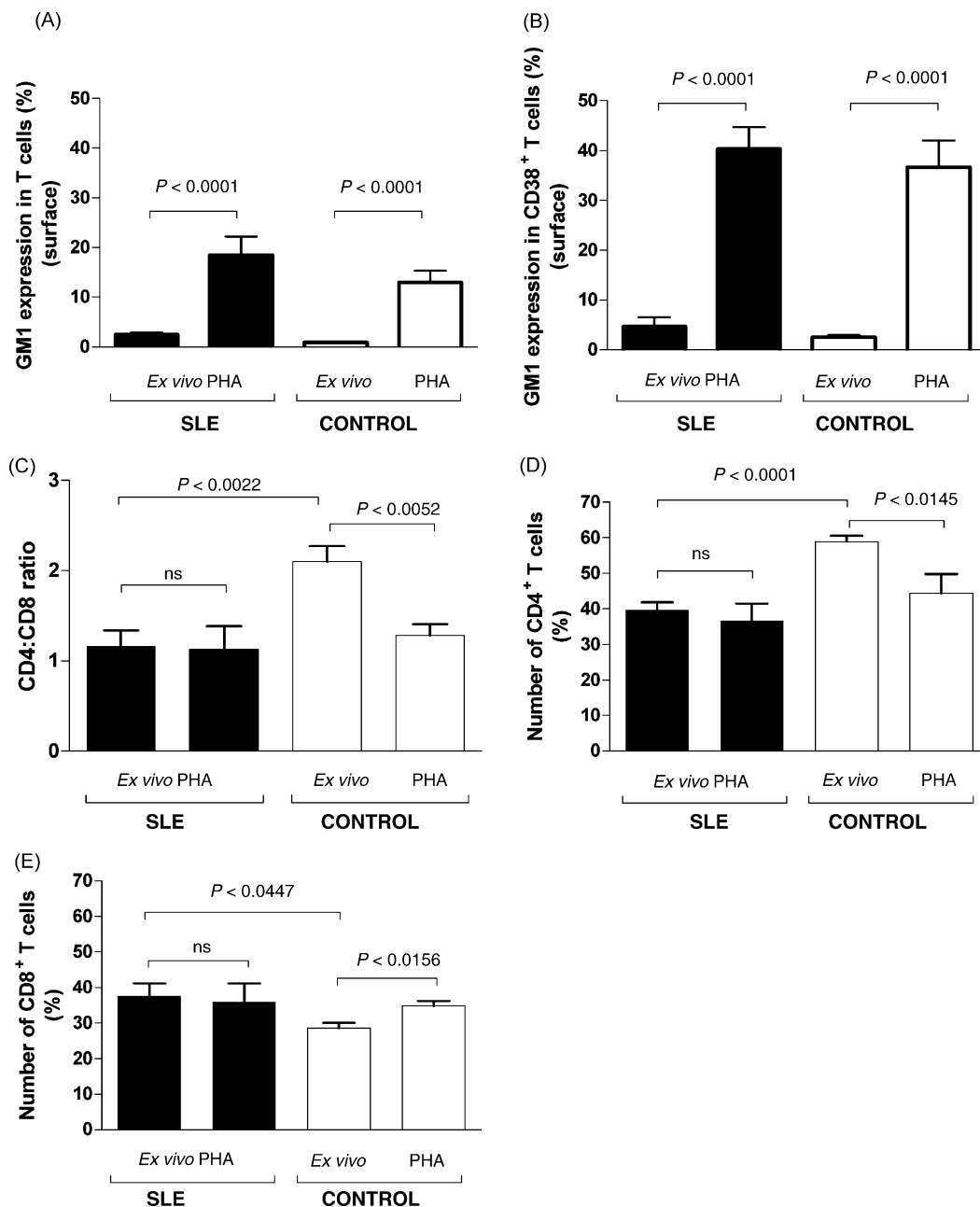


Fig. 5. Increased lipid raft expression and altered phenotype in ex vivo SLE T cells. Effect of PHA stimulation. Number (%) of CD3⁺ cells (panel A), or CD38⁺ cells (panel B) expressing GM1 on the cell surface in ex vivo or PHA-stimulated T cells from 18 SLE patients (black histograms) and 10 healthy controls (open histograms). The relative proportions of T cells expressing CD4 or CD8 (panel C) were expressed as a ratio (CD4:CD8) on ex vivo or PHA-stimulated T cells from eight SLE patients (black histograms) or from seven healthy controls (open histograms). The number (%) of CD4⁺ (panel D), or CD8⁺ (panel E) T cells. All results are expressed as mean + S.E.M. The *P* values are indicated in each panel (two-tailed unpaired Student's *t*-test).

CD38 function in T cells is mediated by cell-surface association with the TCR/CD3 complex (Morra et al., 1998; Zubiatur et al., 1997, 1999), and the localization of CD38 to lipid raft domains is essential for CD38-mediated signaling in CD38-transfected murine T cell lines (Zubiatur et al., 2002), or in Jurkat T cells, which constitutively express CD38 (Munoz et al., 2003). In these T cell lines, CD38 appears to localize to the rafts without the need for ligation (Munoz et al., 2003; Zubiatur et al., 2002). Therefore, it was to some

extent surprising that in normal resting T cells CD38 was detected exclusively in soluble fractions. The mechanism by which CD38 in T cells is included or excluded from rafts is not known, but it may be related rather with the significant differences in the lipid raft composition and dynamics between resting and activated/effector T cells, and not with the level of expression of CD38. Thus, the organization of GM1-lipid rafts on the T cell membrane appears developmentally regulated (Hare et al., 2003). Interestingly, in rest-

ing human T cells from peripheral blood Lck and the raft glycosphingolipid GM1 reside in intracellular membranes, while in activated/effector T cells the amount of these markers at the plasma membrane increases significantly (Tuosto et al., 2001). These dramatic increases in GM1 cell surface expression can be recapitulated *in vitro* by a number of different stimuli including PHA (Tuosto et al., 2001), TCR/CD3 cross-linking with a soluble CD3 ligand (Thomas et al., 2003b), or with anti-CD3/CD28 beads (Slaughter et al., 2003; Tuosto et al., 2001). Likewise, murine and human T cell lines, which have an effector phenotype, express high levels of GM1 on the cell surface, and CD38 is readily detected in lipid rafts (Zubiaur et al., 2002; Munoz et al., 2003). Our present findings are significant in this regard, as the dramatic changes in the distribution of CD38 into Brij 98-insoluble and -soluble fractions upon mitogenic stimulation of normal T cells (Fig. 4B) correlated with increased GM1 expression on the cell surface (Fig. 5A), and a distinct expansion of GM1⁺CD38⁺ T cells (Fig. 5B). Likewise, in untouched SLE T cells a significant proportion of CD38 is associated with lipid rafts, which again correlates with increased basal expression of GM1 on the cell surface (Fig. 5A). Note that we have just measured the GM1 pool that is on the cell surface, which is only a fraction of the total GM1 pool (surface + intracellular). Increased basal expression of total GM1 has been reported previously in SLE T cells compared with normal T cells (Jury et al., 2004; Krishnan et al., 2004). Therefore, SLE T cells possess more extensive basal levels of lipid rafts than normal T cells, which may be indicative of their “activated” phenotype that could result from the exposure of SLE T cells to the abnormal frequency of differentiated dendritic cells found in these patients (Blanco et al., 2001).

Increased lipid raft expression on the plasma membrane may constitute a means by which effector T cells acquire an improved signaling machinery (Tuosto et al., 2001). In contrast, displacement of the CD4:Lck signalosome from the lipid rafts by a soluble, dimeric peptide-MHC Class II chimera induces Ag-specific T cell anergy (Thomas et al., 2003a), suggesting that the defective partitioning of signaling molecules in lipid rafts is an early, negative signaling event in T cells. The study of raft protein composition in the Jurkat T cell line have revealed that CD38, Lck and CD3- ζ reside in a subset of lipid rafts separately from LAT and other key signaling molecules (Munoz et al., 2003), which is compatible with other studies showing that in resting T cells Lck and LAT are located in different raft subsets (Drevot et al., 2002; Schade and Levine, 2002; Slaughter et al., 2003). After cellular activation, these rafts coalesce, leading to Lck and LAT colocalization in the same raft population (Drevot et al., 2002; Schade and Levine, 2002; Slaughter et al., 2003). CD38 residency in a subset of lipid rafts together with Lck and CD3- ζ provides a structural basis for initiating CD38-mediated signaling in this compartment, where fully phosphorylation of CD3- ζ , CD3- ϵ , Lck and LAT occurs, as well as the translocation of key signaling molecules as Sos and p85-phosphatidylinositol 3-kinase into rafts (Munoz et al., 2003).

The low number of cells used in this study precluded the analysis of the protein composition of CD38-containing rafts in either resting or activated SLE T cells but it is likely that the anomalous expression or changes in membrane location of signaling molecules as CD3- ζ , or Lck found in these patients (Jury et al., 2003; Krishnan et al., 2004) may lead to anomalous lipid raft-mediated signaling. It has been shown that ligand-mediated cross-linking of GM1 moieties in lipid rafts facilitates an exchange of proteins including the redistribution of the TCR and adhesion molecules in T cells (Mitchell et al., 2002). We speculate that the increased expression of CD38 in floating rafts from SLE T cells, or from activated T cells may modulate TCR signaling by providing or sequestering signaling molecules to the engaged TCR. This aspect will require further study and may help in searching for new molecular mechanisms of positive or negative regulation in T cells.

Acknowledgments

Dr. Sancho's work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (former Ministerio de Ciencia y Tecnología) grant SAF2002-00721. Dr. Zubiaur's work was supported by Instituto Carlos III-FIS, Ministerio de Sanidad y Consumo, grant FIS03/0389, by a “Ramón y Cajal” contract from the Ministerio de Educación y Ciencia, and by a Grant 209/02 from the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Esther J. Pavón was supported by a fellowship from grant SAF2002-00721. Pilar Muñoz was supported by a fellowship FPI (Formación de Personal Investigador) from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. María del Carmen Navarro was supported by a contract I3P from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

References

- Alcocer-Varela, J., Alarcon-Riquelme, M., Laffon, A., Sanchez-Madrid, F., Alarcon-Segovia, D., 1991. Activation markers on peripheral blood T cells from patients with active or inactive systemic lupus erythematosus. Correlation with proliferative responses and production of IL-2. *J. Autoimmun.* 4, 935–945.
- al-Janadi, M., Raziuddin, S., 1993. B cell hyperactivity is a function of T cell derived cytokines in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 20, 1885–1891.
- Belles-Isles, M., Houde, I., Lachance, J.G., Noel, R., Kingma, I., Roy, R., 1998. Monitoring of cytomegalovirus infections by the CD8⁺CD38⁺ T-cell subset in kidney transplant recipients. *Transplantation* 65, 279–282.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Gill, M., Pascual, V., Banchereau, J., 2001. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294, 1540–1543.
- Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D., Chang, C.H., 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 35, 630–640.
- Brown, D.A., London, E., 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 17221–17224.

- Brown, D.A., Rose, J.K., 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533–544.
- Carbone, J., Gil, J., Benito, J.M., Navarro, J., Munoz-Fernandez, A., Bartolome, J., Zabay, J.M., Lopez, F., Fernandez-Cruz, E., 2000. Increased levels of activated subsets of CD4 T cells add to the prognostic value of low CD4 T cell counts in a cohort of HIV-infected drug users. *AIDS* 14, 2823–2829.
- Deaglio, S., Mehta, K., Malavasi, F., 2001. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk. Res.* 25, 1–12.
- Drevot, P., Langlet, C., Guo, X.J., Bernard, A.M., Colard, O., Chauvin, J.P., Lasserre, R., He, H.T., 2002. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *Embo. J.* 21, 1899–1908.
- Erkeller-Yuksel, F.M., Lydyard, P.M., Isenberg, D.A., 1997. Lack of NK cells in lupus patients with renal involvement. *Lupus* 6, 708–712.
- Gonzalez-Escribano, M.F., Aguilar, F., Torres, B., Sanchez-Roman, J., Nunez-Roldan, A., 2004. CD38 polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Hum. Immunol.* 65, 660–664.
- Grammer, A.C., Lipsky, P.E., 2003. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 5 (Suppl. 4), S22–S27.
- Gray-McGuire, C., Moser, K.L., Gaffney, P.M., Kelly, J., Yu, H., Olson, J.M., Jedrey, C.M., Jacobs, K.B., Kimberly, R.P., Neas, B.R., Rich, S.S., Behrens, T.W., Harley, J.B., 2000. Genome scan of human systemic lupus erythematosus by regression modeling: evidence of linkage and epistasis at 4p16-15.2. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1460–1469.
- Gringhuis, S.I., Leow, A., Papendrecht-Van Der Voort, E.A., Remans, P.H., Breedveld, F.C., Verweij, C.L., 2000. Displacement of linker for activation of T cells from the plasma membrane due to redox balance alterations results in hyporesponsiveness of synovial fluid T lymphocytes in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 164, 2170–2179.
- Hare, K.J., Pongracz, J., Jenkinson, E.J., Anderson, G., 2003. Modeling TCR signaling complex formation in positive selection. *J. Immunol.* 171, 2825–2831.
- Janes, P.W., Ley, S.C., Magee, A.I., 1999. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147, 447–461.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2001. *Immunobiology*. Garland Publishing, New York.
- Jury, E.C., Kabouridis, P.S., Abba, A., Mageed, R.A., Isenberg, D.A., 2003. Increased ubiquitination and reduced expression of LCK in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48, 1343–1354.
- Jury, E.C., Kabouridis, P.S., Flores-Borja, F., Mageed, R.A., Isenberg, D.A., 2004. Altered lipid raft-associated signaling and ganglioside expression in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 113, 1176–1187.
- Kammer, G.M., Perl, A., Richardson, B.C., Tsokos, G.C., 2002. Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 46, 1139–1154.
- Kay, J.E., 1991. Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunol. Lett.* 29, 51–54.
- Kong, P.L., Odegard, J.M., Bouzazah, F., Choi, J.Y., Eardley, L.D., Zielinski, C.E., Craft, J.E., 2003. Intrinsic T cell defects in systemic autoimmunity. *Ann. NY Acad. Sci.* 987, 60–67.
- Krishnan, S., Nambiar, M.P., Warke, V.G., Fisher, C.U., Mitchell, J., Delaney, N., Tsokos, G.C., 2004. Alterations in lipid raft composition and dynamics contribute to abnormal T cell responses in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 172, 7821–7831.
- Lin, P., Medeiros, L.J., Wilder, R.B., Abruzzo, L.V., Manning, J.T., Jones, D., 2004. The activation profile of tumour-associated reactive T-cells differs in the nodular and diffuse patterns of lymphocyte predominant Hodgkin's disease. *Histopathology* 44, 561–569.
- Lindqvist, A.K., Alarcon-Riquelme, M.E., 1999. The genetics of systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* 50, 562–571.
- London, E., Brown, D.A., 2000. Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 182–195.
- Lynne, J.E., Schmid, I., Matud, J.L., Hirji, K., Buessow, S., Shlian, D.M., Giorgi, J.V., 1998. Major expansions of select CD8⁺ subsets in acute Epstein-Barr virus infection: comparison with chronic human immunodeficiency virus disease. *J. Infect. Dis.* 177, 1083–1087.
- Manes, S., del Real, G., Martinez, A.C., 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 557–568.
- Mitchell, J.S., Kanca, O., McIntyre, B.W., 2002. Lipid microdomain clustering induces a redistribution of antigen recognition and adhesion molecules on human T lymphocytes. *J. Immunol.* 168, 2737–2744.
- Mocroft, A., Bofill, M., Lipman, M., Medina, E., Borthwick, N., Timms, A., Batista, L., Winter, M., Sabin, C.A., Johnson, M., Lee, C.A., Phillips, A., Janossy, G., 1997. CD8⁺, CD38⁺ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J. Acq. Immun. Def. Synd. Hum. Retrovirol.* 14, 158–162.
- Morra, M., Zubiaur, M., Terhorst, C., Sancho, J., Malavasi, F., 1998. CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells. *Faseb. J.* 12, 581–592.
- Munoz, P., Navarro, M.D., Pavon, E.J., Salmeron, J., Malavasi, F., Sancho, J., Zubiaur, M., 2003. CD38 signaling in T cells is initiated within a subset of membrane rafts containing Lck and the CD3-zeta subunit of the T cell antigen receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 50791–50802.
- Ortolan, E., Vacca, P., Capobianco, A., Armando, E., Crivellin, F., Horenstein, A., Malavasi, F., 2002. CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality. *Cell Biochem. Funct.* 20, 309–322.
- Ramzaoui, S., Jouen-Beades, F., Michot, F., Borsa-Lebas, F., Humbert, G., Tron, F., 1995. Comparison of activation marker and TCR V beta gene product expression by CD4⁺ and CD8⁺ T cells in peripheral blood and lymph nodes from HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 99, 182–188.
- Rozzo, S.J., Allard, J.D., Choubey, D., Vyse, T.J., Izui, S., Peltz, G., Kotzin, B.L., 2001. Evidence for an interferon-inducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 15, 435–443.
- Salojin, K.V., Zhang, J., Madrenas, J., Delovitch, T.L., 1998. T-cell anergy and altered T-cell receptor signaling: effects on autoimmune disease. *Immunol. Today* 19, 468–473.
- Schade, A.E., Levine, A.D., 2002. Lipid raft heterogeneity in human peripheral blood T lymphoblasts: a mechanism for regulating the initiation of TCR signal transduction. *J. Immunol.* 168, 2233–2239.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., Simons, K., 2003. Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5795–5800.
- Simons, K., Ehehalt, R., 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597–603.
- Simons, K., Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.
- Simons, K., Toomre, D., 2000. Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39.
- Slaughter, N., Laux, I., Tu, X., Whitelegge, J., Zhu, X., Effros, R., Bickel, P., Nel, A., 2003. The flotillins are integral membrane proteins in lipid rafts that contain TCR-associated signaling components: implications for T-cell activation. *Clin. Immunol.* 108, 138–151.
- Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., Winchester, R.J., 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25, 1271–1277.
- Thomas, S., Kumar, R., Preda-Pais, A., Casares, S., Brumeanu, T.D., 2003a. A model for antigen-specific T-cell anergy: displacement of CD4-p56(lck) signalosome from the lipid rafts by a soluble, dimeric peptide-MHC class II chimera. *J. Immunol.* 170, 5981–5992.
- Thomas, S., Kumar, R.S., Casares, S., Brumeanu, T.D., 2003b. Sensitive detection of GM1 lipid rafts and TCR partitioning in the T cell membrane. *J. Immunol. Meth.* 275, 161–168.
- Tuosto, L., Parolini, I., Schroder, S., Sargiacomo, M., Lanzavecchia, A., Viola, A., 2001. Organization of plasma membrane functional rafts upon T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 31, 345–349.

- Wakeland, E.K., Liu, K., Graham, R.R., Behrens, T.W., 2001. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 15, 397–408.
- Zhang, W., Tribble, R.P., Samelson, L.E., 1998. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239–246.
- Zubiaur, M., Fernandez, O., Ferrero, E., Salmeron, J., Malissen, B., Malavasi, F., Sancho, J., 2002. CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/protein kinase B and Erk activation in the absence of the CD3-zeta immune receptor tyrosine-based activation motifs. *J. Biol. Chem.* 277, 13–22.
- Zubiaur, M., Guirado, M., Terhorst, C., Malavasi, F., Sancho, J., 1999. The CD3-gamma delta epsilon transducing module mediates CD38-induced protein-tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 274, 20633–20642.
- Zubiaur, M., Izquierdo, M., Terhorst, C., Malavasi, F., Sancho, J., 1997. CD38 ligation results in activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase and the CD3- ζ/ζ -associated protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes. *J. Immunol.* 159, 193–205.

RESEARCH ARTICLE

Proteomic analysis of plasma from patients with systemic lupus erythematosus: Increased presence of haptoglobin α 2 polypeptide chains over the α 1 isoforms

Esther J. Pavón¹, Pilar Muñoz¹, Antonio Lario², Victoria Longobardo², Montserrat Carrascal³, Joaquín Abián³, Ana B. Martín¹, Salvador A. Arias¹, José-Luis Callejas-Rubio⁴, Ricardo Sola⁵, Francisco Navarro-Pelayo⁴, Enrique Raya-Alvarez⁶, Norberto Ortego-Centeno⁴, Mercedes Zubiaur¹ and Jaime Sancho¹

¹ Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Armilla, Spain

² Servicio de Proteómica y Genómica, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Armilla, Spain

³ Unidad de Espectrometría de Masas Estructural y Biológica, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain

⁴ Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain

⁵ Servicio de Hematología, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain

⁶ Servicio de Reumatología, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain

In the present study plasma samples from 15 systemic lupus erythematosus (SLE) patients and 16 healthy controls of initially unknown haptoglobin (Hp) phenotype were separated by 2-DE, and tryptic digests of the excised Hp α polypeptide chain spots were analyzed by MALDI-TOF-MS. Selected tryptic peptides were sequenced by nano-(n)ESI-IT MS/MS. The six major Hp phenotypes were present, although with distinct frequencies in controls and SLE patients. Thus, there were an increased proportion of SLE patients with Hp 2–2, or Hp 2–1S phenotypes. The Hp phenotype distribution resulted in allele frequencies of 0.625 (Hp^2), 0.281 (Hp^{1S}), and 0.093 (Hp^{1F}) in healthy controls, correlating fairly well with the allele frequencies of European populations. In contrast, the Hp allele frequencies of the SLE patients were 0.733 (Hp^2), 0.233 (Hp^{1S}), and 0.033 (Hp^{1F}), which clearly indicated an increased frequency of Hp^2 , a similar proportion of Hp^{1S} and a diminished proportion of Hp^{1F} in SLE patients compared with that in healthy controls. Preferential Hp α 2 expression in SLE patients may contribute to some of the clinical manifestations of the disease such as hypergammaglobulinemia, systemic vasculitis, and cardiovascular disorders.

Received: June 1, 2005

Revised: November 11, 2005

Accepted: November 14, 2005

Keywords:

Autoimmune disease / Differential protein expression / Haptoglobin / MALDI-TOF MS / Serum biomarkers

Correspondence: Dr. Jaime Sancho, Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

E-mail: granada@ipb.csic.es

Fax: +34-958-181-632

Abbreviations: aa, amino acid; Hp, haptoglobin; SLE, systemic lupus erythematosus; SLEDAI, SLE disease activity index

1 Introduction

Haptoglobin (Hp) consists of two different polypeptide chains, the α and β chain. The β chain (40 kDa) is heavier than the α chain and is identical in all Hp types. The Hp α gene, located on chromosome 16q22, consists of three structural alleles: Hp^{1F} , Hp^{1S} , and Hp^2 [1]. The gene products of the Hp^{1F} and Hp^{1S} alleles, the α 1F and α 1S chains, are of the

equal length but differ in the number of charged residues. The $\alpha 1F$ chain carries aspartic acid and lysine residues at positions 52 and 53, whereas at these positions asparagine and glutamic acid residues are located in the $\alpha 1S$ chain. All other amino acids (aa) are identical in both $Hp\alpha 1$ proteins. The Hp^2 allele originates from fusion of the Hp^{1F} and Hp^{1S} alleles, presumably by a non-homologous crossing-over between the structural alleles during meiosis [2]. Therefore, this allele codes for a polypeptide chain, $Hp\alpha 2$, that is almost twice as much longer as the $\alpha 1$ chains. The three alleles are responsible for six Hp phenotypes: 1F-1F, 1S-1S, 1F-1S, 2-1F, 2-1S, and 2-2 [2, 3]. However, due to the sequence similarity of the $\alpha 1S$ and $\alpha 1F$ chains, often only the three major phenotypes Hp 1-1, Hp 2-2, and Hp 2-1 are described in the literature [1, 4]. The Hp 1-1 phenotype express only $\alpha 1$ variants (~9 kDa), while the $\alpha 2$ chains (16 kDa) are present in both Hp 2-2 and Hp 2-1 phenotypes. The $Hp\alpha$ chains form varying spot patterns in 2-DE gels, which can only be fully identified by MS, and MS/MS analysis [2, 3].

Hp, one of the acute phase proteins induced in response to infection, tissue injury, and malignancy, was originally described as functioning by the absorption of free hemoglobin and thus preventing kidney damage [1]. However, it has subsequently become apparent that the physiological role of Hp is not restricted to the trapping of free hemoglobin. Bacteriostatic and angiogenic effects and antibody-like and antioxidative properties have also been suggested [1, 4]. Hp inhibits lectin-induced lymphocyte transformation [1] and may selectively bind to CD22, a B cell-specific lectin that mediates the interactions of mature B cells with erythrocytes, lymphocytes, monocytes, neutrophils, and endothelial cells [5]. Hp binds to human peripheral blood neutrophils via a specific membrane receptor [6]. Adding Hp to culture medium together with stimulatory agents such as formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), arachidonic acid, and opsonized zymosan, specifically inhibits the neutrophil respiratory burst activity [6]. These cell interactions are likely to be affected by changing levels of Hp.

The Hp1-1 phenotype is associated with a higher binding and antioxidant capacity compared with the Hp 2-2, or Hp 2-1 phenotypes. In contrast, the Hp 2-2 phenotype is associated with a higher immune reactivity and ability to form antibodies. Moreover, the possession of a particular phenotype has been associated with the prevalence and clinical evolution of many inflammatory diseases including infections as tuberculosis, vaccination, viral hepatitis, atherosclerosis, cardiovascular and autoimmune diseases [1, 3-5, 7]. However, the association of the two allelic $\alpha 1S$ and $\alpha 1F$ variants or $\alpha 2$ and $\alpha 1$ PTM that lead to structurally distinct protein species with different clinical conditions has not been studied.

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by a waxing and waning course and the involvement of multiple organs, including skin, kidneys, and CNS [8]. SLE patients display multiple abnormalities in T cell antigen-mediated signaling that lead

to B cell hyper-responsiveness, increased apoptosis, skewed cytokine production, and breakdown of immunological tolerance (reviewed in [9], and [10]). Although SLE etiopathology is poorly understood, there is likely a role for environmental triggers, for instance viruses, acting in the context of susceptibility genes [11, 12]. A significant increase of the haptoglobin type 2-2 and a concomitant decrease in the percentage of the 2-1 phenotype has been found in SLE patients [13]. Since the method used to determine the Hp phenotypes did not allow distinguishing between the two $\alpha 1$ isoforms, and even less, to detect PTM [13], the contribution of either $\alpha 1F$, or $\alpha 1S$ and derivatives to these abnormalities is lacking. In this study, SLE patients show increased presence of the Hp 2-2 and Hp 2-1S phenotypes, and decreased Hp 2-1F phenotype. This results in both, increased frequency of the Hp^2 allele and diminished frequency of the Hp^{1F} allele.

2 Materials and methods

2.1 Patients and healthy controls

Fifteen outpatients fulfilling the revised American College of Rheumatology (ACR) criteria for the diagnosis of SLE [14], and routinely followed in the Systemic Autoimmune Diseases Unit (Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain) participated in this study. Sixteen healthy, age-matched volunteers served as controls. Disease activity was scored and the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) was calculated [15]. All subjects participating in the study were Caucasians. Complete blood cell count, serum complement and serum anti-nuclear and anti-DNA antibodies were measured in all patients. The study protocol was approved by the Hospital Clínico San Cecilio, and CSIC Review Board and Ethics Committees. Written informed consent was obtained from all participating patients and volunteers according to the Declaration of Helsinki.

2.2 Plasma sample collection

Blood was collected by the BD Vacutainer system into K₂-EDTA tubes (BD Diagnostics, NJ) and plasma was separated from cells by density gradient centrifugation over HISTO-PAQUE[®]-1077 (Sigma-Aldrich Química, Spain). The supernatant was collected, checked for the absence of cells by light microscopy, and fractionated in aliquots that were stored at -80°C.

2.3 Albumin and IgG depletion

Plasma samples were albumin and IgG depleted by using the Aurum[™] Serum Protein kit (Bio-Rad, Hercules, CA) following the manufacturer's instructions. Briefly, 60 μ L of plasma was mixed with 180 μ L of binding-buffer and the solution was deposited onto the column, mixed with the sorbent and allowed to stand for 5 min. This mixing step was

repeated twice and the protein extract was eluted by centrifugation at $10\,000 \times g$ (20 s). The column was washed with 200 μL of binding buffer followed by a second centrifugation at the same speed. The two eluates were mixed and stored for analysis. Protein concentration was determined in each sample by using the Protein Assay kit (Bio-Rad).

2.4 2-DE

2-DE was carried out using the Protean IEF cell and Criterion electrophoresis cell systems (Bio-Rad). Plasma samples depleted of albumin and IgG were diluted in 185 μL of rehydration/sample buffer containing 8 M urea, 2% w/v CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% Biolyte[®] 3/10 ampholytes, and Bromophenol Blue (trace) (Bio-Rad). First-dimension IPG strips (Bio-Rad: 11 cm, linear pH 4–7 gradient) were loaded with the solubilized samples through passive in-gel rehydration 12–18 h at 20°C. The 11-cm IPG strips were focused in a one-step procedure, at 8000 V for 30 000 Vh at 20°C with a current limit of 50 μA . Prior to the second-dimension separation, the focused strips were equilibrated for 10 min in Equilibration Buffer I (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glycerol, and 2% w/v DTT) followed by another 10 min in Equilibration Buffer II (Equilibration Buffer I with 2.5% w/v iodoacetamide instead of DTT). The equilibrated IPG strips were positioned on Criterion XT Precast Gels (4–12% gradient in XT MES buffer) and the separation was performed at 150 V at room temperature. The gels were fixed for 30 min in 10% methanol, 7% acetic acid and stained overnight with SYPRO Ruby fluorescent stain (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. The stained gels were scanned with a Typhoon 9400 system (Amersham Biosciences). Then gels were washed with double-distilled H₂O and stained for 60 min with Bio-Safe stain (Bio-Rad) and scanned using a GS-800 Calibrated densitometer (Bio-Rad). Digitalized gel images were analyzed with the PDQuest software version 7.2 (Bio-Rad).

2.5 In-gel digestion of proteins

Gel pieces containing the proteins of interest were manually excised and subjected to in-gel digestion using a 96-well ZipPlate kit for sample preparation (Millipore Ibérica SA Madrid, Spain). Proteins were reduced, alkylated, and digested with sequence grade trypsin (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's protocol. Peptides were eluted by the centrifugation using 5–10 μL of 60% v/v ACN/0.1% v/v TFA.

2.6 Protein identification by MS

2.6.1 Protein identification methods

Proteins were identified either by PMF by MALDI-TOF MS or by peptide sequencing using nano(n)ESI-IT MS/MS.

2.6.2 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS analysis of the tryptic digest was performed using a Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Barcelona, Spain) instrument in the reflectron mode. Spectra were externally mass calibrated using a standard peptide mixture. For the analysis, 0.5 μL of the peptide extract and 0.5 μL of matrix (CHCA, 3 mg/mL) were loaded in the MALDI plate and were let to dry.

2.6.3 nESI-IT MS/MS

Selected peptides from the tryptic digest were sequenced on a Finnigan LCQ IT mass spectrometer (ThermoQuest, Finnigan MAT, San Jose, CA) equipped with a nanospray source (Protana, Odense, Denmark). The spray voltage applied was 0.85 kV and the capillary temperature was 110°C. For MS/MS experiments, the isolation window was three mass units wide and the relative collision energy was 30%. Samples were desalted prior to the analysis with C18 ZipTip pipette tips (Millipore, MA) following standard procedures.

2.6.4 Database search

MASCOT (Matrix Science, London, UK) and the Protein Prospector v 3.4.1 (UCSF Mass Spectrometry Facility, University of California) were used for protein identification from the PMF or peptide fragment-ion data obtained from MALDI-TOF-MS and MS/MS analysis, respectively. The Swiss-Prot (European Bioinformatics Institute, Heidelberg, Germany, Update 02/20/02), MSDB, and NCBIInr databases were used for the search.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis of Hp plasma levels was performed using the non-parametric two-tailed Mann-Whitney test (GraphPad Software, Version 4.02, San Diego, CA). Statistical significance was set at $p < 0.05$. To evaluate whether the gene frequencies fulfilled the Hardy-Weinberg equilibrium, a chi-square test was used to compare the observed number of subjects with the expected number.

3 Results

3.1 2-DE analysis of control and SLE plasma samples

The protein profile of plasma samples from 16 controls and 15 SLE patients of unknown Hp phenotype were examined by 2-DE. Very few proteins from plasma were observed in 2-D gels to migrate below pH 4. Above pH 7, gels were dominated by light and heavy chain immunoglobulin proteins (data not shown). Moreover, removal of albumin and IgG from plasmas allowed a higher sample load and

improved the visualization of less abundant proteins (data not shown). Therefore, for proteome analyses of the albumin- and Ig-removed plasmas, proteins were separated in IPG strips ranging from pH 4 to 7. At first glance, the protein patterns visualized by Bio-Safe Coomassie-stained gels from healthy controls and SLE patients resemble each other closely (Fig. 1). However, upon closer examination, significant differences between the protein compositions in healthy controls and SLE patients became evident. The differences found in the low-molecular mass region boxed in Fig. 1 will be described in detail below. Since several spots were difficult to visualize by Coomassie staining, the differential protein analyses that follow were performed from SYPRO Ruby-stained gels.

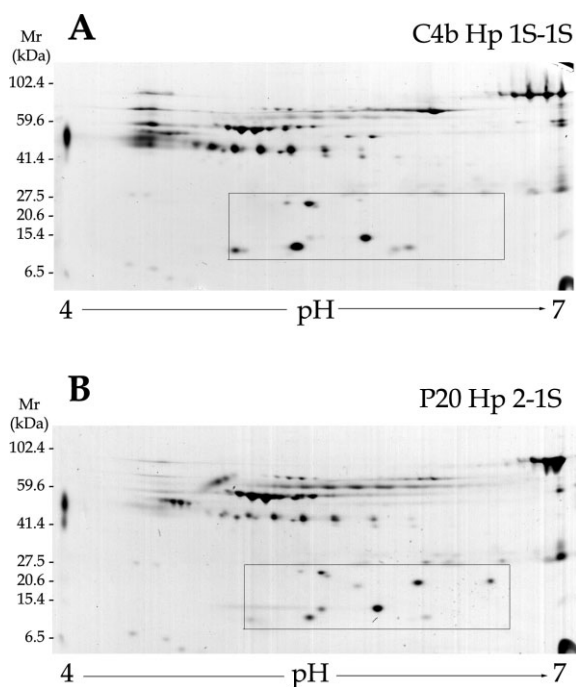


Figure 1. Plasma from a healthy control (A) and from an SLE patient (B) upon depletion of albumin and Ig. The region where prominent differences in protein expression patterns occur is boxed (see Fig. 2). Total protein amount was 35 μ g. pH range 4–7, 11-cm IPG strips in the first dimension, 4–12% Criterion PreCast XT Gels in XT MES buffer in the second dimension. Bio-Safe Coomassie staining.

3.2 Interindividual differences in the haptoglobin α species

Differences in several spots in the low-mass region were observed and identified as Hpa derivatives after visual inspection of the spot pattern of SYPRO Ruby-stained gels (Fig. 2). The Hpa spots locations and patterns were comparable to those in the Swiss-2-D database plasma map (www.expasy.org/ch2d/), however, given the similarity of the sequences of the different Hp isoforms, assignment of each

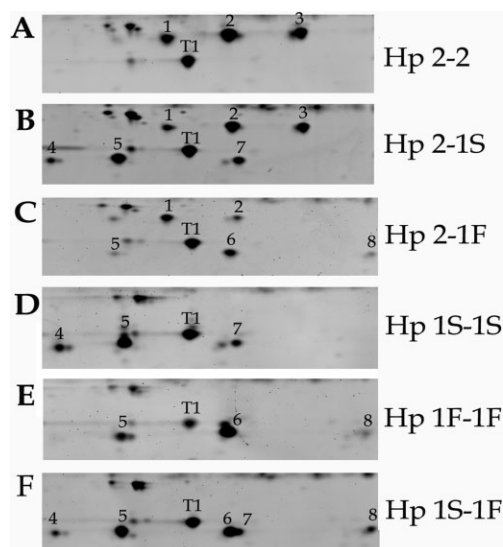


Figure 2. Comparison of 2-DE protein patterns in the low mass region of albumin- and Ig-depleted plasmas showing haptoglobin α chains. (A) Hp 2–2, (B) Hp 2–1S, (C) Hp 2–1F, (D) Hp 1S–1S, (E) Hp 1F–1F, and (F) Hp 1S–1F phenotypes. Numbers 1, 2 and 3 indicate spots of haptoglobin α 2 chains; numbers 4, 5, and 7 are spots of haptoglobin α 1S chains; numbers 5, 6, and 8 contains haptoglobin α 1F, and spot T1 contained transthyretin protein species. Same running conditions as in Fig. 1 except that about 100 μ g of total protein was loaded per gel. SYPRO Ruby staining.

isoform could only be done on the basis of specific tryptic peptide signals observed in the MALDI spectra [2, 3] (see below).

Samples belonging to the phenotype Hp 2–2 showed α 2 spots only (Fig. 2 and Table 1), with three prominent spots separated in the first dimension, each with a distinct pI, (spots 1–3; molecular masses of about 16 kDa). The central spot usually was the most prominent. In the 2-D gels representing the phenotypes Hp 1S–1S, Hp 1F–1F, and Hp 1S–1F

Table 1. Human plasma haptoglobin α chain derivatives characterized in this study

Spot location ^{a)}	Description	Number of aa	pI ^{b)}	M _r ^{b)}
1	Hpa α 2,N5D	142	5.37	15 946.7
2	Hpa α 2	142	5.57	15 945.7
3	Hpa α 2,R143	143	5.82	16 101.9
4	Hpa α 1S,N5D	83	4.99	9 193.1
5	Hpa α 1S	83	5.23	9 192.1
7	Hpa α 1S,R84	84	5.6	9 348.4
5	Hpa α 1F,N5D	83	5.22	9 193.2
6	Hpa α 1F	83	5.58	9 192.1
8	Hpa α 1F,R84	84	6.1	9 348.4

a) See Fig. 2.

b) Theoretical values were calculated using the Compute pI/M_r tool (www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

samples, the spots 1–3 are missing, indicating that Hp $\alpha 2$ isoform and derivatives are not present. In contrast in the Hp 2–1S and Hp 2–1F phenotypes, the $\alpha 2$ chains (spots 1–3), as well as the $\alpha 1$ chains (spots 4, 5 and 7 in Hp 2–1S, or spots 5, 6, and 8 in Hp 2–1F; molecular masses about 9 kDa) were visible as the main spots. Note that in the Hp 2–1S and Hp 1S-1S phenotypes an identical pattern of $\alpha 1$ spots was shown (spots 4, 5 and 7 were present, whereas spots 6 and 8 were missing), spot 5 being the most prominent. This pattern is consistent with the identification of these spots as the $\alpha 1S$ isoform and derivatives.

In Hp 2–1F and Hp 1F-1F samples spots 4 and 7 were missing, while spots 5, 6 and 8 were usually present, the spot 6 being the most prominent, which is consistent with the presence of $\alpha 1F$ derivatives only. In contrast, in the Hp 1S-1F sample all $\alpha 1$ spots were present (spots 4, 5, 6, 7 and 8), which is consistent with the presence of both $\alpha 1S$ and $\alpha 1F$ chains and derivatives. In this sample spots 6 and 7 appeared very close with a more intensely stained left spot ($\alpha 1F$ isoform). Thus, three up to five different forms of $\alpha 1$ chains are separated in 2-D gels of the Hp 2–1S, Hp 2–1F, Hp 1S-1S, Hp 1F-1F, or Hp 1S-1F phenotypes.

In this study, the six major Hp phenotypes were present although with distinct frequencies in controls as compared with those in SLE patients (Table 2). Nevertheless the selection of samples in healthy controls, with allele frequencies of 0.625 (Hp^2), 0.281 (Hp^{1S}) and 0.093 (Hp^{1F}) correlated fairly well with the allele frequencies of European populations [16–18]. In contrast, the Hp allele frequencies of the SLE patients were 0.733 (Hp^2), 0.233 (Hp^{1S}), and 0.033 (Hp^{1F}), indicating clearly an increased frequency of Hp^2 , a similar proportion of

Hp^{1S} and a diminished frequency of Hp^{1F} in SLE patients compared with that in healthy controls. Note that in SLE patients the frequency of Hp^1 ($Hp^{1S} + Hp^{1F}$) was 0.266, while in controls it was 0.374 (Table 2).

3.3 Protein identification by MS

3.3.1 General observations

To gain insight into the composition of these spots, the MALDI peptide maps of the corresponding tryptic digests were then analyzed in detail. PMF searching identified these spots as belonging to the Hp precursor family (Table 3). However, the sequence database entries of haptoglobins are for the least processed forms, comprising the signal peptide (aa 1–18) followed directly by the α subunit, and with the β subunit located in the C-terminal portion of a single polypeptide chain [19], whereas in the mature Hp α subunits, both the signal peptide and the β chain are not present. Therefore, in a regular PMF database search, the experimental peptide masses derived from Hp $\alpha 2$ and $\alpha 1$ subunits, of about 16 and 9 kDa, are confronted with the theoretical peptide masses of their corresponding precursors (42 and 39 kDa, respectively), which necessarily leads to relatively low sequence coverage when compared with other proteins of similar size as transthyretin, and, eventually, low P scores (Table 3).

In contrast, manual inspection of each Hp precursor hit indicated that the ion signals were for tryptic peptides corresponding exclusively to the portion of the Hp precursor sequence where the $\alpha 2$ or $\alpha 1$ subunits were located [2], leading to almost full-sequence coverage (Tables 4 and 5). Moreover, we noticed that the N-terminal and C-terminal tryptic peptides of most of the Hp proteins analyzed by MALDI-TOF had no matching peptides in the Hp precursors. Thus, the additional 18 aa of the signal peptide lead to a theoretical N-terminal tryptic peptide at m/z 5204.57, which cannot be cleaved by trypsin into smaller peptides due to the absence of arginine or lysine residues between the first aa of the signal peptide and the first aa of the mature protein. In contrast, the N-terminal tryptic peptide of the mature Hp α isoforms lacking the signal peptide, yields ion signals at m/z 3349.6 (Fig. 3B–D) that, indeed, will never match with those generated by the Hp precursors. Likewise, an ion signal at m/z 2578.3 (Fig. 3A, B and D) that corresponds to the C-terminal peptide of the α chains (aa 119–142 of the mature $\alpha 2$ isoform, or aa 60–83 of the mature $\alpha 1$ isoforms), has no matching peptide in any of the annotated Hp precursors. The corresponding peptide (aa 137–161 of the Hp-2 precursor, or aa 78–102 of the Hp-1 precursor) yields ion signals at m/z 2734.37. This is due to an additional arginine at the C terminus that is removed from the mature α chains by a circulating carboxipeptidase of unknown nature [20]. Only the α species that migrate to the more basic location conserve this arginine [2].

Table 2. Haptoglobin phenotype distribution and Hp allele frequencies in healthy controls and SLE patients

Phenotype	Controls ^{a)} <i>n</i> = 16 ^{c)}	SLE ^{a)} <i>n</i> = 15 ^{c)}	Haplotype	Controls ^{b)} <i>n</i> = 16 ^{c)}	SLE ^{b)} <i>n</i> = 15 ^{c)}
Hp 1S-1F	0 (0)	1 (6.7)	<i>Hp2</i>	0.625	0.733
Hp 1S-1S	2 (12.5)	0 (0)	<i>Hp1S</i>	0.281	0.233
Hp 1F-1F	1 (6.25)	0 (0)	<i>Hp1F</i>	0.093	0.033
Hp 2–1F	1 (6.25)	0 (0.0)	<i>Hp1</i>	0.374 ^{d)}	0.266
Hp 2–1S	5 (31.25)	6 (40)			
Hp 2–2	7 (43.75)	8 (53.3)	<i>Hp²/Hp¹ratio</i>	1.67 ^{e)}	2.75 ^{e)}

a) The entries indicate the number of individuals with a particular phenotype. Data in parentheses represent percentage.

b) The calculation of gene frequencies is based on the gene counting method, assuming that haptoglobins are codominantly inherited and therefore, phenotype = genotype. The gene frequencies are in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium.

c) Number of controls or SLE patients analyzed by 2-DE.

d) The Hp^1 allele frequency (the sum of Hp^{1S} and Hp^{1F} allele frequencies) in European populations is ~ 0.40 [4], including the Spanish population [16].

e) In balanced polymorphism, the Hp^2/Hp^1 allele ratio should remain constant [1].

Table 3. Database search results with MALDI PMF data (see also Fig. 2 for spot location)

Spot ^{a)}	Mass (kDa)/pI theoretical	Protein	Score	Sequence coverage	Acc. number
1	45.86/6.13	Haptoglobin precursor	84	20	P00738 ^{b)}
2	42.12/6.25	Hp-2 alpha	126	27	Q6LBY9 ^{c)}
3	45.86/6.13	Haptoglobin precursor	120	23	P00738 ^{b)}
4	38.94/6.13	Haptoglobin precursor	70	18	HPHU1 ^{c)}
5	38.94/6.13	Haptoglobin precursor	66	12	P00738 ^{b)}
6	45.86/6.13	Haptoglobin precursor	62	14	P00738 ^{b)}
7	45.86/6.13	Haptoglobin precursor	101	19	P00738 ^{b)}
8	38.94/6.13	Haptoglobin precursor	38	14	P00738 ^{b)}
T1	12.99/5.33	Transthyretin	247	91	2ROXA ^{c)}

a) A total of 63 different spots from 12 controls and 7 SLE patients were analyzed (see Tables 4 and 5).

b) Swiss-Prot.

c) MSDB.

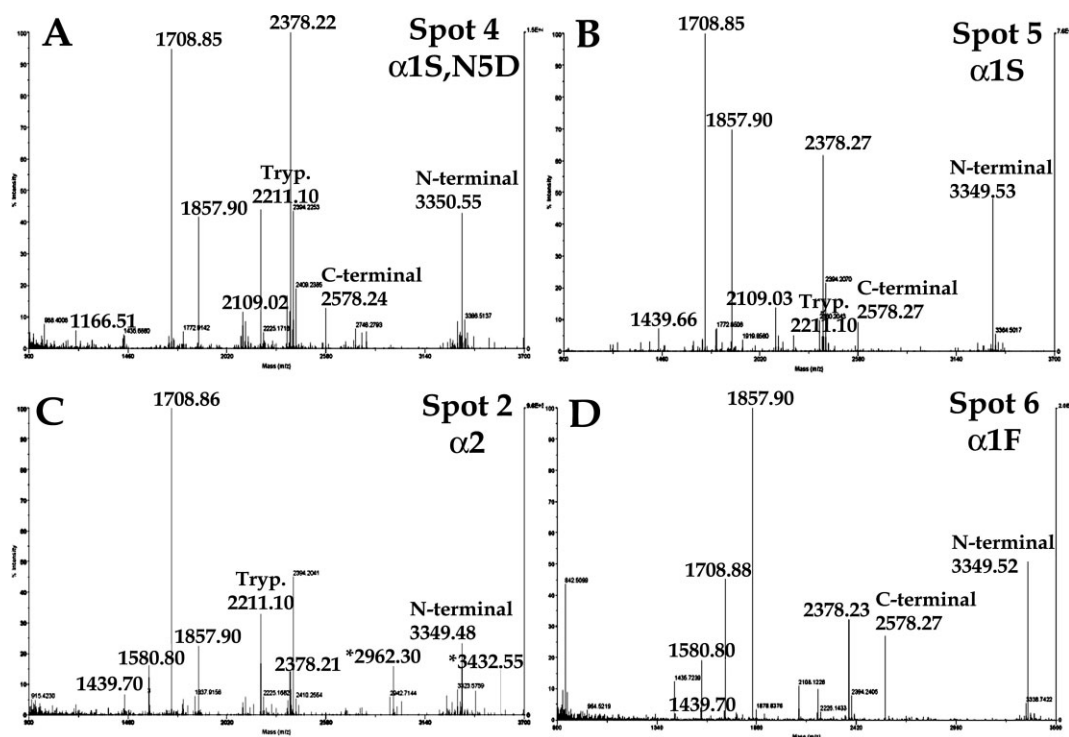


Figure 3. MALDI-TOF-MS peptide mapping analyses from tryptic digests of (A) spot 4, (B) spot 5, (C) spot 2, and (D) spot 6 shown in Fig. 2. Large numbers in the mass spectrum give precise m/z values for the detected peptide ion signals that are specific for H α chains. m/z values of the N-terminal and C-terminal peptides are indicated. Trypsin autoproteolysis peptide at m/z 2211.10 is labeled as Tryp. In panel (C), ion signals resulting from peptides that are specific for H α 2 protein are indicated with an asterisk.

3.3.2 H α 2 spot family

We first analyzed the protein structures of the corresponding spots 1–3 from 10–13 samples from either controls or SLE patients (Table 4). Significant differences between the mass spectra from the haptoglobin α 2 proteins in the three spots were found in the analyzed samples. As mentioned above, the

first 31 aa of mature H α comprise a characteristic tryptic peptide at m/z 3349.5 that was detectable in all samples analyzed from spots 2 and 3 (Table 4 and Fig. 3C). However, the masses of the N-terminal peptides from spot 1 were found to be heavier by 1 Da (m/z 3350.6) due to deamidation of the asparagine residue at position 5 to aspartic acid [2]. The mass differences of 1 Da were clearly identified in most samples analyzed.

Table 4. Most pronounced tryptic peptides of haptoglobin $\alpha 2$ polypeptide chains identified by MALDI-TOF-MS

[M+H] ⁺ a)	Haptoglobin $\alpha 2$ chain			
	Position ^{b)}	Relative abundance ^{c)}		
		Spot 1 ($\alpha 2$,N5D) (<i>n</i> = 11) ^{d)}	Spot 2 ($\alpha 2$) (<i>n</i> = 14) ^{d)}	Spot 3 ($\alpha 2$,R143) (<i>n</i> = 12) ^{d)}
3349.54	1–31	12.5	100.0	100.0
3350.52 ^{e)}	1–31	75.0	0	0
1166.53	32–39	18.2	14.3	0
1580.79	40–53	63.6	78.6	75.0
1708.89	40–54	100.0	100.0	100.0
2378.25	40–59	90.9	92.9	83.3
1439.70	42–54	27.3	57.1	58.3
2109.06	42–59	54.5	71.4	66.7
3432.60 ^{f)}	60–90	81.8	100.0	87.5
2962.35 ^{f)}	65–90	81.8	92.8	75.0
1166.53	91–98	18.2	14.3	0
1708.85	99–113	100.0	100.0	100.0
2378.21	99–118	90.9	92.9	83.3
1439.70	101–113	27.3	57.1	58.3
2109.03	101–118	54.5	71.4	66.7
1857.92	119–135	90.9	92.8	91.7
2578.27	119–142	36.4	50.0	0
2734.38 ^{g)}	119–143	0	0	50.0
895.47 ^{g)}	136–143	0	0	50.0

a) Calculated values.

b) Sequence position.

c) The entries indicate the percentage of samples in which the respective peptide masses were detected in the corresponding mass spectra relative to the total number of spots analyzed.

d) Numbers in parenthesis indicate the number of different spots analyzed, each one corresponding to a different plasma sample from a different individual.

e) N-terminal peptide in which N5 is deaminated.

f) Peptides only present in $\alpha 2$ and derivatives.

g) C-terminal peptide with an additional arginine residue.

The masses of the C-terminal peptides from spots 2 and 3 were found at m/z 2578.28 (aa 119–142) whereas in the Hpx2 protein species that migrated to a more basic location (spot 3), a distinct ion signal at m/z 2734.38 was found in 6 out of 12 samples analyzed. According to Mikkat *et al.* [2], this corresponds to the mass of the C-terminal peptide (aa 119–143), which contains an additional arginine residue at the C terminus (Table 4). Furthermore, in 6 out of 12 samples analyzed an ion signal at m/z 895.47 was detected, which also indicated a C-terminal peptide with the arginine-containing C terminus (aa 136–143). The presence of these peptides has been reported for the $\alpha 2$ protein most basically located spot [2], in agreement with our results.

Spots 1, 2 and 3 of most samples analyzed showed ion signals at m/z 2962.3, corresponding to a peptide that is specific for $\alpha 2$ species (aa 65–90), and therefore, it is not

found in tryptic maps of $\alpha 1$ polypeptide chains [2]. Another peptide that is also $\alpha 2$ specific, and showed an ion signal at m/z 3432.6 (aa 60–90) was also detectable in tryptic maps from most samples analyzed (Table 4). Other ion signals at m/z 1708.85, 2378.21, 1439.7, and 2109.03 matched to two tryptic peptides, because the sequence of the $\alpha 2$ chain is composed of two nearly identical sequence stretches [20]. These ion signals and the one at m/z 1857.92 (aa 119–135) were found in most samples analyzed.

MS sequence data using the nESI-ITMS/MS technique (Fig. 4A) confirmed that peptide at m/z 1580.9 from spot 2 corresponded to aa 40–53 of haptoglobin $\alpha 2$, or $\alpha 1F$ (Tables 4 and 5). Likewise, a peptide at m/z 1439.7 from spots 1, 2, and 3 was also analyzed by nESI-ITMS/MS and showed fragment

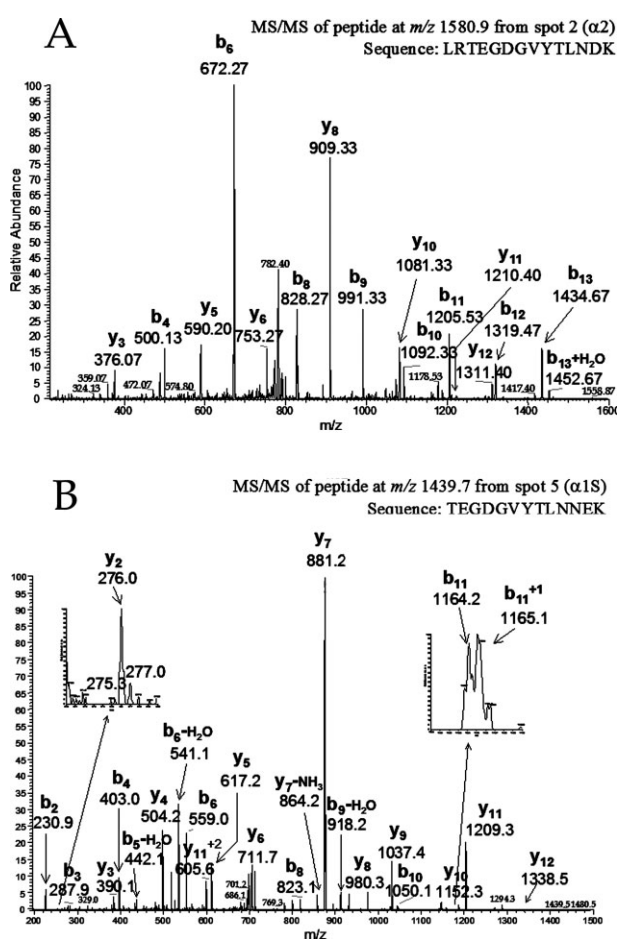


Figure 4. (A) nESI-ITMS/MS analysis of peptide with ion signal at m/z 1580.9 from spot 2. The MS fragment ions from the y-type and b-type ion series are indicated. The determined partial aa sequence is depicted on top and was assigned to a haptoglobin peptide comprising aa40–53 of haptoglobin $\alpha 1$, or $\alpha 2$. (B) nESI-ITMS/MS analysis of peptide with ion signal at m/z 1439.7 from spot 5. The MS fragment ions from the y-type and b-type ion series are indicated. Magnification showed the enlarged regions around the y_2 (m/z 276), and b_{11} (m/z 1164.2) ions. The determined partial aa sequence is depicted on top and was assigned to a haptoglobin peptide comprising aa 42–54 of haptoglobin $\alpha 1S$.

Table 5. Most pronounced tryptic peptides of haptoglobin $\alpha 1$ polypeptide chains identified by MALDI-TOF-MS

[M+H] ⁺ ^{a)}	Haptoglobin $\alpha 1$ chains						
	Position ^{b)}	Relative abundance ^{c)}					
		Spot 4 ($\alpha 1S,N5D$) ($n = 5$) ^{d)}	Spot 5 ($\alpha 1S$) ($n = 8$) ^{d)}	Spot 5 ($\alpha 1F,N5D$) ($n = 2$) ^{d)}	Spot 6 ($\alpha 1F$) ($n = 5$) ^{d)}	Spot 7 ($\alpha 1S,R84$) ($n = 5$) ^{d)}	Spot 8 ($\alpha 1F,R84$) ($n = 1$) ^{d)}
3349.54	1–31	0	100	0	100	100	100
3350.52 ^{e)}	1–31	100	0	100	0	0	0
1166.53	32–39	20	12.5	50	0	20	0
1580.79 ^{f)}	40–53	0	0	50	100	0	100
1708.89	40–54	80	100	100	100	100	100
2378.25	40–59	100	100	100	100	100	100
1439.70	42–54	0	50	50	60	20	0
2109.06	42–59	60	87.5	100	80	60	0
1857.92	60–76	80	100	100	80	80	100
2578.27	60–83	60	62.5	100	40	0	0
2734.38 ^{g)}	60–84	0	0	0	0	60	100
895.47 ^{g)}	77–84	0	0	0	0	40	0

a) Calculated values.

b) Sequence position.

c) The entries indicate the percentage of samples in which the respective peptide masses were detected in the corresponding mass spectra relative to the total number of spots analyzed.

d) Numbers in parenthesis indicate the number of different spots analyzed, each one corresponding to a different plasma sample from a different individual.

e) N-terminal peptide in which N5 is deaminated.

f) Peptide that is not generated in the $\alpha 1S$ chain.

g) C-terminal peptide with an additional arginine residue.

ions corresponding to aa 42–54 of either Hp $\alpha 2$, or $\alpha 1F$ (data not shown). The apparent molecular weights of spots 1, 2, and 3 (Fig. 2) are closer to that of $\alpha 2$ and derivatives (Table 1), and, therefore, these spots could represent distinct PMF of the haptoglobin $\alpha 2$ chain.

3.3.3 Hp $\alpha 1S$ protein spot family

In general, spectra from Hp $\alpha 1$ proteins resemble those from $\alpha 2$ species with the main exception that the ion signals at m/z 2962.3 and m/z 3432.6 are missing, because the corresponding tryptic peptides do not occur in $\alpha 1$ chains (Tables 4 and 5). Thus, Hp $\alpha 1$ and $\alpha 2$ species can easily be distinguished in the PMF spectra. Moreover, the aa sequences of Hp $\alpha 1S$ and $\alpha 1F$ differ in a double aa exchange at positions 52 and 53. Accordingly, the tryptic peptide aa 40–53 that generates an ion signal at m/z 1580.8 is contained in Hp $\alpha 1F$, but is missing in the $\alpha 1S$ protein, where a glutamic acid residue at position 53 does not allow tryptic cleavage [1].

As neither the ion at m/z 1580.8 (Fig. 3 and Table 5), nor other signals related to tryptic cleavage at the C terminus of aa 53 were present in the PMF spectra from spot 5 in any of the samples analyzed, we concluded that spot 5 represents the unmodified Hp $\alpha 1S$ chain (Table 5). To confirm this assumption, the nESI-ITMS/MS spectrum from the peptide at m/z 1439.7 from spot 5 was submitted to database search

and yielded the identification of the corresponding peptide sequence comprising aa 42–54 from the Hp $\alpha 1S$ (Fig. 4B). The ion signals in the y_2 (m/z at 276.0) and b_{11} (m/z at 1164.2) ions showed the expected mass difference of 1 Da as compared with the y_2 (m/z at 275) and b_{11} (m/z at 1165.1) ions of the corresponding fragmentation of peptide 42–54 from Hp $\alpha 1F$ (Fig. 5B). These differences in the masses of y_2 and b_{11} ion fragments allow the unambiguous identification of spot 5 as $\alpha 1S$ and spot 6 as $\alpha 1F$.

Of note is that spot 7 from most samples analyzed showed ion signals at m/z 2734.4 and at m/z 895.48 that indicated the presence of C-terminal peptides aa 60–84 and aa 77–84, respectively, with an additional arginine at position 84 (Table 5). The absence of signal at m/z 1580.8 led us to conclude that this spot corresponded to the Hp $\alpha 1S,R84$ form (Table 1). In contrast, spot 4 of most samples analyzed showed ion signals at m/z 2578.23, indicating the presence of a normal C-terminal peptide (aa 60–83). The absence of ion signals at m/z 1580.8, and the presence of ion signals at m/z 3350.55, which is the increase of 1 Da in the N-terminal peptide of the protein migrating on the acidic side (Fig. 3 and Table 5) due to deamidation of the asparagine residues at position 5 to aspartic acid [2], strongly suggested that this $\alpha 1S$ derivative corresponds to Hp $\alpha 1S,N5D$ (Table 1). Therefore, the MALDI spectra revealed the same three structural modifications for Hp $\alpha 1S$ proteins as for the $\alpha 2$ chain spots.

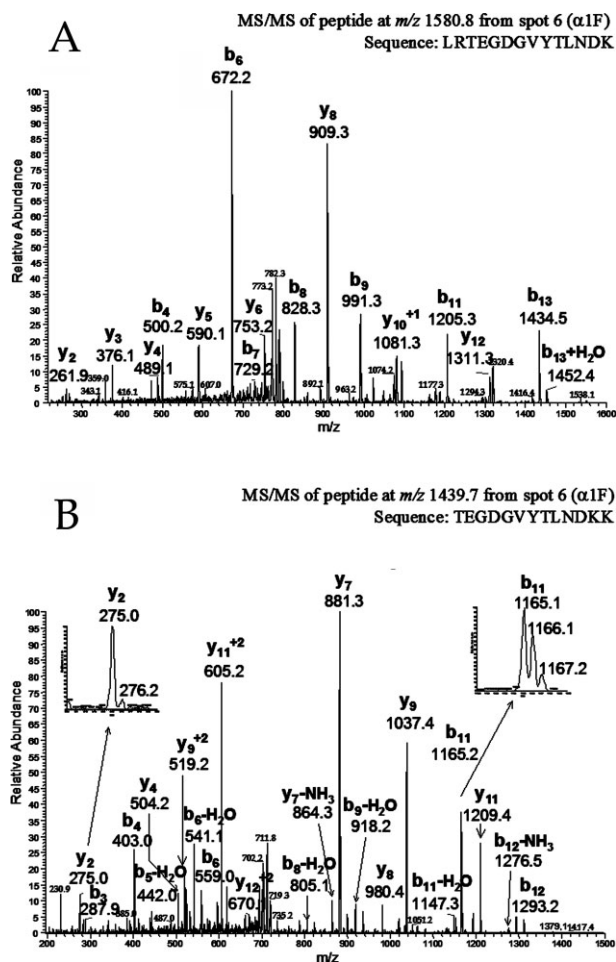


Figure 5. (A) nESI-ITMS/MS analysis of peptide with ion signal at m/z 1580.8 from spot 6. The MS fragment ions from the y-type and b-type ion series are indicated. The determined partial aa sequence is depicted on top and was assigned to a haptoglobin peptide comprising aa 40–53 of haptoglobin $\alpha 1$, or $\alpha 2$. (B) nESI-ITMS/MS analysis of peptide with ion signal at m/z 1439.7 from spot 6. The MS fragment ions from the y-type and b-type ion series are indicated. Magnification showed the enlarged regions around the y_2 (m/z 275), and b_{11} (m/z 1165.2) ions. The determined partial aa sequence is depicted on top and was assigned to a haptoglobin peptide comprising aa 42–54 of haptoglobin $\alpha 1$, or $\alpha 2$.

3.3.4 H α 1F spot family

Spot 6 showed the characteristic ion signal at m/z 1580.8 in all five samples analyzed (Table 5), strongly suggesting the presence of $\alpha 1F$ in this spot. nESI-ITMS/MS analysis of this peptide (Fig. 5B) clearly revealed the sequence of the peptide corresponding to aa 40–53 of $\alpha 1F$, or $\alpha 2$ (Tables 5 and 4). Likewise, as mentioned above, nESI-ITMS/MS analysis of a peptide at m/z 1439.7 (Fig. 5A) produced fragment ions belonging to the haptoglobin sequence ranging aa 42–54, which is present in $\alpha 1F$, and $\alpha 2$, but not in $\alpha 1S$. Spot 6 also showed an ion signal at m/z 2578.3, characteristic of the

normal C-terminal peptide without arginine at the C terminus (aa 60–83). The absence of the ion signal at m/z 2734.4 was also consistent with the presence of $\alpha 1F$ and not $\alpha 1S$,R84 in that spot. Therefore, the protein in spot 6 will be referred to as H $\alpha 1F$ (Table 1).

Ion signals at m/z 3350.5 were detected in spot 5 of two samples analyzed (one with Hp 1F-1F phenotype and the other with Hp 2-1F), and in both cases this spot was likely to correspond to the N-terminally deaminated form of the $\alpha 1F$ chain (Hp $\alpha 1F$,N5D), and not to H $\alpha 1S$. The MALDI-TOF spectrum from spot 8 showed the ion signal of the unmodified N-terminal peptide (m/z 3349.6) and of the C-terminal peptide with the additional arginine residue (m/z 2734.4) and, thus the protein in spot 8 will be referred to as H $\alpha 1F$,R84 (Table 5).

In conclusion, the MS analysis discovered three main structural variants of both haptoglobin $\alpha 1S$ and $\alpha 1F$.

3.4 Haptoglobin levels

The median Hp plasma levels were significantly higher in SLE patients with high SLEDAI scores (127.5 mg/dL) than in SLE patients with low or not disease activity (69 mg/dL) ($p = 0.0411$) (Fig. 6). However, these differences were at the limit of significance when compared with the Hp levels of the normal healthy population (79.2 mg/dL), probably due to the low number of individuals analyzed ($p = 0.0549$) (Fig. 6).

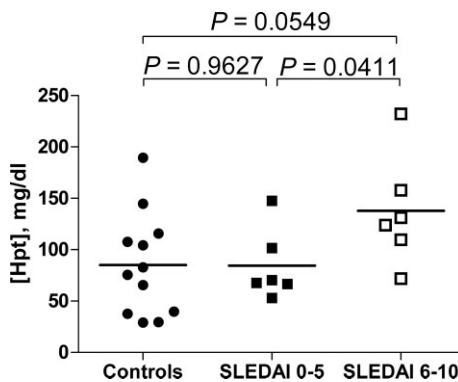


Figure 6. Hp plasma levels were measured by nephelometry. SLE patients were segregated according to their SLEDAI scores, which is highly indicative of the disease activity [15]. p Values were calculated by the Mann-Whitney test (two-tailed).

4 Discussion

Plasma samples from healthy controls and SLE patients have been comparatively analyzed by 2-DE. There are remarkable interindividual differences in the Hp patterns of SLE patients compared with those of healthy controls. Thus, H $\alpha 1F$ protein is only present in one of the patients studied, whereas the H $\alpha 2$ isoform is detected in all but one SLE patients studied. This results in an Hp^2 allele frequency

(0.733), which is significantly higher than that in healthy controls (0.625). Moreover, the frequency of the Hp^{1F} allele is drastically diminished (0.033 in SLE vs. 0.093 in controls). As the Hp^{1S} frequency in our study is relatively normal, the overall diminished Hp^1 frequency must be attributed to the Hp^{1F} allele. Interestingly, in a previous study on Hp distribution in SLE patients from Sweden [13], the Hp^1 frequency in SLE patients was 0.278, which is quite similar to the one found in the present study (0.266). However, in the Swedish study no distinction was made between Hp 2–1S and Hp 2–1F phenotypes because only the three major Hp phenotypes (Hp 2–2, Hp 2–1, and Hp 1–1) were tested. Note that the Hp^1 allelic frequency in different European populations is about 0.4 [1], including the Spanish population ([16], and this study).

SLE is a chronic, multisystem autoimmune disease characterized by the differentiation of short- and long-lived immunoglobulin secreting plasma cells that secrete pathogenic autoantibodies [21]. In this sense, the association of the Hp^2 allele with SLE may be connected with the superior ability of individuals with the Hp 2–2 phenotype to produce antibodies [1, 4]. Moreover, individuals with the Hp 2–2 phenotype show an unbalanced number of B cells between the periphery and bone marrow [4]. Hp binds to the CD22 receptor on human B cells [4], which is implicated in B cell activation and survival. Although the affinity of the binding is the same for the three phenotypes, the number of free CD22-binding sites in the circulation is estimated to be higher in Hp 2–2 individuals. Increased B cell expression of CD22 promotes the presence of autoreactive B cells in the mature repertoire [22]. In addition, murine CD22 is located within the *slc3* susceptibility locus [23], and a polymorphism of *cd22* associates with SLE in a study of Japanese patients [24]. It is likely that the Hp/CD22 interaction can modulate B cell function. Thus, soluble Hp could inhibit the interaction of CD22⁺ B cells with the activated endothelial cells, which upon treatment with pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) display increased expression of cell-surface CD22 ligands [5]. Overall, there are no dramatic changes in the plasma Hp levels in the SLE patients studied (Fig. 6), although the patients with higher disease activity showed significant higher Hp levels than those with lower or no activity. Despite that a larger number of samples should be included, increased Hp levels may correlate with increased disease activity, which is when the release of pro-inflammatory cytokines and the resultant acute-phase response may occur.

The Hp polymorphism is related to the prevalence and the outcome of various pathological conditions with altered iron metabolism such as hemochromatosis, infections, and atherosclerotic vascular disease. Free hemoglobin promotes the accumulation of hydroxyl radical and harmful reactive oxygen species (free radicals), because iron can generate extremely reactive hydroxyl radicals in the presence of H_2O_2 [25]. Hp functions as an antioxidant and an essential endothelial protector by binding to free hemoglobin [26]. How-

ever, both the hemoglobin-binding and the antioxidant capacity of $Hp\alpha 1$ is higher compared with that of $Hp\alpha 2$ [1, 5]. The lower Hb-binding capacity of individuals with the Hp 2–2 phenotype results in more renal damage and higher serum iron levels, at least in males [27].

The increased antioxidant function of Hp1 is thought to confer protection from angiopathies. Thus, following a myocardial infarction, the severity and extent of myocardial damage is greater in patients with Hp 2–2 phenotype than in those with Hp 1–1, or Hp 2–1 [28]. In addition, the survival time in patients with Hp 2–2 who have undergone coronary artery bypass graft is shorter than for people with other Hp phenotypes [4]. These data suggest that Hp 2–2 protects less against oxidative stress in arterial vessels. Interestingly, the Hp 2–2 phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes [29]. This is probably due to the increased generation of redox active iron induced preferentially by Hp 2–2-Hb complexes [30]. In Hp-null mice, free hemoglobin accumulates predominantly in the kidney instead in the liver and spleen as in wild-type mice [31]. In Hp-null mice, induction of severe hemolysis by phenylhydrazine causes greater mortality rate and oxidative tissue damage than in normal mice [32].

Cardiovascular disease is an important complication in patients with SLE, and the increased risk of cardiovascular disease in these patients is not fully accounted for by traditional atherosclerotic risk factors [33]. Moreover, several studies indicate that atherosclerosis is an active inflammatory and immune-mediated process [34], and that this dyslipoproteinemia, which is characterized by high serum triglyceride levels and low serum levels of high-density lipoprotein, correlates with increased disease activity in patients with SLE [33]. Factors, capable of modulating the inflammatory response in patients with SLE, are, therefore, likely to be of interest with regard to the pathogenesis of cardiovascular disease in these patients. Knowledge of the haptoglobin phenotypes and their PMF by 2-DE and MS in SLE patients can help predicting or preventing cardiovascular disorders and determining a more precise prognosis and better treatment.

Dr. Sancho's work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia (former Ministerio de Ciencia y Tecnología) grants SAF2002–00721 and SAF2005–06056-C02–01. Dr. Zubiatur's work was supported by Instituto Carlos III-FIS, Ministerio de Sanidad y Consumo, grant FIS03/0389, by a "Ramón y Cajal" contract from the Ministerio de Educación y Ciencia, and by a Grant 209/02 from the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía. Esther J. Pavón was supported by a fellowship from grant SAF2002–00721. Pilar Muñoz was supported by a fellowship FPI (Formación de Personal Investigador) from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain. Ana B. Martín was supported by a contract I3P from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Salvador A. Arias was supported by a fellowship "Introducción a la investigación" from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

5 References

- [1] Langlois, M. R., Delanghe, J. R., *Clin. Chem* 1996, **42**, 1589–1600.
- [2] Mikkat, S., Koy, C., Ulbrich, M., Ringel, B. *et al.*, *Proteomics* 2004, **4**, 3921–3932.
- [3] Quero, C., Colome, N., Prieto, M. R., Carrascal, M. *et al.*, *Proteomics* 2004, **4**, 303–315.
- [4] Van Vlierberghe, H., Langlois, M., Delanghe, J., *Clin. Chim. Acta* 2004, **345**, 35–42.
- [5] Hanasaki, K., Powell, L. D., Varki, A., *J. Biol. Chem.* 1995, **270**, 7543–7550.
- [6] Oh, S. K., Pavlotsky, N., Tauber, A. I., *J. Leukoc. Biol.* 1990, **47**, 142–148.
- [7] Sadrzadeh, S. M., Bozorgmehr, J., *Am. J. Clin. Pathol.* 2004, **121 Suppl**, S97–104.
- [8] Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., *Immunobiology*, Garland Publishing, New York 2001.
- [9] Kammer, G. M., Perl, A., Richardson, B. C., Tsokos, G. C., *Arthritis Rheum.* 2002, **46**, 1139–1154.
- [10] Kong, P. L., Odegard, J. M., Bouzahzah, F., Choi, J. Y. *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 2003, **987**, 60–67.
- [11] Rozzo, S. J., Allard, J. D., Choubey, D., Vyse, T. J. *et al.*, *Immunity* 2001, **15**, 435–443.
- [12] Wakeland, E. K., Liu, K., Graham, R. R., Behrens, T. W., *Immunity* 2001, **15**, 397–408.
- [13] Rantapaa Dahlqvist, S., Beckman, G., Beckman, L., *Hum. Hered.* 1988, **38**, 44–47.
- [14] Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T. *et al.*, *Arthritis Rheum.* 1982, **25**, 1271–1277.
- [15] Bombardier, C., Gladman, D. D., Urowitz, M. B., Caron, D. *et al.*, *Arthritis Rheum.* 1992, **35**, 630–640.
- [16] Alonso, A., Visedo, G., Sancho, M., Fernandez-Piqueras, J., *Electrophoresis* 1990, **11**, 321–324.
- [17] Thymann, M., Svensmark, O., Masumba, G., Brokso, H. *et al.*, *Electrophoresis* 1990, **11**, 61–65.
- [18] Teige, B., Olaisen, B., Teisberg, P., *Hum. Hered.* 1992, **42**, 93–106.
- [19] Hanley, J. M., Haugen, T. H., Heath, E. C., *J. Biol. Chem.* 1983, **258**, 7858–7869.
- [20] Yang, F., Brune, J. L., Baldwin, W. D., Barnett, D. R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983, **80**, 5875–5879.
- [21] Grammer, A. C., Lipsky, P. E., *Arthritis Res. Ther.* 2003, **5 Suppl 4**, S22–27.
- [22] Grimaldi, C. M., Cleary, J., Dagtas, A. S., Moussai, D. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 2002, **109**, 1625–1633.
- [23] Morel, L., Tian, X. H., Croker, B. P., Wakeland, E. K., *Immunity* 1999, **11**, 131–139.
- [24] Hatta, Y., Tsuchiya, N., Matsushita, M., Shiota, M. *et al.*, *Immunogenetics* 1999, **49**, 280–286.
- [25] Gutteridge, J. M., *Clin. Chem.* 1995, **41**, 1819–1828.
- [26] Gutteridge, J. M., *Biochim. Biophys. Acta* 1987, **917**, 219–223.
- [27] Delanghe, J. R., Langlois, M. R., *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002, **40**, 212–216.
- [28] Chapelle, J. P., Albert, A., Smeets, J. P., Heusghem, C. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 1982, **307**, 457–463.
- [29] Levy, A. P., Hochberg, I., Jablonski, K., Resnick, H. E. *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002, **40**, 1984–1990.
- [30] Asleh, R., Guetta, J., Kalet-Litman, S., Miller-Lotan, R. *et al.*, *Circ. Res.* 2005, **96**, 435–441.
- [31] Fagoonee, S., Gburek, J., Hirsch, E., Marro, S. *et al.*, *Am. J. Pathol.* 2005, **166**, 973–983.
- [32] Lim, S. K., Kim, H., bin Ali, A., Lim, Y. K. *et al.*, *Blood* 1998, **92**, 1870–1877.
- [33] Ohlenschlaeger, T., Garred, P., Madsen, H. O., Jacobsen, S., *N. Engl. J. Med.* 2004, **351**, 260–267.
- [34] Kao, A. H., Sabatine, J. M., Manzi, S., *Curr. Opin. Rheumatol.* 2003, **15**, 519–527.

*ANEXO 2: Artículos
publicados (colaboraciones)*

CD38 Signaling in T Cells Is Initiated within a Subset of Membrane Rafts Containing Lck and the CD3- ζ Subunit of the T Cell Antigen Receptor*

Received for publication, July 23, 2003, and in revised form, September 22, 2003
Published, JBC Papers in Press, September 30, 2003, DOI 10.1074/jbc.M308034200

Pilar Muñoz^{‡§}, María-del-Carmen Navarro^{‡¶}, Esther J. Pavón^{‡||}, Javier Salmerón^{**},
Fabio Malavasi^{‡‡}, Jaime Sancho[‡], and Mercedes Zubiaur^{‡§§}

From the [‡]Instituto de Parasitología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18001 Granada, the ^{**}Hospital Universitario San Cecilio, 18012 Granada, Spain, and the ^{‡‡}Laboratory of Immunogenetics, University of Torino Medical School, 10126 Torino, Italy

In this study we present data supporting that most CD38 is pre-assembled in a subset of Brij 98-resistant raft vesicles, which were stable at 37 °C, and have relatively high levels of Lck and the CD3- ζ subunit of T cell antigen receptor-CD3 complex in contrast with a Brij 98-soluble pool, where CD38 is associated with CD3- ζ , and Lck is not detected. Our data further indicate that following CD38 engagement, LAT and Lck are tyrosine-phosphorylated exclusively in Brij 98-resistant rafts, and some key signaling components translocate into rafts (*i.e.* Sos and p85-phosphatidylinositol 3-kinase). Moreover, N-Ras results activated within rafts immediately upon CD38 ligation, whereas activated Erk was mainly found in soluble fractions with delayed kinetics respective to Ras activation. Furthermore, full phosphorylation of CD3- ζ and CD3- ϵ only occurs in rafts, whereas partial CD3- ζ tyrosine phosphorylation occurs exclusively in the soluble pool, which correlated with increased levels of c-Cbl tyrosine phosphorylation in the non-raft fractions. Taken together, these results suggest that, unlike the non-raft pool, CD38 in rafts is able to initiate and propagate several activating signaling pathways, possibly by facilitating critical associations within other raft subsets, for example, LAT rafts via its capacity to interact with Lck and CD3- ζ . Overall, these findings provide the first evidence that CD38 operates in two functionally distinct microdomains of the plasma membrane.

Human CD38 antigen is a 45-kDa type II transmembrane glycoprotein with a short N-terminal cytoplasmic domain and a

long C-terminal extracellular domain (1, 2). It is widely expressed in different cell types including thymocytes, activated T cells, and terminally differentiated B cells (plasma cells) (3–6). Other reactive cells include NK cells, monocytes, macrophages, dendritic cells, and some epithelial cells. The CD38 antigen acts mainly as a NAD(P)⁺ glycohydrolase (7) and plays a role in lymphocyte activation (3, 8). However, CD38 may also act as an ectocyclase that converts NAD⁺ to the Ca²⁺-releasing second messenger cyclic ADP-ribose (9). Moreover, intracellularly expressed CD38 may catalyze NAD⁺/cyclic ADP-ribose conversion to cause cytosolic Ca²⁺ release (10), and CD38 may control neutrophil chemotaxis to bacterial chemoattractants through its production of cyclic ADP-ribose (11).

Plasma membranes of many cell types, including T cells, contain specialized microdomains, or lipid rafts, enriched in sphingolipids, cholesterol, sphingomyelin, and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. These membrane domains are characterized by detergent insolubility at low temperatures and low buoyant density. Based on these biochemical properties, they are often referred to as glycosphingolipid-enriched membranes or detergent-insoluble glycolipid fractions (12, 13). Several signaling proteins are enriched in lipid rafts. Src family kinases and the adaptor protein LAT,¹ both of which require acylation for raft targeting, are constitutively present in rafts. The densely packed, liquid-ordered environment of rafts excludes most integral membrane proteins. However, antibody-mediated clustering can recruit receptors on several cell types to rafts. These include some components of the TCR-CD3 complex (14–17), BCR (18–20), Fc ϵ RI (21), CD20 (22), and human CD2 (23). Other transmembrane proteins seem to be constitutively associated with rafts as CD44, CD5, CD9, and murine CD2 (24–26).

Recent data, however, demonstrate that in resting T cells 10–20% of the TCR-CD3 complex partitions into rafts that are resistant to solubilization in 1% Brij 98 at 37 °C (27), which suggests that part of the TCR-CD3 complex is constitutively associated with lipid rafts. Our previous data led to the proposition that in T cells CD38 requires the TCR-CD3 complex for signaling (28, 29). In addition, we have demonstrated that Lck,

* This work was supported in part by Instituto Carlos III-FIS, Ministerio de Sanidad y Consumo Grant 01/1073, Consejería de Salud de la Junta de Andalucía Grant 209/02 (to M. Z.), CICYT Grants SAF99-0024 and SAF2002-00721 (to J. Sancho), AIRC (Milano, Italy), TELETHON (Roma, Italy), Biotechnology (CNR, Roma, Italy), and by the AIDS and TB projects (ISS, Rome, Italy) (to F. M.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Supported by Fellowship I3P from Fondo Social Europeo and Fellowship FPI from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain.

¶ Supported by Contract I3P from Fondo Social Europeo.

|| Supported by Fellowship from CICYT Grant SAF2002-00721.

§§ Supported by a Contrato de Investigadores del Plan Nacional de Salud from the Ministerio de Sanidad y Consumo, and a contract of the program “Ramón y Cajal” from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain. To whom correspondence should be addressed: Instituto de Parasitología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ventanilla, 11, 18001 Granada, Spain. Tel.: 34-958805182; Fax: 34-958203911; E-mail: mzubiaur@ipb.csic.es.

¹ The abbreviations used are: LAT, linker for activation of T cells; TCR, T cell antigen receptor; PI, phosphatidylinositol; ZAP-70, ζ -associated protein-70; Erk, extracellular signal-regulated protein kinase; Tyr(P), phosphotyrosine; mAb, monoclonal antibody; PVDF, polyvinylidene difluoride; ODG, octyl D-glucoside or *n*-octyl β -D-glucopyranoside; ECL, enhanced chemiluminescence; HRP, horseradish peroxidase; FITC, fluorescein isothiocyanate-conjugated; α mo, F(ab')₂ Goat anti-mouse IgG; GM1, Gal β 1–3GalNac β 1–4Gal(3–2 α NeuAc) β 1–4Glc β 1–1-Cer; Sos, Son of Sevenless; RBD, Ras-binding domain; GST, glutathione S-transferase.

which partitions into rafts, is required for CD38-mediated signaling (30), and CD38 itself is constitutively associated with lipid rafts resistant to solubilization in 1% Nonidet P-40 at 4 °C (31). Moreover, upon CD38 cross-linking, a number of proteins are tyrosine-phosphorylated including ZAP-70 and LAT (30, 31). These studies suggested that rafts and the proteins associated or targeted to them as the TCR-CD3, Lck, ZAP-70, and LAT could be involved in CD38 signaling. However, a key issue remained unclear: how is CD38 ligation coupled to activation events in rafts? Does CD38 ligation induce coalescence of membrane rafts, and does such aggregation facilitate the trans-activation of the raft-associated Lck, thereby initiating the intracellular cascades, or is CD38 and a fraction of the TCR-CD3 complex constitutively present in a subset of rafts where they co-localize and physically interact?

A major concern about rafts isolated by 1% Triton X-100 or 1% Nonidet P-40 at 4 °C is that they are large vesicles of 0.5 and 1 μm in diameter, which probably results from the coalescence of segregated raft units (32). Therefore, it is difficult to interpret data on protein composition of raft subsets. However, the size of 1% Brij 98-resistant vesicles isolated at 37 °C is rather small (67 ± 39 nm) (27), which is quite close to the size (~ 50 nm in diameter) of circular raft patches estimated by photonic force microscopy in living fibroblasts (33) or to the size of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein domains (less than 70 nm in diameter) measured by fluorescence resonance energy transfer microscopy in living Chinese hamster ovary cells (34). Moreover, Brij 98 vesicles are very stable, and once isolated from different cell membranes they do not coalesce (27). If a circular raft patch has a radius of about 30 nm and thus occupies 2827 nm², it follows that a Brij 98 vesicle on average should harbor about 1 separate raft unit, which theoretically would allow it to immunoisolate homogeneous raft subsets. Indeed, raft subsets with different protein compositions from the same membrane could actually be isolated (27).

In the present study, using 1% Brij 98 at 37 °C to isolate raft from Jurkat T cells, we have demonstrated the existence of at least three types of Brij 98-resistant raft subsets: CD38 rafts, which are enriched in CD38, CD3- ζ , and Lck; TCR/CD3 rafts, which are enriched in CD3- ζ , CD3- ϵ , and Lck; and LAT rafts, which are primarily enriched in Lck. Indeed, immunoisolated Lck rafts retrieve all the above proteins, which is in agreement with its presence in all raft subsets studied so far. Our results further indicated that following stimulation of CD38, LAT and Lck are tyrosine-phosphorylated exclusively in Brij 98-resistant rafts, and many key components of signaling pathways that are regulated by CD38 translocate into rafts (*i.e.* Sos and p85 PI 3-kinase). Moreover, N-Ras is found in its activated state within rafts upon CD38 stimulation. Furthermore, full phosphorylation of CD3- ζ and CD3- ϵ only occurs in rafts, whereas c-Cbl tyrosine phosphorylation occurs exclusively in non-raft fractions. Taken together, these data provide new insights in how rafts take part in CD38 signal transduction.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines—Jurkat D8 cells, which constitutively express CD38, were obtained from wild-type Jurkat cells (subclone E6-1, American Tissue Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) by the limiting dilution technique (35). The Lck-deficient Jurkat T cell variant JCaM1.6 (36) was kindly provided by Dr. Arthur Weiss (University of California, San Francisco).

Antibodies and Reagents—Anti-human CD3- ϵ mAb OKT3 (IgG2a) or the CD38 mAbs HB136 (IgG1) and OKT10 (IgG1) were prepared and purified by affinity chromatography on HiTrap protein A or HiTrap protein G HP column, respectively, using the ÄKTA explorer system (Amersham Biosciences) as described (28). Anti-human CD38 mAb IB4 (IgG2a) was prepared and purified by affinity chromatography on protein A-Sepharose and high pressure liquid chromatography on hydroxyapatite columns, as described (37). Anti-human CD3- ζ mAb 1D4.1 is

directed against the C-terminal portion of CD3- ζ , and it has been described previously (38). Affinity-purified, fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC) F(ab')₂ fraction of rabbit antibody to mouse immunoglobulins (F(ab')₂ FITC- α mIg) was purchased from Dako (Glostrup, Denmark). Affinity-purified F(ab')₂ fraction of goat antibody to mouse IgG (whole molecule) (F(ab')₂ G α mIg) was purchased from Cappel (ICN Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa, CA). Recombinant anti-Tyr(P) antibody coupled to horseradish peroxidase (RC20-HRP), anti-Sos1 mAb, and anti-p85 PI 3-kinase mAb were obtained from BD Biosciences. The anti-phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (Thr-202/Tyr-204) E10 mouse mAb was purchased from Cell Signaling Technology (New England Biolabs, Beverly, MA). The following affinity-purified rabbit polyclonal antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA): anti-Erk-2, anti-ZAP-70, anti-Vav, anti-Sos, anti-Cbl, anti-p85 α PI 3-kinase, and the affinity-purified mouse monoclonal antibody anti-Lck 3A5 mAb. An affinity-purified rabbit antibody to CD3- ϵ was purchased from Dako (Denmark). Polyclonal antibodies anti-LAT and anti-Lck (N-terminal) were from Upstate Biotechnology, Inc. Anti-Zap-70 (Zap-4) rabbit antiserum was a kind gift from Dr. S. C. Ley (Medical Research Council, London, UK) (30). Anti-CD3- ζ antiserum 448 was a gift from Dr. B. Alarcón (Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid, Spain). Affinity-purified goat anti-rabbit IgG (Fc) HRP conjugate and goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugate were from Promega (Madison, WI). Prestained SDS-PAGE standards (broad and precision range), and ImmunoStart reagents were from Bio-Rad. The cholera toxin HRP-conjugated and the anti-actin mAb, AC40, were purchased from Sigma. Protein G-Sepharose 4 Fast Flow and ECL reagents were from Amersham Biosciences. Raf-1 Ras-binding domain agarose conjugate, anti-Ras (clone RAS 10, mouse monoclonal IgG2a- κ), was purchased from Upstate Biotechnology, Inc. μ MACS protein G Microbeads, μ MACS Separator, and μ Columns were purchased from Miltenyi Biotec (Germany).

Fluorescence-activated Cell Sorter Analysis—Cells were analyzed for surface expression of CD3 and CD38 by flow cytometry as described previously by using saturating concentrations of the unlabeled primary mouse mAbs and of the F(ab')₂ FITC- α mIg secondary antibody (30). Samples were analyzed in a FACScan flow cytometer (BD Biosciences), using the CellQuest Software. Under these conditions the primary antibody binds to the cell surface antigen monovalently; therefore, the number of bound antibody molecules corresponds to the number of antigenic sites (39). In experiments on peripheral blood binding of anti-CD38 mAbs tend to be exclusively monovalent when CD38 antigen density is low but partially bivalent at higher CD38 densities (40). Therefore, these estimates may be incorrect by as much as a factor of 2. However, the ratio between the median fluorescence intensities of CD3 and CD38 was constant from experiment to experiment, because the same Jurkat line was used throughout the study, and because saturating concentrations of the mAbs were used.

Detergent Solubilization of Cells at 37 °C—Cells ($7-9 \times 10^7$) were washed twice in ice-cold RPMI/HEPES, resuspended in 0.45 ml of ice-cold 1 \times lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 50 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 20 μM phenylarsine oxide, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM iodoacetamide, and a mixture of small peptide protease inhibitors at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each) without detergent to disrupt the cells (30), quick-frozen on dry ice, and then thawed on ice. Broken cells were homogenized by shearing through a 25-gauge needle with a 1-ml syringe, 10 times, on ice (41). The particulate suspension was preincubated for 4 min at 37 °C. 50 μl of a 10% Brij 98 (Sigma) stock solution in 20 mM HEPES, pH 7.4, was then added to bring a final concentration of 1% Brij 98. After 5 min of solubilization at 37 °C, the lysate was quick-frozen on dry ice and kept at -80 °C until use. Before the sucrose gradient centrifugation, lysates were thawed on ice and then diluted with 0.5 ml of lysis buffer containing 80% sucrose (final sucrose concentration 40%; final Brij 98 concentration 0.5%) and incubated on ice for 50 min (27). Samples were then placed at the bottom of a discontinuous sucrose gradient and fractionated as described below.

Fractionation of Detergent-insoluble and -soluble Fractions by Sucrose Gradient Ultracentrifugation—Detergent-insoluble and -soluble fractions were separated as described (31) with some modifications. Cell lysates were mixed with an equal volume of 80% sucrose and transferred to Sorvall ultracentrifuge tubes. Two ml of 30% sucrose, followed by 1 ml of 5% sucrose in 1 \times lysis buffer without detergent, were overlaid. All the sucrose solutions were prepared in 1 \times lysis buffer without detergent and in the presence of small peptide protease inhibitors at 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each, (30). Samples were centrifuged for 18–20 h at $200,000 \times g$ in a Sorvall AH-650 rotor. Eight fractions of 0.5 ml each were collected on ice, from the top to the bottom of the gradients. 18- μl

aliquots of each fraction of the gradient was diluted with 9 μ l of 3 \times Laemmli sample buffer and resolved on 12.5% SDS-PAGE under non-reducing conditions, transferred to PVDF, and immunoblotted with specific antibodies. Ganglioside GM1, which migrated with the dye front on a 12.5% SDS-PAGE gel, was detected by blotting with cholera toxin-HRP conjugated following by the ECL system.

In indicated experiments two pools of the sucrose gradient fractions were then collected. First was the low density fractions corresponding to the 5/30% interface (fractions 2 and 3, along fraction 4) and referred to as rafts. Second was the high density soluble material corresponding to fractions 7 and 8 of the gradient and referred to as soluble. Except where otherwise indicated, 18 μ l of each pool were diluted with 9 μ l of 3 \times Laemmli sample buffer and loaded onto gels. In indicated experiments proteins of each fraction of the gradient were concentrated by methanol/chloroform precipitation as described (31).

Immunoisolation of Raft Subsets under Non-solubilizing Conditions—Pooled sucrose gradient fractions 2–4 (rafts) or fractions 7–8 (soluble) were diluted with lysis buffer containing 1% Brij 98 to less than 20% sucrose. To avoid variability inherent to each sucrose gradient centrifugation, the rafts or soluble fractions from six different sucrose gradients were pooled and then divided into 6 aliquots for the immunoisolation experiments with anti-CD38, anti-Lck, anti-CD3- ζ , anti-CD3- ϵ , anti-LAT, or isotype-matching antibodies. After 1 h of incubation on ice with specific mAbs, 50–100 μ l of protein G superparamagnetic microbeads (Miltenyi Biotec S. L. (Spain)) were added and mixed well, and the mixture was incubated for an additional 45 min on ice. Subsequently, the magnetically labeled raft subsets were passed over μ Columns placed in the magnetic field of the μ MACS separator following the manufacturer's specifications. The columns were then rinsed twice with 200 μ l of 1% Brij 98 lysis buffer, followed 2 times by 200 μ l of Solution A (0.5% Brij 98 lysis buffer), 1 time by 200 μ l of Solution B (0.01% Brij 98 lysis buffer), and 1 time by 200 μ l of low salt wash buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5). The immunoisolated raft subsets were then eluted with 20 + 50 μ l of pre-heated 95 $^{\circ}$ C hot 1 \times SDS gel sample buffer and the collected second eluate (50 μ l) was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The data shown are representative of three independent experiments.

Immunoprecipitation under Solubilizing Conditions—Pooled rafts and soluble sucrose gradient fractions were diluted with lysis buffer containing 1% Brij 98 + 60 mM ODG to less than 20% sucrose. ODG is a gentle non-ionic detergent that is very efficient in solubilizing proteins associated with rafts (42–45). Immunoprecipitation of protein assemblies was performed by incubation of these fractions with specific antibodies followed by capture of the immune complexes on protein G superparamagnetic microbeads as described above or on protein G-Sepharose 4 Fast Flow beads (Amersham Biosciences) as described elsewhere (30).

Cell Stimulation and Western Blotting—Cells were grown up to a density of $0.5\text{--}1 \times 10^6$ /ml, centrifuged, and serum-starved in RPMI/HEPES + 0.1% fetal bovine serum 15–20 h. The cells were then washed twice in RPMI/HEPES without serum and resuspended at $4\text{--}9 \times 10^7$ cells per sample, or as otherwise indicated, in serum-free RPMI/HEPES medium at 4 $^{\circ}$ C. Stimulation with anti-CD38 mAbs, lysis, and Western blotting analyses were performed as described in detail elsewhere (30). Densitometric analysis was performed on a MacIntosh computer using the public domain NIH Image program version 1.62 (developed at the National Institutes of Health and available at rsb.info.nih.gov/nih-image/) or on a personal computer using the Quantity One—dimensional Analysis Software version 4.4 (Bio-Rad).

Affinity Assay for Ras Activation in Postnuclear Supernatants—D8 Jurkat T cells were grown and stimulated as described. Cells were then lysed in ice-cold $2 \times \text{Mg}^{2+}$ lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 2% Igepal CA-630, 20 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA, 4% glycerol, 20 μ g/ml aprotinin, 20 μ g/ml leupeptin, 50 mM sodium fluoride, and 2 mM sodium orthovanadate) for 30 min. Postnuclear supernatants were obtained by centrifugation at $13,000 \times g$ for 15 min at 4 $^{\circ}$ C. Activated Ras was assayed on equivalent amounts of lysates from unstimulated or anti-CD38-stimulated cells. The lysates were incubated with GST-Raf1-RBD (Ras-binding domain) as specified by the manufacturer (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Proteins were eluted with 3 \times Laemmli reduced sample buffer and applied to either a 12.5 or a 15% SDS-PAGE under reducing conditions. Proteins were transferred to a PVDF membrane, blocked at room temperature for 1 h in 5% milk, and probed with anti-Ras antibody overnight at 4 $^{\circ}$ C (clone RAS 10) (46). Total Ras was measured by anti-Ras immunoblot analysis of an aliquot of the postnuclear lysate followed by an HRP-conjugated anti-mouse secondary. Proteins were detected using enhanced chemiluminescence (ECL System, Amersham Biosciences, or ImmunoStart System from Bio-Rad).

Affinity Assay for Ras Activation in Raft and Soluble Fractions—Pooled raft and soluble fractions from 4 to 5×10^6 unstimulated or anti-CD38-stimulated Jurkat T cells were diluted with $1 \times \text{Mg}^{2+}$ lysis buffer to bring the sucrose concentration to less than 20%. Samples were then incubated with GST-RBD and processed as above.

Statistical Analysis—Statistical analysis were performed using the Student's *t* test (parametric) to compare sample groups. *p* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Isolation and Characterization of CD38-containing Brij 98-insoluble Raft Microdomains—In this study we used Jurkat T cells, which constitutively express CD38 (30) (Fig. 1A), to test whether CD38-mediated signaling is initiated within rafts. We first investigated whether CD38 is associated with the membrane raft vesicles that are recovered as detergent-insoluble complexes upon solubilization of cells in Brij 98 at 37 $^{\circ}$ C. This detergent has a hydrophilic-lipophilic balance of 15.3 mM, and it has been successfully used to selectively isolate detergent-insoluble microdomains at 37 $^{\circ}$ C exhibiting the expected biochemical characteristics of rafts (27). Jurkat T cells were lysed in 1% Brij 98 at 37 $^{\circ}$ C as described under “Experimental Procedures,” and the lysates were fractionated into supernatant and pellet after centrifugation at $13,000 \times g$ for 15 min. As shown in Fig. 1B, only about 42% of CD38 was found in the supernatant (lane 1), and therefore, most CD38 was found precipitated in the pellet (lane 3). These results demonstrated that a large fraction of CD38 was insoluble in Brij 98 at 37 $^{\circ}$ C and strongly suggested that CD38 was associated with Brij 98-resistant lipid rafts. However, insolubility of a membrane protein in a non-ionic detergent could be due to its association with detergent-resistant lipid rafts and/or its anchoring to cytoskeletal elements. To distinguish between these two possibilities, we used ODG, which is a gentle non-ionic detergent that is very efficient in solubilizing proteins associated with glycolipid-enriched membranes, and it does not disrupt the cytoskeleton (42–45). As shown in Fig. 1B, lane 2, in cells lysed in 1% Brij 98 in the presence of 60 mM ODG about 98% of CD38 was recovered in the supernatant upon centrifugation at $13,000 \times g$ for 15 min, which indicated that CD38 was almost entirely solubilized by ODG. Therefore, the efficiency of ODG to solubilize CD38 supports the conclusion that its insolubility in Brij 98 is due to raft association and not to cytoskeleton interactions.

To confirm this, raft membranes were isolated from Jurkat T cells by using a flotation assay based on resistance to solubilization by Brij 98 at 37 $^{\circ}$ C (27), and buoyancy at low density fractions of a bottom-loaded discontinuous sucrose gradient, with steps of 5, 30, and 40% sucrose (31). As shown in Fig. 1C, most of the transmembrane proteins CD38 and LAT, the intracellular membrane-bound Lck, and the ganglioside GM1 partitioned into low density fractions 2–4, which is consistent with its residency in floating lipid rafts or glycolipid-enriched membranes. Thus, densitometric analysis showed that the CD38 present in rafts was composed of $62.2 \pm 3.7\%$ of the total CD38, whereas the CD38 present in soluble fractions 7–8 was $35.0 \pm 3.9\%$ of total CD38 ($p < 0.006$, $n = 10$, Table I). Likewise, $73.9 \pm 4.7\%$ of total GM1 localized to rafts, whereas only $13.1 \pm 2.5\%$ was in soluble fractions ($p < 0.00001$, $n = 10$, Table I). Moreover, about 84% of Lck, 75% of LAT, and less than 30% of CD3- ζ and CD3- ϵ were enriched in floating rafts. In contrast, about 10% of ZAP-70 and none of actin or Cbl were detected in those fractions (Fig. 1C, and data not shown). These low density fractions contained only about 2% of total proteins found in the whole sucrose gradient (Fig. 1D); therefore they were highly enriched in proteins associated with lipid rafts.

We next examined how ODG affected the recovery of CD38, CD3- ζ , CD3- ϵ , LAT, Lck, and the ganglioside GM1 in floating

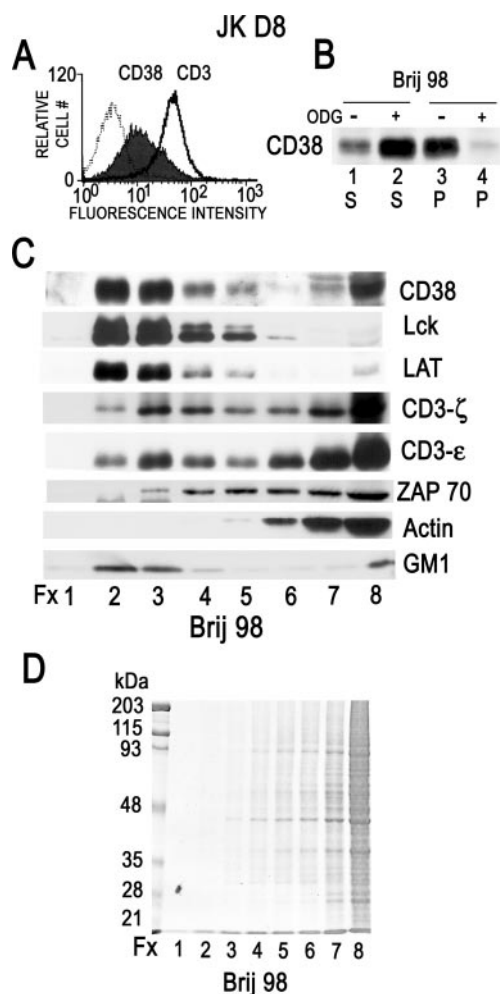


FIG. 1. Isolation and characterization of CD38-containing detergent-insoluble membrane microdomains using Brij 98 at 37 °C. *A*, the surface expression of CD3 and CD38 was analyzed by indirect immunofluorescence staining with saturating concentrations of both primary and secondary antibodies. Thus, Jurkat D8 cells were incubated with the anti-human CD3- ϵ mAb OKT3 (*open histogram, continuous line*) or with the anti-human CD38 mAb HB136 mAb (*filled histogram*), followed by incubation with F(ab')₂ FITC-anti-mouse IgG secondary antibody. Representative flow cytometric profiles are shown. Negative controls were obtained after staining with an isotype-matching unrelated mAb plus a secondary antibody (*open histogram, dotted line*). Flow cytometric data are presented as the logarithm of fluorescence intensity. Median fluorescence intensity after subtraction of the fluorescence detected with an isotype-matched control was 38.02 and 7.74 for CD3 and CD38, respectively. The data shown are representative of more than 20 independent experiments. *B*, Jurkat T cells were lysed in 1% Brij 98-containing lysis buffer at 37 °C for 5 min (–) or with 1% Brij 98 in the presence of 60 mM ODG (+). Cell lysates were fractionated into a supernatant of soluble proteins (S) and a pellet (P) of insoluble proteins by centrifugation at 13,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C, as described under “Experimental Procedures.” Proteins were separated on 11% SDS-PAGE under non-reducing conditions, and upon transference to PVDF membranes were immunoblotted with the anti-CD38 mAb HB136. Blot in *B* was scanned, and CD38 bands were quantified using the NIH Image program 1.62 version. CD38 in either the supernatant or in the pellet was expressed as percentage of total (sum of supernatant plus pellet). The numbers are as follows: 42% (*lane 1*), 98% (*lane 2*), 58% (*lane 3*), and 2% (*lane 4*). The data shown are representative of three independent experiments. *C*, Jurkat T cells were lysed in 1% Brij 98-containing lysis buffer at 37 °C for 5 min and fractionated on a sucrose gradient as described under “Experimental Procedures.” Eight fractions of 0.5 ml were collected from the top to the bottom of the gradient. 18- μ l aliquots of each fraction of the gradient were diluted with 9 μ l of 3 \times Laemmli non-reducing sample buffer, and the resulting 27 μ l were resolved on 12.5% SDS-PAGE under non-reducing conditions, transferred to PVDF, and blotted with specific antibodies against the indicated proteins to the *right of each panel*. Ganglioside GM1, which migrated with the dye front of the 12.5% SDS-PAGE gel, was

rafts by treating the Brij 98 lysates with 60 mM ODG before gradient centrifugation. As shown in Table I, ODG dissociated >50% of CD38, LAT, and GM1 from the top fractions, whereas Lck was less affected (about 28% of Lck moved out of the raft fractions). Note, however, that only 43% of CD38 migrated to high density fractions 7–8 upon ODG treatment, despite the fact that same treatment yielded little pelletable CD38 upon centrifugation at 13,000 $\times g$ (Fig. 1*B*). Likewise, ODG seemed not to affect the recovery of CD3- ζ or CD3- ϵ in the low density fractions, although there was a small but highly reproducible reduction in the percentage of these proteins found in the high density fractions 7–8 (Table I). These apparent contradictions were caused by the appearance in fractions 5–6 of CD38, CD3- ζ , and CD3- ϵ forms of greater buoyant density than those floating to fractions 2–4 but with lower densities than those remaining in fractions 7–8 (data not shown). These data suggest that ODG caused partial solubilization with the appearance of less buoyant CD38, CD3- ζ , and CD3- ϵ complexed with sphingolipid and other lipids in non-vesicular form (47), or forming vesicles of smaller size (nanovesicles) with a distinct cholesterol/lipid environment than that in fractions 2–4 (48). Therefore, ODG altered the buoyant properties of CD38, CD3- ζ , and CD3- ϵ shifting to intermediate densities.

Lck and the TCR-CD3 Complexes Are Specifically Concentrated in Anti-CD38 Immunisolated Rafts—We next examined whether the CD3 subunits and Lck are located within the same raft subset as CD38. To this end, CD38-containing rafts were immunisolated from the total pool of Brij 98-resistant raft fractions with μ MACS protein G Microbeads as described under “Experimental Procedures.” Then the immunisolated rafts bound to the anti-CD38-coated magnetic beads were analyzed biochemically. Western blot analysis showed that nonspecific binding of CD38 to an irrelevant isotype-matching mouse mAb (IgG1) was about 1% of the total amount of CD38 in the pooled raft fractions 2–4, whereas its specific binding to the anti-CD38 mAb OKT10 was about 38%, which suggested a substantial enrichment over the amount in the pooled raft fraction (data not shown), despite the fact that these experiments were done in antigen excess according to the manufacturer’s specifications. Similar analysis showed that Lck, CD3- ζ , CD3- ϵ , and LAT were also detected in rafts immunisolated with the anti-CD38 mAb, OKT10 (Fig. 2*A, lane 1*), although there was a hierarchy of binding, Lck > CD3- ζ \gg CD3- ϵ \geq LAT. Binding of CD3- ϵ and LAT to OKT10 was considered nonspecific because it was in the range of that bound to the irrelevant isotype-matching mAb (0.2–0.8%). Then, we examined the protein composition of the rafts immunisolated with anti-Lck, anti-CD3- ζ , anti-CD3- ϵ , or anti-LAT antibodies. The data showed that Lck, CD38, and CD3- ζ were readily detected in rafts immunisolated with the anti-Lck mAb 3A5 (Fig. 2*A, lane 2*). Likewise, CD3- ζ , CD38, and Lck were clearly present in rafts immunisolated with the anti-CD3- ζ mAb 1D4.1 (Fig. 2*A, lane 3*). Moreover, significantly higher amounts of LAT were detected in Lck- than in CD3- ζ -immunisolated rafts (Fig. 2*A, lanes 2 and 3*, respectively). Regarding CD3- ϵ rafts immunoiso-

detected by blotting with cholera toxin-HRP conjugated by following the ECL system. A representative experiment is shown from more than 10 independent experiments. Blots in *C* were scanned, and protein bands were quantified using the NIH Image program 1.62 version. The percentage of each protein that migrated to low and high density fractions is shown in Table I. *D*, an 18- μ l aliquot of each gradient fraction was resolved on SDS-PAGE as above and stained with Coomassie Blue. The gel was scanned and protein bands were quantified using the NIH Image version 1.62 software system. A representative experiment is shown from five independent experiments. The results were confirmed by analyzing the same fractions in solution with the Bio-Rad colorimetric protein assay (data not shown).

TABLE I
Effects of detergents Brij 98 or ODG on the floatability of cell surface and intracellular membrane-associated molecules

Jurkat T cells were lysed in 1% Brij 98 or in 1% Brij 98 + 60 mM ODG before sucrose gradient centrifugation as described under "Experimental Procedures." 0.5-ml fractions were collected, and aliquots of each fraction were analyzed by Western blot for the indicated proteins or ganglioside GM1. Densitometric data on rafts (fractions 2–4) and soluble (fractions 7–8) pools are presented as percentage of the sum of all sucrose gradient fractions (fractions 1–8).

	Rafts		Soluble	
	Brij 98	Brij 98 + ODG	Brij 98	Brij 98 + ODG
CD38	62.2 ± 3.7 ^a	28.7 ± 0.2 ^b	35.0 ± 3.9 ^a	43.2 ± 1.7 ^b
Lck	83.7 ± 4.0 ^c	59.8 ± 9.4 ^b	6.2 ± 3.2 ^c	20.7 ± 14.4 ^b
LAT	75.1 ± 13.6 ^c	25.5 ± 5.0 ^b	20.3 ± 11.4 ^c	54.3 ± 2.0 ^b
CD3-ζ	22.6 ± 2.0 ^c	23.4 ± 2.4 ^b	61.9 ± 1.4 ^c	49.9 ± 2.1 ^b
CD3-ε	26.8 ± 6.5 ^c	31.3 ± 6.4 ^b	54.6 ± 7.8 ^c	40.5 ± 6.1 ^b
GM1	73.9 ± 4.7 ^a	36.6 ± 3.2 ^b	13.1 ± 2.5 ^a	37.3 ± 5.7 ^b

^a The data are the means ± S.E. of 10 independent experiments.

^b The data are the means ± S.E. of 2 independent experiments.

^c The data are the means ± S.E. of 3 independent experiments.

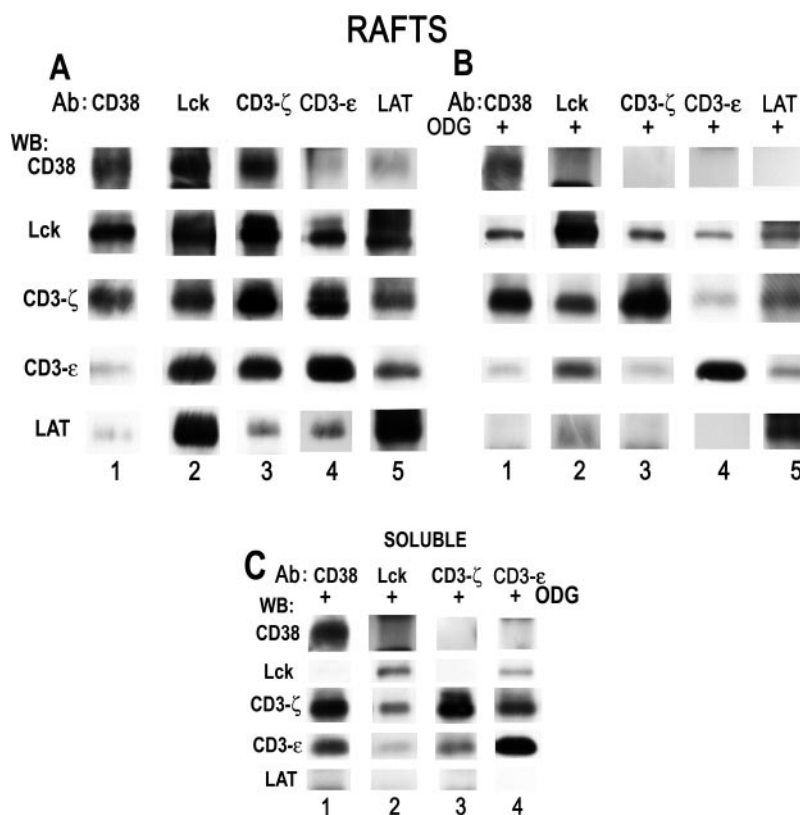


FIG. 2. Lck and CD3-ζ are associated with CD38 in membrane rafts. A, Jurkat T cells were lysed in 1% Brij 98 at 37 °C for 5 min. Rafts were isolated by sucrose gradient ultracentrifugation, and pooled fractions 2–4 were resuspended in 1% Brij 98 lysis buffer. The raft subsets enriched in CD38 (lane 1), Lck (lane 2), CD3-ζ (lane 3), CD3-ε (lane 4), or LAT (lane 5) were immunoprecipitated with specific antibodies (Ab) and μMACS protein G microbeads as described under "Experimental Procedures." Immunoprecipitates were separated on 11% SDS-PAGE gels under non-reducing conditions and blotted with the indicated antibodies. The amount of CD38, Lck, CD3-ζ, CD3-ε, or LAT in the corresponding immunoprecipitates was estimated by comparison with the total amount of each protein recovered in the pooled raft fractions 2–3, and ranged from 22% for Lck up to 51% for CD3-ε. Nonspecific binding to an isotype-matched mouse immunoglobulin (IgG1) ranged from 0.1 to 1%. WB, Western blot. B, pooled raft fractions isolated as in A were prepared and treated for raft solubilization with 1% Brij 98 + 60 mM ODG lysis buffer before being subjected to immunoprecipitation with anti-CD38 (lane 1), anti-Lck (lane 2), anti-CD3-ζ (lane 3), anti-CD3-ε (lane 4), or anti-LAT (lane 5) mAbs bound to μMACS protein G microbeads. Immunoprecipitates were blotted with the indicated antibodies. C, soluble fractions were prepared and treated as in B with 1% Brij 98 + 60 mM ODG before being subjected to immunoprecipitation with anti-CD38 (lane 1), anti-Lck (lane 2), anti-CD3-ζ (lane 3), or anti-CD3-ε (lane 4) mAbs bound to μMACS protein G microbeads. Immunoprecipitates were blotted with the indicated antibodies. The data shown are representative of at least three independent experiments.

lated with the anti-CD3-ε mAb OKT3, CD3-ζ was the major protein co-isolated, following by Lck, with relatively weaker detection of LAT and CD38 (Fig. 2A, lane 4). This correlated with the fact that CD3-ε was readily detected in both Lck- and CD3-ζ-immunoprecipitated rafts (Fig. 2A, lanes 2 and 3) showed intermediate levels in LAT rafts and was weakly detected in CD38-immunoprecipitated ones (Fig. 2A, lanes 1 and 5, respectively).

The higher level of Lck relative to LAT in CD3-ζ- and CD3-

ε-immunoprecipitated rafts indicated that TCR-CD3 raft distribution in Jurkat T cells was very similar to that in the murine T cell line 3A9 lysed in Brij 98 (27). Of note is that LAT was readily detected in Lck rafts and vice versa Lck was clearly present in LAT rafts, whereas the amount of the other proteins was significantly higher in Lck rafts than in LAT rafts (Fig. 2A, lanes 2 and 5), which is in agreement with the strong presence of Lck in all raft subsets studied so far and suggesting that Lck is the linker that keeps most of these proteins together.

ODG Extraction Reveals Distinct Protein Assemblies within Rafts, Which Differ in Their Requirements for Stable Association—To examine whether the protein assemblies detected in immunisolated rafts correspond to protein-protein interactions or whether they are dependent on the raft integrity, pooled low density Brij 98-resistant raft vesicles were resuspended in a buffer containing 1% Brij 98 + 60 mM ODG, which efficiently disrupts many lipid raft-protein associations (see Table I). Then either CD38, Lck, CD3- ζ , CD3- ϵ , or LAT was immunoprecipitated with specific antibodies bound to μ MACS protein G microbeads as described above, and the retrieved proteins were detected by Western blot analysis (Fig. 2B). Because ODG did not affect much the interaction of Lck with lipid rafts, although greatly affecting the CD38-raft interaction (Table I), it was expected that in ODG-treated raft vesicles the ratio Lck/CD38 would be significantly higher than that in Brij 98-resistant ones. In this sense, CD38 was no longer detectable in the Lck immunoprecipitates from ODG-treated raft vesicles (Fig. 2B, lane 2), whereas Lck was still detectable in the CD38 immunoprecipitates (Fig. 2B, lane 1). Note, however, that the relative amount of Lck co-immunoprecipitated with CD38 was significantly reduced as compared with that in the intact raft vesicles (Fig. 2, B and A, lane 1). These data were in accordance with the reduced amount of CD38 that still remained associated with raft fractions upon ODG treatment (Table I) and therefore susceptible to interact with Lck, or being part of the same raft subset. Likewise, in the presence of ODG LAT was no longer detected in CD3- ζ or CD3- ϵ immunoprecipitates (Fig. 2B, lanes 3 and 4, respectively), and vice versa, low amounts of CD3- ζ and CD3- ϵ were co-immunoprecipitated with LAT (Fig. 2B, lane 5). Again, these data correlated with the ability of ODG to selectively disrupt raft-LAT association, whereas the association of either CD3- ζ or CD3- ϵ with lipid rafts was less affected (Table I).

Other protein assemblies were affected by the presence of ODG but not completely disrupted. Thus, lower amounts of LAT was co-immunoprecipitated with Lck as compared with that in Brij 98 alone (Fig. 2, B versus A, lane 2), and vice versa a lower amount of Lck was detected in LAT immunoprecipitates than that in Brij 98 (Fig. 2, B versus A, lane 5), which is in agreement with a recent report (49) showing that in Jurkat cells solubilized in 1% Triton X-100 LAT preferentially interacts with the open active form of Lck and weakly with the closed non-active Lck in lipid rafts, the latter being the predominant form in unstimulated Jurkat cells.

On the other hand, in the presence of ODG the associations of Lck with CD3- ζ or with CD3- ϵ were readily detectable, although the relative amounts of CD3- ζ and CD3- ϵ co-immunoprecipitated with Lck were significantly reduced (Fig. 2B, lane 2) as compared with that in Brij 98 alone (Fig. 2A, lane 2). Moreover, CD3- ζ -Lck and CD3- ϵ -Lck interactions were detectable despite much less Lck was co-immunoprecipitated with both CD3 subunits (Fig. 2, B versus A, lanes 3 and 4).

CD38 Associates with CD3- ζ in Both Raft and Soluble Fractions—Because both the TCR-CD3 complex and CD38 were present in raft and soluble fractions, it was of interest to know whether they could interact in both compartments. The data clearly showed that the presence of ODG did not significantly affect the amount of CD3- ζ co-immunoprecipitated with CD38 in low density fractions (Fig. 2B, lane 1) as compared with that retrieved in Brij 98-resistant CD38-containing raft vesicles (Fig. 2A, lane 1). Moreover, CD3- ζ was readily detected in CD38 immunoprecipitates from the non-raft fraction either in the presence of ODG (Fig. 2C, lane 1) or in Brij 98 alone (data not shown). It is worth noting that although CD3- ϵ was also detected in the CD38 immunoprecipitates from soluble fractions

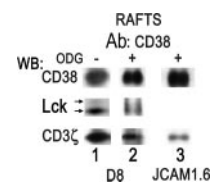


FIG. 3. CD38 is associated with CD3- ζ in the absence of Lck. Pooled raft fractions from sucrose gradient from Brij 98 lysates from Jurkat D8 (lanes 1 and 2) or JCaM 1.6 cells (lane 3) were immunoprecipitated with the anti-CD38 mAb OKT10 in the presence of 1% Brij 98 alone (lane 1) or in the presence of 1% Brij 98 + 60 mM ODG (lanes 2 and 3) using protein G-bound-Sepharose beads as described previously (30). Immunoprecipitates were separated on 11% SDS-PAGE gels under non-reducing conditions and blotted with the indicated antibodies to the left of each panel. The data shown are representative of at least three independent experiments. WB, Western blot.

(Fig. 2C, lane 1), its concentration in CD38 raft fractions was significantly lower than that of CD3- ζ (Fig. 2, A and B, lane 1), which suggested that, at least in rafts, CD38-CD3- ζ interaction could occur independently of the presence of the other subunits of the TCR-CD3 complex or at other CD3- ζ /CD3- ϵ ratios than that of the TCR-CD3 complex. Moreover, CD38-CD3- ζ association also occurred in soluble fractions where Lck did not co-immunoprecipitate with CD38 (Fig. 2C, lane 1), and in ODG-solubilized rafts from the Lck-deficient Jurkat variant JCaM 1.6 (Fig. 3, lane 3), which strongly suggests that Lck is not required for CD38-CD3- ζ interaction. Together, these results emphasize that the association of CD38 with CD3- ζ can occur outside of raft membrane vesicles and that CD38-CD3- ζ complexes are not artifacts of incomplete solubilization but instead represent discrete units that are capable of being fully solubilized.

However, CD38 was not detected in CD3- ζ immunoprecipitates from either ODG-solubilized rafts or non-raft compartments (Fig. 2, B and C, lane 3), which was a clear discrepancy from the data in intact raft vesicles where CD38 is readily retrieved by CD3- ζ immunisolates (Fig. 2A, lane 3), and suggested an interaction of either low affinity or low stoichiometry. Against the low affinity of the CD38-CD3- ζ interaction is the fact that upon extraction with ODG, CD3- ζ is still readily detectable in CD38 immunoprecipitates (Fig. 2B, lane 1, and Fig. 3, lane 2), while almost undetectable in the CD3- ϵ immunoprecipitates (Fig. 2B, lane 4). Likewise, relatively lower amounts of CD3- ϵ were co-immunoprecipitated with CD3- ζ in the ODG-treated raft compartment (Fig. 2B, lane 3), as compared with those in Brij 98 alone (Fig. 2A, lane 3), which suggests that CD38-CD3- ζ interaction has a relatively higher affinity than that of the well established CD3- ϵ -CD3- ζ association (50).

Moreover, it is worth noting that in Jurkat T cells TCR-CD3 surface expression was significantly higher than that of CD38, with a CD3/CD38 ratio of about 5:1 at saturating concentrations of both the anti-CD3- ϵ and anti-CD38 mAbs (Fig. 1A), which is indicative of a higher number of surface CD3 molecules than that of CD38. However, because these proteins are not equally distributed in the different cell surface microdomains, the real number of CD3 and CD38 molecules in each microdomain may vary significantly. One might expect that in Brij 98-resistant rafts CD38 and CD3- ζ will be constrained to be close together at a more balanced concentration, and hence they were readily co-isolated independently of the antibody used for immunoisolation (Fig. 2A, lanes 1 and 3). In contrast, in Brij 98- or ODG-soluble fractions the number of CD3 molecules clearly exceeds those of CD38; therefore, it is expected that a large proportion of CD3- ζ will be associated with receptors other than CD38 (*i.e.* the TCR-CD3 complex), or it will be remain free. Under conditions of large antigen excess, as occurs

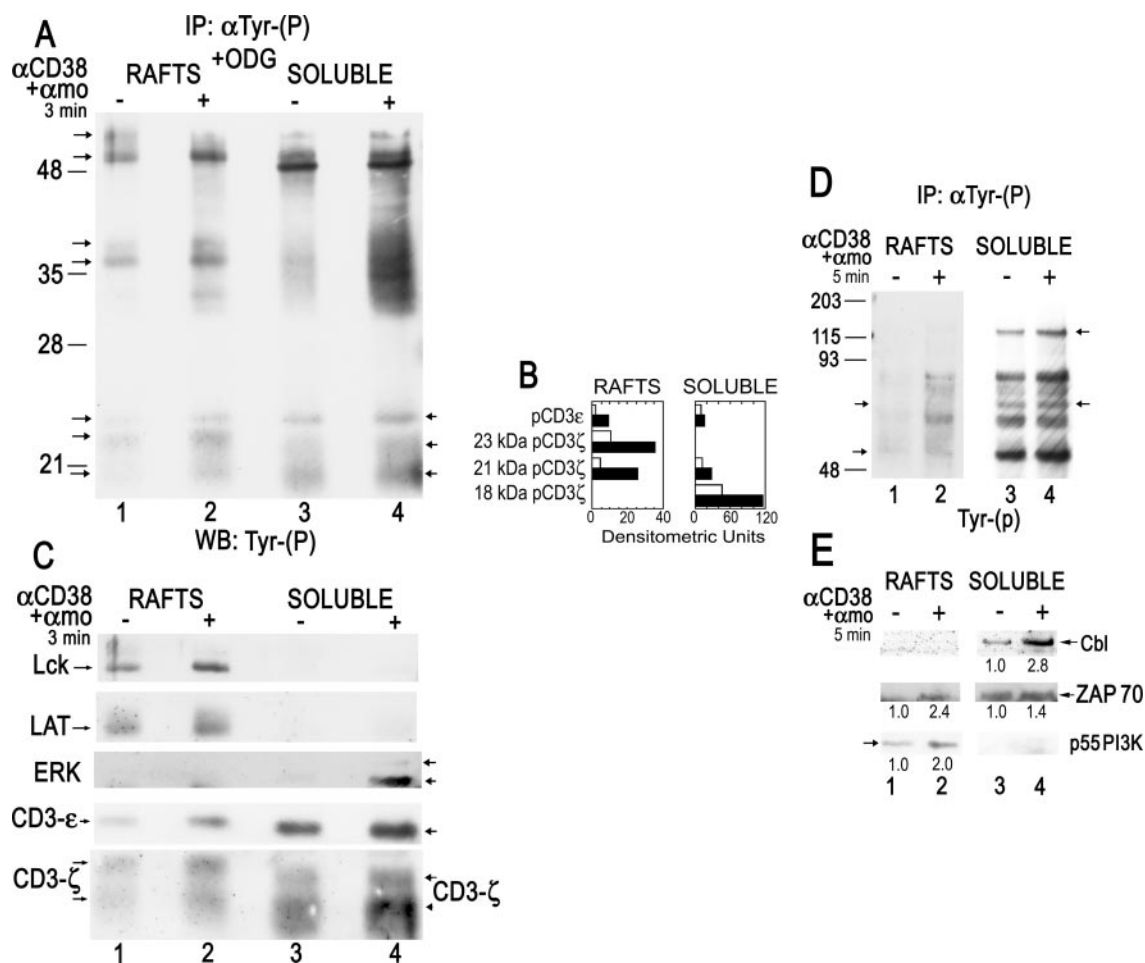


FIG. 4. Upon CD38 engagement LAT, Lck, CD3- ζ , and CD3- ϵ tyrosine phosphorylation occurs in rafts, whereas c-Cbl tyrosine phosphorylation occurs in non-raft soluble fractions. A, serum-starved Jurkat D8 T cells were stimulated (+) or not (-) with the anti-CD38 mAb IB4 at $5 \mu\text{g}/10^7$ cells, followed by cross-linking with the $\text{F}(\text{ab}')_2$ fragment of a secondary antibody for 3 min at 37°C . Cells were then lysed in 1% Brij 98 at 37°C , and rafts and soluble fractions were isolated by sucrose gradient centrifugation as described under "Experimental Procedures." 60 mM ODG + 1% Brij 98-containing lysis buffer was then added to these fractions, and they were subjected to immunoprecipitation (IP) with an anti-Tyr-(P) mAb bound to agarose beads. Tyrosine-phosphorylated proteins were eluted from the beads with 40 mM phenyl phosphate. Proteins were separated on 11% SDS-PAGE under reducing conditions and blotted with the anti-Tyr(P) mAb RC20-HRP. The position of molecular mass markers is indicated to the left. B, blots in A were scanned, and tyrosine-phosphorylated CD3- ϵ and CD3- ζ bands were quantified using the NIH Image program 1.62 version. Open bars represent the amount of each phosphoprotein expressed in densitometric units before stimulation. Closed bars represent that upon IB4 stimulation. C, filter from A was subsequently stripped and reprobed with specific antibodies against the indicated proteins. The data shown are representative of three independent experiments. D, Jurkat T cells were stimulated (+) or not (-) with IB4 + αmo for 5 min at 37°C . Then rafts and soluble fractions were isolated. Tyrosine-phosphorylated proteins were immunoprecipitated and immunoblotted with anti-Tyr(P) mAb as above, except that 1% Brij 98-containing lysis buffer without ODG was added before the immunoprecipitation. The position of molecular mass markers is indicated to the left. E, filter from D was stripped and reprobed with antibodies against the indicated proteins. Fold increase in the densitometric units (corrected by area) relative to unstimulated cells is indicated at the bottom of each lane. The data are representative of three independent experiments.

in our immunoprecipitation experiments, it is likely that the anti-CD3- ζ mAb would bind much more the CD3- ζ molecules that remain free or associated with other receptors (Fig. 2, B and C, lane 3), rather than associated with CD38, which would be preferentially captured by the anti-CD38 mAb (Fig. 2, B and C, lane 1). Therefore, these findings support the idea that the CD38 raft subset represents a significant fraction of CD3- ζ -containing rafts, whereas CD38 in the disordered plasma membrane represents a very minor fraction of CD3- ζ -associated complexes.

Tyrosine Phosphorylation of Lck, LAT, and Fully Phosphorylation of CD3- ζ and CD3- ϵ Occurs Exclusively in Rafts upon CD38 Engagement—The first signaling events following CD38 engagement involve increased tyrosine phosphorylation of a number of cellular proteins, including ZAP-70, Lck, LAT, and the CD3 subunits, CD3- ζ and CD3- ϵ (28, 30, 31). To analyze whether these events occur in rafts, pooled Brij 98-resistant raft and soluble fractions from unstimulated or IB4-stimulated

cells were treated with 1% Brij 98 + 60 mM ODG before immunoprecipitation with an anti-Tyr(P) mAb bound to agarose beads. This was followed by elution of tyrosine-phosphorylated proteins with 40 mM phenyl phosphate, Western blot with anti-Tyr(P) mAb, and subsequent re-blotting with specific antibodies as described (30). As shown in Fig. 4, A and C, Lck and LAT were readily detected in the anti-Tyr(P) immunoprecipitates from rafts with a significant increase upon CD38 ligation for 3 min (in Fig. 4C, compare lane 1 with lane 2). Neither Lck nor LAT was detected in the anti-Tyr(P) immunoprecipitates from the soluble fraction (Fig. 4, A, and C, lanes 3 and 4). In contrast, tyrosine-phosphorylated Erk was mainly detected in the soluble fraction (lane 4). Tyrosine phosphorylation of Erk correlates with increased Erk catalytic activity (30).

Tyrosine phosphorylation of CD3- ϵ and CD3- ζ occurred in both raft and soluble fractions upon CD38 ligation (Fig. 4, A and C). However, in rafts CD3- ϵ tyrosine phosphorylation increased 4-fold relative to that in unstimulated cells, whereas in

the soluble fraction such an increase was only 1.7-fold (for quantification see Fig. 4B). Likewise, the increases in CD3- ζ tyrosine phosphorylation were more prominent in rafts than in soluble fractions (3–5-fold in rafts *versus* 2-fold in soluble fractions, Fig. 4B). It is worth noting that in the raft fraction tyrosine-phosphorylated CD3- ϵ exhibited a slower migration on SDS-PAGE than its counterpart in the soluble fraction (Fig. 4, A and C, lanes 1 and 2 *versus* lanes 3 and 4). Its apparent molecular weight coincided with that of the upper band of the fully tyrosine-phosphorylated CD3- ϵ , which runs as a 24–25-kDa doublet on high resolution SDS-PAGE (38). Likewise, the 23-kDa form of tyrosine-phosphorylated CD3- ζ , which corresponds to that of fully phosphorylated CD3- ζ species (51), was only detected in rafts and not in the soluble fraction. In contrast, in the soluble fraction from IB4-stimulated cells 81% of tyrosine-phosphorylated CD3- ζ migrated with an apparent molecular mass of 18 kDa (Fig. 4, A, lane 4, and B). Moreover, in rafts from IB4-stimulated cells the 23-kDa form was predominant over the 21-kDa form (Fig. 4, A, lane 2, and B). Both the 21- and 18-kDa forms correspond to partially phosphorylated CD3- ζ species (51). The appearance of fully phosphorylated CD3- ζ and a 23:21-kDa ratio near 1 has been correlated with the activation of ZAP-70 and T cell activation, whereas altered CD3- ζ phosphorylation and a 23:21 ratio of much less than 1 has been associated with partial TCR signaling (51–54).

c-Cbl Tyrosine Phosphorylation Occurs Exclusively in the Soluble Fraction upon CD38 Engagement—c-Cbl is a cytosolic protein that becomes tyrosine-phosphorylated upon CD38 engagement although with slower kinetics than those of LAT, CD3- ϵ , and CD3- ζ (28, 30). Because in Jurkat T cells anti-CD3 stimulation induces the association of a highly tyrosine-phosphorylated pool of c-Cbl with lymphocyte membranes and with a detergent-insoluble particulate fraction (55), it was of interest to examine whether this phenomenon occurred upon CD38 ligation. To this end, cells were stimulated for 5 min with the anti-CD38 mAb IB4 followed by cross-linking with the F(ab')₂ fraction of a secondary antibody. Then pooled Brij 98-resistant raft and soluble sucrose gradient fractions from unstimulated or IB4-stimulated cells were immunoprecipitated with an anti-Tyr(P) mAb bound to agarose beads as described above. As shown in Fig. 4E, c-Cbl was exclusively detected in the anti-Tyr(P) immunoprecipitates from the soluble fraction, with a significant increase upon CD38 engagement (Fig. 4E, upper panel, lanes 3 and 4). In contrast, tyrosine phosphorylation of p55 PI 3-kinase was exclusively detected in raft fractions (Fig. 4E, lower panel, lanes 1 and 2), whereas phospho-ZAP-70 was detected in both raft and soluble fractions, although after CD38 stimulation the increase in ZAP-70 tyrosine phosphorylation was seen better in the raft fraction (Fig. 4E, middle panel). Increased ZAP-70 tyrosine phosphorylation has been correlated with augmentation of its catalytic activity (56), whereas c-Cbl has been associated with the negative regulation of immune receptor signaling (57). Note that in both raft and soluble fraction from cells stimulated with anti-CD38 mAb for 5 min, several tyrosine-phosphorylated proteins were detected, with apparent molecular masses above 50 kDa. However, in the soluble fraction the relative abundance of tyrosine-phosphorylated proteins was higher than in rafts, which correlated with its higher protein content. Overall, these findings strongly corroborate our initial suggestion that raft microdomains play an important role in the activation of the earliest CD38 signaling events (31), in which Lck, CD3- ζ , CD3- ϵ , ZAP-70, and LAT become tyrosine-phosphorylated. In contrast, potentially inhibitory signals involving altered CD3- ζ tyrosine phosphorylation and fully c-Cbl tyrosine phosphorylation could be initiated simultaneously, or a few minutes later in the bulk of non-raft

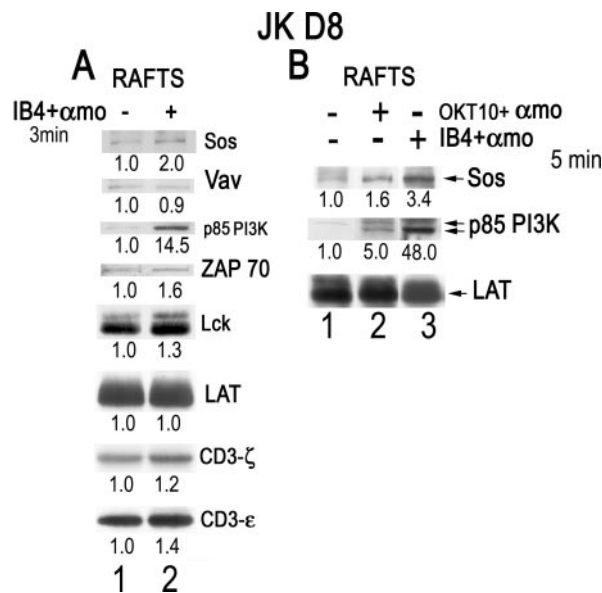


FIG. 5. Recruitment of Sos and p85 PI 3-kinase to membrane rafts upon CD38 ligation. A, overnight serum-starved Jurkat T cells (JK D8) were left unstimulated (–) or they were stimulated (+) with the anti-CD38 mAb antibody IB4 (5 μ g/10⁷ cells), followed by cross-linking with the F(ab')₂ fragment of a secondary antibody (*amo*) for 3 min at 37 °C. Cells were then lysed in 1% Brij 98-containing lysis buffer at 37 °C for 5 min. Rafts were isolated and concentrated as described under “Experimental Procedures.” 25- μ l aliquots (in sample buffer) of rafts fractions were resolved on 11% SDS-PAGE under non-reducing conditions and transferred to PVDF. The membranes were then immunoblotted with the indicated specific antibodies. B, serum-starved Jurkat T cells were left unstimulated (lane 1) or stimulated either with the anti-CD38 mAb antibody, OKT10 (lane 2), or with IB4 (lane 3), followed by cross-linking with the *amo* for 5 min at 37 °C. Rafts were isolated as in A. 25- μ l aliquots (in sample buffer) of rafts fractions were resolved on 11% SDS-PAGE under non-reducing conditions and transferred to PVDF. Separated proteins were immunoblotted with anti-Sos (upper panel), anti-p85 α subunit of the PI 3-kinase (middle panel), or anti-LAT (lower panel) antibodies. Blots from A and B were scanned, and protein bands were quantified using the NIH Image program 1.62 version. Fold increase in the densitometric units (corrected by area) relative to unstimulated cells is indicated at the bottom of each lane. The data are representative of three independent experiments.

plasma membrane and/or the cytosol.

Recruitment of Sos and the p85 α Regulatory Subunit of the PI 3-Kinase to Membrane Rafts upon CD38 Ligation—To examine whether additional signaling molecules were recruited to rafts upon CD38 engagement, despite the fact that they do not become tyrosine-phosphorylated, Jurkat T cells were stimulated with the anti-CD38 mAb, IB4, followed by cross-linking with the F(ab')₂ fraction of a secondary antibody for 3 min. Cells were then lysed in 1% Brij 98 at 37 °C and subjected to sucrose gradient fractionation. The low density raft fractions 2–4 were pooled and concentrated, and proteins were separated by SDS-PAGE under non-reducing conditions and analyzed by Western blot with various specific antibodies. As shown in Fig. 5A, we observed that upon CD38 ligation for 3 min the amount of Sos and p85 PI 3-kinase in rafts increased 2- and 14-fold, respectively (Fig. 5A, lane 2 *versus* lane 1). These increments appeared to be specific because the relative amounts of Vav and LAT remained unchanged following CD38 engagement, whereas ZAP-70, Lck, CD3- ζ , and CD3- ϵ increments ranged from 1.2- to 1.6-fold over unstimulated cells. Furthermore, a more patent translocation of Sos, and particularly of p85 PI 3-kinase, to rafts was observed at 5 min following CD38 ligation with IB4 (Fig. 5B, lane 3, upper and middle panels, respectively). When another anti-CD38 mAb, OKT10, was used to stimulate cells, the translocation of Sos and p85 α to rafts also occurred but less efficiently (Fig. 5B, upper and

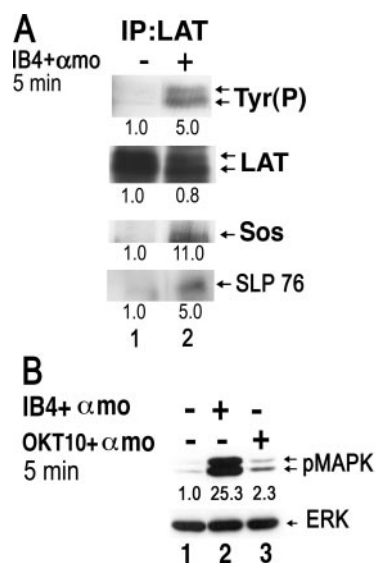


FIG. 6. *A*, recruitment of Sos and SLP-76 by tyrosine-phosphorylated LAT upon CD38 ligation. Jurkat T cells serum-starved overnight (4×10^7 per point) were prepared and stimulated with the anti-CD38 mAb IB4 + α mo for 5 min at 37 °C as described above. Cells were lysed in 1% Nonidet P-40 lysis buffer on ice. Post-nuclear supernatants were subjected to immunoprecipitation (IP) of LAT as described under "Experimental Procedures." Immunoprecipitates were separated on 11% SDS-PAGE under reducing conditions and subjected to immunoblotting with an anti-Tyr(P) mAb (upper panel). Membrane was then stripped and reblotted with antibodies to the indicated proteins (to the right of each panel). Fold increase in the densitometric units (corrected by area) relative to unstimulated cells is indicated at the bottom of each lane. *B*, CD38-mediated Erk activation. Jurkat cells were left unstimulated (lane 1), stimulated with the anti-CD38 mAb antibodies IB4 (lane 2), or OKT10 (lane 3), followed by cross-linking with the α mo for 5 min at 37 °C. After stimulation cells were immediately lysed in ice-cold 1% Nonidet P-40 lysis buffer. Post-nuclear supernatants were separated on 10% SDS-PAGE under reducing conditions and subjected to immunoblotting with an anti-diphospho-Erk mAb (upper panel). Then the filter was stripped and reprobed with an anti-Erk polyclonal antibody (lower panel). Fold increase in the densitometric units (corrected by area) relative to unstimulated cells is indicated at the bottom of the upper panel. The data are representative of three independent experiments.

middle panels, lane 2), which correlated with its relatively lower capability of inducing Erk activation (Fig. 6B). Note that the anti-p85 α mAb used for immunoblotting detected a doublet in CD38-stimulated cells (Fig. 5B, middle panel, lanes 2 and 3). The upper band, which is also present in unstimulated cells (lane 1), may correspond to the p85 β isoform, which is constitutively associated with lipid rafts in Jurkat T cells (14). Because neither Sos nor p85 PI 3-kinase become tyrosine-phosphorylated upon CD38 engagement (Ref. 30 and data not shown), the data suggested that the recruitment of Sos and p85 PI 3-kinase to raft membranes may reflect the specific interaction of these proteins with raft components, which in turn may facilitate the CD38-mediated activation of the Raf-Erk and PI 3-kinase/Akt signaling pathways.

Recruitment of Sos and SLP-76 to Tyrosine-phosphorylated LAT upon CD38 Engagement—LAT tyrosine phosphorylation and recruitment of Grb2-Sos are important steps for TCR-mediated Ras activation (58). Given that LAT is located in rafts, and Sos is translocated to rafts upon CD38 cross-linking, we addressed the question whether cross-linking of CD38 leads to LAT tyrosine phosphorylation and subsequent recruitment of Sos in Jurkat T cells. To this end, anti-LAT immunoprecipitates from unstimulated or anti-CD38-stimulated cells lysed in 1% Nonidet P-40 were immunoblotted with an anti-Tyr(P) mAb. As shown in Fig. 6A, CD38 ligation induced a significant increase in LAT tyrosine phosphorylation (upper panel, lane 2 versus lane 1). Sos was readily detected in LAT immunopre-

cipitates from CD38-stimulated cells, and not from unstimulated cells (Fig. 6A, 3rd panel, lanes 2 and 1, respectively). Therefore, this result suggests that CD38-mediated tyrosine phosphorylation of LAT promotes the recruitment of Grb2-Sos complexes to rafts. Because another critical role of LAT is to bring SLP-76-Gads complexes, and its associated proteins, to the membrane in a tyrosine phosphorylation manner (59), we next tested whether SLP-76 was recruited to LAT upon CD38 ligation. As shown in Fig. 6A, SLP-76 was detected in LAT immunoprecipitates from CD38-stimulated cells (lower panel, lane 2) and not from unstimulated cells (lower panel, lane 1), which is in agreement with an active recruitment of SLP-76-Gads to tyrosine-phosphorylated LAT.

Because translocation of Sos to rafts was better induced by the anti-CD38 mAb IB4 than with OKT10, the relative potency of these mAbs to induce Erk activation was studied. As shown in Fig. 6B, IB4 mAb induced a higher increase in Erk phosphorylation than OKT10, as expected.

CD38 Ligation Induces Ras Activation Within Rafts—Although translocation of Grb2-Sos complexes into rafts leads to Ras activation upon TCR stimulation (60), and we have demonstrated that CD38 ligation leads to Raf/Erk activation (28, 30, 31), it is not known whether Ras is activated upon CD38 engagement. To determine this possibility, serum-starved Jurkat T cells were stimulated with the anti-CD38 mAb IB4 for 2 and 5 min. Activated GTP-bound Ras was extracted from lysates with a GST fusion protein containing the N-terminal Ras binding domain of Raf (see "Experimental Procedures"). The amount of activated Ras in the pull-outs was determined by immunoblotting with an anti-Ras antibody that recognizes the three main Ras isoforms (H-Ras, N-Ras, and K-Ras). As shown in Fig. 7A, CD38 ligation induced a time-dependent activation of Ras, which was stronger at 2 min following stimulation than at 5 min.

In Jurkat T cells the only Ras isoform expressed is N-Ras (61), which potentially could be targeted to lipid rafts via palmitoylation at cysteine 181 (62). To examine whether N-Ras present within rafts become activated upon CD38 engagement, the GTP-Ras pull-down assay was performed in pooled raft fractions from either unstimulated or CD38-stimulated Jurkat T cells. As shown in Fig. 7B, CD38 ligation induced activation of Ras within rafts at 2 min following stimulation, as judged by the increase in the amount of GTP-bound Ras recovered in the pull-outs (lane 2 versus lane 1). In contrast, not such increase was observed in the non-raft-soluble fraction at this time point (data not shown).

DISCUSSION

In a previous paper (31), we have demonstrated that in T cells CD38 is associated with lipid rafts. However, little is known about the protein composition of CD38-containing rafts and whether specific interactions exist between CD38 and other well characterized raft-associated signaling proteins. By using specific antibodies bound to protein G superparamagnetic microbeads, we have analyzed the distribution pattern of CD38, Lck, CD3- ζ , CD3- ϵ , and LAT in immunisolated rafts from Jurkat T cells. This study indicates that CD38 is concentrated in a subset of rafts that have relatively high levels of Lck and CD3- ζ , whereas CD3- ϵ and LAT are weakly detected. Moreover, the CD3- ζ and CD3- ϵ subunits seem to be concentrated in a subset highly enriched in Lck and to a lesser extent with LAT. Thus, the distribution pattern of these molecules in CD3- ϵ rafts is very similar to that in Brij 98-resistant immunisolated CD3- ϵ rafts from a murine T cell line (27). On the other hand, Lck rafts retrieve all the molecules analyzed, whereas LAT rafts are highly enriched in Lck, show intermediate levels of CD3- ζ and CD3- ϵ , and low levels of CD38. There-

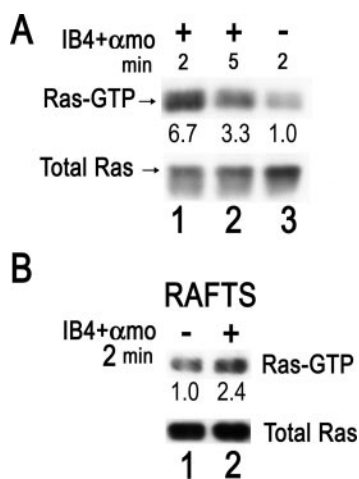


FIG. 7. CD38 ligation induces Ras activation within rafts. *A*, $2-4 \times 10^7$ Jurkat T cells, which were starved overnight in 0.1% serum RPMI/HEPES, were left unstimulated (–) or stimulated with the anti-CD38 mAb antibody, IB4, at $5 \mu\text{g}/10^7$ cells, followed by cross-linking with the F(ab')₂ fragment of a secondary antibody (*amo*), for the indicated periods of time, at 37 °C. After stimulation cells were immediately lysed in ice-cold Mg^{2+} lysis buffer (see “Experimental Procedures”). Active GTP-bound Ras was extracted from post-nuclear supernatants with the GST-Raf-Ras-binding domain (*RBD*), coupled to glutathione-agarose, and analyzed by immunoblotting with anti-Ras antibody (clone RAS 10) (*upper panel*). Total Ras was measured by anti-Ras immunoblot analysis of the post-nuclear supernatants (400,000 cell equivalents per lane) (*lower panel*). Fold increase in the GTP-bound Ras relative to unstimulated cells is indicated at the *bottom* of the *upper panel*. The data were previously corrected by dividing the amount of GTP-bound Ras by the amount of total Ras protein detected in the immunoblots. *B*, pooled Brij 98-resistant raft sucrose gradient fractions from unstimulated (*lane 1*) or IB4-stimulated (*lane 2*) Jurkat cells were solubilized in ice-cold Mg^{2+} lysis buffer and processed as above. Fold increase in the GTP-bound Ras (corrected by total Ras content) relative to unstimulated cells is indicated at the *bottom* of the *upper panel*. The data are representative of at least three independent experiments.

fore, there are quantitative and qualitative differences in the protein content of the raft subsets so far studied, although there is also some degree of overlapping, presumably because most of these molecules are part of pre-formed signaling complexes.

Recent evidence suggests that LAT and Lck could reside in separate raft domains in human T lymphoblasts (63). Interestingly, in the same report TCR stimulation induced the colocalization of LAT and Lck to 50–100 nm microdomains, which suggested that in these cells the coalescence of LAT- and Lck-containing rafts requires T cell activation. In contrast, the results presented in this report demonstrate that in unstimulated Jurkat T cells raft subsets exist containing Lck, LAT, and the TCR-CD3 complex. Moreover, recent data by Kabouridis (49) show the selective interaction of LAT with the open active form of Lck in lipid rafts from Jurkat T cells, whereas such interaction in the soluble non-raft fraction is minimal. Altogether, these data suggest that in normal T cells the association of LAT with Lck-containing rafts is regulated by TCR signaling, whereas in Jurkat T cells there is a constitutive association of these proteins in the same raft subsets, which may explain why in these cells the TCR-generated signals are amplified more rapidly than in resting T cells.

Within these pre-assembled signaling units, some of these protein complexes are very sensitive to raft disruption, which suggest weak and very likely dynamic interactions, involving protein-protein and protein-lipid interactions. Thus, treatment of the raft membrane vesicles with ODG causes the dissociation of LAT from CD3- ζ and CD3- ϵ immunoprecipitates. Likewise, ODG causes a significant dissociation of Lck from CD38 immunoprecipitates and the complete lost of CD38 from Lck immu-

noprecipitates. These results could be explained by the selective dissociation of LAT and CD38 from raft membrane vesicles by ODG, whereas Lck, CD3- ζ , and CD3- ϵ remain associated to them (Table I). In this sense, it has been reported in murine T cells that CD38 and Lck could interact directly through the CD38 cytoplasmic tail and the Lck Src homology 2 domain (64). Interestingly, such interaction takes place in cells solubilized in a lysis buffer containing 1% digitonin, which is a mild detergent known to preserve lipid raft-protein interactions (65).

In contrast, other protein complexes are well maintained regardless of using ODG detergent to solubilize rafts, which suggest that they occur primarily via protein-protein interactions. Thus, the associations of Lck with either CD3- ζ or CD3- ϵ are relatively well maintained in the presence of ODG and are detected independently of the antibody used for immunoprecipitation (*i.e.* anti-Lck, anti-CD3- ζ , or anti-CD3- ϵ). These data further support that Lck and the TCR-CD3 complex are tightly associated within the Lck and/or the TCR raft subsets. Since in rafts a small fraction of both CD3- ζ and CD3- ϵ seems to be constitutively phosphorylated (Fig. 4), it is likely that Lck-CD3 association takes place through phosphotyrosine-dependent interactions.

Another protein ensemble, which probably takes place via protein-protein interactions, is the association of CD38 with CD3- ζ . Thus, in the anti-CD38 immunoprecipitates from raft fractions a similar proportion of CD3- ζ remains associated with CD38 independently of the presence or absence of ODG. Moreover, the association of CD38 with CD3- ζ is found in both raft and soluble fractions and in rafts from Lck-deficient cells, which demonstrates that CD38-CD3- ζ interactions can occur independently of raft partitioning of their components, do not require Lck, and are not artifacts of incomplete solubilization. However, in Jurkat T cells there are clear differences in the surface expression of the CD3 subunits and CD38, along with differences in the proportion of each molecule partitioning into rafts, which may dramatically influence the stoichiometry of CD38-CD3- ζ complexes within rafts, or outside them. The results indicate that changes in the surface expression of CD38, CD3- ζ , or both may greatly affect the number of available CD38-CD3- ζ complexes, which in turn may affect the threshold level required to initiate transmembrane signaling through CD38.

Other protein associations, which are stable in 1% Brij 98 but not in 60 mM ODG, are direct, however. Perhaps the best example is the CD3- ζ -CD3- ϵ complexes, which are detected in both raft and soluble fractions. Our data are consistent with the evidence that CD3- ζ is loosely associated to the other TCR-CD3 subunits (66), and therefore its interaction with the other CD3 polypeptide chains is more sensitive to non-ionic detergents than the more tightly associated TCR- $\alpha\beta$ -CD3- $\gamma\epsilon$ or TCR- $\alpha\beta$ -CD3- $\delta\epsilon$ subcomplexes (50, 67, 68).

CD38 clustering induces tyrosine phosphorylation of Lck, LAT, ZAP-70, and p55 PI 3-kinase within rafts. Moreover, full phosphorylation of CD3- ζ and CD3- ϵ only occurs in raft membranes, as judged by the apparent molecular weight of the different tyrosine-phosphorylated CD3- ζ (23- and 21-kDa forms with a ratio 23:21 higher than 1) and CD3- ϵ forms detected in the anti-Tyr(P) immunoprecipitates. The 21- and/or 23-kDa forms of CD3- ζ may contribute to T cell survival and to T cell responses against pathogens such as bacteria and viruses (69). These data suggest that activation signals initiated in CD38 rafts are rapidly propagated to other raft compartments, where the amplification signaling machinery is present (*i.e.* LAT-enriched rafts, etc.).

CD38-mediated tyrosine phosphorylation of CD3- ζ , CD3- ϵ , ZAP-70, and LAT may be functionally related to the recruit-

ment of Sos and subsequent activation of N-Ras within rafts. In TCR-mediated signaling tyrosine phosphorylation of raft-associated LAT by ZAP-70 may result in an exchange of Sos between the ZAP-70-Grb2-Sos and LAT-Grb2-Sos complexes (60). A similar model is compatible with our observations in Jurkat T cells, where CD38 ligation induces tyrosine phosphorylation of both ZAP-70 and LAT, recruitment of Sos to phospho-LAT (Fig. 6A), and targeting of Sos into rafts as well (Fig. 5). Therefore, a pathway leading from CD38 through Ras to Erk requires the formation of a signaling complex made up of the TCR-CD3 (28), Lck (30), ZAP-70 (30, 31), and its downstream effector LAT. In this model, tyrosine phosphorylation of ZAP-70 and LAT are likely to be essential for CD38-induced targeting of Sos into rafts containing Ras. Therefore, as it is pointed out elsewhere, the formation of functional signaling complexes is unlikely to be stabilized solely through interactions with lipid rafts but does require phosphotyrosine-dependent interactions (70–72). In murine T cells, where CD38-mediated LAT tyrosine phosphorylation is weaker than in Jurkat T cells, we favor a model in which the adaptor Shc might have a crucial role (31). In this sense, Shc partitions into rafts following TCR engagement (14), and targeting of Shc to rafts leads to constitutive activation of the Ras/Erk signaling pathway and enhanced TCR signaling (73).

The distinct membrane microlocalization of the different Ras isoforms clearly has important potential consequences for effector interactions and activation of downstream pathways (74). In cell membranes prepared under detergent-free conditions, doubly palmitoylated H-Ras localizes in both lipid raft microdomains and bulk plasma membrane, whereas K-Ras is predominantly present in the bulk disordered membrane (74–76). On the other hand, 75–80% of unpalmitoylated N-Ras is found in non-caveolar lipid raft fractions from N-Ras-transfected COS-7 cells lysed in 0.25% Triton X-100 (77), and in unstimulated Jurkat T cells extracted with 1% Brij 98 at 37 °C, about 13% of N-Ras migrates with lipid rafts (data not shown). Because Ras interaction with lipid rafts is highly sensitive to detergent extraction (74, 75), it is likely that we are underestimating the amount of N-Ras present in lipid rafts. In any case, CD38 ligation with an agonist anti-CD38 mAb causes N-Ras activation within Brij 98-resistant rafts (Fig. 7) and not in soluble fractions. However, the bulk of the Erk activation occurs in the non-raft fractions (Fig. 4), and disruption of raft interactions by treatment with methyl- β -cyclodextrin strongly stimulates CD38-mediated Erk activation (31). Thus, association with raft domains may be involved in the first steps leading to Ras/Erk activation, but rafts do not constitute the final site of activation of this signaling pathway. These data are consistent with the concept that N-Ras may exist in a dynamic equilibrium between lipid rafts and the disordered plasma membrane, as has been demonstrated for doubly palmitoylated H-Ras (74, 76, 78).

In Jurkat T cells the regulatory p85 α subunit of the PI 3-kinase is recruited to rafts after CD38 cross-linking, whereas the p85 β isoform is constitutively present in rafts. Moreover, a tyrosine-phosphorylated p55 α isoform was also present in rafts and became increasingly tyrosine-phosphorylated upon CD38 ligation. Because CD3- ζ and CD3- ϵ are tyrosine-phosphorylated upon CD38 cross-linking (Zubiaur *et al.* (28, 31) and this paper), and these proteins could interact in a phosphorylation-dependent manner with the p85 α PI 3-kinase (31, 79, 80), they could target PI 3-kinase to rafts. In addition, binding of PI 3-kinase to the TCR-CD3 *per se* could up-regulate the PI 3-kinase activity (79, 80), presumably by a conformational change as reported previously for other p85-binding proteins (81, 82). Other candidate molecules are LAT, Shc, and Cbl, as these

molecules bind p85 (83), and are tyrosine-phosphorylated upon CD38 stimulation (Figs. 4 and 6) (28, 30, 31). An initiating process could occur with molecules such as CD3- ζ and CD3- ϵ , whereas LAT or Shc may be responsible for maintaining or amplifying PI 3-kinase activation. Both events are likely important for PI(3,4,5)P₃ generation after CD38 cross-linking. These interactions with lipid rafts are likely to be functionally significant, because in one earlier study we demonstrated that disruption of raft domains by treatment with methyl- β -cyclodextrin prevents the PI 3-kinase/Akt activation mediated by CD38 (31).

In contrast, c-Cbl, which in B cells is related to inhibition of CD38-mediated cell growth (84), becomes tyrosine-phosphorylated exclusively in the non-raft compartment with delayed kinetics in respect to other signaling molecules. Partial tyrosine phosphorylation of CD3- ζ , which has been correlated with partial TCR signaling (52), is also found in the non-raft plasma membrane. Note that in the non-raft fraction the small amount of Lck detected is not associated with CD38, which could explain why full phosphorylation of CD3- ζ does not occur upon CD38 ligation. Therefore, the CD38 present in the disordered, non-raft plasma membrane might be involved in the initiation of inhibitory signals as c-Cbl tyrosine phosphorylation and partial CD3- ζ tyrosine phosphorylation, although we cannot rule out that CD38 ligation within rafts may regulate lateral segregation of inhibitory signaling molecules from rafts to the non-raft compartment. Likewise, lateral segregation of activating signaling molecules from raft to non-raft sites is likely to occur later on, because the bulk of Erk activation is detected somewhere outside the lipid rafts. In summary, this study provides new insights into the mechanisms by which CD38 transduces signals inside the cell, demonstrating that there are two pools of CD38, which differ in their microdomain localization, associated proteins, and distinct signaling outputs.

Acknowledgments—We gratefully acknowledge Dr. José-Manuel Palma from the Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain, for sharing knowledge and the invaluable help in sucrose gradient ultracentrifugation experiments. We thank Dr. Balbino Alarcón for the gift of the anti-CD3- ζ antibody 448, Dr. Stephen C. Ley for kindly supplying the anti-ZAP-70 antibody Zap-4, and Dr. Arthur Weiss for providing the JCaM1.6 cells. We also thank Antonio Mérida for expert mAb purification.

REFERENCES

1. Terhorst, C., van Agthoven, A., Le Clair, K., Snow, P., Reinherz, E. L., and Schlossman, S. F. (1981) *Cell* **23**, 771–780
2. Jackson, D. G., and Bell, J. I. (1990) *J. Immunol.* **144**, 2811–2815
3. Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S., Horenstein, A., Calosso, L., and Mehta, K. (1994) *Immunol. Today* **15**, 95–97
4. Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K., and Malavasi, F. (2000) *Chem. Immunol.* **75**, 99–120
5. Ferrero, E., Saccucci, F., and Malavasi, F. (2000) *Chem. Immunol.* **75**, 1–19
6. Funaro, A., Ferrero, E., Mehta, K., and Malavasi, F. (2000) *Chem. Immunol.* **75**, 256–273
7. Berthelot, V., Tixier, J. M., Muller-Steffner, H., Schuber, F., and Deterre, P. (1998) *Biochem. J.* **330**, 1383–1390
8. Mehta, K., Shahid, U., and Malavasi, F. (1996) *FASEB J.* **10**, 1408–1417
9. Franco, L., Guida, L., Bruzzese, S., Zocchi, E., Usai, C., and De Flora, A. (1998) *FASEB J.* **12**, 1507–1520
10. Sun, L., Adebajo, O. A., Koval, A., Anandatheerthavarada, H. K., Iqbal, J., Wu, X. Y., Moonga, B. S., Wu, X. B., Biswas, G., Bevis, P. J., Kumegawa, M., Epstein, S., Huang, C. L., Avadhani, N. G., Abe, E., and Zaidi, M. (2002) *FASEB J.* **16**, 302–314
11. Partida-Sanchez, S., Cockayne, D. A., Monard, S., Jacobson, E. L., Oppenheimer, N., Garvy, B., Kusser, K., Goodrich, S., Howard, M., Harmsen, A., Randall, T. D., and Lund, F. E. (2001) *Nat. Med.* **7**, 1209–1216
12. Simons, K., and Toomre, D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39
13. Brown, D. A., and London, E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17221–17224
14. Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998) *Immunity* **8**, 723–732
15. Moran, M., and Miceli, M. C. (1998) *Immunity* **9**, 787–796
16. Janes, P. W., Ley, S. C., and Magee, A. I. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 447–461
17. Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A. M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M. A., Chauvin, J. P., Pierres, M., and He, H. T. (1998) *EMBO J.* **17**, 5334–5348
18. Cheng, P. C., Brown, B. K., Song, W., and Pierce, S. K. (2001) *J. Immunol.* **166**, 3693–3701

19. Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N., and Pierce, S. K. (1999) *J. Exp. Med.* **190**, 1549–1560
20. Petrie, R. J., Schnetkamp, P. P., Patel, K. D., Awasthi-Kalia, M., and Deans, J. P. (2000) *J. Immunol.* **165**, 1220–1227
21. Field, K. A., Holowka, D., and Baird, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4276–4280
22. Deans, J. P., Robbins, S. M., Polyak, M. J., and Savage, J. A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 344–348
23. Yang, H., and Reinherz, E. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 18775–18785
24. Ilangumaran, S., Briol, A., and Hoessli, D. C. (1998) *Blood* **91**, 3901–3908
25. Millan, J., Montoya, M. C., Sancho, D., Sanchez-Madrid, F., and Alonso, M. A. (2002) *Blood* **99**, 978–984
26. Yashiro-Ohtani, Y., Zhou, X. Y., Toyo-Oka, K., Tai, X. G., Park, C. S., Hamaoka, T., Abe, R., Miyake, K., and Fujiwara, H. (2000) *J. Immunol.* **164**, 1251–1259
27. Drevot, P., Langlet, C., Guo, X. J., Bernard, A. M., Colard, O., Chauvin, J. P., Lasserre, R., and He, H. T. (2002) *EMBO J.* **21**, 1899–1908
28. Zubiaur, M., Guirado, M., Terhorst, C., Malavasi, F., and Sancho, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20633–20642
29. Morra, M., Zubiaur, M., Terhorst, C., Sancho, J., and Malavasi, F. (1998) *FASEB J.* **12**, 581–592
30. Zubiaur, M., Izquierdo, M., Terhorst, C., Malavasi, F., and Sancho, J. (1997) *J. Immunol.* **159**, 193–205
31. Zubiaur, M., Fernandez, O., Ferrero, E., Salmeron, J., Malissen, B., Malavasi, F., and Sancho, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 13–22
32. Brown, D. A., and London, E. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111–136
33. Pralle, A., Keller, P., Florin, E. L., Simons, K., and Horber, J. K. (2000) *J. Cell Biol.* **148**, 997–1008
34. Varma, R., and Mayor, S. (1998) *Nature* **394**, 798–801
35. Deaglio, S., Dianzani, U., Horenstein, A. L., Fernandez, J. E., Kooten, C. V., Bragardo, M., Funaro, A., Garbarino, G., Virgilio, F. D., Banchereau, J., and Malavasi, F. (1996) *J. Immunol.* **156**, 727–734
36. Straus, D. B., and Weiss, A. (1992) *Cell* **70**, 585–593
37. Funaro, A., Monte, L. B. D., Dianzani, U., Forni, M., and Malavasi, F. (1993) *Eur. J. Immunol.* **23**, 2407–2411
38. Sancho, J., Franco, R., Chatila, T., Hall, C., and Terhorst, C. (1993) *Eur. J. Immunol.* **23**, 1636–1642
39. Poncet, P., and Carayon, P. (1985) *J. Immunol. Methods* **85**, 65–74
40. Iyer, S. B., Hultin, L. E., Zawadzki, J. A., Davis, K. A., and Giorgi, J. V. (1998) *Cytometry* **33**, 206–212
41. Zubiaur, M., Sancho, J., Terhorst, C., and Faller, D. V. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17221–17228
42. Ilangumaran, S., Arni, S., van Echten-Deckert, G., Borisch, B., and Hoessli, D. C. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 891–905
43. Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992) *Cell* **68**, 533–544
44. Melkonian, K. A., Chu, T., Tortorella, L. B., and Brown, D. A. (1995) *Biochemistry* **34**, 16161–16170
45. Millan, J., Cerny, J., Horejsi, V., and Alonso, M. A. (1999) *Tissue Antigens* **53**, 33–40
46. Delgado, P., Fernandez, E., Dave, V., Kappes, D., and Alarcon, B. (2000) *Nature* **406**, 426–430
47. Ilangumaran, S., and Hoessli, D. C. (1998) *Biochem. J.* **335**, 433–440
48. Roper, K., Corbeil, D., and Huttner, W. B. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 582–592
49. Kabouridis, P. S. (2003) *Biochem. J.* **371**, 907–915
50. Exley, M., Wileman, T., Mueller, B., and Terhorst, C. (1995) *Mol. Immunol.* **32**, 829–839
51. van Oers, N. S., Tohlen, B., Malissen, B., Moomaw, C. R., Afendis, S., and Slaughter, C. A. (2000) *Nat. Immun.* **1**, 322–328
52. Sloan-Lancaster, J., Shaw, A. S., Rothbard, J. B., and Allen, P. M. (1994) *Cell* **79**, 913–922
53. Madrenas, J., Wange, R. L., Wang, J. L., Isakov, N. A., Samelson, L. E., and Germain, R. N. (1995) *Science* **267**, 515–518
54. Kersh, E. N., Shaw, A. S., and Allen, P. M. (1998) *Science* **281**, 572–575
55. Hartley, D., and Corvera, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21939–21943
56. Chan, A. C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G. H., Wang, T., Thoma, R., and Kurosaki, T. (1995) *EMBO J.* **14**, 2499–2508
57. Lupper, M. L., Jr., Rao, N., Eck, M. J., and Band, H. (1999) *Immunol. Today* **20**, 375–382
58. Finco, T. S., Kadlecsek, T., Zhang, W., Samelson, L. E., and Weiss, A. (1998) *Immunity* **9**, 617–626
59. Liu, S. K., Fang, N., Koretzky, G. A., and McGlade, C. J. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 67–75
60. Salojin, K. V., Zhang, J., Meagher, C., and Delovitch, T. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5966–5975
61. Makover, D., Cuddy, M., Yum, S., Bradley, K., Alpers, J., Sukhatme, V., and Reed, J. C. (1991) *Oncogene* **6**, 455–460
62. Prior, I. A., and Hancock, J. F. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 1603–1608
63. Schade, A. E., and Levine, A. D. (2002) *J. Immunol.* **168**, 2233–2239
64. Cho, Y. S., Han, M. K., Choi, Y. B., Yun, Y., Shin, J., and Kim, U. H. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 1685–1690
65. van't Hof, W., and Resh, M. D. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 377–389
66. Rodriguez-Tarduchy, G., Sahuquillo, A. G., Alarcon, B., and Bragado, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 30417–30425
67. Sancho, J., Chatila, T., Wong, R. C., Hall, C., Blumberg, R., Alarcon, B., Geha, R. S., and Terhorst, C. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 20760–20769
68. San Jose, E., Sahuquillo, A. G., Bragado, R., and Alarcon, B. (1998) *Eur. J. Immunol.* **28**, 12–21
69. Pitcher, L. A., Young, J. A., Mathis, M. A., Wrage, P. C., Bartok, B., and Van Oers, N. S. (2003) *Immunol. Rev.* **191**, 47–61
70. Guirado, M., de Aós, I., Orta, T., Rivas, L., Terhorst, C., Zubiaur, M., and Sancho, J. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 574–581
71. Bunnell, S. C., Hong, D. I., Kardon, J. R., Yamazaki, T., McGlade, C. J., Barr, V. A., and Samelson, L. E. (2002) *J. Cell Biol.* **158**, 1263–1275
72. Hartgroves, L. C., Lin, J., Langen, H., Zech, T., Weiss, A., and Harder, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20389–20394
73. Plyte, S., Majolini, M. B., Pacini, S., Scarpini, F., Bianchini, C., Lanfrancone, L., Pelicci, P., and Baldari, C. T. (2000) *Oncogene* **19**, 1529–1537
74. Prior, I. A., Harding, A., Yan, J., Sluimer, J., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 368–375
75. Song, K. S., Li, S., Okamoto, T., Quilliam, L. A., Sargiacomo, M., and Lisanti, M. P. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9690–9697
76. Roy, S., Luetterforst, R., Harding, A., Apolloni, A., Etheridge, M., Stang, E., Rolls, B., Hancock, J. F., and Parton, R. G. (1999) *Nat. Cell Biol.* **1**, 98–105
77. Matalanas, D., Arozarena, I., Berciano, M. T., Aaronson, D. S., Pellicer, A., Lafarga, M., and Crespo, P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 4572–4581
78. Hancock, J. F. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 373–384
79. Exley, M., Varticovski, L., Markus, P., Sancho, J., and Terhorst, C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15140–15146
80. de Aós, I., Metzger, M. H., Exley, M., Dahl, C. E., Misra, S., Zheng, D., Varticovski, L., Terhorst, C., and Sancho, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25310–25318
81. Shoelson, S. E., Sivaraja, M., Williams, K. P., Hu, P., Schlessinger, J., and Weiss, M. A. (1993) *EMBO J.* **12**, 795–802
82. Buhl, A. M., and Cambier, J. C. (1997) *Immunol. Rev.* **160**, 127–138
83. Wange, R. L. (2000) *Science STKE* http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2000/RE1
84. Kitanaka, A., Ito, C., Nishigaki, H., and Campana, D. (1996) *Blood* **88**, 590–598

*ANEXO 3: Resultados no
publicados*

Expresión diferencial de las proteínas de unión a calcio S100A8 (Calgranulina A) y S100A9 (Calgranulina B) y de la proteína de choque térmico de 90 Kda (HSP90) en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con LES y controles sanos

Esther J. Pavón¹, José-Luis Callejas², Norberto Ortego², Mercedes Zubiaur¹, Jaime Sancho¹

¹Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Armilla, Spain

²Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain.

Resumen

Hemos estudiado las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), de 16 muestras de controles sanos y 15 muestras de pacientes LES mediante electroforesis bidimensional, para encontrar diferencias entre la expresión proteica de ambas poblaciones.

Estas muestras son lisados celulares en el detergente NP40, con el que conseguimos no romper los núcleos y de esta forma evitamos usar DNAsas o RNAsas.

Las muestras de interés son digeridas con tripsina y analizadas mediante MALDI-TOF-MS y algunas mediante nESI-IT MS/MS.

De todas las muestras analizadas hemos encontrado hasta 107 proteínas diferentes, y las que más interés han suscitado en nuestro estudio han sido las Calgranulinas A y B y la proteína de choque térmico de 90 Kda. Además hemos encontrado modificaciones postraduccionales en la proteína S100A9.

1.- INTRODUCCIÓN.

El Lupus Eritematoso Sistémico, es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida, caracterizada por un elevado número de manifestaciones clínicas e inmunológicas. Los pacientes que la padecen suelen sufrir brotes de la misma intercalados con periodos de inactividad, donde pueden no presentar sintomatología.

El estudio de nuestras proteínas está basado principalmente en las diferencias de expresión presentadas entre muestras de controles y pacientes, siendo ésta más alta en la población enferma.

Trabajos previos han encontrado elevadas concentraciones en suero de pacientes con LES, de la proteína S100A8/S100A9 y además las cantidades correlacionan con el índice de actividad de la enfermedad [1] en un estudio realizado a 100 pacientes. Se ha podido demostrar mediante análisis inmunohistoquímicos de biopsias renales que la expresión de S100A8/S100A9 por macrófagos infiltrados en el glomérulo de pacientes con LES, se corresponde a la severidad del proceso inflamatorio [2].

La **CALGRANULINA A** (S100A8) y la **CALGRANULINA B** (S100A9), también llamadas MRP8 y MRP14 respectivamente forman parte del grupo de proteínas de unión a calcio de la familia S100. El grupo de genes que las codifican se encuentran en el cromosoma 1q21.

Ambas se encuentran fundamentalmente en fagocitos y se han venido estudiando desde los años ochenta [3-6]. También ha sido bien descrita la sobreexpresión de S100A8 y S100A9 en lugares de inflamación [5, 6] y los primeros estudios que encontraron relación entre estas dos proteínas, su concentración en suero y el proceso inflamatorio fueron publicados hace 20 años [7, 8]. Desde entonces se han ido sucediendo trabajos que no hacen más que confirmar que las proteínas de unión a calcio S100 son biomarcadores inflamatorios.

Presentan un único patrón de expresión con prevalencia en células de origen mieloide [9]. Muestran capacidad de unión a calcio en estados de diferenciación temprana de monocitos y neutrófilos [10, 11] donde representan aproximadamente el 40% del contenido proteico del citosol [2, 12], no pudiéndose detectar en macrófagos en reposo, o en linfocitos [5, 11, 13].

Aunque esa suele ser su localización principal, pueden traslocarse al citoesqueleto o a la membrana celular cuando ocurren aumentos de la concentración de calcio intracelular [9, 13]. Es secretada extracelularmente por neutrófilos estimulados [14] y monocitos [15], o bien es liberada como producto de rotura o muerte celular [16-18].

Pertenecen al grupo de proteínas moduladoras de la señalización del calcio que contienen motivos EF-hand [19].

La calgranulina A tiene 93 aminoácidos y su peso molecular es de 10.8 kDa. La calgranulina B consiste en 114 aminoácidos y su peso es de 13.2 kDa [2, 4, 5]. El bajo peso molecular es también un rasgo característico del grupo de proteínas S100 [20].

Los fagocitos que expresan S100A8 y S100A9, pertenecen a las primeras células que son infiltradas en las lesiones inflamatorias [3, 6], por tanto se ha observado su expresión, en queratinocitos inflamatorios alterados, en la epidermis y en desórdenes malignos [21, 22].

En general ambas proteínas suelen estar formando un heterodímero (S100A8/S100A9) llamado CALPROTECTINA, pero aún así se han podido encontrar diferencias de expresión de ambas moléculas en reacciones inflamatorias crónicas como la glomerulonefritis y en rechazos renales [11, 23]. El conjunto presenta un peso molecular de 36 kDa.

Por otro lado, **proteínas de choque térmico** no son más que chaperonas moleculares que pueden estabilizar o desestabilizar el conformero de otra proteína, controlando su unión y liberación, para facilitar de alguna manera un destino correcto *in vivo*. Esto lo hacen por plegamiento, por uniones oligoméricas, por transporte a un particular compartimento celular, o por eliminación por degradación [24, 25]. Las chaperonas no determinan la estructura terciaria de la proteína pero ayuda a que ésta consiga la forma más estable.

Las funciones características de cada familia de chaperonas muestran que la de 90 kDa (HSP90), es quizás un tanto distinta a las demás, ya que es más “pasiva” ya que en la mayoría de los casos previene solo la agregación de conformeros proteicos inestables [26]. Se encuentra en bacterias y en todas las células eucariotas, aunque parece ser que aparentemente no se han encontrado en arqueas [27].

Su papel biológico es importante porque son proteínas que se han mantenido altamente conservadas a lo largo de la evolución [28].

La Hsp90 tiene dos isoformas α y β las cuales son idénticas en un 76% de su secuencia. La isoforma Hsp90- β es un tanto más larga que la Hsp90- α , y también son llamadas Hsp86 y Hsp84. La isoforma β está más expresada constitutivamente siendo menos inducible y lo contrario ocurre con la forma α . Ambas forman mayormente homodímeros, los cuales serán mayormente de la forma β por ser más estables por pequeñas diferencias en la dimerización del C-terminal [29, 30]. La Hsp90- β fue encontrada en el citoplasma, con una larga porción de proteína localizada en los alrededores de la envuelta nuclear [31]. Además con esta localización, esta isoforma puede ser fosforilada por la proteína quinasa dependiente del ADN de doble cadena en sus residuos de treonina del N-terminal [32]. La Hsp90- α predomina en cerebro y testículos y la β está enriquecida en otros órganos periféricos. La Hsp90 es un dímero fosforilado [32-35] que contiene entre 2 y 3 uniones covalentes de moléculas de fosfato por monómero [36]. La dimerización es necesaria para la función vital de la proteína [37].

El gen que codifica para la Hsp90- α es el 14q32.3. También se han visto segmentos cromosómicos como el 1q21.2-q22, 4q35 y 11p14.1-p14.2 que probablemente contengan pseudogenes para esta isoforma [38, 39]. La forma Hsp90- β expresada constitutivamente está codificada por el gen 6p21, y también se han encontrado dos pseudogenes en los cromosomas 4q21-q25, y 15pter-q21 [40, 41].

De forma general su expresión es baja en condiciones normales, pero se incrementa en situaciones de estrés [42, 43]. Aunque hay estudios que han demostrado que los niveles basales de algunas proteínas de choque térmico, van aumentando con la edad en PBMC. Además se ha comprobado que los niveles de Hsp90 y otras proteínas de este tipo como Hsp32 o Hsp70, están relacionados con la presencia de citoquinas inflamatorias del tipo de IFN- γ , IL-6, IL-10 y TNF- α [44].

En relación al LES se ha visto relación entre esta proteína y la enfermedad [45]. De forma general hay más trabajos que han demostrado y establecido que los niveles de Hsp90 están aumentados en pacientes con LES [46-48], tanto en PBMC como en sueros, no observándose incrementos de otras proteínas de choque térmico.

Esto puede conllevar a que al haber una mayor número de Hsp90 se pueda inducir la producción de autoanticuerpos frente a esta proteína.

Por ejemplo, se ha podido ver la presencia de autoanticuerpos frente a Hsp90 en sueros de una significativa proporción de pacientes con esta enfermedad. En concreto se han encontrado anti Hsp90 de clase IgG en un 50% [49] y en un 26% [50] de una población seleccionada de pacientes mientras que del tipo IgM se ha detectado el 35% [50]. Pero cabe decir que también se pueden observar autoanticuerpos de este tipo en personas sanas aunque no en estas proporciones [51].

Esta elevada cantidad fue además correlacionada con daño renal y bajos niveles de C3 [50]. Además se puede confirmar que la presencia de Hsp90 en depósitos renales es característica de lupus ya que en las biopsias de pacientes con glomerulonefritis pero sin LES no aparece esta proteína [45].

Y aunque es una proteína fundamentalmente citoplasmática también se ha podido ver expresada en superficie de PBMC en aproximadamente el 25% de pacientes en el que se hizo el estudio teniendo en cuenta que eran pacientes activos [52].

También se ha visto que el aumento de Hsp90 en PBMCs de pacientes con LES va asociado al incremento de la transcripción del gen para la forma Hsp90- β [53], pudiendo ésta estar inducida por las citoquinas IL-6 [54] e IL-10 [55], que también están aumentadas en pacientes con esta enfermedad [56, 57], y correlacionadas con la actividad de la enfermedad.

Estos datos también están confirmados en la cepa de ratón MRL/lpr donde los datos son prácticamente idénticos [28].

2.-MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1.- PACIENTES Y CONTROLES

Se han tomado 30 muestras de pacientes previamente diagnosticados según los criterios de reumatología americano (ACR), y se han seguido de forma rutinaria

por la unidad de enfermedades autoinmunes sistémicas del Hospital Clínico San Cecilio de Granada que ha participado en el estudio. La actividad de la enfermedad viene medida según el índice de SLEDAI [58].

También hemos analizado 16 muestras de personas sanas voluntarias que han servido como controles. Todos son de raza caucásica.

En las pruebas clínicas se pueden incluir células de sangre completa, complemento de suero y suero antinuclear y también se analizaron anticuerpos anti-DNA en todos los pacientes.

2.2.- EXTRACCIÓN DE CÉLULAS

Las PBMCs se han obtenido mediante centrifugación en gradiente de densidad con Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich química S.A Spain).

A continuación se lisaron en el detergente NP40 (1% Nonidet P-40), durante 30 minutos a 4°C, para posteriormente hacer una precipitación con metanol/cloroformo para concentrar aún más el total de proteínas de nuestras muestras.

Extraemos una pequeña alícuota de 500.000 células que diluimos en el “sample buffer” Laemmli 3x reducido para western-blot.

Las células se solubilizan en el Ready prep. 2-D Rehydration/Sample Buffer 1, que contiene 7M urea, 2M thiourea, 1% ASB-14 y 40mM Tris, para electroforesis bidimensional.

2.3.- ELECTROFORESIS MEDIANTE GELES DE DOS DIMENSIONES.

Los geles 2-DE corren usando el Protean IEF y el sistema CRITERION de Bio-Rad [59] (Anexo I). Las tiras IPG en este caso han sido de 11 cm y su pH va de 3 a 10, o de 4.7 a 5.9. Los geles en este caso son teñidos con *Sypro Rubi* y con *Biosafe Commassie* [59]. Para ver fosforilaciones la tinción se realiza con el *Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain*, de Molecular Probes (Invitrogen), comenzando por la fijación del gel a temperatura ambiente (50% metanol, 10% acético), durante 60 minutos. Se repite la fijación toda la noche. Se hacen tres lavados del gel durante 15

minutos con agua bidestilada, para pasar a la tinción con Pro-Q Diamond durante 2 horas. El gel se destiñe durante 1 hora y media con una solución que lleva 20% de acetonitrilo y 50mM de acetato sódico. Se hace un último lavado de 5 minutos y se pasa a revelar con el sistema Typhoon 9400.

La digestión e identificación de proteínas se realiza de forma idéntica a la de nuestro trabajo previo del Anexo I [59].

2.4.- ELECTROFORESIS MEDIANTE WESTERN BLOT

En este caso, los geles son de acrilamida al 15%. La cantidad cargada por pocillo ha sido de 500.000 células diluidas en el "sample buffer" Laemmli 3x reducido.

Los anticuerpos utilizados han sido:

Calgranulin A (FL-83) rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology.

Calgranulin B (H-90) rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology.

HSP90 a/b (H-114) rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology.

HSP70 (W-27) mouse monoclonal IgG_{2a}, Santa Cruz Biotechnology.

Las membranas obtenidas fueron escaneadas en el GS-800 Calibrated Densitometer de Bio-Rad

3.- RESULTADOS.

3.1.- CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS 107 PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR MALDI-TOF EN PBMCs

En un principio comenzamos enviando a identificar cualquier proteína que nos pudiera parecer de interés, bien por su peso molecular, bien por la zona en la que se encontraban (zona básica o ácida del gel), bien por sus diferencias de expresión, y gracias a ello hemos identificado un total de 107 proteínas diferentes, las cuales pertenecen a distintos grupos, según su función en el organismo o el lugar en el que se encuentran.

Clasificación según su LOCALIZACIÓN MOLECULAR:

Data base	Name protein	Match to...	Score Mascot	Score MS-FIT	Queries matched	Sequence Coverage	Molecular weight	pI
-----------	--------------	-------------	--------------	--------------	-----------------	-------------------	------------------	----

Cell Junction

SwissProt	Beta-parvin (Affixin)	Q9HBI1-00-01-00	164		13	38%	41717	6.26
		Q9HBI1		1.035x10e+07	13	38%	41715	6.3
SwissProt	Integrin-linked protein kinase	ILK Human	52		8	23%	51899	8.3
SwissProt	Vinculin	VINC HUMAN (P18206)	207		31	29%	124161	5.51

Cytoplasm

SwissProt	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxilating	6PGD HUMAN (P52209)	74		9	28%	53488	6.88
SwissProt	14-3-3 Protein zeta/delta (KCIP-1)	P63104	150		14	49%	27899	4.73
				9.352x10e+06	14	49%	27745	4.7
SwissProt	Beta actin	ACTB Human	100		10	35%	42052	5.29
	Gamma Actin	ACTG Human	100		10	35%	42108	5.31
SwissProt	Alpha enolase	ENOA Human	128		15	51%	47350	6.99
SwissProt	Annexin A1	P04083	141		12	47%	38787	6.64
SwissProt	Annexin A5	P08758	76		7	29%	35840	4.94
				6.493x10e+04	7	29%	35937	4.9
SwissProt	ARP2/3 Complex 34 kDa subunit (actin-related)	O15144	101		9	34%	34426	6.84
				3.036x10e+04	9	37%	34333	6.8
SwissProt	Botulinum toxin	P15153-00-00-00	73		7	32%	21814	7.52
				1,069x10e+04	7	20%	21429	7.5
SwissProt	Calgizzarin (S100A11)	S10AB Human	71		7	56%	11847	6.56
SwissProt	Calgranulin A (S100A8)	S10A8 Human	117		9	52%	10885	6.51
SwissProt	Calgranulin B (S100A9)	S10A9	162		15	72%	13291	5.71
SwissProt	Calreticulin Precursor	P27797	145		12	36%	48283	4.29
				1.041x10e+07	12	36%	48142	4.3
SwissProt	Carbonic anhydrase II	P0918-00-01-00	111		9	46%	29194	6.89
		P00918		3,090x10e+06	10	34%	29246	6.9

Cytoplasm

SwissProt	Chloride intracellular channel protein 1	O00299	184		13	59%	27117	5.09
				7.609x10e+07	14	64%	26923	5.1
SwissProt	Coactosin like protein	COTL1 Human	71		7	54%	16049	5.54
SwissProt	Cofilin-1	COF1 Human (P23528)	111		10	61%	18588	8.26
SwissProt	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (Cyclophilin A)	P62937	166		12	74%	18098	7.82
SwissProt	Cystatin B	CYTB Human (P04080)	60		5	55%	11190	6.96
SwissProt	Protein DJ-1 (oncogene DJ1)	PARK7 Human (Q99497)	72		7	60%	20050	6.33
SwissProt	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	EF1G Human	90		11	39%	50298	6.27
SwissProt	Eucariotic translation initiation factor 5A-1	IF5A1 Human	55		5	42%	17049	5.08
SwissProt	F-actin capping protein beta subunit	P47756-01-00-00	91		8	35%	30820	5.69
SwissProt	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA Human (P04075)	202		19	63%	39720	8.39
SwissProt	Gelsolin precursor (actin-depolymerizing factor)	P06396-00-00-00	117		13	20%	86043	5.9
		P06396		3.240x10e+07	13	20%	85698	5.9
SwissProt	Glia maturation factor gamma	GMFG human	53		5	38%	16961	5.18
SwissProt	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P Human (P04406)	136		17	47%	36070	8.58
SwissProt	Glutathione peroxidase 1	GPX1 Human (P07203)	88		9	61%	22227	6.15
SwissProt	Endoplasmic precursor Heat shock protein 90 kDa beta member 1	P14625	158		17	24%	92696	4.76
				1.809x10e+07	17	27%	92470	4.8
NCBIInr	Heat shock protein 90 kDa alpha	gi 40254816	169		22	38%	85020	4.94
SwissProt	Hemoglobin alpha subunit	P69905-00-102-00	31		3	29%	15217	9.07
SwissProt	Hemoglobin Subunit beta	HBB HUMAN (P68871)	156		10	80%	15971	6.81

Cytoplasm

SwissProt	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA Human (P00338)	102		11	46%	36819	8.46
SwissProt	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB Human	108		12	44%	36900	5.71
SwissProt	L-plastin (lymphocyte cytosolic protein 1)	P13796-00-00-00	168		15	30%	70815	5.2
		P13796		1.995x10e+06	15	30%	70290	5.2
SwissProt	Moesin	MOES human	107		14	29%	67761	6.09
SwissProt	Myosin-9	MYH9 HUMAN (P35579)	191		36	20%	227515	5.5
SwissProt	Myosin light polypeptide 6	P60660-00-00-00	92		8	58%	16959	4.56
SwissProt	Myosin regulatory light chain 2 (Myosin RLC)	P19105	119		10	67%	19707	4.67
SwissProt	Myotropihin	MTPN Human	56		5	57%	13058	5.27
SwissProt	Peroxiredoxin 6	P30041	137		10	57%	25002	6.02
				8.834x10e+04	9	37%	25035	6
SwissProt	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1 Human (P00558)	54		9	33%	44854	8.3
NCBIInr	Phosphoglycerate mutase 1			2,828x10e+04	6	17%	28804	6.7
SwissProt	Pleckstrin (platelet P47 protein)	PLEK Human	130		13	51%	40471	8.5
SwissProt	Profilin-1	PROF1 Human (P07737)	85		9	58%	15085	8.48
SwissProt	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1 Human	58		7	33%	28876	5.78
SwissProt	Proteasome subunit alpha type 7	PSA7 Human (O14818)	53		7	31%	28041	8.6
SwissProt	Purine nucleoside phosphorylase	P00491-00-01-00	111		10	48%	32325	6.45
		P00491		3.159x10e+05	9	36%	32148	6.5
SwissProt	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	KPYM Human (P14618)	179		19	45%	58339	7.95
SwissProt	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDIB HUMAN (P50395)	74		11	38%	51087	6.11
SwissProt	Rho GDP dissociation inhibitor 1	GDIR Human	97		11	70%	23031	5.1
SwissProt	Rho-GDP dissociation inhibitor 2	GDIS Human	148		12	69%	23031	5.1

Cytoplasm

SwissProt	SH3 Domain binding glutamic acid	SH3L1 Human	98		8	72%	12766	5.22
SwissProt	Superoxide dismutase	SODM Human (P04179)	55		5	24%	24878	8.35
SwissProt	Talin-1	TLN1 HUMAN (Q9Y490)	74		18	11%	271766	5.77
SwissProt	Thioredoxin	THIO Human	61		5	88%	12015	4.82
NCBIInr	Titin			1,371x10e+10	33	62%		6
SwissProt	Tropomyosin-1 alpha	TPM1 Human	53		8	25%	32746	4.69
SwissProt	Tropomyosin alpha-3 chain (Tropomyosin-3)	TPM3 Human	74		10	27%	32856	4.68
SwissProt	Tropomyosin alpha-4 chain (Tropomyosin-4)	TPM4 Human	164		17	57%	28619	4.67
SwissProt	Tubulin alpha-1 chain	P68363	215		18	51%	50804	4.94
	Tubulin alpha-2 chain	P05213		2.305x10e+12	18	51%	50125	4.9
SwissProt	Tubulin alpha-6 chain	Q9BQE3	66		7	20%	50548	4.96
			□	4.461x10e+04	7	20%	49896	5
SwissProt	Tubulin beta-1 chain	Q9H4B7	295		21	55%	50865	5.05
		13562114		1.449x10e+12	21	55%	50327	5.1
SwissProt	Tubulin beta-2 chain	P07437	155		15	40%	50095	4.78
					6.937x10e+09	15	55%	49671
SwissProt	Tubulin beta chain (tubulin beta-5 chain)	TBB5 Human	204		20	56%	50095	4.78
SwissProt	Ubiquitin	UBIQ Human (P62988)	60		5	61%	8560	6.56
	Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)	P50552	62		8	29%	39845	9.05
SwissProt	Vinculin	VINC HUMAN (P18206)	207		31	29%	124161	5.51

Cytoplasmic vesicle

SwissProt	Annexin A2	P07355-00-00-00	197		17	52%	38677	7.56
		P07355		4.272x10e+10	17	58%	38604	7.6

Cytoplasmic vesicle

SwissProt	Eosinophil lysophospholipase	Q05315-00-00-00	66		6	49%	16543	6.8
SwissProt	Peroxisredoxin 6	P30041	137		10	57%	25002	6.02
				8.834x10e+04	9	37%	25035	6

Endoplasmic reticulum

SwissProt	Choline-phosphate cytidyltransferase B	PCY1B	50		8	27%	42199	5.99
-----------	--	-------	----	--	---	-----	-------	------

Endoplasmic reticulum lumen

SwissProt	Calreticulin Precursor	P27797	145		12	36%	48283	4.29
				1.041x10e+07	12	36%	48142	4.3
SwissProt	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (Cyclophilin B)	PPIB Human (P23284)	54		7	37%	22785	9.33
SwissProt	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	ERP29 Human	60		7	39%	29032	6.77
SwissProt	Heat shock 70 kDa (78 kDa glucose-regulated protein precursor)	GRP78 Human	284		27	46%	72402	5.07
SwissProt	Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	215		17	39%	57480	4.76
				1.911x10e+11	17	39%	57117	4.8
SwissProt	Protein disulfide isomerase A3 (ER60) precursor	PDIA3 Human	188		20	38%	57146	5.98

Golgi

MSDB	ADP-ribosilation factor 3	A41570	68		6	43%	20645	6.84
	ADP-ribosilation factor 1	A33283	68		6			

Lysosome

SwissProt	Peroxisredoxin 6	P30041	137		10	57%	25002	6.02
				8.834x10e+04	9	37%	25035	6

Melanosome

SwissProt	14-3-3 Protein zeta/ delta (KCIP-1)	P63104	150		14	49%	27899	4.73
				9.352x10e+06	14	49%	27745	4.7
SwissProt	Annexin A2	P07355-00-00-00	197		17	52%	38677	7.56
		P07355		4.272x10e+10	17	58%	38604	7.6
SwissProt	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (Cyclophilin B)	PPIB Human (P23284)	54		7	37%	22785	9.33
SwissProt	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	ERP29 Human	60		7	39%	29032	6.77
SwissProt	Heat shock 70 kDa (78 kDa glucose-regulated protein precursor)	GRP78 Human	284		27	46%	72402	5.07
SwissProt	Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	215		17	39%	57480	4.76
				1.911x10e+11	17	39%	57117	4.8

Mitochondrion

SwissProt	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P06576	258		22	48%	56525	5.26
				5.977x10e+13	22	48%	56560	5.3
SwissProt	Citrate synthase, mitochondrial precursor	CISY Human	60		8	19%	51908	8.45
SwissProt	Protein DJ-1 (oncogene DJ1)	PARK7 Human (Q99497)	72		7	60%	20050	6.33
SwissProt	Prohibitin	P35232-00-00-00	66		6	33%	29843	5.57
		P35232		1.334x10e+04	6	26%	29804	5.6
SwissProt	Septin-4	SEPT4 HUMAN (O43236)	61		8	21%	55064	5.77
NCBIInr		gi 4758942	61		9	21%	55520	5.77
SwissProt	Voltage dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3)	VDAC3 Human (Q9Y277)	60		7	39%	30981	8.85

Nuclear Membrane

SwissProt	Moesin	MOES human	107		14	29%	67761	6.09
SwissProt	Trasngelin-2	P37802	129		12	70%	22417	8.45

Nucleus

SwissProt	Alpha enolase	ENOA Human	128		15	51%	47350	6.99
SwissProt	Calgizzarin (S100A11)	S10AB Human	71		7	56%	11847	6.56
SwissProt	Chloride intracellular channel protein 1	O00299	184		13	59%	27117	5.09
				7.609x10e+07	14	64%	26923	5.1
SwissProt	Cofilin-1	COF1 Human (P23528)	111		10	61%	18588	8.26
SwissProt	Cyclin-H	CCNH Human	55		7	18%	38075	6.73
SwissProt	Cystatin B	CYTB Human (P04080)	60		5	55%	11190	6.96
SwissProt	Protein DJ-1 (oncogene DJ1)	PARK7 Human (Q99497)	72		7	60%	20050	6.33
SwissProt	EH-domain- containing protein 3	EHD3 Human	84		15	31%	61971	6.06
NCBIInr	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1			2.64x10e+04	8	25%	28412	4.8
SwissProt	Metastasin, S100A4	P26447	54		6	42%	11949	5.85
SwissProt	Myosin-9	MYH9 HUMAN (P35579)	191		36	20%	227515	5.5
SwissProt	Proteasome subunit alpha type 7	PSA7 Human (O14818)	53		7	31%	28041	8.6
SwissProt	Septin-4	SEPT4 HUMAN (O43236)	61		8	21%	55064	5.77
NCBIInr		gi 4758942	61		9	21%	55520	5.77
SwissProt	Septin-7	Q16181	72		11	40%	50933	8.76
SwissProt	SH3 Domain binding glutamic acid	SH3L1 Human	98		8	72%	12766	5.22
NCBIInr	Titin			1,371x10e+10	33	62%		6
SwissProt	Ubiquitin	UBIQ Human (P62988)	60		5	61%	8560	6.56

Plasme Membrane

SwissProt	Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP-1)	CAP1 Human	102		13	35%	52091	8.29
SwissProt	ADP-ribosilation factor 1	A33283	68		6			
SwissProt	Alpha enolase	ENOA	128		15	51%	47350	6.99
SwissProt	Annexin A2	P07355-00-00-00	197		17	52%	38677	7.56
		P07355		4.272x10e+10	17	58%	38604	7.6
SwissProt	Botulinum toxin	P15153-00-00-00	73		7	32%	21814	7.52
				1,069x10e+04	7	20%	21429	7.5
SwissProt	Chloride intracellular channel protein 1	O00299	184		13	59%	27117	5.09
				7.609x10e+07	14	64%	26923	5.1
SwissProt	Erythrocyte band 7 integral membrane protein (Stomatin)	STOM Human	72		9	41%	31751	7.9
SwissProt	Integrin alpha lib precursor	ITA2B HUMAN (P08514)	132		18	22%	114460	5.21
MSDB	MHC class II antigen	Q2PBC3 Human	38		3	40%	10800	5.67
SwissProt	Myosin-9	MYH9 HUMAN (P35579)	191		36	20%	227515	5.5
SwissProt	Prohibitin	P35232-00-00-00	66		6	33%	29843	5.57
		P35232		1.334x10e+04	6	26%	29804	5.6
SwissProt	Protein disulfide-isomerase precursor (en algunos casos)	P07237	215		17	39%	57480	4.76
				1.911x10e+11	17	39%	57117	4.8
SwissProt	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDIB HUMAN (P50395)	74		11	38%	51087	6.11
SwissProt	Ras-related protein Rab-14	P61106-00-00-00	56		5	31%	24140	5.85
SwissProt	Ras-related protein Rap-1b precursor	RAP1B Human (P61224)	124		11	62%	21040	5.65
SwissProt	Ras suppressor protein 1	Q15404	90		9	53%	31390	8.57
SwissProt	Talin-1	TLN1	74		18	11%	271766	5.77

Plasme Membrane

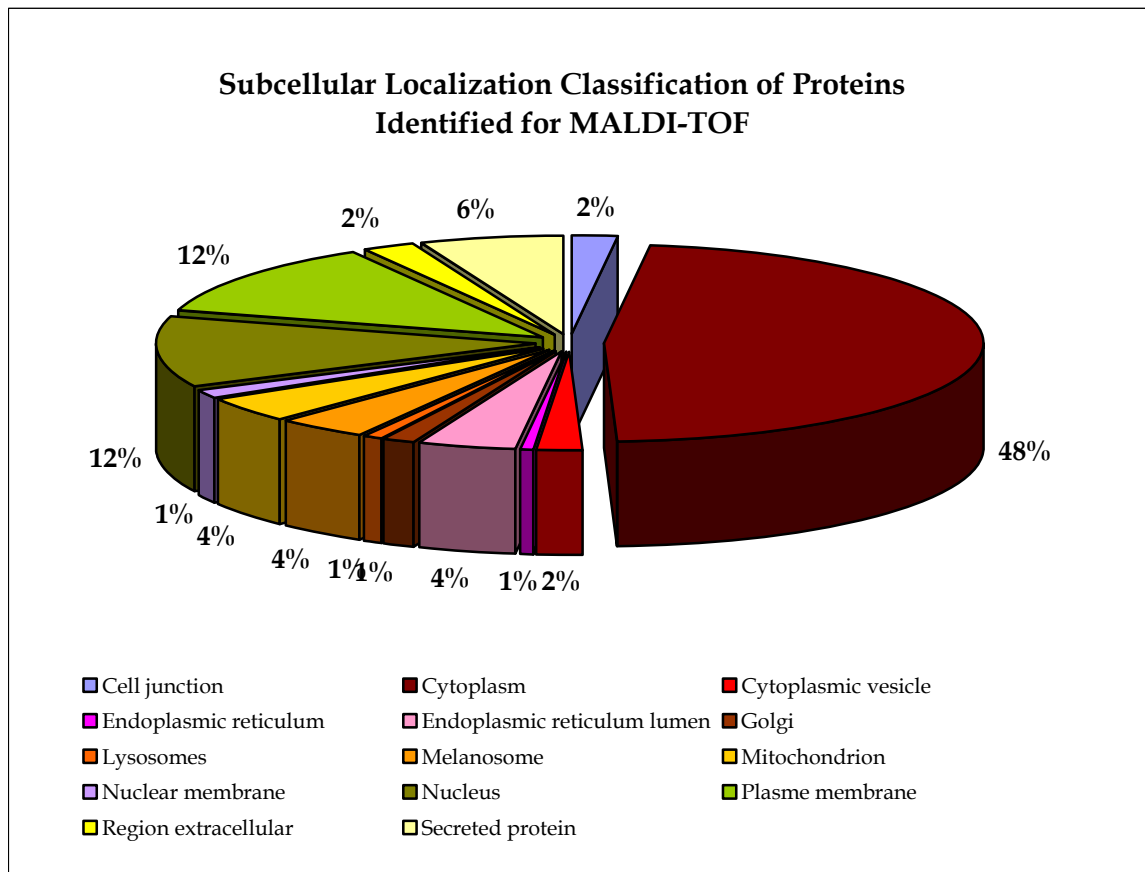
SwissProt	Trasngelin-2	P37802	129		12	70%	22417	8.45
-----------	--------------	--------	-----	--	----	-----	-------	------

Region extracellular

MSDB	Inmunoglobulin heavy chain variable region	AAM87838	60		4	71%	6746	8.83
SwissProt	Platelet basic protein precursor (CXCL7)	P02775	104		8	44%	14171	9.04
SwissProt	Serum albumin precursor	P02768-00-16-00	54		7	14%	71318	5.79

Secreted protein

SwissProt	Annexin A2	P07355-00-00-00	197		17	52%	38677	7.56
		P07355		4.272x10e+10	17	58%	38604	7.6
SwissProt	Calgranulin A (S100A8)	S10A8 Human	117		9	52%	10885	6.51
SwissProt	Calgranulin B (protein S100A9)	S10A9	162		15	72%	13291	5.71
SwissProt	Calreticulin Precursor	P27797	145		12	36%	48283	4.29
				1.041x10e+07	12	36%	48142	4.3
SwissProt	Fibrinogen beta chain precursor	P02675-00-09-00	268		22	45%	56549	8.54
SwissProt	Fibrinogen gamma chain precursor	P02679-01-14-00	257		18	57%	49863	5.8
		P02679		2.164x10e+12	18	55%	51512	5.4
SwissProt	Gelsolin precursor (actin-depolymerizing factor)	P06396-00-00-00	117		13	20%	86043	5.9
		P06396		3.240x10e+07	13	20%	85698	5.9
SwissProt	Neutrophil defensin 1 precursor	DEF1 Human (P59665)	35		3	18%	10536	6.54
SwissProt	Thrombospondin 1 precursor	P07996	123		10	12%	133321	4.71



Clasificación según su FUNCIÓN MOLECULAR:

Data base	Name protein	Match to...	Score Mascot	Score MS-FIT	Queries matched	Sequence Coverage	Molecular weight	pI
-----------	--------------	-------------	--------------	--------------	-----------------	-------------------	------------------	----

Signal Transduction: Cell Communication

SwissProt	14-3-3 Protein zeta/delta (KCIP-1)	P63104	150		14	49%	27899	4.73
				9.352x10e+06	14	49%	27745	4.7
SwissProt	Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP-1)	CAP1 Human	102		13	35%	52091	8.29
MSDB	ADP-ribosilation factor 3	A41570	68		6	43%	20645	6.84
	ADP-ribosilation factor 1	A33283	68		6			
SwissProt	Annexin A1	P04083	141		12	47%	38787	6.64
SwissProt	Annexin A2	P07355-00-00-00	197		17	52%	38677	7.56
		P07355		4.272x10e+10	17	58%	38604	7.6

Signal Transduction: Cell Communication

SwissProt	Annexin A5	P08758	76		7	29%	35840	4.94
				6.493x10e+04	7	29%	35937	4.9
SwissProt	Beta-parvin (Affixin)	Q9HBI1-00-01-00	164		13	38%	41717	6.26
		Q9HBI1		1.035x10e+07	13	38%	41715	6.3
SwissProt	Botulinum toxin	P15153-00-00-00	73		7	32%	21814	7.52
				1,069x10e+04	7	20%	21429	7.5
SwissProt	Calgizzarin (S100A11)	S10AB Human	71		7	56%	11847	6.56
SwissProt	Calgranulin A (S100A8)	S10A8 Human	117		9	52%	10885	6.51
SwissProt	Calgranulin B (S100A9)	S10A9	162		15	72%	13291	5.71
SwissProt	Chloride intracellular channel protein 1	O00299	184		13	59%	27117	5.09
				7.609x10e+07	14	64%	26923	5.1
SwissProt	Cofilin-1	COF1 Human (P23528)	111		10	61%	18588	8.26
SwissProt	Protein DJ-1 (oncogene DJ1)	PARK7 Human (Q99497)	72		7	60%	20050	6.33
SwissProt	Integrin-linked protein kinase	ILK Human	52		8	23%	51899	8.3
SwissProt	Integrin alpha lib precursor	ITA2B HUMAN (P08514)	132		18	22%	114460	5.21
SwissProt	Metastasin, S100 A4, (Placental calcium-binding protein)	P26447	54		6	42%	11949	5.85
SwissProt	Platelet basic protein precursor (CXCL7)	P02775	104		8	44%	14171	9.04
NCBIr	Crystal structure of connective tissue activating peptide	gi 34810160	114		8	67%	9514	7.85
SwissProt	Pleckstrin (platelet P47 protein)	PLEK Human	130		13	51%	40471	8.5
SwissProt	Prohibitin	P35232-00-00-00	66		6	33%	29843	5.57
		P35232		1.334x10e+04	6	26%	29804	5.6
SwissProt	Protein disulfide isomerase A3 (ER60) precursor	PDIA3 Human	188		20	38%	57146	5.98
SwissProt	Rab GDP dissociation inhibitor beta	GDIB HUMAN (P50395)	74		11	38%	51087	6.11
SwissProt	Ras-related protein Rab-14	P61106-00-00-00	56		5	31%	24140	5.85

Signal Transduction: Cell Communication

SwissProt	Ras-related protein Rap-1b precursor	RAP1B Human (P61224)	124		11	62%	21040	5.65
SwissProt	Ras suppressor protein 1	Q15404	90		9	53%	31390	8.57
SwissProt	Rho GDP dissociation inhibitor 1	GDIR Human	97		11	70%	23031	5.1
SwissProt	Rho-GDP dissociation inhibitor 2	GDIS Human	148		12	69%	23031	5.1
SwissProt	SH3 Domain binding glutamic acid	SH3L1 Human	98		8	72%	12766	5.22
SwissProt	Thioredoxin	THIO Human	61		5	88%	12015	4.82
SwissProt	Thrombospondin 1 precursor	P07996	123		10	12%	133321	4.71
SwissProt	Vinculin	VINC HUMAN (P18206)	207		31	29%	124161	5.51

Energy Pathways

SwissProt	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	P06576	258		22	48%	56525	5.26
				5.977x10e+13	22	48%	56560	5.3
SwissProt	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA Human (P04075)	202		19	63%	39720	8.39
SwissProt	Peroxiredoxin 6	P30041	137		10	57%	25002	6.02
				8.834x10e+04	9	37%	25035	6
SwissProt	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1 Human (P00558)	54		9	33%	44854	8.3
NCBIInr	Phosphoglycerate mutase 1			2,828x10e+04	6	17%	28804	6.7
SwissProt	Piruvate kinase isozymes M1/M3	KPYM Human (P14618)	179		19	45%	58339	7.95
NCBIInr	Titin			1,371x10e+10	33	62%		6
SwissProt	Voltage dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3)	VDAC3 Human (Q9Y277)	60		7	39%	30981	8.85

Protein Metabolism

SwissProt	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	6PGD HUMAN (P52209)	74		9	28%	53488	6.88
SwissProt	Calreticulin Precursor	P27797	145		12	36%	48283	4.29
				1.041x10e+07	12	36%	48142	4.3
SwissProt	Carbonic anhydrase II	P0918-00-01-00	111		9	46%	29194	6.89
		P00918		3,090x10e+06	10	34%	29246	6.9
SwissProt	Citrate synthase, mitochondrial precursor	CISY Human	60		8	19%	51908	8.45
SwissProt	Cystatin B	CYTB Human (P04080)	60		5	55%	11190	6.96
SwissProt	Eosinophil lysophospholipase	Q05315-00-00-00	66		6	49%	16543	6.8
SwissProt	Glia maturation factor gamma	GMFG human	53		5	38%	16961	5.18
SwissProt	Glutathione peroxidase 1	GPX1 Human (P07203)	88		9	61%	22227	6.15
SwissProt	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P Human (P04406)	136		17	47%	36070	8.58
SwissProt	Heat shock 70 kDa (78 kDa glucose-regulated protein precursor)	GRP78 Human	284		27	46%	72402	5.07
SwissProt	Endoplasmic precursor Heat shock protein 90 kDa beta member 1	P14625	158		17	24%	92696	4.76
				1.809x10e+07	17	27%	92470	4.8
NCBIInr	Heat shock protein 90 kDa alpha	gi 40254816	169		22	38%	85020	4.94
SwissProt	Hemoglobin alpha subunit	P69905-00-102-00	31		3	29%	15217	9.07
SwissProt	Hemoglobin Subunit beta	HBB HUMAN (P68871)	156		10	80%	15971	6.81
SwissProt	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA Human (P00338)	102		11	46%	36819	8.46
SwissProt	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB Human	108		12	44%	36900	5.71
SwissProt	Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	215		17	39%	57480	4.76
				1.911x10e+11	17	39%	57117	4.8
SwissProt	Superoxide dismutase	SODM Human (P04179)	55		5	24%	24878	8.35
SwissProt	Ubiquitin	UBIQ Human (P62988)	60		5	61%	8560	6.56

Cell Growth and Maintenance

SwissProt	Beta actin	ACTB Human	100		10	35%	42052	5.29
	Gamma Actin	ACTG Human	100		10	35%	42108	5.31
SwissProt	Alpha enolase	ENOA Human	128		15	51%	47350	6.99
SwissProt	ARP2/3 Complex 34 kDa subunit (actin-related)	O15144	101		9	34%	34426	6.84
				3.036x10e+04	9	37%	34333	6.8
SwissProt	Beta-parvin (Affixin)	Q9HBI1-00-01-00	164		13	38%	41717	6.26
		Q9HBI1		1.035x10e+07	13	38%	41715	6.3
SwissProt	Cofilin-1	COF1 Human (P23528)	111		10	61%	18588	8.26
SwissProt	F-actin capping protein beta subunit	P47756-01-00-00	91		8	35%	30820	5.69
SwissProt	Gelsolin precursor (actin- depolymerizing factor)	P06396-00-00-00	117		13	20%	86043	5.9
		P06396		3.240x10e+07	13	20%	85698	5.9
SwissProt	L-plastin (lymphocyte cytosolic protein 1)	P13796-00-00-00	168		15	30%	70815	5.2
		P13796		1.995x10e+06	15	30%	70290	5.2
SwissProt	Metastasin, S100 A4, (Placental calcium-binding protein)	P26447	54		6	42%	11949	5.85
SwissProt	Myosin-9	MYH9 HUMAN (P35579)	191		36	20%	227515	5.5
SwissProt	Myosin light polypeptide 6	P60660-00-00-00	92		8	58%	16959	4.56
SwissProt	Myosin regulatory light chain 2 (Myosin RLC)	P19105	119		10	67%	19707	4.67
SwissProt	Myotropihin	MTPN Human	56		5	57%	13058	5.27
SwissProt	Profilin-1	PROF1 Human (P07737)	85		9	58%	15085	8.48
SwissProt	Septin-4	SEPT4 HUMAN(O43236)	61		8	21%	55064	5.77
NCBIInr		gi 4758942	61		9	21%	55520	5.77
SwissProt	Septin-7	Q16181	72		11	40%	50933	8.76
SwissProt	Talin-1	TLN1 HUMAN (Q9Y490)	74		18	11%	271766	5.77
SwissProt	Tropomyosin-1 alpha	TPM1 Human	53		8	25%	32746	4.69
SwissProt	Tropomyosin alpha-3 chain (Tropomyosin-3)	TPM3 Human	74		10	27%	32856	4.68
SwissProt	Tropomyosin alpha-4 chain (Tropomyosin-4)	TPM4 Human	164		17	57%	28619	4.67

Cell Growth and Maintenance

SwissProt	Tubulin alpha-1 chain	P68363	215		18	51%	50804	4.94
	Tubulin alpha-2 chain	P05213		2.305x10e+12	18	51%	50125	4.9
SwissProt	Tubulin alpha-6 chain	Q9BQE3	66		7	20%	50548	4.96
			□	4.461x10e+04	7	20%	49896	5
SwissProt	Tubulin beta-1 chain	Q9H4B7	295		21	55%	50865	5.05
		13562114		1.449x10e+12	21	55%	50327	5.1
SwissProt	Tubulin beta-2 chain	P07437	155		15	40%	50095	4.78
				6.937x10e+09	15	55%	49671	4.8
SwissProt	Tubulin beta chain (tubulin beta-5 chain)	TBB5 Human	204		20	56%	50095	4.78
SwissProt	Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)	P50552	62		8	29%	39845	9.05

Immune Response

SwissProt	Calgranulin A (S100A8)	S10A8 Human	117		9	52%	10885	6.51
SwissProt	Calgranulin B (protein S100A9)	S10A9	162		15	72%	13291	5.71
MSDB	Immunoglobulin heavy chain variable region	AAM87838	60		4	71%	6746	8.83
MSDB	MHC class II antigen	Q2PBC3 Human	38		3	40%	10800	5.67
SwissProt	Neutrophil defensin 1 precursor	DEF1 Human (P59665)	35		3	18%	10536	6.54
SwissProt	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1 Human	58		7	33%	28876	5.78

Protein Folding ; Peptide metabolism

SwissProt	Cyclophilin A	P62937	166		12	74%	18098	7.82
SwissProt	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (Cyclophilin B)	PPIB Human (P23284)	54		7	37%	22785	9.33
SwissProt	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	ERP29 Human	60		7	39%	29032	6.77

Protein Folding ; Peptide metabolism

SwissProt	Erythrocyte band 7 integral membrane protein (Stomatin)	STOM Human	72		9	41%	31751	7.9
SwissProt	Proteasome subunit alpha type 7	PSA7 Human (O14818)	53		7	31%	28041	8.6

Regulation of Nucleobase, Nucleoside and Nucleic Acid Metabolism

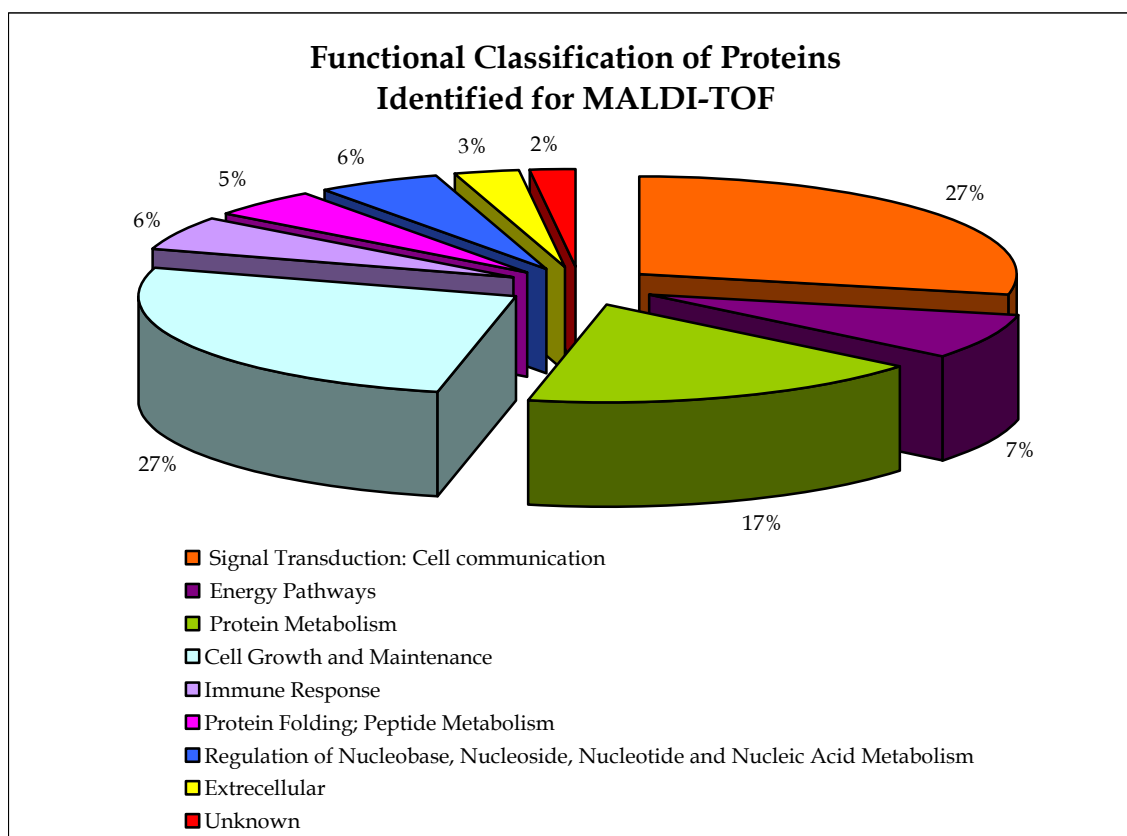
SwissProt	Calgizzarin (S100A11)	S10AB Human	71		7	56%	11847	6.56
SwissProt	Cyclin-H	CCNH Human	55		7	18%	38075	6.73
SwissProt	EH-domain-containing protein 3	EHD3 Human	84		15	31%	61971	6.06
SwissProt	Eucaruotic translation initiation factor 5A-1	IF5A1 Human	55		5	42%	17049	5.08
NCBIInr	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1			2,64x10e+04	8	25%	28412	4.8
SwissProt	Purine nucleoside phosphorylase	P00491-00-01-00	111		10	48%	32325	6.45
		P00491		3.159x10e+05	9	36%	32148	6.5

Extracellular

SwissProt	Fibrinogen beta chain precursor	P02675-00-09-00	268		22	45%	56549	8.54
SwissProt	Fibrinogen gamma chain precursor	P02679-01-14-00	257		18	57%	49863	5.8
		P02679		2.164x10e+12	18	55%	51512	5.4
SwissProt	Serum albumin precursor	P02768-00-16-00	54		7	14%	71318	5.79

Unknown

SwissProt	Coactosin like protein	COTL1 Human	71		7	54%	16049	5.54
SwissProt	Trasngelin-2	P37802	129		12	70%	22417	8.45



3.2.- ANÁLISIS DIFERENCIAL DE GELES DE PACIENTES CON LES Y CONTROLES.

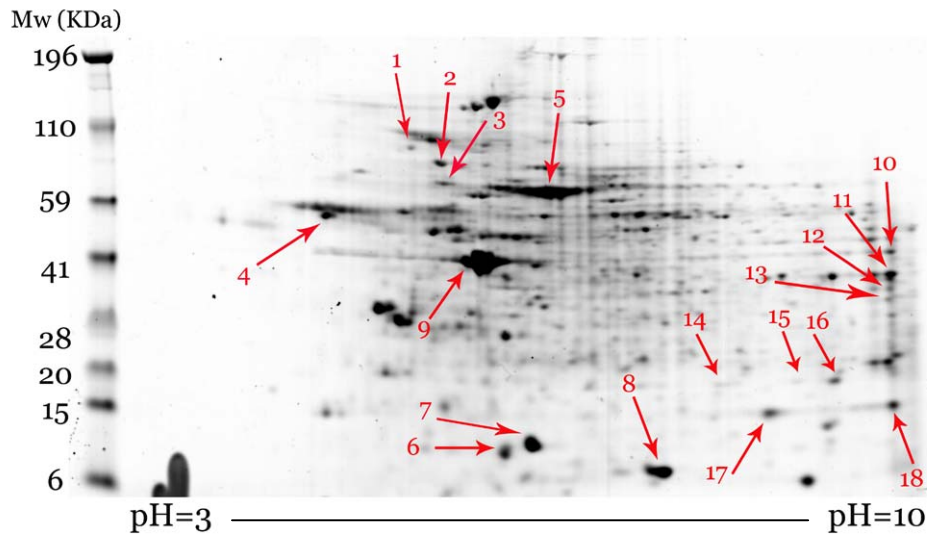
A continuación hemos realizado el análisis diferencial de las distintas muestras para ver qué proteínas pueden estar sobre-expresadas en la población paciente frente a la control, o al contrario.

Para ello hemos utilizado el programa PDQuest 7.2.0. y se han analizado conjuntamente hasta 29 geles, 15 de ellos correspondientes a muestras de controles sanos y 14 de pacientes con LES. Los geles son de 11cm y su pH va de 3 a 10. La cantidad de proteína cargada ha sido de 275 µg/gel.

Como en geles de células aparecen un número elevado de spots, nos hemos centrado en distintas zonas, como la zona básica del gel, la zona inferior de pesos

moleculares pequeños, y la zona de altos pesos moleculares y bajo pH, y de ahí hemos analizado los spots más representativos.

Así lo que hemos encontrado ha sido:



Spots analizados de interés:

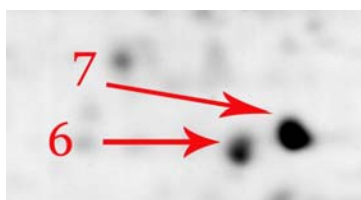
1. HSP90- β .
2. HSP90- α .
3. HSP70.
4. Calreticulin precursor.
5. Albumin.
6. Calgranulin B (S100A9).
7. Calgranulin B (S100A9).
8. Calgranulin A (S100A8).
9. Actin.
10. Fructosa Bisphosphate Aldolae A.
11. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.
12. L-lactate Dehydrogenase A Chain.
13. Ras Suppressor protein 1.
14. Peptidil-Prolyl cis-trans isomerase A o Cyclophilin A o Rotamase A.
15. Peptidil-Prolyl cis-trans isomerase A o Cyclophilin A o Rotamase A.
16. Peptidil-Prolyl cis-trans isomerase A o Cyclophilin A o Rotamase A.
17. Profilin-1.
18. Profilin-1.

3.3.- POSIBLES MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES EN LA CALGRANULINA B.

La Calgranulina B es una proteína que desde un principio despertó nuestro interés debido a las enormes diferencias que se presentaban entre pacientes con LES y controles.

Estas diferencias han sido analizadas tanto por geles bidimensionales, como por western blot, ya que era una forma de confirmar los resultados que habíamos obtenido previamente.

De la Calgranulina B podemos distinguir dos spots diferentes:



Nuestros resultados han demostrado que de estos dos spots, el número 7 es la Calgranulina B propiamente dicha, cuya secuencia peptídica es:

1 MTCKMSQLER NIETIINTFH QYSVKLGHPD TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK
51 KENKNEKVIE HIMEDLDTNA DKQLSFEEFI MLMARLTWAS HEKMHEGDEG
101 PGHHHKPGLG EGTP

mientras que el spot número 6 no es más que el resultado de una modificación post-traducciona del anterior.

Para conocer que tipo de modificación podría ser, hemos analizado las muestras mediante espectrometría de masas. De este modo hemos podido encontrar que esta proteína es susceptible de ser fosforilada en la treonina que posee en el carboxilo terminal.

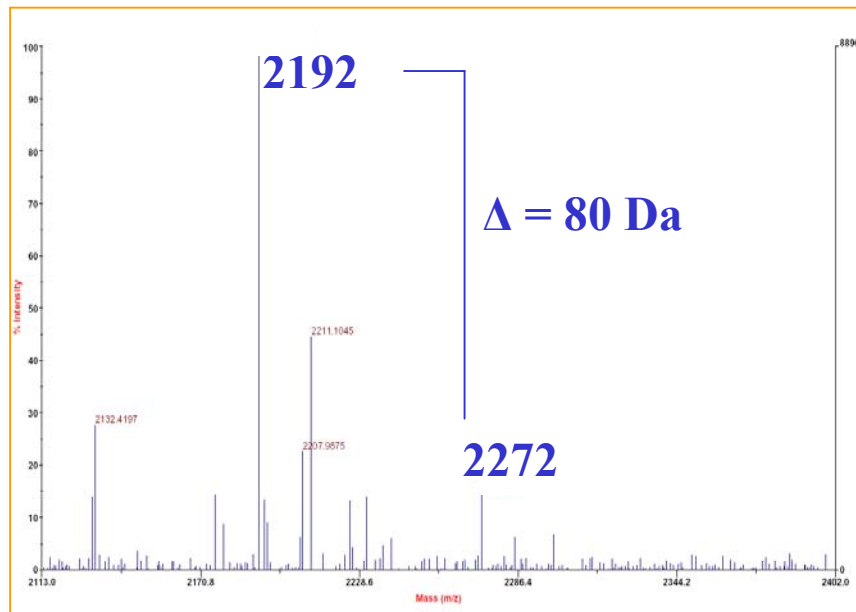
Mediante el análisis del spots 6 por espectrometría de masas, tras la digestión con tripsina, lo que encontramos fue un péptido con valor de m/z

2192.82 y otro que tenía 80 Da de diferencia con el primero encontrado siendo su m/z de 2272.69.

C-terminal tryptic peptide:

MHEGDEG PGHHHKPGLG EGTP

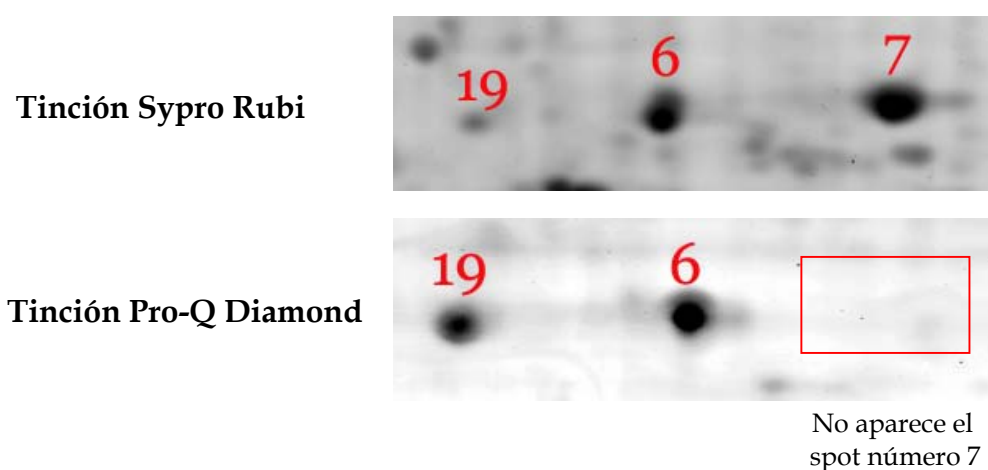
Este último péptido es el que nos daba el dato de la fosforilación puesto que el peso molecular de ión HPO_3^- es de 80 Da.



Pero además hemos podido ver que existe otra modificación en el mismo spot, debida a una forma truncada de la proteína que contiene 4 aminoácidos menos que la forma normal, y pensamos que al ser el quinto aminoácido una metionina, la proteína comienza a sintetizarse a partir de ésta, y por tanto el peso molecular disminuye en 410 Da.

410 Da
 ↓ ↓
 1 MTCKMSQLER NIETINTFH QYSVKLGHPD
 TLNQGEFKEL VRKDLQNFLK KENKNEKVE
 HIMEDLDTNA DKQLSFEEFI MLMARLTWAS
 HEKMHEGDEG PGHHHKPGLG EGTP 114

Debido a la unión del ión fosfórico, y a la pérdida de estos cuatro aminoácidos, se puede producir la aparición del spot 6. Para confirmarlo hemos realizado geles con la tinción Pro-Q Diamond, que sólo tiñe proteínas fosforiladas, y con un intervalo de pH que nos permita resolver mejor la zona de la Calgranulina B, que va únicamente desde 4.7 hasta 5.9. De esta forma lo que observamos es:

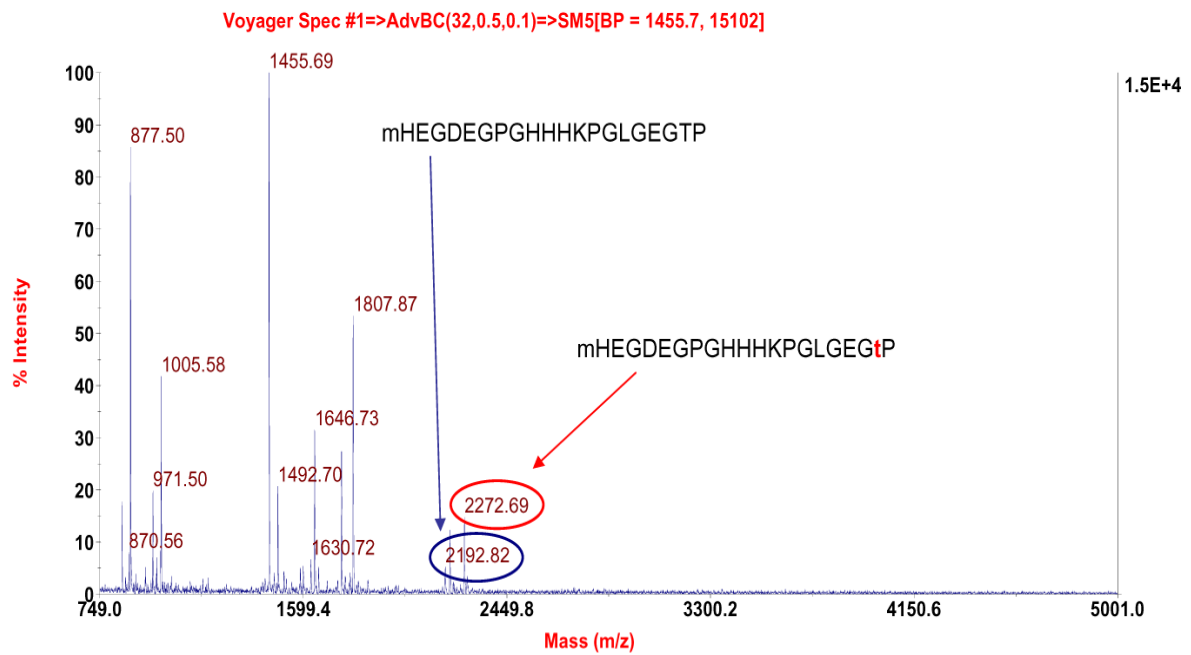


Mediante la tinción con Sypro Rubi vuelven a aparecer los spots 6 y 7, pero también encontramos otro nuevo spot al que hemos denominado 19, y que mediante espectrometría de masas hemos encontrado con un *score* significativo que también se trata de la Calgranulina B.

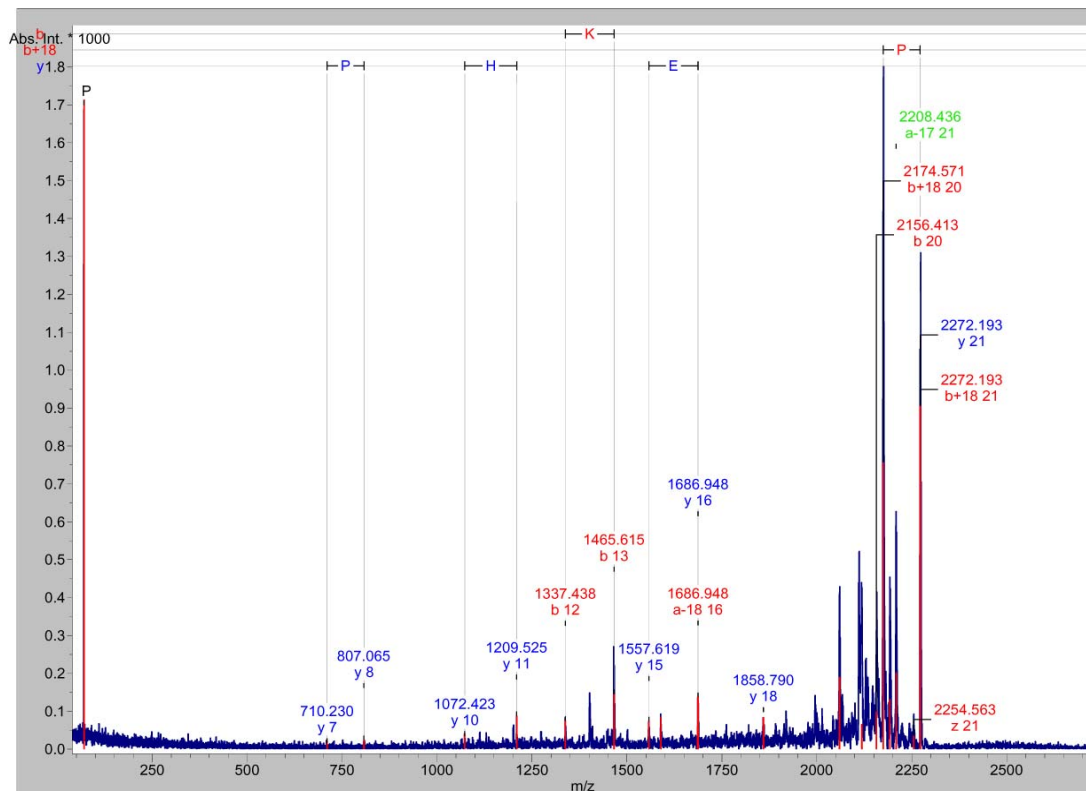
Podemos decir, por tanto que la Calgranulin B original (spot 7), es susceptible de ser fosforilada y cuando lo hace aparece un nuevo spot, que será el número 6, que a su vez también puede fosforilarse y generar el spot 19. Entre cada uno de ellos habrá una diferencia de 80 Da. El spot 7 no está fosforilado.

Mediante análisis por masas-masas (MS/MS), hemos podido identificar también las fosforilaciones:

SPOT 19 (fosforilado)

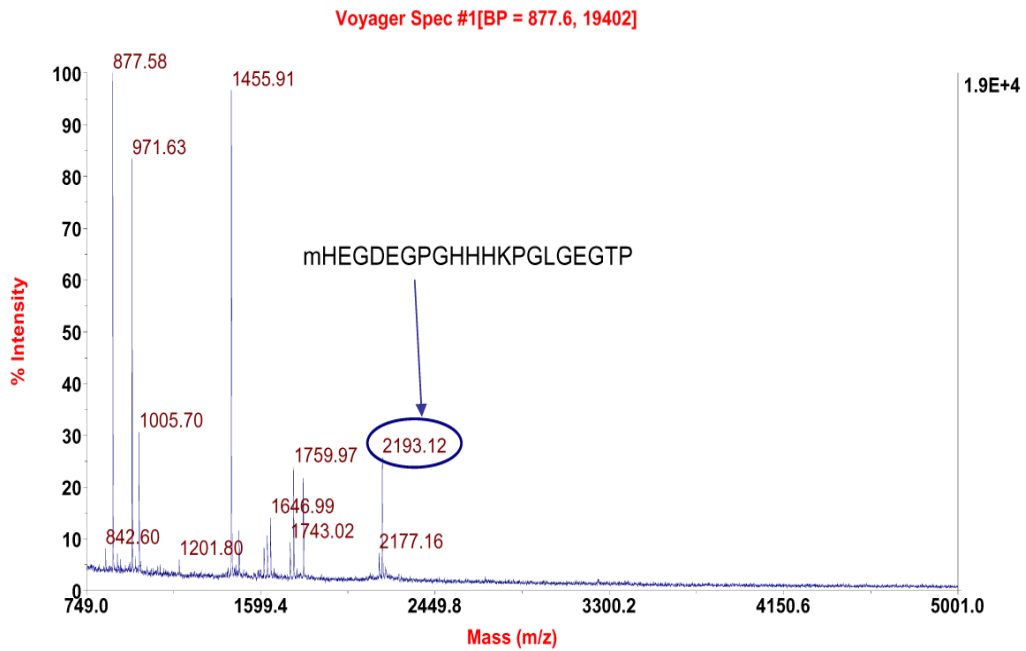


mHEGDEGPGHHHKPGLGEGtP

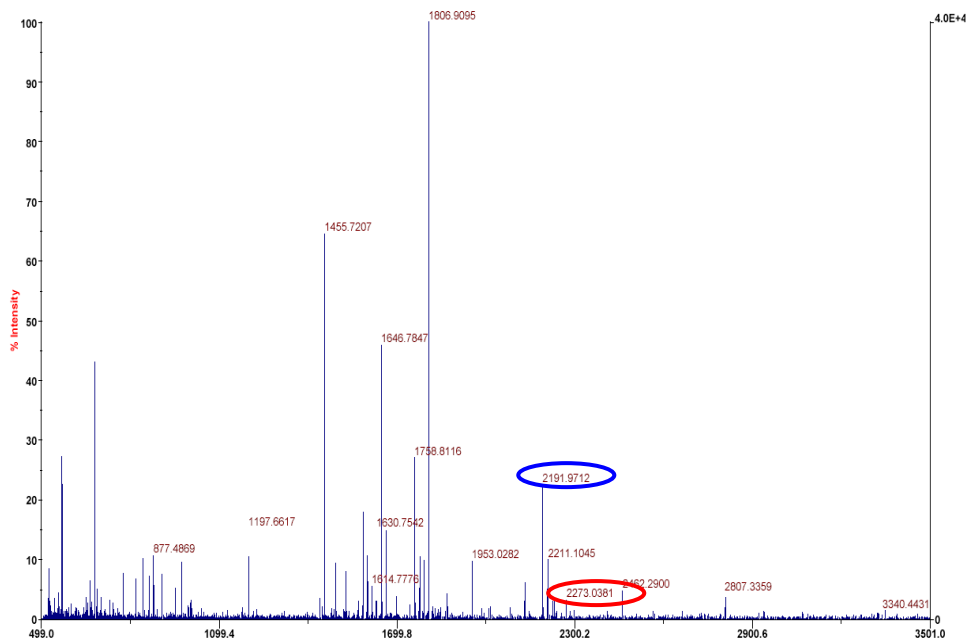


Estos datos están referidos a la secuencia del péptido fosforilado m/z 2272.69.

SPOT 6 (fosforilado o no fosforilado)

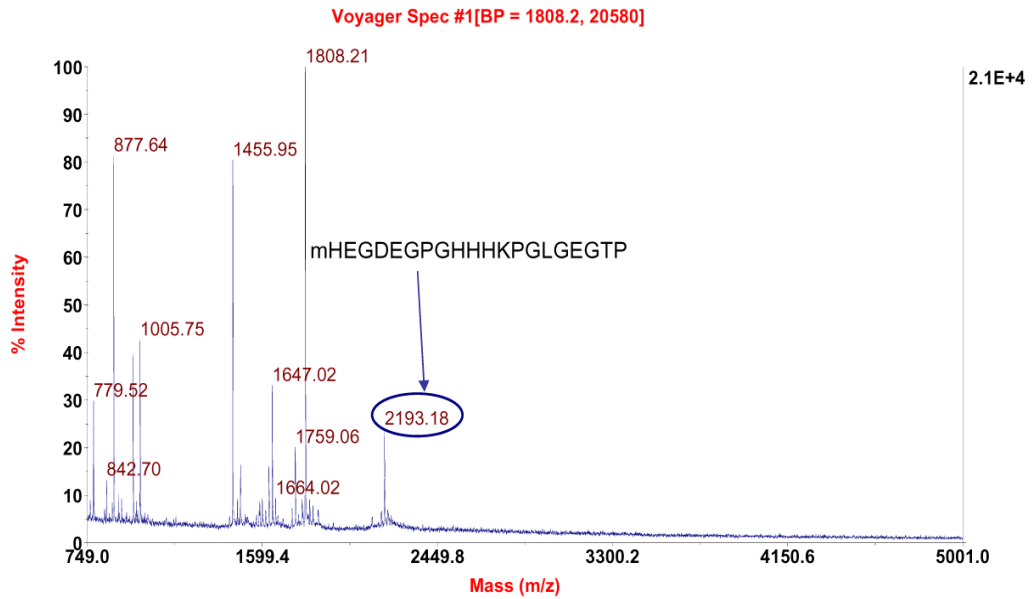


En este caso no se ha encontrado el péptido fosforilado, sino solo el m/z 2193.12 correspondiente a la proteína sin fosforilar



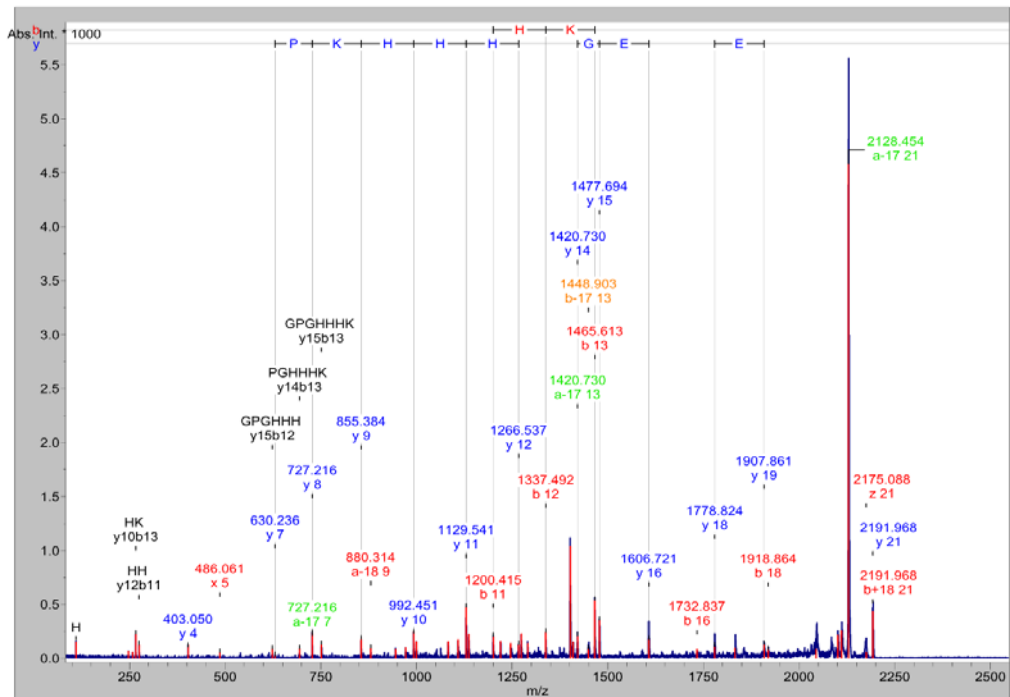
En este caso se ha analizado el mismo spot 6 y sin embargo si se han encontrado tanto el péptido fosforilado (rojo) m/z 2273.03, como el no fosforilado (azul), m/z 2191.97. Por ello pensamos que el spot 6 es una mezcla de dos formas distintas de Calgranulina B.

SPOT 7 (no fosforilado)



En este caso como era de esperar el único péptido que aparece es el correspondiente al péptido no fosforilado con m/z 2193.18.

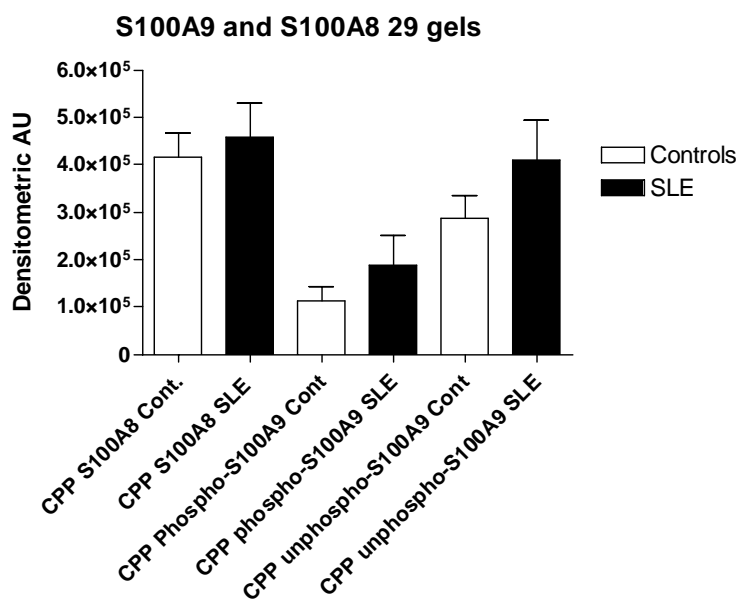
mHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP



Estos datos están referidos a la secuencia del péptido no fosforilado m/z 2193.18.

3.4.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS PROTEÍNAS S100A8 (Calgranulin A), S100A9 (Calgranulin B) y HSP90 MEDIANTE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

Los valores obtenidos mediante el análisis de los geles, utilizando el programa PDQuest son los siguientes:



Parece confirmarse el dato de que las tanto las proteínas Calgranulina A como la Calgranulina B se encuentran incrementadas en PBMCs de pacientes con LES.

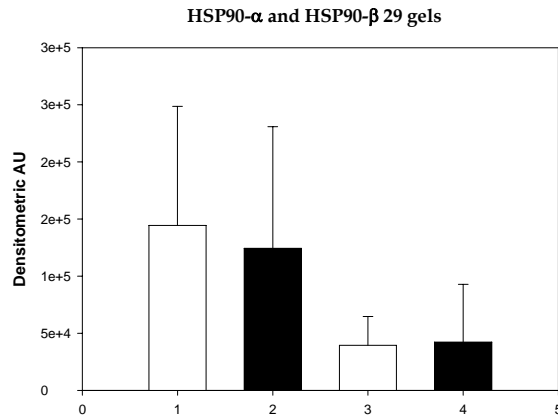
Si además afinamos el análisis, podemos confirmar que si se analizan por separado las formas fosforiladas (spot 6) y la no fosforilada (spot 7), ambas también se encuentran aumentadas en pacientes respecto a controles.

En cuanto a los valores obtenidos para la HSP90 Kda, en nuestro caso no concuerdan con los encontrados en otros trabajos, donde se afirma que esta proteína se encuentra aumentada en pacientes con LES.

En nuestro caso, hemos dividido el análisis según la isoforma alpha y beta, viendo cómo la alpha incluso se encuentra aumentada en el grupo control, mientras que es la beta la que parece estar incrementada en el grupo de pacientes

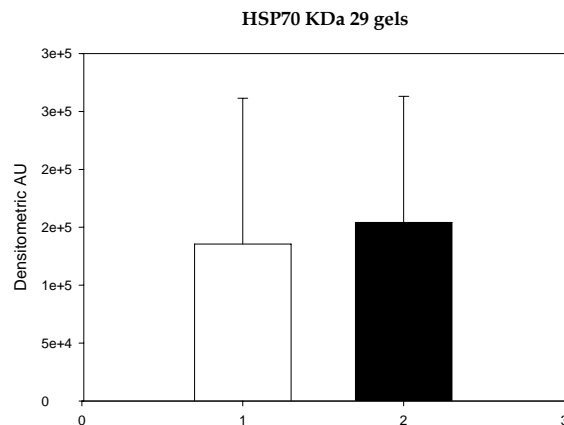
con LES. Aunque las diferencias son mínimas, podemos estar de acuerdo con otros grupos que ya habían visto que es la isoforma HSP90- β la que está aumentada en este grupo de pacientes, debido al incremento de la transcripción del gen de esta isoforma, pero los resultados no son estadísticamente significativos ($P=0.634$; HSP90- α , $P=0.848$; HSP90- β).

- 1.- HSP90- α controles sanos
- 2.- HSP90- α pacientes con LES
- 3.- HSP90- β controles sanos
- 4.- HSP90- β pacientes con LES



Otra proteína de choque térmico que decidimos analizar con más detalle fue la HSP70, ya que al parecer también se encuentra aumentada en pacientes con esta enfermedad.

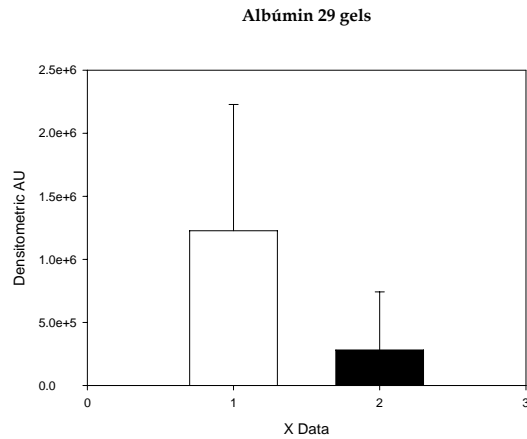
- 1.- HSP70 controles sanos
- 2.- HSP70 pacientes con LES



En este caso vemos que la proporción es más alta con los pacientes con LES que en los controles, pero tampoco las diferencias son estadísticamente significativas ($P=0.689$; HSP70).

Otra proteína que en un principio no íbamos a incluir en el estudio pero que nos llamó mucho la atención fue la albúmina, ya que si en los controles su distribución era normal, en los pacientes aparecía disminuida de tal forma que en algunas muestras ni siquiera se apreciaba. En este caso las diferencias si son significativas ($P=0.0043$).

- 1.- Albúmina controles sanos
- 2.- Albúmina pacientes con LES

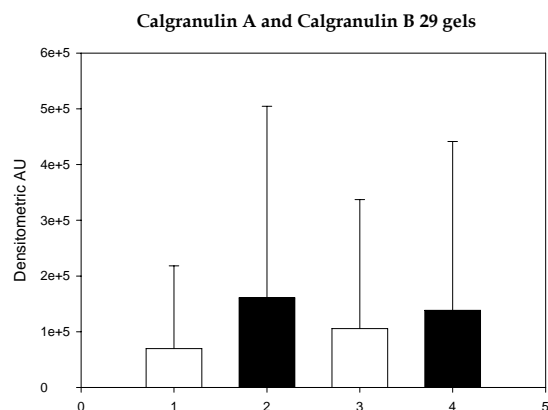


3.5.- EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS PROTEÍNAS S100A8 (Calgranulin A), S100A9 (Calgranulin B) y HSP90 MEDIANTE WESTERN BLOT.

Para confirmar los datos que hemos obtenido mediante electroforesis bidimensional, hemos analizado por western blot las proteínas HSP90, HSP70, Calgranulina A y Calgranulina B.

En este caso no hemos podido hacer distinción entre forma fosforilada y no fosforilada de la Calgranulina B, o entre la isoforma α y β de la HSP90, ya que nuestros anticuerpos reconocían las proteínas completas.

- 1.- Calgranulina A controles sanos
- 2.- Calgranulina A pacientes con LES
- 3.- Calgranulina B controles sanos
- 4.- Calgranulina B pacientes con LES



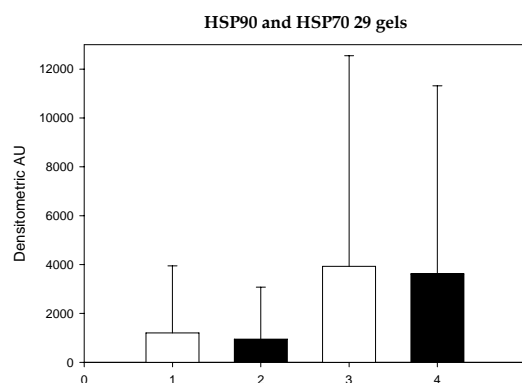
En este caso se confirma lo que ya habíamos obtenido previamente, es decir, tanto la Calgranulina A como la B están aumentadas en pacientes con LES respecto a controles, pero los valores no son estadísticamente significativos:

P=0.269; Calgranulina A, P=0.667; Calgranulina B

En el caso de las HSP, parece que ambas se encuentran aumentadas en los controles, pero con diferencias extremadamente pequeñas que de ninguna manera generan datos significativos:

P=0.720; HSP90, P=0.894; HSP70

- 1.- HSP90 controles sanos
- 2.- HSP90 pacientes con LES
- 3.- HSP70 controles sanos
- 4.- HSP70 pacientes con LES



4.- DISCUSIÓN.

En este trabajo nos hemos basado en el estudio de dos proteínas: la proteína de choque térmico de 90 Kda (HSP90) y la Calgranulina tanto la isoforma A como la B (S100A8 y S100A9).

Nos centramos en ellas, porque desde los primeros análisis de los primeros geles realizados, habíamos venido observando que de forma general estas proteínas estaban aumentadas en los geles de los pacientes con LES respecto a los de los controles sanos, e incluso con resultados estadísticamente significativos, en los primeros análisis realizados cuando aún teníamos pocas muestras.

En concreto la HSP90 KDa nos interesó porque aunque ya había estudios que confirmaban que esta proteína se encontraba aumentada en LES, tanto en plasmas como en PBMCs [46-48, 60, 61], por técnicas de proteómica podíamos distinguir entre las dos isoformas HSP90- α y HSP90- β . También en algún trabajo se han estudiado ambas por separado mediante western blot [53], viéndose que la forma β estaba más aumentada que la α en pacientes con LES, por tanto se sospecha que los altos niveles de la proteína son debidos al aumento de la transcripción del gen HSP90- β .

Nuestros resultados sin embargo, nos muestran como tras el análisis proteómico de 15 muestras de controles y 16 de pacientes con LES, realmente la isoforma β está aumentada en la población enferma, mientras que la forma α , está incrementada en el grupo control, siendo estas diferencias mínimas y los resultados no son estadísticamente significativos.

La otra proteína sobre la que centramos nuestro estudio, son en realidad dos proteínas, la Calgranulina A (S100A8) y la Calgranulina B (S100A9). Ambas suelen encontrarse formando un dímero llamado Calprotectina, que mediante electroforesis bidimensional puede ser separado y por tanto podemos realizar la identificación de cada una de ellas.

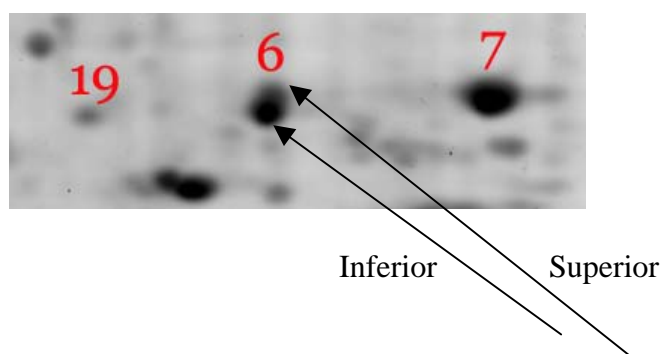
En ambos casos podemos decir que la proteína se encuentra aumentada en pacientes con LES respecto a controles sanos según algunos estudios [1, 2], lo cual concuerda con nuestros datos, aunque no son estadísticamente significativos, con lo que quizás el número de muestras que deberíamos emplear tendría ser más elevado.

También hemos podido comprobar cómo la Calgranulina B es capaz de fosforilarse en la treonina que posee en el carboxilo terminal, y hemos analizado en detalle esa fosforilación.

Como resultado de la misma se obtienen dos spots claramente diferenciados, mediante el análisis de las muestras mediante geles bidimensionales cuyo pH se encuentra entre 3 y 10 (spots 6 y 7), y podemos apreciar hasta 3 spots, en geles cuyo pH oscila entre 4.7 y 5.9 (spots 6, 7 y 19).

Se ha comprobado que la fosforilación existe, pero aún nos quedaba la duda en lo que respecta al número 6, ya que nosotros pensamos que éste spot está formado a su vez por la mezcla de dos spots. Pensamos además que esta mezcla no es de dos proteínas distintas, sino que ambas son Calgranulin B (S100A9), lo que ocurre es que pueden colocalizar en el mismo lugar, tanto la proteína modificada por fosforilación (al hacerse más ácida) como la proteína modificada por la pérdida de los 4 aminoácidos iniciales.

Como la diferencia en cuanto al peso molecular es únicamente de 410 Da puede que en este tipo de geles no pueda apreciarse bien, y la única forma de verlo realmente sea resolviendo aún mejor la zona baja de pesos moleculares.



No obstante ya en este gel parecen poder apreciarse dos spots, pero no separados completamente.

Nuestra hipótesis se basa en que el “superior” sería el spot fosforilado proveniente del spot 7 y el “inferior” derivaría de la forma truncada, que al tener un peso molecular menor aparece un poco más bajo que el original. El spot 19 sería la forma fosforilada de la forma truncada. Pensamos que esto puede ser así porque al analizar varias veces el spot 6, en unas hemos identificado el péptido correspondiente a la fosforilación y en otras ocasiones no, y quizás esto dependa de la forma en que se ha extraído el spot.

Si nos parece interesante resaltar, que no se observa albúmina en prácticamente ningún paciente, o en los que aparece lo hace de forma muy disminuída (aunque hay que decir que algunos pacientes si la tienen totalmente normal).

Pensamos que su relación con el LES puede tener que ver con daño renal, debido a que esta patología pueda estar asociada con glomerulonefritis.

5.- REFERENCIAS.

1. Haga, H.J., et al., *Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity*. *Lupus*, 1993. **2**(1): p. 47-50.
2. Foell, D. and J. Roth, *Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(12): p. 3762-71.
3. Dorin, J.R., et al., *A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene*. *Nature*, 1987. **326**(6113): p. 614-7.
4. Lagasse, E. and R.G. Clerc, *Cloning and expression of two human genes encoding calcium-binding proteins that are regulated during myeloid differentiation*. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(6): p. 2402-10.
5. Odink, K., et al., *Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis*. *Nature*, 1987. **330**(6143): p. 80-2.
6. Zwadlo, G., et al., *Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues*. *Clin Exp Immunol*, 1988. **72**(3): p. 510-5.
7. Sander, J., et al., *Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1984. **44**(4): p. 357-62.
8. Stockley, R.A., et al., *Relationship of neutrophil cytoplasmic protein (L1) to acute and chronic lung disease*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1984. **44**(7): p. 629-34.
9. Foell, D., et al., *Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation*. *Clin Chim Acta*, 2004. **344**(1-2): p. 37-51.
10. van den Bos, C., et al., *Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation*

- from cytoplasm to membranes and cytoskeleton.* J Immunol, 1996. **156**(3): p. 1247-54.
11. Frosch, M., et al., *Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis.* J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 198-206.
 12. Edgeworth, J., P. Freemont, and N. Hogg, *Ionomycin-regulated phosphorylation of the myeloid calcium-binding protein p14.* Nature, 1989. **342**(6246): p. 189-92.
 13. Roth, J., et al., *Expression of calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 is associated with distinct monocytic differentiation pathways in HL-60 cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. **191**(2): p. 565-70.
 14. Boussac, M. and J. Garin, *Calcium-dependent secretion in human neutrophils: a proteomic approach.* Electrophoresis, 2000. **21**(3): p. 665-72.
 15. Rammes, A., et al., *Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway.* J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9496-502.
 16. Voganatsi, A., et al., *Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex.* J Leukoc Biol, 2001. **70**(1): p. 130-4.
 17. Striz, I. and I. Trebichavsky, *Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation.* Physiol Res, 2004. **53**(3): p. 245-53.
 18. Tsamantanis, C., et al., *Haptoglobin types in breast carcinoma.* Hum Hered, 1980. **30**(1): p. 44-5.
 19. Kerkhoff, C., M. Klempt, and C. Sorg, *Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9).* Biochim Biophys Acta, 1998. **1448**(2): p. 200-11.
 20. Zhang, P., et al., *Alcohol intoxication inhibits pulmonary S100A8 and S100A9 expression in rats challenged with intratracheal lipopolysaccharide.* Alcohol Clin Exp Res, 2007. **31**(1): p. 113-21.

21. Brandtzaeg, P., I. Dale, and M.K. Fagerhol, *Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (LI) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia*. Am J Clin Pathol, 1987. **87**(6): p. 700-7.
22. Hsieh, H.L., et al., *Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **307**(2): p. 375-81.
23. Goebeler, M., et al., *Expression and complex formation of S100-like proteins MRP8 and MRP14 by macrophages during renal allograft rejection*. Transplantation, 1994. **58**(3): p. 355-61.
24. Csermely, P., et al., *The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review*. Pharmacol Ther, 1998. **79**(2): p. 129-68.
25. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 571-9.
26. Welch, W.J. and C.R. Brown, *Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding*. Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(2): p. 109-15.
27. Pearl, L.H. and C. Prodromou, *Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 271-94.
28. Stephanou, A., D.S. Latchman, and D.A. Isenberg, *The regulation of heat shock proteins and their role in systemic lupus erythematosus*. Semin Arthritis Rheum, 1998. **28**(3): p. 155-62.
29. Minami, Y., et al., *Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90*. J Biol Chem, 1991. **266**(16): p. 10099-103.
30. Nemoto, T., et al., *Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein*. Eur J Biochem, 1995. **233**(1): p. 1-8.
31. Perdew, G.H., et al., *Localization and characterization of the 86- and 84-kDa heat shock proteins in Hepa 1c1c7 cells*. Exp Cell Res, 1993. **209**(2): p. 350-6.

32. Lees-Miller, S.P. and C.W. Anderson, *The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues.* J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17275-80.
33. Rose, D.W., et al., *The 90-kilodalton peptide of the heme-regulated eIF-2 alpha kinase has sequence similarity with the 90-kilodalton heat shock protein.* Biochemistry, 1987. **26**(21): p. 6583-7.
34. Lees-Miller, S.P. and C.W. Anderson, *Two human 90-kDa heat shock proteins are phosphorylated in vivo at conserved serines that are phosphorylated in vitro by casein kinase II.* J Biol Chem, 1989. **264**(5): p. 2431-7.
35. Radanyi, C., et al., *Chick heat-shock protein of Mr = 90,000, free or released from progesterone receptor, is in a dimeric form.* J Biol Chem, 1989. **264**(5): p. 2568-73.
36. Iannotti, A.M., D.A. Rabideau, and J.J. Dougherty, *Characterization of purified avian 90,000-Da heat shock protein.* Arch Biochem Biophys, 1988. **264**(1): p. 54-60.
37. Minami, Y., et al., *The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function in vivo.* Mol Cell Biol, 1994. **14**(2): p. 1459-64.
38. Ozawa, K., et al., *Mapping of the gene family for human heat-shock protein 90 alpha to chromosomes 1, 4, 11, and 14.* Genomics, 1992. **12**(2): p. 214-20.
39. Vamvakopoulos, N.C., et al., *Mapping the intron-containing human hsp90 alpha (HSPCAL4) gene to chromosome band 14q32.* Cytogenet Cell Genet, 1993. **64**(3-4): p. 224-6.
40. Durkin, A.S., et al., *Assignment of an intron-containing human heat-shock protein gene (hsp90 beta, HSPCB) to chromosome 6 near TCTE1 (6p21) and two intronless pseudogenes to chromosomes 4 and 15 by polymerase chain reaction amplification from a panel of hybrid cell lines.* Genomics, 1993. **18**(2): p. 452-4.

41. Takahashi, I., et al., *A cosmid clone at the D6S182 locus on human chromosome 6p12 contains the 90-kDa heat shock protein beta gene (HSP90 beta)*. Mamm Genome, 1994. **5**(2): p. 121-2.
42. Njemini, R., et al., *Heat shock proteins and chemokine/cytokine secretion profile in ageing and inflammation*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(7-8): p. 450-4.
43. Wallin, R.P., et al., *Heat-shock proteins as activators of the innate immune system*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 130-5.
44. Njemini, R., et al., *Basal and infection-induced levels of heat shock proteins in human aging*. Biogerontology, 2007. **8**(3): p. 353-64.
45. Kenderov, A., et al., *Lupus-specific kidney deposits of HSP90 are associated with altered IgG idiotypic interactions of anti-HSP90 autoantibodies*. Clin Exp Immunol, 2002. **129**(1): p. 169-76.
46. Ripley, B.J., D.A. Isenberg, and D.S. Latchman, *Elevated levels of the 90 kDa heat shock protein (hsp90) in SLE correlate with levels of IL-6 and autoantibodies to hsp90*. J Autoimmun, 2001. **17**(4): p. 341-6.
47. Latchman, D.S., *Heat shock proteins and human disease*. J R Coll Physicians Lond, 1991. **25**(4): p. 295-9.
48. Latchman, D.S. and D.A. Isenberg, *The role of hsp90 in SLE*. Autoimmunity, 1994. **19**(3): p. 211-8.
49. Minota, S., et al., *Autoantibodies to the heat-shock protein hsp90 in systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1988. **81**(1): p. 106-9.
50. Conroy, S.E., et al., *Detection of autoantibodies to the 90 kDa heat shock protein in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases*. Br J Rheumatol, 1994. **33**(10): p. 923-6.
51. Pashov, A., et al., *Autoantibodies to heat shock protein 90 in the human natural antibody repertoire*. Int Immunol, 2002. **14**(5): p. 453-61.

52. Erkeller-Yuksel, F.M., et al., *Surface expression of heat shock protein 90 by blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus*. J Autoimmun, 1992. **5**(6): p. 803-14.
53. Twomey, B.M., et al., *Elevated levels of the 90 kD heat shock protein in patients with systemic lupus erythematosus are dependent upon enhanced transcription of the hsp90 beta gene*. J Autoimmun, 1993. **6**(4): p. 495-506.
54. Stephanou, A., et al., *Interleukin 6 activates heat-shock protein 90 beta gene expression*. Biochem J, 1997. **321 (Pt 1)**: p. 103-6.
55. Ripley, B.J., et al., *Interleukin-10 activates heat-shock protein 90beta gene expression*. Immunology, 1999. **97**(2): p. 226-31.
56. Linker-Israeli, M., et al., *Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis*. J Immunol, 1991. **147**(1): p. 117-23.
57. Park, Y.B., et al., *Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 1998. **16**(3): p. 283-8.
58. Bombardier, C., et al., *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. Arthritis Rheum, 1992. **35**(6): p. 630-40.
59. Pavon, E.J., et al., *Proteomic analysis of plasma from patients with systemic lupus erythematosus: Increased presence of haptoglobin alpha2 polypeptide chains over the alpha1 isoforms*. Proteomics, 2006. **6 Suppl 1**: p. S282-92.
60. Norton, P.M., D.A. Isenberg, and D.S. Latchman, *Elevated levels of the 90 kd heat shock protein in a proportion of SLE patients with active disease*. J Autoimmun, 1989. **2**(2): p. 187-95.
61. Dhillon, V.B., et al., *Differential heat shock protein overexpression and its clinical relevance in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 1993. **52**(6): p. 436-42.