

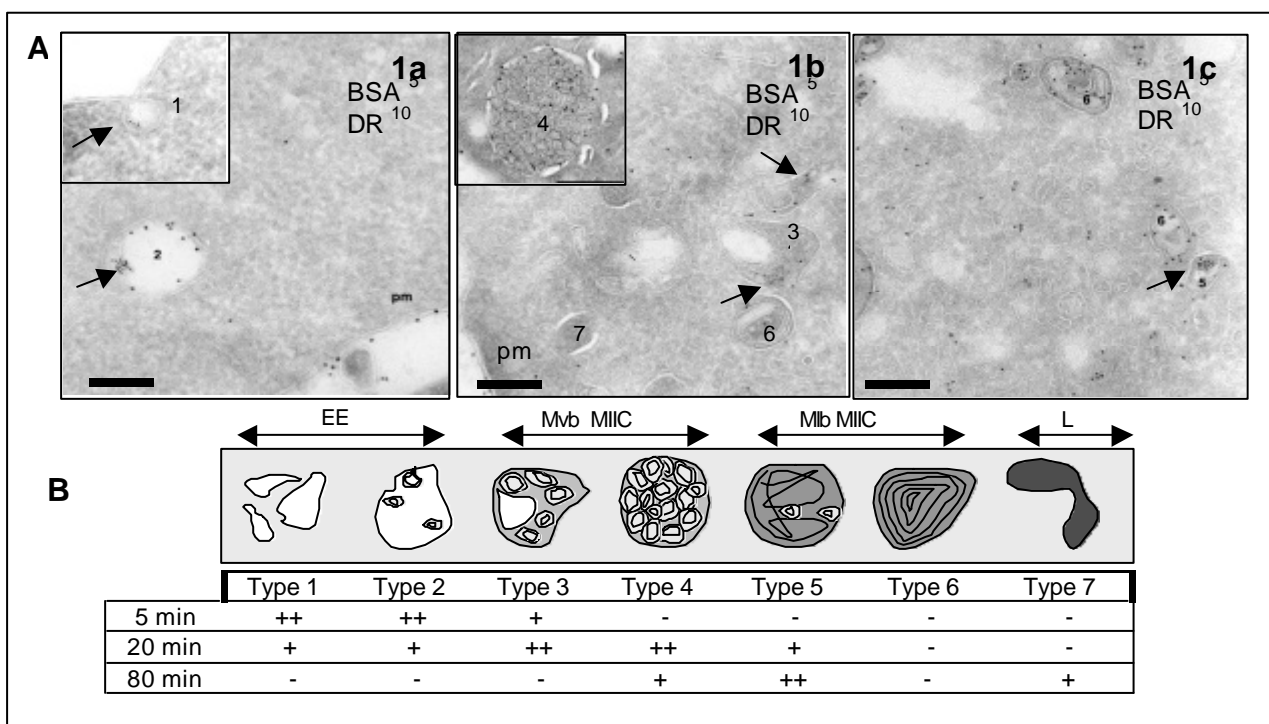
Per a confirmar que els compartiments identificats en RINm5F per analogia morfològica amb els de la LCL (Kleijmeer M i col., 1997) pertanyien a la via endocítica, es va realitzar un estudi de la cinètica d'internalització de partícules d'or de 5nm acoblades a albúmina sèrica bovina (BSA-Au). Les cèl·lules internalitzen la BSA-Au en suspensió per endocitosi constitutiva, permetent traçar la seva progressió a través dels compartiments de la via endocítica, a diferents temps d'internalització. Les cèl·lules DR4liDM es van incubar 5 minuts amb BSA-Au a 37°C i després de rentar l'excés de BSA-Au no internalitzada, es mantingueren en cultiu durant 5, 20 i 80 min. A continuació, es van recol·lir les cèl·lules per a fixar-les i processar-les. La col·localització de DR4 amb la BSA-Au internalitzada es va analitzar mitjançant el marcatge indirecte de les diferents seccions amb l'anticòs policlonal anti-DR $\alpha$  acoblat a partícules d'or de 10nm. Els resultats mostrats a la figura 19, permeteren agrupar els sis tipus de vesícules identificats per morfologia, en 4 categories, en funció de les característiques endocítiques presentades

Endosomes primerencs (EE): Inclou els compartiments tipus 1 i 2 que presentaven una major acumulació de BSA-Au després de 5 minuts d'internalització.

Endosomes Multivesiculars (Mvb): Inclou els compartiments tipus 3 i 4 que presenten la màxima acumulació de BSA-Au als 20 minuts d'internalització.

Endosomes multilaminars (Mlb): Inclou els compartiments tipus 5 i 6. En els compartiments de tipus 5 es detectà BSA als 80min d'internalització mentre que en els compartiments de tipus 6 no es detectà BSA-Au en cap dels períodes d'internalització testats, tot i ser positius pel marcatge de DR4.

Lisosomes (L): Inclou els compartiments tipus 7 que presenten la màxima acumulació de BSA-Au als 80 minuts d'internalització.

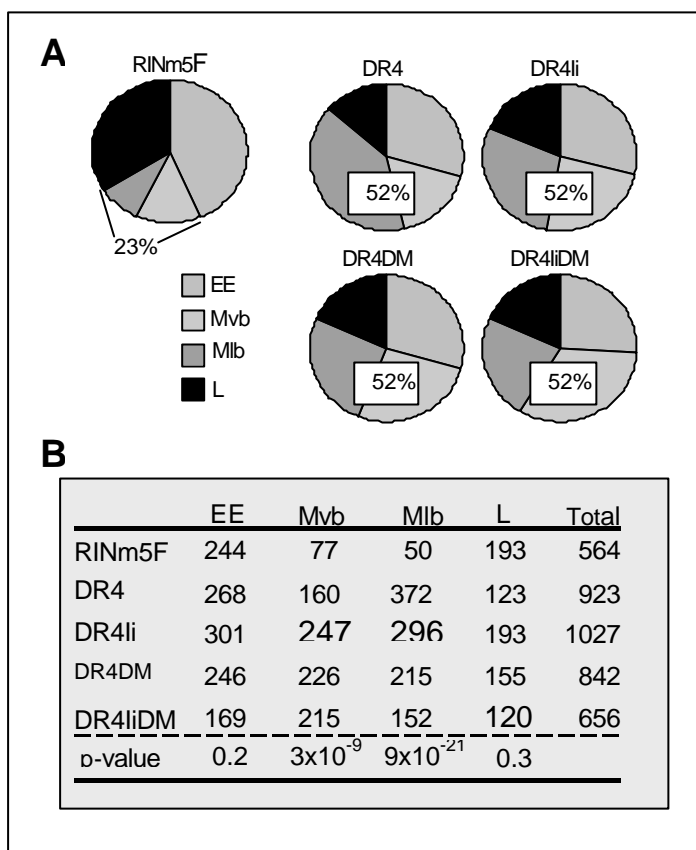


**Figura 19 Cinètica de maduració dels compartiments endocítics de la línia RINm5F mitjançant l'endocitosi de BSA-Au.** L' anàlisi de la localització endocítica de la BSA-Au internalitzada per endocitosi durant 5 minuts a 4°C, es realitzà després de 5 (a), 20 (b) i 80 (c) minuts de cultiu a 37°C per marcar els compartiments endocítics de la línia DR4liDM, sobre seccions de 80 nm de gruix de les cèl·lules fixades i marcades amb anti-DR $\alpha$ . **(A)** La presència de BSA (or de 5 nm) s'indica amb una fletxa. El marcatge de DR $\alpha$  es visualitza amb or de 10 nm. **(B)** Taula resum de la presència de BSA en cada compartiment als diferents temps.

## 2. Influència de l'expressió de DR4, li i HLA-DM en l'organització de la via endocítica de la línia RINm5F

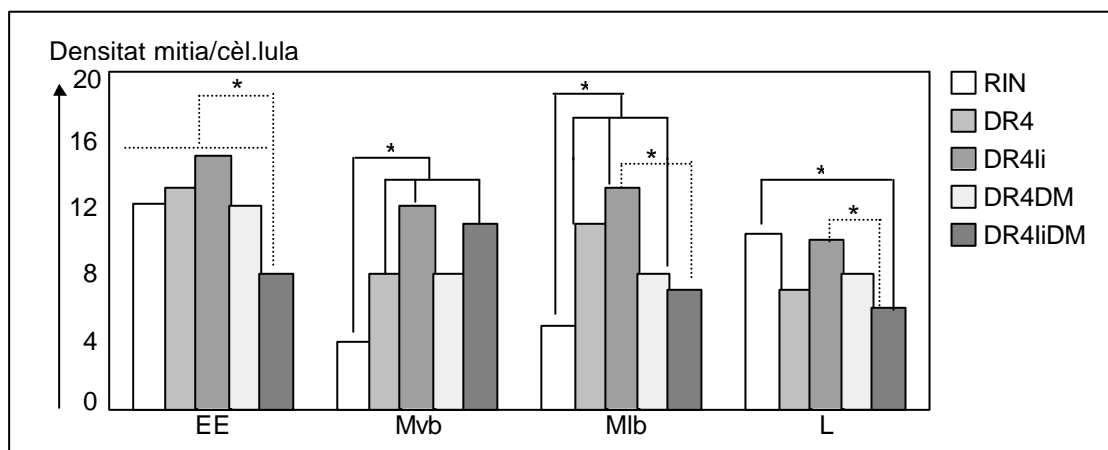
L'anàlisi de les crioseccions marcades amb l'anticòs policlonal anti-DR $\alpha$  de les línies restants, DR4, DR4li i DR4DM, així com de la línia parenteral RINm5F, va evidenciar la presència dels diferents compartiments endocítics identificats en totes les cèl·lules, confirmant que la maduració de les molècules DR4 en la cèl·lula RINm5F es donava en compartiments convencionals de la via endocítica. L'organització de la via endocítica en les quatre cèl·lules transfectades i la línia parenteral es va estudiar quantificant els diferents compartiments en cada cèl·lula, directament al microscopi electrònic. La quantificació dels compartiments EE, Mvb, Mlb i L mostrà que l'organització de la via endocítica era característica de cada cèl·lula. En els diagrames de sectors de la Figura 20A es mostra la proporció de cada compartiment en les cinc cèl·lules RIN, -DR4, -DR4li, -DR4DM, -DR4liDM; i a la taula (Figura 20B) hi ha el número de compartiments comptats en cada cèl·lula, en valors absoluts, així com el valor de significació de les diferències entre les cèl·lules, amb el test F de Fisher. Els resultats resumits a la figura demostren que:

1. El citoplasma de les cèl·lules transfectades amb gens de classe II presentava un tamany major i un nombre absolut més elevat de compartiments endocítics (DR4: 923, DR4li: 1027, DR4DM: 842, i DR4liDM: 656) que en la línia RINm5F sense transfectar (564).
2. Les quatre cèl·lules transfectades presentaven un augment en el nombre i en la proporció dels compartiments clàssicament involucrats en el processament antigènic, Mvbs i Mlbs, que representaven el 52% dels compartiments quantificats en les quatre línies mentre que només eren un 23% del total d'organelles en la línia parenteral.
3. Cada línia presentava un perfil característic de compartiments Mvb i Mlb, significativament diferent vers les altres cèl·lules analitzades (Mvb:  $p=3 \times 10^{-9}$  i Mlb:  $p=9 \times 10^{-21}$ , test F de Fisher).
4. En les subpoblacions d'endosomes primerencs (EE) i lisosomes (L), no es van detectar diferències quantitatives significatives entre les diferents línies epitelials.



**Figura 20** Influència de l'expressió de DR4, li i HLA-DM en l'organització de la via endocítica de la línia RINm5F. L'anàlisi de la reorganització de la via endocítica en cada línia cel.lular es va fer mitjançant el recompte dels compartiments de cada categoria en 20 perfils cel.lulars directament al microscopi de transmissió, sobre talls ultrafins de criomicrotò. (A) Diagrames de sectors on es mostra la proporció de cada compartiment en les diferents cèl.lules (B) A la taula es mostren el nombre de compartiments (valors absoluts) de cada categoria recomptats i a la darrera línia el valor de significació de les diferències entre totes les línies cel.lulars pel test f de Fisher.

El resultat de l'anàlisi estadístic *a posteriori*, comparant totes les línies cel.lulars, permeté identificar les influències de l'expressió de DR4 i les chaperones li i HLA-DM en l'organització d'aquests compartiments. A la figura 21 es mostra l'histograma que representa la densitat mitja (nombre de compartiments per cèl.lula) de cada compartiment en les diferents línies cel.lulars.



**Figura 21** Influència de l'expressió de DR4, li i HLA-DM en l'organització de la via endocítica de la línia RINm5F. Els histogrames mostren la comparació del valor mitg de cada categoria de compartiment en 20 perfils cel.lulars de cada línia estudiada. Amb línies contínues (—) s'assenyalen aquelles diferències entre les línies transfectades respecte la parenteral RINm5F i amb línies discontinües (- -), s'assenyalen les diferències inter-transfectants; amb valor de significació  $p < 0.05$ , test t de Student (\*).