

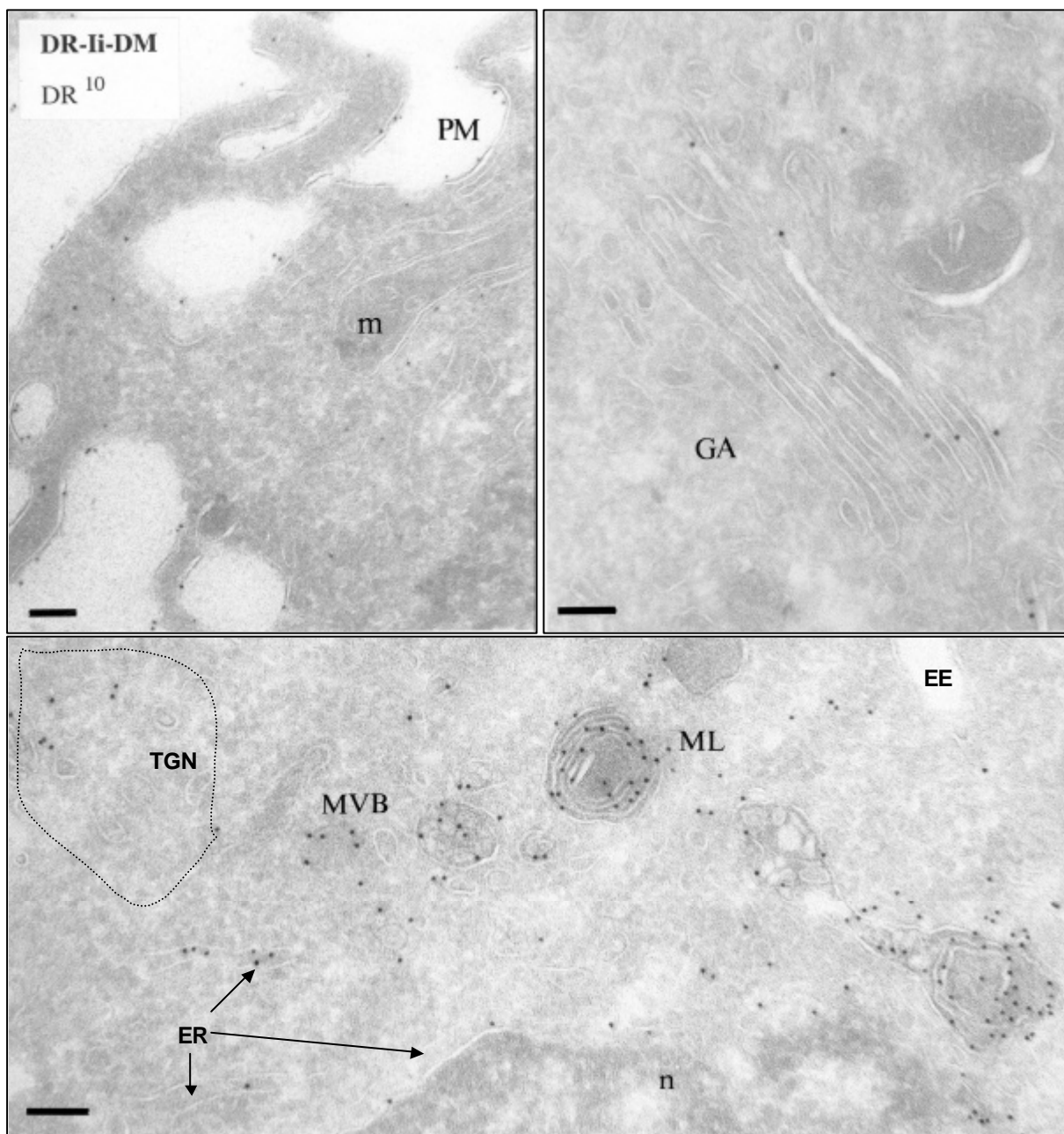
D'aquests resultats, cal destacar els següents punts:

1. La transfectant DR4 presentava un augment significatiu de la densitat promig de Mvb i Mlb respecte la línia sense transfectar. Aquest augment era més important en el número de Mlbs ( $p=9 \times 10^{-4}$ , test t de Student) que en el de Mvbs ( $p=0.039$ , test t de Student).
2. Amb la coexpressió de DR4 i li s'observà un augment semblant i significatiu en la densitat de Mvb i Mlb respecte la línia parenteral ( $p=10^{-4}$  i  $p=7 \times 10^{-5}$ , respectivament, test t de Student).
3. En la transfectant DR4DM només es van trobar diferències significatives respecte la línia parental pel que fa al nombre de Mlbs/cèl.lula, significativament augmentat (densitat promig DR4DM = 5.9 vs RIN= 2.1,  $p=0.029$ , test t de Student). També s'observà un augment del nombre de Mvbs (densitat promig DR4DM= 12.1 vs RIN= 3.28,  $p=0.07$ ). La densitat de Mvbs i Mlbs era equivalent en les línies DR4DM i DR4li.
4. La cèl. lula DR4liDM presentava un patró oposat al de la línia DR4DM. Es trobà un augment significatiu en el nombre de Mvbs respecte la línia parenteral (densitat promig DR4liDM=7.4 vs RIN= 2.4,  $p=3 \times 10^{-4}$ , test t de student), mentre que l'augment era menys significatiu pel nombre de Mlbs (densitat promig DR4liDM= 5.32 vs = 2.1,  $p=0.094$ , test t de student). La cèl. lula DR4liDM era la única en que la densitat de Mvbs era major que la de Mlbs.

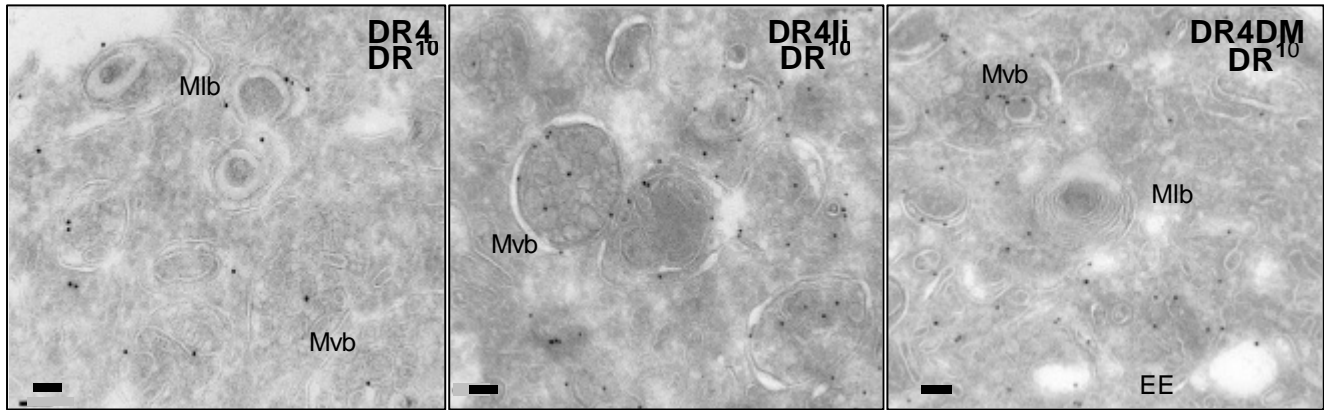
Resumint, l'expressió dels gens de classe II induï a una reorganització de la via endocítica en la línia RINm5F, afavorint la formació de Mvbs i Mlbs, clàssicament considerats com a MIIC. La proporció de Mvbs respecte Mlbs, variava en les diferents transfectants. L'expressió de DR4 sense les chaperones induï a l'augment de Mlbs però no dels Mvbs. La coexpressió d'li o DM independentment, donava lloc a un augment similar en la proporció de Mvbs i Mlbs. Amb la coexpressió de les tres molècules, s'afavoria la formació de Mvbs respecte Mlbs.

### 3. L'expressió d'li i HLA-DM indueix canvis en la distribució de DR4

Per analitzar si la redistribució de la via endocítica es correlacionava amb la localització de DR4, es van quantificar les partícules d'or acumulades en cada compartiment, de les seccions marcades amb l'Ac policlonal anti-DR $\alpha$ . Es van comptar 20 perfils cel·lulars en cada línia estudiada: DR4, DR4li, DR4DM i DR4liDM. A les figura 22 i 23 es mostren imatges dels marcatges en les quatre cèl·lules transfectades. Tal com s'havia observat en la línia DR4liDM, el marcatge d'or associat a DR $\alpha$  mostrava un patró específic, acumulat a la superfície cel·lular (pm) i en tots els compartiments endocítics, en el transgolgi (TGN), en l'aparell de Golgi (GA) i en el reticle endoplàsmic (ER). D'altra banda, el nucli cel·lular (n) i les mitocòndries (m) romanien exemptes de marcatge.

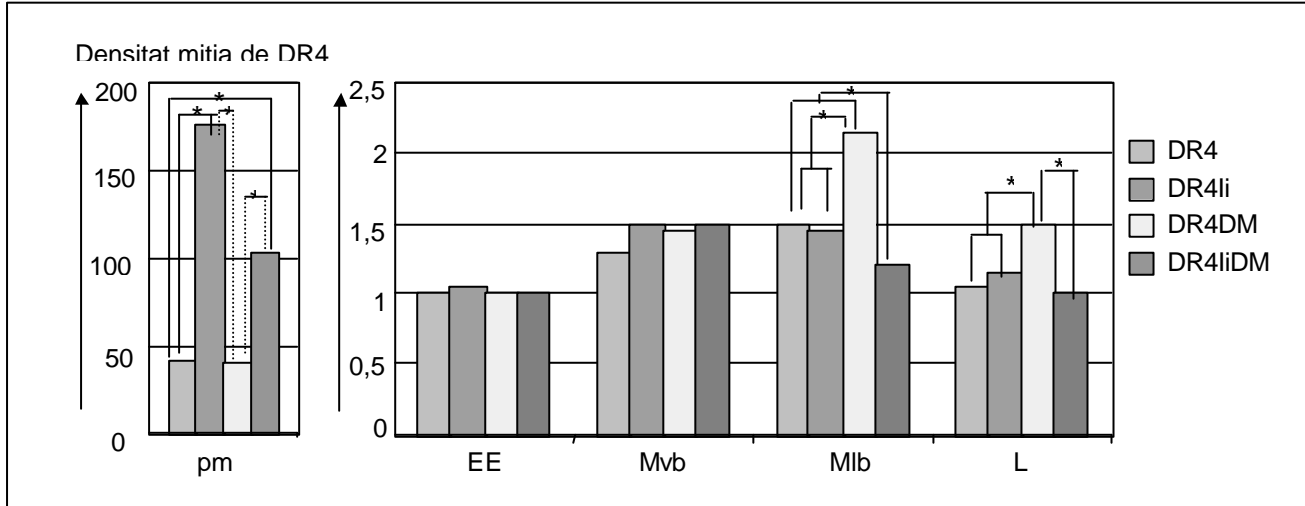


**Figura 22 Localització de DR4 en la línia DR4liDM per microscòpia electrònica.** Les MHC II es van marcar amb un anticòs policlonal anti-DR $\alpha$  revelat amb prot A-Au de 10 nm. A dalt a l'esquerra es mostra una imatge de la superfície cel.lular (PM) on s'inclou una mitocòndria (m) sense marcatge. A l'esquerra es mostra una imatge de l'AG i d'algunes vesícules de la TGN. A baix una imatge més àmplia del citoplasma de les cèl.lules DR4liDM, amb el marcatge per DR4 acumulat en els compartiments endocítics Mvb, Mlb. També es pot observar DR4 en l'ER perinuclear. Les barres són 100 nm.



**Figura 23 Localització subcel.lular de DR4 en les tres línies transfectades DR4, DR4Ii i DR4DM per microscòpia electrònica.** Els dímers DR4 es van detectar per immunomarcatge indirecte amb l'Ac policlonal anti-DR $\alpha$  que es visualitzà amb partícules d'or de 10nm. Els endosomes primerencs s'assenyalen com a EE, els endosomes multivesiculars com a Mvb i els endosomes multilaminars com a MLb. Les barres donen la relació de 100 nm

En un primer anàlisi es va quantificar la densitat de DR $\alpha$  en cada compartiment de les diferents cèl.lules. Els histogrames de la Figura 24 mostren la densitat mitja (n<sup>o</sup> partícules d'or/ compartiment) de DR4 en cada compartiment endocític i a la superfície cel.lular.



**Figura 24 Anàlisi de la influència de l'expressió d'Ii i HLA-DM en la distribució de DR4.** La quantificació de DR4 es va fer directament al microscopi, sobre seccions marcades amb anti-DR $\alpha$  acoblat a partícules d'or de 10 nm. Es van recomptar 20 perfils cel.lulars de cada transfectant. Els histogrames mostren la densitat mitja de DR4 en cada categoria de compartiment en les cèl.lules DR4 (histograma gris clar), DR4Ii (histograma barrat), DR4DM (histograma puntejat) i DR4IiDM (histograma gris fosc). Es troben senyalades (\*) les diferències significatives amb  $p < 0.05$ , t de Student