

Els resultats indicaven que:

1. L'expressió d'Ii, però no la de DM, induï a un augment significatiu de la densitat de DR4 a la superfície cel·lular, amb diferències molt significatives entre les cèl·lules Ii⁻ i les cèl·lules Ii⁺ ($p < 0.01$ en totes les comparacions, test t de student). No hi havia diferències significatives entre la densitat de DR4 a la superfície de les cèl·lules DR4 i DR4DM (41 i 40, respectivament) ni entre DR4Ii i DR4IiDM (176 i 102, respectivament).
2. No s'observaren diferències significatives en la densitat de DR4 en els EE i els Mvbs, independentment de l'expressió d'Ii o HLA-DM.
3. En els compartiments MIb i lisosomes, l'expressió de DM en absència d'Ii, induï a un augment significatiu de la densitat de DR4 (DR4DM, densitat promig de MIb=2.1 i L=1.5), respecte les altres cèl·lules ($p=0.009$ i $p=0.03$, respectivament, test t de student versus cèl·lules DR4).
4. En la triple transfectant DR4IiDM, la densitat de DR4 en MIbs (1.2) i L (1) era menor que en les altres transfectants i significativament diferent de l'observada en les DR4DM (MIbs: 2.1, $p=1 \times 10^{-5}$; L: 1.5, $p=0.01$, test t de student)

Per afegir els efectes produïts per la reorganització de la via endocítica en cada cèl·lula, es van sumar totes les partícules d'or associades a DR4 comptades en cada compartiment i es calculà el percentatge que aquestes representaven respecte el total de dímers DR4 detectats. Els resultats d'aquesta quantificació s'exposen a la Figura 25 on s'indica el percentatge de DR acumulat en cada compartiment de la via endocítica i a la superfície de cada cèl·lula. A la taula inclosa, es presenten els valors absoluts del total de partícules d'or comptades en cada localització.

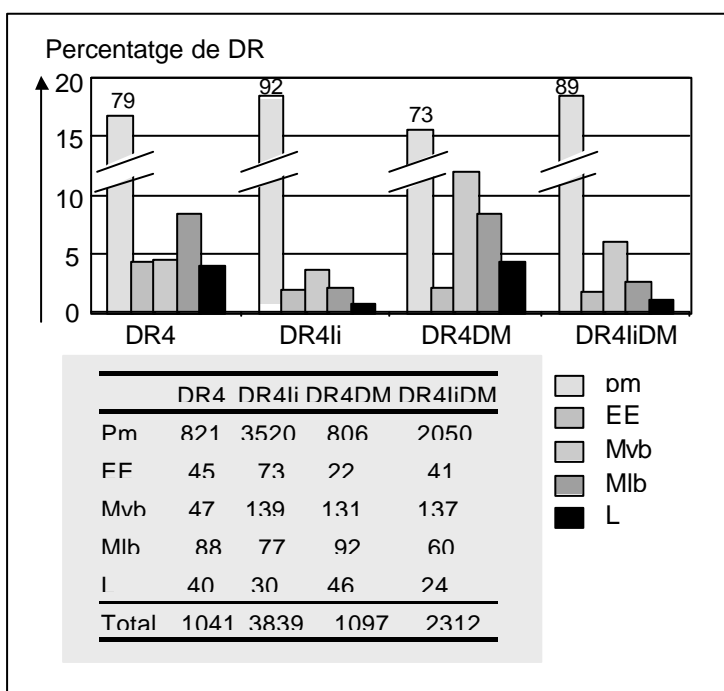


Figura 25 Comparació del percentatge de DR4 acumulat en cada localització subcel·lular en les transfectants. Influència d'Ii i HLA-DM. Es van recomptar les partícules d'or acoplades a DR4 de cada compartiment i es sumaren les partícules en una mateixa categoria de compartiment: EE, Mvb, MIb, i L. Els histogrames mostren el percentatge d'or acumulat en cada categoria respecte el total de molècules DR4.

El resultat d'aquest anàlisi indicaven que:

1. Les cèl·lules Ii^+ presentaven un marcatge per $DR\alpha$ que duplicava ($DR4IiDM=2312$ partícules d'or) o triplicava ($DR4Ii = 3893$ partícules d'or), el marcatge en les dues cèl·lules Ii^- ($DR4= 1041$ i $DR4DM= 1097$ partícules d'or).
2. En absència de chaperones, el 79% de $DR4$ es localitzava a la superfície cel·lular i el 21% restant es distribuïa a pels compartiments endocítics. Entre aquests, la major acumulació s'observà en els $Mlbs$ que contenen el 8% del marcatge per $DR\alpha$, mentre que tant EE com $Mlbs$ i L contenen aproximadament un 4% del marcatge restant en cada cas.
3. L'expressió d' Ii va fer que el 92% de les $DR\alpha$ detectades s'acumulessin a la superfície cel·lular, mentre que en els compartiments de la via endocítica hi havia el 8% del marcatge restant, principalment acumulat en els $Mvbs$ (4%).
4. L'expressió de DM en absència d' Ii induïa un augment en la proporció de $DR4$ amb localització intracel·lular. Les cèl·lules $DR4DM$ presentaven la major acumulació de DR en la via endocítica (27%), localitzades principalment en els $Mvbs$ (12%).
5. En la línia $DR4IiDM$ el marcatge de $DR\alpha$ era superior al de les transfectants Ii^- , però inferior al de $DR4Ii$. Tot i la diferència quantitativa, les cèl·lules $DR4IiDM$ presentaven una distribució de DR amb el 89% del marcatge localitzat a la superfície cel·lular i una acumulació de $DR\alpha$ major en els $Mvbs$ (6%) que en $Mlbs$ (3%).

La unió d'ambdós anàlisis mostrava que d'acord amb el rol d' Ii en la maduració i guiatge dels dímers DR des del TGN fins la via endocítica, en les cèl·lules Ii^+ es detectaren els marcatges de $DR4$ més elevats. L'augment de la densitat de $DR4$ a la superfície de les cèl·lules Ii^+ , apareixia com a conseqüència directa de l'expressió de la cadena invariant, mentre que l'expressió d' $HLA-DM$ en absència d' Ii , induïa un augment de la densitat de $DR4$ en els Mlb i L . La resta de les diferències en la distribució de $DR4$ en les transfectants es podien relacionar amb l'organització particular de cada via endocítica i no amb efectes directes de les chaperones expressades.

4. La distribució d' Ii és independent de l'expressió d' $HLA-DM$ en la línia RINm5F

La distribució d' Ii es va estudiar en les cèl·lules positives mitjançant el marcatge seqüencial de les seccions amb l'Ac policlonal anti- $DR\alpha$ i l'Ac policlonal $Icc5$, que reconeix el segment C-terminal d' Ii . Aquest segment és el primer tallat per les proteases presents en la via endocítica i per tant, el marcatge obtingut amb l'Ac $Icc5$ és indicatiu de la presència de la Ii nativa però no reconeix els productes intermediaris ($DR-lip10$,

DR-CLIP) derivats de la seva proteòlisi. Cal mencionar que l'impediment estèric entre les partícules d'or, conjuntament amb la fixació de les seccions, necessària entre els dos marcatges, impedeixen un anàlisi quantitatiu de la relació entre les dues molècules marcades encara que permeten constatar la seva colocalització.

En les cèl·lules DR4Ii i DR4IiDM la cadena invariant colocalitzava amb DR4 a la superfície cel·lular i en els compartiments endocítics primerencs, els EE i els Mvb (figura 26). La colocalització d'ambdues molècules també era evident en l'ER i en el GA (no mostrat). No es va detectar marcatge amb Icc5 en els Mlbs i L en cap de les dues cèl·lules.

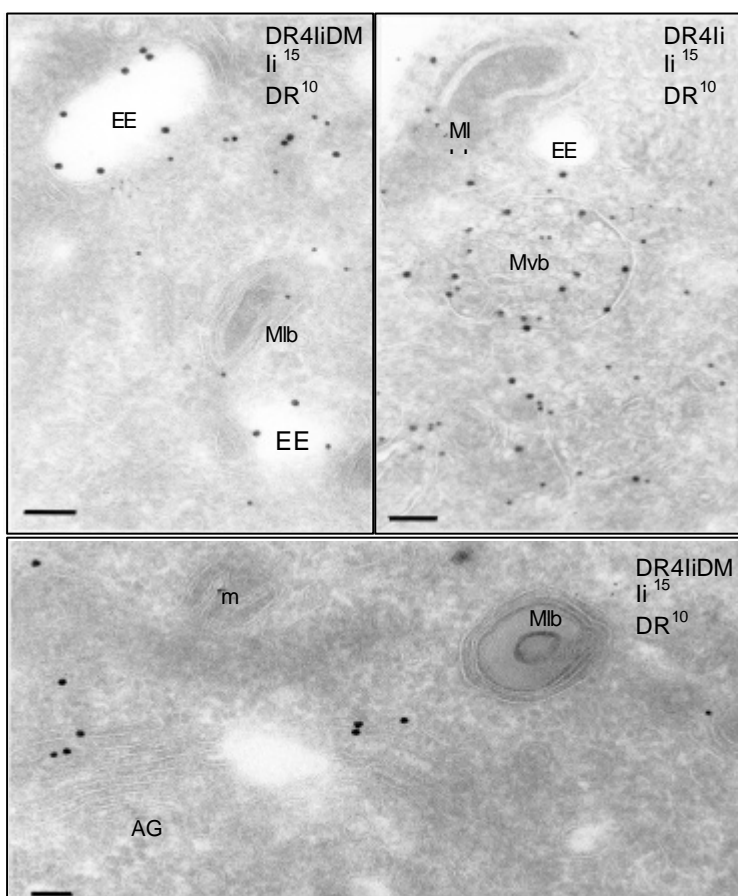


Figura 26 Colocalització d'Ii i DR4 en les dues cèl·lules endocrines Ii* per microscòpia de transmissió.

La localització subcel·lular de les dues molècules es va analitzar per immunodetecció seqüencial en seccions de criomicrotò. Primer es marcà amb l'anticòs Icc5 específic per l'extrem C-ter d'Ii que fou acoplat a pro tA-or de 15 nm. Després d'un pas de fixació es va marcar DR4 amb l'anti-DR policlonal acoplat a prot A-Au de 10 nm. La barra indica 100 nm

Els resultats de la quantificació relativa de les partícules d'or associades a Ii, es mostren a la Figura 27. L'histograma 27A representa la densitat mitja d'Ii, i l'histograma 27B representa el percentatge d'Ii acumulat en cada compartiment de les dues cèl·lules

L'anàlisi de la densitat només mostrà diferència significativa a la superfície cel·lular, on DR4IiDM presentava una densitat d'Ii menor que DR4Ii ($p < 0.01$, test t de student). En presència de DM, la densitat d'Ii en EE i en Mvbs, no presentava diferències significatives.

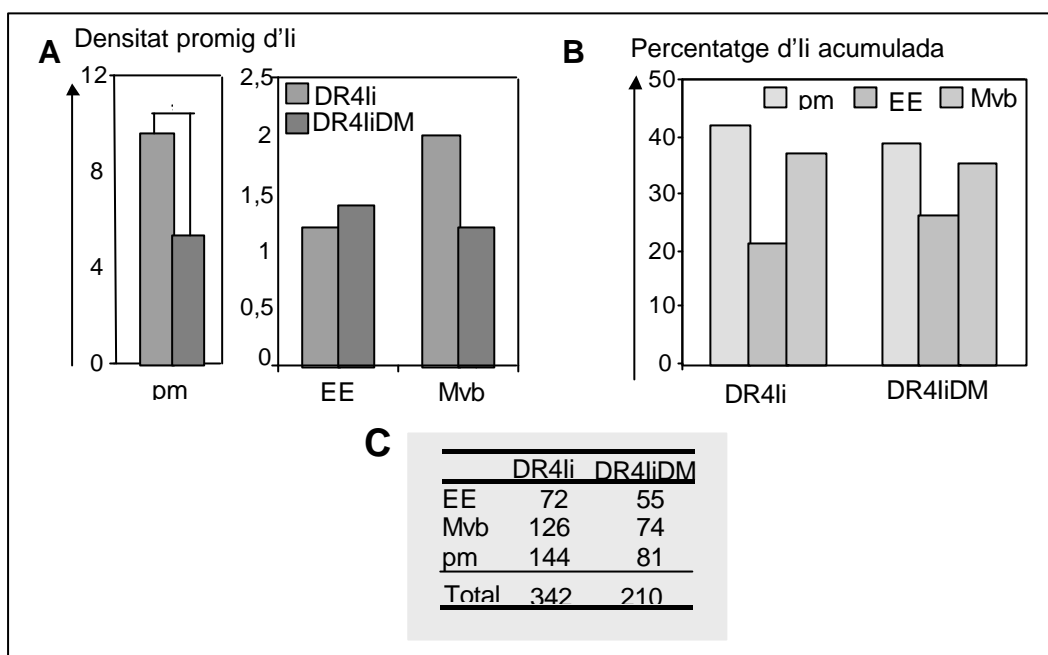


Figura 27 Anàlisi de la quantificació relativa d'Ii en les cèl·lules DR4Ii i DR4IiDM. La quantificació es va fer directament al microscopi, sobre seccions marcades seqüencialment amb anti-Ii i anti-DR α acoplats a partícules d'or de 15 i 10 nm, respectivament. **(A)** Els histogrames mostren la densitat mitja d'Ii en cada categoria de compartiment en les cèl·lules DR4Ii (histograma barrat) i DR4IiDM (histograma ombrejat). **(B)** Els histogrames mostren el percentatge d'Ii acumulat en la superfície cel·lular (pm, histograma ratllat), en els endosomes temprans (EE, histograma ombrejat), i en els endosomes multivesiculars (Mvb, histograma escamós) en les dues cèl·lules Ii⁺. **(C)** A la taula es mostra en valors absoluts en número de partícules d'or associades a Ii recomptades en cada categoria de compartiment.

D'altra banda, l'anàlisi del percentatge d'Ii acumulat en cada compartiment (figura 27 B i C), confirmava que:

1. El marcatge específic d'Ii nativa era major en la cèl·lula DR4Ii (342 partícules d'or/ 20 perfils cel·lulars) que en la cèl·lula DR4IiDM (210 partícules d'or/20 perfils cel·lulars)
2. En la via endocítica, la major acumulació d'Ii es detectà en els Mvb (36% en DR4Ii i 35% en DR4IiDM) seguits pels EE (21% en DR4Ii i 26% en DR4IiDM) de les dues cèl·lules analitzades.

En resum, les dades indicaven que la localització d'Ii en les cèl·lules endocrines RINm5F era independent de l'expressió de DM i es limitava a més de l'ER i de l'AG, a la superfície cel·lular als EE i als Mvb. L'expressió de DM induïa una reducció de l'Ii nativa a la superfície de les cèl·lules DR4IiDM en comparació amb les DR4Ii.

5. L'expressió d'li influeix en la distribució d'HLA-DM

La localització d'HLA-DM es detectà amb l'AcMo 5C1 anti-DM α , en seccions seqüencialment marcades per DR α i DM α . A la figura 28 es mostra el marcatge de DM en els diferents compartiments de la via endocítica de les cèl·lules positives. El marcatge per DM α es detectava en la superfície cel·lular, en l'ER, en el GA i en el TGN però s'acumulava especialment en els Mvbs i Mlbs.

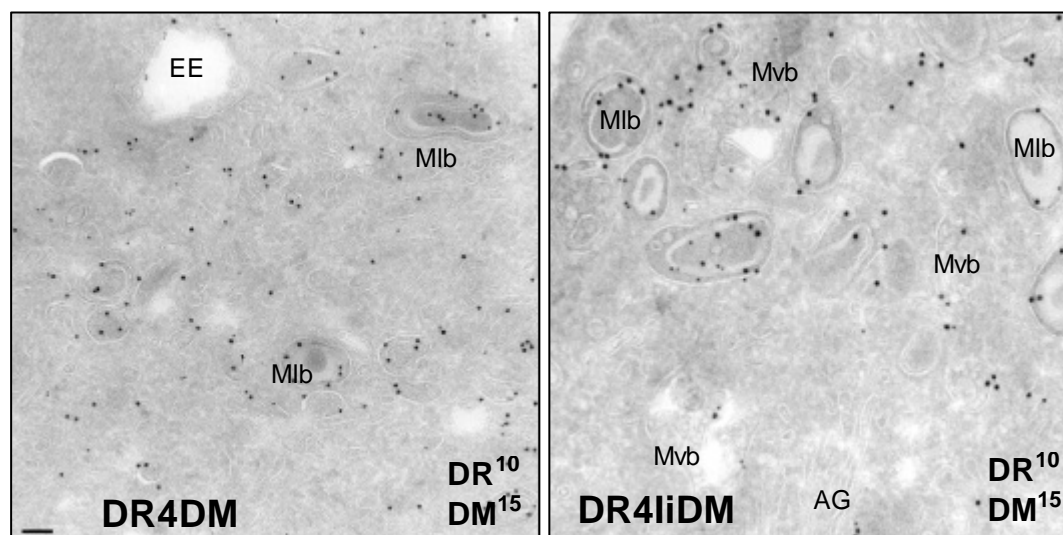


Figura 28: Colocalització de DR4 i DM en la via endocítica de les cèl·lules DR4DM i DR4liDM per microscòpia electrònica. La visualització de la localització subcel·lular de les dues molècules s'aconseguí per immunomarcatge indirecte seqüencial amb un AcMo específic per DM α acoplat a prot A-Au de 15 nm, seguit d'un anti-DR α acoplat a prot A -Au de 10 nm. La colocalització de DR4 i DM es dona a nivell de Mvbs i Mlbs i en menor grau en els EE. La barra indica 100 nm

Els resultats de la quantificació de les partícules d'or associades a DM α i l'anàlisi de la densitat de DM α en cada compartiment (figura 29A) mostraven que:

1. L'expressió d'HLA-DM en les cèl·lules DR4DM (1262 partícules d'or) doblava la de les cèl·lules DR4liDM (583)
2. HLA-DM, en absència d'li, s'acumulava majoritàriament en els Mlbs, on la densitat de DM era molt superior en les cèl·lules DR4DM ($d=8.8$) que en les DR4liDM ($d=2.6$, $p = 5 \times 10^{-6}$, test t de Student). En els lisosomes es detectà una tendència semblant però sense significació estadística.
3. En els compartiments primers, EE i Mvbs, la densitat de DM era semblant en les dues cèl·lules

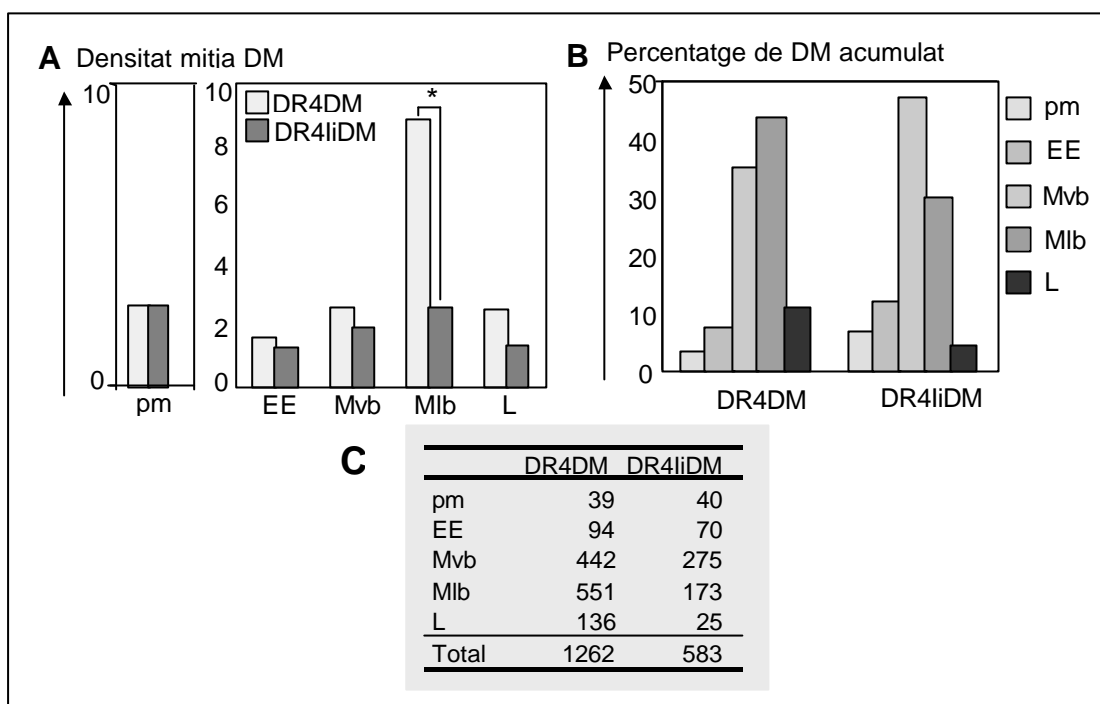


Figura 29: Anàlisi de la quantificació relativa de DM en les cèl.lules DR4DM i DR4liDM. La quantificació es va fer directament al microscopi, sobre seccions marcades seqüencialment amb anti-DM α i anti-DR α acoplats a partícules d'or de 15 i 10 nm, respectivament. **(A)** Els histogrames mostren la densitat mitja de DM en cada categoria de compartiment en les cèl.lules DR4DM (histograma puntejat) i DR4liDM (histograma ombrejat). **(B)** Els histogrames mostren el percentatge de DM acumulat a la superfície cel.lular (pm, histograma ratllat), en els endosomes temprans (EE, histograma ombrejat), en els endosomes multivesiculars (Mvb, histograma escamós), als endosomes multilaminars (Mlb, histograma barrat) i als lisosomes (L, histograma negre). **(C)** A la taula es mostra el valor absolut del total de partícules associades a DM recomptades en cada categoria de compartiment

A l'analitzar la distribució general de DM α , els patrons resultaven diferents (figura 29B), ja que si bé la proporció de DM en la superfície cel.lular era semblant en les dues cèl.lules (4% i 7%), en les cèl.lules DR4DM el 44% de DM α es trobà acumulat en els Mlbs i un 35% en els Mvbs. Contràriament, les cèl.lules DR4liDM presentaven major acumulació de DM en els Mvbs (47%) respecte als Mlbs (30%).

Els recomptes indicaven que DM expressada en absència d'li s'acumulava principalment en els compartiments Mlbs, suggerint que aquests compartiments podien ser la porta d'entrada per HLA-DM a la via endocítica.

Els resultats d'aquest apartat han permès caracteritzar els compartiments endocítics involucrats en la presentació d'antigen per MHC II en la línia endocrina RINm5F, i determinar la influència exercida per l'expressió de DR4, li i HLA-DM sobre aquests.

Per analogia amb una línia B limfoblastoid (Kleijmeer M i col., 1997), s'han identificat set tipus de compartiments endocítics que contenen DR4 i que s'agrupen en les categories d'endosomes primerencs (EE), MIICs multivesiculars (Mvbs), MIICs multilaminars (Mlbs) i lisosomes (L), en funció de la seva situació en la via endocítica. En els compartiments multilaminars de tipus 6 (MIIC clàssics amb estructura onion-like), no s'ha detectat BSA en cap dels tres temps d'internalització analitzats, suggerint la possibilitat de que aquests compartiments es formen per fusió de vesícules del TGN. La possibilitat de que la BSA hagi "passat" pels Mlbs entre els minuts 20 i 80 d'internalització és poc probable, ja que les cèl·lules en cultiu no es troben sincronitzades i en algun moment s'hagués detectat BSA en aquests compartiments. D'altra banda, en els compartiments multilaminars de tipus 5 que presenten un conjunt de membranes internes desorganitzades i algunes vesícules internes es detecta BSA als 80 minuts d'internalització. Aquests compartiments podrien formar-se per la fusió de Mvbs portadors de la BSA i les vesícules internes, amb Mlbs portadors del contingut electroquímic del lumen.

En les cèl·lules dendrítiques immadures, DR4 s'acumula en compartiments endocítics Mvbs i Mlbs que tot i ser anàlegs, presenten una morfologia diferent dels identificats en les altres dues línies cel·lulars. En aquestes cèl·lules però, no s'han pogut identificar els intermediaris en la maduració dels MIICs (tipus 2 i 3 dels Mvbs, i tipus 5 dels Mlbs). La diferència en l'estat d'activació entre les cèl·lules LCL, (transformades amb el virus EBV) i les cèl·lules dendrítiques, amb fenotip immadur, poden explicar les diferències en les seves vies endocítiques. Probablement, l'estudi dels diferents estadis en la maduració de les cèl·lules dendrítiques (entre immadures i activades) permetria la identificació dels diferents compartiments intermediaris observats en les LCLs.

La presència de tots els compartiments endocítics en les cèl·lules parenterals sense transfectar, confirma que la maduració de les MHC II en les cèl·lules endocrines es dona en compartiments convencionals de la via endocítica, al igual que en altres tipus cel·lulars (Neefjes J i col., 1996). Independentment d'aquesta similitud qualitativa, en les quatre cèl·lules transfectades es produeix un augment del nombre de vesícules endocítiques, especialment dels Mvbs i Mlbs que passen d'un 20% a un 50% dels compartiments endocítics presents en el citoplasma. La coincidència en la quantitat total de MIICs en les transfectants desapareix a l'analitzar la proporció de Mvbs i Mlbs per separat, en cada cèl·lula. Curiosament, la proporció de Mvbs augmenta amb les cotransfeccions, i es correlaciona amb l'aparició de complexes DR4-pèptid estables en la superfície de les diferents transfectants (Serradell L i col., 1999). Les diferències

suggereixen que en cada línia transfectada es troben augmentats aquells compartiments més necessaris en cada situació. Així doncs, en les cèl·lules DR4 en les que la majoria de molècules DR4 són inestables i tendeixen a ser degradades, es troben augmentats principalment els Mlbs, compartiments on poden ser retingudes abans de la degradació en els lisosomes. La dificultat del traçador endocític per accedir als Mlbs suggereix que DR α podria arribar a aquests compartiments directament des de l'ER mitjançant algun mecanisme de control de qualitat semblant al descrit per les MHC inestables (Raposo G i col., 1995; Kopito R i col., 2000). A l'altre extrem de la correlació, es trobarien les cèl·lules DR4liDM, on la coexpressió d'ambdues chaperones permet una biosíntesi de complexos DR4-pèptid estables molt eficient (Serradell L i col., 1999) i els compartiments més augmentats són els Mvbs, compartiments on arriba el material endocitat (BSA), on hi ha totes les molècules involucrades en la unió de les MHC II al pèptid antigènic (DR4, li i DM) i des del qual el transport retrògrad cap a la superfície cel·lular encara és molt eficient (Kleijmeer M i col., 2000; Lankard D i col., 2002). L'augment dels Mvbs en les cèl·lules DR4liDM els assenyala com els compartiments on es donaria la maduració de la majoria de les molècules DR4 en aquesta cèl·lula. En una situació intermitja hi hauria les cèl·lules DR4li i DR4DM, en les que els Mvbs i Mlbs es troben augmentats en una proporció similar, coincidint amb la situació dibuixada a la superfície d'ambdues cèl·lules, en la que es detecta una barreja de complexos DR4-pèptid inestables i de compactes (Serradell L i col., 1999). Els resultats suggereixen que seria la necessitat d'una funció determinada la que induiria l'augment d'un tipus de compartiment o d'un altre en la via endocítica de les cèl·lules transfectades, més que l'expressió d'una molècula en concret. Aquests resultats coincideixen amb resultats anteriors en que s'havia observat una inducció dels compartiments Mlbs en una línia de ronyó transfectada amb MHC II, tot i que els autors atribuïren l'augment d'aquests compartiments a l'expressió de MHC II, ja que no els identificaren en la línia parenteral 293 (Calafat F i col., 1994). En aquest treball no es detectà cap efecte en la via endocítica de la línia 293 amb la coexpressió d'li, probablement degut a que no s'analitzaren els compartiments Mvbs i Mlbs per separat, sino conjuntament com a MIICs.

L'estudi de la localització de DR4 en les diferents transfectants confirma el paper d'li com a responsable de la localització a la superfície cel·lular de una major proporció de DR4. Coincidint amb els resultats de FACS i de microscòpia confocal, les cèl·lules li⁺ presentaven major densitat de DR4 a la superfície cel·lular que les cèl·lules li⁻. En les cèl·lules DM⁺, el marcatge intracel·lular per DR4 duplicava el detectat en absència de la chaperona (DR4 vs DR4DM, DR4li vs DR4liDM), confirmant les dades observades per microscòpia confocal (resultats 1).

L'anàlisi de la densitat de DR4 mostra que no hi ha correlació entre el tipus de compartiment augmentat en cada línia cel·lular i un augment de la densitat de DR4 en aquest. En absència de chaperones, DR4 es distribueix uniformement pels compartiments de la via endocítica amb una densitat lleugerament superior en els Mvbs i

Mlbs. L'al·lel DR4 és intrínsecament inestable i molt sensible a les disminucions del pH (Kropshofer H i col., 1997). En absència d'li i DM, altres pèptids o chaperones podrien estabilitzar la conformació de DR4 i permetre la detecció de DR α en la via endocítica. En els Mlbs la proporció de DR4 acumulada és de quasi el doble que en la resta. Aquest augment és degut a l'augment del nombre de Mlbs en la cèl·lula DR4, i no a una major densitat de DR4 en aquests. Les dades suggereixen que en la cèl·lula DR4, alguns dímers de nova síntesi són secretats per defecte cap a la superfície cel·lular des d'on són internalitzats, resseguint tota la via endocítica fins ser degradats als lisosomes. L'augment de Mlbs estaria relacionat amb l'elevada quantitat de DR4 per degradar.

Amb l'expressió d'li en absència de DM la majoria de les molècules DR4 detectades fora de l'ER es localitzen a la superfície cel·lular mentre que la via endocítica presenta una menor proporció de DR4. La densitat de DR4 es troba lleugerament augmentada en Mvbs i Mlbs. Aquests resultats coincidirien amb una arribada de DR4li a la via endocítica seguida ràpidament de la degradació de l'li fins a l'intermediari DR4-CLIP que al perdre la senyal de retenció sortiria cap a la superfície cel·lular donant lloc a l'elevada quantitat de complexos DR4-CLIP detectats a la superfície d'aquestes cèl·lules (Serradell L i col., 1999). La detecció i quantificació de la li nativa en aquestes cèl·lules indica que la degradació de la li es produeix en els compartiments primers de la via endocítica EE i Mvbs, possiblement després d'haver passat per la superfície cel·lular. Un terç del total d'li nativa es detecta a la superfície cel·lular de les cèl·lules endocrines. Aquesta via de transport cap a la via endocítica passant prèviament per la superfície és minoritària en alguns tipus cel·lulars com les cèl·lules B, però s'ha descrit com una via important en altres cèl·lules com les cèl·lules dendrítiques. Independentment de si els complexos DR4-li arriben a la via endocítica des de la superfície o directament als EE/Mvbs des de l'AG, la degradació d'li s'inicia en aquests compartiments ja que no es detecta li nativa en els Mlbs ni en els L.

La coexpressió de DM en absència d'li augmenta significativament la densitat de DR4 en els Mlbs i L de les cèl·lules DR4DM. Aquest augment coincideix amb una major densitat de DM en aquests compartiments i emfatitza el rol de chaperona de la via endocítica postulat per DM (Copier J i col., 1996). La presència de DM estabilitzaria les molècules DR4 que arribessin als compartiments més àcids de la via endocítica sense unir el lligand adequat, permetent que mantinguin una conformació detectable per l'Ac. D'altra banda l'elevada densitat de DM i DR4 en aquests compartiments suggereix que en absència d'li, els Mlbs podrien ser la porta d'entrada de DM i part de les DR4 a la via endocítica des del TGN. De la mateixa manera que en les cèl·lules DR4, una fracció de les DR4 de nova síntesi podria ser secretada per la via constitutiva cap a la superfície des d'on la internalització permetria la seva presència en la resta de compartiments endocítics.

En les cèl·lules DR4liDM, l'expressió d'li conjuntament amb DM induïx una acumulació de DR4 principalment en els Mvbs, reduïnt-la en Mlbs i L, contràriament a

l'observada en les cèl.lules DR4DM. En aquestes cèl.lules la localització d'li no es veu alterada per l'expressió de DM, i la li nativa només es detecta en els EE i Mvbs, però l'expressió de DM coincideix amb la disminució de la densitat d'li a la superfície cel.lular. Aquest resultat suggereix que o bé la internalització d'li en presència de DM es produeix més ràpidament, o bé que l'expressió de DM afavoreix el re-direccionament dels complexos DR4li cap als EE o Mvb sense passar per la superfície cel.lular. Ambdós fets podrien estar mediat per la conjunció de les seqüències responsables del tràfic d'li i DM (Bakke o i Dobberstein E, 1990; Copier J i col., 1996). Independentment del mecanisme usat, l'expressió de DM permetria una acceleració de la degradació de la li nativa facilitant la seva localització en la via endocítica. S'ha descrit una associació directa entre li i HLA-DM en diferents tipus cel.lulars però en cap treball s'ha descrit l'influència de l'expressió de DM sobre la localització d'li. La coexpressió d'ambdues chaperones també té un efecte en la localització d'HLA-DM. En les cèl.lules DR4DM, els MIbs presenten la major densitat de DM però amb l'expressió d'li, aquesta densitat disminueix i DM augmenta en els Mvbs, suggerint que al menys part dels dimers DM interaccionen amb li, assolint compartiments més primerencs de la via endocítica. Estudis previs han demostrat que l'associació d'li amb DM redirigeix la localització de DM i indirectament n'allarga la vida mitja (Pierre P i col., 2000). La chaperona li podria facilitar la localització temprana de DM en la via endocítica que indirectament reduiria la seva degradació en els compartiments més tardans o lisosomes.

En resum, les dades indiquen que l'expressió per transfecció de DR4, li i DM indueix una redistribució de la via endocítica de les cèl.lules epitelials endocrines que les predisposa per a facilitar la presentació adequada de pèptids. Augmenta el nombre de compartiments clàssicament considerats com a MIICs que contenen les tres molècules transfectades, així com el material endocitat i les capacitats per fusionar-se amb vesícules secretores i amb la superfície cel.lular. Dins dels MIICs es poden diferenciar els compartiments Mvbs i MIbs, que es troben augmentats en situacions diferents. Mentre els Mvbs predominen en les cèl.lules més eficients en la formació de complexos DR4-pèptids estables, els MIbs predominen en les cèl.lules que presenten una majoria de molècules DR4 inestables i fàcilment degradables en la via endocítica. A més de la reorganització de la via endocítica, l'expressió d'ambdues chaperones influeix la distribució de DR4 en cada cèl.lula, mitjançant mecanismes directes. L'expressió d'li indueix directament un augment de DR4 a la superfície cel.lular, mentre que l'expressió de DM en absència d'li indueix una major densitat de DR4 en els MIbs i L. Finalment, la coexpressió d'li i DM també té efectes sobre ambdues chaperones, ja que la presència de DM disminueix la densitat d'li a la superfície i n'augmenta la seva degradació, mentre que li facilita l'arribada de DM als Mvbs.