

Figura 47. Comparació de la distribució de DR4 en una línia B limfoblastoid i en la cèl·lula DR4liDM. A l'histograma (A) es mostra la densitat de DR4 en cada compartiment de les dues cèl·lules estudiades. (B) A l'histograma hi ha representat el marcatge de DR4 acumulat en cada localitat. A la taula es mostra en valor absoluts, les partícules d'or associades a DR4 endocític, recomptades en els 20 perfils de cada tipus cel·lular.

L'anàlisi indicava que :

1. El nombre de partícules d'or associades a DR4 en la via endocítica de la LCL (232) era semblant al nombre de partícules detectades en DR4liDM (262).
2. La línia B limfoblastoid presentava una densitat de DR4 significativament superior a la detectada en la línia neuroendocrina en els compartiments EE, Mvb i Mlb.
3. La densitat de DR4 en els lisosomes de la línia B limfoblastoid no diferia de l'observada en les cèl·lules DR4liDM
4. En la LCL, DR4 s'acumulava de manera similar entre els endosomes primerencs (27%) i els dos compartiments MIIC: Mvbs (37%) i Mlbs (31%), mentre que es trobava pràcticament absent dels lisosomes.
5. En les cèl·lules neuroendocrines, el major percentatge de DR4 es localitzava en els Mvbs (52%) seguit dels Mlbs (23%) i dels endosomes primerencs (15%).

En la cèl·lula B la densitat de DR4 en cada compartiment (amb l'excepció dels lisosomes) era superior a la de les cèl·lules epitelials, suggerint diferències específiques de tipus cel·lular, en la capacitat de cada compartiment per contenir una major o menor densitat de les molècules estudiades. La LCL presentava una distribució força homogènia de DR4 entre els EE els Mvbs i els Mlbs, mentre que en la línia DR4liDM el DR4 s'acumulava principalment en els compartiments Mvbs, seguits dels Mlbs i en menor quantitat en els EE.

4. La distribució d'Ii és diferent en els dos tipus cel·lulars estudiats

La localització de la cadena invariant en la LCL es va realitzar per marcatge seqüencial amb l'Ac Icc5, anti-Ii i l'Ac anti-DR α . A la figura 48 es mostra una imatge representativa del marcatge obtingut. Tal com s'havia observat prèviament en les cèl·lules transfectades (veure fig 26, capítol 2), el marcatge per la cadena invariant es localitzava majoritàriament a l'ER, a l'AG i als compartiments EE i Mvbs de la via endocítica. La presència d'Ii nativa també es detectava en la superfície de les LCLs .

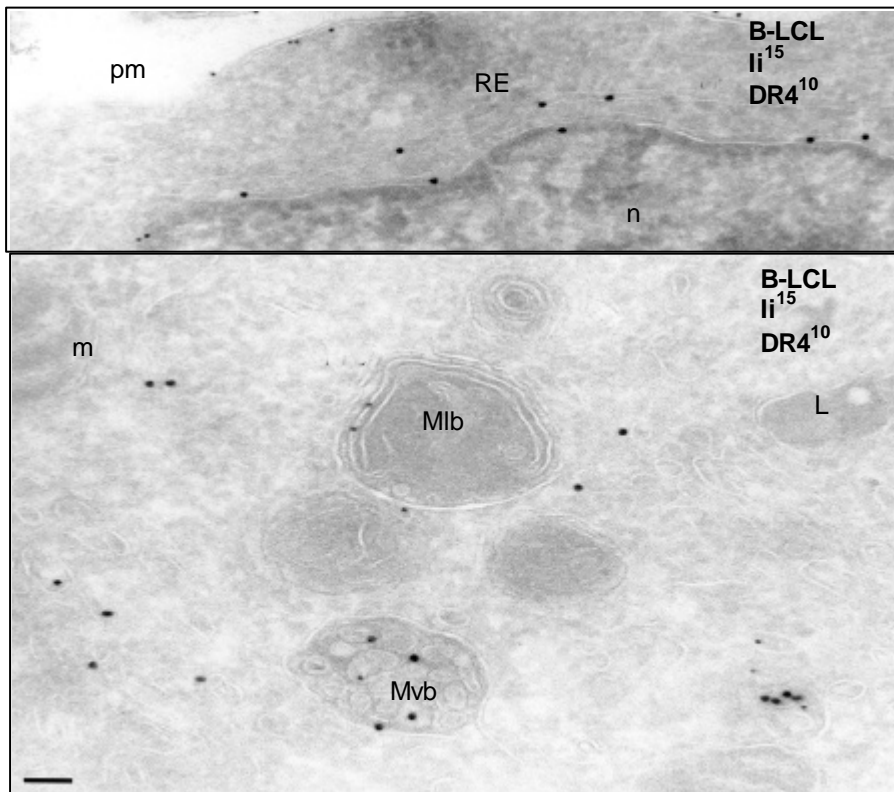


Figura 48. Colocalització d'Ii i DR4 en les B-LCL. El marcatge es va fer per immunodetecció seqüencial, amb Ac policlonals específics per Ii nativa (Icc5) i DR α i s'analitzà per microscòpia electrònica. A la imatge superior es visualitza DR4 a la membrana cel·lular (pm) i la Ii acumulada l'RE perinuclear. A la imatge inferior es mostra la colocalització de DR4 i Ii als Mvb, mentre que Ii es troba absent dels Mlb i L.

La quantificació del marcatge associat a la cadena invariante nativa de la LCL es mostra a la figura 49, amb la comparació de la quantificació realitzada en les cèl·lules DR4liDM. Els resultats obtinguts indicaven que:

1. La quantitat absoluta d'li nativa era major en les cèl·lules B (566 partícules d'or) que en les cèl·lules neuroendocrines (210).
2. La densitat d'li era superior a la superfície de les cèl·lules DR4liDM que en les LCL.
3. La densitat d'li en els endosomes primerencs de la LCL ($d_{EE} = 1.6$) era semblant a la detectada en la línia transfectada ($d_{EE} = 1.4$).
4. Contràriament, la densitat d'li en els compartiments Mvbs era significativament més elevada en les cèl·lules B ($d_{Mvb} = 2.7$) que en la línia DR4liDM ($d_{Mvb} = 1.2$, $p_{Mvb}=0.04$, test t de Student).
5. En la LCL es detectava li nativa en els Mlb ($d_{Mlb} = 1.5$), mentre que en DR4liDM no s'observà presència d'li nativa en aquests compartiments.

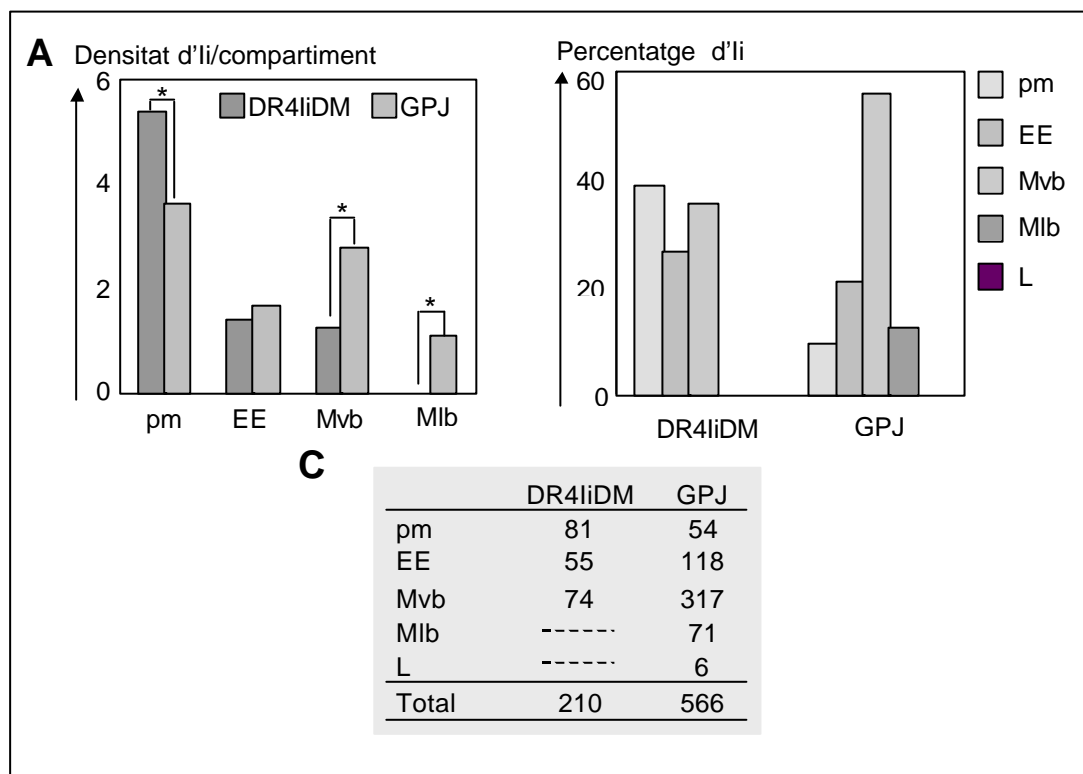


Figura 49. Comparació de la densitat i la distribució d'li en les dues línies analitzades. (A) Els histogrames mostren la densitat de DR4 en cada compartiment. S'assenyalen (*) les diferències significatives segons el test T de student amb $p < 0.01$. (B) Al segon histograma es representa la proporció d'li acumulada en cada localitat cel·lular i a la taula (C) hi ha el número de partícules d'or associades a li en els compartiments de les dues cèl·lules.

A l'analitzar el percentatge d'Ii acumulat en cada categoria de compartiment endocític, es mostrava que:

1. En la LCL, només un 8% del total d'Ii nativa es localitzava a la superfície cel·lular, mentre que el percentatge d'Ii detectat a la superfície de la cèl·lula neuroendocrina era del 35%
2. En els compartiments Mvbs de la cèl·lula B, s'acumulava el 56% d'Ii nativa, mentre que en la cèl·lula DR4liDM només el 35% de l'Ii quantificada s'acumulava en els Mvbs.
3. El 4% de l'Ii nativa s'acumulava en els compartiments Mlbs de la LCL mentre que no es va detectar marcatge per Ii nativa en els Mlbs de la línia endocrina.

En les cèl·lules endocrines transfectades un terç de la Ii nativa es detectava a la superfície cel·lular i en els compartiments EE i Mvb de la via endocítica mentre que es trobava absent en Mlbs i L. En les LCL, la màxima proporció i densitat d'Ii nativa s'acumulava en els Mvbs seguits dels EE i Mlbs mentre que només un 8% d'aquesta chaperona es trobava a la superfície cel·lular

5. La localització i la distribució d'HLA-DM és diferent en les LCL i en la línia DR4liDM

La localització d'HLA-DM es va estudiar per marcatge seqüencial de seccions cel·lulars de les LCLs amb l'AcMo 5C1, anti-DM α , seguit de l'Ac anti-DR α . A la figura 50 es mostra una imatge representativa del marcatge en les cèl·lules B. El marcatge per DM s'acumulava en els compartiments de la via endocítica: Mvbs i Mlbs. Contràriament a lo observat en les cèl·lules endocrines, HLA-DM es localitzava en la membrana perifèrica dels Mvbs de les LCL, i no es detectava en les membranes de les vesícules internes.

Figura 50. Colocalització subcel·lular de DR4 i DM en les B-LCL. Ambdós molècules es detectaren per immunodetecció seqüencial amb or de 10 nm per DR4 i or de 15 nm per DM.

