

RESULTATS II

La via endocítica de la cèl.lula endocrina es reorganitza en funció de
l'expressió de DR4, li i HLA-DM

Durant els darrers 15 anys s'han fet molts esforços per aïllar el compartiment especialitzat de les APCs on es produeix la maduració de les MHC II i la unió al pèptid antigènic. Mitjançant la immunodetecció per microscòpia electrònica i diferents tècniques de fraccionament subcel·lular s'identificaren en LCLs unes vesícules electrodenses que contenien la majoria de les MHC II. Aquests compartiments eren diferents dels lisosomes i contenien abundants membranes internes organitzades en vesícules internes (compartiments multivesiculars, Mvb) o bé organitzades concèntricament (compartiments multilaminars, Mlb) (Neefjes JJ i col., 1990). L'absència del receptor de la transferrina i la presència de diversos marcadors lisosomals (CD63, β -hexosaminidasa, lamp-1) van permetre classificar aquests compartiments com endosomes tardans i lisosomes, anomenant-los col·lectivament MIIC (MHC II containing compartments) (Pieters J i col., 1991). Estructures endocítiques semblants, anomenades MIIC-like, es van descriure a continuació en altres APCs com les cèl·lules dendrítiques (Arkema JM i col., 1991) i macròfags murins activats (Harding CV, 1995b). El cofraccionament dels Mvbs i els Mlbs amb les tècniques disponibles ha fet difícil discernir els esdeveniments bioquímics que es donen en cada compartiment per separat. L'interrupció de la degradació de la cadena invariant mitjançant el tractament de les APCs amb inhibidors de proteases permet detectar els intermediaris de la degradació d'Ii en els compartiments multivesiculars (Amigorena S i col., 1995) mentre que HLA-DM es troba present en Mvbs i Mlbs (Denzin LK i col., 1995). Paral·lelament s'identificà un segon grup de compartiments especialitzats en el processament antigènic en la línia A20 de limfoma B murí. A diferència dels MIIC, aquestes vesícules co-sedimentaven amb el receptor de la transferrina i independentment de l'hexosaminidasa, i s'anomenaren vesícules CIIV (class II vesicles) (Amigorena S i col., 1994).

En el primer treball sobre la maduració de les MHC II en cèl·lules B no transformades, Castellino i col·laboradors realitzaren un estudi amb esplenòcits B aïllats de ratolins CBA/J que havien processat l'antigen HEL. Mitjançant un Ac específic pels complexos MHC II-HEL (Sk-HEL₉₉₋₆₅) demostraren que les molècules de MHC II s'unien la pèptid antigènic al llarg de tota la via endocítica, tot i que la majoria de complexos es formaven en compartiments densos semblants als lisosomes (Castellino F i col., 1995). Més recentment s'ha descrit en cèl·lules B i en cèl·lules dendrítiques, que la captació d'antigen o altres estímuls activadors indueixen canvis dinàmics en la via endocítica, per facilitar la presentació dels antigens captats (Pierre P i col., 1997; Kleijmeer M i col., 2001; Siemasko K i Clark MR, 2001; Lankar D i col., 2002).

Tot i que en els MIIC és on majoritàriament es dona la unió de les MHC II de nova síntesi als pèptids antigènics, també s'han descrit alguns pèptids que s'uneixen a MHC II en els endosomes primerencs, involucrant molècules MHC II internalitzades de la superfície cel·lular (Gromme M i col., 1999).

Els Mvbs es formen per invaginacions de la membrana perifèrica dels endosomes primerencs, que internalitzen material citoplasmàtic i formen les vesícules internes.

Aquests compartiments poden fusionar-se directament amb la membrana cel·lular provocant l'alliberament de les vesícules internes, que s'anomenen exosomes (Raposo G i col., 1996); o poden fer arribar el seu contingut fins a la superfície, mitjançant la formació de vesícules de transport retrògrad (Kleijmeer M i col., 2001). *In vitro*, també s'ha descrit la seva capacitat per fusionar-se amb grànuls de secreció regulada i amb els MIbs i lisosomes, però no entre ells mateixos ni amb endosomes primerencs (Aniento F i col., 1993; Gruenberg i Howell, 1989). Les observacions indiquen que els Mvbs són compartiments transitoris de transport, intermediaris obligatoris entre els endosomes primerencs i els lisosomes. Els MIbs són compartiments més tardans que presenten un ambient luminal altament acídic amb una pressió proteolítica elevada. No es coneix si la generació dels MIbs es dona per maduració dels Mvbs o si la seva biogènesi és independent dels MIICs primerencs, però determinades activitats proteolítiques que s'adquireixen progressivament amb la maduració dels compartiments endosomals només es troben en aquests compartiments (Garin J i col., 2001). Calafat i col. laboradors demostraren que els MIIC en cèl·lules B necessiten l'aport continu de proteïna de nova síntesi, ja que quan les cèl·lules es tracten amb cicloheximida a diferents temps, el nombre de MIICs disminueix. A més, l'expressió per transfecció de MHC II pot induir l'aparició de MIICs tant multivesiculars com multilaminars en la línia 293, derivada de ronyó i no especialitzada en la presentació d'antigen, suggerint que les MHC II podrien induir la formació d'aquests compartiments (Calafat J i col., 1994).

En aquesta part del treball s'ha analitzat la influència de l'expressió de MHC II, Ii i HLA-DM sobre l'organització de la via endocítica de la línia RINm5F i sobre la localització subcel·lular de les MHC II, amb l'objectiu d'identificar els compartiments subcel·lulars involucrats en el processament antigènic per MHC II en cèl·lules epitelials endocrines, i estudiar la influència d'aquestes molècules sobre la seva biogènesi.

1. Definició de la via endocítica de la línia RINm5F

Els compartiments endocítics involucrats en el processament antigènic per MHC II es van identificar al microscopi electrònic de transmissió en crioseccions fixades de les cèl·lules DR4liDM, marcades amb un anticòs policlonal anti-DR α . El patró de marcatge obtingut es va comparar amb l'obtingut en dues APCs amb expressió constitutiva de MHC II: una línia B-LCL i cèl·lules dendrítiques immadures. En les tres línies cel·lulars, la presència de MHC II es detectava en el reticle endoplasmàtic (ER), en l'aparell de Golgi (GA) i en les vesícules que conformen la xarxa del trans-golgi (TGN). Tant les cèl·lules endocrines com la B-LCL presentaven la major part del marcatge per DR4 acumulat a la superfície cel·lular i també es detectava en un conjunt d'organel·les internes de densitat variable al pas dels electrons. En canvi, en la cèl·lula dendrítica immadura el marcatge de DR4 es trobava absent de la superfície cel·lular i es distribuïa principalment en els compartiments interns de morfologia endocítica. Tal com es mostra a la figura 18, el marcatge per DR α permeté la identificació de set compartiments diferents en la cèl·lula endocrina i en la B-LCL.

Vesícules de tipus 1: de morfologia esfèrica, recobertes o no de clatrina, amb lúmen poc dens als electrons. Localitzades en la perifèria del citoplasma, properes a la superfície cel·lular.

Vesícules de tipus 2: de morfologia irregular amb diàmetre entre 200-400 nm. Presenten un lumen poc dens als electrons, en el que es poden observar entre 1-3 vesícules internes.

Vesícules de tipus 3 (multivesiculars): de morfologia ovoide amb diàmetre entre 200-400 nm i de lumen mitjanament electrodens. Estan plenes de vesícules internes amb l'excepció d'una o dues àrees poc denses als electrons.

Vesícules de tipus 4 (multivesiculars): ovoides, de 200-400nm de diàmetre i amb densitat mitjana als electrons. Completament plenes de vesícules internes.

Vesícules de tipus 5 (multilaminars): esfèriques, amb lumen d'elevada densitat als electrons i plenes de membranes internes desorganitzades.

Vesícules de tipus 6 (multilaminars): esfèriques, amb lumen mitjanament dens als electrons i plenes de membranes internes organitzades en anells concèntrics.

Vesícules de tipus 7: de morfologia irregular amb un lumen altament electrodens i sense membranes internes.

En les cèl·lules dendrítiques immadures es detectaren compartiments endocítics de tipus 1 i 2. No s'observaren compartiments multivesiculars de tipus 3 i 4 però si uns compartiments de morfologia esfèrica (Tipus 4 DC), molt rics en marcatge intern per classe II, que permetia suggerir la presència de membranes internes. També es detectà DR4 en uns compartiments multilaminars de tipus 6 però amb membranes internes paral·leles transversals enlloc de concèntriques.

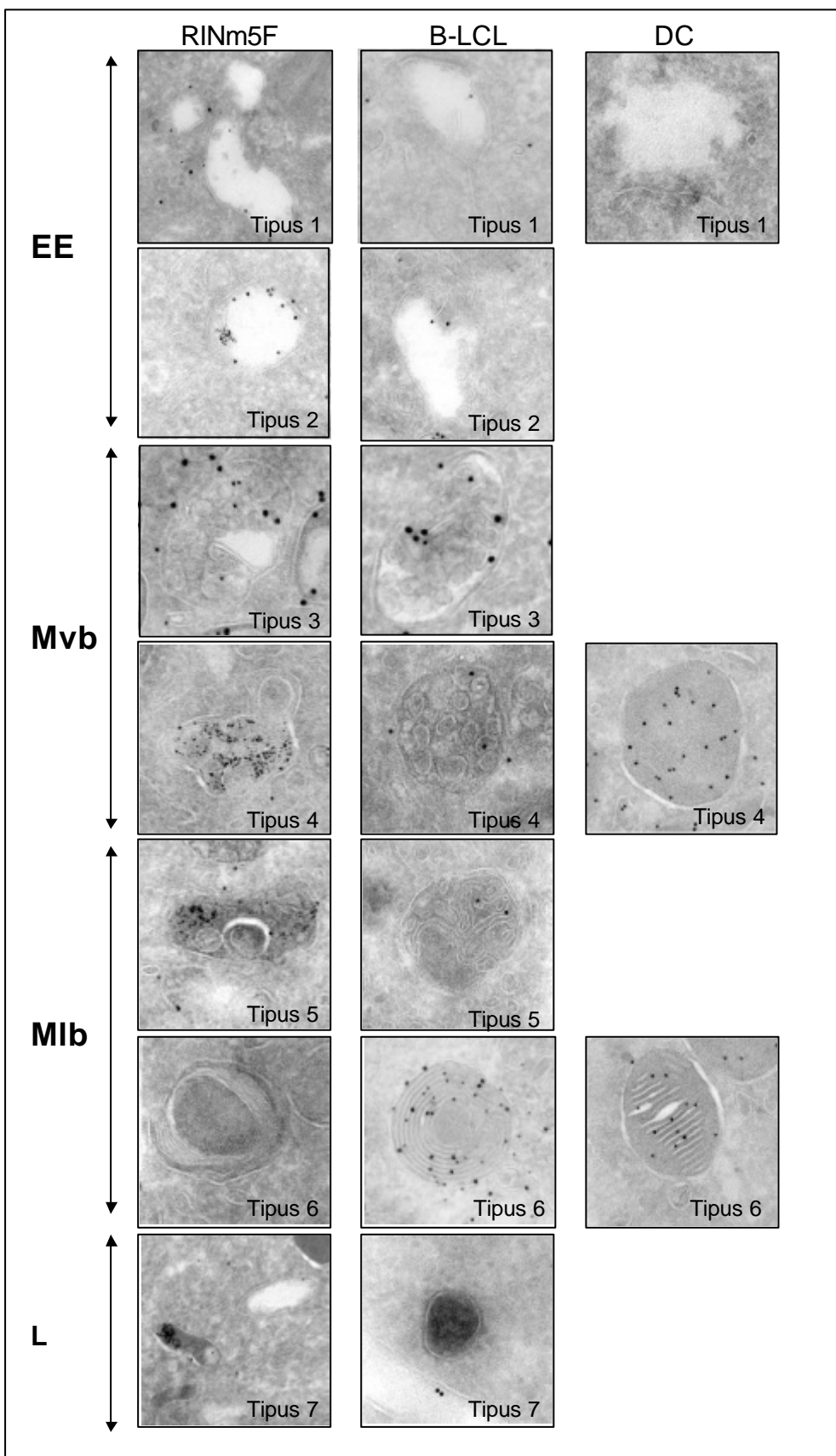


Figura 18 Identificació i comparació dels diferents tipus de compartiments endocítics en la línia epitelial RINm5F, en una línia B limfoblastoid (LCL) i en una cèl.lula dendrítica inmadura (DC). Es mostra un compartiment de cada tipus identificat en les tres línies cel.lulars. Tipus 1 marcatge amb DR¹⁰, Tipus 2 marcatge amb DR¹⁰ i BSA⁵, Tipus 3: marcatge amb DR¹⁰ i li¹⁵, Tipus 4, 5, 6 i 7 marcatge amb BSA⁵, DR¹⁰ i DM¹⁵