

RESULTATS IV
Comparació de la línia endocrina DR4liDM i d'una línia B
limfoblastoid com a cèl.lules presentadores d'antigen per MHC II

En situacions d'inflamació com ara en les glàndules afectades per una resposta autoimmunitària, es troben diferents tipus cel·lulars *in situ* amb la capacitat de presentar antigens proteics via MHC II. En aquestes situacions les cèl·lules endocrines són les més nombroses i expressen ectòpicament MHC II com a conseqüència de l'ambient pro-inflamatori. L'expressió funcional de molècules MHC II (Catálfamo M i col., 1999), les converteix en cèl·lules capacitades per a presentar antigens per MHC II a les cèl·lules CD4⁺ infiltrants (Armstrong TD i col., 1998). A més, en els infiltrats presents en les glàndules afectades per respostes autoimmunitàries, també hi ha cèl·lules B, cèl·lules dendrítiques i macròfags, amb la capacitat de fagocitar i presentar material autòleg per diferents mecanismes. Tot i aquestes possibilitats, diferents treballs descriuen la reactivitat de les cèl·lules T aïllades dels infiltrats per antigens presentats per les cèl·lules endocrines diana i no per les APC convencionals (Londei M i col., 1985; Weetman AP i col., 1986; Dayan CL i col., 1991; Quaratino S i col., 1996).

L'elevada especialització de les cèl·lules neuroendocrines, com les cèl·lules β -pancreàtiques o els tiròcits, en la síntesi i secreció d'hormones i neurotransmissors ha donat lloc al desenvolupament de vies secretores complexes, altament regulades i polaritzades. El patró de proteases expressat en aquestes cèl·lules és específic de llinatge cel·lular i permetria que la generació de lligands per a les MHC II es produís d'una manera diferencial entre aquestes cèl·lules i les APCs professionals presents en l'infiltrat inflamatori.

En aquesta part de l'estudi es comparà la capacitat de les cèl·lules endocrines i d'una APC amb expressió de MHC II constitutiva, per presentar autoantigens associats a DR4. Amb aquest objectiu es va fer la comparació dels resultats obtinguts en la línia DR4liDM (veure resultats III) amb els d'estudis paral·lels sobre l'organització de la via endocítica i del repertori de pèptids associats a DR4 en una línia B limfoblastoid homozigota per aquest al·lel.

1. Descripció de les línies estudiades

Les característiques de la via endocítica en línia DR4liDM (resultats II), i els lligands majoritaris que s'associen a DR4 en aquest tipus cel·lular (resultats III), es van comparar amb els resultats obtinguts en estudis paral·lels amb cèl·lules B transformades amb el virus d'Epstein-Barr o LCL (lymphoblastoid cell line).

Els nivells d'expressió de DR4, li i HLA-DM en ambdós tipus cel·lulars es va comparar per immunofluorescència i anàlisi per citometria de flux. A la Figura 43 es mostren els histogrames corresponents a la tinció per DR4 i DR-CLIP de membrana i a les tincions citoplasmàtiques per li i HLA-DM en les dues cèl·lules estudiades. A la taula es mostren els nivells d'expressió de les tres molècules, expressats com la mitjana de la intensitat de fluorescència detectada (MFI). Els resultats demostren que:

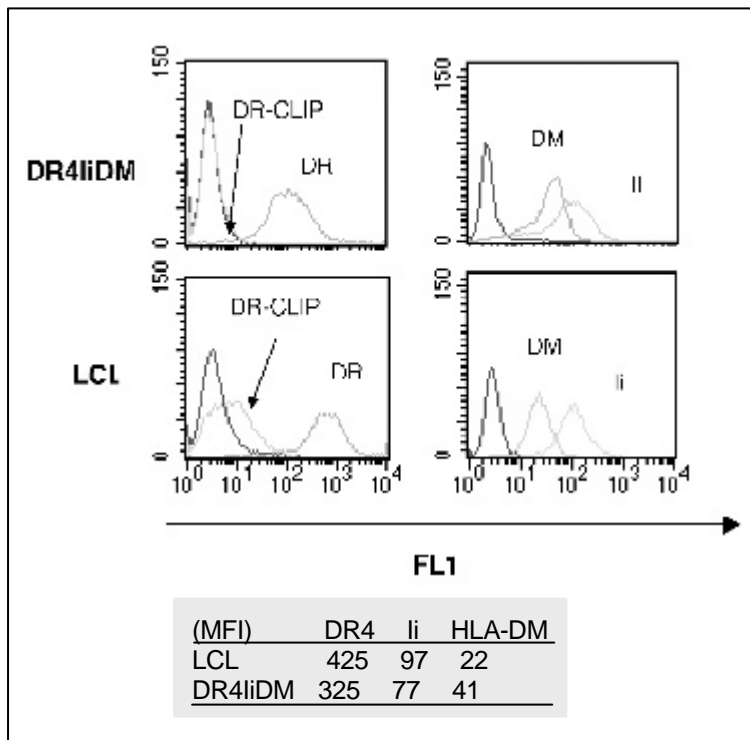


Figura 43 Anàlisi per citometria de flux de l'expressió de DR4, li i HLA-DM en les cèl·lules DR4liDM i en la línia B limfoblastoid. Els histogrames de l'esquerra mostren les tincions de DR i DR-CLIP a la superfície de les cèl·lules endocrines (dalt) i de les LCL (baix). A la dreta hi ha les tincions citoplasmàtiques d'li i DM en els dos tipus cel·lulars. Els AcMo usats són els que s'indiquen a l'apartat de materials i mètodes. A la taula es mostren els valors de la mitjana d'intensitat de fluorescència en cada tinció.

1. L'expressió de DR4 a la superfície cel·lular era més elevada en les cèl·lules B (MFI=425) que en la línia DR4liDM (MFI=325).
2. L'expressió de DR-CLIP era detectable a la superfície de la línia B limfoblastoid mentre que es trobava absent en la línia neuroendocrina. Els complexos DR-CLIP podien correspondre a DR4 i també als isotips associats DR53.
3. L'expressió d'li era semblant en les dues cèl·lules (MFI_{LCL}= 97 i MFI_{DR4liDM}= 77). La relació DR/li era també semblant en la línia B limfoblastoid i en la cèl·lula DR4liDM (DR/li: 4.4, DR/li: 4.2, respectivament).
4. L'expressió d'HLA-DM en la línia neuroendocrina duplicava el nivell d'expressió detectat en la línia B limfoblastoid (MFI_{LCL}= 22, MFI_{DR4liDM}=41). La relació entre DR4 i HLA-DM en la cèl·lula B limfoblastoid (DR/DM=19) era superior a l'observada en la cèl·lula DR4liDM (DR/DM=8).

El nivell d'expressió de les tres molècules es trobava en el mateix ordre de magnitud en les dues cèl·lules. La diferència més important s'observà en el nivell d'expressió d'HLA-DM que era en la línia neuroendocrina duplicava l'expressat per la LCL.

Una altra diferència descrita entre les LCLs i les cèl·lules endocrines és l'expressió d'HLA-DO. HLA-DO és una chaperona de MHC II, que es localitza en la via endocítica tardana i conjuntament amb HLA-DM intervé en el carregament del pèptid antigènic.

L'absència de l'expressió de DO de rata en la línia RINm5F es mostra en la Figura 44. L'expressió de DO α es va analitzar mitjançant RT-PCR a partir de RNA total de les cèl·lules RINm5F, seguida d'hibridació amb una oligosonda específica. Com a control positiu d'expressió s'usà melsa i timus de rata.

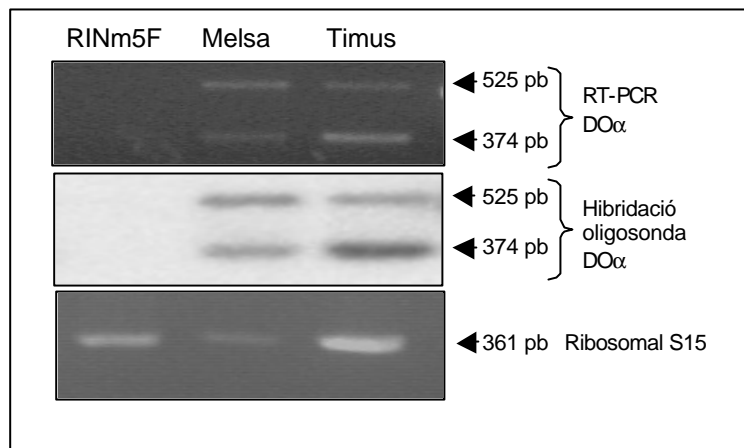


Figura 44. La línia RINm5F no expressa HLA-DO. Presència de l'expressió d'HLA-DO de rata. Determinació per RT-PCR i posterior hibridació amb una oligosonda per DO α , en RNA total de la línia RINm5F. Com a controls positius s'usà RNA total de melsa i tiroides de rata fetal.

Els resultats mostren l'absència d'expressió d'HLA-DO en la línia estudiada, mentre que tant en la melsa com en el RNA total provinent del timus es detectaven dues formes d'expressió d'HLA-DO amb amplimers de 324 b i 494 b. Els encebadors usats es van dissenyar sobre els exons 2 i 3. L'amplificació amb els encebadors específics per la proteïna S15 ribosomal, realitzada per a controlar la puresa de l'extracció del RNA total no mostrà contaminació per DNA.

2. Comparació de l'organització de la via endocítica de les cèl·lules DR4liDM i d'una línia B limfoblastoid

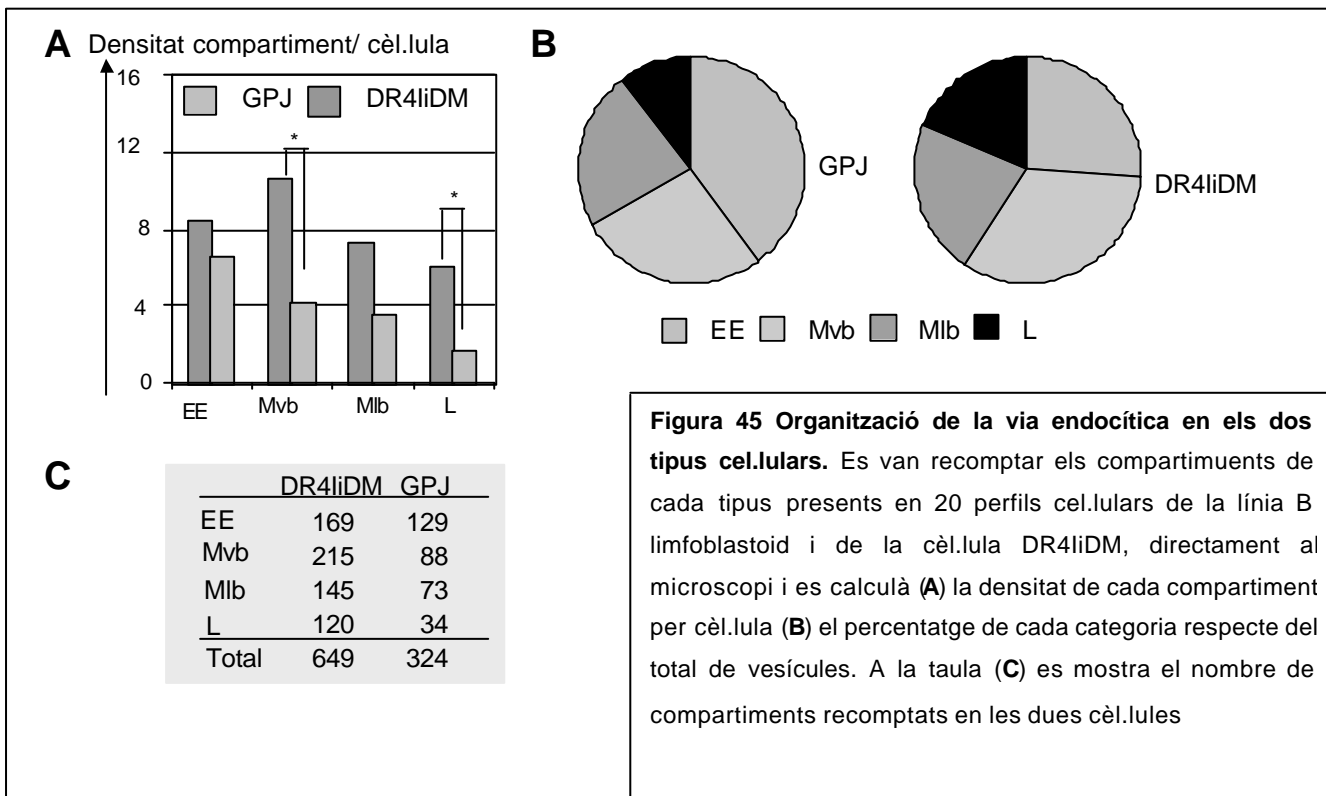
La generació dels lligands peptídics per les MHC II i la formació del complex trimolecular MHC $\alpha\beta$ -pèptid té lloc en la via endocítica de la cèl·lula hoste. Amb l'objectiu de determinar les semblances i diferències entre les vies endocítiques dels 2 tipus cel·lulars estudiats es va fer l'anàlisi de la localització i distribució de DR4, li i DM per microscopia electrònica en la línia B limfoblastoid.

2.1. Els compartiments intracel·lulars que contenen les MHC de classe II en la LCL són morfològicament homòlegs als de la línia neuroendocrina transfectada.

A l'apartat 1.1 dels resultats II (veure Figura 18), es mostra l'analogia morfològica dels compartiments observats en les dues línies. En la via endocítica de la línia B limfoblastoid es podien detectar endosomes primerencs de tipus 1 i 2, endosomes multivesiculars (Mvbs) de tipus 3 i 4, compartiments multilaminars de tipus 5 i 6, i lisosomes. Tot i que en aquest estudi no es va fer un experiment d'internalització de BSA-Au en la línia B limfoblastoid, la progressió d'aquest traçador endocític en les línies B tant humanes com murines es troba àmpliament documentada (Kleijmeer MJ i col., 1996; 1997) i manté un paral·lelisme amb la cinètica observada en la línia DR4liDM.

2.2. El 50% de les vesícules endocítiques en ambdues línies cel·lulars són MIICs

Per estudiar l'organització de la via endocítica en les LCL, es van quantificar els compartiments de 20 perfils cel·lulars, seguint el mateix protocol que en les cèl·lules transfectades. A la Figura 45A es diagrama la densitat mitja de cada compartiment en els dos tipus cel·lulars. A la figura 45B els diagrames de sectors representen el percentatge de cada compartiment respecte el total de compartiments endocítics; i a la Figura 45C s'exposa el nombre absolut de compartiments en els 20 perfils cel·lulars de cada tipus cel·lular.



Els resultats del recompte indiquen que:

1. El nombre absolut de compartiments endocítics totals en la línia B limfoblastoid (324) era la meitat dels quantificats en la línia neuroendocrina (649), d'acord amb la mida menor del citoplasma d'aquest tipus cel·lular.
2. El 50% dels compartiments quantificats en ambdues cèl·lules eren MIICs: Mvbs o Mlbs.
3. La densitat de Mvbs era significativament superior en la línia neuroendocrina que en la cèl·lula B ($d_{Mvbs}=11$, $d_{Mvbs}=4$, respectivament, $p=0.0013$, test T de student).
4. Les cèl·lules neuroendocrines presentaven una densitat de lisosomes significativament major que les cèl·lules B ($d_L=6$, $d_L=2$, respectivament, $p=3 \times 10^{-6}$, test T de student).
5. La major densitat d'EE i Mlbs de la línia neuroendocrina respecte la línia B limfoblastoid, no era significativa i per tant, només atribuïble al major nombre de compartiments comptats en la via endocítica de les cèl·lules neuroendocrines

Per tant, els dos tipus cel·lulars presentaven compartiments endocítics morfològicament homòlegs, el 50% dels quals eren MIICs, és a dir que la biosíntesi i la maduració de les MHC II es podia donar en ambients paral·lels en els dos tipus cel·lulars.

3. Comparació de la distribució de DR4 en la línia B limfoblastoid i en la línia DR4liDM

La LCL presentava un patró de marcatge per DR4 similar al de la línia transfectada, amb una acumulació molt evident en la membrana cel·lular (pm) (Figura 46). També es detectà DR4 en tots els compartiments de la via endocítica, en el reticle endoplasmàtic, en l'aparell de Golgi (AG) i a les vesícules del Transgolgi (TGN).

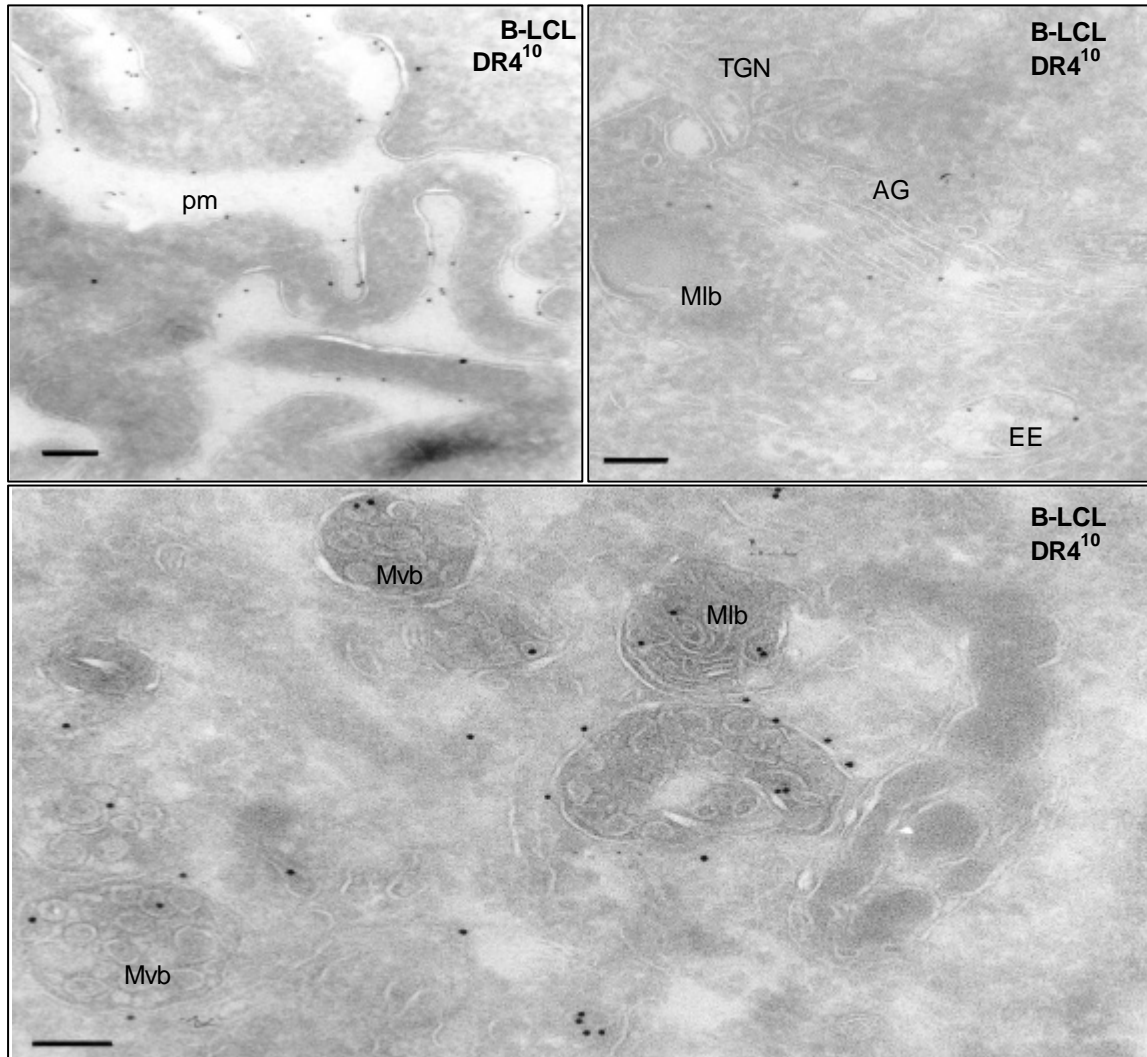


Figura 46 Localització subcel·lular de DR4 en una línia B-LCL per immunodetecció indirecte en seccions al microscopi electrònic. El marcatge de DR4 es va fer amb l'Ac policlonal anti-DR α acoplat a prot A-Au de 10 nm. La barra indica 100 nm.

L'elevada concentració de marcatge per DR4 a la superfície de la cèl·lula B impossibilitava un recompte acurat però indicava que en la cèl·lula B una major proporció del total de dímers expressats es trobava a la superfície cel·lular.

El marcatge citoplasmàtic per DR α en la línia LCL es quantificà seguint el mateix protocol que en les cèl·lules DR4liDM. A la figura 47 es mostren els histogrammes corresponents a l'anàlisi de densitat de DR4 en cada compartiment, i el percentatge de DR4 acumulat en cada compartiment.