



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

**“ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL SENSOR DE LA RESPUESTA A PROTEÍNAS
MAL PLEGADAS IRE1 α EN EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS A
PARTIR DE SUS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Antonia Geisse Anguita

Directora del Seminario de Título:

Dra. Fabiola Beatriz Osorio Olivares

Directora Patrocinante:

Dra. María Rosa Bono

Enero 2019

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el

Seminario de Título, presentado por la Srta. **Antonia Geisse Anguita**

**“EL ESTUDIO DE LA ACTIVACIÓN DEL SENSOR DE LA RESPUESTA A
PROTEÍNAS MAL PLEGADAS IRE1 α EN EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS
DENDRÍTICAS A PARTIR DE SUS PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Fabiola Osorio Olivares

Directora Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono

Prof. Patrocinante del Seminario

Comisión Revisora y Evaluadora:

Presidente Comisión

Evaluador

Santiago de Chile,

BIOGRAFÍA



Me llamo Antonia Geisse Anguita, nací el 8 de julio de 1994 en Santiago de Chile.

En 1999 entré a pre-kinder en el Saint George's College en donde completé mi enseñanza básica y media.

El 2013 entré a Ingeniería en Biotecnología molecular en la Universidad de Chile egresando y obteniendo el grado de licenciada en Ingeniería en Biotecnología molecular el año 2017.

El 2017 entré al laboratorio de Inmunología y Estrés Celular, en donde realicé mi Unidad de Investigación y Seminario de Título bajo la guía de la Dra. Fabiola Osorio.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por el apoyo que siempre me han dado, y en particular a mi mamá quien es un pilar fundamental en mi vida.

A Luca por estar apoyándome en cada momento.

A mis amigas por distraerme y levantarme cuando las cosas se han puesto difíciles.

Al laboratorio de Inmunología y Estrés celular con todos sus integrantes y en especial a Dominique por toda la ayuda brindada y a la Dra. Fabiola Osorio por guiarme.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Células dendríticas	3
Ontogenia de las células dendríticas	4
Respuesta a proteínas mal plegadas	8
Respuesta a proteínas mal plegadas en la hematopoyesis de las células dendríticas... 10	
Hipótesis	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1. Reactivos y ratones	13
1.1 Medios de cultivo, buffers y soluciones	13
1.2 Ratones	13
3. Obtención de células	14

3.1 Obtención de precursores a partir de médula ósea	14
3.2 Obtención de células a partir de bazo	14
4. Citometría de Flujo multiparamétrica	15
5. Biología molecular	16
5.1 Extracción RNA	16
5.2 Obtención cDNA	16
5.3 PCR convencional	16
5.4 PCR en tiempo real.....	17
6. Softwares y análisis estadístico	17
RESULTADOS	18
Identificación de precursores de células dendríticas a partir de médula ósea.....	18
El precursor común de macrófagos y células dendríticas presenta mayor activación del eje IRE1 \square /XBP1.....	20
El precursor MDP es el que tiene mayor nivel de expresión de BiP	28
La UPR se encuentra activa no solo en los precursores de las células dendríticas.....	30
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Sondas de viabilidad utilizadas para citometría de flujo	15
Tabla II. Anticuerpos utilizados para determinación por citometría de flujo de moléculas de superficie celular.	16
Tabla III. Lista de partidores utilizados para PCR en tiempo real.....	17
Tabla IV. Precursores obtenidos mediante <i>cell sorting</i>	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de las células dendríticas a partir de una célula troncal hematopoyética	6
Figura 2. Identificación de los precursores de células dendríticas obtenidos a partir de médula ósea.	19
Figura 3. El precursor MDP presenta mayor activación del eje IRE1a/XBP1	21
Figura 4. Pre y post sort de los precursores hematopoyéticos de células dendríticas.....	24
Figura 5. Precursores tempranos presentan mayores niveles de <i>Xbp1 spliced</i>	27
Figura 6. El precursor MDP es el que tiene mayor nivel de expresión de la chaperona BiP	29
Figura 7. Identificación de precursores hematopoyéticos con el eje IRE1a/XBP1 activo.	31
Figura 8. Modelo propuesto de la activación diferencial de eje IRE1a/XBP1 en precursores hematopoyéticos.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC: Célula presentadora de antígenos.
- CDP: Precursor común de células dendríticas
- cDC: Célula dendrítica convencional
- cMoP: Precursor común de monocitos
- CLP: Precursor común de células linfoides
- CMP: Precursor común de células mieloides
- DC: Célula dendrítica
- LT: Linfocitos T
- MDP: Precursor de macrófagos y células dendríticas
- MFI: Intensidad Media de Fluorescencia
- MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I
- MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II
- mRNA: RNA mensajero
- pDC: Célula dendrítica plasmocitoide
- PBS: Tampón Fosfato Salino
- SEM: Error Estándar de la Media
- SFB: Suero Fetal Bovino
- UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas
- WT: Wild Type

RESUMEN

Las células dendríticas (DC) son las responsables de iniciar la respuesta inmune adaptativa. Las DC se diferencian a partir de un precursor residente de la médula ósea llamado “progenitor común de macrófagos y células dendríticas” (MDP) el cual puede diferenciarse en un precursor común de monocitos (cMoP), o en un precursor que da origen a las DCs (CDP). Para comprometerse al linaje de DCs, las CDP se diferencian en pre-DCs, las cuales dejan la médula ósea y al llegar al tejido se generan las cDC1 y cDC2. Los mecanismos celulares que regulan la diferenciación de las DCs no han sido claramente elucidados. En este contexto, la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), que es el mecanismo celular responsable de mantener la homeostasis del retículo endoplásmico (RE) ha emergido como un interesante candidato en la regulación de la diferenciación de DCs. La UPR está coordinada por tres sensores residentes del RE. Interesantemente, ratones deficientes de XBP1, el factor de transcripción maestro río abajo del sensor IRE1 α , muestran una disminución importante de cDC y pDC *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere que el sensor IRE1 α es relevante para el desarrollo de las DCs. Sin embargo, se desconoce con precisión en que estadio del desarrollo de las DCs este eje estaría operativo. En este trabajo, identificamos los precursores de las DCs y estudiamos la activación del eje IRE1 α /XBP1 de la UPR. Nuestros datos indican que las MDP presentan mayor activación del eje IRE1 α /XBP1 comparado con los otros estadios de desarrollo de las DC, lo que sugiere que en esta etapa del desarrollo podrían estar ocurriendo cambios metabólicos mayores comparados con otros estadios, lo que implicaría un aumento en la síntesis proteica, implicando una UPR más activa.

ABSTRACT

The dendritic cells (DCs) are responsible for the initiation of the adaptive immune response. DCs arise from a common progenitor present in the bone marrow called ‘macrophage-dendritic cell progenitor’ (MDP), which differentiates into a cMoP (common monocyte precursor) or into CDP, the ‘common dendritic cell precursor’, that is committed towards the dendritic lineage. After this differentiation process, the CDP will give rise to pre-DC, which exits the bone marrow and constitute the immediate precursors of terminally developed cDC1 and cDC2 in tissues. The cellular mechanism that controls the DC differentiation are not fully understood. In this context, the unfolded protein response (UPR) is a mechanism responsible to maintain the endoplasmic reticulum (RE) homeostasis that has risen as a candidate for the regulation of the DC development. This adaptive response is coordinated by three ER membrane–resident sensors. Remarkably, it has been reported that XBP1 deficient mice, a key transcription factor downstream IRE1 α , display a marked diminution of cDCs and pDCs *in vitro* and *in vivo*. This implies that IRE1 α plays a key role in DC homeostasis and development. Nevertheless, the contribution of the UPR to DC development is still poorly understood. In this work, we identified DC precursors using multiparametric flow cytometry and studied the UPR activation. Our data indicates that the cells at the stage of the MDP have the most prominent XBP1s signal compared to cells in different differentiation stages. These data suggest that in this stage of the DC development may be occurring major metabolic changes comparing to the other stages which could mean an increase of protein synthesis, involving an active UPR.

INTRODUCCIÓN

Células dendríticas

Las células dendríticas (DCs) son un grupo altamente heterogéneo de leucocitos pertenecientes al linaje mieloide (Durai y Murphy, 2016). Ante la presencia de estímulos inflamatorios tales como patógenos, toxinas, alérgenos o compuestos relacionados con daño celular, tienen la capacidad de reconocer al agente agresor, fagocitarlo, procesarlo y presentar sus antígenos en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad (MHC), para luego migrar hacia los nódulos linfáticos más cercanos (Merad y Manz, 2009). En este sitio anatómico, las DCs presentan los péptidos derivados del agente agresor a linfocitos T vírgenes, promoviendo su diferenciación y polarización hacia un perfil efector (Merad y Manz, 2009). Estas cualidades hacen que las DCs sean críticas para la regulación de la inmunidad adaptativa (Waskow y cols., 2008). Las DCs están constituidas por distintos linajes, clasificándose en DCs plasmocitoides (pDCs), y DCs convencionales (cDCs). Las pDCs representan un subtipo reducido de DCs que se acumulan principalmente en la médula ósea, torrente sanguíneo y tejidos linfoides, y entran a los nódulos linfáticos a través de la circulación sanguínea (Merad y cols., 2013). Las pDCs en estado estacionario expresan bajos niveles de moléculas MHC-II y de la integrina CD11c, por otro lado, son positivas para la proteína de superficie B220 (Reizis y cols., 2011). La función principal de las pDCs es la secreción de interferón del tipo I (IFN- α) ante el reconocimiento de virus y/o ácidos nucleicos derivados de virus (Reizis y cols., 2011).

Las cDCs, según análisis fenotípicos, funcionales y ontogénicos se pueden dividir en

cDC1s y cDC2s (Guilliams y cols., 2014). Las cDC1s se especializan en el proceso de presentación cruzada, que corresponde al mecanismo por el cual antígenos extracelulares son presentados en moléculas MHC-I para activar a linfocitos T CD8 vírgenes (Sichien y cols., 2016). Su generación y supervivencia dependen de la activación de los factores de transcripción Baf3 y de Irf8 (Hildner y cols., 2008; Ginhoux y cols., 2009). En tejidos linfoides estas células expresan las moléculas de superficie CD8 α , XCR1, CD24, mientras que en tejidos no linfoides se caracterizan por expresar la integrina CD103 además de XCR1 (Merad y cols., 2013).

Las cDC2s presentan antígenos a linfocitos T CD4 en un contexto MHC-II induciendo la generación de linfocitos T helper (TH) y T reguladores (Treg; Guilliams y cols., 2014; Schlitzer y cols., 2015a). Estas células dependen del factor de transcripción Irf4 para su diferenciación terminal, supervivencia (Persson y cols., 2013; Schlitzer y cols., 2013) y migración a los órganos linfoides drenantes (Bajana y cols., 2012; Bajaña y cols., 2016). En órganos linfoides, las cDC2s expresan las moléculas CD4 y CD172a, mientras que en órganos no linfoides poseen en su superficie la integrina CD11b además de CD172a (Merad y cols., 2013).

Ontogenia de las células dendríticas

Las DCs se diferencian en la médula ósea a partir de un precursor hematopoyético común. Esta diferenciación depende de la actividad de citoquinas, en particular de la citoquina FLT3L (*fms-like tyrosine kinase3 ligand*), la cual es una pequeña molécula endógena secretada por células endoteliales y por linfocitos T activados, que junto a su receptor (FLT3 o CD135) son claves para el desarrollo de las DCs (Helft y cols., 2010).

El receptor de esta citoquina se encuentra presente en la mayoría de los linajes hematopoyéticos y su expresión se va perdiendo en la medida que los progenitores se van diferenciando, a excepción del linaje de las DCs en donde la expresión de este se mantiene (Merad and Manz, 2009). Las células troncales hematopoyéticas (HSCs) están continuamente reponiendo las células sanguíneas a través de sucesivos pasos de diferenciación y división celular, lo que va generando progenitores comprometidos a linajes celulares específicos que dan origen a células de fenotipo maduro (Merad y Manz, 2009). Durante la diferenciación de las DCs (Fig. 1), los progenitores pueden ser claramente identificados en base a la expresión diferencial de distintos receptores de quimioquinas y citoquinas, además de distinguirse por su capacidad de diferenciarse a DCs *in vivo* (Liu y cols., 2009a; Schlitzer y cols., 2015b).

La hematopoyesis se inicia con las LT-HSCs (*Long-term Hematopoietic Stem Cells*), las cuales se caracterizan por estar constantemente autorenovándose. Estos precursores generan una población multipotente heterogénea, conocida como MPP (*Multipotent Progenitor*; Adolfsson y cols., 2005; Belz y Nutt, 2012; Guilliams y cols., 2018; Iwasaki y Akashi, 2007; Naik y cols., 2013; Schmid y cols., 2010). Para dar origen a las células de la respuesta inmune, las MPP se diferencian en CMP (*Common Myeloid Precursor*) o en CLP (*Common Lymphoid Precursor*). Por una parte, las CLP originan el linaje linfoide, como células T, B y NK. Las CMP por su parte, se diferencian en MEP (*Megakaryocyte and Erythrocyte Progenitor*) o en GMP (*Granulocyte and Macrophage Progenitor*). El GMP se diferencia a MDP (*Macrophage monocyte Dendritic cell Precursor*), correspondiente al primer precursor comprometido exclusivamente hacia monocitos y DCs. Las MDP se caracterizan por la expresión de los receptores de las

citoquinas FLT3-L, M-CSF (Receptor de M-CSF) y c-Kit (receptor de factor de crecimiento de célula madre; Fogg y cols., 2006).

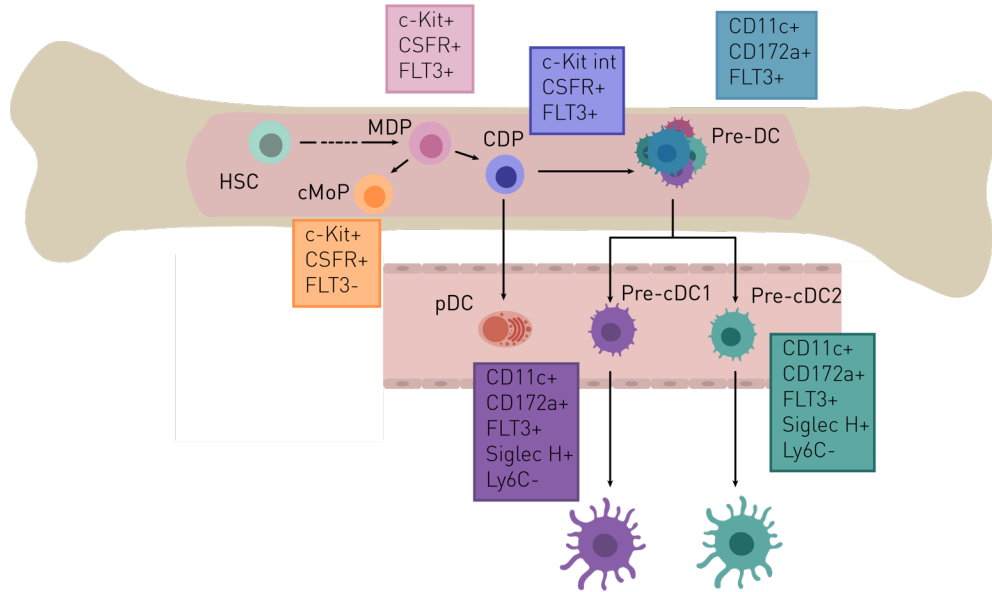


Figura 1. Desarrollo de las células dendríticas a partir de una célula troncal hematopoyética. Las DCs vienen de un precursor común (HSC) el cual tras pasar por varios estadios se diferencia en MDP, que es un precursor común de monocitos (cMoP) y DCs, después se diferencia en CDP, un precursor que está comprometido a la generación de DCs. Finalmente se generan las pre-DC, las cuales viajan a los tejidos para diferenciarse en pre-cDC1 o pre-cDC2.

El precursor MDP se diferencia en cMoP (*Common Monocyte Progenitor*) y en CDP (*Common Dendritic cell Progenitor*), que expresa FLT3 y niveles intermedios de c-Kit (Onai y cols., 2007; Schlitzer y cols., 2015b). El CDP da origen exclusivamente a DCs y son los precursores celulares inmediatos de las pDCs y de las cDCs (Merad y cols., 2013; Naik y cols., 2007), los cuales pueden ser diferenciados por la expresión del receptor M-CSFR (Onai y cols., 2007, 2013; Schlitzer y cols., 2015b).

Dentro del proceso de diferenciación terminal de las DCs, las CDP se diferencian en pre-DC, el último intermediario de las DCs y el precursor que migra desde la médula ósea hacia los tejidos en donde finalmente se diferenciarán a cDC. Las pre-DCs expresan CD11c, CD172a y carecen de moléculas de MHC-II en su superficie (Schlitzer y cols., 2015b). La diferenciación final de las pre-DCs hacia un perfil cDC1 o cDC2 se cree ocurre en el tejido mismo, en donde el término del proceso estaría influenciada por el microambiente local (Liu y cols., 2009; Klebanoff y cols., 2013). Las pre-DCs precursoras de cDC1s versus las pre-DCs precursoras de cDC2, pueden identificarse por la ausencia del marcador Siglec H en ambas poblaciones, y pueden distinguirse por la expresión diferencial de Ly6C (las pre-cDC1 son negativas y las pre-cDC2 positivas para este marcador). Aquellas pre-DCs aún no comprometidas con ninguno de los dos linajes son Siglec H⁺ (Schlitzer y cols., 2015b). Importantemente, con los avances en la citometría de flujo multiparamétrica hoy es posible identificar con alto grado de precisión todos estos linajes permitiendo estudios en profundidad de la diferenciación y función de las DCs, el cual es foco de este seminario de título.

Finalmente, el microambiente es clave para la diferenciación celular, y está influenciado por citoquinas presentes en los distintos tejidos lo que promueve la división y/o proliferación celular (Akashi y cols., 2000). Sin embargo, existen factores intrínsecos de la célula que regulan su desarrollo, por ejemplo, trabajos previos demostraron la importancia de la respuesta a proteínas mal plegadas en la diferenciación hacia cDC y pDC a partir de sus precursores hematopoyéticos (Iwakoshi y cols., 2007). La relevancia

de la respuesta a proteínas mal plegadas en la hematopoyesis inmune se explicará a continuación.

Respuesta a proteínas mal plegadas

El retículo endoplasmático (RE) es un organelo fundamental para el funcionamiento de las células. En este se sintetizan las proteínas destinadas al espacio extracelular y de membrana, las cuales representan aproximadamente un tercio de todo el proteoma celular (Janssens y cols., 2014). Dentro del RE se produce la maduración de estas proteínas, un proceso que implica diversos mecanismos tales como glicosilación, plegamiento, enlaces disulfuro, entre otros (Grootjans y cols., 2016). Debido a la importancia del RE para la homeostasis celular, es crucial que este organelo funcione de manera correcta. En relación a esto, existen enfermedades asociadas con el mal plegamiento de proteínas, en las cuales agregados de estas gatillan estrés y muerte celular, tales como las enfermedades neurodegenerativas, enfermedades inflamatorias crónicas, entre otras (Grootjans y cols., 2016). Por lo tanto, es de suma importancia que el plegamiento de proteínas esté bajo un control de calidad estricto, permitiendo así que las células lleven sus funciones secretoras de manera correcta. Existen contextos fisiológicos y patológicos en los que la capacidad de plegamiento de proteínas del RE se ve sobrepasada por la cantidad de proteínas que están siendo sintetizadas, lo que tiene como consecuencia un aumento en el número de proteínas mal formadas en el lumen del organelo, interfiriendo así con el control de calidad. Cuando esto ocurre, se activa una respuesta celular con el fin de restaurar la homeostasis proteica, llamada respuesta a proteínas mal plegadas o UPR por sus siglas en inglés (*Unfolded protein response*).

La UPR es una respuesta coordinada llevada a cabo por tres sensores de transmembrana ubicados en el RE que detectan el estrés: IRE1 α (*inositol-requiring enzyme 1 α*), PERK (*PRKR-like ER kinase*) y ATF6 (*activating transcription factor 6*). Bajo condiciones fisiológicas normales, los dominios luminarios de estos sensores están inactivos debido a su asociación con la chaperona BiP (*binding immunoglobulin protein*). Mientras que en condiciones fisiológicas y/o patológicas que implican un aumento de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, la chaperona BiP se disocia de los sensores al poseer mayor afinidad estas proteínas. Una vez ocurrido este proceso, los sensores se activan permitiendo la señalización río abajo (Pincus y cols., 2010) promoviendo la activación de factores de transcripción únicos que activan genes diferencialmente para inducir adaptación al estrés de RE. IRE1 α es el sensor más conservado y estudiado en la respuesta inmune, es una kinasa y endorribonucleasa que bajo condiciones de estrés de RE dimeriza y se transfosforila llevando a cabo la activación de su dominio endorribonucleasa. En este estado, IRE1 α genera un *splicing* alternativo del mRNA de XBP1 (*X box-binding protein 1*) eliminando un intrón de 26 nucleótidos, lo que produce un corrimiento en el marco de lectura generando un potente factor de transcripción llamado XBP1s (*XBP1 spliced*), el cual transloca al núcleo e induce la transcripción de genes blanco. XBP1s tiene un rol fundamental en la inducción de chaperonas y moléculas encargadas de la biosíntesis proteica (Sriburi y cols., 2004) lo que es necesario para la expansión del RE e inducción de chaperonas y componentes del proceso ERAD (*Endoplasmic reticulum-associated protein degradation*), vía en la cual proteínas mal plegadas son transportadas desde el RE hacia el citosol para ser

degradadas por el proteosoma. En caso de que el estrés no pueda ser resuelto, las señales de la UPR pasan a ser pre-apoptóticas. En este contexto el sensor PERK juega un papel más fundamental, en el que el factor de transcripción clave de esta vía, ATF4 (*Activating transcription factor 4*) induce la transcripción de la proteína CHOP (*C/EBP homologous protein*), la cual está involucrada en el proceso de apoptosis mediada por estrés de RE (Marciniak y cols., 2004). ATF6 es el sensor menos estudiado en la respuesta inmune y su papel aun no ha sido elucidado.

En células inmunes, el eje IRE1 α /XBP1 es necesario para la producción de citoquinas proinflamatorias, y la eliminación de patógenos, como en el caso de los macrófagos cuando hay reconocimiento de patógenos vía TLRs (*Toll-like receptors*; Martinon y cols., 2010). También se ha descrito que XBP1 tiene un rol esencial en la diferenciación terminal de linfocitos B hacia células plasmáticas ya que este factor controla la expansión del RE lo que permite el aumento masivo de síntesis de inmunoglobulinas (Reimold y cols., 2001). En el caso de las DCs, específicamente en las cDC1s y pDCs, se ha visto que estas poseen la vía de IRE1 α activa de manera constitutiva (Iwakoshi y cols., 2007; Osorio y cols., 2014). Pese a que existen varios estudios sobre el rol de IRE1 α en las células inmunes, poco se sabe de las funciones que cumple mientras estas células están en proceso de diferenciación.

Respuesta a proteínas mal plegadas en la hematopoyesis de las células dendríticas

La hematopoyesis es un proceso en el cual las células sanguíneas son producidas a partir de una célula indiferenciada (HSC). Esta célula reside en la médula ósea en un estado de dormancia evitando un posible estrés metabólico, siendo esto clave para mantener la

integridad del sistema hematopoyético. Signer y colaboradores, quienes estudian la proteostasis, demostraron que células hematopoyéticas poseen niveles de síntesis proteica más baja comparada con células más diferenciadas, característica que podría ser esencial para mantener la homeostasis de las HSCs (Signer y cols., 2014).

Las células troncales hematopoyéticas son células de larga vida debido a su capacidad de autorenovación. Consecuencia de su larga vida, es la exposición a estímulos de estrés, en lo que se incluyen especies reactivas de oxígeno (ROS), fluctuación de nutrientes y daños en el ADN. Los daños que ocurran en las HSCs deben ser controlado para prevenir pérdida de función o transmisión de daños a la progenie. Debido a que estos estímulos pueden derivar en acumulación de proteínas mal plegadas, estas células deben tener activa la UPR. Estudios de RNAseq de célula única de precursores hematopoyéticos demostraron que las vías de la UPR no están igualmente expresadas en cada uno de ellos. Los autores demostraron que células menos diferenciadas tienen más activa la vía de PERK, por lo que favorecen más la apoptosis antes que resolver el estrés, esto con el fin de que no se transmitan daños. Por otro lado, progenitores más comprometidos con un linaje tienen más activa la vía de IRE1 α , además de presentar mayor sobrevivencia (Van Galen y cols., 2014). Siguiendo con la misma línea, ratones deficientes de XBP1 tienen una disminución importante de pDCs y cDCs, además de una reducción en sobrevivencia (Iwakoshi y cols., 2007).

En base a la importancia que tiene la UPR y en particular, el eje IRE1 α , en la función y diferenciación de DCs en este trabajo se pretende estudiar el grado de activación del eje IRE1 α /XBP1 en los distintos precursores hematopoyéticos de las DCs.

Para este estudio utilizaremos la técnica de citometría de flujo multiparamétrica para identificar los precursores de las DCs y el ratón transgénico ERAI, el cual permite monitorear la activación del dominio RNAsa de IRE1 α .

Hipótesis

El sensor de respuesta a proteínas mal plegadas, IRE1 α se activa diferencialmente en precursores hematopoyéticos de las células dendríticas.

Objetivo general

Determinar el grado de activación de la vía IRE1 α en los distintos precursores de las células dendríticas.

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad basal de la vía IRE1 α en los distintos precursores de las células dendríticas.
2. Aislar los precursores hematopoyéticos de las células dendríticas y cuantificar los niveles de BiP como marcador canónico de estrés de retículo en cada uno de ellos.
3. Determinar la razón entre *Xbp1u* y *Xbp1s* en cada uno de los precursores de las células dendríticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y ratones

1.1 Medios de cultivo, buffers y soluciones

Medio RPMI 1640 GlutaMAX™: Gibco, ThermoFisher Scientific

Buffer de lisis RBC: Biolegend

PBS 1X pH 7.4: Gibco, ThermoFisher Scientific

FACS/MACS Buffer: PBS 1X pH 7.4 suplementado con 1% SFB (Hyclone, Thermo Scientific) y 2 mM de EDTA (Ambion, Thermo Scientific)

1.2 Ratones

Ratones *C57BL/6 wild type* de entre 5 a 8 semanas de edad fueron obtenidos del bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Ratones ERAI (Iwawaki y cols., 2004) de entre 5 a 8 semanas de edad fueron mantenidos en la unidad de mantención experimental del Programa Disciplinario de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El manejo con animales presentado en este seminario de título se realizó de acuerdo con los protocolos de bioética correspondientes a la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

3. Obtención de células

3.1 Obtención de precursores a partir de médula ósea

Se aislaron los fémures y tibias de ratones C57BL/6 los cuales fueron lavados y perfundidos con RPMI + 10% suero utilizando una jeringa de insulina de 1 mL (BD). La suspensión celular se filtró a través de un *cell strainer* de 70 μ M (Falcon®, BD) y se centrifugó en un tubo de 15 o de 50 mL (Falcon®, BD) a 400 x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de buffer de lisis RBC (la cantidad de mL utilizados corresponde a la cantidad de ratones) y se incubó durante 1 minuto, agitando. Luego, se diluyó 1:5 con RPMI + 10% suero y se centrifugó utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 5 mL de medio RPMI + 10%. Posteriormente, las células fueron contadas mediante tinción de viabilidad con azul de tripán en una cámara de Neubauer.

3.2 Obtención de células a partir de bazo

Se aisló el bazo del ratón, se dejó en un tubo de 1,5 mL con 500 uL de PBS+10% suero, y con una tijera se cortó en pequeños pedazos. Tras esto, se llevó a un tubo de 15 mL (Falcon®, BD) y se agregó 4 mL de PBS+10%, junto con 500 uL de colagenasa D (10 mg/mL) y 25 uL de DNasa I (10 mg/mL). Se dejó en un baño termorregulado a 37°C por 45 minutos. La suspensión se filtró a través de un *cell strainer* de 70 μ M (Falcon®, BD) y se centrifugó a 600 x g por 5 minutos a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 5 mL de buffer de lisis RBC por 5 minutos

agitando. Luego, se diluyó 1:5 con PBS + 10% suero y se centrifugó utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 5 mL de medio RPMI + 10%. Posteriormente, las células fueron contadas mediante tinción de viabilidad con azul de tripán en una cámara de Neubauer.

4. Citometría de Flujo multiparamétrica

La suspensión celular fue centrifugada a 400 x g por 7 minutos y resuspendida en FACS buffer con la sonda de viabilidad correspondiente (Tabla I). Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras esto, se lavó con FACS buffer y se centrifugó. El pellet se resuspendió en FACS con el mix de anticuerpos correspondientes (Tabla II) y se incubó durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación se lavó y se resuspendió en FACS buffer para el posterior análisis. En el caso de utilizar anticuerpos conjugados a biotina, se realizó una incubación con estreptavidina, posterior al lavado. Para análisis por citometría de flujo las incubaciones se hicieron en 100 uL de FACS buffer, mientras que para el *cell sorting* se hicieron en 1 mL.

Las células obtenidas por *cell sorting* se recolectaron en tubos con 1 mL de suero.

Tabla I. Sondas de viabilidad utilizadas para citometría de flujo

Sonda	Fluoróforo	Dilución	Marca
Zombie Green	FITC	1/1000	Biolegend
Live/Dead	Aqua	1/800	Invitrogen

Tabla II. Anticuerpos utilizados para determinación por citometría de flujo de moléculas de superficie celular.

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Dilución	Marca
Siglec H	PE	551	1/400	Biolegend
CD115	PE	AFS98	1/400	Biolegend
Sirpa	PerCP Cy5	P84	1/400	Biolegend
CD117	PerCP Cy5	2B8	1/400	Biolegend
CD11c	PE Cy7	N418	1/800	Biolegend
Estreptavidina	APC	-	1/100	Biolegend
Ly6C	Alexa Fluor 700	HK1.4	1/2000	Biolegend
Ly6G	Alexa Fluor 700	1A8	1/800	Biolegend
MHC II	APC H7	M5/114.15.2	1/1600	Biolegend
Ly6C	Brilliant Violet 421	HK1.4	1/800	Biolegend
CD16/32	-	93	1/800	Biolegend
CD135-Biotina	-	A2F10	1/100	Biolegend

5. Biología molecular

5.1 Extracción RNA

Para la extracción de RNA de las muestras se utilizó el kit Rneasy Plus Micro Kit (QIAGEN) siguiendo el protocolo adjunto.

Las muestras de RNA se guardaron a -80°C.

5.2 Obtención cDNA

Para la obtención de cDNA se utilizó el kit de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen®, Life Technologies), utilizando 3,3 µL de RNA total por muestra y hexámeros al azar como partidores a 250 ng/µL (Invitrogen®, Life Technologies). Para uso posterior, el cDNA se diluyó 3 veces en agua libre de nucleasas y se guardó a -20°C.

5.3 PCR convencional

Para la amplificación de *Xbp1s* y *Xbp1u* se utilizó la polimerasa GoTaq Flexi (Promega).

Los partidores utilizados fueron mXBP1-F (5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC-3') y

XBP1-R (5'-CCATGGGAAGATGTTCTGGG-3'). Los amplicones fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa 2,8% (Lafken).

5.4 PCR en tiempo real

Para reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el kit SYBR-Green I (Invitrogen®, Life Technologies), polimerasa GoTaq Flexi y los partidores que se indican en la tabla III.

Tabla III. Lista de partidores utilizados para PCR en tiempo real

Partidor	Secuencia (5'-3')
BiP-F	ATGAGGCTGTAGCCTATGGTG
BiP-R	GGGGACAAACATCAAGCAG
L27-F	GCCAAGCGATCCAAGATCAA
L27-R	GCTGGGTCCCTGAACACATC

Para la lectura de los PCR en tiempo real se utilizó el equipo LightCycler® 480 de Roche, y la abundancia de cada mRNA fue normalizada con L27.

6. Softwares y análisis estadístico

Para análisis de datos de citometría de flujo se utilizó el software FlowJo versión X 10.0.7r2. Para análisis de gráficos se utilizó el programa Prism7 (GraphPad) utilizando la técnica one way ANOVA para análisis estadísticos. En todos los casos se fijó el nivel de significancia del P valor menos a 0,05.

Los softwares ImageLab e ImageJ se utilizaron para el análisis de geles de agarosa.

RESULTADOS

Identificación de precursores de células dendríticas a partir de médula ósea

Las DCs se originan a partir del HSC que va diferenciándose progresivamente en distintos precursores cada vez más comprometidos para finalmente dar origen a las cDCs presentes en los tejidos.

Mediante citometría de flujo multiparamétrica fue posible identificar los precursores directos de las DCs (células positivas para el receptor de FLT3-L) por medio de las moléculas de superficie propias presentes en cada una de estas células (Fig. 2). En primer lugar, se identificaron los precursores de las DCs, los cuales son negativos para la integrina CD11c y para moléculas MHC-II. Dentro de esta población, la cual representa la mayoría de las células vivas dentro de la médula ósea, se encuentran aquellas que son positivas para el receptor de M-CSF, y dentro de estas se pueden diferenciar las MDP de las CDP por la expresión diferencial de c-Kit, siendo alta para las MDP, y media para las CDP, ambas positivas para FLT3. Por otro lado, también con el uso de estos marcadores fue posible identificar al precursor común de monocitos (cMoP), este precursor tiene en su superficie la molécula Ly6C, y se encuentra dentro de la población positiva para c-Kit y negativa para FLT3 (Fig. 2a).

El precursor CDP, el cual está comprometido exclusivamente al linaje de las DCs se diferencia en pre-cDC1 y pre-cDC2, los cuales originan las cDC1 y cDC2 respectivamente. Estos dos precursores se caracterizan por presentar en su superficie el receptor de FLT3-L y la molécula CD172a. Tanto las pre-cDC1 como pre-cDC2 son

negativas para Siglec H, y se pueden diferenciar por la expresión de Ly6C, siendo este marcador negativo para las pre-cDC1 y positivo para las pre-cDC2 (Fig. 2b).

Los datos obtenidos acá son consistentes con lo reportado en cuanto a la identificación de los precursores con el uso de estos marcadores de superficie (Schlitzer y cols., 2015b; Sharma y cols., 2018).

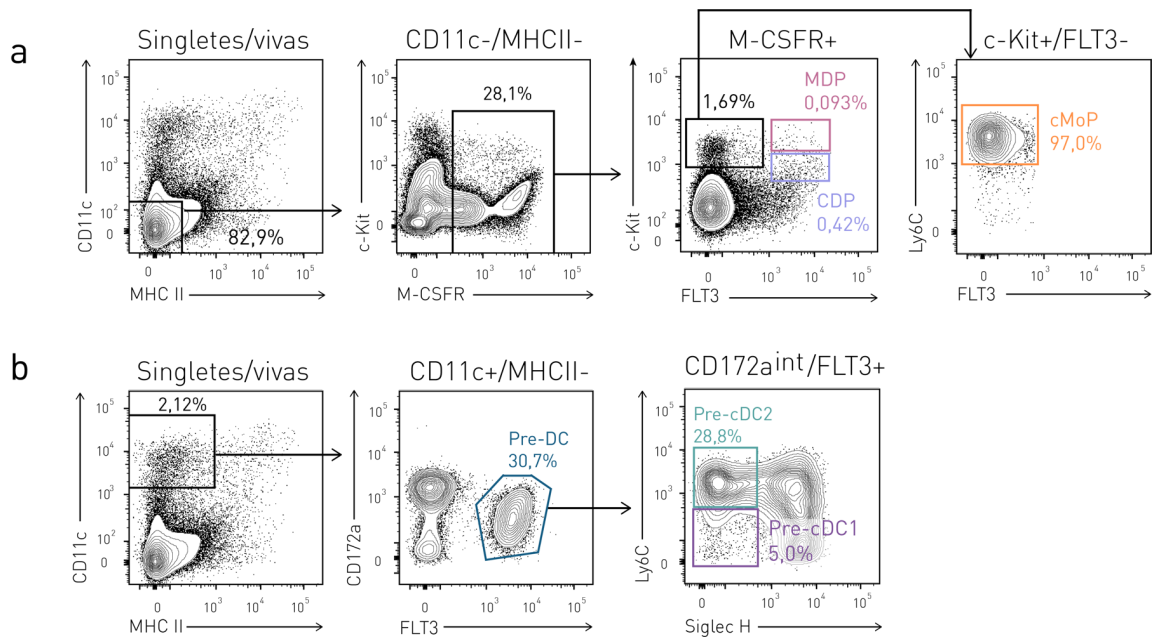


Figura 2. Identificación de los precursores de células dendríticas obtenidos a partir de médula ósea. Análisis de células de médula ósea de ratones C57BL/6 mediante citometría de flujo. En (a) se identificaron los precursores de las DCs, MDP y CDP y el precursor común de monocitos (cMoP), y en (b) Se identificaron los precursores pre-DC, de las cuales de observan las pre-cDC1 y pre-cDC2.

El precursor común de macrófagos y células dendríticas presenta mayor activación del eje IRE1 α /XBP1

En trabajos anteriores se ha visto un papel fundamental del eje IRE1 α /XBP1 en la biología y funcionalidad de las DCs, estos se han referido a la relevancia del factor de transcripción XBP1 en el desarrollo y sobrevivencia de las DCs a partir de sus precursores hematopoyéticos (Iwakoshi y cols., 2007), y también que las cDC1 tienen este eje activado de manera constitutiva, y que la pérdida de XBP1 se asocia con una pérdida en la funcionalidad de estas células (Osorio y cols., 2014).

Teniendo en cuenta la importancia de esta vía en las DCs y habiendo ya definido el protocolo de marcaje (Fig. 2), estudiamos la actividad constitutiva del eje IRE1 α /XBP1 en los precursores hematopoyéticos de estas células. Para esto se utilizó el ratón transgénico ERAI, con el cual se puede monitorear la activación del dominio RNAsa de IRE1 α , ya que posee un fragmento del gen de XBP1 unido con el mensajero de la proteína VenusFP, la que se traduce cuando ocurre el *splicing* alternativo (Iwawaki y cols., 2004) y se escinde el codón de término que se encuentra río arriba de VenusFP produciendo fluorescencia (Fig. 3a), la cual se puede medir mediante citometría de flujo. Por lo tanto, aquellas células que emitan fluorescencia son células que tienen la vía de IRE1 α activa.

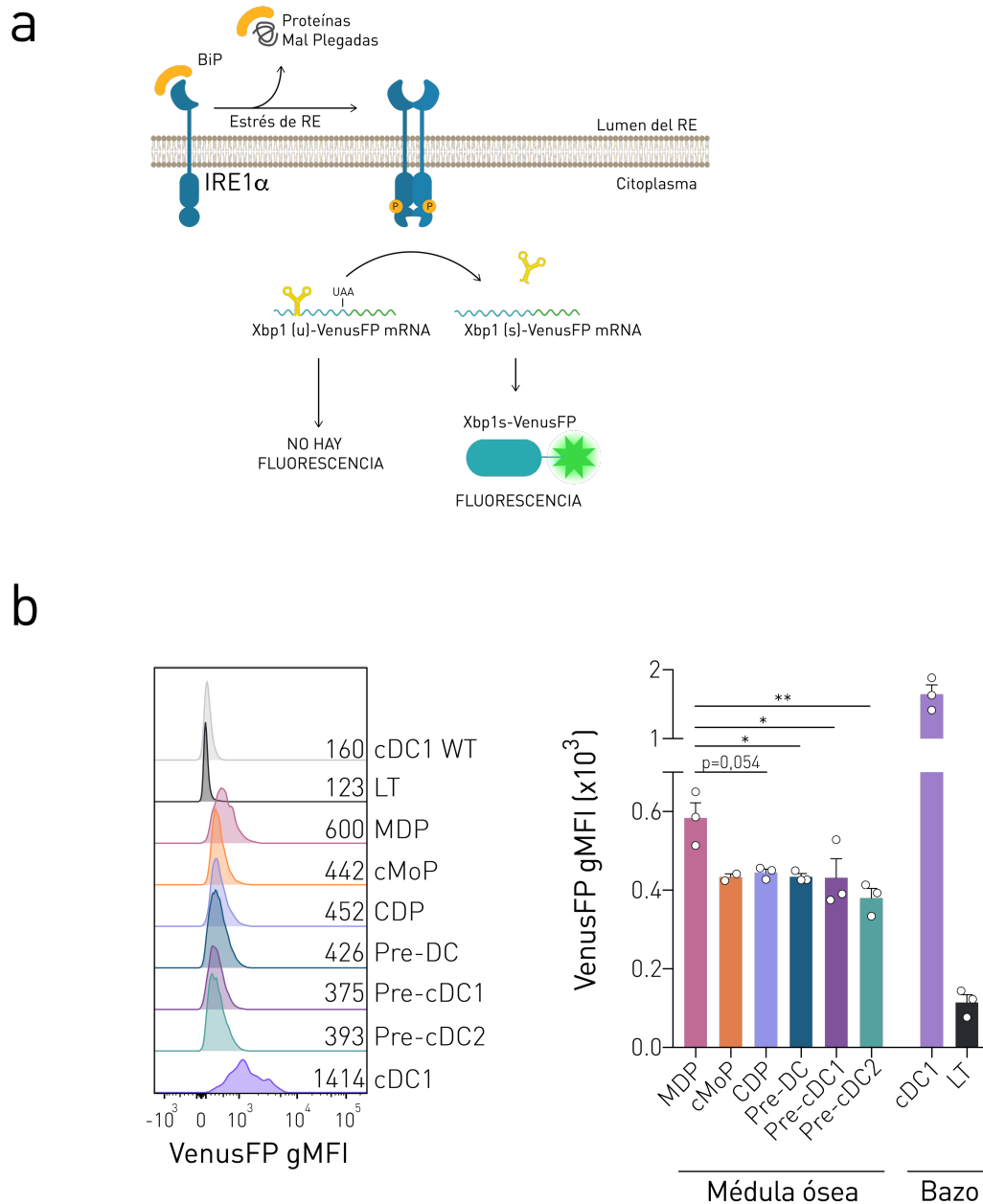


Figura 3. El precursor MDP presenta mayor activación del eje IRE1 α /XBP1. (a) Esquema del ratón ERAI, bajo condiciones normales el transcrito no sufre *splicing*. En condiciones de estrés de RE, se genera el *splicing* produciendo un cambio en el marco de lectura lo que permite que junto a XBP1s se traduzca VenusFP, generando fluorescencia. (b) Análisis de la expresión de VenusFP de precursores de las DCs provenientes de médula ósea de ratones ERAI mediante citometría de flujo. Se midió por citometría de flujo la expresión de VenusFP de cada precursor (5×10^6 de células cada uno) proveniente de médula ósea y linfocito T y cDC1 provenientes de bazo. El gráfico de barra muestra un resultado de 3 experimentos independientes e indica la media geométrica \pm S.E.M. de la fluorescencia de VenusFP.

Mediante la expresión de VenusFP se puede medir de manera indirecta la activación del dominio endoribonucleasa de IRE1 α de los distintos precursores. En la figura 3b a la izquierda se observa un histograma que muestra la media geométrica de fluorescencia de los precursores de las DCs, además de controles negativos (cDC1 de ratón WT y linfocito T) y uno positivo (cDC1 de ratón ERAI). A la derecha se muestra el análisis estadístico del experimento.

Es posible observar que todos los precursores tienen el eje IRE1 α /XBP1 activo, ya que todos presentan un nivel superior al de los linfocitos T de bazo, los cuales no tienen activo este eje. Por otro lado, todos los precursores presentan menos actividad del eje IRE1 α /XBP1s que las cDC1 provenientes de bazo, incluidos las pre-cDC1, lo que indicaría que la activación de este eje en este subtipo celular es un evento tardío en el desarrollo, y no ocurre a nivel de médula ósea, sino que a nivel de tejido.

Dentro de los precursores, aquel que presenta mayor actividad del eje IRE1 α /XBP1 es el precursor MDP, este es el precursor menos diferenciado de todos los estudiados, y da origen tanto monocitos como a DCs. Por otro lado, aquellos precursores que ya están comprometidos al linaje de las DC poseen menos activación de la vía.

Estudios previos han señalado la importancia de la UPR en células troncales hematopoyéticas debido a su alta tasa de renovación y contacto con estímulos dañinos. Células troncales menos diferenciadas tienen mayor actividad en la vía de PERK, mientras que aquellas que ya están más comprometidas como lo son las CMP y MDP

tienen la vía IRE1 α más activada, lo que refuerza la capacidad proliferativa de estas células (Tavernier y cols., 2009).

Posteriormente, aislamos de la médula ósea los precursores de las DCs con el objetivo de determinar la razón entre *XBPIu* y *XBPIs* en cada uno de los precursores de las DCs estudiados. Para aislar los distintos precursores se utilizó la técnica de *cell sorting*, identificando las células en base a sus marcadores de superficie ya mencionados.

En la figura 4 muestra la estrategia de *gating* utilizada y los gráficos de post-sort que hacen cuenta de la pureza de cada población aislada.

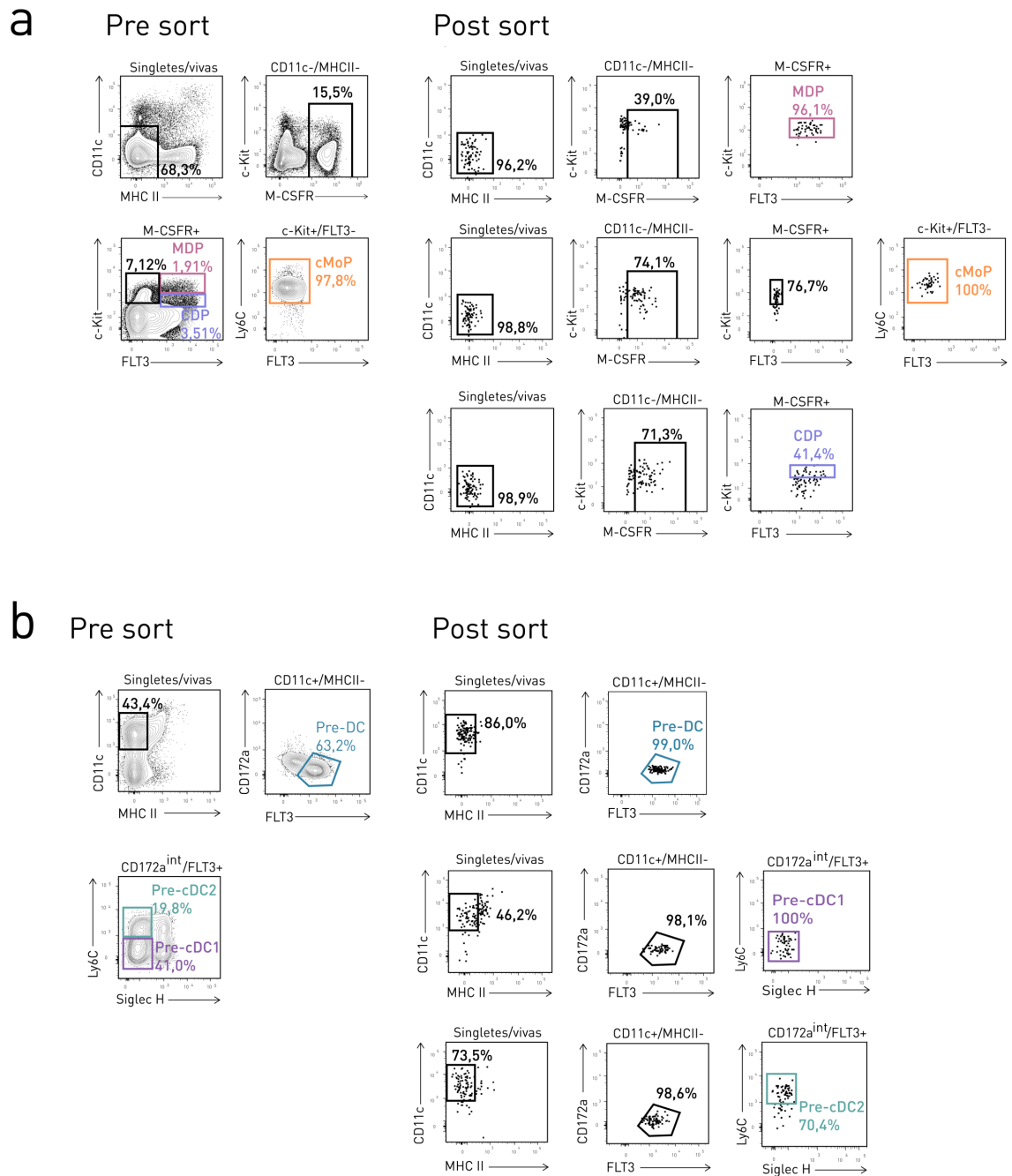


Figura 4. Pre y post sort de los precursores hematopoyéticos de células dendríticas. Se obtuvieron los precursores mediante *cell sorting* de ratones C57BL/6. En (a) se observa la estrategia de *gating* utilizada para la obtención de MDP, CDP y cMoP, y en (b) para pre-DC.

En la tabla IV se observa la cantidad aproximada de células obtenidas a través de *cell sorting* de cada precursor.

Tabla IV. Precursores obtenidos mediante *cell sorting*

Precursor	Número aproximado de células obtenidas
MDP	100.000
cMoP	400.000
CDP	150.000
Pre-DC	70.000
Pre-cDC1	50.000
Pre-cDC2	150.000

En cada uno de los precursores aislados se analizó la razón *Xbp1u* y *Xbp1s* por medio de un PCR convencional, amplificando ambas formas y corriéndolas en un gel de agarosa.

En la figura 5 se observan las bandas de *Xbp1u* y *Xbp1s* de DCs generadas con GM-CSF no tratadas (vía inactiva, control negativo experimental) y tratadas con tunicamicina (control positivo experimental), el cual es un inhibidor de la glicosilación de proteínas que causa una acumulación de proteínas mal plegadas y, por lo tanto, gatilla la UPR. Es posible identificar (Fig. 5a) que los precursores más tempranos de los estudiados, es decir, MDP, cMoP y CDP tienen más prominente la banda correspondiente a *Xbp1s*, mientras que los más tardíos, pre-DC, pre-cDC1 y pre-cDC2, es lo contrario, es decir, en estos precursores la banda de *Xbp1u* es más intensa.

Con el software ImageJ se determinó el porcentaje de *Xbp1u* y *Xbp1s* en cada precursor. Tal como se dijo anteriormente, los precursores más tempranos tienen más cantidad de la forma *spliced* que de la forma *unspliced*, teniendo arriba de un 70% de esta forma. Tal como se vio en la Figura 3, el MDP es el precursor que tiene la vía más activa, y se ve que en los precursores más comprometidos la cantidad de *Xbp1u* va disminuyendo hasta

llegar a aproximadamente un 35% en el precursor pre-DC, por lo tanto, siendo predominante la forma *unspliced*. Tanto las pre-cDC1, como las pre-cDC2 tienen mayor porcentaje de *Xbp1s* que las pre-DC, lo que indicaría que dentro de la población de las pre-DC aquellas subpoblaciones más diferenciadas, es decir, las pre-cDC1 y pre-cDC2 tienen una activación mayor del eje comparado con aquellas pre-DC que aún no se han comprometido al linaje de las cDC1 o cDC2.

En la Figura 5b se observa que todos los precursores tienen mayor cantidad de *Xbp1s* que las DCs tratadas con tunicamicina, indicando que los precursores de las DCs tienen este eje activo constitutivamente de manera importante.

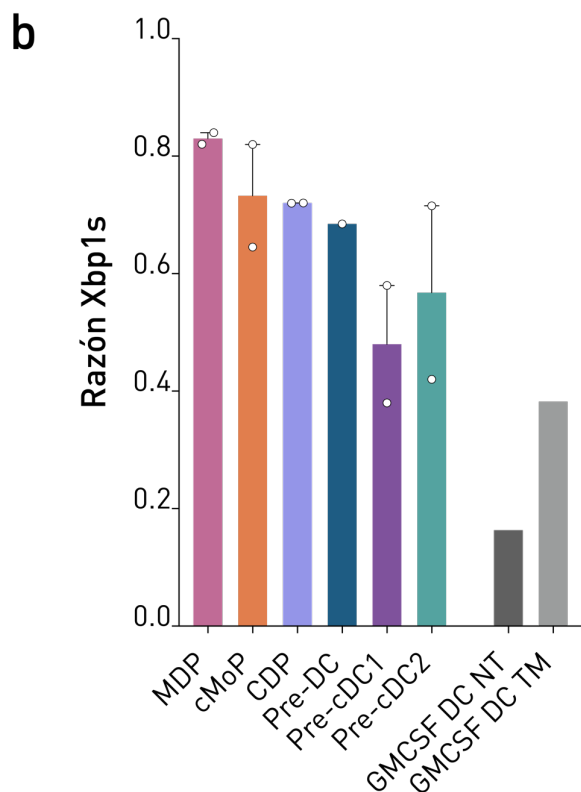
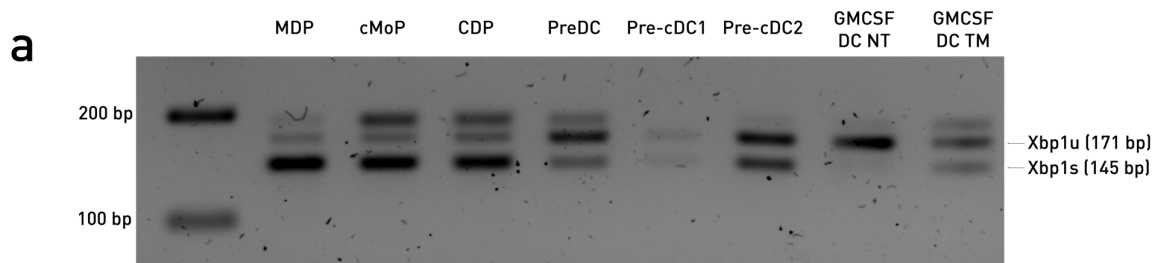


Figura 5. Precusores tempranos presentan mayores niveles de *Xbp1 spliced*. Análisis de la cantidad de *Xbp1u* y *Xbp1s* de los precusores de las DCs. (a) PCR convencional de *Xbp1s* y *Xbp1u*, los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2,8%. Se utilizó muestras de DCs generadas con GM-CSF no tratadas como control negativo y tratadas con tunicamicina como control positivo. (b) Gráfico de barra muestra un resultado de 2 experimentos independientes e indica la razón \pm S.E.M. de *Xbp1s*.

El precursor MDP es el que tiene mayor nivel de expresión de BiP

La chaperona BiP es una proteína residente del RE la cual es esencial para iniciar la UPR. En condiciones homeostáticas normales, esta chaperona está asociada a los dominios luminares de los sensores IRE1 α , PERK y ATF6 manteniéndolos inactivos. Pero, cuando hay un aumento de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, la chaperona BiP se disocia de los sensores, permitiendo la activación de estos y señalización río abajo (Pincus y cols., 2010). Una vez activadas las vías se generan los factores de transcripción asociados a cada una, y con esto la transcripción de genes que permitan lidiar con el estrés de RE o iniciar el proceso de apoptosis. Dentro de los blancos de ATF6 se encuentran chaperonas, incluyendo a BiP (Lewy y cols., 2017), lo que permite monitorear el estrés de RE analizando los niveles de esta proteína.

Debido a que la chaperona BiP es fundamental para iniciar la UPR, y que su transcripción es inducida bajo estas condiciones, esta chaperona es un marcador clásico del estrés de RE. Por lo tanto, para determinar si los precursores estudiados tienen activa la UPR canónica y no solo IRE1 α se determinaron los niveles de BiP en los precursores de las DCs y en el precursor cMoP.

Los niveles de BiP se evaluaron mediante PCR en tiempo real en los precursores hematopoyéticos de las DCs y en el precursor cMoP. En la figura 6 se observa que existe una tendencia en cuanto a cómo varía la cantidad de BiP. El precursor de macrófagos y células dendríticas (MDP) posee los niveles más altos de la chaperona, y tras comprometerse en linajes de monocitos y DCs diferenciándose en cMoP o CDP respectivamente, los niveles de BiP disminuyen. Por otro lado, en el estadio de pre-DC,

más específicamente en pre-cDC2 se observa que los niveles de la chaperona aumentan nuevamente.

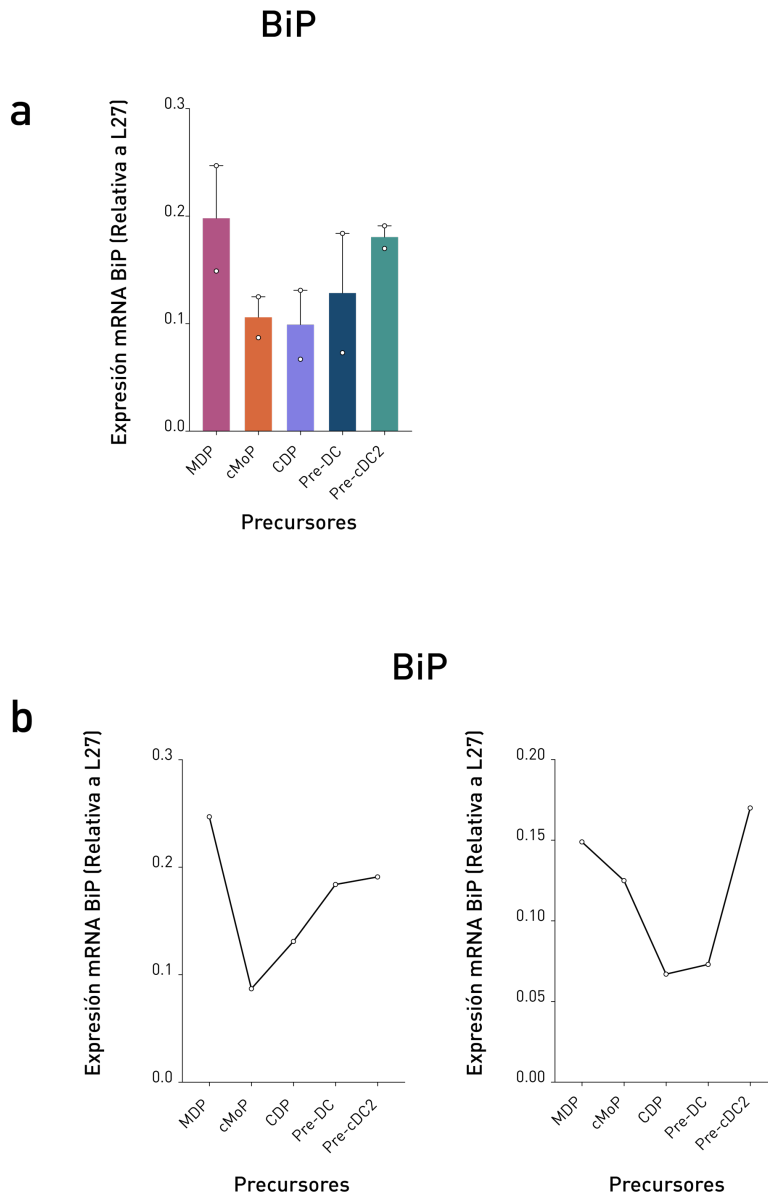


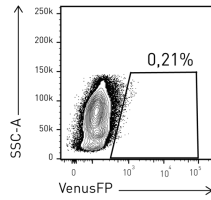
Figura 6. El precursor MDP es el que tiene mayor nivel de expresión de la chaperona BiP
 Análisis de expresión de BiP de los precursores de las DCs y cMoP mediante qPCR. (a) Gráfico con el promedio de las repeticiones. (b) Expresión de *Bip* relativa a L27 de ambas repeticiones mostradas por separado. El gráfico de barra muestra un resultado de 2 experimentos independientes e indica la expresión de *Bip* relativa a L27 \pm S.E.M.

La UPR se encuentra activa no solo en los precursores de las células dendríticas.

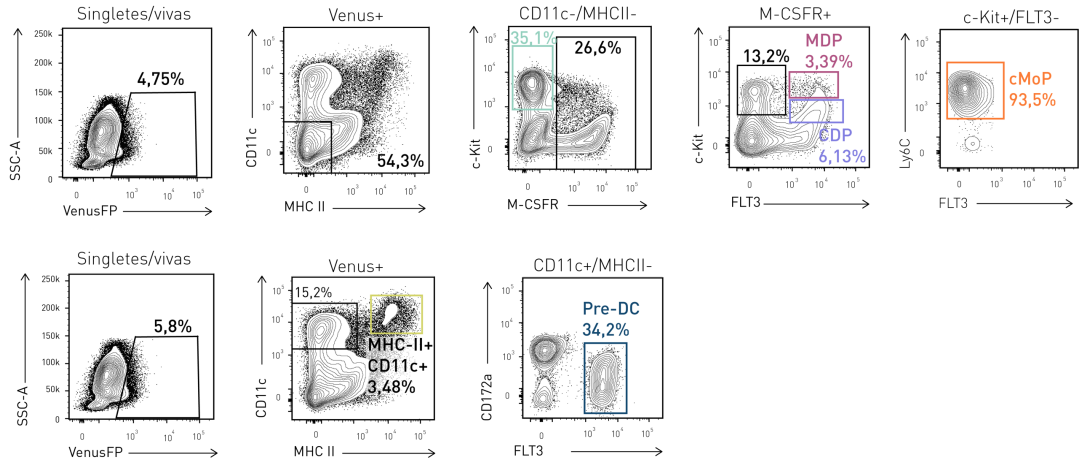
Como se vio en los experimentos anteriores, los precursores de las DCs y el precursor cMoP tienen el eje IRE1 α /XBP1 activo, por lo que se quiso estudiar si hay otras poblaciones dentro de la médula ósea también lo tenían. Utilizando el ratón reportero ERAI y citometría de flujo multiparamétrica determinamos que el 5% de la médula ósea es positiva para VenusFP, es decir, tienen el eje IRE1 α /XBP1 activo (Fig. 7a). Dentro de esta población, se determinaron los porcentajes de cada precursor de las DC y cMoP utilizando la misma estrategia de *gating* usada en los experimentos anteriores.

En la figura 7b se observan los porcentajes de las distintas poblaciones. Se encontró que aproximadamente un 9% de las células VenusFP⁺ son precursores de DC, es decir, MDP, CDP y pre-DC. Se observó también una población positiva para marcadores clásicos de las DCs (MHC-II⁺, CD11c⁺), y estas corresponden al 3,5% de las células. Por otro lado, dentro de las mismas células que tienen el eje activo, se vio que existe un 19% de células que son positivas para el receptor c-Kit, es cual es un receptor asociado a células troncales hematopoyéticas (Mayle y cols., 2012). Por último, existe una población de células desconocidas, que corresponde al 69,16% de las VenusFP⁺ totales. Esta población podrían ser células mieloides ya diferenciadas o en vías de, como precursores de eosinófilos, en los que se ha visto que XBP1 es necesario para su diferenciación (Bettigole y cols., 2015). Dentro de esta población podrían también encontrarse las pDC, en las que se ha visto que la activación de IRE1 α y por consiguiente, el *splicing* de XBP1 es constitutiva (Iwakoshi y cols., 2007).

a Ratón WT



Ratón ERAI



b

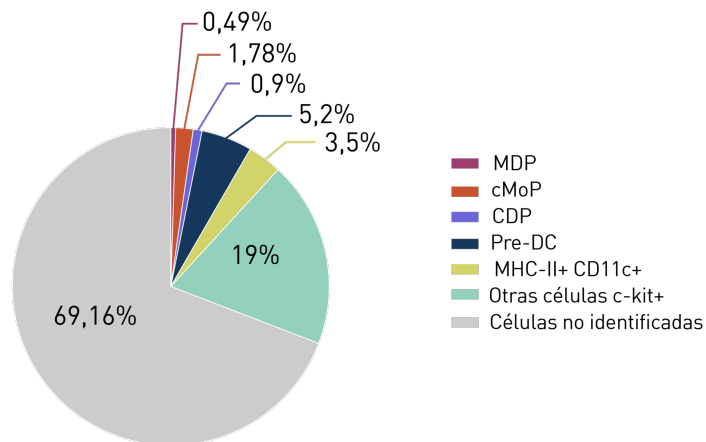


Figura 7. Identificación de precursores hematopoyéticos con el eje IRE1 α /XBP1 activo.
 (a) Estrategia de identificación de las células de la médula ósea con la vía IRE1 α activa. (b) Porcentaje de cada población celular dentro las positivas para VenusFP.

DISCUSIÓN

Las DCs cumplen un rol fundamental en el sistema inmune, ellas son las encargadas de censar antígenos propios y extraños para activar linfocitos T vírgenes, siendo el puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Debido a que estas células son claves para montar la respuesta inmune es importante estudiar y entender su biología, funcionalidad y aquellos procesos fisiológicos que permiten sean capaces de realizar los procesos necesarios para iniciar una respuesta inmune eficiente, como lo son el reconocimiento, captura y activación de los linfocitos T vírgenes.

A lo largo de los últimos años se ha descrito que la UPR, en particular el eje IRE1 α /XBP1 cumple un rol importante en la funcionalidad y desarrollo de las DCs. Por un lado, se demostró que las cDC1s y las pDCs tienen este eje activado de manera constitutiva, y que la pérdida de XBP1 se asocia a disminución en la funcionalidad en un contexto de inmunidad antitumoral en el caso de las cDC1 (Osorio y cols., 2014). Por otro lado, Iwakoshi y colaboradores estudiaron como la ausencia del factor de transcripción XBP1 en la diferenciación de las DC produce una disminución en la generación y supervivencia de DC maduras, tanto pDC como cDC (Iwakoshi y cols., 2007).

Teniendo en cuenta la importancia de este eje en el desarrollo y funcionalidad de las DCs, en este trabajo nos propusimos estudiar qué tan representada estaba esta vía en los precursores hematopoyéticos de las DCs.

Mediante citometría de flujo multiparamétrica desarrollamos una estrategia de *gating* que nos permitió identificar los precursores hematopoyéticos de las DCs: MDP, CDP,

pre-DC, pre-cDC1 y pre-cDC2, y el precursor común de monocitos (cMoP) (Fig. 2), basándonos en la presencia de receptores de citoquinas y quimioquinas comunes. Todos estos precursores tienen en común la presencia del receptor de la citoquina FLT3-L en su superficie, con excepción del cMoP (Geissmann y cols., 2010). Las poblaciones identificadas con el uso de los distintos marcadores de superficie (FLT3, c-Kit, M-CSFR, CD172a, Siglec H, Ly6C) son coincidentes con las reportadas previamente (Schlitzer y cols., 2015b; Sharma y cols., 2018).

Para determinar la expresión basal del eje IRE1 α /XBP1 de los precursores de las DCs se utilizó el ratón ERAI, el cual es un ratón transgénico que posee un fragmento del gen de XBP1 unido a la proteína Venus, la que se traduce cuando ocurre el *splicing* alternativo del mensajero (Iwawaki y cols., 2004) produciendo fluorescencia la cual se puede medir mediante citometría de flujo, por lo tanto, es posible determinar aquellas células que tienen activada esta vía cuantificando fluorescencia de Venus. Se observó que los precursores que tenían mayor actividad del eje IRE1 α /XBP1 son las MDP, las cuales son las células menos diferenciadas dentro de las estudiadas, pero que de todas maneras están comprometidas con el linaje de las DCs. Se ha visto que la respuesta a proteínas mal plegadas modula la diferenciación hematopoyética, por un lado, los precursores aún más tempranos que las MDP como las HSC tienen más activa la vía de PERK, mientras que en precursores ya más comprometidos en el desarrollo como CMP y MDP se ha observado un aumento de IRE1 α (Van Galen y cols., 2014). Esto, porque los precursores más tempranos son de vida más larga, esto implica más exposición a estímulos dañinos que puedan generar estrés oxidativo, acumulación de proteínas mal

plegadas, entre otros, y como consecuencia daños en el material genético, y para evitar la transmisión a la descendencia se activa la autofagia en estas células, proceso asociado a la activación de PERK. Por otro lado, los precursores más comprometidos con un linaje como lo son las MDP tienen más activa la vía de IRE1 α , lo que les permite lidiar con la demanda proteica que implica el aumento de divisiones celulares, esto refuerza la capacidad proliferativa de estas células (Tavernier y cols., 2009). En este seminario de título mostramos que las MDP son los precursores que poseen mayor actividad del eje IRE1 α /XBP1, y que al diferenciarse en CDP, pre-cDC1 y pre-cDC2 disminuye esta actividad. Como se mencionó anteriormente, las cDC1 poseen la vía IRE1 α activa constitutivamente, esto indica que la activación del eje en este subtipo celular es un proceso tardío en el desarrollo, que no ocurre en la médula, sino que cuando las pre-cDC1 llegan al tejido, ya que no se observan diferencias con los otros precursores presentes en la médula ósea. En concordancia con esto, un trabajo publicado por el grupo de Bart Lambrecht mostró que los precursores presentes en la médula ósea no exhiben grandes cantidades de *Xbp1s*, pero cuando llegan al bazo, todas las pre-cDC1 aumentan radicalmente sus niveles de *Xbp1s*, y además de que todos estos precursores dan origen a cDC1 diferenciadas, pese a que la activación de este eje no sea necesaria para la diferenciación (Tavernier y cols., 2017).

En este trabajo demostramos que los precursores MDP, cMoP y CDP poseen altos niveles de *Xbp1s* (todos sobre un 70%). De los precursores estudiados las MDP, son las que presentan el mayor porcentaje de *Xbp1s*, con un 85% de *Xbp1s* y un 15% de *Xbp1u*, esto podría indicar que están bajo estrés de RE. Por otro lado, en precursores más tardíos

(pre-DC), se observa mayor cantidad de *Xbp1u*, un 38% y 42% en las pre-cDC1 y pre-cDC2 respectivamente, esto sugiere una disminución de la actividad IRE1 α .

Yoshida y colaboradores demostraron que durante fases tempranas del estrés de RE la cantidad de *Xbp1s* aumenta de forma rápida, debido a la activación de IRE1 α , mientras que durante la fase de recuperación del estrés la forma *spliced* comienza a disminuir, esto debido a la inactivación de IRE1 α (Yoshida y cols., 2006). En este sentido, la diferencia en los niveles de *Xbp1s* y *Xbp1u* en los distintos precursores de las DCs podría deberse a que estos están en distintas fases del estrés de RE, estando los precursores menos diferenciados como MDP, CDP y cMoP en una fase inicial, mientras que las pre-DC se encuentran en la fase de recuperación del estrés.

Otra de las maneras de saber si una célula está bajo estrés de RE es monitorear la inducción de la expresión de la chaperona BiP. En este trabajo realizamos un PCR en tiempo real para determinar los niveles de esta chaperona en los precursores hematopoyéticos. Nuestros resultados muestran que las MDP son los que tienen los niveles más altos de BiP, y que luego de la diferenciación hacia cMoP y CDP estos niveles disminuyen, indicando un alivio del estrés de RE. Por otra parte, observamos que BiP aumenta en las pre-DC las cuales dejan la médula ósea e ingresan al torrente sanguíneo para llegar a los tejidos. Los cambios fisiológicos y la traducción de nuevas proteínas, estaría causando cambios en la homeostasis proteica y aumento de proteínas mal plegadas en el RE. Interesantemente la expresión de BiP se correlaciona con los niveles de *Xbp1s* observados en los precursores.

Finalmente, usando el ratón reportero ERAI pudimos determinar que el 5% de las células de la médula ósea tiene activo el eje IRE1 α /XBP1, y que, dentro de esta población, aproximadamente el 9% corresponden a progenitores de DCs. Existe también un porcentaje de células más diferenciadas porque tienen los marcadores CD11c+ y MHC-II+, los cuales son clásicos de las cDCs (Merad y Manz, 2009). También se encontró células que son positivas para c-Kit, por lo que están dentro de la población denominada “células troncales hematopoyéticas y progenitores” (Mayle y cols., 2012). Por último, se encontró una población correspondiente al 69% de total de las células de la médula que tienen activo el eje que no están identificadas. Esta población no posee el poseen el receptor c-Kit, por lo que no corresponde a células troncales hematopoyéticas (Adolfsson y cols., 2005b; Broudy, 1997; Grinenko y cols., 2018). Estas células podrían ser células ya diferenciadas del linaje mieloide, como pDC, que tienen el eje IRE1 α /XBP1 activo constitutivamente (Iwakoshi y cols., 2007), o precursores de granulocitos, específicamente eosinófilos que dependen de XBP1s para su diferenciación (Bettigole y cols., 2015). Por otro lado, estudios demuestran que en la médula ósea existen distintas poblaciones no hematopoyéticas, tales como células endoteliales, mesenquimales, entre otras (Boulais y cols., 2018), las cuales podrían corresponder a estas células no identificadas que tienen activa la vía IRE1 α .

En este trabajo de investigación demostramos que los precursores hematopoyéticos de la médula ósea presentan activación diferencial del eje IRE1 α /XBP1, nuestros resultados demuestran que precursores más tempranos del desarrollo tienen una mayor activación,

y que está va disminuyendo a medida que los precursores se van comprometiendo a un linaje en particular.

En trabajos futuros, se pretende estudiar la tasa de síntesis proteica basal que cada uno de los precursores de las DCs, y mediante herramientas genéticas, comprender el efecto que tiene el eje IRE1 α /XBP1 en el desarrollo de las DCs, interrogando cuál sería el papel que este eje juega en la diferenciación de las células mediante depleción génica.

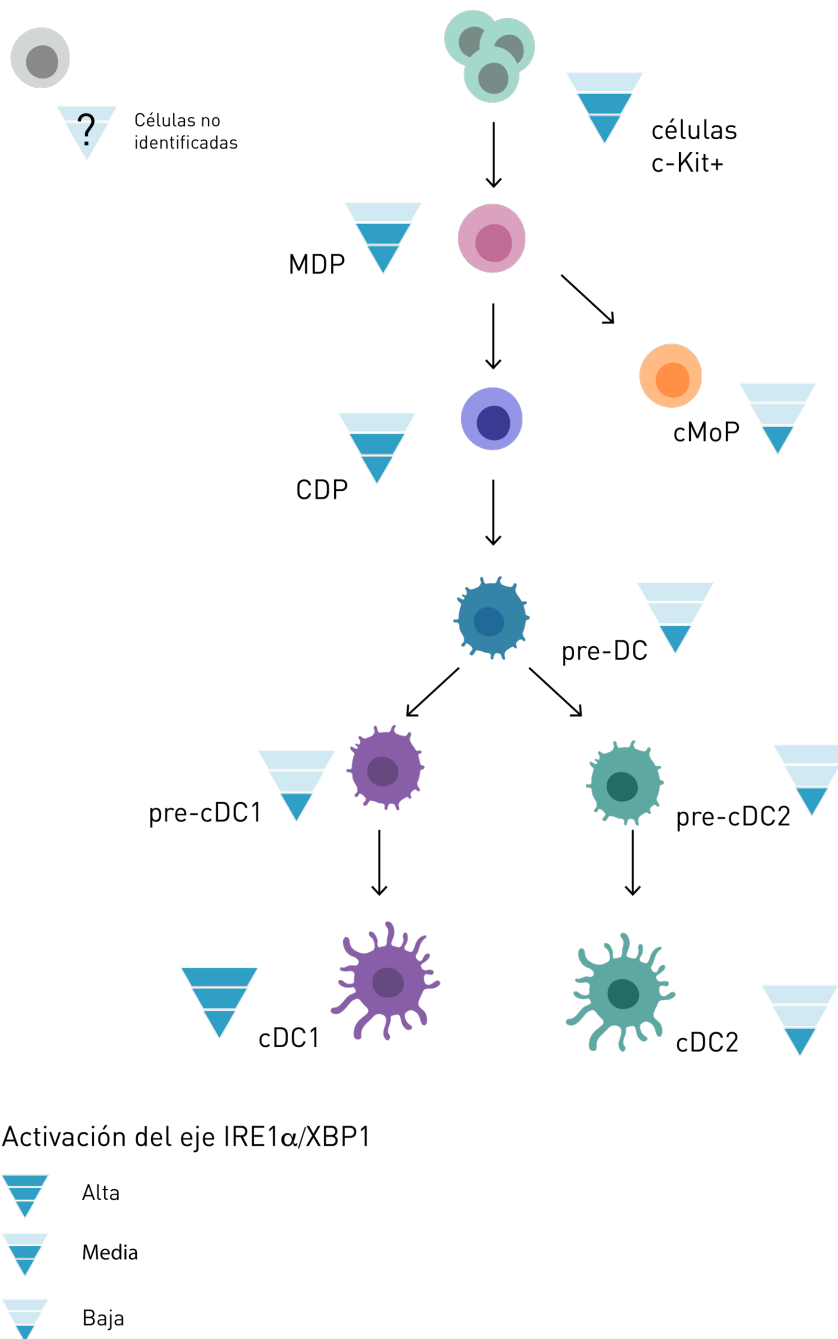


Figura 8. Modelo propuesto de la activación diferencial de eje IRE1 α /XBP1 en precusores hematopoyéticos. Precusores más tempranos del desarrollo (c-Kit⁺) presentan niveles intermedios de activación IRE1 α . A medida que los precusores se van comprometiendo a un linaje esta expresión disminuye (CDP en adelante), teniendo estos precusores una expresión baja de IRE1 α .

CONCLUSIONES

A partir de los ensayos realizados en este seminario de título observamos que los precursores hematopoyéticos de las DCs tienen una activación diferencial del eje IRE1 α /XBP1, siendo esta activación más prominente en las MDP. Por otro lado, la expresión de la chaperona BiP sigue una tendencia similar lo que indica que los precursores de las DCs están bajo estrés de RE, estrés que va disminuyendo a medida que las células se van diferenciando.

Estos resultados sugieren que la UPR y en específico, el eje IRE1 α /XBP1 es importante para el desarrollo de las células hematopoyéticas maduras, y sabiendo en qué etapas del desarrollo de estas células la UPR es crucial, podría ser posible modular el desarrollo de las distintas células, generando así mayor cantidad de alguna población por sobre otra, esto con el fin de generar terapias de interés biomédico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A.M., et al. (2005a). Identification of Flt3+lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* *121*, 295–306.
2. Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.J., Thoren, L.A.M., et al. (2005b). Identification of Flt3+lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* *121*, 295–306.
3. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* *404*, 193–197.
4. Bajana, S., Roach, K., Turner, S., Paul, J., and Kovats, S. (2012). IRF4 Promotes Cutaneous Dendritic Cell Migration to Lymph Nodes during Homeostasis and Inflammation. *J. Immunol.* *189*, 3368–3377.
5. Bajaña, S., Turner, S., Paul, J., Ainsua-Enrich, E., and Kovats, S. (2016). IRF4 and IRF8 Act in CD11c+ Cells To Regulate Terminal Differentiation of Lung Tissue Dendritic Cells. *J. Immunol.* *196*, 1666–1677.
6. Belz, G.T., and Nutt, S.L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 101–113.
7. Bettigole, S.E., Lis, R., Adoro, S., Lee, A.H., Spencer, L.A., Weller, P.F., and Glimcher, L.H. (2015). The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. *Nat. Immunol.* *16*, 829–837.
8. Boulais, P.E., Mizoguchi, T., Zimmerman, S., Nakahara, F., Vivicé, J., Mar, J.C., van Oudenaarden, A., and Frenette, P.S. (2018). The Majority of CD45⁺ Ter119⁺ CD31⁺ Bone Marrow Cell Fraction Is of Hematopoietic Origin and Contains Erythroid and Lymphoid Progenitors. *Immunity* *49*, 627–639.e6.
9. Broudy, V.C. (1997). Stem Cell Factor and Hematopoiesis. *Blood* *90*, 2421–2438.
10. Durai, V., and Murphy, K.M. (2016). Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity* *45*, 719–736.
11. Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science* (80-.). *311*, 83–87.
12. Van Galen, P., Kreso, A., Mbong, N., Kent, D.G., Fitzmaurice, T., Chambers, J.E., Xie, S., Laurenti, E., Hermans, K., Eppert, K., et al. (2014). The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress. *Nature* *510*, 268–272.
13. Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656–661.
14. Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., Price, J., Yin, N., Bromberg, J., Lira, S.A., et al. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J. Exp. Med.* *206*, 3115–3130.
15. Grinenko, T., Eugster, A., Thielecke, L., Ramasz, B., Krüger, A., Dietz, S., Glauche, I., Gerbault, A., Von Bonin, M., Basak, O., et al. (2018). Hematopoietic stem cells can differentiate into restricted myeloid progenitors before cell division in mice. *Nat. Commun.* *9*.
16. Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R.J., and Blumberg, R.S. (2016). The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 469–484.
17. Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578.
18. Guilliams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018). Immunity Developmental and functional heterogeneity of monocytes Developmental and functional heterogeneity of monocytes.
19. Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M., and Merad, M. (2010). Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol. Rev.* *234*, 55–75.
20. Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B.,

- Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* (80-.). 322, 1097–1100.
21. Iwakoshi, N.N., Pypaert, M., and Glimcher, L.H. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J Exp Med* 204, 2267–2275.
 22. Iwasaki, H., and Akashi, K. (2007). Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell. *Immunity* 26, 726–740.
 23. Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., and Miura, M. (2004). A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nat. Med.* 10, 98–102.
 24. Janssens, S., Pulendran, B., and Lambrecht, B.N. (2014). Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nat. Immunol.* 15, 910–919.
 25. Klebanoff, C.A., Spencer, S.P., Torabi-Parizi, P., Grainger, J.R., Roychoudhuri, R., Ji, Y., Sukumar, M., Muranski, P., Scott, C.D., Hall, J.A., et al. (2013). Retinoic acid controls the homeostasis of pre-cDC-derived splenic and intestinal dendritic cells. *J. Exp. Med.* 210, 1961–1976.
 26. Lewy, T.G., Grabowski, J.M., and Bloom, M.E. (2017). BiP: Master regulator of the unfolded protein response and crucial factor in flavivirus biology. *Yale J. Biol. Med.* 90, 291–300.
 27. Liu, K., Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009a). In Vivo Analysis of Dendritic Cell. *Science* (80-.). 324, 392–397.
 28. Liu, K., Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009b). In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. *Science* (80-.). 324, 392–397.
 29. Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18, 3066–3077.
 30. Martinon, F., Chen, X., Lee, A.-H., and Glimcher, L.H. (2010). TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* 11, 411–418.
 31. Mayle, A., Luo, M., Jeong, M., and Goodell, M.A. (2012). Flow Cytometry Analysis of Murine Hematopoietic Stem Cells.
 32. Merad, M., and Manz, M.G. (2009). Dendritic cell homeostasis. *Blood* 113, 3418–3427.
 33. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604.
 34. Naik, S.H., Sathe, P., Park, H.-Y., Metcalf, D., Proietto, A.I., Dakic, A., Carotta, S., O’Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., et al. (2007). Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat. Immunol.* 8, 1217–1226.
 35. Naik, S.H., Perić, L., Swart, E., Gerlach, C., Van Rooij, N., De Boer, R.J., and Schumacher, T.N. (2013). Diverse and heritable lineage imprinting of early haematopoietic progenitors. *Nature* 496, 229–232.
 36. Onai, N., Obata-Onai, A., Schmid, M.A., Ohteki, T., Jarrossay, D., and Manz, M.G. (2007). Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat. Immunol.* 8, 1207–1216.
 37. Onai, N., Kurabayashi, K., Hosoi-Amaike, M., Toyama-Sorimachi, N., Matsushima, K., Inaba, K., and Ohteki, T. (2013). A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential. *Immunity* 38, 943–957.
 38. Osorio, F., Tavernier, S.J., Hoffmann, E., Saeys, Y., Martens, L., Vettters, J., Delrue, I., De Rycke, R., Parthoens, E., Pouliot, P., et al. (2014). The unfolded-protein-response sensor IRE-1 α regulates the function of CD8 α + dendritic cells. *Nat. Immunol.* 15, 248–257.
 39. Persson, E.K., Uronen-Hansson, H., Semmrich, M., Rivollier, A., Hägerbrand, K., Marsal, J., Gudjonsson, S., Håkansson, U., Reizis, B., Kotarsky, K., et al. (2013). IRF4 Transcription-Factor-Dependent CD103+CD11b+ Dendritic Cells Drive Mucosal T Helper 17 Cell Differentiation. *Immunity* 38, 958–969.
 40. Pincus, D., Chevalier, M.W., Aragón, T., van Anken, E., Vidal, S.E., El-Samad, H., and Walter, P. (2010). BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol.* 8, e1000415.

41. Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* *412*, 300–307.
42. Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L., and Sisirak, V. (2011). Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 163–183.
43. Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A.W.S., See, P., Shin, A., Wasan, P.S., et al. (2013). IRF4 transcription factor-dependent CD11b⁺ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* *38*, 970–983.
44. Schlitzer, A., McGovern, N., and Ginhoux, F. (2015a). Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Semin. Cell Dev. Biol.* *41*, 9–22.
45. Schlitzer, A., Sivakamasundari, V., Chen, J., Sumatoh, H.R. Bin, Schreuder, J., Lum, J., Malleret, B., Zhang, S., Larbi, A., Zolezzi, F., et al. (2015b). Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat. Immunol.* *16*, 718–728.
46. Schmid, M.A., Kingston, D., Boddupalli, S., and Manz, M.G. (2010). Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol. Rev.* *234*, 32–44.
47. Sharma, M.D., Rodriguez, P.C., Koehn, B.H., Baban, B., Cui, Y., Guo, G., Shimoda, M., Pacholczyk, R., Shi, H., Lee, E.-J., et al. (2018). Activation of p53 in Immature Myeloid Precursor Cells Controls Differentiation into Ly6c⁺CD103⁺ Monocytic Antigen-Presenting Cells in Tumors. *Immunity* *48*, 91–106.e6.
48. Sychien, D., Scott, C.L., Martens, L., Vanderkerken, M., Van Gassen, S., Plantinga, M., Joeris, T., De Prijck, S., Vanhoutte, L., Vanheerswynghels, M., et al. (2016). IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity* *45*, 626–640.
49. Signer, R.A.J., Magee, J.A., Salic, A., and Morrison, S.J. (2014). Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature* *508*, 49–54.
50. Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., and Brewer, J.W. (2004). XBP1: A link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *167*, 35–41.
51. Tavernier, S.J., Lambrecht, B.N., and Janssens, S. (2009). *The unfolded protein response in immune cell development: putting the caretaker in the driving seat* (Springer International Publishing).
52. Tavernier, S.J., Osorio, F., Vandersarren, L., Vettters, J., Vanlangenakker, N., Van Isterdael, G., Vergote, K., De Rycke, R., Parthoens, E., van de Laar, L., et al. (2017). Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival. *Nat. Cell Biol.* *19*, 698–710.
53. Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jèze, G., Guermonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., and Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* *9*, 676–683.
54. Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* *172*, 565–575.