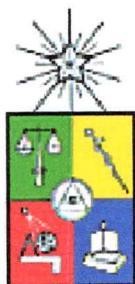


UCH-FC
Doc - BMCN
V297
C.I.



La Catepsina S en la Biología de las Células Dendríticas

**Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de**

**Doctor en Ciencias con Mención en
Biología Molecular, Celular Y Neurociencias**

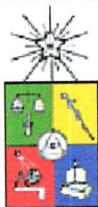
**Facultad de Ciencias
por**

PABLO ANTONIO VARGAS CONTRERAS

**Directores de Tesis
DR. MARIO ROSEMBLATT SILBER
DRA. ANA-MARÍA LENNON-DUMÉNIL**

Enero, 2008

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

PABLO ANTONIO VARGAS CONTRERAS

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de Enero de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Mario Roseblatt

Co-Directora de Tesis

Dra. Ana-María Lennon-Duménil

Comisión de Evaluación de la Tesis

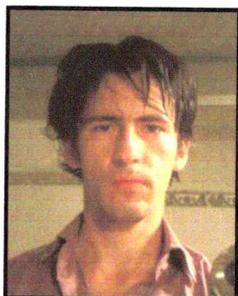
Dr. Marco Tulio Nuñez

Dr. Alexis Kalergis

Dr. Alfredo de Ioannes

A series of handwritten signatures in blue ink, each positioned above a horizontal dotted line. From top to bottom, the signatures correspond to: Mario Roseblatt, Ana-María Lennon-Duménil, Marco Tulio Nuñez, Alexis Kalergis, and Alfredo de Ioannes. The signatures are stylized and cursive.

AUTOBIOGRAFÍA DEL AUTOR



Hace 29 años que estoy en este mundo, y esta es mi primera autobiografía. Partiendo por la infancia, creo que de niño era muy, pero muy callado. Siendo así no es raro que en el colegio hiciera pocos amigos y participara poco en todo. Se podría decir que era un niño observador. Al final igual la gente cambia, pero no tanto. En el transcurso de la enseñanza media, en algún segundo de "iluminación", aprendí a pensar. En la U supe de afectos y de entrega. Luego viajé, conocí otras culturas, y en el camino aprendí a aceptarme como persona. Ahora trato de comunicarme más seguido, me gusta pensar en las cosas felices, en que la libertad existe y que los límites son imaginarios. Mi mundo lo complementa mi hija Matilde, con quien somos amigos y que por ahí se ganó de forma mágica mi entrega y amor incondicionales.

AGRADECIMIENTOS

Me gusta pensar que todos los eventos que han ocurrido en este periodo están ligados unos con otros. No conozco con exactitud los "grados de separación" que nos distancian, pero las interacciones con el resto han moldeado mi persona, y como resultado de eso es que salen estas palabras.

Siguiendo la historia, cuando el año 2003 entre al programa de doctorado mi interés por la investigación era más bien limitado. En ese tiempo trabajaba en "Inmuno", donde en la época conocí a las ahora viejas generaciones comandadas por el Leo, Cortés, la Paula, la Saumin, el Mora, la Lily, el Naves, la Carola, luego la Michea, el Fernando, el Raúl, la Jenny, el Gonzalo, la Fabiola, la Pino, y tal vez se me olvide alguien... creo que fue otra vida. En ese tiempo fue que adquirí la costumbre de transformar al laboratorio en segunda casa y centro operacional. Agradezco de todos ellos las malas influencias y los buenos ejemplos, también la compañía, la amistad y la confianza que con muchos aún perdura.

En ese tiempo terminaba la tesis de pregrado. La Bono presionaba por el escrito, igual que ahora, y yo no tenía ningún interés en esas cosas. Recuerdo las tardes de los sábados, cuando con mis amigos jugaba fútbol por mil horas, me perdía en el tiempo y volvía con el bajón anímico al lab, y ahí estaba o Cortés, o la Bono, o ambos. Me recuerdo poniendo CIITA en las placas de ELISA, con una luz bien amariiiiilla en el lab, con el constante sonido de los refrigeradores y al lado María Rosa pasando tubos en el citómetro. Aprecio mucho las conversaciones que ahí mantuvimos, que más bien fueron consejos de vida que me llevaron a apreciar mucho a MR y que probablemente definieron todo lo que después pasó.

El 2004 me fui a Francia. Ahí fue la revolución. Mi vida quedó partida. Me cambié de Conchalí a Paris, literalmente y sin escalas. Llegue donde la Nani, la nueva Jefa. Ella me trató siempre súper bien, fuimos amigos, y creo que nos comunicamos casi inusualmente. Ella no tenía prejuicios de mí y yo no tenía prejuicios suyos. Creo que fue en ese periodo que gané confianza, porque después de la cantidad de cosas que pasaron nada de lo que ocurriera podía ser insuperable. Al final no paso nada. Agradezco inmensamente la libertad que en ese entonces me otorgó la Nani, la confianza que me hizo sentir y la preocupación que por mí demostró. Agradezco también a Fulvia, Hélène, Gabrielle, Pierre y Hulin por enseñarme inglés y francés, por las idas al cine, las conversaciones extrañas que tuvimos y por dejarme ser. También por compartir historias y dejarme conocer un poquito de lo que se vive en otros lugares. Después llegó el Fernando, la Jheymmi, la Yuseff. El cufi apareció itinerante y hasta un tal Furman llegó a Francia, y por ahí fue que el lab dejó de ser de los franceses. Agradezco a la comunidad chilena por los carretes, las discusiones científicas y el engrupimiento. Aprendí harto de por ahí.

Entre medio en Chile aparecieron nuevos elementos en el juego, las generaciones se volvieron regueteras, como que algo paso. Los OPA se renovaron, eran los inicios de los galancetes.

De las nuevas generaciones en inmuno están los galancetes de Calisto, Espejo y Michea, también la Paz, la Ale, la Solanes, el Felipe, la Vale, Alberto, la Carola, la Pame, el Oscar y la Eva. De esta generación destaco la diversidad que ha hecho inesperadamente enriquecedora la permanencia en el laboratorio. Agradezco la sinceridad, la amistad, la confianza y también la postura en la vida.

Para cerrar el plano laboral tengo que agradecer a Mario Rosembiatt. No puedo decir que seamos amigos, pero yo lo respeto. Gracias a él pude viajar y tener un proyecto novedoso, y aunque las personalidades no han permitido una mejor comunicación, no puedo negar que lo considero como un ejemplo.

En el plano personal han pasado muchas cosas en estos años, pero dentro de lo que más afectó el desarrollo de la tesis es que entre medio fui papa. Como nunca estuve en Chile, esa responsabilidad ha sido más bien virtual. Creo que si hay algo que me permitió cumplir a cabalidad mis funciones científicas fue la confianza de saber que la Bertsy cuidaba a la Mati. Podemos tener diferencias, pero su amor incondicional, su fuerza y sus ganas de hacer de la Mati una niña feliz hicieron que no sintiera duda alguna del éxito de su complicada misión. Creo que son las gracias más importantes de estas páginas. También le agradezco la compañía en momentos difíciles y las antiguas conversaciones de horas y horas, de esa época en que el tiempo no duraba nada.

Agradezco también a mis amigos, los típicos de la U. Es inmensamente gratificante después de viajar sentir que uno nunca se ha ido. Incluyendo a todos los OPA y asociados, agradezco en especial al Ale, Esparza, Cesar, Karen, Ricardo, Lupe, Undu, Polo, Elmer y Raúl. Aprecio las conversaciones, el relajo y el compañerismo que nos hace sentir unidos.

Finalmente quiero mencionar a la familia. Si bien en estos años nuestra relación ha sido bastante lejana, todo lo que soy parte de la base que ellos pusieron. Independiente de las distancias sigo siendo el mismo, no me pidan que cambie. Agradezco a la Chica por la confianza, al Gabriel por su inmenso cariño de hermano, a mi padre por regalarme y a mi madre por todas las cosas.

ABREVIATURAS.

Introducción.

CD: Célula dendrítica

LT: Linfocito T

RRP: Receptores reconocedores de patrones

ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*

TIR: *Toll/IL-1 Receptor*

IL : Interleuquina

LB : Linfocito B

CPA : Célula presentadora de antígeno

MHC : *Major Histocompatibility Complex* (complejo principal de histocompatibilidad)

Ii: Cadena invariante

Cat: Catepsina

CLIP: *Class II associated invariant chain peptide*

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia

KO: *Knock-out*

Materiales y Métodos.

Lamp: *Lysosomal associated membrane protein*

Myo: *Myosin*

OVA: Ovoalbúmina

HRP: *Horse radish peroxidase*

BSA: *Bovine serum albumin*

HEL: *Hen egg lysozime*

PE: *Phycoeritrin*

FITC: *Fluorescein iso thyo-cyanate*

IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Media*

PBS: *Phosphate saline buffer*

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

EDTA: *Acido etilendiaminotetraacético*

FACS: *Flow activated cell sorting*

rpm: *Revoluciones por minuto*

FSC: *Forward sactter*

IMF: *Intensidad media de fluorescencia*

DTT: *Ditiotreitól*

SDS-PAGE: *SDS poliacrilamide gel electrophoresis*

SDS: *Sodium dodecylsulfate*

MAC: *Macintosh*

Resultados y Discusión.

MGF: *Media geométrica de fluorescencia*

LPS: *Lipopolisacarido*

LHVS: *Morpholinurea-leucine-homophenylalanine-vinyl phenyl sulfone*

OLS: *Órgano linfoide secundario*

EEA1: *Early endosome antigen 1*

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

2D: *2 dimensiones*

Nota. La mayor parte de las abreviaturas utilizadas en este trabajo derivan de nombres en inglés de moléculas o técnicas que comúnmente se utilizan en el área de la biología celular. Este vocabulario se mantuvo con la idea de crear un lenguaje universal y comprensible para cualquier lector informado interesado en este trabajo.

INDICE DE CONTENIDOS.

AGRADECIMIENTOS	II
ABREVIATURAS.	IV
ABREVIATURAS.	IV
INDICE DE CONTENIDOS.	VI
INDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
INTRODUCCIÓN	1
EL INICIO DE LA RESPUESTA INMUNE	2
RECONOCIMIENTO Y PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS	7
INTERNALIZACIÓN ANTIGÉNICA Y MIGRACIÓN EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.	15
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS.	20
ANIMALES UTILIZADOS.	20
ANTICUERPOS Y DROGAS.	20
LÍNEAS CELULARES	21
PREPARACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	21
ENSAYO DE FAGOCITOSIS	22
Acoplamiento de partículas con estreptavidina-Alexa 488.	23
Ensayo de internalización de partículas de látex en células dendríticas.	24
ENSAYO DE DEGRADACIÓN ANTIGÉNICA.	25
Acoplamiento de proteínas a la superficie de las partículas de látex.	26

Seguimiento de la degradación antigénica	27
Calculo del grado de degradación	28
Calculo de la capacidad degradativa	28
ENSAYO DE MADURACIÓN FAGOSOMAL	29
ENSAYO PARA LA ESTIMACIÓN DEL pH FAGOSOMAL	30
Preparación de las partículas	30
Ensayo de pH en células dendríticas	31
Curva de calibración y cálculo del pH.	32
PURIFICACIÓN DE FAGOSOMAS	33
ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PROTEASAS <i>IN VIVO</i> .	34
Acoplamiento de partículas de látex con la sonda de proteasas.	35
ENSAYOS DE MOTILIDAD <i>IN VITRO</i> .	35
ENSAYOS DE MIGRACIÓN <i>IN VIVO</i> .	36
INMUNOPRECIPITACIÓN DE Ii Y ANÁLISIS DE PROTEÓMICA.	36
CITOMETRÍA DE FLUJO	37
RESULTADOS	38
PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.	38
LA DEGRADACIÓN ANTIGÉNICA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS ES GRADUAL DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS FAGOSOMAS.	41
CATEPSINA S Y DEGRADACIÓN ANTIGÉNICA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.	44
INHIBICIÓN DE LA DEGRADACIÓN ES ESPECÍFICA DE LOS COMPARTIMENTOS QUE ACUMULAN Ii.	47
EN AUSENCIA DE CATEPSINA S LOS COMPARTIMENTOS QUE ACUMULAN Ii SE FUSIONAN MENOS CON LOS LISOSOMAS.	50
DISMINUCIÓN GENERAL EN ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN FAGOSOMAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DEFICIENTES EN CATEPSINA S.	52
AUMENTO DE pH FAGOSOMAL DA CUENTA DEL DEFECTO EN LA DEGRADACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DEFICIENTES EN CATEPSINA S.	55
IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS LIGANDOS DE Ii.	58
MYO II, FAGOCITOSIS Y MADURACIÓN DE FAGOSOMAS.	63
LA MADURACIÓN DE FAGOSOMAS ES DEPENDIENTE DE CATEPSINA S PERO INDEPENDIENTE DE LA CADENA INVARIANTE.	65
LA INTERACCIÓN Ii/MYO II CONTROLA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	68
LPS INDUCE UNA ASOCIACION TRANSIENTE Ii/Myo II QUE CORRELACIONA CON UNA BAJA EN LA ACTIVIDAD DE CATEPSINA S.	72

DISCUSIÓN	75
DEL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y LA MADURACIÓN DE LOS FAGOSOMAS EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	77
DEL PAPEL DE LA CATEPSINA S EN EL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.	81
CONTROL DE LA MADURACIÓN DE LOS FAGOSOMAS EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	85
DE CÓMO SE REGULA LA MOTILIDAD Y MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	88
SENSORES DEL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO.	90
DEL FAGOSOMA HACIA AFUERA.	92
PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y MIGRACIÓN (función v/s movimiento)	95
DE CÓMO SE INTEGRAN LOS RESULTADOS EN EL TIEMPO Y EL ESPACIO.	97
CONCLUSIONES	100
ANEXO	102
REFERENCIAS.	104

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reconocimiento antigénico.	3
Figura 2. Reconocimiento e internalización antigénica en células dendríticas.	4
Figura 3. Maduración de fagosomas.	6
Figura 4. Ii y la catepsina S en el control de la carga peptídica.	10
Figura 5. El desbloqueo y la liberación de las moléculas de MHC II.	11
Figura 6. Esquema del procesamiento antigénico en la vía endocítica de las células dendríticas.	13
figura 1M. Esquema del ensayo de fagocitosis.	24
figura 2M. Esquema del ensayo de degradación antigénica.	26
figura 3M. Base del ensayo de maduración fagosomal.	30
Figura 1. Degradación antigénica en fagosomas de células dendríticas.	39
Figura 2. Degradación de antígenos durante la maduración de los fagosoma en células dendríticas.	43
Figura 3. Efecto de la ausencia de Catepsina S en la degradación de antígenos fagosomales. ..	46
Figura 4. Fagosomas que acumulan Ii tienen una degradación antigénica disminuida en ausencia de Catepsina S.	49
Figura 5. Defecto de la fusión entre los fagosomas y los lisosomas en ausencia de Catepsina S.	51
Figura 6. Defecto en la cantidad de proteasas activas en los fagosomas de CDs deficientes en Catepsina S.	54
Figura 7. El pH de los fagosomas está aumentado en ausencia de Catepsina S.	57
Figura 8. Inmunoprecipitación de Ii y proteínas asociadas.	61
Figura 9. Papel de Myo II en la fagocitosis y procesamiento antigénico.	64

Figura 10. El defecto en la degradación antigénica detectado en ausencia de Catepsina S es independiente de Ii.	67
Figura 11. Motilidad de células dendríticas <i>in vitro</i>	70
Figura 12. Migración de células dendríticas <i>in vivo</i>	71
Figura 13. El efecto de la activación de las células dendríticas en la actividad de la Catepsina S y la asociación Ii/Myo II.	74
Figura 1D. La función de las células dendríticas durante la respuesta inmune adaptable.....	76
Figura 2D. Modelo Propuesto.....	96

RESUMEN

Durante el desarrollo de una respuesta inmune específica los patógenos reconocidos en el sitio infectado son capturados, procesados y transportados al linfonodo por las células dendríticas (CDs). El transporte y la llegada de los antígenos a este lugar permiten la activación específica de los linfocitos T (LT) que circulan por el órgano. La ocurrencia de estos fenómenos corresponde a uno de los eventos esenciales para el inicio de una respuesta inmune específica. Los antígenos procesados que llegan a los linfonodos lo hacen unidos a moléculas presentadoras de antígeno, formando juntos una unidad estructural necesaria para la activación específica de los LT. En este trabajo se muestra que la maquinaria que controla el procesamiento y la unión de los antígenos a las moléculas presentadoras controla también la migración de las CDs a los órganos linfoides. Nuestros resultados muestran que aquellas células en las cuales el procesamiento antigénico y carga peptídica se encuentran inhibidas son incapaces de migrar al linfonodo, independientemente de su estado de maduración. Esto sugiere que *in vivo* las CDs que entran en contacto con los LT son aquellas en las el que el procesamiento antigénico ha ocurrido de manera eficiente. En conjunto nuestros resultados sugieren que el procesamiento antigénico, la carga de las moléculas presentadoras con el péptido antigénico y la migración de las CDs ocurren de manera coordinada, probablemente para asegurar que luego de una infección e inflamación, la presentación de los antígenos derivados del patógeno ocurra de forma concertada, tanto espacial como temporalmente.

ABSTRACT

During the development of a specific immune response the pathogens recognized at the site of infection are internalized, processed and transported to the lymph node by dendritic cells (DCs). The transport and arrival of antigens to this place allows the activation of antigen-specific T lymphocytes (TL) circulating through this organ. These phenomena correspond to one of the essential events for the initiation of a specific immune response. The processed antigens that reach the lymph node do that bound to antigen presenting molecules, conforming together a specific structural unit necessary for the activation of specific TL. In this work we shown that the machinery that controls antigen processing and the binding of peptides to antigen presenting molecules also controls the migration of DCs to the lymph nodes. Our results show that cells showing an inhibited antigen processing and peptide loading activities are also inefficient in reaching the lymphoid tissue, independently of their maturation stage. This suggests that *in vivo* the DCs that enter in contact with TL are those in which antigen processing has been successful. Altogether our results suggest that antigenic processing, the loading of antigenic peptides onto presenting molecules and the migration of the DCs occur coordinately, probably to ensure that following an infection and inflammation, presentation of pathogen-derived peptides occurs both, spatially and temporally synchronized.

INTRODUCCIÓN

La inmunidad es la respuesta de ciertos organismos frente a la presencia de elementos extraños que son o representan un peligro potencial para el desarrollo de la vida. La eficiencia de este proceso es esencial para la existencia y refleja una de las adaptaciones que permite la convivencia de organismos de distintas especies en un espacio común y limitado.

La máxima expresión de un sistema inmune se encuentra en mamíferos, en donde múltiples tejidos y tipos celulares se encargan de elaborar reacciones coordinadas específicamente y adecuadas al origen de cada posible elemento perturbador. La detección de los entes exógenos es llevada a cabo inicialmente por fagocitos, células destinadas a eliminar al patógeno y equipadas con variados tipos de receptores que les permiten discriminar el origen de los distintos antígenos de modo de iniciar una respuesta acorde al tipo de infección.

La función de los fagocitos ocurre en general de manera local, en el lugar infectado. Sin embargo, existe una población particular de estas células que se moviliza desde el sitio afectado hacia los linfonodos. Estos fagocitos sofisticados son conocidos como "células dendríticas" (CDs), y su función se asocia al transporte y no a la eliminación de los antígenos, para así favorecer la activación específica de las células inmunes residentes en los linfonodos.

Este trabajo estudia cómo las CD coordinan la captura y procesamiento de los antígenos del patógeno con el transporte de estos a los linfonodos, de modo de entender las claves que controlan la naturaleza de una respuesta inmune específica.

EL INICIO DE LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune se inicia en el sitio de infección. En ese lugar la presencia de los patógenos induce alteraciones locales que se traducen en la activación del tejido, el que en ese momento inicia la liberación de factores solubles que median el reclutamiento de fagocitos al lugar afectado. Estos fagocitos tienen la capacidad de identificar y diferenciar a los antígenos del patógeno del resto de los elementos presentes en el sitio dañado. Este poder de discernimiento se conoce como "reconocimiento antigénico", y corresponde al evento que da inicio a la respuesta inmune efectora.

El reconocimiento antigénico permite que el sistema inmune realice respuestas específicamente adaptadas a cada tipo de patógeno o elemento perturbador. Esto explica que el tipo de respuesta que se inicia cuando el organismo detecta fragmentos moleculares propios sea distinta de aquella iniciada al momento de la infección con un patógeno (Blander and Medzhitov 2006).

La capacidad de los fagocitos de diferenciar entre distintos tipos de antígenos está dada por la expresión de familias de receptores reconocedores de patrones (RRP) en la superficie celular (Janeway 1989). Cada uno de estos reconoce patrones moleculares

invariables entre familias de antígenos, como la fosfatidil serina de las células apoptóticas, el LPS de las bacterias *gram-*, o el zymosan de las levaduras (Lee and Kim 2007). La estimulación de la mayoría de estos receptores induce la internalización del antígeno e instruye a la célula fagocítica acerca de sus características. Esto da inicio a la puesta en marcha de programas transcripcionales específicos que finalmente median la respuesta de defensa específica de los organismos (Underhill and Ozinsky 2002; Chen, Zhuchenko et al. 2007).

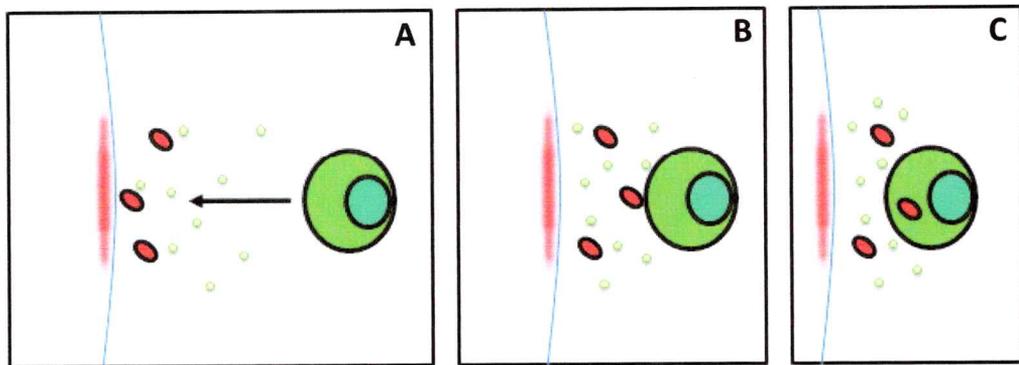


Figura 1. Reconocimiento antigénico.

La presencia de elementos infecciosos (óvalos rojos) en el organismo gatilla un proceso inflamatorio. A) Las células locales que entran en contacto con los patógenos secretan quimioquinas (círculos verdes), factores solubles que se distribuyen formando gradientes quimioattractantes (barra verde). B) Las quimioquinas dirigen la migración de las células fagocíticas al sitio dañado, las que en ese lugar identifican a los elementos perturbadores. C) Los antígenos son fagocitados por la célula centinela, lo que finalmente decide todo el desarrollo posterior de la respuesta inmune.

Entre los RRP que participan en el reconocimiento antigénico se encuentran los TLRs, receptores Fc, receptores del complemento, lectinas de tipo C y otros (Lee and Kim 2007). Durante el reconocimiento los receptores se acumulan en las regiones de la célula que entran en contacto con el antígeno. Esto genera una interface entre ambos, lo que se traduce en cambios locales en el citoesqueleto de la célula fagocítica que

permiten que el antígeno asociado a su receptor sea internalizado (Stuart and Ezekowitz 2005).

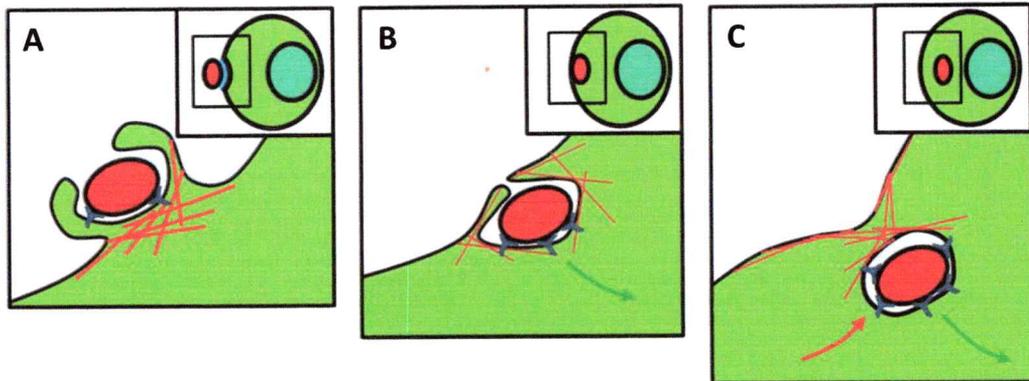


Figura 2. Reconocimiento e internalización antigénica en células dendríticas.

A) El reconocimiento antigénico induce la acumulación de los receptores específicos en el sitio de contacto con el antígeno. B) La activación de estos receptores se traduce en cambios en el citoesqueleto de actina, lo que permite la deformación de la membrana y la internalización del patógeno. C) Los patógenos internalizados en los fagosomas envían y reciben señales de la célula. Esto permite que el antígeno induzca cambios generales en los fagocitos y que estos a su vez reaccionen enviando la maquinaria destructiva al contacto con el elemento internalizado.

Los cambios inducidos por la presencia del ligando se traducen al otro lado de la membrana a través del dominio citosólico de los receptores. Con el contacto, esta región cambia su posicionamiento espacial, afectando su interacción con proteínas del citoplasma. Estos fenómenos llevan a la exposición de motivos moleculares antes ocultos y que al quedar expuestos se vuelven susceptibles a sufrir modificaciones. Entre los dominios más utilizados para transducir señales por parte de los RRP se encuentran los dominios ITAM y los TIR (Medzhitov 2001; Abram and Lowell 2007). La fosforilación de estos motivos cambia la carga interna de la membrana e induce el rápido

reclutamiento de los efectores que participan en la reorganización de la membrana y la fagocitosis (Aderem and Underhill 1999; Yeung, Terebiznik et al. 2006).

Las señales que la presencia del antígeno implica para la célula pueden tener consecuencias tempranas o tardías. A tiempos tempranos la activación de los receptores fagocíticos induce la reorganización local del citoesqueleto de actina que permite la deformación de la membrana y la invaginación del patógeno (figura 2). Existe más de una manera de inducir este re-arreglo de la corteza de actina, hecho que es dependiente del tipo de receptor estimulado durante la internalización (Caron and Hall 1998; Franc, Heitzler et al. 1999). Esto hace pensar que las propiedades de cada fagosoma dependen de los receptores estimulados al momento de la formación del compartimento. Una vez selladas, estas vacuolas evolucionan a través de eventos de fusión y fisión con distintas fuentes de membranas intracelulares para madurar transformándose a vacuolas líticas que finalmente destruyen el contenido del fagosoma (figura 3) (Desjardins, Huber et al. 1994).

A tiempos tardíos cada receptor estimulado por el antígeno transduce señales desde la membrana del fagosoma hacia el citoplasma de la célula. El reclutamiento de moléculas adaptadoras y complejos señalizadores inician e instruyen a la célula fagocítica acerca de las funciones a desarrollar durante el curso de la infección (Pulendran and Ahmed 2006). Estas median en la activación de programas transcripcionales que gatillan la producción de los factores necesarios para responder frente a la presencia de cada patógeno. A modo de ejemplo, el reconocimiento de elementos propios lleva a la

producción de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, mientras que por el contrario el de agentes infecciosos lleva a la producción de factores destinados a aumentar la inflamación, como IL-12 (Wu, Tibrewal et al. 2006).

La mayoría de las células que llegan al sitio inflamado y capturan a los antígenos son fagocitos con alta capacidad destructiva. Ellos corresponden a monocitos, macrófagos y neutrófilos, y forman parte del sistema innato de defensa del organismo (Savina and Amigorena 2007).

Entre estos fagocitos profesionales existe además una población de células que no son eficientes en la destrucción antigénica. Estas son conocidas como células dendríticas (CDs), y su función se orienta al transporte y no a la destrucción de los antígenos internalizados (Watts, Moss et al. 2003; Iwasaki and Medzhitov 2004).

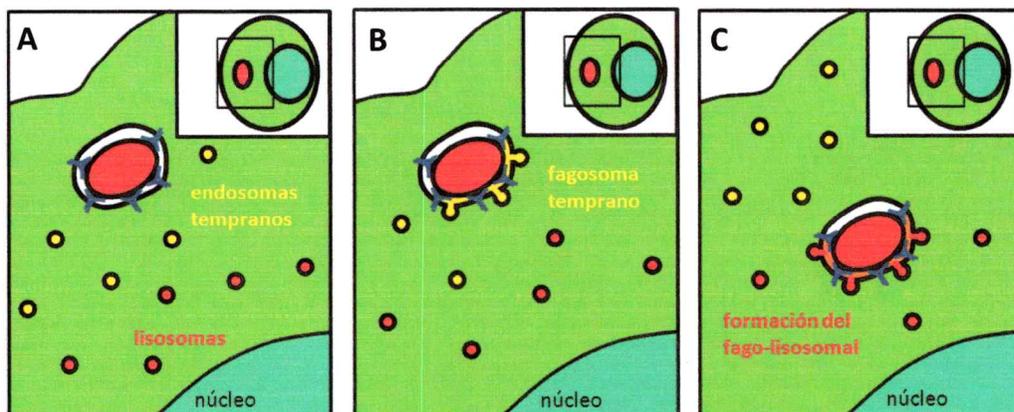


Figura 3. Maduración de fagosomas.

A) Los fagosomas recién formados están compuestos principalmente por membranas que provienen de la superficie celular. B) Al interior de la célula, siguiendo las instrucciones de los receptores antigénicos, los fagosomas se fusionan con vesículas endosomales con las que intercambian contenido, lo que lleva a la maduración del fagosoma. C) El compartimento que contiene al patógeno se fusiona finalmente con los lisosomas, evento que les confiere la capacidad para destruir el contenido del compartimento.

RECONOCIMIENTO Y PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las CDs son una población celular escasa en los tejidos, con bajo poder degradativo y menor capacidad de internalización que otros fagocitos, razones que hacen cuestionable que a nivel periférico participen en funciones protectoras. Estas, junto a linfocitos B (LB) y macrófagos activados, poseen la capacidad de procesar y presentar fragmentos de antígenos a los linfocitos T (LT), por lo que se conocen como células presentadoras de antígeno (CPAs).

Las CPAs se caracterizan por degradar los antígenos internalizados de manera controlada, permitiendo la generación de los fragmentos peptídicos lineales que sirven de sustrato para las moléculas presentadoras de antígeno. Las DCs son especiales entre las CPAs por su eficiencia en la activación de LT vírgenes (Banchereau, Briere et al. 2000). Estos LT transitan por los linfonodos y requieren de coestimulación para su activación. Las CDs otorgan esta coestimulación y además son las únicas CPAs con la capacidad de migrar y transportar los antígenos desde el sitio infectado hacia el órgano linfoide donde entran en contacto con los linfocitos.

La propiedad de activar por primera vez a los LT vírgenes convierte a las CDs en las células presentadoras por excelencia del sistema inmune. Las otras CPAs, incapaces de cumplir esta función, se encargan de re-estimular a los LT efectores o de memoria que ya han sido activados, por lo que son parte de respuestas más tardías y probablemente partícipes de la regulación y mantención de la respuesta inmune iniciada por las CDs.

Las CD4 en el estado basal residen principalmente en los sitios de entrada de los patógenos. En estos tejidos la CD4 tiene características de células inmaduras y cumple el papel de centinela del sistema inmune. En este estado posee capacidades de reconocimiento e internalización antigénica constitutivas que le permiten censar la presencia de elementos dañinos en el ambiente para luego transmitir la información recopilada al interior de la célula.

Cuando el tejido dañado por la presencia de un patógeno envía señales de alerta, las CD4 y los otros fagocitos profesionales son reclutados al lugar afectado. Al momento del reconocimiento de los elementos infecciosos se inicia la activación de las CD4 (Cella, Sallusto et al. 1997). Durante este proceso, las CD4 pierden su capacidad fagocítica e inician un cambio generalizado en la expresión de proteínas de superficie. Su patrón de adhesión se ve alterado y finalmente comienzan la migración hacia el tejido linfóide (Watts, Zaru et al. 2007).

El destino común de los antígenos que gatillan la activación de la CD4 es la internalización. Una vez dentro de la célula, en el fagosoma, el antígeno es degradado de manera controlada o "procesado" (Watts, Moss et al. 2003; Villadangos, Schnorrer et al. 2005). Esta función es realizada por enzimas proteolíticas, las que generan, a partir del agente infeccioso, los fragmentos proteicos del tamaño apropiado para unirse a las moléculas presentadoras de antígeno. Estos complejos, expuestos en la superficie, constituyen una de las unidades estructurales que permiten la activación específica de los LT (Mazza and Malissen 2007).

Existen varios tipos de moléculas presentadoras, donde las mas estudiadas son las de MHC I y MHC II. Las moléculas de MHC I están presentes en todas las células nucleadas del organismo. Unen péptidos antigénicos producidos por el proteosoma y participan en la activación de los LT CD8 o citotóxicos. El proteosoma procesa de manera corriente antígenos citosólicos, por lo que estos linfocitos se activan en caso de infecciones virales o aquellas en que las proteínas antigénicas han tenido acceso al citoplasma de las células presentadoras (Van Kaer 2002).

Las moléculas de MHC II, por su parte, sólo se expresan en células presentadoras de antígeno profesionales (Ting and Trowsdale 2002). Sus péptidos sustratos son producidos por proteasas endosomales y permiten la activación de los linfocitos T CD4 o de ayuda, los que mediante la producción de factores solubles median en la eliminación de bacterias o parásitos tanto intra como extracelulares.

Dado que este trabajo se centra en la presentación antigénica por moléculas de MHC II, el análisis que sigue se referirá sólo a éstas moléculas presentadoras.

Desde el punto de vista del antígeno, el procesamiento que debe sufrir el patógeno para permitir la carga de las moléculas de MHC II no es bien entendido. Se sabe que depende de proteasas endosomales que cortan a proteínas antigénicas y que este fenómeno ocurre durante la maduración de los endosomas. Sin embargo, los detalles del fenómeno son desconocidos. Se ha postulado que para ciertos antígenos hay cortes tempranos sobre las proteínas antigénicas, los que inducen el relajamiento de la

estructura proteica y permiten la acción posterior de otras proteasas endosomales (Watts, Moss et al. 2003).

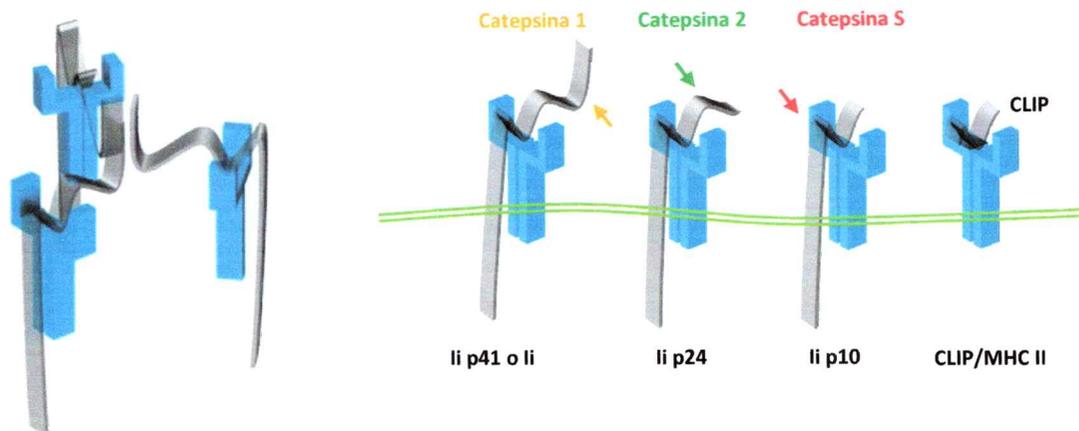


Figura 4. li y la catepsina 5 en el control de la carga peptídica.

En el retículo endoplásmico las moléculas de MHC II se asocian con li formando una estructura nonamérica (izquierda). Este complejo es exportado a los endosomas, donde el corte de la región luminal de li por proteasas permite la reducción a trímeros, los que son atacados secuencialmente por distintas hidrolasas. Estos cortes reducen a li hasta un fragmento de masa 10 KDa denominado p10, el que es específicamente procesado por la CatS. Como resultado de esto, MHC II se disocia de la mayor parte de li, quedando solo asociada a CLIP, péptido que evita la unión prematura de péptidos en los compartimentos endocíticos.

Mejor estudiado está el camino que siguen las moléculas presentadoras para encontrar a los antígenos y permitir su presentación. Las moléculas de MHC II son ensambladas a nivel de retículo endoplásmico. En este compartimento se pliegan con la ayuda de la chaperona llamada cadena invariante (li), la cual estabiliza la estructura de las moléculas presentadoras. La asociación entre ambas tiene además funciones adicionales. li bloquea el bolsillo de unión peptídica de MHC II, evitando la carga prematura de péptidos no infecciosos. Adicionalmente li contiene en su región citosólica un motivo de destinación y retención endosomal que les permite a las

moléculas de MHC II alcanzar los endosomas en un estadio inmaduro, impedidas de unir los fragmentos peptídicos (figura 4) (Gregers, Nordeng et al. 2003).

Los complejos Ii/MHC II inmaduros son estructuras nonaméricas. Estos consisten en un trímero de los complejos formados por tres cadenas de Ii y las cadenas alfa y beta de MHC II (figura 4). Esta estructura es la que viaja a los endosomas, donde Ii es procesada mediante cortes por proteasas endosomales, lo que permite la separación del fragmento de Ii y el desbloqueo de las moléculas presentadoras, lo que finalmente lleva a la liberación del sitio de unión del péptido antigénico.

El procesamiento de Ii ocurre de manera secuencial (Hsing and Rudensky 2005). Este consiste en una serie de cortes llevado a cabo por cisteína proteasas de la familia de las catepsinas, las que procesan las moléculas que llegan a los endosomas para favorecer la carga específica de los antígenos presentes en ese compartimento.

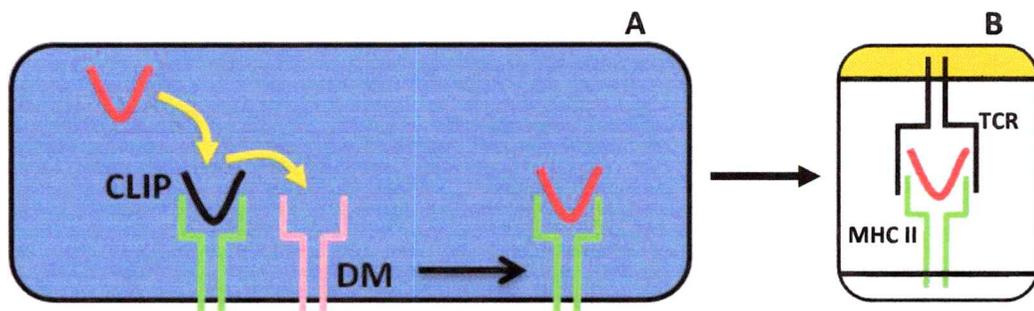


Figura 5. El desbloqueo y la liberación de las moléculas de MHC II.

El corte de Ii por CatS genera un complejo MHC II/CLIP en los endosomas de las CD4 (MHC II en verde, CLIP en negro). La estabilidad de este complejo es alterada por la presencia de DM (Rosado), la que se une lateralmente a los complejos MHC II/CLIP, desplazando a CLIP de la molécula presentadora. Este evento permite la asociación de otros péptidos presentes en el compartimento (Rojo) con las moléculas presentadoras. Los complejos MHC II/péptido no poseen una señal de retención endosomal, por lo que son exportados hasta la superficie de la célula, donde al encuentro de un TCR apropiado pueden ejercer su función presentadora (LT en amarillo).

En el ratón *Ii* tiene una masa de 31 o 41 KDa, dependiendo de la isoforma (Strubin, Berte et al. 1986). Ambas se diferencian en la región luminal y están probablemente involucradas en la destinación y retención de MHC II en distintos compartimentos intracelulares (Peterson and Miller 1992). La isoforma p31 es cerca de 10 veces más abundante que p41 (Strubin, Berte et al. 1986). Ambas pueden llegar a los endosomas para ser cortadas secuencialmente por las catepsinas, dando origen a un fragmento de 24 KDa primero y a uno de 10 KDa después (p24 y p10 respectivamente). p10 es el sustrato específico de la endopeptidasa Catepsina S (CatS), la que permite que el fragmento citosólico de *Ii* se separe de las moléculas presentadoras perdiendo así su señal de retención en el endosoma (Bakke and Dobberstein 1990; Shi, Villadangos et al. 1999). El bolsillo peptídico de las moléculas de MHC II, sin embargo, no es liberado en ese momento. A este nivel un fragmento de *Ii* permanece aún asociado a las moléculas de clase II (figuras 4 y 5). Este péptido se conoce con el nombre de CLIP (*class II invariant peptide*), y ayuda a mantener la estabilidad estructural de MHC II (Shi, Villadangos et al. 1999).

Para que la carga peptídica ocurra, CLIP debe ser removido. Esto sucede cuando los complejos CLIP/MHC II se topan con la presencia de la chaperona DM (Busch, Rinderknecht et al. 2005). Esta molécula es homóloga a las moléculas de MHC II, pero no participa directamente en la presentación antigénica. DM posee una mayor afinidad por CLIP, por lo que cuando se produce el encuentro de ésta con el complejo CLIP/MHC II, el péptido es desplazado de las moléculas presentadoras lo que permite la carga con

los fragmentos antigénicos presentes en el endosoma al momento de su remoción (Denzin and Cresswell 1995).

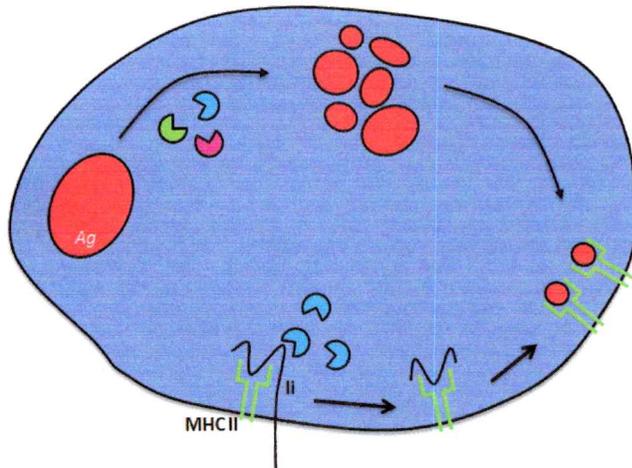


Figura 6. Esquema del procesamiento antigénico en la vía endocítica de las células dendríticas. Los antígenos internalizados son atacados por proteasas al interior de los fagosomas. Las mismas enzimas proteolíticas se encargan de procesar a las moléculas de MHC II, lo que permite el desbloqueo de la molécula presentadora y la pérdida de la señal de retención en el endosoma. Ambos fenómenos ocurren en paralelo y deberían estar coordinados, aunque el mecanismo responsable es del todo desconocido.

En términos de tráfico, es desconocida la manera como li lleva a las moléculas de MHC II a los endosomas. Se sabe que es esencial para la estructura y transporte de las moléculas presentadoras, pero la maquinaria celular asociada al movimiento de las vesículas es aún desconocida.

Es interesante resaltar que la presencia de li en compartimentos endocíticos de células que normalmente no expresan la molécula induce severas alteraciones en la morfología endosomal (Stang and Bakke 1997; Nordeng, Gregers et al. 2002). Estas incluyen el aumento en tamaño de los compartimentos que contienen la proteína al mismo tiempo que enlentecen su maduración. Estos endosomas presentan estructura

multivesicular y son equivalentes a los detectados en células en donde el procesamiento de Ii ha sido artificialmente inhibido (Zachgo, Dobberstein et al. 1992).

Estos datos indican que la presencia de Ii y las moléculas de MHC II en los endosomas modifican o alteran las propiedades del compartimento que las contienen. Esto podría repercutir en el control de otros fenómenos celulares dependientes del tráfico vesicular, adicionales al transporte de las moléculas presentadoras.

En el plano fisiológico, las CPAs que expresan Ii y MHC II constitutivamente no presentan estas alteraciones. Esto puede estar relacionado con los niveles de expresión o con la existencia de moléculas específicas de las CPAs que controlan o regulan las funciones de Ii. En las CDs de ratones deficientes en CatS (donde Ii se acumula intracelularmente) se observa un aumento en el número de compartimentos multivesiculares de tamaño alargado ricos en moléculas de MHC II, similar a lo observado en células transfectadas con Ii (Driessen, Bryant et al. 1999). El tamaño de estos endosomas parece ser controlado por la presencia de Ii en los compartimentos, pues el fenómeno no se observa en las células deficientes en CatS e Ii (Boes, van der Wel et al. 2005).

Esto sugiere que Ii no solo controlaría el transporte de las moléculas de MHC II, sino que también modifica el tráfico y la composición de los compartimentos que la contienen. Esto podría tener repercusiones directamente asociadas al procesamiento antigénico e indirectamente relacionadas con el tráfico de proteínas involucradas en otras funciones celulares.

INTERNALIZACIÓN ANTIGÉNICA Y MIGRACIÓN EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Para que ocurra la respuesta inmune específica los antígenos deben ser transportados desde la periferia a los órganos linfoides. Por ende su captura debería estar coordinada con la migración de las células transportadoras.

Lo que se conoce al respecto en las CD es bastante reciente. Una vez que los antígenos patogénicos han sido reconocidos, las CDs, normalmente motiles, se detienen de manera transiente al mismo tiempo que aumentan su capacidad de internalización antigénica (West, Wallin et al. 2004). Esto indica que el reconocimiento antigénico induce la permanencia momentánea de las CDs en el sitio infectado, probablemente para favorecer el contacto y la incorporación de los antígenos presentes en el lugar.

Una vez que los patógenos han sido internalizados, las CDs vuelven a adquirir la capacidad migratoria. Guiadas por las quimioquinas expresadas en los tejidos linfoides, las células dejan la periferia y se dirigen al linfonodo. Esto permite que las CDs transporten los antígenos capturados en la periferia al lugar de encuentro con los linfocitos.

Es claro que no hace falta un antígeno "real" para inducir la migración, pues estímulos inflamatorios puros inducen el viaje de las CDs a los linfonodos (Randolph, Angeli et al. 2005). Ante esta situación, ¿cómo asegurar la migración de las células que efectivamente han capturado los antígenos?

Por lógica, la única forma de certificar que la célula migre con el antígeno en su interior es que la señal migratoria sea iniciada una vez internalizado el elemento perturbador.

Sólo los antígenos patogénicos inducen la activación y migración de las células, por lo que la estimulación de algún RRP desde el fagosoma podría estar controlando esta función.

Es muy interesante destacar que un fenómeno de estas características ha sido descrito en organismos inferiores como *Dictyostelium discoideum* (Chen, Zhuchenko et al. 2007). Este es un organismo unicelular que en condiciones de carencia de alimento se agrega formando una masa migratoria. Esta masa posee poblaciones celulares especializadas. Entre estas se distingue una conformada por células fagocíticas, las que al igual que en organismos superiores cumplen el papel de patrullas del "organismo". Estas se conocen como células S (*sentinels*), y tienen la capacidad de detoxificar la masa de células apartando de ella los elementos potencialmente tóxicos.

Cuando elementos patogénicos son introducidos dentro de la masa de células migratorias, las células S capturan los antígenos y detienen su movimiento. La masa celular continúa su migración, por lo que las células S se quedan atrás y se aparatan, alejando el contenido tóxico del grueso del conjunto celular. En este caso, en términos celulares, el fenómeno que ocurre es muy similar a lo que pasaría con las CDs. La internalización del antígeno genera cambios en la conducta migratoria de las células. Esto probablemente debido a la estimulación de vías de transducción de señales o a la modificación directa de la maquinaria responsable de controlar la motilidad de las células. Esto indica además, en términos evolutivos, que la internalización y la

migración están conectados, incluso desde antes de la aparición de la multicelularidad (Chen, Zhuchenko et al. 2007).

Volviendo al caso de las CDs, como ya se mencionó, la detención de las células ocurre sólo frente a antígenos patogénicos, indicando que hay algo específico de ellos que repercute en la motilidad de las CDs. Una de las funciones que difiere de manera notable entre compartimentos que son o no patogénicos es la carga de péptidos antigénicos. Esta ocurre de manera preferencial en los fagosomas inflamatorios, lo que sugiere la maduración autónoma de este tipo de compartimentos (Blander and Medzhitov 2006).

Con estos antecedentes se puede inferir que el procesamiento antigénico en la CD y la migración de ésta podrían estar conectados. La formación de fagosomas inflamatorios podría estar asociada al envío de señales desde la membrana del endosoma para indicar a la célula qué hacer en respuesta a la presencia del patógeno. La integración local de las señales permitiría a la célula coordinar distintas funciones de manera de favorecer la eficiencia de la respuesta inmune específica.

A nivel molecular uno de los eventos esenciales del procesamiento en CPAs es el corte de I κ B. Como esta molécula está involucrada en movimiento y maduración de vesículas, postulamos que el par I κ B/CatS podría controlar tanto el procesamiento de los antígenos como la migración celular, coordinando dos de las funciones que permiten el eficiente desarrollo de una respuesta inmune específica.

HIPÓTESIS

La Catepsina S y la cadena invariante (Ii) son cruciales para asegurar la dinámica endosomal necesaria para la formación de endosomas aptos para el procesamiento antigénico. Dentro de estos el corte de Ii por la Catepsina S influencia la biosíntesis y el transporte endosomal de moléculas implicadas en la migración de las CDs a los linfonodos.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el papel de CatS y de Ii en la regulación de la dinámica endosomal de las CDs y su función en la maquinaria de procesamiento antigénico y migración celular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar el compartimento de procesamiento de antígeno en las CDs.
2. Estudiar la dinámica de maduración de los fagosomas que carecen de CatS e Ii, de modo de establecer su papel en la maduración del endosoma antigénico.
3. Identificar, mediante análisis bioquímico y bioinformático, moléculas efectoras que puedan dar cuenta de la participación de la CatS en la

biogénesis de los fagosomas, en la migración de las CDs y en la presentación antigénica.

4. Estudiar en las CDs la función de la o las proteínas identificadas en 3, en las funciones mencionadas mediante el uso de inhibidores, ARNi o KO, de existir estos.
5. Confirmar *in vivo* los resultados para determinar los reales efectos de la ausencia de CatS tanto en la activación de linfocitos T como en la migración de las CDs.

MATERIALES Y MÉTODOS.

ANIMALES UTILIZADOS.

Los ratones C57BL/6, que poseen un fondo génico H-2^b, fueron obtenidos en *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA). Los ratones deficientes en CatS, li y dobles deficientes, todos ellos en el mismo fondo génico, fueron generados según lo descrito (Driessen, Bryant et al. 1999; Shi, Villadangos et al. 1999; Boes, van der Wel et al. 2005) y donados por los autores.

ANTICUERPOS Y DROGAS.

Para los estudios de dinámica fagosomal se utilizó: rata anti-Lamp 1 (Pharmingen, USA), rata anti-li N terminal (Clon In-1; Pharmingen, USA), rata anti-Lamp 2 (Pharmingen, USA) y sueros de conejo anti-li JV11 (Driessen, Bryant et al. 1999), anti-myo IIA (Abcam, UK), anti-CatD, anti-gp91 y JV5 anti-MHC II (Driessen, Bryant et al. 1999).

Para los ensayos de degradación antigénica se utilizaron: anti-OVA, anti-HRP, anti-BSA y anti-HEL (sueros policlonales de conejo purificados).

Como anticuerpos secundarios se utilizó anti-conejo Alexa 647, anti-rata Alexa 488, anti-ratón PE, todos adquiridos en Molecular Probes, USA.

Para la fenotipificación de las CDs se utilizaron los anticuerpos: anti-I-A^b conjugado con FITC, anti-CD11c conjugado con APC, anti-CD80 conjugado con PE y anti-CD86 conjugado con PE, todos ellos adquiridos en Pharmingen, USA.

Las sondas de proteasas DCGO-4 y JPM 565 fueron obtenidas según lo descrito (Meara and Rich 1996; Greenbaum, Medzihradzsky et al. 2000). ML-7 y Y27632 (Calbiochem), blebistatina (Tocris), y LHVS (suministrado por H. Ploegh, Whitehead Institute, Cambridge, MA). CFSE y TRITC (Molecular Probes, Eugene, OR).

LÍNEAS CELULARES

La línea celular de macrófagos RAW264.7, fue obtenida en la *American Type Culture Collection* y cultivada en medio IMDM (Invitrogen) suplementado con 50 μ M 2-mercaptoetanol (GIBCO), 2 mM L-glutamina (GIBCO), 100 U/ml de penicilina (GIBCO) y 100 μ g/ml de estreptomina (GIBCO) (IMDM Completo).

PREPARACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las DCs se generaron *in vitro* desde de precursores de médula ósea extraídos a partir de tibias y fémures de las distintas cepas de ratones. Los huesos se lavaron con etanol 70% durante 20 segundos y luego se perfundieron utilizando PBS frío. Las células obtenidas se lavaron con PBS y luego se cultivaron en placas bacteriológicas (140mm, Greiner Bio-one, U.K.) a una concentración de 10^7 células en 20 ml de una mezcla de

80% IMDM completo y 20% de medio condicionado proveniente del cultivo de la línea celular J558L transfectada con un plasmidio codificante para GM-CSF murino en el mismo medio completo (medio de diferenciación) (Winzler, Rovere et al. 1997). Esta proporción de sobrenadante corresponde a 20 ng/mL del factor de crecimiento y es equivalente a los niveles normales utilizados para diferenciar CD8 a partir de GM-CSF recombinante. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera equilibrada al 5% de CO₂ por 4 días, tiempo tras el cual se recuperaron las células en suspensión y las células adherentes luego de incubar estas últimas por 5 min con 10 ml de una solución de PBS + 5mM EDTA (37°C). Las células obtenidas se mezclaron y sembraron nuevamente a una concentración de 10⁷ células por placa en 20 ml del medio de diferenciación. Al día 8 de cultivo las células no adherentes (de características maduras) fueron eliminadas junto con el sobrenadante, el que fue reemplazado por 20 mL de medio de diferenciación fresco. Después de 12 días de cultivo se recuperaron las células adherentes y su pureza y fenotipo fue evaluado por FACS. Normalmente el protocolo da como resultado la obtención de 1,5 10⁸ células por ratón, de las cuales un 98% son CD11c⁺ (CD8) con bajos niveles de MHC II y moléculas coestimuladoras (fenotipo inmaduro).

ENSAYO DE FAGOCITOSIS

Para evaluar la capacidad de las CD8 de incorporar partículas de látex, se montó un sistema para medir fagocitosis por FACS. El método consiste en administrar a las CD8

partículas de látex de 3 μm químicamente modificadas para exponer Alexa 488 (Molecular Probes,) en su superficie (ver más abajo). Este compuesto fluoresce al ser excitado con un laser de 488 nm y tiene la propiedad de que su señal es apagada por el contacto directo con azul de tripán, permitiendo la diferenciación entre las partículas de látex adsorbidas a la superficie celular de aquellas que fueron internalizadas por las células (Hed, Hallden et al. 1987) y figura 1M).

Acoplamiento de partículas con estreptavidina-Alexa 488.

Amino partículas PolybeadsTM (Polysciences, Alemania) de 3 μm fueron modificadas acoplando EZ-SH2-NH2-biotina (Pierce, Rockford, USA) a su superficie siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las partículas de látex se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS centrifugando a 14.000 rpm por 4 min y descartando el sobrenadante luego de cada centrifugación. Tras la centrifugación final las partículas se resuspendieron en 500 μl de PBS, a los que se agregaron 10 μl de una solución de EZ-SH2-NH2-biotina de concentración 100 mg/ml. La mezcla se incubó durante la noche a 4°C y con agitación. Al día siguiente las partículas se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS + 2% BSA y finalmente se resuspendieron en 200 μl de una solución de estreptavidina-alexa 488 (Molecular Probes) diluida 50 veces en PBS + 2% BSA. La mezcla se incubó por 1 hr a temperatura ambiente con agitación, tiempo tras el cual las partículas se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS + 2% BSA. En el último lavado el látex se resuspendió

en el volumen inicial de esferas de modo de recuperar la concentración original de las partículas.

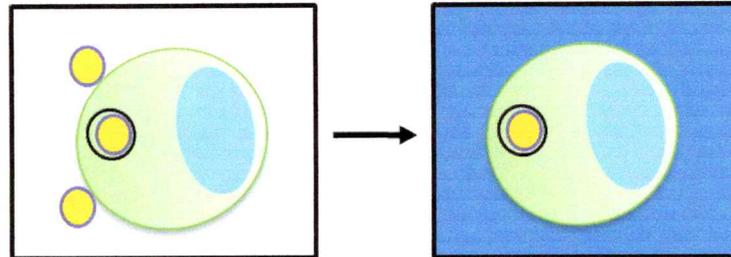


figura 1M. Esquema del ensayo de fagocitosis.

CDs inmaduras son pulsadas con partículas de látex de $3\ \mu\text{m}$ de diámetro que exponen Alexa 488 en su superficie. Tras el pulso y sin lavar, las CDs se resuspenden directamente en una solución que contiene azul de tripán, el que apaga la fluorescencia del látex que no fue internalizado permitiendo la estimación de la cantidad de esferas que fueron internalizadas.

Ensayo de internalización de partículas de látex en células dendríticas.

Para estimar la internalización de las esferas, se incubó 5×10^6 CDs con distintas cantidades de las partículas de látex acopladas a alexa-488. La incubación duró 10 min y se llevó a cabo en un volumen final de $100\ \mu\text{l}$ de medio completo (50×10^6 células/ml). Transcurrido el pulso se detuvo la internalización de las partículas agregando un exceso de PBS a 4°C . Las células se dividieron en dos fracciones, se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min y resuspendidas ya sea en un tampón citrato de sodio 20 mM equilibrado a pH 4 o en una solución de 0,2 mg/ml de azul de tripán diluido en el mismo tampón citrato (ambas a 4°C). Las células se traspasaron a los tubos apropiados e inmediatamente analizadas por FACS. La fluorescencia del canal FL-1 en las células sin azul de tripán entrega la fluorescencia correspondiente a la suma de las partículas

adsorbidas e internalizadas por las células, mientras que la medida en presencia del colorante entrega la fluorescencia de aquellas partículas que fueron internalizadas por las células y que por ende quedan impedidas de interactuar con el tripán (figura 1M). Como el colorante proporciona además tinción vital y es detectado en el canal FL-2 del citómetro, en el ensayo se pueden descartar las células dañadas o apoptóticas y así obtener un resultado de fagocitosis muy limpio. Como control positivo del apagamiento de la fluorescencia y negativo de la internalización, el ensayo se realizó a 4°C o en presencia de citocalasina D, droga inhibidora de la polimerización de actina. En ambos casos la fagocitosis del látex se inhibió por completo.

ENSAYO DE DEGRADACIÓN ANTIGÉNICA.

Para seguir la degradación antigénica al interior de los fagosomas se utilizaron partículas de látex cubiertas a saturación con distintas proteínas unidas covalentemente a ellas. Tiñendo las partículas con anticuerpos contra estos antígenos se puede evaluar por FACS de forma comparativa y cuantitativa la cantidad de proteína presente en cada esfera en distintas condiciones experimentales. Cuando las partículas son incorporadas al fagosoma y expuestas al contacto con las proteasas fagosomales, el antígeno proteico es degradado, lo que permite evaluar la cantidad de proteína remanente en cada partícula internalizada y el poder degradativo específico de cada fagosoma.

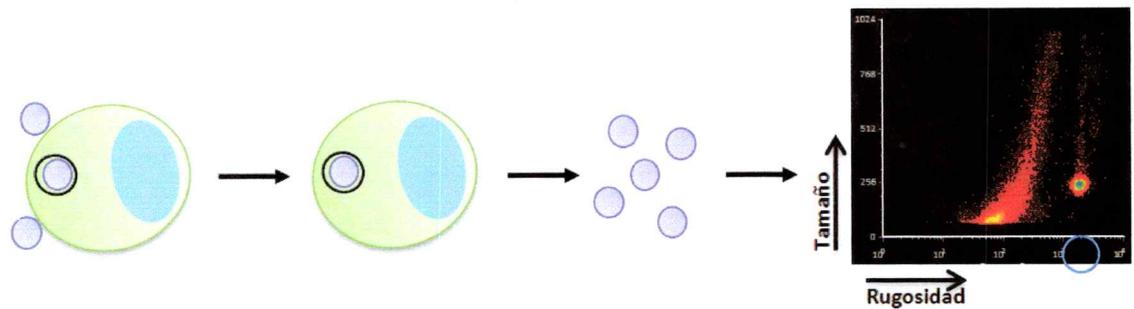


figura 2M. Esquema del ensayo de degradación antigénica.

Las CDs son pulsadas con partículas de látex que exponen en su superficie OVA. Tras el pulso, las células son lavadas en reiteradas oportunidades hasta eliminar las partículas adsorbidas a la superficie y luego cultivadas en medio completo durante distintos tiempos para permitir la maduración de los fagosomas. Al final de cada tiempo las CDs son lisadas, y los extractos incubados con anti-OVA. Al pasar los lisados por el citómetro las partículas de látex son fácilmente diferenciables del resto de fragmentos celulares (círculo azul en el gráfico de la izquierda), lo que permite evaluar específicamente la cantidad de OVA remanente en cada una de las esferas de látex.

Acoplamiento de proteínas a la superficie de las partículas de látex.

Partículas de látex de 3 μm PolybeadsTM (Polysciences, Eppelheim, Alemania), no fluorescentes y químicamente modificadas para exponer grupos amino en su superficie fueron covalentemente acopladas a OVA, HRP, HEL, BSA o LACK recombinantes siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 100 μl de partículas de látex se lavaron 2 veces con PBS (14.000 rpm, 5min) para luego ser resuspendidas en 500 μl de glutaraldehído diluido al 8% en PBS. La mezcla se incubó durante la noche a 4°C con agitación, proceso que permitió la activación de los grupos aminos de las partículas. Finalizada esta etapa, las esferas se lavaron con PBS frío 3 veces y luego se resuspendieron en 500 μl de PBS conteniendo 0,5 mg/ml de la proteína correspondiente. La solución se incubó por 6 hrs a temperatura ambiente con agitación, luego de lo cual las partículas se volvieron a lavar con PBS. Los sitios libres se

bloquearon incubando por 30 min a temperatura ambiente con una solución de glicina 0,1 M disuelta en PBS. Las esferas se lavaron 3 veces más para remover cualquier traza de agentes bloqueadores y al final se resuspendieron en el volumen de origen para recuperar su concentración inicial.

Seguimiento de la degradación antigénica

Las CDs inmaduras se pulsaron con las partículas de látex acopladas a las proteínas antigénicas durante 10 min. Para ello 20×10^6 CDs se incubaron con 100×10^6 partículas de látex por 10 min a 37°C en un volumen final de 400 μ l de medio completo. El pulso fue finalizado con la adición de 10 ml de PBS a 4°C. Las CDs se centrifugaron una vez a 150 g por 5 min, tras lo cual el sobrenadante fue eliminado y el pellet resuspendido en 500 μ l de PBS frío. Esta solución fue depositada sobre una cama de 2 ml de suero puro y luego centrifugada a 150 g por 5 min. Como resultado de esta centrifugación las partículas de látex, menos densas que el suero, flotan y pueden ser separadas fácilmente de las células. El proceso de lavado (flotación) fue repetido 2 veces más, luego de lo cual las células se distribuyeron en diferentes tubos correspondientes a cada uno de los tiempos de incubación, por lo general $t=0$, 30, 60 y 120 min. Cada grupo celular se resuspendió en 2ml de medio completo (a 4°C en el caso del tiempo cero, o 37°C para el resto de los puntos) e incubó a 37°C durante los tiempos indicados más arriba. La maduración se detuvo con la adición de 10 ml de PBS frío, luego de lo cual cada tubo se centrifugó a 1200 rpm por 5 min para finalmente lisar las células durante 30 min a 4°C en un tampón con NP40 0,5%, 150 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$, 1

mM DTT, DNAsa I (Roche) y un coctel de inhibidores de proteasas (Roche). El resultado de la lisis se centrifugó a 3000 rpm por 5 min y el pellet se re suspendió en PBS + 2% BSA y distribuyó en placas de 96 pozos con fondo cónico. Las incubaciones con el anticuerpo polivalente dirigido contra la proteína antigénica y el posterior anticuerpo secundario se realizaron cada una en 50 μ l de PBS + 2% BSA, en la misma placa, lavando 3 veces con 100 μ l de solución sin anticuerpo luego de cada incubación. Las mezclas obtenidas se resuspendieron en 300 μ l de PBS 2% BSA y se analizaron por FACS.

Calculo del grado de degradación

Las partículas de látex marcadas con los distintos anticuerpos se recuperaron en los tubos adecuados y se analizaron por FACS. En los tiempos de incubación mayores a 10 min se observan dos poblaciones de fagosomas, aquellos en los que se degrada el antígeno y otros en los que éste permanece intacto (figura 1). La media geométrica de fluorescencia de la población degradada (fagosomas activos) respecto de la del antígeno no degradado es lo que se denomina "grado de degradación". Para la representación gráfica los valores se expresan de manera porcentual de modo de simplificar la lectura del experimento (figura 1b).

Calculo de la capacidad degradativa

Esta propiedad se concibió como la capacidad de las células de transformar al fagosoma en un compartimento apto para la degradación antigénica, hecho que en los

ensayos corresponde al porcentaje de fagosomas activos. Los valores fueron normalizados a 1, de modo de facilitar la lectura del resultado (figura 1c).

ENSAYO DE MADURACIÓN FAGOSOMAL

El ensayo de maduración fagosomal nació como un perfeccionamiento del ensayo de degradación antigénica. En efecto constituye la adaptación del protocolo de degradación antigénica para permitir la recuperación de los fagosomas completos con sus membranas, admitiendo el seguimiento de marcadores de membrana fagosomal al mismo tiempo que la degradación antigénica.

El protocolo es muy similar al del ensayo de degradación, salvo que el número de células utilizado es mayor y el método de lisis es distinto. En resumen 40×10^6 células se incubaron con 200×10^6 partículas de látex por 10 min a 37°C en un volumen final de 800 μl de medio completo. Tras los lavados y las respectivas incubaciones a 37°C , la actividad de las células se detuvo con la adición de 10 ml de PBS frío, luego de lo cual cada tubo se centrifugó a 1200 rpm por 5 min para luego lavarse 3 veces por flotación de la manera ya detallada. Luego del último lavado el sobrenadante se descartó y el pellet se re suspendió en 500 μl de una solución de sacarosa al 8%, 3 mM imidazol e inhibidores de proteasas. Las células se lisaron mecánicamente pasando por una aguja de 22G acoplada a una jeringa de 2 ml. Este proceso se repitió el número de veces necesario para obtener un 70% de mortalidad celular. El material resultado de la lisis se centrifugó a 3000 rpm por 5 min y el pellet se resuspendió en PBS + 2% BSA para luego

ser distribuido en placas de 96 pozos con fondo cónico. Las incubaciones con distintos anticuerpos y el posterior marcaje secundario se llevaron a cabo en la misma placa en 50 μ l de PBS + 2% BSA, lavando 3 veces con 100 μ l de solución sin anticuerpo luego de cada incubación.

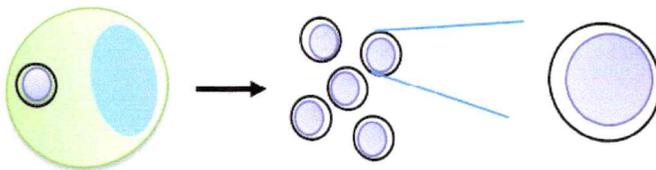


figura 3M. Base del ensayo de maduración fagosomal.

En este ensayo las partículas internalizadas por las CDs se recuperan con su membrana intacta. Esto permite estudiar al mismo tiempo los fenómenos que ocurren en la superficie del látex y en la membrana del compartimento, obteniéndose una visión global de los cambios que ocurren durante la maduración de los fagosomas.

ENSAYO PARA LA ESTIMACIÓN DEL pH FAGOSOMAL

Preparación de las partículas

Partículas de látex de 3 μ m, fluorescentes establemente en rojo (FL-2) y químicamente modificadas para exponer grupos carboxilato en su superficie (Polysciences, Eppelheim, Alemania) se acoplaron covalentemente con FITC siguiendo las instrucciones de manufacturación. El FITC puede ser usado como una sonda sensible a pH (Geisow 1984). Brevemente, las partículas de látex se lavaron en un tampón carbonato 0.1 M y

luego se resuspendieron en tampón fosfato 0,02 M pH 4.5. Esta solución se mezcló gota a gota con 0,6 mL de carbodiimida 2% (Sigma) diluida en el mismo tampón fosfato, mezcla que se incubó a temperatura ambiente por 4 hrs. Posteriormente las esferas se lavaron 3 veces con 1 ml del tampón fosfato, lo que se consiguió centrifugando a 14.000 rpm por 4 min, descartando el sobrenadante luego de cada centrifugación. Las partículas fueron entonces resuspendidas en 1 ml de tampón borato 0,2 M, pH 9 e incubadas con FITC a una concentración final de 0,5 mg/ml. La mezcla se dejó incubando durante la noche y al día siguiente las partículas se lavaron 2 veces con tampón borato para luego ser resuspendidas en 1,2 ml del mismo tampón. A esta solución se le agregaron 50 μ L etanolamina 0,1 M y fueron incubadas por 30 min a temperatura ambiente, etapa destinada a bloquear los sitios libres dejados por la carbodiimida que no unieron FITC. Finalmente las partículas se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en el volumen original del látex, de modo de recuperar la concentración inicial de las partículas. Como resultado se obtuvieron esferas de látex acopladas a 2 fluoróforos distintos, uno sensible y otro insensible al pH, ambos excitables a 488 nm, pero detectados en distintos canales del citómetro de flujo.

Ensayo de pH en células dendríticas

En resumen 10×10^6 CDs se incubaron con 50×10^6 partículas de látex preparadas según lo descrito por 10 min a 37°C en un volumen final de 200 μ l de medio completo. Tras lavar 3 veces por flotación las células se incubaron a 37° en 3 ml de medio completo.

Una alícuota de células fue tomada a distintos tiempos de cultivo, momento en el cual fueron inmediatamente adquiridas por FACS. En una región de FSC v/s FL-2 (donde se detecta la fluorescencia intrínseca de las partículas de látex) se seleccionaron las CDs que capturaron sólo una partícula de látex. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de esta población en el canal FL-1 corresponde a la fluorescencia del FITC. Este valor es proporcional al pH del ambiente, con variaciones lineales en un rango de pH entre 5 y 8 (figura 7).

Curva de calibración y cálculo del pH.

La curva de calibración se hizo incubando las células con las partículas doble-fluorescentes por 30 min a 37°C en medio completo. Posteriormente las células se lavaron extensivamente por flotación, se dividieron en 5 fracciones y se incubaron en medios de cultivo equilibrados a distintos pH (5-9). Estas soluciones contenían 0,1 % de Triton X100, lo que permitió equilibrar el pH del fagosoma con el extracelular. Las muestras fueron inmediatamente adquiridas por FACS y analizadas en la misma región FSC/FL-2, seleccionando las células que capturaron una sola partícula.

Con los valores de fluorescencia obtenidos en FL-1 se elaboró un gráfico pH v/s fluorescencia, el que se muestra en la figura 7b. Los valores son lineales en el intervalo 5-8, rango en el que se hace posible inferir el pH de los fagosomas.

PURIFICACIÓN DE FAGOSOMAS

Los fagosomas se prepararon a partir de CDs diferenciadas *in vitro* a partir de precursores de médula ósea de los distintos ratones. Luego de 12 días de cultivo, un mínimo de 50×10^6 CDs adherentes se incubaron durante 20 min a 37°C junto con 500×10^6 partículas de látex de $0.8 \mu\text{m}$ de diámetro (Sigma). La incubación se realizó en $500 \mu\text{L}$ de IMDM puro de modo de evitar la fagocitosis vía receptores Fc. El pulso se realizó en tubos de 50 mL, y la reacción se detuvo agregando 50 mL de PBS frío. Las células fueron centrifugadas a 150 G por 5 min, velocidad a la cual la mayor parte del látex (de baja densidad) queda en el sobrenadante. Tras ser este descartado, las CDs se lavaron extensivamente (5 veces) con 40 mL de PBS frío cada vez, tomando extrema precaución en la eliminación del líquido para no perder el pellet de células. Las células lavadas se cultivaron en medio RPMI completo (sin GM-CSF), por distintos tiempos. Al final de cada incubación se detuvo la reacción con PBS frío, se centrifugó a 1300 rpm y el pellet final de células se re suspendió en $500 \mu\text{L}$ de una solución de sacarosa 8%, imidazol 3 mM, DTT 1 mM y un coctel de inhibidores de proteasas (Roche). Las células se recolectaron y lisaron mecánicamente por jeringueo con agujas 22G. El tratamiento se repitió tantas veces como necesario para asegurar que la viabilidad disminuyó a un 90 % del valor inicial. El lisado celular se centrifugó a 150 G por 5 min a 4°C , obteniéndose 2 fracciones. El sobrenadante contiene el grueso de las partículas de látex, las que en esta oportunidad están rodeadas por membranas y corresponden a los fagosomas. El sobrenadante recuperado se y diluyó con sacarosa al 65% hasta obtener una mezcla al

45 %. Esta solución se colocó en una gradiente discontinua de sacarosa 3 mM imidazol (65%, 45%, 35%, 25% y finalmente 8%), que fue ultracentrifugada a 30.000 rpm durante 1 hora. La fracción enriquecida en fagosomas fue recuperada desde la interface 25%-8%. Los fagosomas obtenidos se lavaron diluyendo en PBS y centrifugando nuevamente a 24.000 rpm, obteniéndose un pellet seco que posteriormente se lisó y analizó mediante SDS-PAGE.

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PROTEASAS *IN VIVO*.

CDs inmaduras obtenidas tras 12 días de diferenciación *in vitro* fueron incubadas con partículas de látex de 2 µm recubiertas con una sonda que se asocia covalentemente al sitio activo de cisteína proteasas de la familia de las catepsinas (Bogyo, Verhelst et al. 2000; Greenbaum, Medzihradzsky et al. 2000). La sonda está biotinilada y se adhiere a las partículas de látex usando como puente la estreptavidina. La interacción de la estreptavidina y la biotina es estable en tampones de lisis corrientes, por lo que las proteasas quedan acopladas a las partículas de látex tras la destrucción de las células. El hervido de las muestras en tampón de carga destruye esta interacción, por lo que las proteasas acopladas a las partículas pueden ser recuperadas y separadas en geles de poliacrilamida. Como la sonda está biotinilada las proteasas pueden ser detectadas utilizando estreptavidina-peroxidasa.

Acoplamiento de partículas de látex con la sonda de proteasas.

Las CDs recién obtenidas (10×10^6 células), fueron incubadas en una relación 1:5 con las partículas de látex acopladas a la sonda de proteasas. Tras un pulso de 10 min las células fueron lavadas 3 veces por flotación y luego incubadas en medio completo por distintos tiempos a 37°C. Al final de cada incubación las células fueron lisadas directamente en 50 μ l de una solución de lisis reductora (Molecular Probes) que contenía SDS, la que fue suplementada con JPM-565 libre para evitar la unión de las proteasas a las partículas durante el proceso de lisis (sonda fría).

Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida preparados al 12% (Invitrogen), transferidas a membranas de nitrocelulosa (Immobilon-P, Millipore) y finalmente desarrolladas incubando con estreptavidina HRP (Pierce) y revelando con ECL (GE Healthcare).

ENSAYOS DE MOTILIDAD *IN VITRO*.

Para los ensayos de migración *in vitro* CDs inmaduras fueron sembradas en placas de cultivo previamente cubiertas con fibronectina. Las células fueron cultivadas en medio completo y filmadas por 4 hrs con intervalos de 1 min entre cada imagen. Las coordenadas correspondientes al movimiento de las células en relación al punto de inicio de la película fueron inferidas usando el programa Metamorph (Molecular Devices). Los datos obtenidos fueron graficados usando el programa Office Excel 2007 (Microsoft).

ENSAYOS DE MIGRACIÓN *IN VIVO*.

Estos ensayos fueron realizados de dos maneras distintas, dando en ambos casos resultados equivalentes. Ambos métodos coincidían en inyectar en el cojinete plantal de ratones C57/BL6 CDs provenientes de los distintos ratones. En un caso las CDs fueron activadas sobre la noche con 1 µg/ml de LPS (Sigma), mientras que en el otro caso fueron inyectadas tras incubar 10 min con la misma cantidad de LPS.

INMUNOPRECIPITACIÓN DE Ii Y ANÁLISIS DE PROTEÓMICA.

Las inmunoprecipitaciones de Ii se llevaron a cabo a partir de 1 mg de extracto de CDs no tratadas o tratadas con LPS por 30 min. Los extractos se prepararon lisando las CDs por 30 min a 4°C en un tampón que contenía 100 mM Tris, 300 mM NaCl, 0.5% NP-40, 5% glicerol y que se suplemento con un coctel de inhibidores de proteasas. Previo a la inmunoprecipitación el lisado se clarificó incubando el extracto con sueros pre-inmunes de ratón y conejo, además de proteína G acoplada a sefarosa (Amersham). Ii y MHC II fueron precipitadas usando los anticuerpos In-1 o M5114 respectivamente. Las muestras se lavaron y resuspendieron en tampón de carga reductor, hervidas y separadas en geles de poliacrilamida al 12% (Invitrogen). Las proteínas se transfirieron finalmente a membranas de difluoruro de polivinilideno (Immobilon-P; Millipore) y las membranas fueron incubadas con los anticuerpos apropiados y revelados con ECL (GE Healthcare). De manera alternativa, los geles se tiñeron directamente con azul de

coomasie coloidal (Bio-Rad) y las bandas detectadas se cortaron y enviaron al servicio de espectrometría de masa del Institut Curie, Paris, Francia (<http://bioinfo.curie.fr/>).

CITOMETRÍA DE FLUJO

CDs o fagosomas recién obtenidos se incubaron durante 30 min a 4°C y en oscuridad con las diferentes combinaciones de anticuerpos diluidos en PBS + 2% BSA. En los casos en que se utilizaron simultáneamente anticuerpos purificados no marcados y anticuerpos conjugados directamente al fluorocromo, estos últimos se adicionaron junto con el anticuerpo secundario específico para los anticuerpos no marcados. Todos los anticuerpos se usaron en diluciones apropiadas las cuales fueron determinadas previamente por citometría de flujo. Después de incubar con los anticuerpos marcados las células o fagosomas se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS + 2% BSA centrifugando a la velocidad apropiada. Luego del último lavado las muestras se resuspendieron en PBS + 2% BSA y traspasadas a los tubos apropiados para adquirir las muestras en el citómetro de flujo.

En el caso de los fagosomas los análisis se realizaron utilizando una región FSC/SSC restringida a las partículas de látex. En todos los casos las muestras fueron adquiridas con un equipo FACScalibur™ (Becton Dickinson) y analizadas ya sea con el programa CELL Quest™ (Becton Dickinson) en la plataforma MAC o con FCSEXPRESS™ (De Novo Software) en la plataforma Windows.

RESULTADOS

PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.

El procesamiento antigénico es, en términos celulares, la serie de eventos que permite la degradación de componentes del patógeno con el fin de generar fragmentos proteicos de estructura lineal que sirven de sustrato para las moléculas de MHC (Hsing and Rudensky 2005). Con el fin de investigar la maquinaria molecular responsable del control de dicho procesamiento se montó un sistema para evaluar, de manera específica, la capacidad degradativa propia de los compartimentos antigénicos (figura 2M). El diseño experimental utiliza como antígeno modelo proteínas acopladas a esferas de látex, las que son expuestas al lumen de los compartimentos formados tras la fagocitosis del látex. Si el antígeno entra a un compartimento degradativo, la proteína presente en la superficie será atacada por las proteasas disociándose de la superficie de las partículas. Nuestro ensayo mide por FACS la cantidad de proteína remanente en cada esfera de látex fagocitada (Materiales y Métodos), lo que permite estimar de manera individual la capacidad degradativa de cada compartimento (figura 2M). Un ejemplo realizado en CDs silvestres y demostrativo de una cinética de degradación utilizando OVA como proteína antigénica se muestra en la figura 1. La fagocitosis de las partículas de látex está sincronizada con un pulso corto de 10 min que busca coordinar la ingesta de las partículas y la consecuente degradación antigénica (figuras 1 y 2M). Durante este tiempo no se aprecia desaparición de OVA desde la

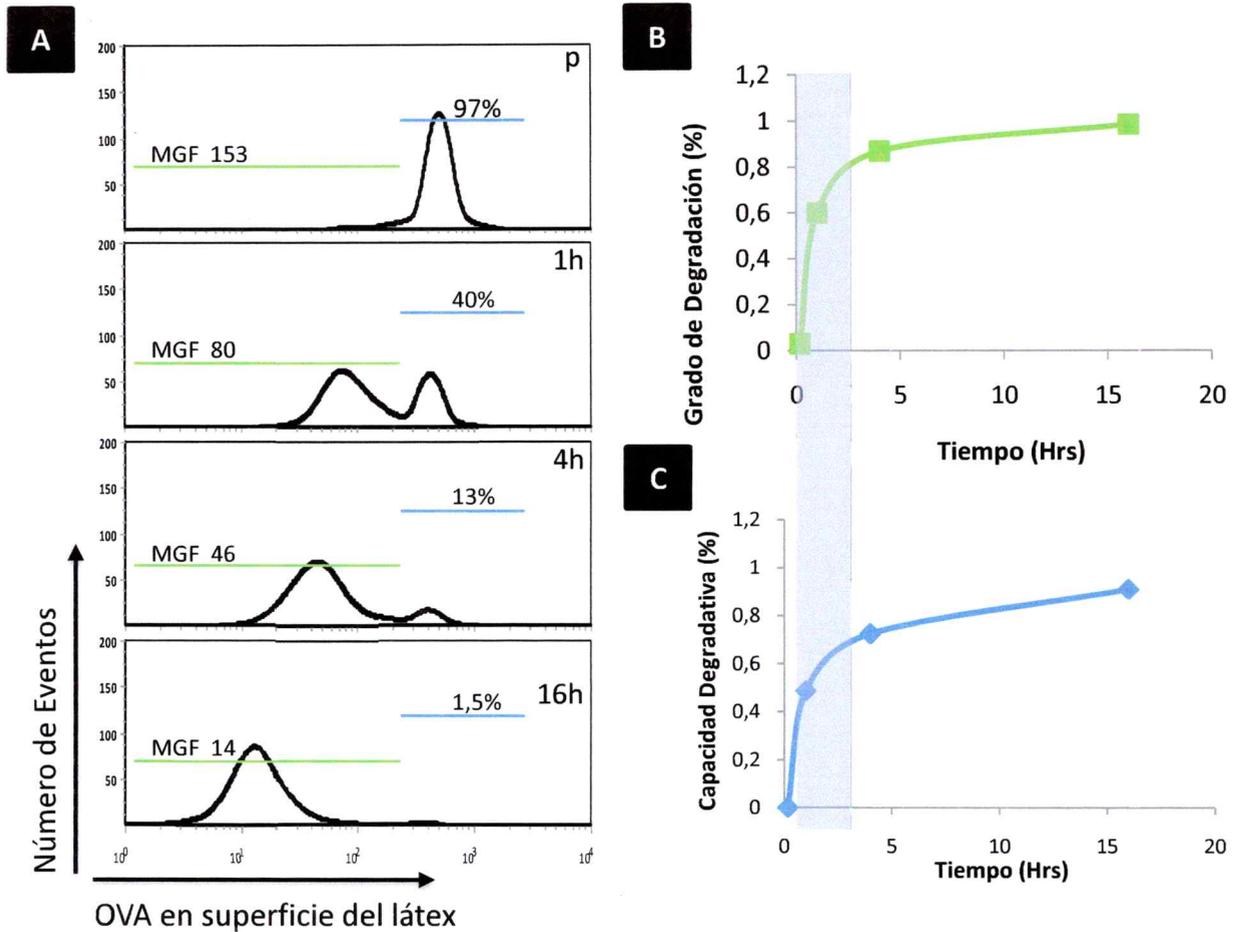


Figura 1. Degradación antigénica en fagosomas de células dendríticas.

La proteína OVA remanente en la superficie de partículas de látex fagocitadas por CDs silvestres fue evaluada por FACS a distintos tiempos de la formación de los fagosomas. El panel A muestra la cinética de degradación de OVA al interior de los fagosomas. El porcentaje que se muestra equivale al de los fagosomas que permanecen inactivos en cada tiempo. La MGF se refiere exclusivamente a la población de fagosomas activos (ver texto). En el panel B de la figura se muestra un grafico del grado de degradación al interior de los fagosoma (ver Materiales y Métodos). En el panel C se muestra el porcentaje de fagosomas activos a los distintos tiempo de maduración de las vacuolas (capacidad degradativa). Este es un experimento representativo de al menos 10 realizados. (MGF, media geométrica de fluorescencia).

superficie de las esferas, evidenciando un bajo poder degradativo de los fagosomas recién formados. Luego de cultivar las células durante una hora la degradación antigénica se hace evidente, pero solo en el 60% de los fagosomas aislados. El 40% restante permanece con el antígeno intacto. Esto sugiere que a pesar de haber una sincronización de la fagocitosis, en CDs la formación y maduración de los fagosomas no ocurre de manera sincrónica. En la medida en que transcurre el tiempo se observa un aumento gradual en el porcentaje de fagosomas en los que OVA está siendo degradada (fagosomas activos) (figura 1c). En paralelo la media geométrica de fluorescencia (MGF) de la población activa disminuye de manera paulatina, lo que implica un aumento en el grado de degradación de los antígenos al interior de estos fagosomas (figura 1b). Es importante destacar que la mayor parte de los cambios en la MGF y el porcentaje de fagosomas activos ocurren dentro de la primera hora de maduración de los compartimentos. Los cambios degradativos tienen un máximo a los 30 min, sugiriendo que la maquinaria degradativa en los fagosomas opera poco tiempo después de que el antígeno ha sido internalizado (figura 2c). Finalmente, a tiempos de caza largos (16 hrs) se observa que la mayor parte del antígeno ha desaparecido de la superficie de las partículas (figura 1a). Esto sugiere que independientemente de las velocidades de maduración individuales, todos los compartimentos terminan degradando los elementos contenidos en su interior.

LA DEGRADACIÓN ANTIGÉNICA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS ES GRADUAL DURANTE LA MADURACIÓN DE LOS FAGOSOMAS.

Al interior de la célula la mayor parte de las proteasas involucradas en procesamiento antigénico se encuentran acumuladas en endosomas tardíos y lisosomas (Luzio, Pryor et al. 2007). Estos compartimentos son normalmente peri-nucleares y corresponden al lugar donde llegan a fusionarse las vesículas que siguen la vía degradativa. Para caracterizar de mejor manera los compartimentos antigénicos (fagosomas), se modificó el ensayo de degradación ya descrito de modo de detectar, además de la desaparición del antígeno, la adquisición de marcadores de membrana presentes en cada fagosomas (ver Materiales y Métodos y figura 3M).

Un resultado tipo de este experimento se muestra en la figura 2a. En este caso la proteína de membrana analizada corresponde al marcador lisosomal Lamp2. En la imagen se aprecia que tras el pulso con las partículas de látex el antígeno entra a un compartimento que carece de este marcador. A 30 min de caza el 50 % de los fagosomas se ha activado, y todos los compartimentos activos contienen Lamp2 en su membrana. Esto es consistente con la visión de que la función proteolítica de los fagosomas se adquiere durante su fusión con los lisosomas (Desjardins, Huber et al. 1994). Este fenómeno ocurre a tiempos cortos post-internalización del antígeno, alcanzando su máximo a los 30 min de iniciado el proceso (figura 2c). A las 2 horas cerca del 70% de los compartimentos son positivos para Lamp2, confirmando que es dentro de las primeras horas de maduración que el grueso de la maquinaria de

procesamiento antigénico es destinada a los fagosomas (figuras 1b, 1c y 2c). El mismo resultado se obtuvo utilizando Lamp1, otro marcador lisosomal, para estimar la maduración (no mostrado). Es importante destacar que existen otros marcadores para endosomas, distintos de los lisosomales, que pudieron haber complementado la técnica, pero ninguno de los ensayos pudo ser detectada por FACS (no mostrado).

Para complementar estos resultados y verificar la identidad de los compartimentos se purificaron fagosomas y se estudió su maduración por métodos de inmunodetección sobre membranas de nitrocelulosa (ver Materiales y Métodos y figura 2b). Al utilizar fagosomas purificados a diferentes tiempos para evaluar la presencia de marcadores de maduración endosomal se aprecia la adquisición de un marcador tardío (CatD) al mismo tiempo que la pérdida de uno temprano (gp91), confirmando la maduración gradual de los fagosomas en estas células y complementando el análisis de maduración del compartimento.

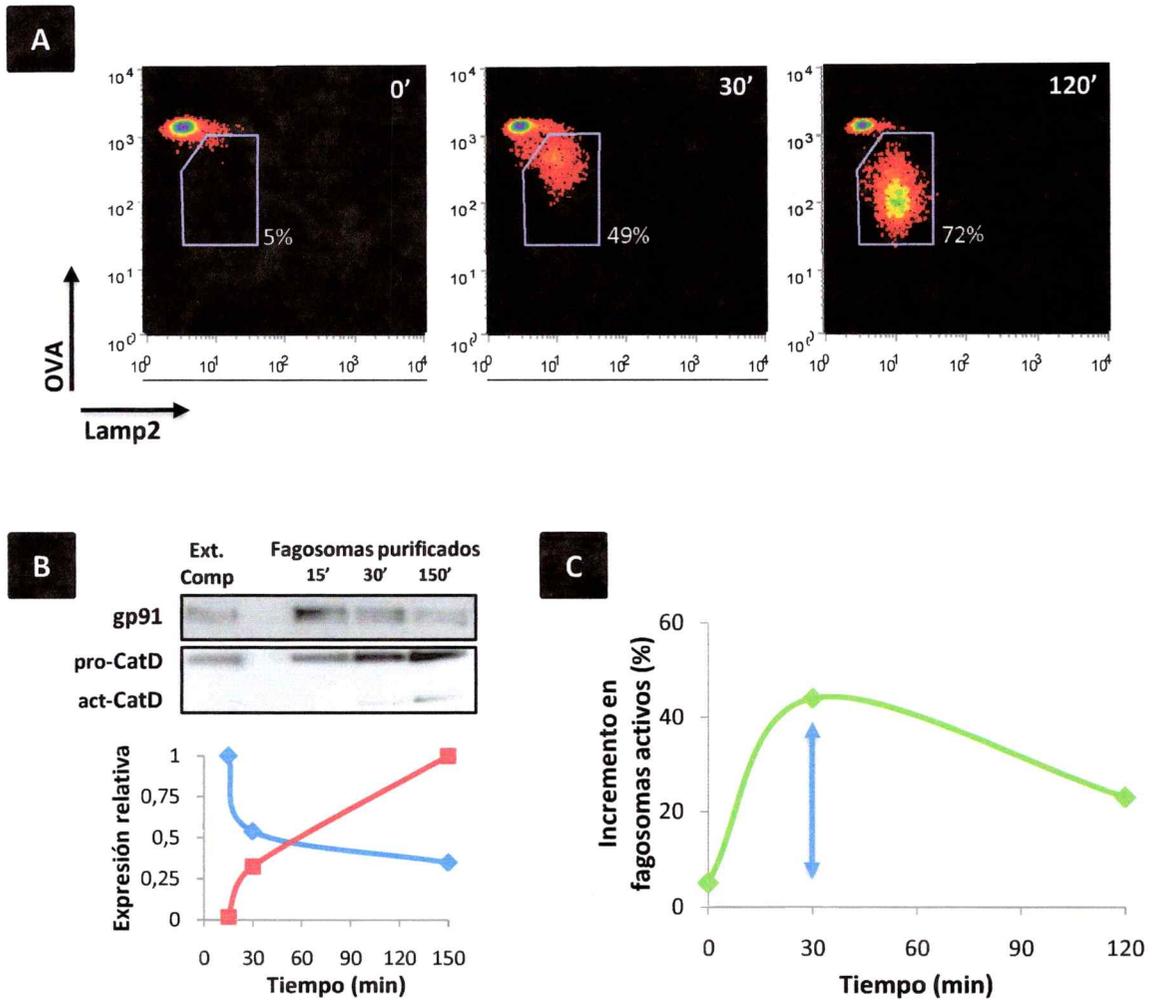


Figura 2. Degradación de antígenos durante la maduración de los fagosoma en células dendríticas.

El ensayo de degradación antigénica se complementó modificando el protocolo para seguir al mismo tiempo proteínas de membrana de los fagosomas. El panel A muestra el análisis por FACS de degradación de OVA y la presencia del marcador lisosomal Lamp2 a distintos tiempos de formado el fagosoma. En B se muestra por SDS-PAGE la adquisición de marcadores tempranos y tardíos en la membrana de fagosomas purificados a distintos tiempos. El gráfico inferior muestra la expresión relativa de los marcadores CatD activa (tardío) y gp91 (temprano) en la membrana de los compartimentos. El panel C muestra el incremento porcentual de fagosomas activos que ocurre a cada tiempo .

CATEPSINA S Y DEGRADACIÓN ANTIGÉNICA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Para que ocurra la presentación antigénica los péptidos producto de la degradación de los antígenos deben entrar en contacto con las moléculas de MHC. En el caso de las moléculas de MHC II este encuentro lo permite Ii, encargada de la destinación y retención de estas moléculas presentadoras en los endosomas. Las moléculas de MHC II que llegan a este compartimento están inmaduras y son incapaces de unir péptidos en su bolsillo antigénico. Esta capacidad la adquieren al encontrarse con CatS activa, la que procesa a Ii de manera específica facilitando la maduración de las moléculas presentadoras (Shi, Villadangos et al. 1999). En este contexto, poco o nada se sabe del papel de CatS en la degradación antigénica, o de las consecuencias que trae para el antígeno su encuentro con las moléculas de MHC II. Para tratar de abordar estas interrogantes se analizó el efecto de la ausencia de CatS en el procesamiento de antígenos en fagosomas de CDs derivadas de ratones KO para la proteasa (CatS^{-/-}) (figuras 3a y 3c).

En ausencia de la proteasa se observa un claro defecto en la degradación de OVA presente en la superficie del látex. El fenómeno se caracteriza por una mayor MGF de la población de fagosomas CatS^{-/-} activos respecto a fagosomas silvestres (180 v/s 80 a los 120 min). Dado que la ausencia de CatS no afecta la fagocitosis de las partículas de látex (figura 3b), esto sugiere que el defecto en el procesamiento observado está asociado a eventos propios de la maduración y no de la formación de los fagosomas. Estas diferencias tampoco parecen estar ligadas a defectos en el paso de fagosomas

inactivos a fagosomas activos ya que a pesar de haber menores niveles de Lamp2 en ausencia de CatS, la tasa de activación es la misma para ambos tipos celulares (figura 3a). Cabe mencionar que este fenotipo no es exclusivo de la degradación de OVA, ya que el mismo defecto en el procesamiento se observa al estudiar otros antígenos como BSA, HRP y HEL (Anexo 1). Esto muestra que la ausencia de CatS afecta de manera general la capacidad degradativa antigénica en los fagosomas de las CDs.

Analizando más en detalle los resultados se concluye que el procesamiento de Ii y la degradación de antígenos están coordinados. En condiciones en que CatS está ausente, las moléculas de MHC II permanecen bloqueadas con Ii al mismo tiempo que los antígenos son degradados de manera menos eficiente. Esto podría significar que la convergencia de antígenos y moléculas de MHC II restringe la capacidad degradativa del fagosoma, tal vez para favorecer la generación de péptidos (degradación de antígenos) sólo en aquellos compartimentos donde Ii está siendo proteolizada, los que corresponden a aquellos en donde CatS se encuentra activa.

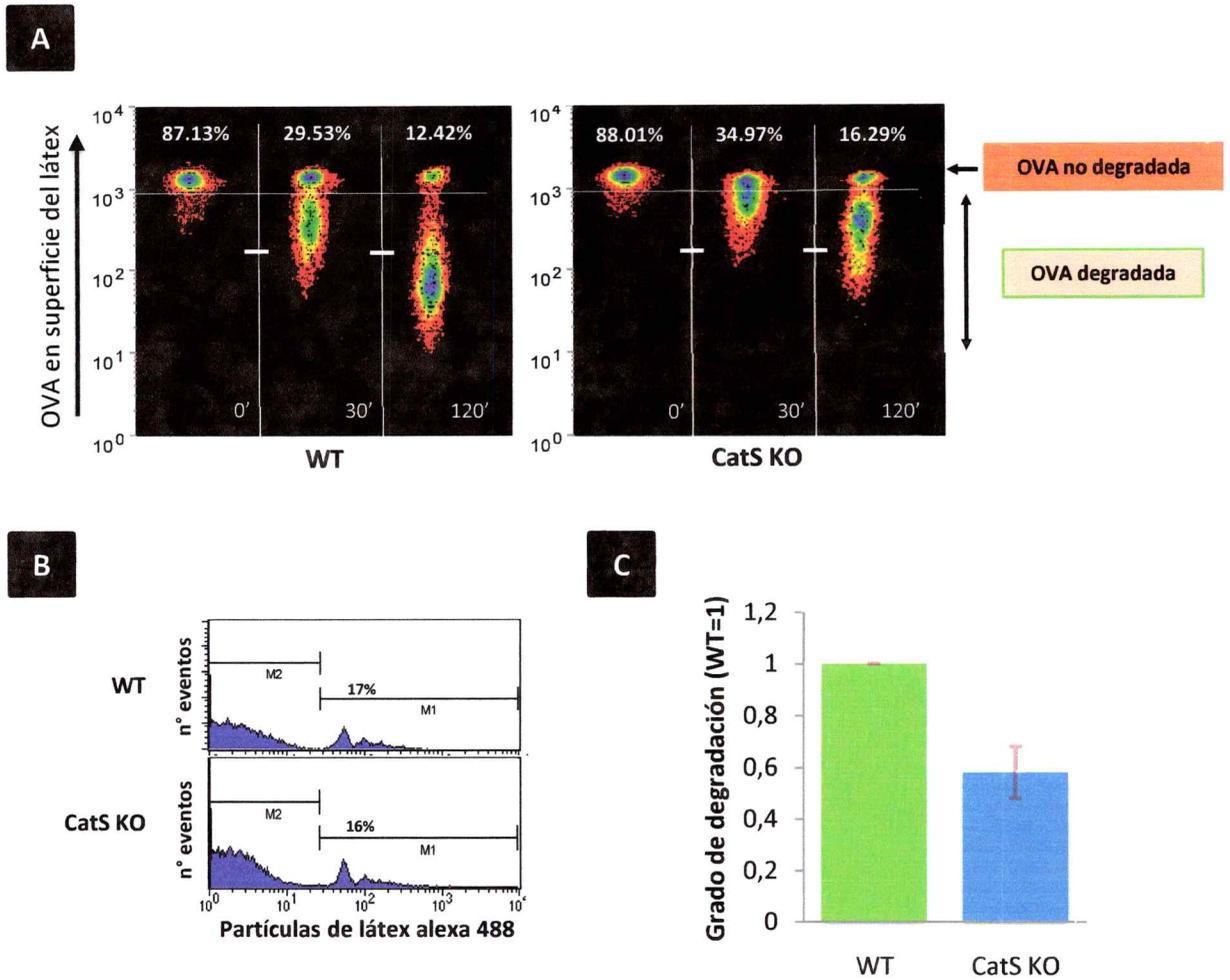


Figura 3. Efecto de la ausencia de Catepsina S en la degradación de antígenos fagosomales.

El ensayo de degradación antigénica ya descrito se utilizó para comparar la capacidad degradativa de los fagosomas de CDs silvestres o deficientes en CatS (CatS^{-/-}). El panel A muestra la presencia de OVA en los fagosomas de ambos tipos de CDs a distintos tiempos post internalización antigénica. En B se muestra la capacidad fagocítica de los distintos tipos de CDs. El panel C muestra la cuantificación de lo graficado en A a los 120 min. El resultado es representativo de al menos 5 experimentos independientes.

INHIBICIÓN DE LA DEGRADACIÓN ES ESPECÍFICA DE LOS COMPARTIMENTOS QUE ACUMULAN I κ B.

Una de las interrogantes que surgen de estos experimentos es la naturaleza de los compartimentos afectados por la ausencia de CatS. Una de las posibilidades, la más evidente, es que sin la proteasa, en los endosomas de las CDs se acumularía I κ B y moléculas de MHC II, lo que impediría la maduración de los fagosomas. Para evaluar esta posibilidad se midió la degradación antigénica en paralelo a la presencia de I κ B en la membrana de estos compartimentos. Los resultados muestran que los fagosomas con degradación lenta son aquellos que acumulan I κ B en su membrana, y que no existen compartimentos ricos en I κ B que presenten degradación normal de antígeno (figuras 4a y 4b). Esto sugiere que la ausencia de CatS afecta principalmente a los compartimentos en donde hay moléculas de MHC II, ya que la ausencia de corte de I κ B lleva a la acumulación *in situ* de estas moléculas presentadoras (figura 4c).

Los compartimentos que acumulan I κ B corresponden a aquellos que tienen MHC II en su membrana. La figura 4c muestra la presencia de estas moléculas tanto en los fagosomas de células silvestres como CatS^{-/-}. Como era de esperar las moléculas de MHC II se acumulan en los fagosomas de las células deficientes en CatS. De manera inesperada los niveles de estas moléculas son mínimos o indetectables en fagosomas silvestres, independiente del tiempo o de la naturaleza inflamatoria del antígeno (no mostrado). Esto sugiere que en CDs inmaduras la cantidad de MHC II al estado basal es mínima o que las moléculas presentadoras pasan solo transientemente por la

membrana de los fagosomas. Esto sería posible si los compartimentos antigénicos tuvieran CatS siempre activa, de modo que las moléculas de MHC II fueran liberadas inmediatamente al contacto con el patógeno.

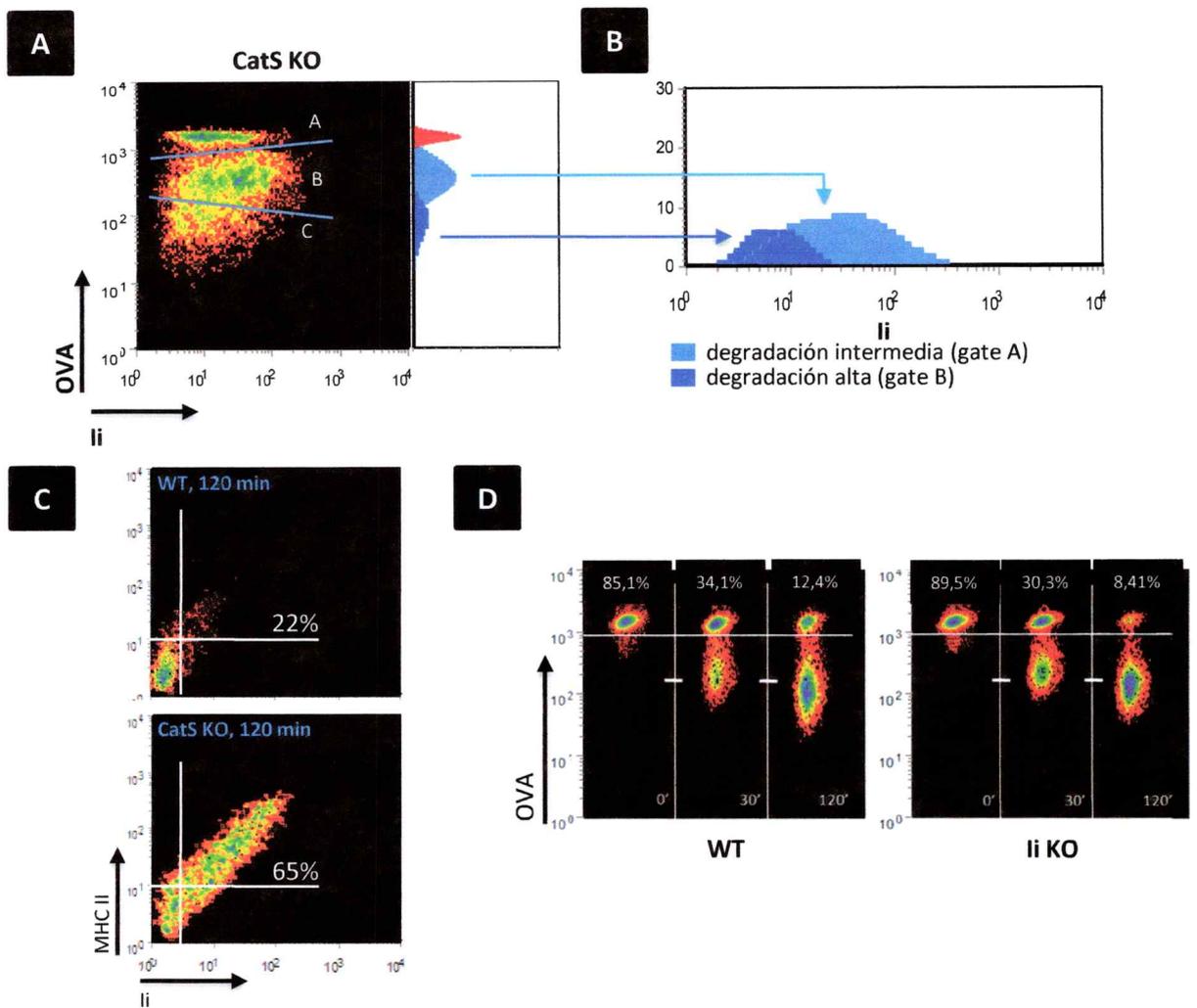


Figura 4. Fagosomas que acumulan li tienen una degradación antigénica disminuida en ausencia de Catepsina S.

Los fagosomas deficientes en CatS fueron caracterizados para tratar de entender la causa del defecto degradativo observado en ausencia de la proteasa. En A se muestra la degradación de OVA al mismo tiempo que la presencia de li en la membrana de los compartimentos. El gráfico lateral es un histograma de la distribución de la cantidad de OVA en los fagosomas. En B se muestra la expresión de li en las poblaciones con degradación alta o intermedia de OVA en ausencia de CatS. En C se muestra la expresión de MHC II y li en los fagosomas de CDs CatS $-/-$. En D se muestra el efecto de la ausencia de li en la degradación antigénica en los fagosomas.

EN AUSENCIA DE CATEPSINA S LOS COMPARTIMENTOS QUE ACUMULAN I α SE FUSIONAN MENOS CON LOS LISOSOMAS.

Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que la capacidad degradativa de los fagosomas de CDs se adquiere durante la maduración de los compartimentos, y que este paso de un fagosoma no degradativo a uno activo ocurre a pocos minutos de ocurrida la internalización de los antígenos (figura 2c). En ausencia de CatS la capacidad degradativa de las CDs esta disminuida, hecho que podría deberse a un defecto en la maduración de los fagosomas. Para verificar esta hipótesis se analizó el reclutamiento de Lamp2 a los compartimentos CatS^{-/-}. En los resultados mostrados en la figura 5a se observa un marcado defecto en la adquisición del marcador lisosomal en los fagosomas de estas células. A las dos horas se observa la presencia predominante de una población con degradación antigénica incompleta, la que corresponde a un compartimento con niveles de Lamp2 intermedios. En CDs silvestres la adquisición de Lamp2 ocurre como un todo o nada, por lo que esta población intermedia está ausente (figuras 2a, 4a y 4b). Dado que las partículas antigénicas son de forma y tamaño homogéneo, la cantidad de Lamp2 en los fagosomas es proporcional al grado en que ocurre la fusión entre estos compartimentos y los lisosomas. En las células mutantes la degradación del antígeno es proporcional al grado de fusión con el lisosoma (figura 4a). Esto sugiere nuevamente que es esta fusión la que entrega al compartimento los factores necesarios para permitir la degradación antigénica.

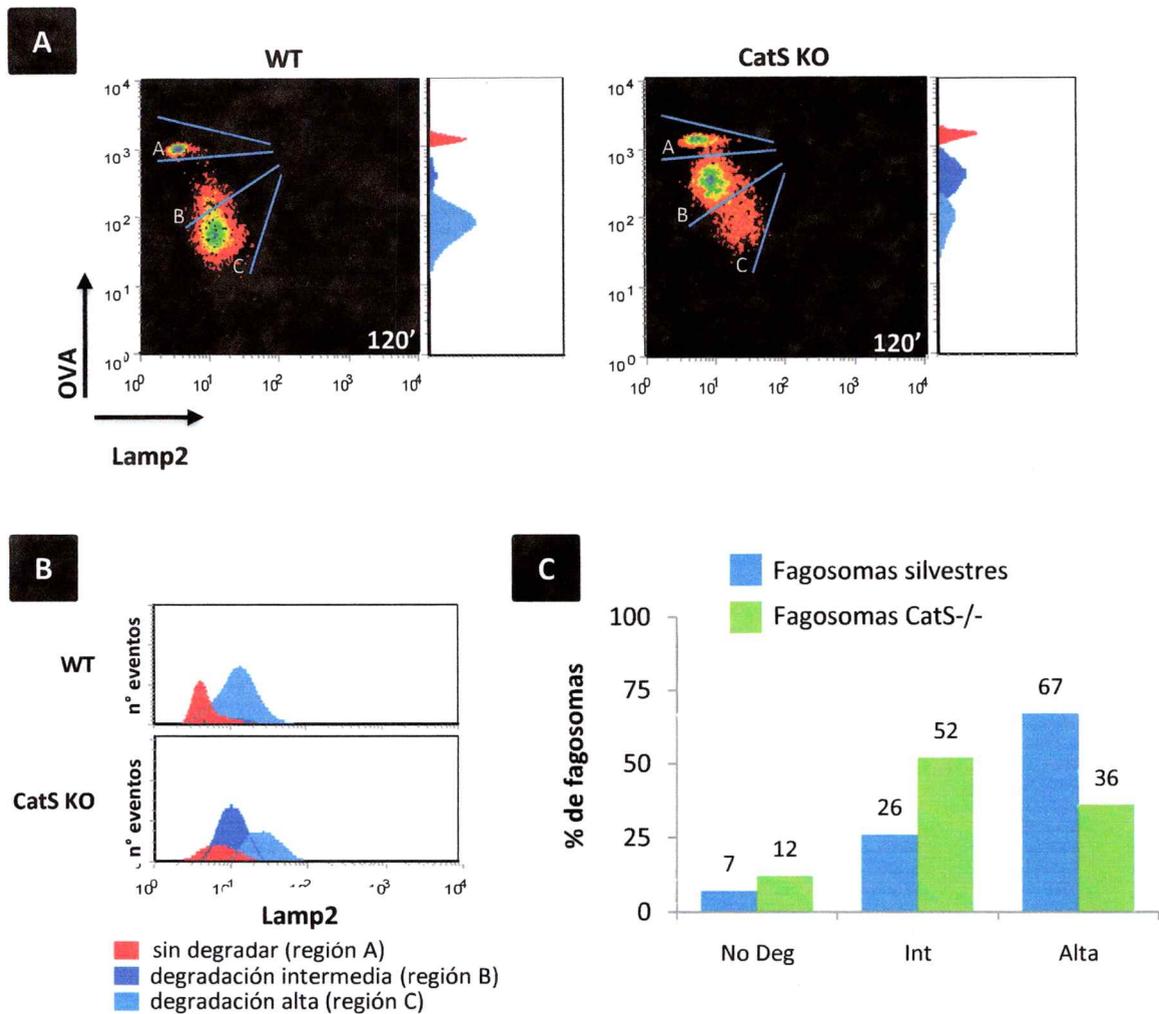


Figura 5. Defecto de la fusión entre los fagosomas y los lisosomas en ausencia de Cathepsina S.

Para evaluar si la ausencia de CatS se asocia a defectos en la adquisición de marcadores lisosomales en los fagosomas se analizó la degradación antigénica en paralelo a la adquisición del marcador Lamp2. En A se muestran ambos eventos a los 120 min de maduración de los fagosomas. Las muestras se clasificaron en función del grado de degradación en 3 regiones (A, B y C) que se muestran en rojo, azul y celeste en los gráficos laterales. En B se muestra la expresión de Lamp2 en las regiones A, B y C ya mencionadas. En C se muestra el porcentaje de fagosomas correspondiente a cada región en ambos tipos de CDs.

El defecto en la adquisición de Lamp2 no parece estar asociado a la formación de los fagosomas, dado que en ausencia de CatS no hay defecto de fagocitosis (figura 3b). Además, a pesar de las diferencias en el grado de degradación, la proporción de compartimentos con capacidad degradativa es equivalente en ambos tipos celulares (figura 3a y 5c). Esto sugiere que el problema de estos fagosomas no está tampoco en el paso de compartimentos inactivos a activos, sino en su capacidad de fusionar con los lisosomas. Este fenómeno no afecta a todos los compartimentos, dado que en ausencia de CatS se detectan fagosomas con niveles de degradación normales. La proporción de compartimentos que a las 2 hrs presentan defectos es cercana al 40%, correspondiendo a la población más abundante en estas CDs (figura 4c).

DISMINUCIÓN GENERAL EN ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN FAGOSOMAS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DEFICIENTES EN CATEPSINA S.

La degradación antigénica es un fenómeno asociado a la actividad de las proteasas endosomales que entran en contacto con el antígeno. La mayor parte de estas proteasas reside en compartimentos tardíos o lisosomales, donde el bajo pH permite la activación de estas proteínas. En macrófagos, prototipo de célula fagocítica, los fagosomas que se fusionan con los lisosomas adquieren rápidamente un bajo pH, por lo que son altamente degradativos. Esto no ocurre en CDs, en donde a pesar de haber fusión con los lisosomas, el pH de los fagosomas se mantiene neutro y con un menor

nivel de proteasas activas que los detectados en macrófagos (Lennon-Dumenil, Bakker et al. 2002; Savina, Jancic et al. 2006).

Para evaluar si el defecto en la degradación de los antígenos observado en ausencia de CatS se asocia a una baja en la cantidad de proteasas activas en los fagosomas se analizaron las actividades proteolíticas presentes en estos compartimentos (ver Materiales y Métodos y (Lennon-Dumenil, Bakker et al. 2002). Al realizar el ensayo con las células silvestres se aprecia ausencia o baja actividad de proteasas a tiempos cortos de fagocitosis (10 min) (figura 6a). A medida que maduran los compartimentos las actividades proteolíticas aumentan de manera gradual (15-60 min), con una cinética similar a la de adquisición de Lamp2 (figura 6c). El mismo ensayo con células CatS deficientes entrega niveles menores de proteasas activas en los fagosomas, a pesar de que el porcentaje de fagosomas activos es similar en ambos casos (figuras 3a y 5c). Esto sugiere que la degradación de los antígenos al interior de estos compartimentos depende de la presencia de proteasas activas en los fagosomas, que la fusión de compartimentos Lamp2 con los fagosomas aportaría estas proteasas, pero no descarta que existan otros factores involucrados en el control de dichas actividades. Adicionalmente esta disminución de proteasas parece ser específica de los fagosomas, dado que los niveles de actividad totales en ambos tipos celulares son equivalentes (figura 6a).

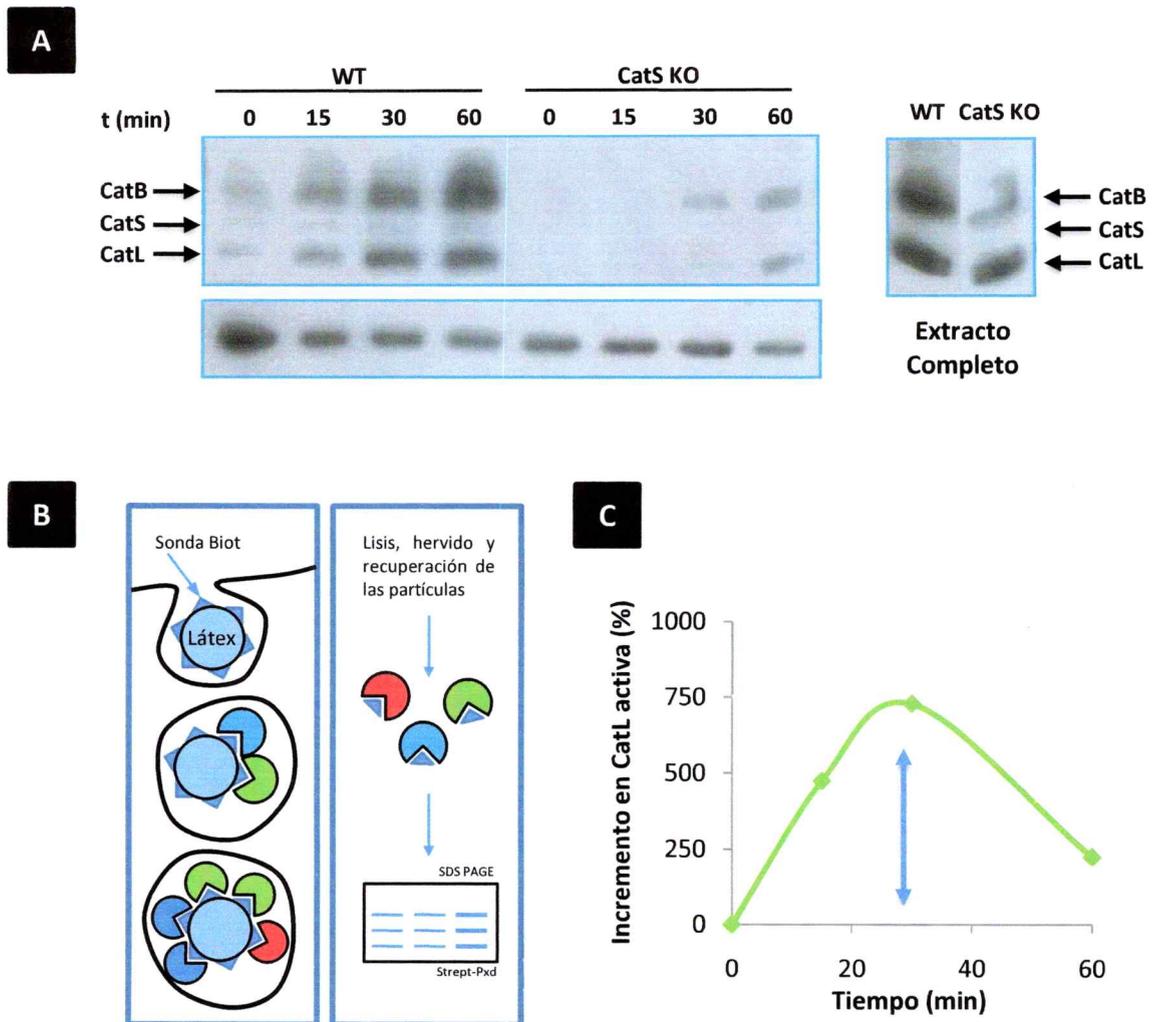


Figura 6. Defecto en la cantidad de proteasas activas en los fagosomas de CDs deficientes en Catepsina S.

La presencia de proteasas activas fue evaluada en fagosomas de CDs silvestres o deficientes en CatS. En el panel A, a la izquierda, se muestra el reclutamiento de actividades proteolíticas a los fagosomas por SDS-PAGE. A la derecha se muestra la comparación de los niveles de proteasas activas presentes en extractos totales de ambos tipos celulares. En B un esquema didáctico de la técnica utilizada (ver Materiales y Métodos). En C se muestra la cuantificación del incremento en la actividad de CatL al interior de los fagosomas.

En la literatura no existen reportes que muestren un papel directo de la CatS en la activación de otras proteasas. Además, su expresión es específica de células presentadoras de antígeno (Wang, Baron et al. 2006). Esto sugiere que la disminución de proteasas activas no se debe a un efecto directo causado por la ausencia de la CatS. Además, dados su bajo nivel de actividad en comparación a otras proteasas fagosomales, es improbable que la sola acción de CatS sobre el antígeno de cuenta de un defecto degradativo tan marcado (figura 6a). Esto indica nuevamente que la ausencia de CatS afecta indirectamente las propiedades del compartimento antigénico, generando un ambiente poco degradativo que favorece la persistencia del antígeno en los fagosomas.

AUMENTO DE pH FAGOSOMAL DA CUENTA DEL DEFECTO EN LA DEGRADACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DEFICIENTES EN CATEPSINA S.

Como ya se menciona, el pH es una de las propiedades que controlan la activación de las proteasas endosomales. En CDs deficientes en CatS la actividad de proteasas y por tanto la capacidad degradativa se encuentran disminuidas al interior de los fagosomas. Esto sugiere que el control del pH del compartimento en células carentes de CatS también podría estar alterado. Para estimar el pH de estos fagosomas se tomo ventaja del FITC, colorante cuya fluorescencia es inversamente proporcional a la acidez del ambiente (Geisow 1984). Así, el FITC acoplado covalentemente a partículas de látex sirve como sensor para la medición de los cambios de acidez fagosomal. La adición a las partículas de un segundo colorante con fluorescencia emitida en una longitud de onda

distinta e insensible a la acidez permite establecer un estándar interno para el experimento (ver Materiales y Métodos y figura 7c). El pH en fagosomas de células silvestres tiene un valor cercano a 7.4, el que se mantiene invariable durante las primeras horas de maduración (figura 7a). Este valor concuerda con datos recientes de la literatura en los que se sugiere una baja actividad proteolítica en fagosomas de CDs producto del pH neutro de sus compartimentos (Savina, Jancic et al. 2006). Al estimar la acidez de los fagosomas de las células deficientes en CatS se aprecia un pH cercano a 8, valor que también se sostiene durante las primeras horas de maduración de los compartimentos. Esto indica que en ausencia de CatS el control del pH fagosomal está alterado, aumentado al menos 0.5 unidades de pH respecto del control. Este fenómeno podría ser responsable de la baja generalizada en la actividad de proteasas y el consecuente defecto en la degradación de los antígenos. Como además este fenómeno ocurre antes de los 30 min, esto podría afectar las propiedades de los fagosomas y la fusión con lisosomas. De acuerdo a esta hipótesis, la realización del ensayo de degradación antigénica utilizando un tampón pH 7.4 restaura la capacidad degradativa de las CDs carentes de CatS (figura 7c).

En conjunto esto sugiere la existencia de un mecanismo de control de procesamiento antigénico modulado por la actividad de la CatS. Este sistema dependería de las perturbaciones que la ausencia de esta proteasa provoca en los fagosomas de las CDs.

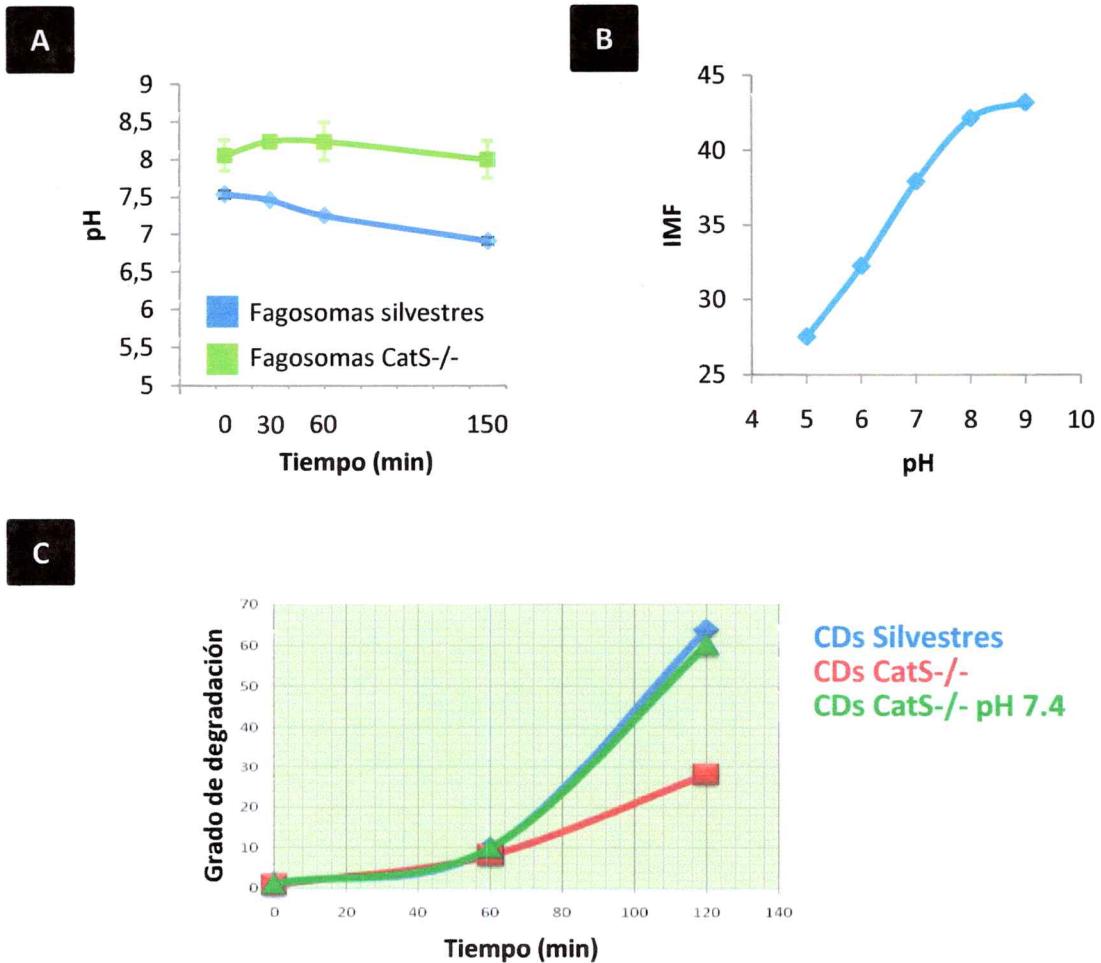


Figura 7. El pH de los fagosomas está aumentado en ausencia de Catepsina S.

El pH fagosomal se evaluó siguiendo el protocolo descrito (ver Materiales y Métodos). En A se muestra el pH en fagosomas de CDs silvestres o deficientes en CatS a distintos tiempos de maduración de las vacuolas. En B se muestra la curva de calibración utilizada para estimar los valores de pH mostrados en A. En C se evalúa el efecto de la neutralización del pH fagosomal en la degradación antigénica en las CDs CatS-/-.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS LIGANDOS DE Ii.

La alteración física más evidente producida por la ausencia de CatS es la acumulación de complejos Ii/MHC II en los endosomas (Driessen, Bryant et al. 1999). Respecto de la maduración de compartimentos intracelulares es interesante destacar que la sobreexpresión de Ii ha sido sugerida como responsable de la disminución en la velocidad de maduración de ciertos compartimentos e incluso su nivel de expresión es usado como herramienta para medir maduración de endosomas (Nordeng, Gregers et al. 2002). En nuestro caso el defecto en la maduración de los fagosomas se observa claramente asociado a los compartimentos que acumulan Ii (figura 4). Esto sugiere que el retardo en la degradación observado en ausencia de CatS podría ser causa indirecta de la acumulación de Ii, la que al controlar la maduración de los endosomas mantendría los compartimentos antigénicos por más tiempo en un estado parcialmente inmaduro y poco degradativo.

Siguiendo esta hipótesis y confiando en que los efectos causados por la ausencia de CatS deben ser transducidos hacia el exterior del fagosoma por Ii, la continuación de nuestro trabajo se centro en identificar ligandos de Ii que pudieran controlar la maduración fagosomal. La identificación de proteínas asociadas a Ii es algo que ya se ha intentado en otras oportunidades (Lagaudriere-Gesbert, Newmyer et al. 2002). Ii contiene las señales que permiten la destinación de moléculas de MHC II a los endosomas, pero el motor molecular asociado a dicho transporte es aún desconocido.

En el sistema de células dendríticas carentes de CatS existe una acumulación natural de I κ B al interior de estas CPAs, lo que sin duda constituye una herramienta que podría favorecer la identificación de sus putativos ligandos naturales.

Se diseñó en primera aproximación experimentos en los que se precipitaron, a partir de un extracto celular completo, las proteínas asociadas a un péptido sintético equivalente a la región citosólica de I κ B. El acoplamiento del péptido a una matriz sólida (partículas magnéticas) permite su separación del resto de las proteínas (ver Materiales y Métodos y figura 8a). El precipitado se realiza a partir de extractos completos de células tratadas o no con LPS, de modo de observar los posibles ligandos de I κ B tanto en estado basal como activado. Interesantemente, tras separar y teñir las proteínas coprecipitadas en geles de acrilamida con azul de coomasie coloidal, el ensayo entregó una única banda de alto peso molecular sólo detectable a partir de extractos de CDs previamente tratadas con LPS (no mostrado). El mismo resultado se obtuvo usando extractos de linfocitos B, otro tipo de CPA, nuevamente sólo a partir de extractos de LB activados (G. F., resultados del laboratorio). La banda obtenida fue aislada, procesada e identificada por espectroscopia de masas, dando como resultado a miosina II (Myo II).

Una segunda técnica utilizada para encontrar ligandos de I κ B fue la inmunoprecipitación de la proteína endógena. Esta se realizó a partir de extractos de células tratadas o no con LPS, encontrándose un patrón de múltiples bandas en las que nuevamente aquella de alto peso molecular se vio enriquecida en las células activadas (figura 8b). La identificación de cada una de las proteínas se realizó por espectroscopia de masa,

confirmándose nuevamente la presencia de Myo II asociada a la li. Como control de especificidad del ensayo se sustrajeron de la lista aquellas proteínas que precipitaron a partir de extractos de CDs deficientes en li, las que fueron consideradas como bandas inespecíficas. La lista completa de las proteínas obtenidas en esta inmunoprecipitación se muestra en la Tabla 1.

De las proteínas obtenidas nuestro interés se centró en la Myo II. Esta es una de las proteínas con roles atribuidos a migración, adhesión y fagocitosis, tres funciones consideradas como esenciales para la correcta presentación antigénica por parte de las CDs. De manera importante Myo II se asocia a li sólo luego de la activación, lo que sugiere que podría ser una de las proteínas clave en la coordinación de los procesos celulares gatillados por el reconocimiento antigénico (figura 8d).

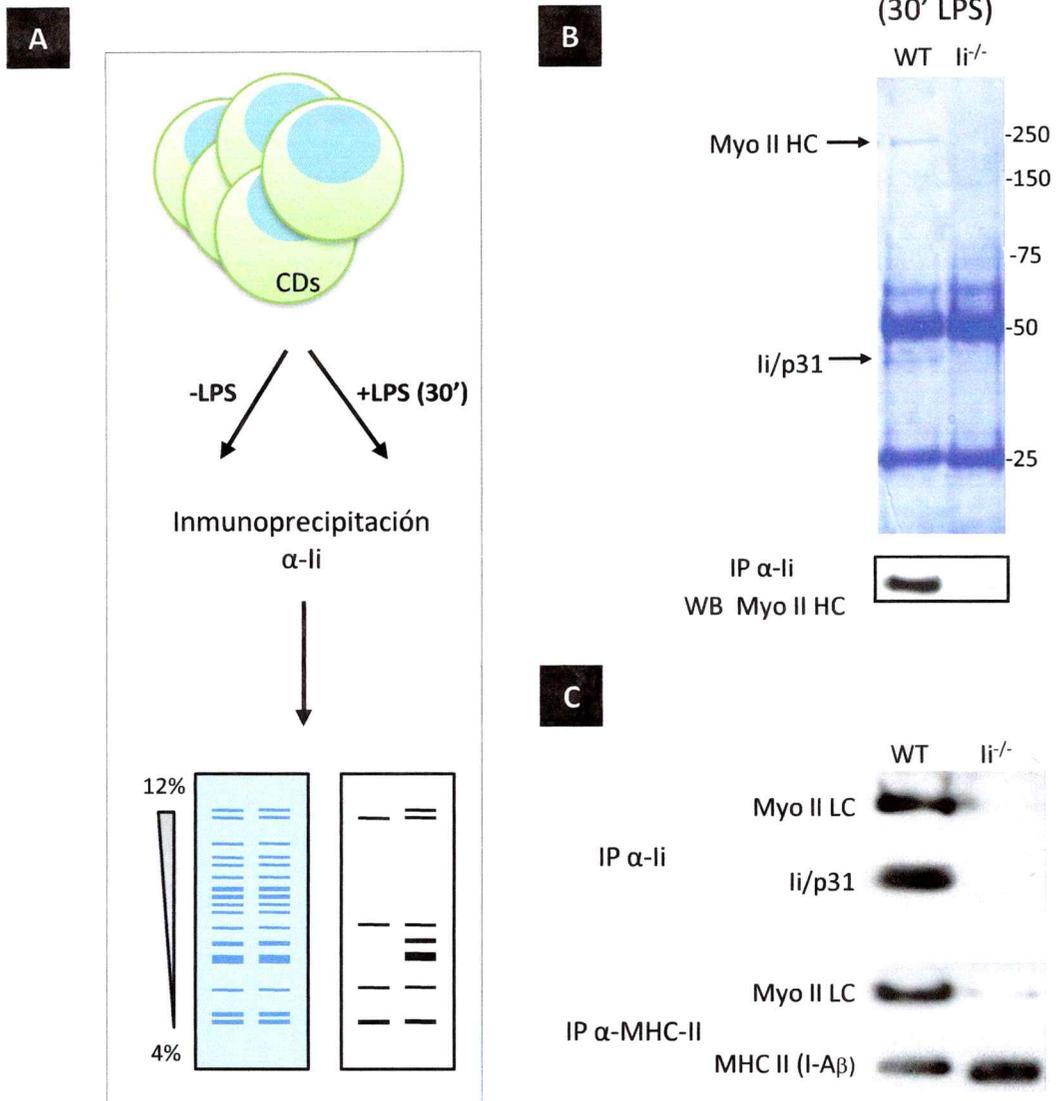


Figura 8. Inmunoprecipitación de Ii y proteínas asociadas.

Con el fin de identificar ligandos de Ii se inmunoprecipitó la proteína a partir de 1 mg de extracto de CDs tratadas por 30 min con 1 μ g/ml de LPS. La figura A muestra un esquema didáctico del protocolo utilizado. El panel B muestra un experimento representativo de la inmunoprecipitación de Ii teñida con azul de coomassie coloidal. Como control se muestra la precipitación a partir de CDs Ii KO. En C se muestra la inmunodetección de las proteínas coprecipitadas con Ii o MHC II mediante inmunoblot.

Tabla 1. Análisis proteómico de proteínas coprecipitadas con Ii en CDs activadas 30 min. con LPS.

Identificación	Descripción	Peso Molecular (Da)	Péptidos	Cobertura (%)
gi 20137006	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle (Myo II)	226357,2	41	23,4
gi 33638127	nonmuscle myosin II-C heavy chain	228585,82	5	2,5
gi 38566236	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1	176432,7	2	1,2
gi 29835160	Murinoglobulin 1	165297,7	1	0,9
gi 94370308	PREDICTED: similar to amylo-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	174287,33	1	0,7
gi 29789020	Ia-associated invariant chain	24454,43	1	4,7
gi 27502097	myosin-1F	125213,64	9	8,1
gi 68299824	myosin IE	126817,99	6	5,5
gi 71153505	ATP-dependent RNA helicase A (Nuclear DNA helicase II) (NDH II) (DEAH box protein 9) (mHEL-5)	149474,94	5	4
gi 14714615	Tumor rejection antigen gp96	92489,83	1	1,1
gi 28916693	gelsolin	85941,61	1	1,2
gi 34784211	Hspa9a protein	73461,28	5	9
gi 20330802	transferrin	76723,83	2	3,2
gi 2598562	BiP	72477,17	2	4
gi 6753620	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3,	73101,43	1	1,7
gi 93102411	galactosylceramidase	77256,52	1	1,3
gi 34784211	Hspa9a protein	73461,28	8	15
gi 2598562	BiP	72477,17	4	6,4
gi 6753620	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked	73101,43	2	3,5
gi 1183929	haemoglobin epsilon chain	16136,62	1	6,8
gi 20330802	transferrin Mus musculus	76723,83	1	1,7
gi 34810551	Chain G, Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-(8-18c5) Fab-Complex	26657,14	1	5,6
gi 38511912	P lysozyme structural	16794,21	1	8,1
gi 950002	smooth muscle gamma-actin	42879,84	1	2,5
gi 56207072	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)- associated factor	58600,75	1	2,5
gi 94398401	PREDICTED: similar to RNA-binding protein EWS	74324,35	1	2
gi 23956576	CaRG-binding factor A	13080,93	1	11,1
gi 29789020	Ia-associated invariant chain	24454,43	2	8,4
gi 23956576	CaRG-binding factor A	13080,93	1	11,1
gi 29789020	Ia-associated invariant chain	24454,43	4	19,1
gi 83649737	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta isoform a	31345,48	1	3,6
gi 3329498	heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	35993	3	9,1
gi 29789020	Ia-associated invariant chain	24454,43	2	8,4
gi 16307455	Arpc1b protein (ARP 2/3)	41498,39	1	3,5
gi 51527	I-A alpha NON protein (254 AA)	28012,87	1	4,7
gi 29789020	Ia-associated invariant chain	24454,43	4	19,1
gi 11066226	cathepsin Z	34175,49	2	7,2
gi 34328365	histone 1, H1d	22145,62	1	5,4
gi 7304889	annexin A4	35989,88	1	3,4
gi 83649737	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta isoform a	31345,48	1	3,6
gi 94408789	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S2	32975,24	1	3,6
gi 17986258	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle isoform 1	16930,06	2	15,9
gi 63101519	Ribosomal protein L35	14552,56	1	8,1
gi 6677775	ribosomal protein L22	14758,94	1	10,2
gi 7305447	ribosomal protein S26	12992,39	1	7,8
gi 17986258	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle isoform	116930,06	4	35,1
gi 6677775	ribosomal protein L22	14758,94	1	10,2
gi 34328185	prosaposin	61394,09	2	3,6
gi 26986555	myosin light chain 1 slow a	22748,94	1	6,3
gi 29789020	Ia-associated invariant chain	24454,43	1	6,5

* Proteins in italics indicate a bad confidence.

MYO II, FAGOCITOSIS Y MADURACIÓN DE FAGOSOMAS.

Myo II es un motor molecular estático que participa en la regulación de la rigidez y contractilidad de la red intracelular de filamentos de actina (Mizuno, Tardin et al. 2007). Esta rigidez regula aquellos procesos celulares que requieren modificaciones de flexibilidad celular, incluyendo por ejemplo migración y fagocitosis (Krendel and Mooseker 2005). En el caso de la fagocitosis, una relajación de la red de actina permite la deformación de la membrana y la internalización de elementos como bacterias o células apoptóticas. En macrófagos, prototipo de célula fagocítica, la inhibición de la actividad ATPásica de la Myo II reduce en un 60% los niveles de fagocitosis (figura 9b y (Olazabal, Caron et al. 2002). Para confirmar si este fenómeno se repite en CDs se uso blebistatina, droga que inhibe específicamente la actividad de Myo II (Straight, Cheung et al. 2003). El resultado se muestra en la figura 9a, donde no se observa que la droga inhiba la fagocitosis en las CDs, pero si afecta la internalización de partículas de látex en macrófagos (figura 9b). Además, en células deficientes en CatS, donde existe una asociación constitutiva entre I κ B y Myo II, no se observan diferencias en la fagocitosis de las partículas de látex (figura 4b). Esto sugiere que a diferencia de los macrófagos, la actividad de Myo II no controla la fagocitosis en CDs. Esto indica además que los mecanismos moleculares involucrados en la internalización de antígenos en CDs y macrófagos son distintos, lo que podría explicar de manera mecánica la dispar capacidad degradativa de una y otra célula.

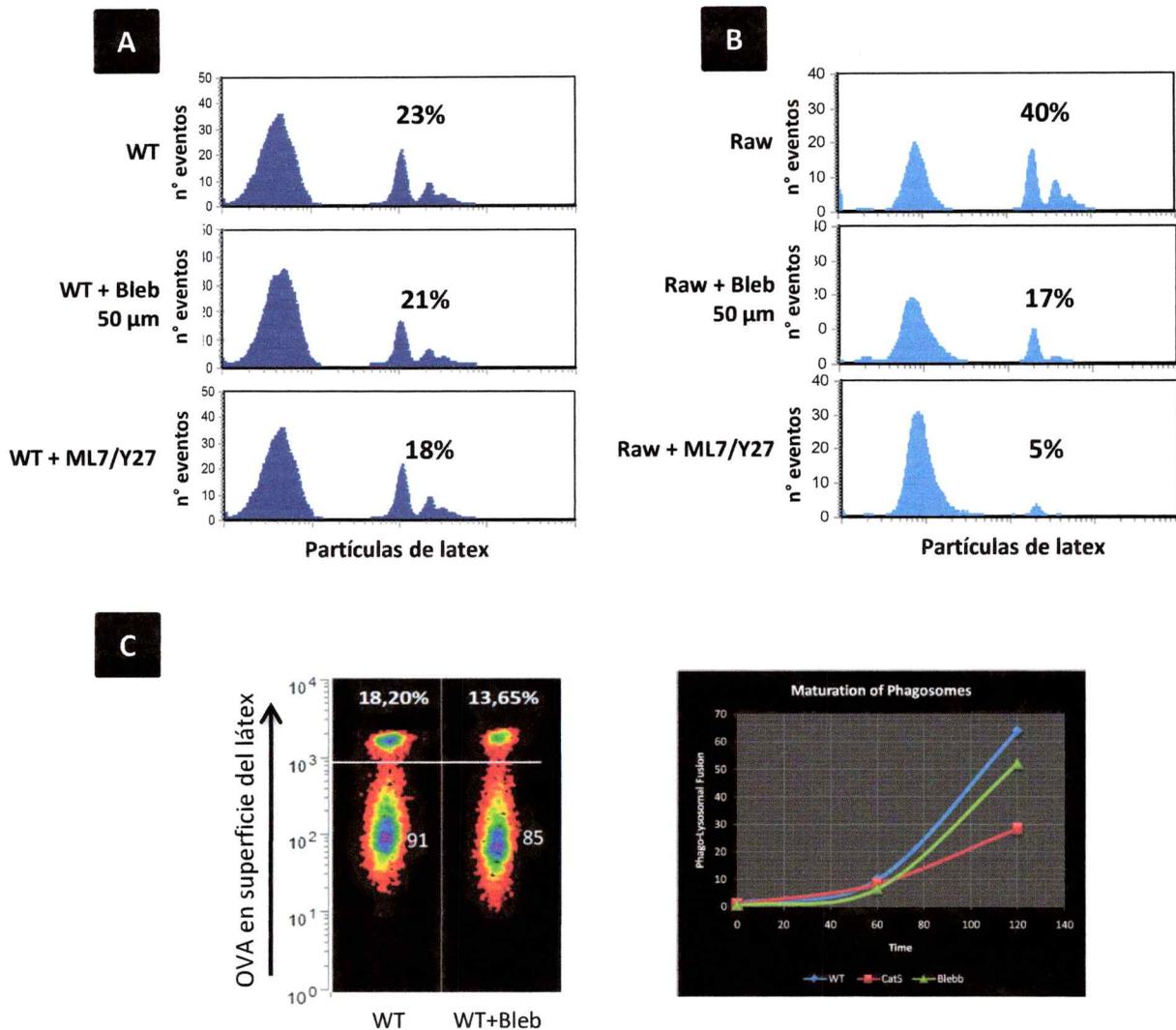


Figura 9. Papel de Myo II en la fagocitosis y procesamiento antigénico.

Para evaluar el papel de Myo II en el procesamiento antigénico se utilizó blebistatina (bleb), un inhibidor específico de la actividad de ésta proteína motora. En A se muestra el efecto de bleb en la fagocitosis de partículas de látex por CDs. Adicionalmente se muestra el efecto de ML7/Y27, una mezcla de inhibidores que de manera general regulan el ciclo fosforilativo de Myo II. En B se muestra el efecto de bleb en una línea celular de macrófagos, en donde está descrita la participación de Myo II en la fagocitosis. En C se muestra el efecto de la bleb en la degradación antigénica (izquierda). A la derecha un gráfico de la adquisición de Lamp2 en los fagosomas en las condiciones detalladas.

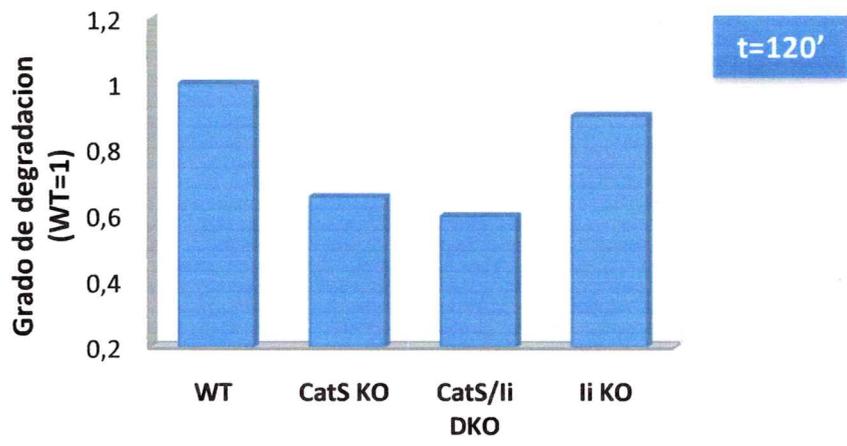
La etapa siguiente del análisis consistió en evaluar el papel de Myo II en el procesamiento antigénico y la maduración fagosomal. Los resultados muestran que la inhibición de la actividad de Myo II no se tradujo en alteraciones en ninguna de estas capacidades (figura 9c), sugiriendo que Myo II no es la proteína efectora responsable de las alteraciones detectadas en ausencia de CatS. En efecto, la utilización de mezclas de inhibidores más inespecíficos que alteran el ciclo de fosforilación de Myo II (ML7+Y27) tampoco afecta la fagocitosis ni la maduración de los fagosomas de las CDs (figura 9a y datos no mostrados). Esto sugiere fuertemente que en ausencia de CatS el control de la maduración de los fagosomas se asociaría a otra de las moléculas ligadas a I α , o que este retardo es independiente de esta proteína.

LA MADURACIÓN DE FAGOSOMAS ES DEPENDIENTE DE CATEPSINA S PERO INDEPENDIENTE DE LA CADENA INVARIANTE.

Para dilucidar el efecto real de I α en la dinámica fagosomal se evaluó la degradación antigénica en CDs doble deficientes para CatS y I α . El resultado que se muestra en la figura 10a señala que el defecto degradativo observado en ausencia de CatS persiste en los fagosomas de las células doble deficientes. Este experimento, dada la escasez de animales doble KO, fue realizado sólo en una oportunidad. Para complementar este trabajo se realizó el mismo ensayo en ratones I α deficientes en presencia o ausencia de LHVS, inhibidor específico de CatS. El resultado de estos experimentos es similar a lo observado en las CDs doble KO, donde LHVS afecta la degradación antigénica incluso en

ausencia de li (figura 10b). Además, células carentes de li muestran niveles de degradación comparables a los de células silvestres, sugiriendo que al menos en CDs inmaduras li no participa directamente en la maduración de los fagosomas (figura 4d). En conjunto los resultados sugieren que la ausencia de CatS afecta la maduración de los fagosomas, lo que se traduce en un defecto de la degradación antigénica. El control de la maduración está asociado a las vesículas que acumulan li, que son aquellas en las que efectivamente la actividad de CatS no ha sido compensada por la presencia de otras proteasas. Sin embargo, la maduración de los fagosomas no depende de li (ni de Myo II), lo que sugiere que CatS estaría involucrada en el corte o procesamiento de otras moléculas involucradas en el control de la maduración fagosomal.

A



B

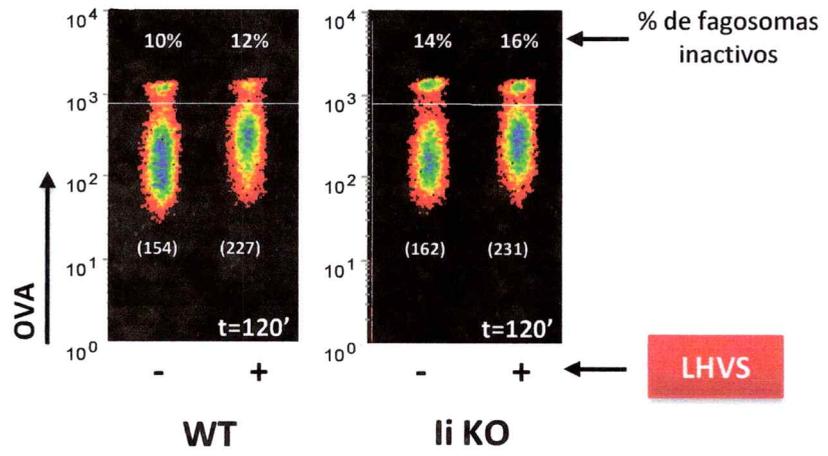


Figura 10. El defecto en la degradación antigénica detectado en ausencia de Catepsina S es independiente de li.

Para evaluar la influencia de li sobre la degradación antigénica en ausencia de CatS se analizó el grado de degradación de los antígenos fagosomales de CDs silvestres, deficientes en CatS, li, o ambas. El panel A muestra el grado de degradación a 120 min de maduración de los fagosomas de los distintos tipos de CDs. En B, como método alternativo, se analizó la capacidad degradativa de CDs provenientes de ratones silvestres o deficientes en li que fueron tratados con LHVS, un inhibidor específico de la actividad de CatS. En ambos casos se analizó la degradación a 120 min post internalización antigénica.

LA INTERACCIÓN α II/MYO II CONTROLA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Como ya se menciona, la actividad de Myo II está asociada a fenómenos celulares que implican modificaciones de la rigidez y contractibilidad de la célula, donde la migración es una de las funciones sensibles a estos cambios. Dado que los resultados muestran que Myo II no participa ni en la regulación de la fagocitosis ni en la maduración fagosomal en CDs, pensamos que su papel podría estar asociado a la migración celular. En efecto, la inhibición de su actividad afecta *in vitro* la migración de diversos tipos celulares, incluyendo linfocitos T (Samaniego, Sanchez-Martin et al. 2007). Para evaluar si la ausencia de la CatS está involucrada en el control de la motilidad de las CDs se realizaron experimentos *in vitro* e *in vivo*. En los primeros se filmó durante 4 hrs el movimiento de CDs sembradas en placas de cultivo recubiertas con fibronectina. En el análisis se estimaron el movimiento relativo al punto de origen y la velocidad de desplazamiento de las células. Los resultados se muestran en la figura 11, en donde se aprecia que las CDs que acumulan α II intracelularmente (provenientes de los ratones $\text{CatS}^{-/-}$) presentan una motilidad disminuida respecto de células silvestres. Como es de esperar para células con baja motilidad, su velocidad de desplazamiento también es menor a la de células control (figura 11b). En el caso de CDs deficientes en α II el fenómeno es inverso, apreciándose una velocidad de desplazamiento muy superior a la de las células silvestres. En el caso de CDs tratadas con blebistatina la motilidad de las células se inhibe casi completamente, de manera muy similar a lo observado en las células deficientes en CatS (figura 11b).

Estos resultados sugieren que la motilidad de las CDs podría depender de la cantidad de li intracelular presente en los endosomas de las células, y que este fenómeno puede ser regulado modulando la cantidad de CatS activa. La acumulación intracelular de li inhibiría la migración de las células de manera Myo II dependiente, sugiriendo que la interacción li/Myo II afecta negativamente la actividad de la proteína motora.

Para estudiar la influencia de li en la migración utilizando un modelo más fisiológico se realizaron ensayos de migración *in vivo* en ratones con CDs diferenciadas a partir de animales deficientes en li o CatS. De manera similar a lo observado *in vitro*, la migración *in vivo* de las CDs deficientes en CatS se encuentra disminuida, y de manera inversa aumentada en las células deficientes en li (figura 12). Esto señala que la actividad de CatS también controla la motilidad de las CDs *in vivo*, algo probablemente asociado con la inhibición de la capacidad motil detectada en los ensayos *in vitro*.

En conjunto los resultados presentados señalan que el procesamiento antigénico y la motilidad celular se encuentran alterados en CDs deficientes en CatS. Estos fenómenos parecen compartir parte de su mecánica molecular, siendo ambos dependientes de la actividad de esta proteasa. Esto sugiere que el fenómeno de procesamiento antigénico y la migración ocurren en paralelo, y que están coordinados probablemente para favorecer la presentación antigénica de aquellos antígenos captados al inicio de la inflamación, que son aquellos que activan a las CDs y finalmente inducen la migración hacia los OLS.

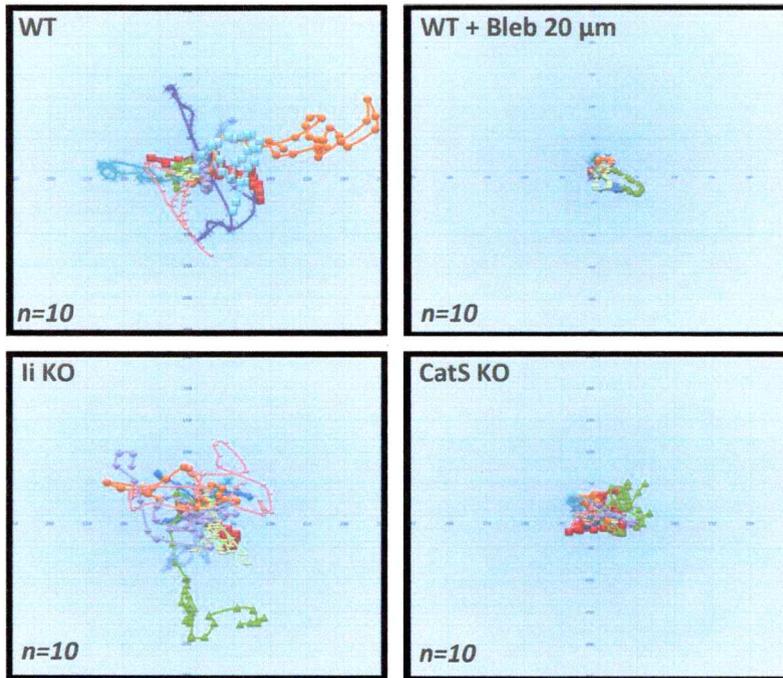
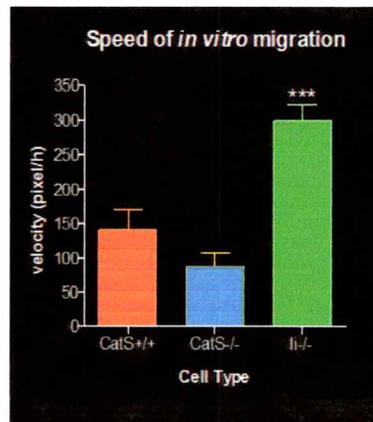
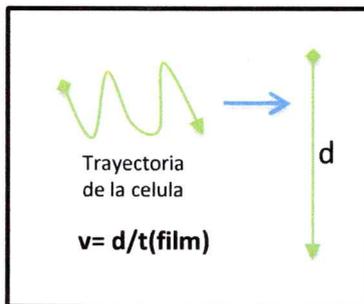
A**B**

Figura 11. Motilidad de células dendríticas *in vitro*.

Para evaluar el efecto de la ausencia de CatS o li en la motilidad de las CDs, las CDs provenientes de los distintos ratones fueron filmadas durante 4 hrs en placas cubiertas con fibronectina. En A se muestra la trayectoria de las células tomando como punto de origen la intersección de ambos ejes del grafico. En B, a la izquierda, un esquema de cómo se calculó la velocidad de desplazamiento de las células. A la derecha un grafico que muestra las velocidades de desplazamiento de los distintos tipos de CDs.

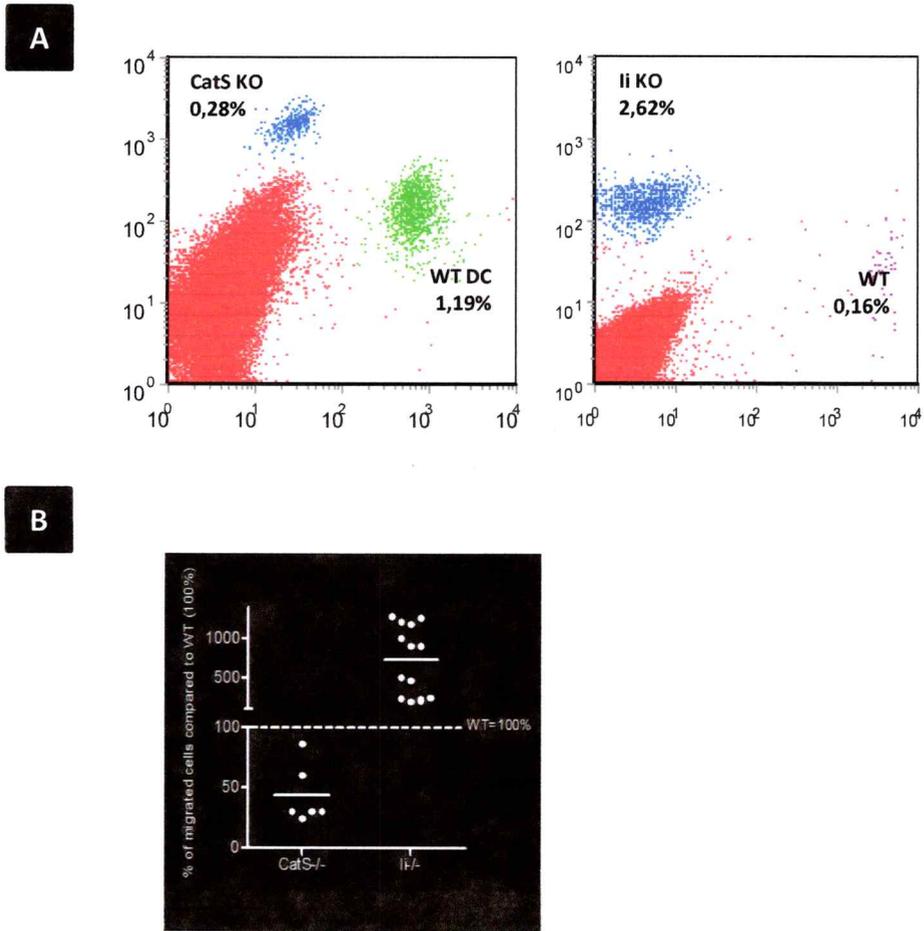


Figura 12. Migración de células dendríticas *in vivo*.

Para evaluar las consecuencias de la ausencia de CatS o li en la migración de las CDs en el ratón, CDs silvestres marcadas con CFSE (verde) fueron coinyectadas con CDs CatS^{-/-} o li^{-/-} marcadas con TRITC (azul) en el cojinete plantar de ratones silvestres. En A se muestra el análisis por FACS de la presencia de las distintas CDs en el ganglio poplíteo a 24 hrs post inyección de las células. En la figura se indica el porcentaje de CDs que llegan al órgano linfóide. En B se muestra la cuantificación de los datos obtenidos en A, normalizados respecto de la migración de CDs silvestres.

LPS INDUCE UNA ASOCIACION TRANSIENTE Ii/Myo II QUE CORRELACIONA CON UNA BAJA EN LA ACTIVIDAD DE CATEPSINA S.

Hasta ahora todos los análisis han sido desarrollados en modelos de ratones deficientes en moléculas partícipes en la presentación antigénica. Para acercar los datos al contexto de una respuesta inmune, se trataron CDs de ratones silvestres con LPS, analizándose luego la actividad de CatS y la asociación Ii/Myo II. En el caso de la actividad de CatS esta se estimó utilizando una sonda fluorométrica específica de la proteasa. A nivel de extracto completo la actividad de CatS disminuye transientemente tras la activación con LPS (figura 12a), presentando un mínimo a 30 min post-tratamiento. De manera interesante éste corresponde al tiempo en que la asociación entre Ii y Myo II es mayor, sugiriendo que la baja actividad de CatS favorece o permite la interacción entre ambas proteínas. En CDs $CatS^{-/-}$ la asociación Ii/Myo II es constitutiva, sugiriendo que en efecto la baja en la actividad de CatS estimula la interacción y no un efecto alternativo del LPS. Esto se confirma al utilizar LHSV, el inhibidor de CatS, el que también induce la interacción Ii/Myo II de manera independiente del antígeno.

Estos datos sugieren que durante una respuesta contra antígenos patogénicos se produce una baja en la actividad de CatS, y que esta lleva a una acumulación transiente de Ii y MHC II al interior de la célula. Para confirmar esto se realizó un pulso y caza para ver la acumulación de MHC II asociado a Ii tras la estimulación con LPS. En efecto, tras inmunoprecipitar Ii se observa que a 30 min ocurre el máximo de interacción entre Ii y

MHC II, lo que sugiere que en efecto la baja general en la actividad de CatS se traduce de manera efectiva en una acumulación intracelular de los complejos li-MHC II (figura 13c).

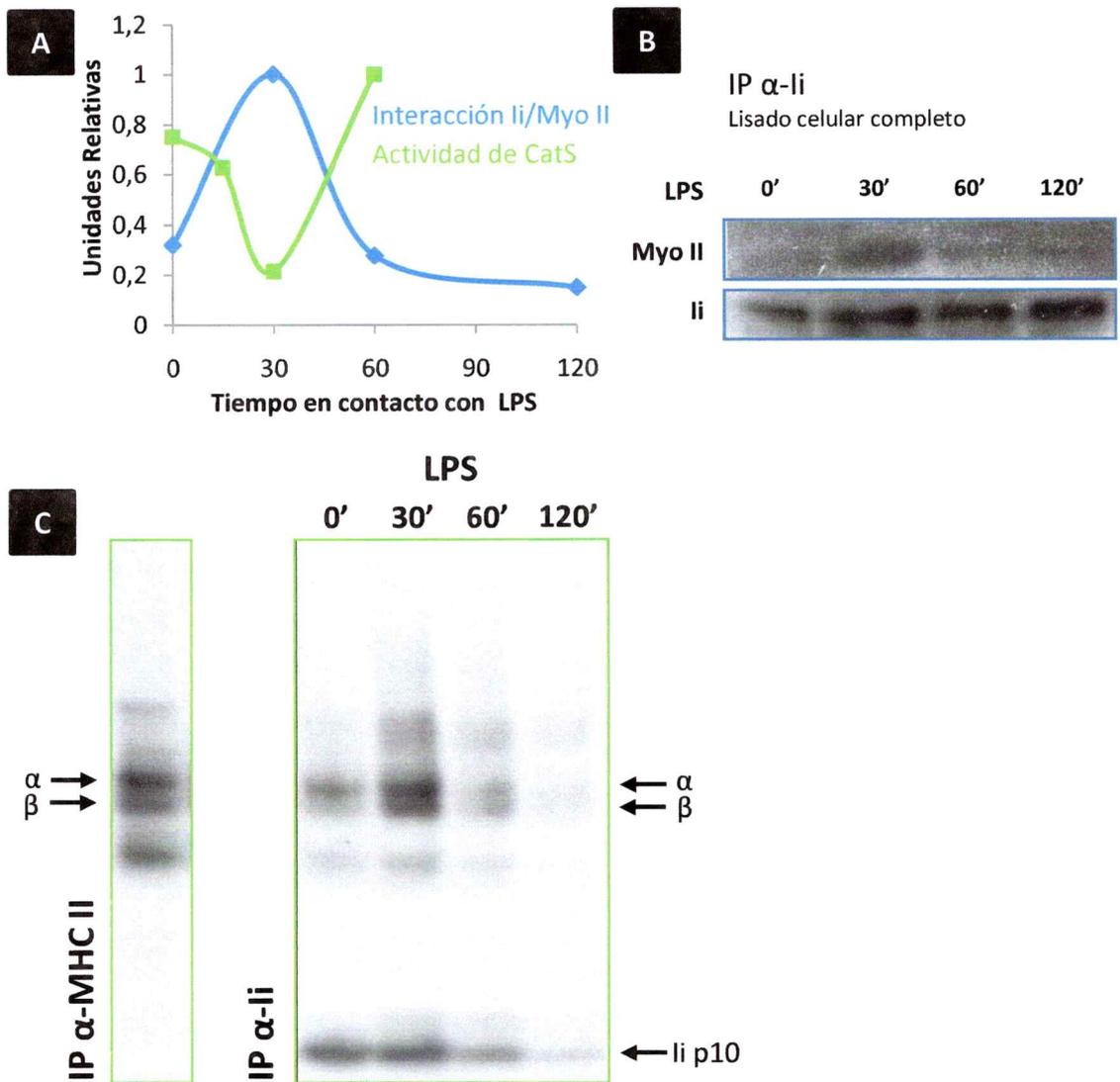


Figura 13. El efecto de la activación de las células dendríticas en la actividad de la Catepsina S y la asociación li/Myo II.

Para llevar los resultados a un plano más fisiológico se evaluó el efecto de LPS sobre la actividad de CatS usando un sustrato fluorescente específico de la proteasa. En A se muestra la actividad de CatS evaluada a distintos tiempos post tratamiento con LPS (línea verde). En la misma figura se grafica la interacción li/Myo II tras inmunoprecipitar li a los tiempos indicados (línea azul). El panel B muestra el resultado de la inmunoprecipitación de li revelada con un anticuerpo específico contra la Myo II. En C se muestra una autoradiografía de extractos de CDs inmunoprecipitados con anticuerpos anti MHC II o li. En el gráfico se destacan las cadenas alfa y beta de MHC II, lo mismo que el fragmento p10 de li.

DISCUSIÓN

El inicio de la respuesta inmune ocurre en el sitio de entrada de los patógenos. Este lugar corresponde a los tejidos periféricos, aquellos que se encuentran en contacto directo con el medio externo. Estos sitios son la primera barrera de defensa de los organismos y en mamíferos corresponden a la piel y las mucosas de los sistemas digestivo, respiratorio y reproductivo. Cada uno de estos lugares está adaptado para interactuar con cientos de microorganismos que habitan en ellos, y que de penetrar al organismo podrían representar un peligro para la sobrevivencia.

En caso de daño de la piel o de las mucosas, la barrera periférica se rompe y el sitio expuesto puede convertirse en el punto de entrada de agentes infecciosos. Como medida precautoria, en caso de destrucción de los tejidos, el epitelio afectado secreta factores que median en el reclutamiento de fagocitos al lugar alterado. Estos censan los elementos presentes en el sitio y en caso de detectar agentes peligrosos se activan y proceden a su eliminación (ver figura 1 de la introducción).

Existen dos tipos principales de fagocitos. Los que actúan a nivel local y los que ejercen su función a nivel de los tejidos linfoides. Los primeros incluyen a macrófagos y neutrófilos, que forman parte del "sistema innato" de defensa inmune, encargado de la eliminación rápida de los elementos infecciosos. La base para el funcionamiento de este sistema es la capacidad fagocítica de las células involucradas, la que les permite a

los fagocitos primero aislar a los agentes dañinos en vacuolas para luego destinar a éstas la maquinaria que se encarga de la destrucción de su contenido de forma específica.

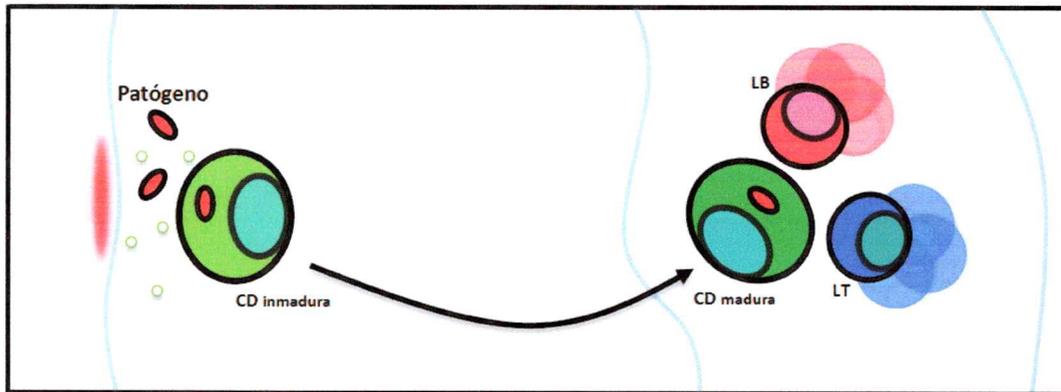


Figura 1D. La función de las células dendríticas durante la respuesta inmune adaptable.

Durante una infección el reconocimiento antigénico que las CDs realizan en la periferia de los organismos permite determinar la identidad de los elementos internalizados. En el caso de tratarse de elementos patogénicos, las CDs inician su activación y migran hacia los linfonodos. Como ambos fenómenos requieren de la misma maquinaria, ambas funciones parecen estar ligadas para favorecer el eficiente desarrollo de la respuesta inmune específica.

El otro tipo de fagocitos son las CDs. éstas células residen en la periferia del organismo en donde cumplen el papel de centinelas del sistema de defensa. La función principal de estas células es la activación de los linfocitos específicos que transitan por los linfonodos. Para que esta activación ocurra de manera eficiente hay dos fenómenos que deben ocurrir de manera coordinada. El procesamiento de los antígenos capturados y su transporte a los OLS (figura 1D).

DEL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y LA MADURACIÓN DE LOS FAGOSOMAS EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Uno de los primeros objetivos de este trabajo fue poner a punto un método para medir procesamiento antigénico en fagosomas de CDs con el fin de estudiar la interrelación entre el procesamiento antigénico y la migración de las células, dos importantes procesos en la respuesta inmune (figura 1). El ensayo desarrollado nos permitió describir de manera precisa la cinética con que ocurren los cambios degradativos al interior de estos endosomas antigénicos. En los fagosomas recién formados la degradación es casi inexistente. Durante los primeros 10 min de internalización las partículas de látex se mantienen saturadas de proteínas, sugiriendo que los endosomas que aportan con membranas para la formación de los fagosomas carecen de actividad proteolítica. Las vacuolas antigénicas comienzan a adquirir la capacidad degradativa a medida que maduran, aunque no todas lo hacen al mismo tiempo. Esto indica que a pesar de que en el presente caso todas las moléculas de antígeno tienen propiedades idénticas, este no es el caso para los fagosomas. Este fenómeno ya había sido observado en líneas celulares de macrófagos, cultivos más homogéneos que los primarios de CDs utilizados en este trabajo. Esto sugiere que existen al menos dos mecanismos distintos de fagocitosis operando simultáneamente en las CDs (y probablemente también en macrófagos). En las condiciones de nuestro ensayo (5 partículas/célula) algunas células llegan a captar hasta 5 partículas de látex en su

interior mientras que la mayoría no internaliza ninguna (figuras 3b y 9a). Esto sugiere que en el cultivo, la mayoría de las CDs no desarrolla fagocitosis de manera eficiente. En las células en que sí ocurre la fagocitosis cada partícula internalizada termina recubierta con membranas, lo que implicaría que si muchas esferas de látex son internalizadas de manera simultánea, la fuente de membranas que forma el fagosoma podría no ser homogénea para todos los compartimentos. En condiciones de látex limitantes (0,75:1) la proporción de fagosomas no degradativos o de maduración lenta disminuye, pero no desaparece (datos no mostrados). Esto sugiere que, en efecto, en nuestro modelo hay dos mecanismos de fagocitosis que están operando al mismo tiempo, uno de los cuales está más presente en las células que han sido expuestas a un alto número de partículas. Dado que las propiedades degradativas de ambos compartimentos son distintas, es también posible que ambas poblaciones estén involucradas en distintas funciones inmunológicas.

Otra de las observaciones importantes derivadas del ensayo es la velocidad a la que ocurre el procesamiento de los antígenos. A una hora de formado el fagosoma la cantidad de proteína que recubre a las partículas de látex en los fagosomas activos ha disminuido a la mitad (figura 1a). Esto sugiere que una vez que los compartimentos se activan, rápidamente adquieren el poder degradativo que erosiona las proteínas que recubren al látex (figura 1c).

Para complementar el análisis y estudiar más en detalle los fenómenos tempranos ocurridos durante la maduración de los fagosomas, se acopló el ensayo de degradación

antigénica al seguimiento de proteínas de la membrana de los mismos compartimentos (figura 2). Esto permitió en principio evaluar la composición de los fagosomas degradativos, concluyendo que es sólo en los fagosomas que poseen marcadores lisosomales donde se detecta antígeno degradado y sugiriendo que la fusión de los lisosomas con los fagosomas le otorga la capacidad degradativa a estos compartimentos. Nuestros resultados muestran por primera vez y de forma cuantitativa la relación degradación/maduración a nivel de compartimentos individuales en CDs, lo que constituye sin duda un aporte al estudio del procesamiento antigénico en estas células. Este ensayo ya ha sido utilizado para el análisis de la capacidad degradativa de otros tipos celulares y actualmente se utiliza para estudiar la influencia de factores pro o anti inflamatorios en el destino del antígeno al interior de las células (Savina, Jancic et al. 2006).

Una de las limitantes del ensayo que no pudo ser resuelta durante el desarrollo de la tesis fue el uso de marcadores que permitieran caracterizar con más detalle los compartimentos no degradativos. Ninguno de los marcadores tempranos ensayados, incluyendo rab5, el receptor de transferrina, EEA1 o proteínas residentes de la membrana plasmática como CD44 otorgó resultados interpretables. Ésto en principio se debió a la baja calidad de algunos de los anticuerpos y al elevado ruido de fondo de los marcajes (no mostrado). Este problema fue parcialmente solucionado purificando fagosomas y analizando la maduración por métodos de inmunodetección sobre membranas de nitrocelulosa (figura 2b). Los resultados muestran como marcador

temprano a la proteína gp91, subunidad del complejo NADPH oxidasa asociado al control del pH del fagosoma en CDs (Savina, Jancic et al. 2006). A medida que las vacuolas degradativas maduran, gp91 desaparece de las membranas de los fagosomas, fenómeno que ocurre en paralelo a la adquisición de marcadores lisosomales (CatD en la figura 2b). Este protocolo ayuda a validar nuestro sistema, pero no permite una asociación directa de la maduración de los fagosomas con la degradación antigénica. Además, por su complejidad y elevado requerimiento en número de células, es impracticable realizar la purificación de fagosomas mediante el método de gradientes de sacarosa en cada experimento. A pesar de esto el método aporta a una aproximación alternativa que confirma y complementa los resultados obtenidos por FACS sobre los fagosomas.

Finalmente, y para finalizar nuestro análisis de la maduración de los fagosomas en las CDs, se evaluó el contenido de proteasas activas al interior de estos compartimentos (Lennon-Dumenil, Bakker et al. 2002). Los resultados muestran que el enriquecimiento en proteasas activas ocurre de manera secuencial. La cuantificación de las bandas muestra que el máximo de incorporación de proteasas ocurre a los 30 min, coincidente con la cinética que siguen la degradación antigénica y la adquisición de Lamp2 (figuras 2c y 6c). En conjunto estos datos indican que la adquisición del material degradativo ocurre principalmente durante la primera hora de maduración de los fagosomas, momento en que los lisosomas fusionan con la mayoría de los fagosomas aportando el poder destructivo responsable del procesamiento antigénico.

DEL PAPEL DE LA CATEPSINA S EN EL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.

La destinación de las moléculas de MHC II a los compartimentos endocíticos depende de Ii. La unión entre estas dos moléculas es el evento que permite el encuentro intracelular entre antígenos y moléculas presentadoras. Una vez en los endosomas Ii es procesada por proteasas endosomales, lo que permite que las moléculas de MHC II maduren, adquiriendo la capacidad de unir péptidos y de salir a la membrana plasmática. El reclutamiento de proteasas, por ende, no solo afecta a la degradación de los antígenos, sino que también controla la disponibilidad de moléculas presentadoras. En este juego, CatS es la proteasa cuya actividad es limitante en el corte de Ii. Su ausencia causa la acumulación intracelular de complejos Ii/MHC II y evita su asociación con péptidos antigénicos (Shi, Villadangos et al. 1999). La actividad de CatS es entonces esencial para permitir la remoción de Ii y la carga antigénica, lo que la hace ser una de las moléculas claves en la respuesta inmune específica.

La primera parte de este trabajo pretende establecer cuál es el papel de CatS sobre el procesamiento de los antígenos, de modo de saber si la maquinaria responsable de cargar el péptido sobre la molécula de MHC II regula además la degradación antigénica. Para esto se evaluó en ratones *CatS^{-/-}* el efecto de la ausencia de proteasa en el procesamiento de antígenos en los fagosomas. Los primeros resultados obtenidos mostraron que la falta de CatS ocasiona un defecto de la degradación de OVA sobre el

látex (figura 3). Este fenómeno se repitió usando antígenos de distinta estabilidad a la degradación como BSA (antígeno lábil) y HEL (antígeno resistente), sugiriendo que la ausencia de CatS afecta de manera independiente del antígeno la degradación antigénica al interior de los fagosomas en las CDs (anexo 1). Al caracterizar más en detalle la inhibición de la degradación se observó que el defecto degradativo ocurría principalmente en las vacuolas antigénicas que acumulaban I α I en su superficie (figura 4a). Es interesante resaltar que en las mismas células se encuentran compartimentos con degradación antigénica normal, los que por el contrario carecen de I α I en su membrana (figura 4b). Esto sugiere que en una misma célula la maduración de fagosomas distintos ocurre de manera autónoma, y que en este caso particular la ausencia de CatS no genera un fenómeno general sino restringido a aquellos compartimentos que acumulan I α I. Esto sugiere que el control en la actividad de CatS podría estar induciendo la acumulación de I α I a nivel de compartimentos individuales controlando así su maduración de manera específica.

En conjunto estos resultados muestran que existe un defecto en la degradación antigénica en las CDs deficientes en CatS, fenómeno que a nivel intracelular se asocia a los compartimentos que carecen de CatS y que acumulan I α I en su superficie.

Estos resultados nos llevan a plantear que la degradación antigénica y la carga de péptidos ocurren de manera coordinada en la célula. Que los compartimentos que carecen de CatS tengan degradación y carga antigénica inhibidas sugiere que ambos fenómenos ocurren en forma coordinada y sólo en aquellos compartimentos en que

CatS está activa. Esto indica además que la degradación de antígenos ocurre en paralelo a la maduración de las moléculas de MHC II. Esto podría tener como fin optimizar la probabilidad de carga de los péptidos antigénicos, dado que estos estarían siendo generados al mismo tiempo que las moléculas presentadoras se hacen accesibles. El defecto degradativo observado en los fagosomas que acumulan Ii en su membrana sugiere además que existen componentes que viajan asociados a Ii (y MHC II) que de manera local controlan la capacidad de procesar antígenos del compartimento al que son destinados.

Para complementar el análisis de los fagosomas deficientes en CatS nos abocamos a evaluar si el defecto en la degradación estaba asociado a un impedimento en la fusión con los lisosomas. En células silvestres la degradación de los antígenos ocurre en paralelo a la adquisición de Lamp2, por lo que un retardo en la degradación podría deberse a un defecto en la fusión fago-lisosomal. Al realizar los experimentos observamos que en efecto existe una menor adquisición de Lamp2 en los fagosomas de las CDs deficientes en CatS. Este retardo se manifiesta con la aparición de una población de fagosomas con niveles de degradación y contenido de Lamp2 intermedios, grupo completamente ausente en células silvestres (figuras 5a y 5b). Por los niveles de degradación detectados es claro que los compartimentos que acumulan Ii y aquellos que tienen Lamp2 intermedio son los mismos, aunque por problemas técnicos se hizo imposible la realización de ambos marcajes en paralelo. De todas maneras esto nos indica que los compartimentos que acumulan complejos Ii/MHC II

tienen inhibida la capacidad de fusionar con compartimentos Lamp2, fenómeno que se traduce en un defecto local en su capacidad de degradación antigénica.

Como era de esperar, y confirmando nuestros resultados, la adquisición de proteasas activas esta inhibida en ausencia de CatS (figura 6a). Esto era predecible si se considera que la fusión de los lisosomas, que esta inhibida en ausencia de la CatS, es responsable de la destinación de las catepsinas a los fagosomas.

Finalmente, y en un último intento por tratar de entender el fenómeno que afecta la degradación antigénica en ausencia de CatS, se evaluó el pH de los fagosomas en las CDs (ver Materiales y Métodos). A la acidez endosomal se le atribuye un papel en la activación de proteasas, por lo que normalmente los compartimentos degradativos como los lisosomas son ácidos, con un pH inferior a 5.5. En macrófagos el pH de los fagosomas desciende rápidamente durante su maduración, fenómeno que se correlaciona con una alta degradación antigénica. En CDs el pH fagosomal es neutro, lo que coincide con un menor poder degradativo que el detectado en los macrófagos (Savina, Jancic et al. 2006). Esto sugiere que el control del pH de los fagosomas controla o afecta la degradación antigénica, por lo que es una de las propiedades que se encuentra potencialmente alterada en las CDs deficientes en CatS. Al medir pH fagosomal nos encontramos con que, en efecto, los compartimentos de las células mutantes presentan en promedio un pH al menos 0,5 unidades más alto que el de las células silvestres (figura 7a). Las diferencias se manifiestan de manera temprana, observándose incluso en fagosomas recién formados. Esto indica que el defecto en el

pH precede a la adquisición de Lamp2, por lo que tal vez impida la fusión de los compartimentos con los lisosomas. Sin embargo, y en contra de esta hipótesis, la realización de fagocitosis en presencia de cloroquina o NH₄Cl (agentes alcalinizadores estabilizados a pH 8.0), no afectaron ni la maduración ni la degradación de los antígenos en los fagosomas (no mostrado). Esto indica que en el rango de 7.4 a 8.0 el pH *per se* no controla ni degradación ni maduración de los compartimentos. Entre las restricciones del ensayo se encuentra que su límite de detección máximo se alcanza a pH 8 (figura 7b). Esto indica que las mediciones efectuadas en las células deficientes en CatS pueden estar subestimadas. Entonces, si el pH es responsable del control de la degradación, tal vez se requiera de un pH aun más alto para llegar a alterar las propiedades degradativas de los fagosomas. En acuerdo con esta idea la realización del experimento a la inversa, siguiendo degradación antigénica en las células deficientes en CatS pero neutralizadas a pH 7.4 restaura los niveles degradativos a valores equivalentes a los de células silvestres (figura 7c). Estos datos además confirman que el defecto en degradación observado en células CatS^{-/-} esta indirectamente asociado a la ausencia de la proteasa.

CONTROL DE LA MADURACIÓN DE LOS FAGOSOMAS EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Una vez establecida la existencia de un defecto en la maduración de los fagosomas en ausencia de CatS, nuestros esfuerzos se focalizaron en identificar los posibles efectores que pudieran estar controlando esta función celular. Es importante mencionar que en

estudios realizados en el contexto de tráfico vesicular se ha establecido que la sobreexpresión de li en variados tipos celulares induce grandes anomalías a nivel de la morfología de los endosomas. Este fenotipo es típico de alteraciones en el tráfico de vesículas, algo que en el caso de li se traduce en alteración en el tamaño, localización y maduración de los endosomas (Nordeng, Gregers et al. 2002). Esto lleva a pensar que las alteraciones en la degradación antigénica observadas en ausencia de CatS están asociadas a la acumulación de li en la membrana de los fagosomas. En contra de esta hipótesis, al analizar las CDs deficientes en li no se observa defecto alguno ni en degradación antigénica ni en maduración de fagosomas (figura 4d). Aun así, la cantidad de li presente en las CDs al estado basal es muy baja, por lo que la ausencia de la proteína equivaldría, en términos de expresión, a algo muy similar al estado de reposo de las CDs. A pesar de no tener un fenotipo claro en nuestro sistema, es sabido que li está involucrada en el transporte de las moléculas de MHC II hacia los endosomas. Esto ha llevado a sugerir que, para cumplir esta función, li se encuentra asociada a proteínas motoras que regulan de forma específica el tráfico de las vesículas que contienen a las moléculas presentadoras (Wubbolts and Neefjes 1999).

Para tratar de identificar posibles motores moleculares involucrados en el tráfico de los fagosomas (y tal vez de moléculas de MHC II), se precipitaron e identificaron las proteínas asociadas a li en células silvestres activadas o no con estímulos patogénicos (Tabla 1). De la lista de proteínas obtenidas es interesante destacar que se encuentran varios motores moleculares asociados a filamentos de actina, pero no a microtúbulos.

Los motores pertenecen a la familia de las miosinas y corresponden a Myo II, Myo IE y Myo IF.

Las miosinas son proteínas de alto peso molecular que participan en la regulación del movimiento de vesículas y en el control de la tensión de la red de actina. Como la actina está involucrada en todo proceso que requiera de deformación de membranas, las miosinas han sido implicadas en funciones que incluyen adhesión, migración y fagocitosis.

Esto sugiere que li participa en procesos celulares asociados a fenómenos dependientes de la dinámica de la actina. En efecto, en ausencia de CatS además de encontrar defectos en la maduración de los fagosomas se presentan también defectos en la adhesión celular. Las células carentes de la proteasa presentan una adhesión aumentada a las placas de cultivo, fenómeno inverso a lo que ocurre en ausencia de li (observaciones del autor). Esto sugiere que la ausencia de CatS o li podría también afectar la motilidad de las CDs.

De las miosinas identificadas la más atractiva para nuestros intereses la constituye Myo II. Esta fue la única proteína obtenida en todos los ensayos de precipitación de li, pero sólo a partir de células activadas con LPS. Esto sugiere fuertemente que la interacción li/Myo II controla funciones tempranas asociadas o gatilladas por el reconocimiento antigénico.

La utilización de inhibidores específicos de la actividad de Myo II nos permitió evaluar su función en las CDs. Al inhibir Myo II y analizar el efecto en la dinámica de los

fagosomas no se detectó efecto alguno sobre la internalización de las partículas, maduración fagosomal ni degradación antigénica (figura 9c). En el caso de la internalización antigénica esto es completamente inesperado, dado que en macrófagos la inhibición de Myo II reduce esta propiedad en cerca de un 60% (figura 9b). El hecho de que macrófagos y CDs posean estas diferencias sugiere que los mecanismos que median la ingesta de partículas en ambos tipos celulares son distintos, lo que podría explicar en parte las dispares capacidades degradativas de ambos tipos de fagocitos (Delamarre, Pack et al. 2005; Savina, Jancic et al. 2006) y su papel en la presentación antigénica. Estos resultados indican que la actividad de Myo II no controla las propiedades de los compartimentos antigénicos en las CDs en ninguno de los términos estudiados. Tampoco se aprecian diferencias cuando los antígenos están acoplados a LPS, por lo que parece ser algo independiente del tipo de antígeno utilizado (no mostrado). Estos resultados hacen pensar que Myo II no es el efector que modula la maduración de los fagosomas en las CDs, aunque no descarta que li esté involucrada en la maduración de los compartimentos.

DE CÓMO SE REGULA LA MOTILIDAD Y MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Myo II, como ya se menciono, es una proteína involucrada en el control de fenómenos dependientes de actina entre los que se cuenta la adhesión y la migración celular. Decidimos entonces estudiar la motilidad de las CDs deficientes en CatS. *In vitro* en estas células se observó la inhibición casi total de su desplazamiento en matrices de 2D,

fenómeno acompañado por una muy baja velocidad de desplazamiento (figura 11). Interesantemente, en las células deficientes en Ii se observó el fenómeno inverso, motilidad y velocidad de desplazamiento muy aumentados respecto a las células control (figura 11b). Esto sugiere que la acumulación intracelular de Ii/MHC II afecta negativamente la motilidad de las CD8. En acuerdo con este planteamiento, la inhibición específica de Myo II bloquea el movimiento de las CD8, fenómeno muy similar a lo observado en ausencia de CatS. Estos experimentos fueron desarrollados utilizando células inmaduras, sugiriendo que la actividad de Myo II controlaría la migración de las CD8 incluso al estado basal. Los mismos resultados se obtienen al inhibir la CatS con LHSV, inhibidor específico de la actividad de la proteasa (G.F., resultados de nuestro grupo).

Estos datos son sumamente importantes desde un punto de vista conceptual, ya que señalan que la misma maquinaria que está involucrada en el control del procesamiento antigénico está relacionada con el control de la migración de las células. Para ver si el fenómeno de acumulación de Ii en las células $CatS^{-/-}$ se traducía en defectos migratorios de las CD8 *in vivo*, se desarrollaron experimentos de migración en el ratón (figura 12). Los experimentos confirmaron las anomalías migratorias observadas *in vitro*, mostrando una migración impedida en células deficientes en CatS y aumentada en aquellas carentes de Ii. Todas estas CD8 presentan niveles de activación normales y responden *in vitro* a quimioquinas inflamatorias, por lo que no parece posible que el defecto migratorio se deba a algún problema generalizado en la maduración de las

células (Anexo 2). Al respecto es importante mencionar que *in vivo* la migración a los órganos linfoides ocurre en células maduras. Esto sugiere que tanto en células maduras como inmaduras la motilidad celular es controlada por la acumulación de Ii/MHC II en los endosomas, constituyendo una especie de señal autónoma que impide el movimiento de aquellas células, que a pesar de haber recibido las señales de activación, no han procesado antígenos de manera eficiente. Esto correspondería a un sistema de filtro que evitaría que al linfonodo llegasen las células presentadora en que la presentación antigénica no esté asegurada.

SENSORES DEL PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO.

Una de las observaciones importantes de nuestro trabajo es que Ii puede ser la molécula que comunica al citoplasma celular el estado de degradación de los antígenos en los fagosomas. La ausencia de CatS genera un compartimento rico en Ii, pero de pobre capacidad degradativa, sugiriendo que en estas condiciones la cantidad de Ii en el fagosoma funciona como un indicador de la calidad del antígeno al interior del compartimento.

La presencia de este marcador (Ii) en la membrana de los fagosomas le indicaría a la célula la existencia de un compartimento donde no ha ocurrido carga antigénica y donde el antígeno permanece en un estado de "*stand by*" degradativo. En la línea de los resultados, la acumulación de moléculas de MHC II inmaduras en estos fagosomas induciría en estos un efecto inhibitorio en su maduración.

Como ya se menciona en la introducción, la sobreexpresión de I α en líneas celulares lleva a la disminución en la velocidad de maduración de los endosomas y a una disminución de su capacidad degradativa (Gregers, Nordeng et al. 2003). Esto sugiere que el fenómeno gatillado por la ausencia de la CatS en las CDs se debe a la acumulación de I α en la membrana de los compartimentos.

El encuentro de I α /MHC II con el antígeno parece transmitirle al fagosoma cierta incapacidad degradativa. Esto no es tan extraño, pues los compartimentos endocíticos en que las moléculas de MHC II inmaduras se acumulan en las CPAs, a pesar de tener marcadores lisosomales, carecen de poder degradativo. Estos compartimentos no adquieren el receptor M6P, encargado de destinar las hidrolasas a los endosomas, lo que probablemente es causa de este fenómeno (Kleijmeer, Ossevoort et al. 1995).

Por otro lado I α ha sido propuesta como responsable de inducir la fusión homotípica entre vesículas cargadas con la proteína (Nordeng, Gregers et al. 2002). Esto explicaría la aparición de endosomas alargados en células transfectadas con la chaperona. La acumulación de I α en los fagosomas de las CDs podría estar favoreciendo su fusión directa con los reservorios intracelulares de MHC II, también ricos en I α , traspasando así su incapacidad degradativa a los fagosomas.

La acumulación temprana de I α en los fagosomas recién formados podría favorecer que estos compartimentos adquirieran predilección a fusionar con una población particular de lisosomas poco degradativos. Entre los marcadores lisosomales de los reservorios de MHC II descritos en la literatura se encuentran CD63 y Lamp1 (Kleijmeer, Ossevoort et

al. 1995). En células silvestres el reclutamiento de Lamp1 a los fagosomas es idéntico al de Lamp2, por lo que no se investigó este marcador con especial atención en las células deficientes en CatS. Basado en la evidencia recién mencionada parece indispensable analizar este punto en el futuro, para dilucidar si en ausencia de la proteasa los fagosomas tienen una fusión preferencial con los compartimentos ricos en Lamp1, es decir aquellos con baja capacidad degradativa.

En resumen, bajo determinadas condiciones Ii puede ser un marcador de membrana que determina la identidad del fagosoma. La entrada de un antígeno en un compartimento con CatS inactiva podría generar la acumulación temprana de moléculas de MHC II y favorecer la fusión directa con la población de reservorios de moléculas presentadoras. Esto permitiría al fagosoma evadir la vía de degradación clásica en las CDs y entrar de manera compartimento-autónoma a un estado con las condiciones óptimas para favorecer la carga antigénica específica.

DEL FAGOSOMA HACIA AFUERA.

Como ya hemos visto, la acumulación de complejos Ii/MHC II correlaciona con una inhibición de la motilidad celular *in vitro* e *in vivo*. Volviendo al postulado original de este proyecto, el que proponía una conexión entre procesamiento antigénico y migración, nos encontramos con que en efecto, en las células con defecto migratorio se observa además una vía endocítica perturbada. Estas alteraciones podrían ser responsables del tráfico anormal de receptores importantes para la migración. En

contra de este postulado nosotros no detectamos cambios en la expresión de ninguna de las moléculas involucradas en migración y adhesión estudiadas ni al estado de reposo ni en células activadas (no mostrado).

Como el problema de tráfico vesicular solo repercute en los compartimentos ricos en li, entonces lo más probable es que las moléculas estudiadas no trafiquen por aquellos compartimentos que acumulan la chaperona. Los cambios que afectan a la migración parecen estar a otro nivel, probablemente más asociados a la mecánica del movimiento que a la circulación de proteínas al interior de la célula. En acuerdo con esta idea nunca se detecto Myo II en los fagosomas purificados, ni siquiera en ausencia de CatS, a pesar de detectarse gran acumulación de li. Esto sugiere que la interacción li/Myo II no ocurre a nivel de fagosomas, y que por ende su papel es indirecto y ocurre desde otro compartimento.

La inhibición de la miosina bloquea el movimiento de CDs maduras e inmaduras. Esto indica que esta proteína motora está involucrada en el control de la mecánica general de la migración de las CDs. En las células en que CatS está ausente y que presentan inhibición de la motilidad celular, la interacción de li con Myo II es constitutiva, lo que sugiere que la asociación de ambas inhibe la actividad de Myo II. Esto es consistente con el análisis de células deficientes en li, en donde la migración esta exacerbada de manera constitutiva, lo que podría ser interpretado como una pérdida del proceso de regulación negativa de la maquinaria involucrada en movimiento.

La inhibición de Myo II, además, no afecta ninguna de las funciones asociadas a la maduración fagosomal. Basados en resultados del laboratorio no incluidos en esta tesis se vislumbra que esta proteína podría estar relacionada con la fusión entre vesículas ricas en MHC II y la membrana plasmática. Esto porque en las células deficientes en CatS hay niveles elevados de macropinocitosis y de secreción de exosomas, además de la localización anormalmente periférica de las vesículas ricas en li. Nuevamente, de manera consistente, en ausencia de li los niveles de macropinocitosis están disminuidos en las CDs, sugiriendo que en efecto existe a nivel de mecanismo un balance entre migración e internalización, el que es controlado por la presencia de li en los endosomas. Además, la inhibición de Myo II bloquea la macropinocitosis en las CDs al igual que en muchos otros tipos celulares, sugiriendo que li controla esta propiedad de manera dependiente de la proteína motora.

Es interesante resaltar que macropinocitosis es un proceso que en CDs ha ido propuesto como opuesto a la motilidad celular (West, Wallin et al. 2004). La misma tendencia se obtiene de nuestros resultados, en donde ausencia de CatS o li se traducen en efectos opuestos sobre ambos fenómenos, sugiriendo que este par de moléculas controla el balance entre motilidad celular y macropinocitosis de manera dependiente de Myo II.

PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y MIGRACIÓN (función v/s movimiento)

En la periferia del organismo las CD_s se encuentran en un estado inmaduro. En este estado las CD_s presentan motilidad y capacidad fagocítica constitutivas, lo que sumado al amplio repertorio de receptores que expresan en su superficie les permite censar de manera constante la composición del tejido periférico (figuras 9a y 11a).

Interesantemente la capacidad fagocítica y migratoria dependen de la misma maquinaria celular (Reddien and Horvitz 2000). Esto sugiere que si ambas funciones suceden en las mismas células, los dos eventos podrían ocurrir de manera alternada de modo de evitar competir por el uso de dicha maquinaria celular (figura 2D).

Al inicio de la infección los factores quimioattractantes producidos por el epitelio reclutan a las CD_s al sitio dañado. Este movimiento direccionado promueve el encuentro patógeno-CD, permitiendo que ocurra el reconocimiento antigénico.

Los datos aquí obtenidos muestran que la actividad de la CatS controla el procesamiento de los antígenos y la motilidad de las células, sugiriendo que las CD_s el control del desplazamiento celular está adaptado para cumplir de manera eficiente la función presentadora de las CD_s.

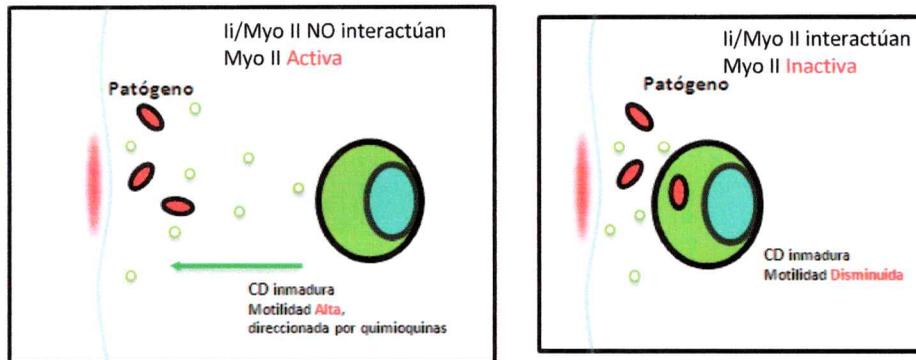


Figura 2D. Modelo Propuesto.

En resumen nuestros resultados muestran que los fagosomas que se forman en CDs que carecen de CatS tienen un poder degradativo menor que los formados en células silvestres. Al mismo tiempo las células CatS^{-/-} son incapaces de moverse, sugiriendo que en este tipo de células procesamiento y migración están conectados.

- A) Previo al reconocimiento de los antígenos las CDs se encuentran en un estado de movilidad constitutiva. En este no se observa interacción Ii/Myo II.
- B) Estímulos patogénicos llevan a la disminución transiente en la actividad de la CatS (figura 13). Nuestra predicción dice que la motilidad de las células debería disminuir con la baja en la actividad de la proteasa, idea que calza con las ideas actuales acerca de motilidad en respuesta a estímulos inflamatorios (West, Wallin et al. 2004). La detención de las células en el lugar inflamado permitiría a la célula "polarizar" su maquinaria celular a la captura y procesamiento antigénicos. Los antígenos internalizados en la perifería tendrían entonces tendencia a ser capturados cuando la cantidad de CatS es mínima, que corresponde al momento en que hay más complejos Ii/MHC II acumulados al interior de las células (figura 13). Esto podría favorecer la destinación de los patógenos a compartimentos ricos en moléculas de MHC II e Ii, los que además tienen bajo poder degradativo y que por ende permitirían una degradación antigénica controlada, óptima para permitir la carga de las moléculas de MHC II.
- C) Las CDs vuelven a adquirir capacidad migratoria una vez que los complejos Ii/MHC II han desaparecido del interior de las células. Esto permitiría a la CD activar a Myo II para adquirir la fuerza que guíe la salida de las células hacia los linfonodos.



DE CÓMO SE INTEGRAN LOS RESULTADOS EN EL TIEMPO Y EL ESPACIO.

El reconocimiento antigénico en las CD_s induce la activación de estas. Esta primera etapa de la respuesta inmune induce la internalización del antígeno además de una serie de cambios morfológicos y funcionales, los que en conjunto permiten el transporte del antígeno desde el lugar inflamado al linfonodo para permitir la activación específica de los LT.

La activación de la CD, ya sea por estímulos patogénicos o citoquinas inflamatorias, gatilla varios fenómenos. Entre estos se destaca un aumento temprano de 2-3 veces en la cantidad de complejos Ii/MHC II al interior de la célula (Nijman, Kleijmeer et al. 1995). Al mismo tiempo, la activación de la CD induce una baja en la actividad de CatS, inhibición que presenta su mínimo a 30 min post estimulación antigénica (figura 13a y (Reich, van Swieten et al. 2007)). La suma de ambos fenómenos debería llevar a la acumulación temprana de complejos MHC II inmaduros, lo que según la lógica de nuestros resultados debería traducirse en la detención de la migración de las células presentadoras.

En efecto, el grupo de Colin Watts recientemente postuló un modelo donde se propone la detención temprana y transiente de las CD_s luego del reconocimiento antigénico. Este fenómeno favorecería la permanencia de las CD_s en el sitio infectado y con ello la captura de los antígenos presentes en el lugar inflamado (West, Wallin et al. 2004). Nuestros datos sugieren que las células que se detienen tienen potencialmente altos niveles de Ii y MHC II en sus endosomas, por lo que los fagosomas formados en este

periodo tendrían una mayor posibilidad de fusionar con compartimentos ricos en moléculas presentadoras.

Los compartimentos ricos en MHC II, según la literatura y nuestro sistema, poseen una limitada capacidad degradativa, por lo que se esperaría menor degradación antigénica durante la incorporación de los patógenos. Al respecto, el reclutamiento de proteasas a los fagosomas generados en presencia de LPS es menor que a la de compartimentos no inflamatorios, lo que está en acuerdo con el patrón degradativo esperado (Lennon-Dumenil, Bakker et al. 2002).

Es interesante que la capacidad macropinocítica de las células también presente un máximo a 30 min de iniciada la activación, pues sugiere que hay un incremento de la internalización justo al momento de detención de las células. Nuestros resultados muestran que las células que no migran tienen mayor capacidad macropinocítica que las células control, y viceversa. Esto sugiere que la acumulación de MHC II en los endosomas permite al mismo tiempo la detención de la célula, el aumento en la internalización y la formación de compartimentos antigénicos ricos en MHC II. El reclutamiento diferencial o la activación local de CatS podrían estar favoreciendo la maduración de las moléculas presentadoras, la maduración de los compartimentos (adquisición de Lamp2) y la presentación antigénica en los endosomas antigénicos.

En acuerdo con esta idea, un aumento específico de la actividad de CatS en los compartimentos patogénicos ha sido propuesto recientemente, hecho que en un modelo de maduración fagosomal autónoma permitiría la carga peptídica

específicamente en aquellos compartimentos que contienen al antígeno de interés (Blander and Medzhitov 2006)

Nuestro modelo propone que procesamiento antigénico y migración ocurren en paralelo en las CDs, que ambos fenómenos son controlados por la misma maquinaria y que la migración de las CDs ocurre solamente en aquellas células en las que se ha producido un procesamiento eficiente de antígenos e Ii. Además, nuestros resultados muestran que una proteasa endosomal, la CatS, y su acción de corte sobre Ii es en efecto una de las acciones claves para de forma armónica coordinar múltiples aspectos de la respuesta inmune específica.

CONCLUSIONES

1. El procesamiento antigénico al interior de los fagosomas está afectado de manera general en CDs carentes de CatS.
2. El defecto en procesamiento se asocia a las vesículas que acumulan I κ B, el sustrato de CatS.
3. Los fagosomas formados en las CDs deficientes en CatS tienen defectos en la fusión con compartimentos lamp2, tienen menos proteasas activas y un pH más alto que el de células control.

Estos datos sugieren que la ausencia de CatS afecta de manera global la maduración de los fagosomas, lo que altera las propiedades degradativas de dichos compartimentos. Al tratar de identificar las causas de dicho defecto nos encontramos con que I κ B interactuaba con Myo II. Al respecto tenemos que:

1. I κ B y Myo interactúan solo tras la inducción de la activación celular.
2. Myo no controla ni procesamiento antigénico, ni fagocitosis en las CDs.
3. La inhibición de Myo II sí afecta la motilidad de las CDs *in vitro* y la migración de estas células desde la periferia a los linfonodos *in vivo*.
4. Las células deficientes en CatS tienen motilidad celular reducida, mientras que las deficientes en I κ B se mueven mucho más que células silvestres.

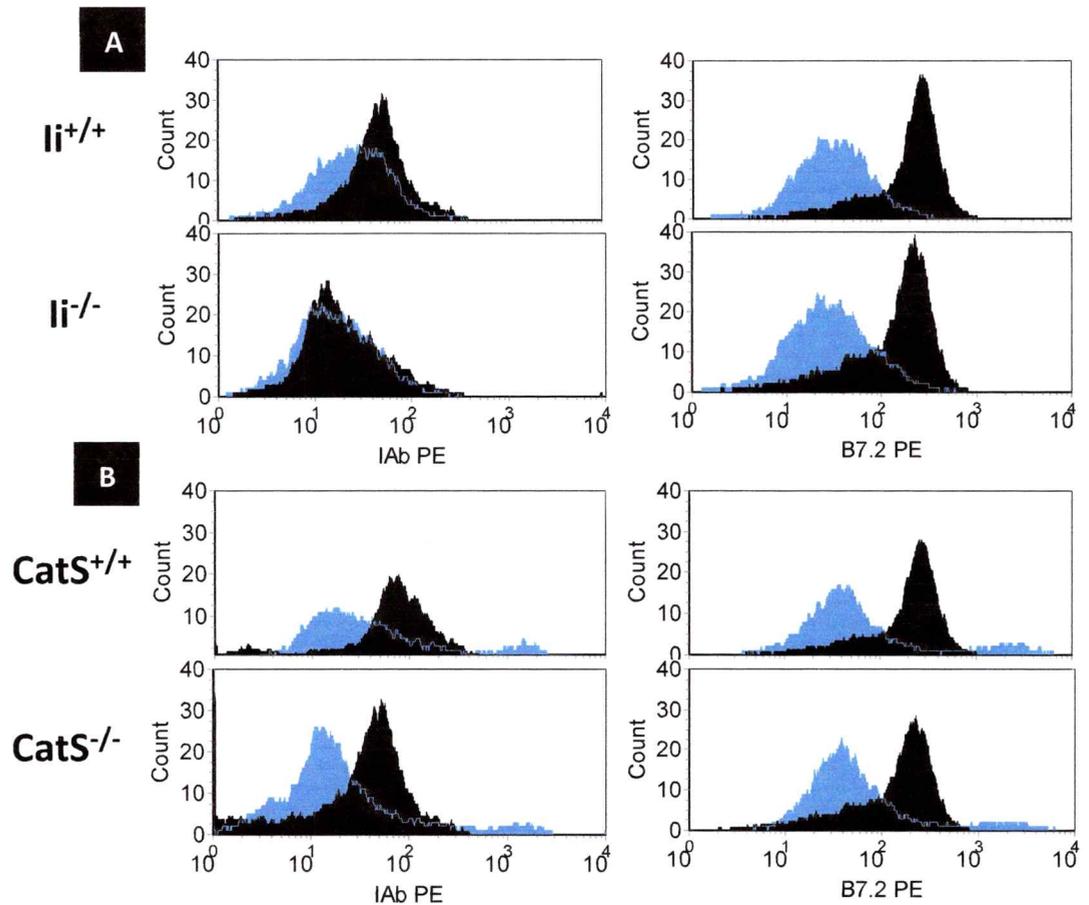
Estos datos señalan que la acumulación de Ii a nivel endosomal afecta la migración de las CDs, y que este proceso puede ser controlado regulando desde el interior de los endosomas alterando la actividad de la CatS. La interacción Ii/Myo II parece inhibir la actividad de Myo II, pues la migración celular se ve inhibida cuando la interacción Ii/Myo II se hace constitutiva.

Finalmente respecto de la a la activación de las CDs se observa que:

1. La activación con LPS induce una baja transiente en la actividad de la CatS.
2. La interacción Ii/Myo II ocurre con cinética inversa a la baja en la actividad de la CatS inducida por el LPS.
3. Esta baja se traduce en la acumulación también transiente de complejo Ii/MHC II en los endosomas.

Nuestros resultados sugieren que procesamiento antigénico y migración dependen de la misma maquinaria celular, y que ambos fenómenos cambian en función de los estímulos patogénicos, probablemente para permitir la coordinación entre las funciones que permiten el eficiente desarrollo de una respuesta inmune específica.

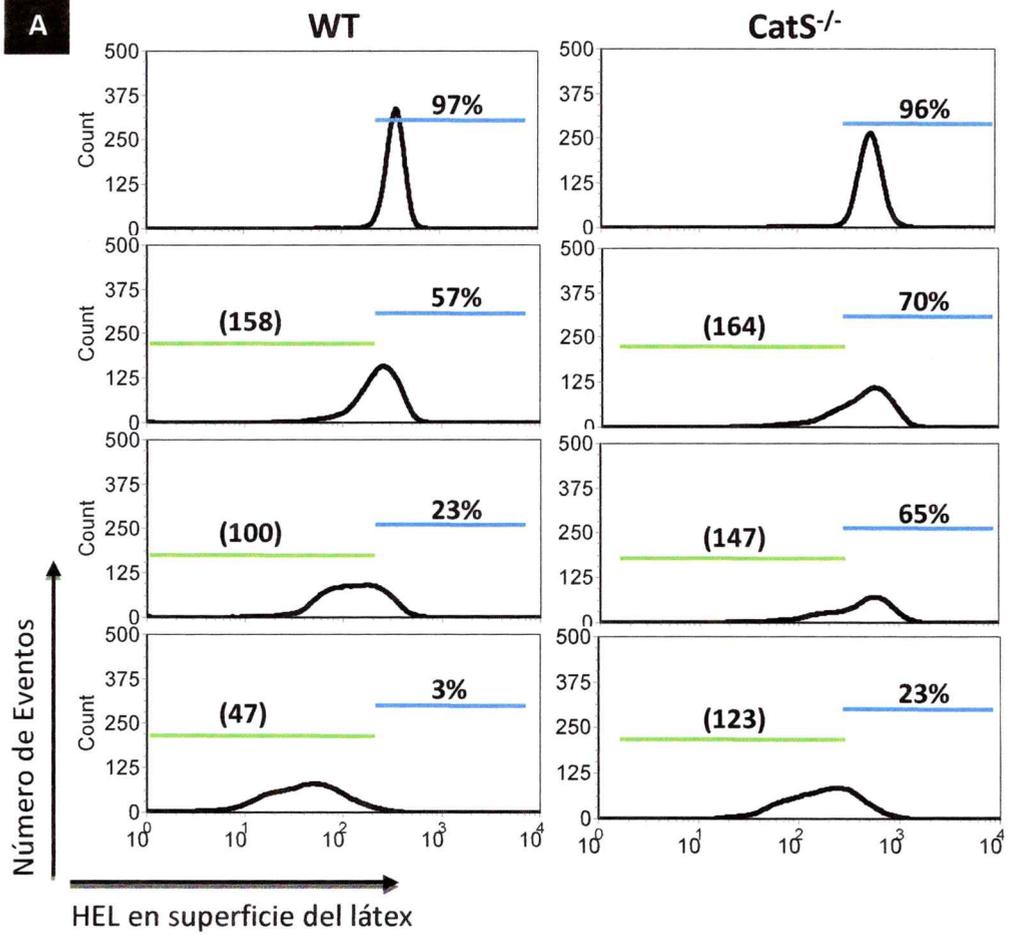
ANEXO

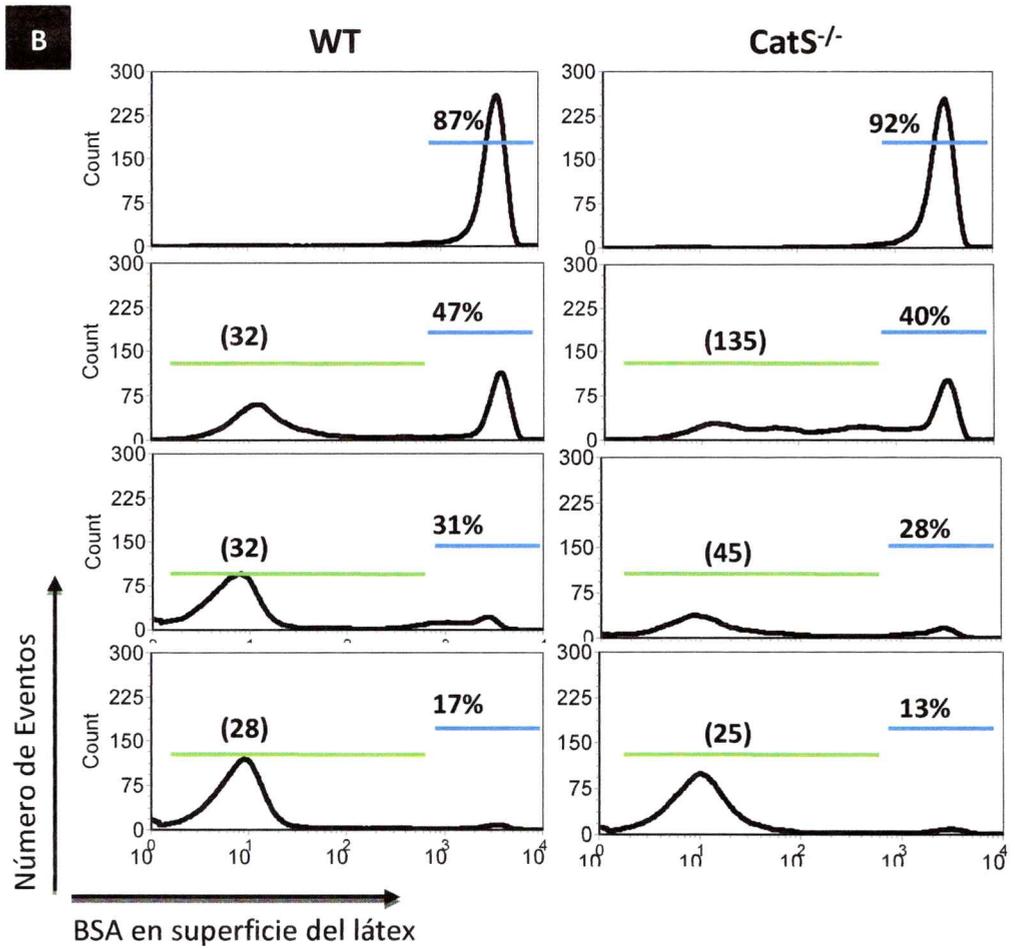


Anexo 1.

El fenotipo de las CD's utilizadas en el trabajo fue caracterizado en cultivos inmaduros (azul) o tratados 12 Hrs con LPS (negro). IAb corresponde a las moléculas de MHC II. B7.2 es lo mismo que CD86, marcador de activación de las células. A pesar de las diferencias esperables en términos de expresión de MHC II en los KO, no se detectan alteraciones generales en la maduración de ninguno de los tipos celulares.

A





Anexo 2.

Las proteínas BSA Y HEL remanentes en la superficie de partículas de látex fagocitadas por CD8 silvestres fue evaluada por FACS a distintos tiempos de la formación de los fagosomas. El panel A muestra la cinética de degradación de HEL al interior de los fagosomas. El porcentaje que se muestra equivale al de los fagosomas que permanecen inactivos en cada tiempo. La MGF se refiere exclusivamente a la población de fagosomas activos. En el panel B de la figura se muestra la cinética de degradación de BSA.

REFERENCIAS.

- Abram, C. L. and C. A. Lowell (2007). "The expanding role for ITAM-based signaling pathways in immune cells." Sci STKE **2007**(377): re2.
- Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Annu Rev Immunol **17**: 593-623.
- Bakke, O. and B. Dobberstein (1990). "MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments." Cell **63**(4): 707-16.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Blander, J. M. and R. Medzhitov (2006). "Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells." Nature **440**(7085): 808-12.
- Boes, M., N. van der Wel, et al. (2005). "In vivo control of endosomal architecture by class II-associated invariant chain and cathepsin S." Eur J Immunol **35**(9): 2552-62.
- Bogyo, M., S. Verhelst, et al. (2000). "Selective targeting of lysosomal cysteine proteases with radiolabeled electrophilic substrate analogs." Chem Biol **7**(1): 27-38.
- Busch, R., C. H. Rinderknecht, et al. (2005). "Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression." Immunol Rev **207**: 242-60.
- Caron, E. and A. Hall (1998). "Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases." Science **282**(5394): 1717-21.
- Cella, M., F. Sallusto, et al. (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." Curr Opin Immunol **9**(1): 10-6.
- Chen, G., O. Zhuchenko, et al. (2007). "Immune-like phagocyte activity in the social amoeba." Science **317**(5838): 678-81.
- Delamarre, L., M. Pack, et al. (2005). "Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate." Science **307**(5715): 1630-4.
- Denzin, L. K. and P. Cresswell (1995). "HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading." Cell **82**(1): 155-65.
- Desjardins, M., L. A. Huber, et al. (1994). "Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus." J Cell Biol **124**(5): 677-88.
- Driessen, C., R. A. Bryant, et al. (1999). "Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells." J Cell Biol **147**(4): 775-90.
- Franc, N. C., P. Heitzler, et al. (1999). "Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila." Science **284**(5422): 1991-4.
- Geisow, M. J. (1984). "Fluorescein conjugates as indicators of subcellular pH. A critical evaluation." Exp Cell Res **150**(1): 29-35.
- Greenbaum, D., K. F. Medzihradzky, et al. (2000). "Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools." Chem Biol **7**(8): 569-81.
- Gregers, T. F., T. W. Nordeng, et al. (2003). "The cytoplasmic tail of invariant chain modulates antigen processing and presentation." Eur J Immunol **33**(2): 277-86.
- Hed, J., G. Hallden, et al. (1987). "The use of fluorescence quenching in flow cytofluorometry to measure the attachment and ingestion phases in phagocytosis in peripheral blood without prior cell separation." J Immunol Methods **101**(1): 119-25.

- Hsing, L. C. and A. Y. Rudensky (2005). "The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation." Immunol Rev **207**: 229-41.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.
- Kleijmeer, M. J., M. A. Ossevoort, et al. (1995). "MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells." J Immunol **154**(11): 5715-24.
- Krendel, M. and M. S. Mooseker (2005). "Myosins: tails (and heads) of functional diversity." Physiology (Bethesda) **20**: 239-51.
- Lagaudriere-Gesbert, C., S. L. Newmyer, et al. (2002). "Uncoating ATPase Hsc70 is recruited by invariant chain and controls the size of endocytic compartments." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1515-20.
- Lee, M. S. and Y. J. Kim (2007). "Pattern-recognition receptor signaling initiated from extracellular, membrane, and cytoplasmic space." Mol Cells **23**(1): 1-10.
- Lennon-Dumenil, A. M., A. H. Bakker, et al. (2002). "Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation." J Exp Med **196**(4): 529-40.
- Luzio, J. P., P. R. Pryor, et al. (2007). "Lysosomes: fusion and function." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(8): 622-32.
- Mazza, C. and B. Malissen (2007). "What guides MHC-restricted TCR recognition?" Semin Immunol **19**(4): 225-35.
- Meara, J. P. and D. H. Rich (1996). "Mechanistic studies on the inactivation of papain by epoxysuccinyl inhibitors." J Med Chem **39**(17): 3357-66.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Mizuno, D., C. Tardin, et al. (2007). "Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks." Science **315**(5810): 370-3.
- Nijman, H. W., M. J. Kleijmeer, et al. (1995). "Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells." J Exp Med **182**(1): 163-74.
- Nordeng, T. W., T. F. Gregers, et al. (2002). "The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology." Mol Biol Cell **13**(6): 1846-56.
- Olazabal, I. M., E. Caron, et al. (2002). "Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not Fc γ R, phagocytosis." Curr Biol **12**(16): 1413-18.
- Peterson, M. and J. Miller (1992). "Antigen presentation enhanced by the alternatively spliced invariant chain gene product p41." Nature **357**(6379): 596-8.
- Pulendran, B. and R. Ahmed (2006). "Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development." Cell **124**(4): 849-63.
- Randolph, G. J., V. Angeli, et al. (2005). "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels." Nat Rev Immunol **5**(8): 617-28.
- Reddien, P. W. and H. R. Horvitz (2000). "CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*." Nat Cell Biol **2**(3): 131-6.
- Reich, M., P. F. van Swieten, et al. (2007). "Endocytosis targets exogenous material selectively to cathepsin S in live human dendritic cells, while cell-penetrating peptides mediate nonselective transport to cysteine cathepsins." J Leukoc Biol **81**(4): 990-1001.

- Samaniego, R., L. Sanchez-Martin, et al. (2007). "Rho/ROCK and myosin II control the polarized distribution of endocytic clathrin structures at the uropod of moving T lymphocytes." *J Cell Sci* **120**(Pt 20): 3534-43.
- Savina, A. and S. Amigorena (2007). "Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells." *Immunol Rev* **219**: 143-56.
- Savina, A., C. Jancic, et al. (2006). "NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells." *Cell* **126**(1): 205-18.
- Shi, G. P., J. A. Villadangos, et al. (1999). "Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development." *Immunity* **10**(2): 197-206.
- Stang, E. and O. Bakke (1997). "MHC class II-associated invariant chain-induced enlarged endosomal structures: a morphological study." *Exp Cell Res* **235**(1): 79-92.
- Straight, A. F., A. Cheung, et al. (2003). "Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor." *Science* **299**(5613): 1743-7.
- Strubin, M., C. Berte, et al. (1986). "Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain." *Embo J* **5**(13): 3483-8.
- Stuart, L. M. and R. A. Ezekowitz (2005). "Phagocytosis: elegant complexity." *Immunity* **22**(5): 539-50.
- Ting, J. P. and J. Trowsdale (2002). "Genetic control of MHC class II expression." *Cell* **109** Suppl: S21-33.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky (2002). "Phagocytosis of microbes: complexity in action." *Annu Rev Immunol* **20**: 825-52.
- Van Kaer, L. (2002). "Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and presentation." *Tissue Antigens* **60**(1): 1-9.
- Villadangos, J. A., P. Schnorrer, et al. (2005). "Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces." *Immunol Rev* **207**: 191-205.
- Wang, Y., R. M. Baron, et al. (2006). "PU.1 regulates cathepsin S expression in professional APCs." *J Immunol* **176**(1): 275-83.
- Watts, C., C. X. Moss, et al. (2003). "Creation versus destruction of T cell epitopes in the class II MHC pathway." *Ann N Y Acad Sci* **987**: 9-14.
- Watts, C., R. Zaru, et al. (2007). "Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells." *Curr Opin Immunol* **19**(1): 73-8.
- West, M. A., R. P. Wallin, et al. (2004). "Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling." *Science* **305**(5687): 1153-7.
- Winzler, C., P. Rovere, et al. (1997). "Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures." *J Exp Med* **185**(2): 317-28.
- Wu, Y., N. Tibrewal, et al. (2006). "Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill." *Trends Cell Biol* **16**(4): 189-97.
- Wubbolts, R. and J. Neefjes (1999). "Intracellular transport and peptide loading of MHC class II molecules: regulation by chaperones and motors." *Immunol Rev* **172**: 189-208.
- Yeung, T., M. Terebiznik, et al. (2006). "Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis." *Science* **313**(5785): 347-51.
- Zachgo, S., B. Dobberstein, et al. (1992). "A block in degradation of MHC class II-associated invariant chain correlates with a reduction in transport from endosome carrier vesicles to the prelysosome compartment." *J Cell Sci* **103** (Pt 3): 811-22.