

# **Rol del eje ATF6 en la frecuencia y maduración de células dendríticas en tejidos.**



**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas  
Programa Disciplinario de Inmunología**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**María Francisca Gutiérrez Ballesteros**

**Abril, 2023**

**Director de Tesis Dra: Fabiola Beatriz Osorio Olivares**

**Co-Director de Tesis Dra: María Rosa Bono Merino**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata.

**María Francisca Gutiérrez Ballesteros**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas Programa Disciplinario de Inmunología en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de Agosto de 2022.

Director de Tesis:

**Dra. Fabiola Beatriz Osorio Olivares .....**

Co-Director de Tesis

**Dra. María Rosa Bono Merino .....**

Comisión de Evaluación de la Tesis

**Dra. Daniela Sauma Mahaluf.....**

**Dr. Álvaro Glavic Maurer.....**

*A mi familia, desde sus orígenes...*

## BIOGRAFÍA



Mi nombre es María Francisca Gutiérrez Ballesteros, nací en Melipilla el 12 de septiembre de 1987.

En 2008 ingrese a la Pontificia Universidad Católica de Chile, Egresando el 2010 de Bachillerato en Ciencias.

En 2014 entre a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, obteniendo el grado de licenciada en marzo de 2019 y Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular en 2021.

Comencé a realizar mi Unidad de Investigación en el Laboratorio de Inmunología y Estrés Celular el 2018, donde posteriormente desarrolle mi Seminario de Título y tesis para el programa de Magister en Ciencias Biológicas bajo la tutoría de la Dra. Fabiola Osorio y el patrocinio de la Dra. María Rosa Bono.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a mi familia, por su constante apoyo durante toda mi formación académica, en particular a mi madre e hijo por su inagotable paciencia y amor. Agradecer también a todos los integrantes del laboratorio de Inmunología y Estrés celular por el apoyo brindado durante todo el proceso de investigación. Especial agradecimiento a Antonia Geisse por su colaboración en el desarrollo de experimentos, a Felipe Flores por su colaboración en el análisis de datos, a Jonathan Morales por su apoyo y entrega de conocimientos y a la Dra. Fabiola Osorio y Dra. María Rosa Bono por permitirme ser parte de esta investigación, depositando su confianza y entregándome conocimientos valiosos para mi desarrollo en el área laboral y personal.

## TABLA DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Células Dendríticas.....	1
Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) y Presentación antigénica en DCs.....	2
Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).....	7
Factor de transcripción activador 6 (ATF6).....	10
Hipótesis.....	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1. Medios de Cultivo y Ratones.....	15
1.1 Medios de cultivo, buffers y soluciones.....	15
1.2 Ratones.....	15
2. Preparación de suspensiones celulares a partir de tejidos.....	16
2.1 Obtención de células a partir de bazo.....	16
2.2 Obtención de células a partir de pulmón.....	17
2.3 Obtención de células a partir de intestino.....	18
3. Purificación mediante separación inmunomagnética.....	19
4. Estimulación con agonistas virales.....	20
5. Citometría de Flujo multiparamétrica y <i>Cell Sorting</i> .....	20

6. Marcaje intracelular de citoquinas .....	24
7. Extracción RNA y qPCR .....	25
8. Softwares y análisis estadístico .....	25
RESULTADOS .....	27
Las cDC1 presentan el mayor nivel de activación de la vía IRE1-XBP1.....	27
La deficiencia de XBP1 afecta la composición de las cDCs de forma tejido especifica .....	32
La ausencia de ATF6 no afecta la composición de las cDCs en los tejidos .....	37
La expresión de genes blancos de la UPR se conserva en cDCs deficientes para ATF6 $\alpha$ .....	41
Características funcionales de las cDCs en ausencia de ATF6.....	44
DISCUSIÓN.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	55

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sondas viabilidad y bloqueador utilizados .....	21
Tabla 2. Anticuerpos utilizados para marcajes .....	22
Tabla 3. Fenotipo de células inmunes identificadas en tejidos .....	24
Tabla 4. Partidores utilizados para qPCR.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presentación antigénica a linfocitos T mediada por Células Dendríticas.....	6
Figura 2. Activación de la vías de la UPR .....	10
Figura 3. Esquema modelo reportero ERAI .....	28
Figura 4. Estrategia de identificación de poblaciones inmunes .....	30
Figura 5. Activación de IRE1 en poblaciones de células inmunes residentes de tejido	31
Figura 6. Cuantificación de células inmunes residentes de tejido en modelo murino deficiente para XBP1 .....	33
Figura 7. Frecuencia de cDCs residentes en de tejido en modelo murino deficiente para XBP1 .....	36
Figura 8. Cuantificación de células inmunes residentes de tejido en modelo murino deficiente para ATF6 .....	38
Figura 9. Frecuencia de cDCs residentes de tejido en modelo murino deficiente para ATF6.....	40
Figura 10. Expresión basal de genes blancos de la UPR en modelo ATF6 KO .....	42
Figura 11. Cuantificación de moléculas coestimuladoras en modelo ATF6 KO en condiciones basales. ....	45
Figura 12. Producción de Citoquinas en cDC1s deficientes para ATF6 .....	46
Figura 13. Producción de Citoquinas en cDC2s deficientes para ATF6 .....	48
Figura 14. Conclusión Grafica.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATF6: *Activating transcription factor 6*  
DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño  
cDC: Célula dendrítica convencional  
cDC1: Célula dendrítica convencional de tipo 1  
cDC2: Célula dendrítica convencional de tipo 2  
CDM: Células Derivadas de Monocitos  
DC: Célula dendrítica  
ERAD: *ER-associated degradation*  
gMFI: Media geométrica de Intensidad de Fluorescencia  
IL-12: Interleuquina 12  
IRE1: *Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$*   
KO: *Knock out*  
LIB: Liberasa  
LP-ID: Lamina propia de intestino delgado  
Macs: Macrófagos  
MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I  
MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II  
mRNAs: RNAs mensajeros  
NK: *Natural Killer*  
NKT: *Natural Killer T cells*  
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos  
PBS: Tampón Fosfato Salino  
pDC: Célula dendrítica plasmacitoide  
PERK: *Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*  
PRR: Receptores de reconocimiento de patrones  
RIDD: *Regulated IRE1-dependent decay*  
SFB: Suero Fetal Bovino  
TCR: *T cell receptor*  
TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  
TLRs: Receptores Tipo *Toll*  
UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas

VenusFP: *Venus Fluorescent protein*

WT: *Wild Type*

XBP1: *X-binding protein 1*

XBP1s: *X-binding protein 1 spliced*

XBP1u: *X-binding protein 1 unspliced*

RE: *Retículo endoplásmico*

## RESUMEN

Las células dendríticas convencionales (cDCs) cumplen un rol crucial en la respuesta inmune dada su capacidad superior para realizar la presentación antigénica. Esto hace a estas células cruciales en la respuesta inmune ya que, dependiendo de su estado de activación y la naturaleza del antígeno, median entre la respuesta inmune innata, la respuesta inmune adaptativa y la mantención de la tolerancia, estado donde hay ausencia de respuesta ante sustancias que tienen el potencial de inducir la activación del sistema inmune. Se ha visto que las células dendríticas convencionales de tipo 1 (cDC1s), un linaje de las cDCs, presentan constitutivamente activo el eje IRE1-XBP1 de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), el cual tiene un rol crucial en la sobrevivencia de estas células en los tejidos. Se ha demostrado que la expresión del mRNA codificante para XBP1 es controlado por el factor de transcripción ATF6. Bajo este contexto, en este estudio se buscó dilucidar cual es el la contribución de ATF6 en la frecuencia de la población de cDCs y en características de maduración como la expresión de moléculas coestimuladoras y síntesis de citoquinas, requeridas por estas células para realizar la presentación antigénica. Los resultados muestran que, en condiciones basales, tanto la frecuencia como la expresión de moléculas coestimuladoras en las cDCs no son afectadas por la deficiencia de ATF6. Bajo contextos inflamatorios inducidos por agonistas virales, la producción de TNF- $\alpha$  e IL-12 en las cDCs tampoco es afectada de manera significativa en ausencia de ATF6. Por tanto, a diferencia de la vía IRE1-XBP1, concluimos que ATF6 no regula la homeostasis de las cDC1s en las condiciones estudiadas. Sin embargo, el modelo deficiente para ATF6 utilizado mostró tener un efecto deletéreo en la población de monocitos residentes de pulmón, células en las que la UPR ha sido poco estudiada.

## ABSTRACT

Conventional dendritic cells (cDCs) play a crucial role in the immune response given their superior ability to perform antigen presentation. This makes these cells crucial in the immune response since, depending on their activation state and the nature of the antigen, they mediate between the innate immune response, the adaptive immune response and the maintenance of tolerance, a state of unresponsiveness to substances that have the potential to induce activation of the immune system. It has been shown that type 1 conventional dendritic cells (cDC1s), a lineage of cDCs, present constitutively active IRE1-XBP1 axis of the unfolded protein response (UPR), which has a crucial role in the survival of these cells in the tissues. It has been shown that the expression of the mRNA coding for XBP1 is induced by the transcription factor ATF6. In this context, this study sought to elucidate the contribution of ATF6 in the frequency of the cDCs population and characteristics of maturation such as costimulatory molecules expression and cytokines production, required by these cells for antigen presentation. The results show that, under basal conditions, both population frequency and costimulatory molecules expression in cDCs are not affected by the deficiency in the ATF6 expression. Under inflammatory contexts induced by viral agonists, the production of TNF- $\alpha$  and IL-12 in cDCs it is not affected either significantly in the absence of ATF6. Therefore, unlike the IRE1-XBP1 pathway, we conclude that ATF6 does not regulate the homeostasis of cDC1s under studied condition. Nevertheless, the deficient model for ATF6 used was shown to have a deleterious effect on the population of lung resident monocytes, cells in which the UPR has been poorly studied.

# INTRODUCCIÓN

## **Células Dendríticas**

Las células dendríticas (DCs) son una población de leucocitos de origen mieloide, que residen en tejidos linfoides y no linfoides (Merad et al., 2013) y forman parte del sistema de fagocitos mononucleares junto con los monocitos y macrófagos (Guilliams et al., 2014). Según convención, las DCs pueden ser clasificadas de acuerdo a su ontogenia y a la expresión de moléculas específicas presentes en su superficie, distinguiéndose dos principales grupos: las células dendríticas plasmacitoides o pDCs, y las células dendríticas convencionales o cDCs (Merad et al., 2013).

Las pDCs son un pequeño subconjunto de células dendríticas que participan de la respuesta antiviral produciendo grandes cantidades de interferón tipo I (Swiecki & Colonna, 2015; Ye et al., 2020) y se caracterizan por expresar marcadores como B220, Ly6C, Sirp- $\alpha$  y tener baja expresión de los marcadores MHC-II y CD11c en estado basal (Merad et al., 2013). Por su parte las cDCs, son consideradas células presentadoras de antígeno por excelencia e inducen inmunidad o tolerancia a través de la presentación antigénica. Estas células actúan como centinelas, adquiriendo los antígenos presentes en su entorno. Una vez adquiridos, las cDCs procesan los antígenos y migran hacia los linfonodos drenantes. Una vez en los linfonodos, los antígenos son presentados a linfocitos T vírgenes induciendo la proliferación y polarización de estos, ya sea a un linfocito T efector antígeno-específico (induciendo una respuesta inmuno-específica) o bien a un linfocito T regulador (induciendo una respuesta tolerogénica), según la naturaleza del antígeno presentado (Sichien et al., 2017).

Las cDCs, se subdividen en dos principales categorías: las células dendríticas convencionales de tipo 1 (cDC1s) y las células dendríticas convencionales de tipo 2

(cDC2s). Las cDC1s son dependientes de los factores de transcripción *Batf3* e *Irf8* para su correcto desarrollo (Sichien et al., 2017) y se identifican por expresar los marcadores de superficie CD11c, MHC-II y XCR1 (Guilliams et al., 2016; Sichien et al., 2017). En términos funcionales, las cDC1s están especializadas en lo que se denomina presentación cruzada, esto es, tienen la capacidad de tomar péptidos derivados de proteínas exógenas y presentarlos a linfocitos T CD8<sup>+</sup> en contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) (Imai et al., 2019). Por su parte, las cDC2s son dependientes de *Irf4* para su correcto desarrollo (Guilliams et al., 2016), se identifican por presentar los marcadores CD11c, MHC-II, CD11b y *Sirp-α* (Guilliams et al., 2016; Merad et al., 2013) y son células especializadas en la presentación antigénica a linfocitos T CD4<sup>+</sup> en contexto de moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II).

La localización crítica en la que se disponen en los tejidos no linfoides y en la zona marginal del bazo, su alta capacidad para migrar hacia los linfonodos drenantes y la capacidad superior en la presentación de antígenos a los linfocitos T, son atributos claves para la función que desempeñan las cDCs en el sistema inmune (Merad et al., 2013). Dadas estas características, las cDCs participan desde la identificación del potencial agente nocivo hasta la inducción de la respuesta mediada por linfocitos T. Es por ello, que estas células se consideran cruciales en el nexo entre las respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa y fundamentales en el mantenimiento de la tolerancia hacia antígenos propios.

### **Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) y Presentación antigénica en DCs**

Las DCs reconocen estructuras características de agentes patógenos, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que suelen ser estructuras

invariantes y esenciales para la sobrevivencia de los patógenos (Coyne et al., 2012; Mogensen, 2009). Así también, tienen la capacidad de reconocer señales de daño de células infectadas, denominadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los diferentes agentes patógenos como; virus, bacterias gram positivas y negativas, hongos o parásitos, expresan diferentes PAMPs dentro de los cuales se incluyen, entre otros, RNAs de doble o simple hebra, complejos lipídicos o carbohidratos como los lipopolisacáridos. Estas estructuras son reconocidas por receptores presentes en una amplia variedad de células como neutrófilos, macrófagos y DCs, y son llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), dentro de los cuales se encuentra un tipo específico de receptores denominados *Toll-like receptors* (TLRs) (Ng Chee Ping, 2013). Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana de tipo I, presentan un dominio extracelular o luminal de unión al ligando que contiene motivos repetidos ricos en leucina y un dominio de señalización citoplasmático denominado TIR (*Toll/IL-1 receptor homology*) (Mogensen, 2009). Han sido identificados 10 TLRs humanos y 13 murinos los cuales se expresan en la membrana plasmática o en la membrana endosomal de las células (Nie et al., 2018). Dentro de los TLRs que se expresan en la membrana del endosoma se encuentran TLR3 y TLR7/8 los cuales reconocen ácidos nucleicos, RNA viral de doble hebra y RNA viral de hebra simple, respectivamente (Kawai & Akira, 2006; Krieg & Vollmer, 2007; Mogensen, 2009). Interesantemente, se ha visto que estos TLRs son selectivamente expresados en las DCs, encontrándose TLR3 presente exclusivamente en cDC1s, mientras que por el contrario, TLR7/8 se expresaría principalmente en las cDC2s (Edwards et al., 2003).

Ante el reconocimiento de un agente patógeno se produce la interacción PAMP-TLR, que induce la oligomerización de los TLRs, iniciándose la cascada de señalización intracelular en donde diferentes proteínas adaptadoras son reclutadas, provocando la

activación de proteínas quinasas que gatillan la activación de factores de transcripción cuyos blancos son un conjunto de genes vinculados con la secreción de quimioquinas, citoquinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$  , IL-1 e IL-12, citoquinas antivirales como interferones de tipo I y moléculas coestimuladoras, como CD80 y CD86 (Lambrecht et al., 2015; Mogensen, 2009; Nie et al., 2018). De esta forma, la cascada de señalización de los TLR en las DCs coordina la activación de estas células (Reis E Sousa, 2004). Al ser activadas, las DCs aumentan su superficie mediante la prolongación de sus dendritas, aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras y aumentan la expresión de complejos MHC-I o MHC-II asociadas a un péptido (MHC-péptido) (Fig. 1) (Lambrecht et al., 2015). En general, a las moléculas MHC-I se unen los péptidos endógenos generados por proteólisis a través del proteosoma y la carga de los péptidos es llevada a cabo en el retículo endoplásmico (RE) después de que los péptidos se translocan desde el citosol, mientras que las moléculas MHC-II se unen a péptidos exógenos generados por proteólisis lisosomal en las vías endocítica y fagocítica. Sin embargo, ambos pueden acceder a péptidos de antígenos endógenos y exógenos. Por ejemplo, MHC-II se puede unir a péptidos derivados de proteínas de membrana endógenas que se degradan en el lisosoma, mientras que las moléculas MHC-I pueden unir péptidos derivados de proteínas exógenas internalizadas por endocitosis o fagocitosis mediante la presentación cruzada, que es llevada a cabo particularmente por las cDC1, como se mencionó con anterioridad (Blum et al., 2013). Todo este proceso de activación de las DCs coincide con la migración desde tejidos no linfoides hacia la zona T de los linfonodos drenantes, donde realizan la presentación de antígenos a linfocitos T vírgenes (Lambrecht et al., 2015).

La presentación de antígenos mediada por las DCs a los linfocitos T, difiere según el tipo de linfocitos T. En general, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son preferencialmente activados por las

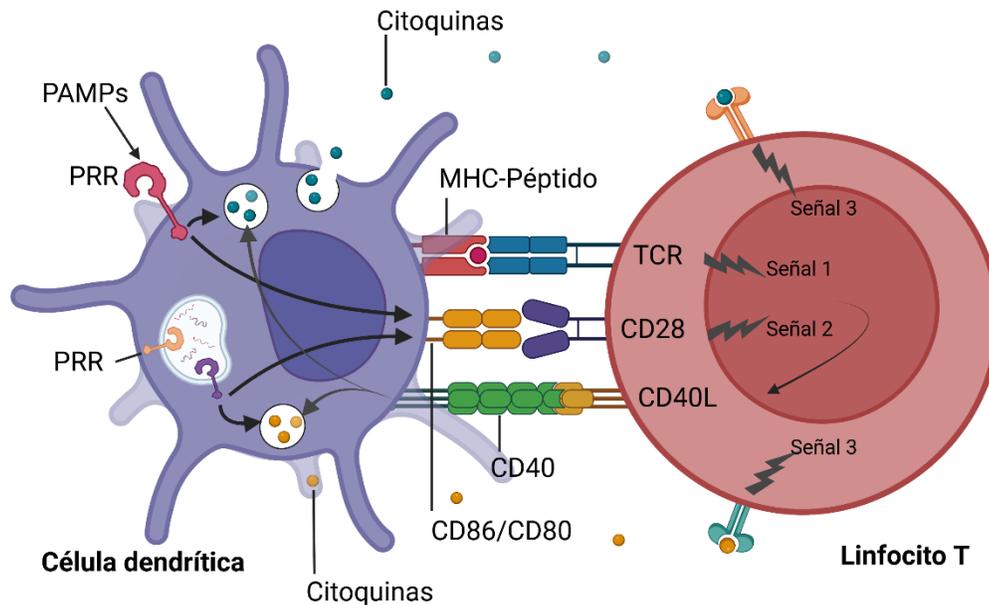
cDC2, realizando la presentación antigénica a través de moléculas MHC-II, mientras que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son preferencialmente activados mediante la presentación de antígenos en moléculas MHC-I por parte de las cDC1 (Lambrecht et al., 2015).

Finalmente, para que la activación de los linfocitos vírgenes ocurra, son necesarias tres señales fundamentales proporcionadas por las cDCs: (1) La señal de estimulación 1, es la generada por la interacción entre el receptor del linfocito T (TCR) y el péptido cargado en la molécula MHC de las cDCs, lo cual determina la especificidad de la respuesta.

(2) La señal de estimulación 2, es la interacción entre las moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de las cDCs y su ligando, presente en la superficie de los linfocitos T. Sin esta interacción, los linfocitos se vuelven anérgicos. (3) La señal de estimulación 3, es la producción de factores solubles como las citoquinas, la cual en el caso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> determina la polarización de estos hacia un tipo efector en particular, y cuya naturaleza depende del tipo de PRR activado. Además, el desarrollo óptimo del perfil efector de los linfocitos T requiere estimulación de retroalimentación por la interacción de CD40 y CD40L. Este último ligando, es expresado por los linfocitos T después de la activación por las señales 1 y 2 (Fig. 1) (Curtsinger et al., 2003; Kapsenberg, 2003).

Una vez activados los linfocitos T, encontrándose presente las 3 señales de estimulación requeridas, se produce la expansión clonal de los linfocitos, montándose la respuesta inmune contra el agente patógeno específico. Para que la respuesta inmune adaptativa pueda ser montada, la presentación antigénica mediada por las cDCs es fundamental. En este contexto, el correcto procesamiento de los antígenos y la carga de estos en las moléculas MHC por parte de las cDCs es crucial, y se ha visto que la señalización de las vías que integran la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), la cual se encarga de mantener la homeostasis proteica en las células, regula la expresión de varias de la

proteínas que participan del procesamiento y presentación de antígenos, tales como las ribosporinas 1 y 2, chaperonas como la calnexina y proteínas componentes del complejo de caga de péptidos como la calreticulina, entre otros (Osorio et al., 2018).



**Figura 1. Presentación antigénica a linfocitos T mediada por Células Dendríticas**

Esquema de señalización de presentación de antígenos y activación de Linfocitos T mediada por células dendríticas. La señal 1 es la señal específica de antígeno que está mediada a través de la activación del TCR por péptidos asociados a las moléculas MHC procesados a partir de agentes reconocidos por la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los receptores tipo Toll (TLR). La señal 2 es la señal coestimuladora, mediada por la activación de CD28 por CD80 y CD86 que se expresan en las DCs después de la unión de los PRR a un patrón molecular. La señal 3 es la señal polarizadora que está mediada por varios factores solubles o unidos a la membrana, como la interleucina-12 (IL-12). La interacción de CD40 y CD40L es requerida para el desarrollo óptimo del perfil efector del linfocito T. *Adaptado de (Kapsenberg, 2003)*

## **Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR)**

La integridad celular depende de forma importante de la homeostasis proteica, siendo la síntesis, plegamiento y degradación de proteínas mal plegadas esenciales para el correcto funcionamiento celular (Bouchecareilh & Balch, 2011). Dentro de este proceso de regulación de las proteínas, el retículo endoplásmico cumple un rol fundamental, siendo el organelo en donde se lleva a cabo la síntesis y procesamiento de cerca de un tercio de las proteínas totales requeridas por las células, tanto proteínas residentes de membrana como aquellas proteínas que son secretadas (Almanza et al., 2019). Numerosos agentes ambientales, patógenos y/o deficiencias génicas, pueden desestabilizar el balance de este sistema, provocando la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, generando lo que se conoce como estrés de retículo endoplásmico. Bajo esta condición, se activa la vía de señalización intracelular denominada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *Unfolded Protein Response*) la cual induce un conjunto de eventos transcripcionales y traduccionales que restauran la homeostasis del RE (Oakes & Papa, 2015).

En células de organismos eucariontes la UPR consta de tres sensores dispuestos en la membrana del RE: PERK (*protein kinase R-like ER kinase*), IRE1 (*inositol- requiring enzyme 1, Alpha*) y ATF6 (*Activating transcription factor 6*) (Fig. 2). Cada uno de estos sensores presenta un dominio en el lumen del RE, a través del cual es sensada la acumulación de proteínas mal plegadas y es inducida una cascada de señalización que busca restaurar la homeostasis proteica (Hetz et al., 2015). Ante condiciones de estrés de RE, PERK inicia una respuesta adaptativa inmediata. Esta quinasa permanece inactiva en forma de monómero al encontrarse unida a la proteína BiP (Hetz et al., 2020). Al producirse la acumulación de proteínas mal plegadas, por las que la chaperona BiP tiene mayor afinidad, BiP se disocia y PERK homodimeriza y se autotransfosforila lo que

genera su activación (Grootjans et al., 2016). Al activarse, esta quinasa fosforila la subunidad  $\alpha$  del factor 2 de iniciación de la traducción eucariótica (eIF2 $\alpha$ ) impidiendo el ensamblaje del ribosoma, atenuándose la síntesis de nuevas proteínas, y con ello disminuyendo la sobrecarga impuesta al RE. Al aumentar los niveles de eIF2 $\alpha$  fosforilado, ciertos mRNAs específicos son traducidos, dentro de ellos, el que codifica para ATF4 (Palam et al., 2011) (Fig. 2A), factor de transcripción que participa en un circuito de retroalimentación para la desfosforilación de eIF2 $\alpha$  a través de GADD34, que induce la transactivación de genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos, resistencia al estrés oxidativo, autofagia y, en condiciones crónicas de estrés, tiene la capacidad de inducir la apoptosis celular a través de la inducción de CHOP (Grootjans et al., 2016; Hetz et al., 2020).

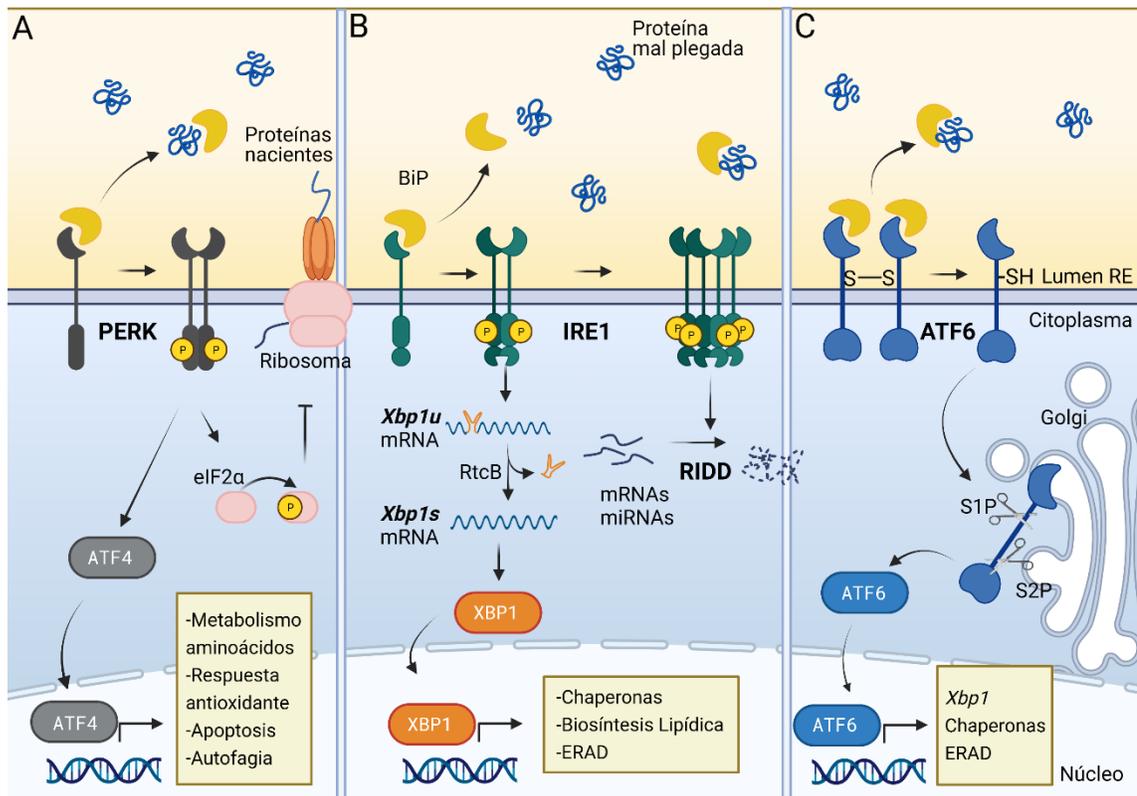
IRE1, el primero de los sensores de la UPR descubierto, es el más estudiado y el más conservado evolutivamente. Este es una proteína transmembrana de tipo I, que presenta un dominio quinasa y un dominio endoribonucleasa o RNasa de cara al citosol (Grootjans y col., 2016). Este sensor se encuentra inactivo, como monómero, mientras la chaperona BiP, en un complejo formado con la co-chaperona codificada por ERdj4, se encuentra unido a su dominio luminal (Daverkausen-Fischer & Pröls, 2022; Hetz et al., 2020). Al igual que en el caso de PERK, ante condiciones de estrés de RE, BiP se disocia del dominio luminal de IRE1, induciendo la dimerización de éste, su autotransfosforilación y con ello su consiguiente activación (Cubillos-Ruiz et al., 2017). Una vez activado, el dominio RNasa de IRE1 media el *splicing* no convencional del mRNA *Xbp1u* (*Xbp1 unspliced*), generándose el mRNA *Xbp1s* (*Xbp1 spliced*) codificante para el factor de transcripción XBP1s (*X box binding protein 1 spliced*). XBP1s luego transloca al núcleo e induce la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis lipídica y proteínas chaperonas que conducen a un aumento del tamaño y capacidad de procesamiento del

RE (Grootjans y col., 2016) (Fig. 2B).

Por otra parte, XBP1s también puede inducir la degradación de proteínas asociada al RE (ERAD) y a través del mecanismo conocido como decaimiento regulado dependiente de IRE1 (RIDD, de su sigla en inglés *Regulated IRE1-dependent decay*), IRE1 puede degradar mRNAs y microRNAs, disminuyendo de esta manera la carga impuesta sobre el RE (Fig. 2B) (Hetz et al., 2020).

Por su parte ATF6, al igual que IRE1 y PERK, permanece en su forma inactiva mediante la asociación con BiP, pero a diferencia de estos, el mecanismo de activación de ATF6 no está totalmente dilucidado (Glembotski et al., 2019). En términos generales, lo que se sabe de este mecanismo es que la disociación directa de BiP libera al sensor, este viaja hasta el aparato de Golgi donde es clivado por las proteasas de sitio 1 (S1P) y de sitio 2 (S2P). La acción de estas proteasas libera al citosol el dominio N-terminal de ATF6, el cual actúa como un potente factor de transcripción. El factor de transcripción ATF6 induce genes relacionados con el aumento en la síntesis de chaperonas, la activación de ERAD e induce la transcripción de *Xbp1*, lo que hace a ATF6 un regulador de la vía IRE1-XBP1 (Fig. 2C) (Flores-Santibáñez et al., 2019).

En células cuya función requiere de una alta demanda secretora, como es el caso de la células inmunes, particularmente las células dendríticas, el correcto desarrollo y funcionamiento del RE y por ende la señalización y coordinación orquestada por las tres ramas de la UPR son esenciales.



**Figura 2. Activación de las vías de la UPR**

Ante condiciones de estrés, donde se produce una acumulación de proteínas mal plegadas se produce la activación de las tres vías de la UPR. (A) PERK, al disociarse de BiP, dimeriza y se autotransfosforila, y fosforila la subunidad eIF2α, lo que impide el ensamblaje del ribosoma. Así también se induce la traducción del factor de transcripción ATF4, el cual se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, respuesta antioxidante, autofagia y apoptosis celular. (B) Bip se disocia de IRE1, permitiendo su dimerización y autotransfosforilación. Esto activa el dominio RNasa de IRE1 que media el splicing alternativo de Xbp1u para producir el mRNA Xbp1s el cual codifica un potente factor de transcripción, XBP1, el cual transloca al núcleo e induce la transcripción de genes relacionados con la producción de chaperonas, biosíntesis lipídica y la activación de ERAD. Ante un estrés sostenido, IRE1 oligomeriza y la actividad de RIDD permite la degradación de un conjunto limitado de mRNAs y microRNAs. (C) ATF6, se activa al disociarse de BiP. Este es liberado, viaja hacia el Golgi, donde es procesado por las enzimas de S1P y S2P. El fragmento generado actúa como un factor de transcripción potente, que transloca al núcleo e induce la transcripción de genes vinculados con la producción de chaperonas, activación de ERAD y la transcripción de Xbp1. *Adaptado de (Grootjans et al., 2016)*

### Factor de transcripción activador 6 (ATF6)

Como se mencionó anteriormente, el factor de transcripción activador 6 (ATF6, de sus siglas en inglés *Activating Transcription Factor 6*) es la vía de la UPR menos estudiada

y de la que poco se conoce sobre su contribución, particularmente en las células inmunes.

ATF6 es una proteína transmembrana de tipo II que contiene un factor de transcripción de la familia bZIP (*basic Leucin Zipper*) en su dominio citosólico (Grootjans et al., 2016). En mamíferos se expresan dos proteínas homologas de ATF6, ATF6 $\alpha$  y ATF6 $\beta$ . Dentro del dominio citosólico, ambas isoformas presentan el dominio de unión a DNA conservado. Sin embargo, presentan divergencias en el dominio de activación transcripcional. Aunque ATF6 $\beta$  ha sido poco estudiado, se sabe que ATF6 $\alpha$  es un potente factor de transcripción, mientras que ATF6 $\beta$  es factor de transcripción más débil (Thuerauf et al., 2007). Además, se ha propuesto que ATF6 $\beta$  podría tener una posible función antagónica, inhibiendo la activación de ATF6 $\alpha$ , y actuando como regulador endógeno de la respuesta inducida por ATF6 $\alpha$  (Thuerauf et al., 2004). Sin embargo, esta propuesta ha sido puesta en duda, considerándose que ambos son reguladores positivos en la activación de la vía, lo que se respaldaría en el hecho de que modelos murinos que presentan delección de ambas isoformas son inviables, mientras que las delecciones individuales de una de las isoformas, ATF6 $\alpha$  o ATF6 $\beta$ , genera un individuo que puede desarrollarse normalmente (Yamamoto et al., 2007).

En condiciones basales, ATF6 $\alpha$  (al cual se referirá como ATF6 de aquí en adelante) se encuentra retenido en la membrana del RE como oligómeros unidos a través de enlaces disulfuros y asociados a la proteína BiP. En un contexto de estrés de RE, BiP se disocia de ATF6 y los enlaces disulfuros son reducidos, liberándose los monómeros de ATF6. ATF6 migra hacia al aparato de Golgi donde residen las proteasa de sitio 1 (S1P) y proteasa de sitio 2 (S2P). S1P es una proteasa de serina que escinde selectivamente residuos no básicos, mientras que S2P es una proteasa cuyos substratos pertenecen todos a factores de transcripción de la familia bZIP (Danyukova et al., 2022). Tras la

acción enzimática de estas proteasas, el dominio que actúa como factor de transcripción ATF6 es liberado (Fig. 2C). El factor de transcripción ATF6 transloca al núcleo y se induce la expresión de genes blancos de la vía, los cuales se ha visto están relacionados con la expresión de chaperonas, proteínas involucradas en la vía de degradación ERAD e importantemente, la expresión de Xbp1 (Glembotski et al., 2019).

Dentro de la UPR, ATF6 parece tener un rol más protector que pro-apotótico, a diferencia de las otras vías de la UPR que pueden inducir mecanismos que dirigen el destino celular hacia la apoptosis cuando están sometidas a condiciones de estrés persistentes. Dentro de este rol protector, ATF6 ha sido mayormente estudiado como un posible regulador en la homeostasis de tejidos (Hillary & Fitzgerald, 2018).

De hecho, los estudios del papel de ATF6 en patologías han mostrado un rol importante en enfermedades relacionadas con la disponibilidad de oxígeno en el tejido, tales como isquemia/reperfusión y condiciones cardiovasculares (Glembotski et al., 2019). En condiciones de reperfusión, se ha observado que en tejido cardiaco la sobreactivación de la vía mediada por ATF6 disminuye de manera considerable el daño en el tejido (Blackwood et al., 2019), proponiendo al factor de transcripción como un componente protector contra ese tipo de enfermedades. Resultados similares han sido observados en neuronas y tejido renal (Blackwood et al., 2019; Yu et al., 2017).

Además, estudios recientes han mostrado que ATF6 también está involucrado en la secreción de citoquinas en macrófagos residentes en el hígado. Estas citoquinas afectarían a las células hepáticas provocando un desbalance en los sistemas de reparación del tejido, demostrándose que el silenciamiento de ATF6 en estas células inmunes contribuiría a la disminución en el daño del tejido (Wang et al., 2021).

Por otro lado, se ha visto que ante condiciones de estrés, los factores de transcripción ATF6 y XBP1 tienen la capacidad de formar heterodímeros, lo cual tendría como

resultado un efecto sinérgico en cuanto a la expresión de genes de componentes de la vía de degradación del RE, ERAD, y en la expresión de chaperonas (Yamamoto et al., 2007). Así también, se ha visto que ambas vías tienen la capacidad de regular la biosíntesis de lípidos y la expansión del retículo endoplásmico a través de mecanismos parcialmente diferentes, pudiendo ATF6 dirigir la biosíntesis de lípidos y aumentar el tamaño del RE en condiciones de estrés, de manera independiente de XBP1 (Bommiasamy et al., 2009).

En general, los estudios reportados en literatura sobre la vía de ATF6 están enfocados en cómo afecta o contribuye la activación de esta vía en enfermedades que provocan daño tisular. Su rol en contextos basales y particularmente en células que participan de la respuesta inmune ha sido pobremente abordado. Por otro parte, la activación constitutiva de IRE1 en las cDC1s denota la importancia de esta vía en estas células. Ha sido bien reportado que la ausencia de XBP1 en las cDC1s induce la apoptosis de estas células residentes de pulmón, mientras que en intestino la actividad de RIDD, inducida por la ausencia de XBP1, promueve su sobrevivencia. Por lo tanto, el eje IRE1-XBP1 ha sido considerado como un nuevo regulador de la homeostasis de las cDC1s, pero se desconoce si miembros adicionales de la UPR podrían tener una función similar. Bajo este contexto y dado que ATF6 controla la expresión de Xbp1, la vía mediada por ATF6 podría ser fundamental en la acción coordinada entre ambas vías que permitirían el correcto desarrollo y sobrevivencia de las cDC1s. Así, el objetivo de este trabajo fue contribuir con nuevos hallazgos dentro de esta área, enfocándonos en dilucidar como la deficiencia de ATF6 afecta la sobrevivencia y algunos aspectos del desarrollo fenotípico y funcional de las células dendríticas.

## **Hipótesis**

ATF6 regula la frecuencia de las cDC1 residentes de bazo, lamina propia del intestino delgado y pulmón, además de contribuir a la producción de citoquinas ante estímulos inflamatorios en este tipo celular.

## **Objetivo general**

Comparar el rol entre los ejes ATF6 y XBP1 en la frecuencia de células dendríticas convencionales, y determinar el papel de ATF6 en la expresión de moléculas coestimuladoras y producción de citoquinas en estas células, en condiciones basales e inflamatorias, respectivamente.

## **Objetivos específicos**

1. Identificar y cuantificar poblaciones de células dendríticas convencionales residentes de bazo, pulmón, timo y lamina propia del intestino delgado en modelos murinos transgénicos deficientes para XBP1 y ATF6.
2. Determinar el rol del sensor ATF6 en la expresión de moléculas coestimuladoras en las cDCs en condiciones homeostáticas.
3. Determinar el rol de ATF6 en la producción de citoquinas en las cDCs en contexto inflamatorio, inducido por la administración de los agonistas virales poly I:C (agonista de TLR3 específico de cDC1s) y R848 (agonista de TLR7 específico de cDC2).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Medios de Cultivo y Ratones

### 1.1 Medios de cultivo, buffers y soluciones

1. Medio RPMI 1640 (Gibco, Thermofisher Scientific)
2. Buffer de lisis RBC (Biolegend)
3. PBS 1X pH 7.4 (Gibco, Thermofisher Scientific)
4. FACS Buffer: PBS 1X pH 7.4 suplementado con 1% Suero Fetal de Bovino (SFB) (Gibco, Thermofisher Scientific) y 2 mM de EDTA (Ambion, Thermofisher Scientific)
5. Magnisort: PBS 1X, 3%SBF, 10mM EDTA
6. RPMI 10%SFB: RPMI 1640 suplementado con 10% SFB (Gibco, Thermofisher Scientific)
7. PBS 10%SFB: PBS 1X pH 7.4 suplementado con 10% SFB (Gibco, Thermofisher Scientific)
8. Medio R10:RPMI+Glutamax, 10%SBF, 1X Penicilina/estreptomicina, 50µM β-mercaptoetanol.
9. Medio SFM: RPMI 1640 1X 25mM HEPES (Corning), 0,1% β-mercaptoetanol 1000X
10. Medio SFM1: 20ml SFM, 200ul EDTA 0,5M, 18,8ul DTT 1M (Para el tratamiento de un intestino)
11. Medio SFM2: 20mL SFM, 80ul EDTA 0,5M (Para el tratamiento de un intestino)
12. Medio SFM +3%SFB: SFM suplementado con 3% SFB.
13. Medio SFM+LIB: 12ml SFM, ¼ de pastilla de liberasa TM Research grade (12,5mg/ml), 6ul DNasa I 10mg/ml. (Para el tratamiento de un intestino)
14. Colagenasa D, 10mg/ml (Roche, Merk)
15. Liberasa TM Research Grade, 1mg/ml (Roche, Merk)
16. Liberasa TM Reasearch Grade, pastillas sin reconstituir (Roche, Merk)
17. DNasa I, 10mg/ml (Roche, Merk)
18. Percoll 100%: 3,6ml Percoll (GE Healthcare), 0,35 ml HBSS 10X, 0,04ml HEPES 1M, 0,018% HCl 1N (4ml aprox. por intestino)
19. Percoll 40%: Percoll 100% diluido al 40% con HBSS 1X
20. Percoll 75%: Percoll 100% diluido al 75% con HBSS 1X

### 1.2 Ratones

Se utilizaron ratones ATF6<sup>fl/fl</sup> (ATF6 *WT*) que poseen sitios loxP que flanquean los exones 8-9 del gen del factor de transcripción activador 6 (Engin et al., 2013) y ratones Itgax-Cre (Cd11c-Cre) × ATF6<sup>fl/fl</sup> (ATF6 *KO*), los cuales son deficientes para ATF6 específicamente en células dendríticas. Se utilizaron también ratones XBP1<sup>fl/fl</sup> (XBP1

*WT*) y ratones Itgax-Cre (Cd11c-Cre) × XBP1<sup>fl/fl</sup> (XBP1 *KO*), que utiliza la misma tecnología Cre-LoxP para la delección del exón 2 del gen codificante para XBP1.

Se utilizaron ratones de entre 10 y 14 semanas de edad, siendo la colonia establecida y mantenida en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida.

El manejo de los animales presentado en este trabajo se realizó de acuerdo con los protocolos de bioética establecidos en la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

## **2. Preparación de suspensiones celulares a partir de tejidos**

El estudio de las poblaciones inmunes en tejidos se realizó tanto en ratones ATF6 (*WT* y *KO*) como en ratones XBP-1 (*WT* y *KO*) utilizando la metodología de procesamiento descrita a continuación para cada tejido en ambos modelos murinos.

### **2.1 Obtención de células a partir de bazo**

Para la obtención de células inmunes en bazo se aislaron los órganos de cada ratón y fueron puestos en un tubo con 100ul de PBS 10%SFB cada uno. Cada órgano fue picado con tijeras en trozos pequeños de forma de obtener una suspensión lo más homogénea posible. Posteriormente, se agregó 1ml de PBS 10%SFB y se traspasó la muestra a un tubo de 15ml (Falcon®, BD), agregando PBS 10%SFB hasta alcanzar un volumen de 4,5ml. Tras esto, se agregaron las enzimas de digestión: 500ul de colagenasa D (10mg/ml) y 25ul de DNasa I (10mg/ml), y las muestras fueron incubadas en baño termostático a 37°C durante 30 minutos. Luego de la incubación, la suspensión fue filtrada a través de un *cell strainer* 70 µm (Falcon®, BD) y centrifugada a 600 x g durante 7 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 2ml de buffer de lisis RBC e incubado a 4°C durante 5 minutos, agitando frecuentemente.

Posteriormente, para detener la reacción del buffer de lisis, se diluyó la muestra en la razón 1:5 con PBS 10%SFB y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 5ml de RPMI 10%SFB.

Para el conteo celular, se realizó una dilución 1:20 de la muestra obtenida y las células fueron contadas mediante tinción de viabilidad con azul de tripan (en una relación 1:1) utilizando una cámara de Neubauer.

## **2.2 Obtención de células a partir de pulmón**

Se aislaron pulmones de los ratones evitando la ruptura del tejido. Una vez extraído el órgano, este fue puesto en un tubo de 1,5ml con 100ul de RPMI 1640 y fue picado con ayuda de tijeras hasta obtener pequeños trozos. A la muestra picada, se agregó 1ml de RPMI1640 y fue trasvasijada a un tubo de 15ml (Falcon®, BD), llevando la muestra a un volumen final de 4,9ml con el mismo medio. Posteriormente, se agregaron 100ul de Liberasa (1mg/ml) y 25 ul de DNasa (10mg/ml) y se incubó la muestra en baño termostático a 37°C durante 30 minutos. Durante el tiempo de incubación, la muestra fue frecuentemente resuspendida con ayuda de una pipeta Pasteur disgregando el tejido. Luego de la incubación, la suspensión fue filtrada a través de un *cell strainer* 70 µm (Falcon®, BD) y centrifugada a 600 x g durante 7 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 2ml de buffer de lisis RBC e incubado a 4°C durante 5 minutos, agitando frecuentemente. Posteriormente, se diluyó la muestra en la razón 1:5 con RPMI 10%SFB y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 5ml de RPMI 10%SFB.

Para el conteo celular, se realizó una dilución 1:10 de la muestra obtenida y las células fueron contadas mediante tinción de viabilidad con azul de tripan (en una relación 1:1) utilizando una cámara de Neubauer.

### **2.3 Obtención de células a partir de intestino**

Se aislaron intestinos de los ratones recuperando el intestino delgado, descartando el intestino grueso y colon, para la aislación de células de la lámina propia. El tejido recuperado se llevó a una placa Petri con 30ml de HBSS en hielo. Cuidadosamente se limpió el tejido con ayuda de pinzas y tijeras, removiendo el linfonodo mesentérico, grasas y las placas de Peyer. Una vez limpio, se realizó un corte longitudinal a través de todo el tejido, cortándose luego pequeños trozos de 1cm aproximadamente, los cuales fueron incubados en 20ml de medio SFM1 en baño termostático a 37°C, con agitación constante durante 20 min.

Luego de la incubación, se agitó vigorosamente el tejido durante 30seg. y se filtró a través de una malla metálica, recuperando los trozos de tejido y descartando el sobrenadante. Se realizaron dos lavados del tejido con 10ml de medio SMF1 cada uno, agitando vigorosamente durante 30seg. El tejido recuperado es posteriormente incubado en 12ml de medio SMF+LIB a 37°C con agitación constante durante 30 minutos. La muestra fue posteriormente filtrada a través de un *cell strainer* de 100 µm (Falcon®, BD) y lavada con medio SFM +3% SFB hasta completar 40ml. Se centrifugó a 600 x g y 20°C durante 6 minutos. El pellet fue resuspendido en 4ml de percoll 40% en un tubo de 15ml. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se tomaron 2ml de percoll 75% y llevando la punta de la pipeta al fondo del tubo se liberó el contenido, de forma de obtener dos fases claramente separadas. Se centrifugó a 600 x g y 20°C durante 20 minutos, con aceleración/desaceleración 1. Las células de la lámina propia fueron recuperadas desde

la interfase del gradiente de percoll y fueron lavadas con 10ml de RPMI+10%SFB. Se centrifugo a 600 x g 4°C durante 6 minutos. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 1ml de RPMI+10%SFB. Para el conteo celular, se realizó una dilución 1:2 y se utilizó tinción de viabilidad con azul de tripán

### **3. Purificación mediante separación inmunomagnética**

Para obtener muestras más enriquecidas en cDCs, se realizó la purificación de muestras de bazo completo mediante separación inmunomagnética (MACS® *Cell Separation*, Miltenyi Biotec). Para ello, los bazos fueron procesados de acuerdo al protocolo de digestión descrito previamente. El total de la suspensión obtenida del tejido fue centrifugada a 600 x g 4°C durante 7 minutos y resuspendida en 150ul de magnisort y 1ul de FcBlock, incubando a 4°C y oscuridad durante 15 minutos. Sin realizar lavados, se agregaron 150ul de mix de anticuerpos CD3 y B220 conjugados a biotina y se incubó incubando a 4°C y oscuridad durante 15 minutos más. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó lavado con 1 ml de magnisort y se centrifugó la suspensión en las mismas condiciones anteriores. El pellet obtenido fue resuspendido en 300ul de magnisort y se agregaron 50ul de microbeads anti-biotina (Miltenyi Biotec) incubando 15 minutos a 4°C y en oscuridad, vortexeando la suspensión frecuentemente. Luego de la incubación, se realizó un lavado con 1 ml de magnisort, centrifugando en las mismas condiciones anteriores y se resuspenden las células obtenidas en 1 ml de magnisort.

Para la separación, se utilizaron columnas de separación (LS Columns) dispuestas en magneto (QuadroMACS™ Separator) y tubos de 15 ml para recibir la muestra purificada. Antes de agregar la muestra, la columna fue cebada con 1 ml de magnisort, posteriormente se agregó la muestras y se realizaron 3 lavados con 3 ml de magnisort cada uno dejando en todos ellos que la muestras eluyan sin generar presión. La fracción

negativa es rescatada en el tubo receptor y se realizó conteo celular en una dilución 1:2 utilizando tinción de viabilidad con azul de tripán. Posteriormente la muestra es centrifugada para realizar el marcaje correspondiente.

#### **4. Estimulación con agonistas virales**

Para estudiar la producción de citoquinas en contextos inflamatorios, se estimularon células provenientes de bazo con los agonistas virales Poly I:C (*polyinosine-polycytidylic acid*) (Invivogen) y R848 (Resiquimod) (Invivogen). Para ello los bazos fueron procesados de acuerdo al protocolo definido para ello y posteriormente las muestras fueron enriquecidas mediante separación inmunomagnética. Una vez purificadas las muestras, estas fueron plaqueadas en medio R10 en una concentración de  $2,0 \times 10^6$  cels/ml. Para el tratamiento con Poly I:C se utilizó una concentración de 10µg/ml mientras que para el tratamiento con R848 se utilizó una concentración de 5µg/ml. Las células fueron incubadas durante 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrida la primera hora, se agregó a todas las muestras BFA (Brefeldina A) en una concentración 1:1000, para evitar la secreción de las citoquinas y se volvió a incubar las muestras durante 3 horas más, completando un periodo de incubación total de 4 horas. Posterior a la incubación, se realizó el marcaje de las muestras para ser analizadas mediante citometría de flujo. A modo de control en contexto basal, se incubaron paralelamente células sin tratar en las mismas condiciones expuestas anteriormente.

#### **5. Citometría de Flujo multiparamétrica y *Cell Sorting***

Para el análisis mediante citometría de flujo, se realizó el marcaje de entre 2 a 5 millones de células. Una vez separado el total de células a marcar, estas fueron centrifugadas a

600 x g durante 7 minutos a 4°C para retirar el medio de la suspensión. Para el caso del estudio de poblaciones inmunes, las células fueron resuspendidas en 150ul de PBS con la sonda de viabilidad ZombieUV-BUV496 (Tabla 1), incubando a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. Tras la incubación, se realizó un lavado con 500ul de FACS buffer y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 50ul de Fc-block (Tabla 1) incubando a 4°C y oscuridad durante 15 minutos. Para los estudios de carácter funcional, el marcaje se inició incubando las células en Fc-Block bajo las mismas condiciones antes mencionadas, siendo la sonda de viabilidad (Zombie Green-FIT-C (Tabla 1)) incorporada posteriormente en conjunto con el mix de anticuerpos. Transcurrido al tiempo de incubación del bloqueador de receptores Fc, se agregó el mix de anticuerpos correspondiente (Tabla 2) y se incubó a 4°C y oscuridad durante 15 minutos. Luego del periodo de incubación, se realizó un lavado con 500ul de FACS buffer y se centrifugó resuspendiendo el pellet final en 200ul de FACS buffer.

Para el caso de los anticuerpos conjugados a biotina, se realizó una incubación adicional de la muestra con 100ul de FACS buffer con estreptavidina (Tabla 2) en las mismas condiciones utilizadas para el mix de anticuerpos.

**Tabla 1. Sondas viabilidad y bloqueador utilizados**

Sonda/anticuerpo	Fluoróforo	Dilución	Marca
<b>Zombie Green</b>	FIT-C	1/1000	Biologend
<b>Zombie UV</b>	BUV496	1/500	Biologend
<b>Fc- Block (CD16/32)</b>	-	1/400	Biologend

Todas las muestras fueron finalmente filtradas a través de nital antes de realizar la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo, metodología a través de la cual se identificaron las diferentes poblaciones celulares (Tabla 3).

La adquisición y análisis inicial de las muestras fue realizado en el citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences) y los análisis subsecuentes utilizando el software FlowJo10.4 (FlowJo, LLC).

Para el *cell sorting*, se realizaron suspensiones celulares a partir de bazo completo, siguiendo el protocolo de digestión descrito previamente, y se realizó una purificación previa mediante la depleción de células CD3<sup>+</sup> y B220<sup>+</sup> por separación inmunomagnética. La muestra obtenida fue marcada utilizando anticuerpos de superficie (Tabla 2) que permitieron discriminar leucocitos (CD45) linfocitos B, T y la identificación de cDC1s y cDC2s (Tabla 3). El *sorting* de células fue realizado en el *cell sorter* FACS Aria III (BD Biosciences) y los análisis subsecuentes utilizando el software FlowJo10.4 (FlowJo, LLC)

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados para marcajes**

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Dilución	Marca
<b>Marcadores para identificación de poblaciones inmunes</b>				
<b>XCR1</b>	PE	ZET	1/400	Biolegend
<b>B220</b>	PE-Cy5	RA3-6B2	1/1600	Biolegend
<b>CD3</b>	PE-Cy5	145-2C11	1/400	Biolegend
<b>CD4</b>	PE/Dazzle 594	GK1.5	1/1600	Biolegend
<b>Sirp-<math>\alpha</math></b>	PE-Cy7	P84	1/400	Biolegend
<b>CD103</b>	PE-Cy7	2E7	1/200	Biolegend
<b>CD11c</b>	APC	N418	1/800	eBioscience
<b>CD45</b>	AlexaFluor700	30-F11	1/1600	Biolegend
<b>Ly6G</b>	AlexaFluor700	1A8	1/800	Biolegend

<b>MHC-II</b>	APC-Cy7	M5/114.15.2	1/1600	Biologend
<b>CD8</b>	eFluor450	53-6.7	1/1500	eBioscience
<b>CD11b</b>	Brilliant Violet 421	1/800	M1/70	Biologend
<b>B220</b>	Brilliant Violet 510	1/400	RA3-6B2	Biologend
<b>CD3</b>	Brilliant Violet 510	1/200	145-2C11	Biologend
<b>Ly6C</b>	Brilliant Violet 605	HK1.4	1/200	Biologend
<b>NK1.1</b>	Brilliant Violet 650	PK136	1/100	Biologend
<b>XCR1</b>	Brilliant Violet 650	ZET	1/400	Biologend
<b>CD64</b>	Brilliant Violet 711	X54-5/7.1	1/100	Biologend
<b>CD11c</b>	Brilliant Violet 711	N418	1/800	Biologend
<b>CD11b</b>	Brilliant Violet 785	M1/70	1/800	Biologend
<b>CD45</b>	Brilliant Ultraviolet 395	30-F11	1/800	BD Biosciences
<b>Estreptavidina</b>	Brilliant Ultraviolet 737	-	1/100	BD Biosciences
<b>F4/80-Biotina</b>	-	BM8	1/100	Biologend
<b>B220-Biotina</b>	-	RA3-6B2	1/100	Biologend
<b>CD3-Biotina</b>	-	145-2C11	1/200	Biologend
<b>Marcadores para identificación de moléculas coestimuladoras</b>				
<b>CD274 (PD-L1)</b>	PE	MIH5	1/200	Invitrogen
<b>CD86</b>	PE-Cy7	GL-1	1/400	Biologend
<b>CD40</b>	APC	3/23	1/200	Biologend
<b>Marcadores para identificación de Citoquinas</b>				
<b>IL-6</b>	PE	MP5-20F3	1/100	Biologend
<b>IL-12</b>	eFluor660	C17.8	1/200	eBioscience
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	APC	MP6-XT22	1/200	Biologend

**Tabla 3. Fenotipo de células inmunes identificadas en tejidos**

<b>Tipo celular</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Linaje</b>	<b>Marcador</b>
<b>Dendrítica convencional de tipo 1</b>	cDC1	Mieloide	XCR-1 <sup>+</sup> ( <sup>1</sup> )
<b>Dendrítica convencional de Tipo 2</b>	cDC2	Mieloide	Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup> ( <sup>2</sup> )
<b>Monocito</b>	-	Mieloide	Ly6C <sup>+</sup>
<b>Macrófago</b>	Macs	Mieloide	F4/80 <sup>+</sup> , CD64 <sup>+</sup>
<b>Neutrófilo</b>	-	Mieloide	Ly6G <sup>+</sup>
<b>Eosinófilo</b>	-	Mieloide	F4/80 <sup>+</sup> , SSC High
<b>Linfocito B</b>	LB	Linfoide	B220 <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup>
<b>Linfocito T</b>	LT	Linfoide	CD3 <sup>+</sup>
<b>Célula <i>Natural Killer</i></b>	NK	Linfoide	NK1.1 <sup>+</sup>
<b>Célula T <i>Natural Killer</i></b>	NKT	Linfoide	CD3 <sup>+</sup> , NK1.1

La identificación de DCs en el intestino (LP-ID) se realizó mediante los marcadores CD103 y CD11b (<sup>1</sup>)En LP-ID las cDC1 fueron identificadas como CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>. (<sup>2</sup>)Las cDC2 en LP-ID fueron identificadas como CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup>.

## **6. Marcaje intracelular de citoquinas**

Para el estudio de la síntesis de citoquinas, se realizó el marcaje intracelular de citoquinas en células de bazo. Para ellos, luego de realizar la tinción extracelular, se realiza lavado con 500ul de FACS buffer y se centrifugan las muestras a 600g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizó la fijación y permeabilización de las células resuspendiéndolas en 200  $\mu$ L de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) e incubando durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Se realizó un lavado con 800  $\mu$ L de Permash 1X (BD Biosciences) y se centrifugó a 700 x g durante 7 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizó la incubación con los anticuerpos para el marcaje intracelular diluidos en 50  $\mu$ L de Permash 1X durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células fueron lavadas con 500  $\mu$ L de Permash 1X, centrifugadas a 700g por 7 minutos a 4°C y se resuspendidas en 200  $\mu$ L de FACS buffer para ser analizadas en el citómetro.

## **7. Extracción RNA y qPCR**

A partir de células dendríticas sorteadas provenientes de bazo de ratones ATF6 *WT* y ATF6 *KO*, se realizó la extracción de RNA utilizando el kit RNeasy Plus Micro (QIAGEN), siguiendo los protocolos indicados por el fabricante. Una vez obtenido el RNA, este fue cuantificado por espectrofotometría (NanoDrop™ Lite Thermo Scientific™). Se sintetizó el cDNA a partir de entre 25 a 100ng del RNA extraído en cada muestra, utilizando el kit de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen®, Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación del material genético, se realizó PCR en tiempo real utilizando el kit SYBR-Green I (Invitrogen®, Life Technologies), la polimerasa GoTaq Flexi y los partidores indicados en la Tabla 4. Las lecturas de las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron en el equipo LightCycler® 480 de Roche. Para la normalización de la expresión génica de los genes estudiados se utilizó como control interno el gen codificante para RPL27.

## **8. Softwares y análisis estadístico**

Para el análisis y compensación de datos obtenidos por citometría de flujo, se utilizó el programa FlowJo 10.4 (FlowJo, LLC). Para la realización de los análisis estadísticos, se utilizó el programa GraphPad Prism 9, utilizando el test no paramétrico Mann Whitney y el test One Way ANOVA con comparación múltiple de Tukey, fijando para todos los casos analizados la significancia del P valor en 0,05.

Para la representación de los datos a través de un *heatmap* se utilizó el software RStudio Version 1.3.959, fijando los valores inferior y superior para el gradiente en base a los valores extremos de media de fluorescencia obtenidos de todos los tejidos analizados.

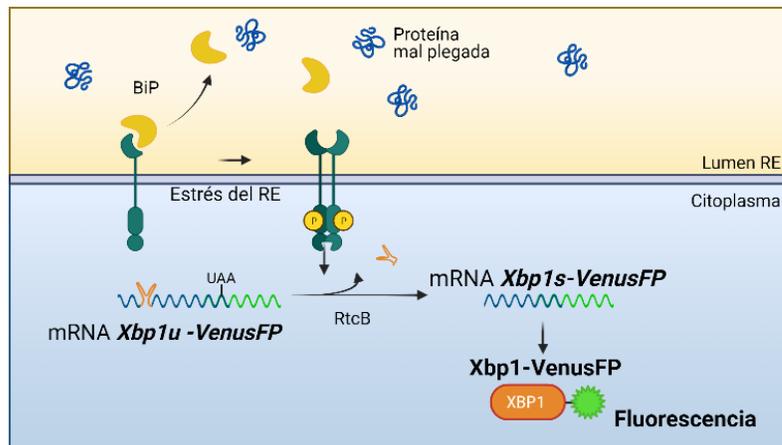
**Tabla 4. Partidores utilizados para qPCR**

<b>Gen</b>		<b>Secuencia</b>
<b>L27</b>	Fwd	GCCAAGCGATCCAAGATCAA
	Rev	GCTGGGTCCCTGAACACATC
<b>ATF6<math>\alpha</math></b>	Fwd	ACCATGTGGTGAATGTGCTG
	Rev	TTCTTCTTGC GCGACTGACA
<b>ATF6<math>\beta</math></b>	Fwd	ACTAACCACAGTTCCGGTGC
	Rev	GGCATAGGGGCTGGAACAAT
<b>HerpUD</b>	Fwd	AGCAGCCGGACA ACTCTAAT
	Rev	CTTGAAAGTCTGCTGGACA
<b>XBP-1 exon2</b>	Fwd	CAGCAAGTGGTGGATTTGG
	Rev	CGTGAGTTTTCTCCCGTAAAAG
<b>GRP94</b>	Fwd	AATAGAAAGAATGCTTCGCC
	Rev	TCTTCAGGCTCTTCTTCTGG
<b>BIP</b>	Fwd	ATGAGGCTGTAGCCTATGGTG
	Rev	GGGGACAAACATCAAGCAG
<b>Erdj4</b>	Fwd	CCCCAGTGTCAA ACTGTACCAG
	Rev	AGCGTTTCCAATTTTCCATAAATT
<b>Edem1</b>	Fwd	AAGCCCTCTGGA ACTTGCG
	Rev	AACCCAATGGCCTGTCTGG
<b>CHOP</b>	Fwd	CCACCACACCTGAAAGCAG
	Rev	TCCTGCAGATCCTCATACCAG
<b>GADD34</b>	Fwd	GAGATTCCTCTAAAAGCTCGG
	Rev	CAGGGACCTCGACGGGCAGC
<b>ATF4</b>	Fwd	ATGGCCGGCTATGGATGAT
	Rev	CGAAGTCAA ACTCTTTTCAGATCCATT
<b>CD18</b>	Fwd	AACGAGATCACCGAGTCTGG
	Rev	CAGGCCTTCTCCTTGTGG
<b>Bloc1s1</b>	Fwd	CACCCAGCCAGACTCGAC
	Rev	GCAGCGATAGCTTCTCTCCTC

## RESULTADOS

### **Las cDC1 presentan el mayor nivel de activación de la vía IRE1-XBP1**

Dado que ATF6 ha sido reportado como un regulador de XBP1, inicialmente nos enfocamos en estudiar los niveles de activación del eje IRE1-XBP1 en cDCs y otras células inmunes en tejidos de bazo, timo, pulmón y lamina propia del intestino delgado. Estudios previos han mostrado que las cDC1 provenientes de bazo presentan una activación constitutiva del eje IRE1-XBP1 (Osorio et al., 2014), es decir, bajo condiciones basales, este eje se encuentra activo en estas células. Interesantemente, se ha visto que en tejidos mucosos, como intestino y pulmón, la activación de IRE1-XBP1 en las cDC1s es diferencial, mostrando las cDC1s residentes de intestino altos niveles de activación, mientras que aquellas residentes de pulmón presentan niveles de activación casi tres veces menores a las vistas en intestino (Tavernier et al., 2017a). En nuestro laboratorio, replicamos los estudios de los niveles de activación de la vía IRE1-XBP1 extendiendo estos a un mayor número de poblaciones inmunes. Para ello, se utilizó el modelo murino ERAI (Iwawaki et al., 2004), el cual tiene la característica de ser reportero de la activación del dominio endoribonucleasa de IRE1, utilizando la fusión de la proteína reportera VenusFP río abajo del gen codificante para XBP1 humano. Al ocurrir el *splicing* alternativo de *Xbp1u*, donde son removidos 26 nucleótidos, se produce un cambio en el marco de lectura que genera la escisión del codón de termino de *Xbp1u*, permitiendo la traducción de la proteína de fusión la cual produce fluorescencia que puede ser detectada mediante citometría de flujo (Fig. 3). Utilizando este modelo reportero, se determinaron los niveles de activación del eje IRE1-XBP1 en estado basal en 10 poblaciones inmunes, cuya identificación se realizó mediante una estrategia de selección



**Figura 3. Esquema modelo reportero ERAI**

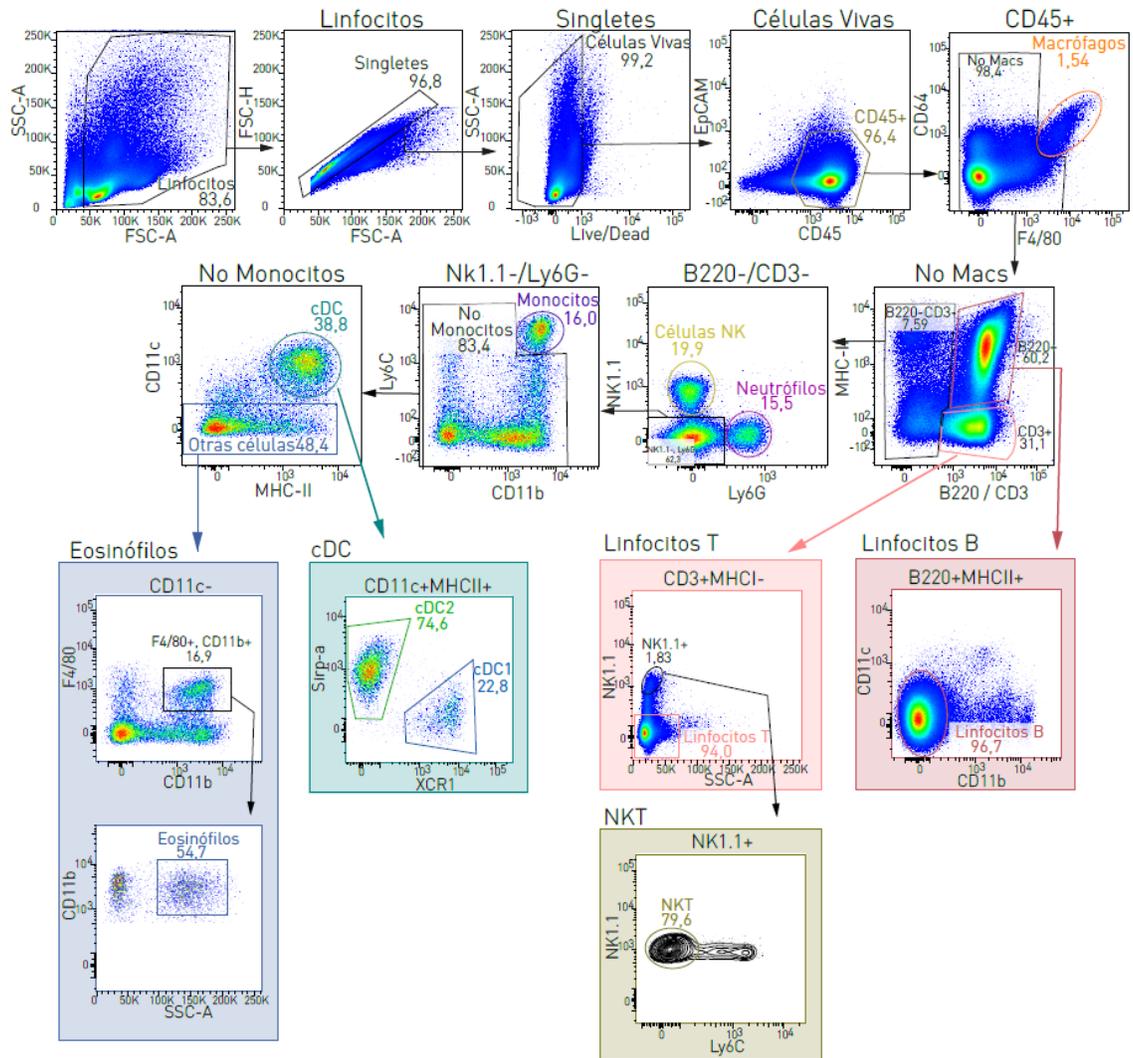
Esquema de la función del ratón reportero ERAI. El esquema muestra que solo cuando se produce el *splicing* alternativo de Xbp1u (*Xbp1-unspliced*) mediado por la actividad RNasa y se produce el corte que genera el cambio en el marco de lectura, se genera el mRNA de Xbp1s (*Xbp1-spliced*) fusionado a VenusFP, el cual es traducido generándose el factor de transcripción XBP1 fusionado a la proteína VenusFP la cual produce fluorescencia.

de poblaciones única (Fig.4), residentes de cuatro tejidos diferentes: bazo, timo, pulmón y lamina propia del intestino delgado (LP-ID). Para los análisis, se realizó la comparación de los niveles de activación de todas las poblaciones identificadas a través de un *heatmap*, donde puede observarse el mayor nivel de activación las cDC1s en comparación a cualquiera de los otros tipos de células inmunes estudiadas. Así también, se hace evidente que los niveles más altos de activación de la vía se observan en las cDC1s residentes de la LP-ID (Fig.5A). Para determinar diferencias estadísticas, se cuantificó la fluorescencia media emitida por cada una de las poblaciones tanto en ratones *WT* como en ratones ERAI, y se determinó la razón entre las medias de fluorescencia ERAI/*WT* a fin de descartar la autofluorescencia propia de las células. Los resultados obtenidos muestran que, pese a que se observa un grado de activación en las células NK y NKT en bazo, pulmón y LP-ID, solo las cDC1s presentan una activación constitutiva del eje en los tejidos y en niveles superiores a los observados en cualquier otra población inmune (Fig. 5B), concordando con lo reportado en la literatura (Osorio et

al., 2014). Niveles significativamente altos de activación fueron observados en las cDC1s de la LP-ID en comparación a los vistos en bazo, timo y pulmón, mientras que las cDC2s residentes de bazo, pese a que presentan niveles de activación muy inferiores a los vistos en las cDC1, presentan diferencias significativas respecto a este mismo tipo celular residentes en otros tejidos (Fig. 5B).

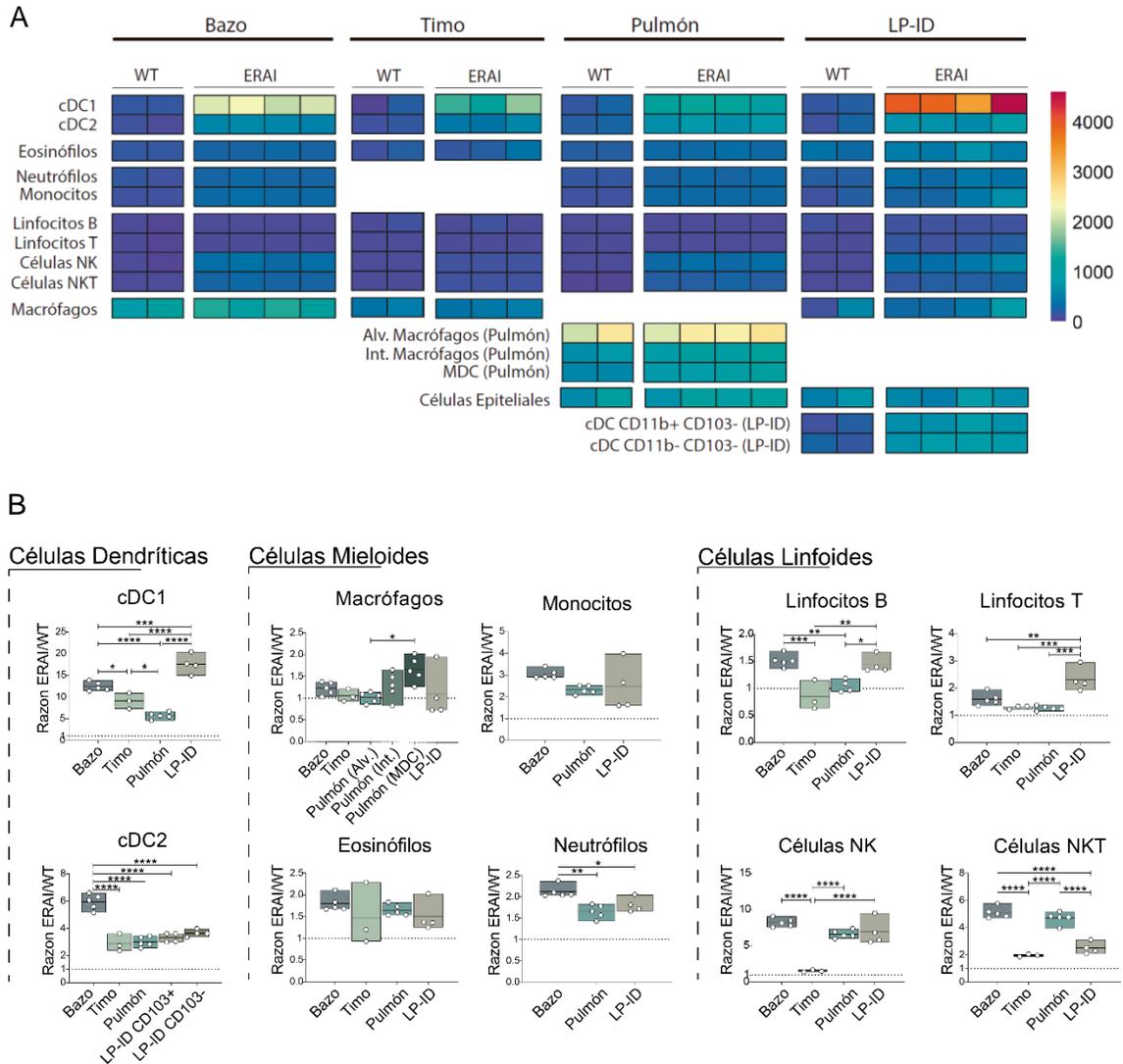
Cabe destacar que en el caso de los macrófagos, los niveles aparentemente altos de activación observados en el *heatmap* (Fig. 5A) corresponden a la autofluorescencia propia de estas células y no a una fidedigna activación del eje (Fig. 5B).

Estos resultados corroboran lo observado en literatura, demostrándose que las cDC1s presentan un estado de activación constitutivo del eje IRE1-XBP1, el cual es sustancialmente mayor al observado en otras poblaciones inmunes, y el grado de activación que presentan es dependiente del tejido de residencia.



**Figura 4. Estrategia de identificación de poblaciones inmunes**

Estrategia de selección representativa para la identificación de poblaciones inmunes. La estrategia mostrada corresponde a poblaciones inmunes residentes de tejido de bazo proveniente de modelo murino ERAI. Estrategias análogas fueron utilizadas para la identificación de las poblaciones en tejidos de timo, pulmón y lamina propia del intestino delgado.



**Figura 5. Activación de IRE1 en poblaciones de células inmunes residentes de tejido**

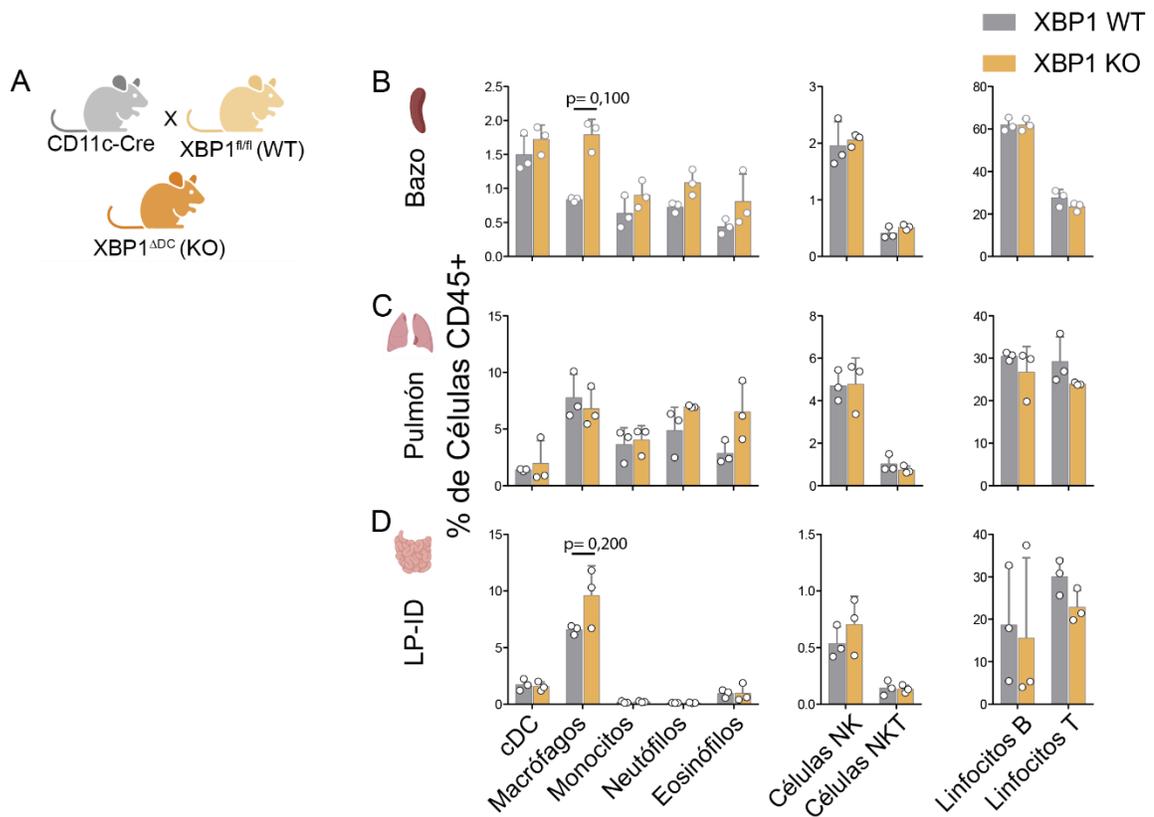
**A.** Heat-map de la media geométrica de fluorescencia de VenusFP de células de linaje mieloides, linfoides y células epiteliales en órganos linfoides y tejido mucoso. Se utilizaron los datos de  $n=2$  ratones WT para todos los tejidos y  $n=4$  para bazo, pulmón y LP-ID y  $n=3$  para timo de ratones ERAI. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes. **B.** Cuantificación de la media geométrica de fluorescencia (gMFI) de VenusFP representada a través de la razón entre la fluorescencia media entre ratones ERAI sobre WT en cada una de las poblaciones analizadas, comparando de acuerdo al tejido de residencia. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose entre 3 a 5 ratones de cada genotipo para el estudio de los diferentes tejidos. Para análisis estadísticos se utilizó test One-Way ANOVA con comparación múltiple de Tukey.  $*P < 0.05$ . Estos experimentos se realizaron en colaboración con Antonia Geisse, tesista de Magister en Ciencias Biológicas y Felipe Flores tesista de Doctorado en Ciencias mención Biología Molecular, Celular y Neurociencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

## **La deficiencia de XBP1 afecta la composición de las cDCs de forma tejido específica**

Estudios previos, han mostrado que la ausencia de XBP1 afecta la población de las cDCs manera diferencial en tejidos mucosos, habiéndose observado que en pulmón existe una pérdida de cDC1s y que las cDC2s no se ven afectadas, mientras que en intestino tanto la población de cDC1s como de cDC2s no se ve mayormente alteradas. (Tavernier et al., 2017a).

Dados los altos niveles de activación del eje IRE1-XBP1 observados en las cDC1s, indicativos de que esta vía tendría un rol crucial en estas células, realizamos un estudio de la frecuencia de las poblaciones de las cDCs y otras poblaciones inmunes en tejidos de bazo, pulmón y LP-ID de ratones deficientes para XBP1. Para estos análisis no se contempló el estudio del timo, debido al bajo número de células obtenidas desde este órgano y al menor tipo de poblaciones inmunes residentes de este tejido que fue posible identificar.

Para este estudio, se utilizó el modelo murino XBP1 *KO* y su contraparte *WT*. La delección que afecta a XBP1 en este modelo es dirigida por el promotor de CD11c, el cual se expresa principalmente en células dendríticas (Fig.6A). En este modelo se realizó el análisis de las mismas 10 poblaciones de células inmunes previamente vistas, residentes en los tres tejidos mencionados anteriormente: bazo, pulmón y LP-ID. El análisis de las diferentes poblaciones de células inmunes fue utilizado a modo de control, a fin descartar que los resultados observados se produzcan por efectos celulares no autónomos generados como consecuencia de la ausencia del factor de transcripción y/o a efectos inespecíficos de la modificación genética del modelo en blancos distintos a las cDCs.



**Figura 6. Cuantificación de células inmunes residentes de tejido en modelo murino deficiente para XBP1**

Frecuencia de células inmunes relativa al porcentaje total de leucocitos (CD45<sup>+</sup>) residentes de tejido. **A.** Esquema representativo de la estrategia de cruce para la generación del modelo XBP1 KO. **B.** Frecuencia relativa a células CD45<sup>+</sup> de células inmunes mieloides y linfoides presentes en tejidos de bazo, **C.** pulmón y **D.** LP-ID de ratones XBP1 WT y KO. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 3 ratones de cada genotipo para el estudio de cada tejido, en un experimento independiente. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney,  $P=0.100$ . Estos experimentos se realizaron en colaboración con Antonia Geisse, tesista de Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Para determinar la existencia de cambios en la frecuencia de cada una de las poblaciones celulares identificadas, se realizó un análisis de la frecuencia relativa de estas poblaciones respecto al total de leucocitos (células CD45<sup>+</sup>) presentes en cada tejido. Los resultados obtenidos muestran que dentro de las poblaciones de células mieloides, distintas de las cDCs, no existen diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia relativa de las poblaciones en los ratones XBP1 WT y KO. Sin

embargo, es posible identificar una tendencia a aumentar en la población de macrófagos residentes de bazo y LP-ID de ratones *KO* en comparación a su contraparte *WT*, comportamiento que no se observa en esta misma población residente de pulmón (Fig. 6B-D).

En el caso de las células linfoides, donde se incluyen las células NK, NKT, Linfocitos B y Linfocitos T, no se observan cambios significativos en las frecuencias de las poblaciones entre los ratones *XBP1 WT* y *KO* en ninguno de los tejidos estudiados (Fig. 6B-D). Estos resultados eran esperados, considerando que la delección de *XBP1* no afecta estos tipos celulares, sin embargo se demuestra con ellos que no existe un efecto no autónomo sobre estas poblaciones.

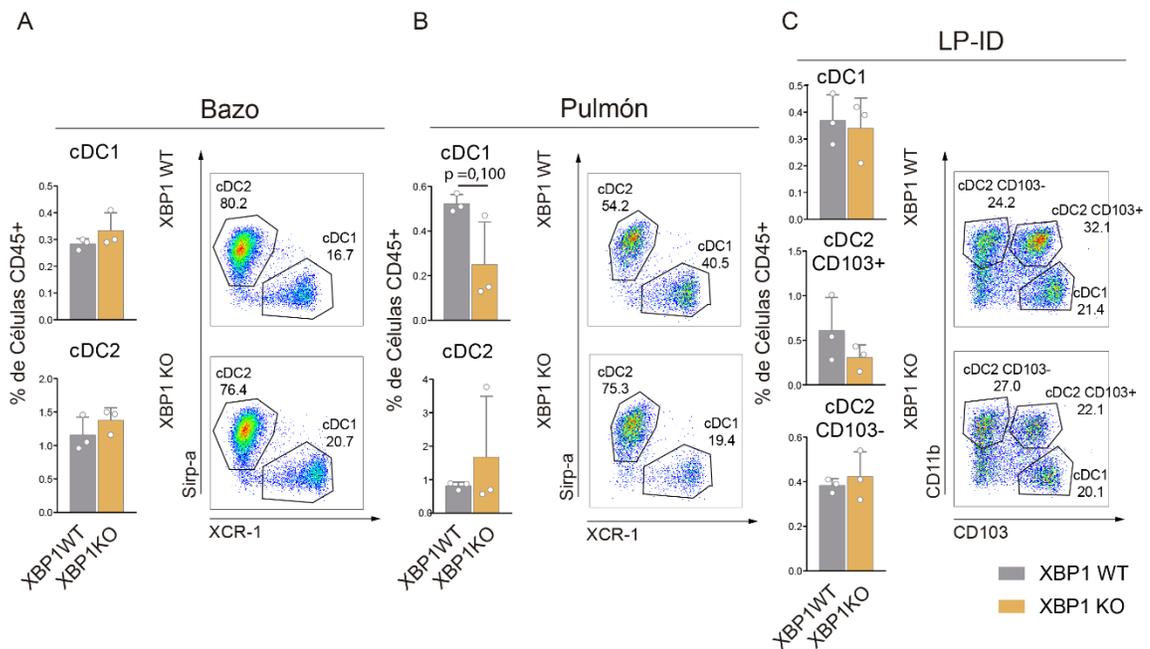
Al cuantificar la población de cDCs, identificada como  $CD11c^+MHCII^+$ , no se observan diferencias significativas en ninguno de los tejidos (Fig. 6B-D). Al diferenciar las poblaciones mediante los marcadores específicos *XCR-1* y *sirp- $\alpha$*  para la identificación de las cDC1s y cDC2, respectivamente, se observa que la población de cDC1s residentes de pulmón (Fig. 7B) presenta una reducción que no es observada en bazo (Fig.7A) ni en la LP-ID (Fig. 7C). Sin embargo, esta reducción no presenta diferencias estadísticamente significativas. La falta de significancia estadística en esta población, puede estar causada tanto por la dispersión de los datos, así como también por el bajo número de muestras analizadas (tres muestras). Durante el transcurso de la revisión de esta tesis, estas observaciones han sido consolidadas con un número mayor de animales generando la diferencia estadística esperada (datos no mostrados). Datos análogos han sido publicados en estudios previos, donde se ha demostrado que esta disminución es estadísticamente significativa (Tavernier et al., 2017a). Estos resultados muestran que las cDC1s residentes de tejidos, en los que la activación del eje *IRE1-XBP1* es mayor, como es el caso del bazo y LP-ID, no ven afectada la frecuencia de la

población en ausencia de XBP1, mientras que en pulmón, donde la activación de esta vía es menor, se produce una reducción de la población (Tavernier et al., 2017a).

En cuanto a las poblaciones de cDC2s residentes de bazo, pulmón y ambas poblaciones de cDC2s de LP-ID (CD103<sup>-</sup> y CD103<sup>+</sup>), la frecuencia relativa al total de leucocitos no se ve alterada (Fig.7). Particularmente en el caso del pulmón (Fig. 7B), las proporción de las cDC2s pareciera aumentar en los animales deficientes para XBP1, desde 54,2% a 75,3%. Sin embargo, esta diferencia en las proporciones de cada población se produce debido a la disminución de la población de cDC1s en los animales XBP1 KO y no a un aumento real de las cDC2s (Fig. 7B).

En términos de frecuencia relativa a células CD45<sup>+</sup>, las cDC1s representan entre un 0,3% y 0,5% del total de leucocitos. Dado que la población de cDC1s es pequeña, las variaciones que puedan producirse en ellas se ven enmascarados al observar las cDCs como una población global (CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>), debido a esto, al observar la población total de cDCs pareciera no existir cambios en la población (Fig.6B)

Los resultados obtenidos, concuerdan con lo visto en literatura, mostrando que la ausencia de XBP1 en las células dendríticas afecta la frecuencia de la población de cDC1s y no de las cDC2s, siendo este efecto dependiente del tejido en el que residen.



**Figura 7. Frecuencia de cDCs residentes en de tejido en modelo murino deficiente para XBP1**

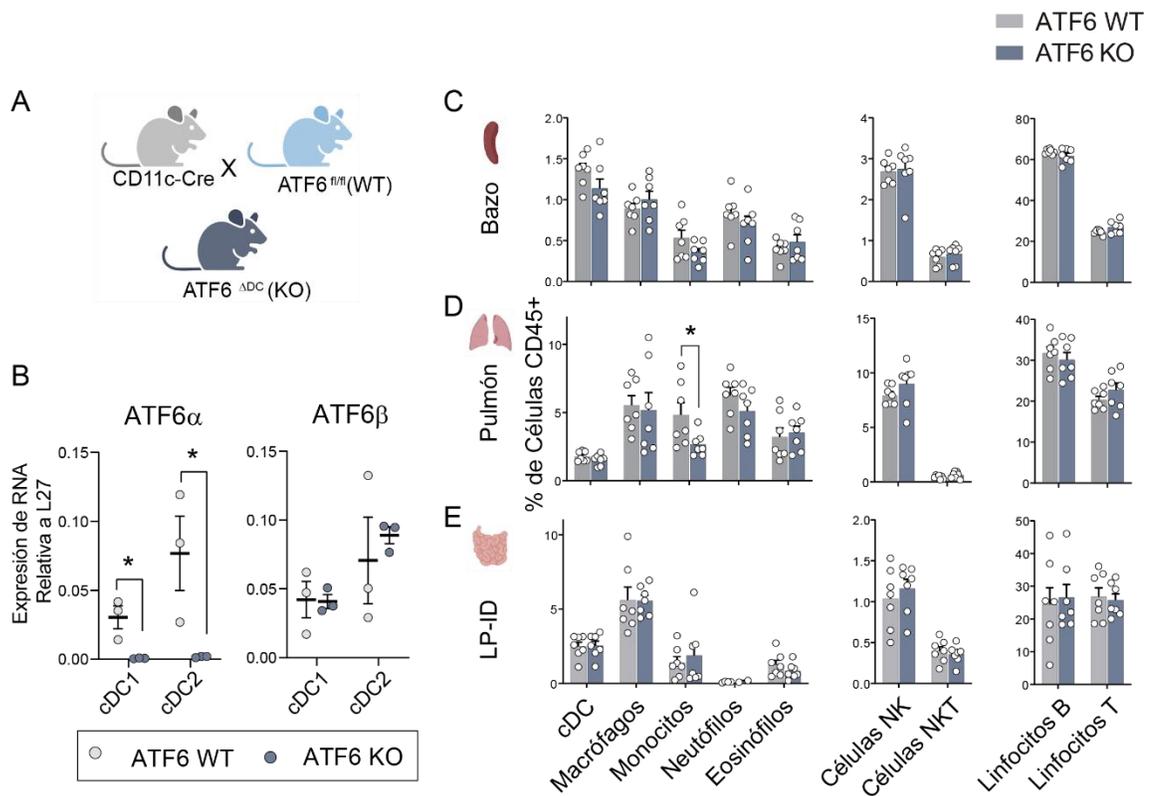
Frecuencia de cDC1s y DC2s relativa al porcentaje total de leucocitos (CD45<sup>+</sup>) residentes de tejidos de **A.** bazo, **B.** pulmón y **C.** LP-ID de ratones XBP1 *WT* y *KO*. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón. Se utilizaron 3 ratones de cada genotipo para el estudio de cada tejido, en un experimento independiente. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney,  $P=0.100$ . Estos experimentos se realizaron en colaboración con Antonia Geisse, tesista de Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

### **La ausencia de ATF6 no afecta la composición de las cDCs en los tejidos**

Para el estudio de la contribución del eje ATF6 en la composición de las células dendríticas, se estableció la colonia ATF6 KO a través de la cruce de ratones *Itgax-Cre* (*Cd11c-Cre*), los cuales expresan la recombinasa Cre en DCs, y ratones ATF6<sup>fl/fl</sup>, que poseen sitios loxP que flanquean los exones 8-9 del gen del factor de transcripción activador 6 (ATF6). El esquema representativo de la cruce se presenta en la Fig.8A. Para validar la ausencia de ATF6 en este modelo, fueron sorteadas células de bazo de ratones ATF6 *WT* y ATF6 *KO*, de acuerdo a la expresión de los marcadores de superficie CD11c, MHC-II, XCR1 y Sirp- $\alpha$  (CD172a) definiéndose las cDC1s como aquellas CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> y las cDC2s como aquellas CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>Sirp- $\alpha$ <sup>+</sup>. A partir de estas células sorteadas, se realizó la extracción de mRNA y se midieron los niveles de expresión del mRNA codificante para los genes *Atf6 $\alpha$*  y *Atf6 $\beta$*  mediante qPCR, observándose una expresión prácticamente nula de *Atf6 $\alpha$*  tanto en cDC1s como en cDC2s de ratones ATF6 *KO*, mientras que la expresión de *Atf6 $\beta$*  no se ve alterada en ninguna de estas poblaciones, comprobándose así que la delección es específica para ATF6 $\alpha$  (Fig. 8B).

Para determinar si la ausencia de ATF6 en cDCs posee un rol no autónomo que pueda afectar a otros tipos de células inmunes, se realizó el mismo análisis de poblaciones inmunes efectuado para los ratones XBP1 *KO*, analizándose la frecuencia relativa al total de leucocitos, de poblaciones de células mieloides y linfoides obtenidas de tejido de bazo, pulmón y lamina propia del intestino delgado.

Los resultados muestran que tanto las poblaciones inmunes de linaje mieloides como linfoides residentes de bazo y lamina propia no son afectadas por la ausencia de ATF6



**Figura 8. Cuantificación de células inmunes residentes de tejido en modelo murino deficiente para ATF6**

Frecuencia de células inmunes relativa al porcentaje total de leucocitos (CD45<sup>+</sup>) residentes de tejido. **A.** Esquema representativo de la estrategia de cruce para la generación del modelo ATF6 KO. **B.** Cuantificación de la expresión relativa a L27 del mRNA para *Atf6 $\alpha$*  y *Atf6 $\beta$*  en cDC1s y cDC2s. La cuantificación fue realizada por qPCR. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 3 ratones para el estudio en dos experimentos independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney. \* $P < 0.05$ .

**C.** Frecuencia relativa a células CD45<sup>+</sup> de células inmunes mieloides y linfoides presentes en tejidos de bazo, **D.** pulmón y **E.** LP-ID de ratones ATF6 WT y KO. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 7 ratones de cada genotipo para el estudio de cada uno de los tejidos, en 3 experimentos independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney.  $P = 0.0379$ . Estos experimentos se realizaron en colaboración con Antonia Geisse, tesista de Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

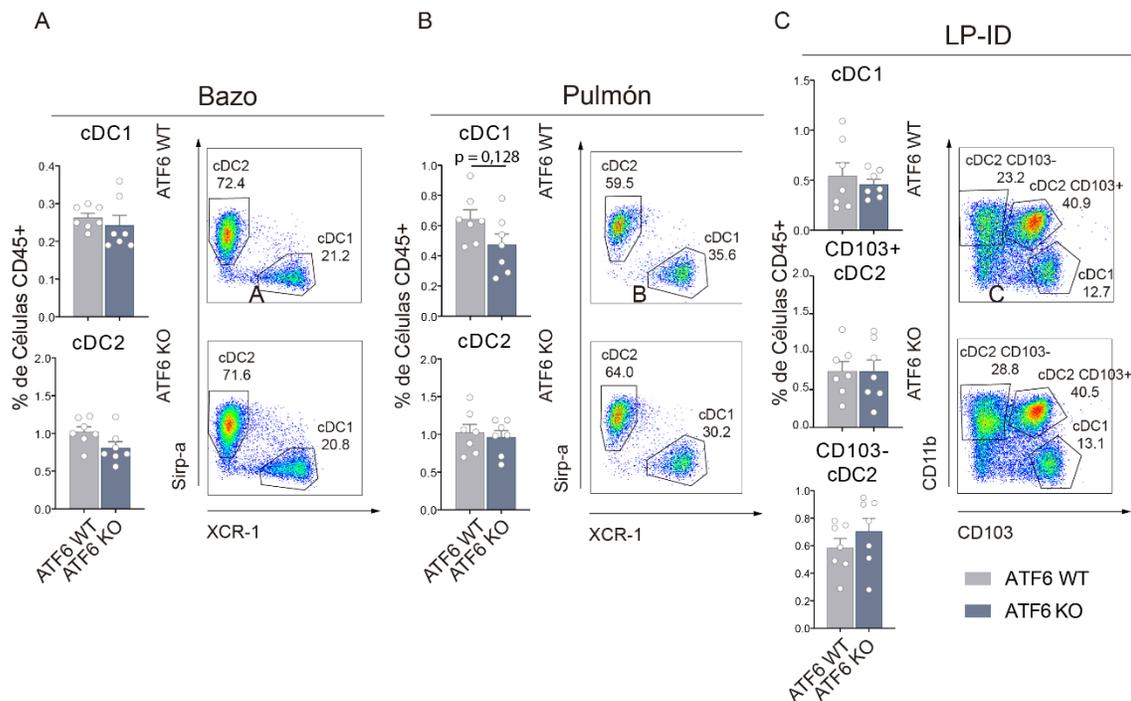
en las células CD11c<sup>+</sup>, observándose en estos tejidos frecuencias de las poblaciones similares entre los genotipos WT y KO (Fig. 8C y E).

Por otro lado, al realizar el análisis de las poblaciones inmunes residentes de pulmón, se observó que la frecuencia de la población de monocitos del modelo deficiente para

ATF6 presenta una disminución significativa respecto a su contraparte *WT*, mientras que la composición del resto de las poblaciones inmunes en este tejido no se ven alteradas (Fig. 8D). Es importante destacar que existe una subpoblación de monocitos que expresa CD11c+ (Gibbings et al., 2017) por lo que no podemos descartar que esta subpoblación sea blanco de la recombinasa Cre, o si la disminución en la población de monocitos podría deberse a un efecto no-autónomo, mediado por DCs. Sin embargo, se requerirían análisis adicionales para corroborar o descartar estas hipótesis.

Al igual que en los análisis efectuados para el modelo *XBP1 KO*, se realizó el análisis de la población de las cDCs diferenciando las cDC1 y cDC2 de acuerdo a sus marcadores específicos XCR-1 y sirp- $\alpha$  (Fig. 9A-C). A diferencia de lo visto en el modelo *XBP1 KO*, no se observaron diferencias en la composición de estas poblaciones en ninguno de los tejidos estudiados.

En base a estos resultados se concluye que, a diferencia de lo esperado, la deficiencia de ATF6 en las cDCs no afecta la frecuencia de la población de cDC1s. Sin embargo, el modelo utilizado si afecta de forma significativa la población de monocitos residentes de pulmón, mostrando que el factor de transcripción ATF6 podría tener un rol importante en la homeostasis de estas células.



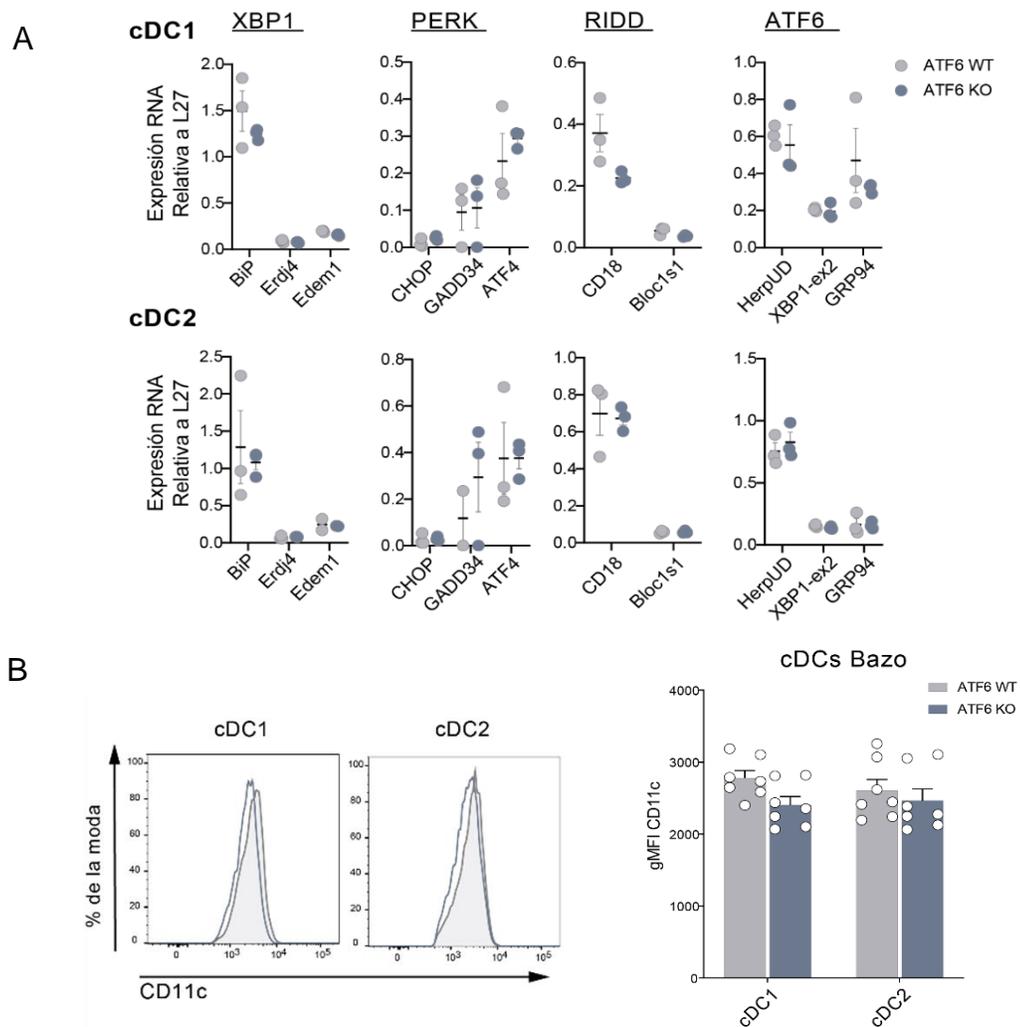
**Figura 9. Frecuencia de cDCs residentes de tejido en modelo murino deficiente para ATF6**

Frecuencia de cDC1s y DC2s relativa al porcentaje total de leucocitos (CD45<sup>+</sup>) residentes de tejido de **A.** bazo, **B.** pulmón y **C.** LP-ID de ratones ATF6 *WT* y *KO*. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 7 ratones de cada genotipo para cada uno de los tejidos estudiados, en 3 experimentos independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney. *P* < 0.128. Estos experimentos se realizaron en colaboración con Antonia Geisse, tesista de Magister en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

### **La expresión de genes blancos de la UPR se conserva en cDCs deficientes para ATF6 $\alpha$**

La UPR orchestra un mecanismo coordinado entre los tres ejes que la componen para mantener la homeostasis proteica. Para determinar si la ausencia de ATF6 en las cDCs tiene algún efecto sobre otras ramas de la UPR, se analizó la expresión de mRNAs de diferentes blancos de las vías de la UPR en estado basal. Los estudios fueron realizados a partir de cDC1 y cDC2 sorteadas de bazo de ratones *WT* y *KO* para ATF6, con el fin de investigar si la sola ausencia de este factor de transcripción genera algún desbalance en la expresión de los genes vinculados a la UPR. Para ello, se realizó extracción de mRNA y se midieron los niveles de expresión mediante qPCR. Para estos análisis se escogieron entre 2 a 3 genes blancos para cada vía de la UPR y se compararon normalizando los datos en base a la expresión del *housekeeping* RPL27.

Los resultados mostraron que tanto en cDC1s como en cDC2s en estado basal, no existen diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes blancos de PERK ni RIDD y, a diferencia de los que se esperaba, la inducción de genes blancos de ATF6 y XBP1 no presentaron variaciones entre los diferentes genotipos. Considerando una actividad basal de cada una de las vías de la UPR, se esperaba que la expresión de al menos algunos de los genes blancos de los factores de transcripción ATF6 (HerpUD, XBP1-ex2 y GRP94) y XBP1 (Erdj4, Edem1) (Fig. 10A) en los animales *KO* para ATF6 fuese nula, cercana a cero, o al menos que su expresión fuese significativamente menor que la observada en los animales *WT*. Sin embargo, los niveles de expresión de estos genes no presentan diferencias significativas en comparación con los controles *WT*, indicando que en las cDCs residentes de bazo la expresión de estos genes podría estar regulada por otras vías compensatorias, o bien que los efectos de ATF6 pueden evidenciarse solo en condiciones de mayor activación



**Figura 10. Expresión basal de genes blancos de la UPR en modelo ATF6 KO**

**A.** Expresión basal de genes de la UPR blancos de las vías IRE1-XBP1, PERK, RIDD y ATF6 relativos al gen RPL27 en cDCs sorteadas de bazo. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 3 ratones de cada genotipo, en dos experimentos independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney,  $P < 0.100$ . **B.** Histogramas representativos de la expresión de CD11c en cDC1s y cDC2s residentes de bazo de genotipos WT y KO. Los histogramas se encuentran normalizados por la moda. Los gráficos de barras representan el promedio ( $\pm$  s.e.m) de la media geométrica de fluorescencia (gMFI) de CD11c de cDC1s y cDC2s residentes de bazo de los genotipos WT y KO. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 7 ratones de cada genotipo para cada uno de los tejidos estudiados, en 3 experimentos independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney.  $P = 0.097$

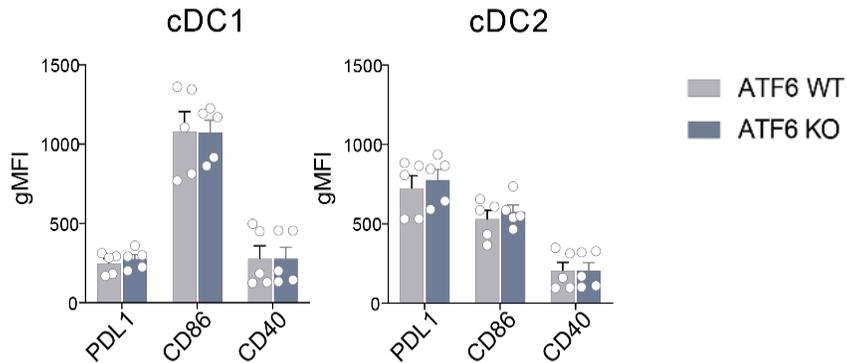
del eje (por ejemplo bajo tratamientos con inductores de la UPR) y no en contextos basales. Así también, se observó que la expresión de estos genes en ambos tipos celulares, cDC1s y cDC2s, es relativamente similar (Fig. 9A). Por otro lado, dado que ATF6 controla la expresión de *Xbp1*, y que la rama IRE1/XBP1 se encuentra constitutivamente activa en cDC1s de bazo, se esperaba que la expresión de los blancos de XBP1 se vieran afectados por la ausencia de ATF6. Sin embargo, no se observaron cambios considerables en su expresión.

Dado que la activación de IRE1, junto con inducir la expresión de XBP1, induce el mecanismo de degradación de mRNAs denominado RIDD, se estudió la expresión de algunos blancos conocidos para esta vía, siendo CD18 uno de ellos. Cuando este mecanismo se encuentra activo, el mRNA codificante para CD18 es degradado y por ende se produce una baja en los niveles de expresión de este. De los resultados obtenidos, pese a que no hay variaciones significativas, se observó una baja en la expresión de CD18 entre los genotipos *WT* y *KO* para ATF6. Este blanco de RIDD además es de gran relevancia en las células CD11c<sup>+</sup>, ya que la integrina CD18 es un *partner* obligado de CD11c, y por tanto una disminución en su expresión conlleva a una baja en la expresión de CD11c. Para determinar si la disminución observada en la expresión de CD18 provoca alguna alteración en los niveles de expresión de CD11c en las cDCs de bazo de ratones ATF6 *KO*, se cuantificaron mediante citometría de flujo los niveles de expresión de CD11c en estas células. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en la expresión de CD11c en las cDC1s ni en las cDC2s. (Fig. 10B). En conjunto, estos resultados muestran que en términos generales los niveles de expresión de los genes blancos de la UPR no se ven alterados en las cDC1s ni en las cDC2s de bazo deficientes en ATF6, al menos en condiciones basales.

### **Características funcionales de las cDCs en ausencia de ATF6**

Las cDCs son las células presentadoras de antígeno por excelencia, siendo claves en la mediación de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa (Sichien et al., 2017). Para llevar a cabo esta función, las cDCs requieren ejecutar tres mecanismos fundamentales que actuaran como señales de activación para los linfocitos T. La primera de ellas, es realizar el procesamiento de antígenos y cargarlos en las moléculas MHC. La segunda es expresar moléculas coestimuladoras requeridas para la correcta activación de los linfocitos T y la tercera es la secreción de citoquinas que inducen la polarización y un óptimo perfil de los linfocitos T (Kapsenberg, 2003).

En este trabajo, nos enfocamos en determinar cómo se ven afectas las señales 2 y 3 en las cDCs deficientes para ATF6. Para ello, inicialmente determinamos si existían diferencias en la expresión de moléculas coestimuladoras (señal 2) en cDCs residentes de bazo, en contextos basales. Para esto, se utilizaron anticuerpos anti-CD86 y anti-CD40, dos de las moléculas coestimuladoras esenciales en la activación de linfocitos T, y también se determinó la expresión de PDL1, molécula inhibitoria importante en la inducción de la tolerancia. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de estas moléculas, al menos en contextos basales, no es afectada por la deficiencia en ATF6, observándose que no existen diferencias entre las expresiones de éstas ni en las cDC1s ni en las cDC2s de ratones ATF6 *KO* en comparación con su contraparte *WT* (Fig.11). Por otra parte, para determinar si la producción de citoquinas (señal 3) en las cDC1s y en las cDC2s de bazo es afectada por la delección de ATF6, se cuantificó la producción de estas moléculas mediante citometría de flujo, en contextos inflamatorios inducidos a través de dos agonistas virales, Poly IC y R848.

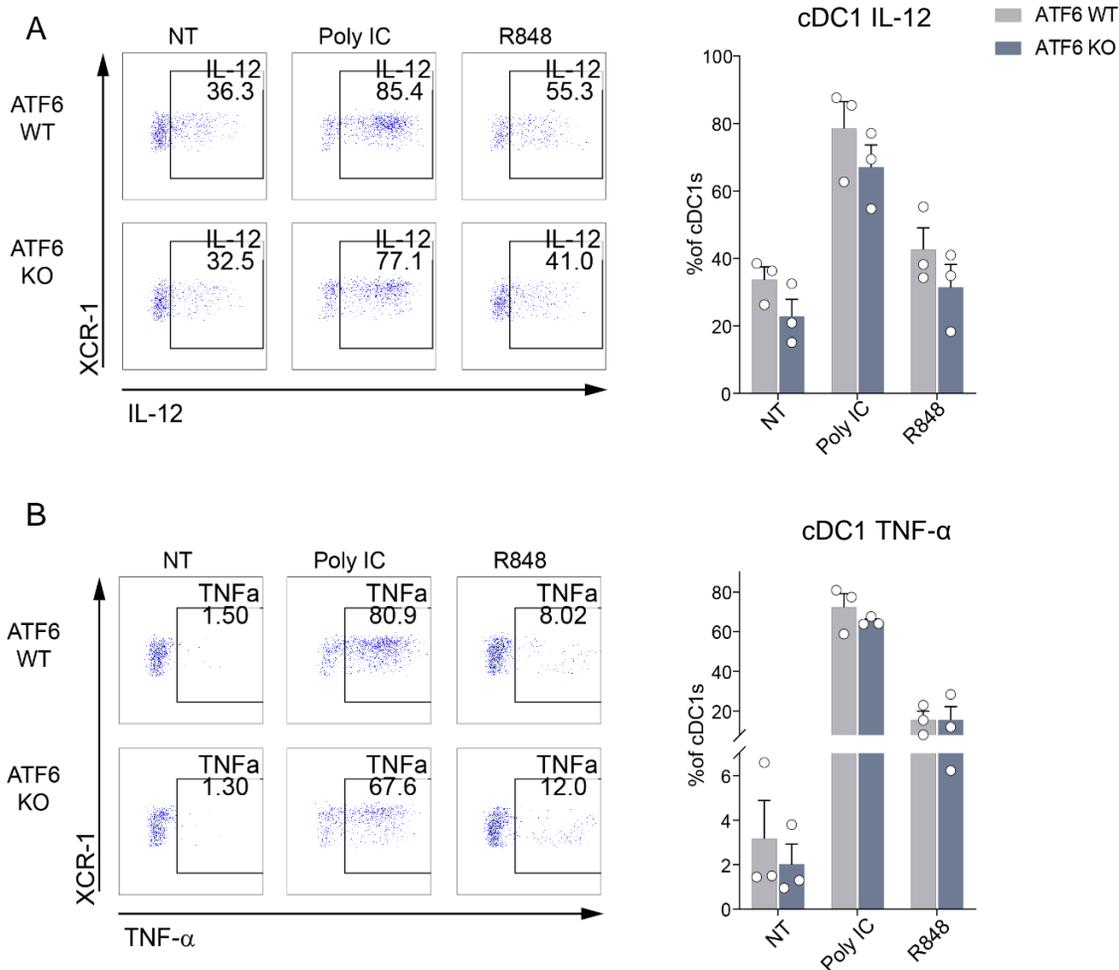


**Figura 11. Cuantificación de moléculas coestimuladoras en modelo ATF6 KO en condiciones basales.**

Los gráficos de barra muestran el promedio ( $\pm$  s.e.m) de la media geométrica de fluorescencia (gMFI) de moléculas coestimuladoras en estado basal en cDC1s y cDC2s residentes de bazo de ratones *WT* y *KO*. La identificación de moléculas coestimuladoras se realizó mediante marcaje con anticuerpos. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 5 ratones de cada genotipo, en dos experimentos independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney.  $P = 0.547$ .

Poly IC, es un análogo de RNA de doble hebra y agonista viral de TLR3, el cual está principalmente presente en los endosomas de las cDC1s y no en las cDC2s. Por otro lado, R848 un agonista viral de TLR7/8, está principalmente presente en los endosomas de las cDC2s y no en las cDC1s. Esta selectividad nos permite inducir la producción de citoquinas específicamente en un subtipo de cDCs dependiendo del agonista a utilizar. Tras un tratamiento de 4 horas con cada uno de estos agonistas virales, las células fueron marcadas con anticuerpos para la identificación de la producción de las citoquinas Interleuquina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

Para los análisis, se determinó el porcentaje de la población de cDC1s o cDC2s que producen IL-12 y TNF- $\alpha$  respecto al total de la población, bajo las diferentes condiciones de tratamiento. En el caso de la población de cDC1s, de acuerdo a lo que se esperaba,



**Figura 12. Producción de Citoquinas en cDC1s deficientes para ATF6**

Cuantificación de la producción de citoquinas intracelulares en cDC1s a través de citometría de flujo. **A.** Producción de IL-12 en cDC1s en condiciones no tratadas (NT) y bajo estímulo con tratamientos de poly IC y R848. La cuantificación se determinó en base al porcentaje total de cDC1s. **B.** Producción de TNF- $\alpha$  en cDC1s en condiciones no tratadas (NT) y bajo estímulo con tratamientos de poly IC y R848. La cuantificación se determinó en base al porcentaje total de cDC1s. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 3 ratones de cada genotipo, en dos experimentos independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney.  $P < 0.050$ .

el tratamiento con poly IC indujo una mayor producción de citoquinas en comparación al tratamiento con R848 (Fig. 12). En el caso de la producción de IL-12 (Fig. 12A), los resultados muestran que el tratamiento con R848 activa un porcentaje de la población de cDC1s similar al observado en condiciones sin tratamiento, mientras que poly IC

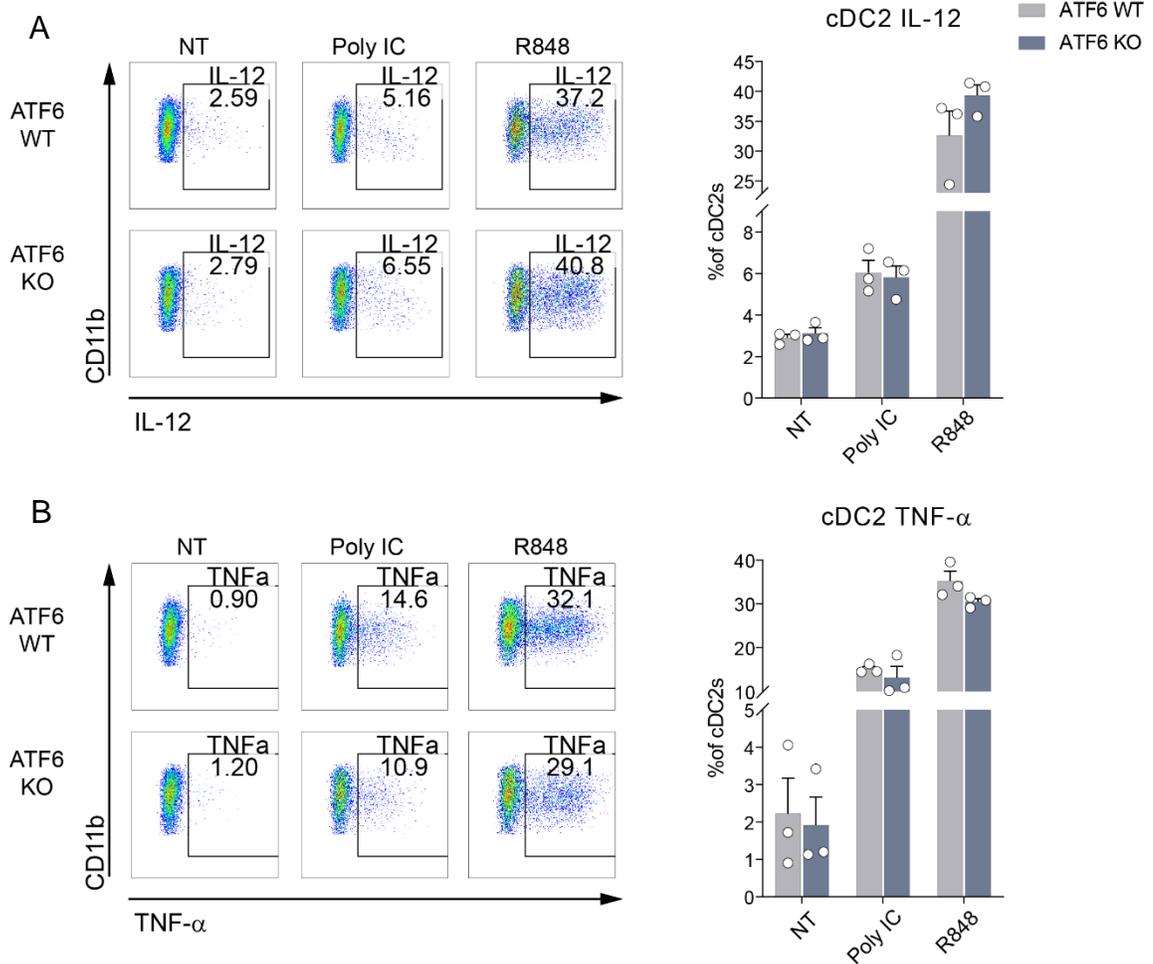
induce fuertemente la producción activándose un porcentaje cercano al 80% del total de la población. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en la población de células activadas, productora de citoquinas, entre los genotipos *WT* y aquellos deficientes para ATF6. De manera similar, en el caso de la producción de TNF- $\alpha$ , el mayor porcentaje de células productoras de esta citoquina se obtuvo bajo el tratamiento con poly IC, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los fenotipos *WT* y *KO* para ATF6 (Fig.12B).

En conjunto con los análisis realizados de la expresión de moléculas coestimuladoras, estos resultados muestran que la ausencia de ATF6 en las cDC1s residentes de bazo, no afectan las características esenciales de maduración y activación de estas células requeridas para la presentación antigénica.

En cuanto a la producción de citoquinas por parte de las cDC2s, acorde a lo esperado, la mayor producción de citoquinas fue inducida por el agonista viral de TLR7/8, R848. Tanto en el caso de la IL-12 como TNF- $\alpha$ , cerca de un 40% de la población de cDC2s son activadas, produciendo estas citoquinas, mientras que bajo el tratamiento con poly IC el porcentaje de cDC2s que produce IL-12 no supera el 5% y la población productora de TNF- $\alpha$  bajo esta condición promedia el 15% (Fig.13A-B). Al comparar los porcentajes de la población de cDC2s que producen estas citoquinas entre los genotipos *WT* y *KO*, no se observan diferencias estadísticamente significativas bajo ninguna de las condiciones estudiadas, indicando que la producción de citoquinas de la población de cDC2s residentes de bazo, no es afectada por la ausencia de ATF6 en dichas condiciones.

En conjunto, los análisis realizados en las poblaciones de cDC1s y cDc2s residentes de bazo, muestran que tanto la expresión de moléculas coestimuladoras como la producción

de citoquinas, en particular IL-12 y TNF- $\alpha$ , no son afectadas por la deficiencia de ATF6 en estas células, al menos en las condiciones estudiadas.



**Figura 13. Producción de Citoquinas en cDC2s deficientes para ATF6**

Cuantificación de la producción de citoquinas intracelulares en cDC2s a través de citometría de flujo. **A.** Producción de IL-12 en cDC2s en condiciones no tratadas (NT) y bajo estímulo con tratamientos de poly IC y R848. La cuantificación se determinó en base al porcentaje total de cDC2s. **B.** Producción de TNF- $\alpha$  en cDC2s en condiciones no tratadas (NT) y bajo estímulo con tratamientos de poly IC y R848. La cuantificación se determinó en base al porcentaje total de cDC2s. Cada símbolo representa la muestra obtenida de un ratón, utilizándose 3 ratones de cada genotipo, en dos experimentos independientes. Para los análisis estadísticos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney.  $P < 0.100$ .

## DISCUSIÓN

El eje ATF6 es la rama de la UPR menos estudiada y de la que poco sabemos sobre su rol en el sistema inmune. El objetivo de esta investigación fue realizar una primera aproximación a comprender cual es el grado de contribución de este eje en términos de frecuencia de población y maduración de las células dendríticas convencionales.

En la literatura se ha reportado la importancia de la vía IRE1-XBP1 en las cDC1s, tanto a nivel de sobrevivencia como funcional (Osorio et al., 2014; Tavernier et al., 2017a), y se sabe que ATF6 tiene la capacidad de inducir la expresión del mRNA codificante para XBP1 (Yoshida et al., 2001). Bajo este contexto, consideramos que la ausencia del sensor ATF6 en las cDC1s, podría afectar los niveles de expresión de XBP1 y por ende tener un efecto perjudicial tanto en la frecuencia de la población como en la maduración de estas células, afectando las características esenciales para que estas células puedan llevar a cabo correctamente la presentación antigénica.

Los resultados obtenidos, mostraron que las cDC1s presentan altos niveles de activación de la vía IRE1-XBP1 en comparación a lo observado en otras poblaciones inmunes, siendo las cDC1s residentes de la lámina propia del intestino y aquellas residentes de bazo las que presentaron una mayor activación de la vía en condiciones basales, mientras que la población de cDC1s residentes de pulmón presenta bajos niveles de activación de la vía. Esta activación constitutiva de la vía, da cuenta de un rol particularmente importante de esta en las cDC1s, que podría responder a la alta carga de procesamiento de proteínas requerida por estas células dada su función de patrullaje y constante procesamiento de antígenos en su entorno. Para valorar la contribución de esta vía en la frecuencia poblacional de las células inmunes, se estudió el efecto de la ausencia de XBP1, el cual se ha reportado que regula la sobrevivencia de las cDC1s

residentes de pulmón. Los resultados obtenidos, acorde con lo que se ha reportado en literatura, mostraron que la ausencia de XBP1 afecta la frecuencia de la población de cDC1s y no así la frecuencia de las cDC2s ni de otras poblaciones inmunes. Es así, como se ha observado que las cDC1s deficientes para XBP1 residentes de pulmón, muestran una reducción de su población en cerca del 50% en comparación con su contraparte *WT*, mientras que las cDC1s XBP1 *KO* residentes de bazo y de LP-ID no ven afectada la frecuencia de esta población. En los trabajos previos donde estas condiciones fueron estudiadas, esta disminución en la población residente de pulmón se explica por la baja expresión de IRE1 y por ende, una menor activación de RIDD en estas células lo cual conduce a la muerte celular. (Tavernier et al., 2017b). Los análisis de frecuencia de las poblaciones realizados en el modelo deficiente para XBP1, mostraron que aunque no existen diferencias significativas, existe una reducción importante en la población de cDC1s de pulmón, y en aquellos tejidos donde no se produce una pérdida de estas células (bazo y LP-ID), existe una tendencia al aumento por parte de la población de macrófagos, la cual no es observada en el pulmón. Esto podría deberse a que el aumento en la actividad de RIDD en las cDC1s genere señales en el microambiente que induzcan el reclutamiento de los macrófagos, a que la deficiencia de XBP1 afecte directamente a la población de macrófagos, efectos no autónomos o bien podría deberse a una combinación de estas posibilidades. Para determinarlo se requerirían un análisis más exhaustivo de estas poblaciones.

En el caso de los análisis de frecuencia de las cDCs en ratones deficientes para ATF6, se esperaba observar un comportamiento de la población similar al observado para el modelo deficiente para XBP1, sin embargo, los resultados muestran que no existen diferencias significativas entre las poblaciones de cDC1s residentes de pulmón entre los genotipos *WT* y *KO* para ATF6. Por tanto, ATF6 no parece tener un rol crucial como lo

tiene XBP1, en cuanto a la estabilidad de la población en las cDC1s, al menos en estado basal. Sin embargo, se observó que en pulmón existe una reducción significativa en la población de monocitos. El modelo ATF6 KO, dirige la delección de ATF6 a células que presentan el promotor de CD11c, integrina que algunas poblaciones de monocitos pueden expresar (Gibbins et al., 2017). Por lo tanto, los monocitos podrían estar siendo afectados directamente por la ausencia de ATF6, lo que sería indicativo de que ATF6 tendría un rol importante en la mantención de estas células y esto se daría de una forma tejido específica, ya que en bazo y LP-ID esta reducción en la población de monocitos no se observa. Así también, esta reducción podría explicarse por efectos no autónomos inducidos por la modificación presente en el modelo, o por un aumento en la diferenciación de los monocitos hacia otros tipos celulares, como células dendríticas o macrófagos, que sea inducido por la ausencia de ATF6 en aquellas poblaciones CD11c<sup>+</sup> residentes de pulmón o bien. El poder definir cuáles son las causas de la disminución en de monocitos residentes del pulmón en el modelo, requeriría de estudios adicionales.

En términos de la activación general de la UPR, la ausencia de ATF6, al menos en condiciones basales, no parece tener un efecto importante en la expresión de genes de las vías de IRE1-XBP1, RIDD o PERK. El que uno de los ejes de la UPR este ausente podría suponer un cambio drástico en la expresión de genes de otras de la vía de la UPR, sin embargo, en estado basal se demostró que incluso los genes blancos de ATF6 no se ven alterados. Esto podría deberse a que, por una parte, dos de los genes analizados para ATF6, exon2 de Xbp1 y GRP94, basalmente sean poco expresados y por ende no sea posible observar diferencias entre células *WT* y células *KO* para ATF6, y por otro lado, que muchos de los genes blancos de una vía se solapan con los blancos de otra. En general existen genes que son predominantemente inducidos por una de las

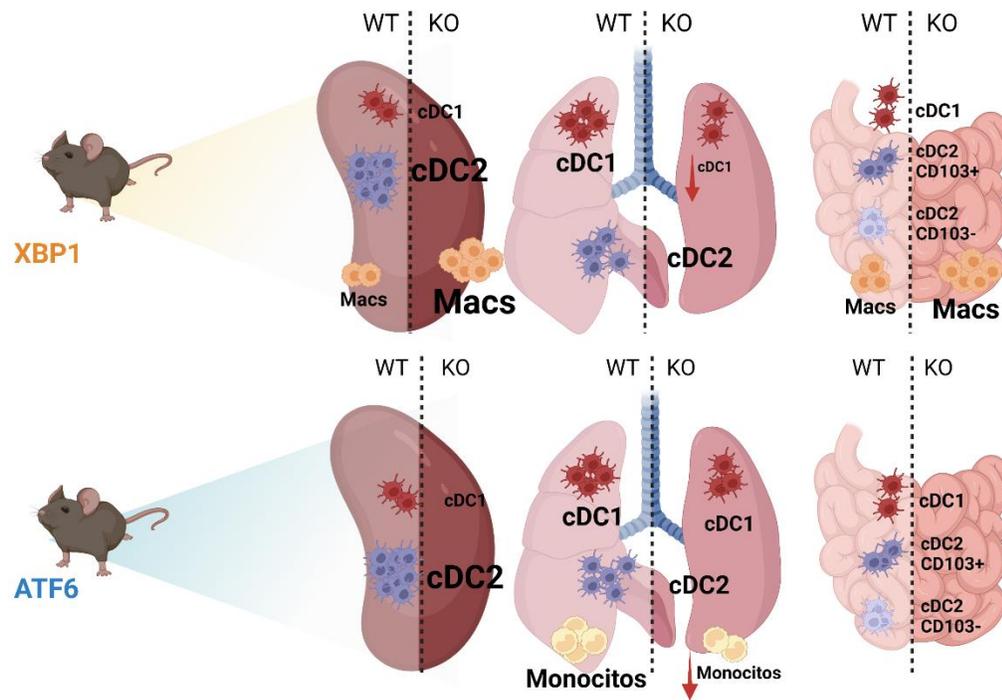
vías, pero no necesariamente exclusivos de estas y esto ocurre con los genes de ATF6, y en condiciones basales, es posible que esto se vea mayormente acentuado dado que no existe una condición que fuerce a la inducción de estos genes. Así también, es posible que la isoforma ATF6 $\beta$ , pese a tener una actividad débil como factor de transcripción, pueda sostener la expresión de al menos los niveles basales requeridos por las células. Para corroborar esto, resultaría importante determinar la expresión de estos genes en condiciones de estrés de RE mediante inductores de la activación de la UPR, como taspigargina o tunicamicina, de manera de poder determinar si existe una atenuación efectiva de la expresión de genes blancos de ATF6 o si se produce un efecto compensatorio por parte de las otras vías de la UPR.

En cuanto a las características de maduración de las cDCs, la ausencia de ATF6 no provocó cambios en la expresión de moléculas coestimuladoras en contextos basales en estas células residentes de bazo. Esto es un indicativo más de que, al menos en condiciones basales, ATF6 no afecta la funcionalidad de las células y esto puede deberse a que en términos funcionales otras vías tengan mayor preponderancia. Como se ha mencionado anteriormente, entre las vías existe un solapamiento de genes importante, y tanto ATF6 como XBP1 tienen la capacidad de inducir la producción de chaperonas, inducir componentes de la vía de degradación del RE y tienen injerencia en la biosíntesis de lípidos y el modelamiento del tamaño del retículo, y como se ha visto a través de los análisis de activación de la vía IRE-XBP1, esta parece tener un rol predominante en estado basal en estas células, lo que podría explicar que no existan alteraciones en el procesamiento de las proteínas que tienen pertinencia en la expresión de las moléculas coestimuladoras en la superficie de estas células.

Dentro de los estudios realizados en la capacidad de producción de citoquinas de las cDCs residentes de bazo, los resultados mostraron que la ausencia de ATF6 no afecta

el porcentaje de cDCs que son activadas y tienen la capacidad de producir citoquinas bajo contextos inflamatorios, por lo que para las cDC1s residentes de este tejido no parece ser fundamental la activación de la vía ATF6, o bien la ausencia de esta vía puede ser compensada para desarrollarse correctamente las características de maduración necesarias para la presentación de antígenos.

En conjunto, los resultados obtenidos revelan que ATF6 en contextos basales parece no tener un rol indispensable en la mantención de la población de cDC1s ni en la población de las cDC2s. En estas condiciones, las características de maduración requeridas para que las cDC1s puedan realizar correctamente la presentación antigénica, tampoco son afectadas por la ausencia de ATF6. Sin embargo, la pérdida de monocitos observada en pulmón en este modelo, revela la posible importancia de esta eje en otros tipos de células inmunes. Estos resultados develan el camino hacia el cual debieran dirigirse estudios posteriores que permitan concluir cual es real impacto de la vía ATF6 en las cDCs. De este modo, se cree que se requiere expandir estos estudios, ampliando los análisis de maduración y activación en cDCs residentes de pulmón e intestino, dado que el comportamiento de las poblaciones y los requerimientos de estas células en cada tejido muestran ser diferentes. Así también, se considera necesario realizar análisis de expresión de los genes de la UPR en estos tejidos, y robustecer esta información estudiando la expresión tanto en condiciones basales como en condiciones de activación. Es importante mencionar que los resultados derivados de esta tesis de magister fueron recientemente publicados (Gutiérrez-ballesteros et al., 2023)



**Figura 14. Conclusión Grafica**

Ratones que presentan deficiencias de XBP1 en células CD11c<sup>+</sup>, presentan una disminución en la población de cDC1s residentes de pulmón. Ratones deficientes en ATF6, presentan una disminución en la población de monocitos residentes de pulmón. En ambos modelos las poblaciones de células inmunes de bazo e intestino no se ven alteradas. Las cDC2s, no se ven afectadas en términos de frecuencia poblacional ante ninguna de estas condiciones.

## BIBLIOGRAFÍA

- Almanza, A., Carlesso, A., Chinth, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Bellerocche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., ... Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS Journal*, *286*(2), 241–278. <https://doi.org/10.1111/febs.14608>
- Blackwood, E. A., Azizi, K., Thuerauf, D. J., Paxman, R. J., Plate, L., Kelly, J. W., Wiseman, R. L., & Glembotski, C. C. (2019). Pharmacologic ATF6 activation confers global protection in widespread disease models by reprogramming cellular proteostasis. *Nature Communications*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08129-2>
- Blum, J. S., Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 31, Issue December 2012). <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095910>
- Bommiasamy, H., Back, S. H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R. J., & Brewer, J. W. (2009). ATF6 $\alpha$  induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, *122*(10), 1626–1636. <https://doi.org/10.1242/jcs.045625>
- Bouchecareilh, M., & Balch, W. E. (2011). Proteostasis: A new therapeutic paradigm for pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *8*(2), 189–195. <https://doi.org/10.1513/pats.201008-055MS>
- Coyne, C. B., Zeh, H. J., & Lotze, M. T. (2012). *Imr\_1146 158..175. 249*, 1–18. [papers://18256/3a-f617-4840-9a49-fa78b8732348/Paper/p1178](https://doi.org/10.18256/3a-f617-4840-9a49-fa78b8732348/Paper/p1178)
- Cubillos-Ruiz, J. R., Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2017). Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell*, *168*(4), 692–706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.004>
- Curtsinger, J. M., Johnson, C. M., & Mescher, M. F. (2003). CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine. *The Journal of Immunology*, *171*(10), 5165–5171. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5165>
- Danyukova, T., Schöneck, K., & Pohl, S. (2022). Site-1 and site-2 proteases: A team of two in regulated proteolysis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1869, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119138>
- Daverkausen-Fischer, L., & Pröls, F. (2022). The function of the co-chaperone ERdj4 in diverse (patho-)physiological conditions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *79*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04082-4>
- Edwards, A. D., Diebold, S. S., Slack, E. M. C., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., & Reis e Sousa, C. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: Lack of TLR7 expression of CD8 $\alpha^+$  DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *European Journal of Immunology*, *33*(4), 827–833. <https://doi.org/10.1002/eji.200323797>
- Engin, F., Yermalovich, A., Ngyuen, T., Hummasti, S., Fu, W., Eizirik, D. L., Mathis, D., & Hotamisligil, G. S. (2013). Restoration of the unfolded protein response in pancreatic  $\beta$  cells protects mice against type 1 diabetes. *Science Translational Medicine*, *5*(211). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006534>
- Flores-Santibáñez, F., Medel, B., Bernal, J. I., & Osorio, F. (2019). Understanding the Role of the Unfolded Protein Response Sensor IRE1 in the Biology of Antigen Presenting Cells. *Cells*, *8*(12). <https://doi.org/10.3390/cells8121563>
- Gibbins, S. L., Thomas, S. M., Atif, S. M., McCubbrey, A. L., Desch, A. N., Danhorn, T., Leach, S. M., Bratton, D. L., Henson, P. M., Janssen, W. J., & Jakubzick, C. V. (2017). Three unique

- interstitial macrophages in the murine lung at steady state. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 57(1), 66–76. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0361OC>
- Glembotski, C. C., Rosarda, J. D., & Wiseman, R. L. (2019). Proteostasis and Beyond: ATF6 in Ischemic Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 25(6), 538–550. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.03.005>
- Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R. J., & Blumberg, R. S. (2016). The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 16(8), 469–484. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.62>
- Guilliams, M., Dutertre, C. A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Prijck, S., Tavernier, S. J., Low, I., Irac, S. E., Mattar, C. N., Sumatoh, H. R., Low, G. H. L., Chung, T. J. K., Chan, D. K. H., Tan, K. K., ... Ginhoux, F. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, 45(3), 669–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.015>
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R., & Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*, 14(8), 571–578. <https://doi.org/10.1038/nri3712>
- Gutiérrez-ballesteros, F., Morales-reyes, J., Fernández, D., Geisse, A., Arcaya, A., Flores-santibañez, F., Bono, M. R., & Osorio, F. (2023). Normal tissue homeostasis and impairment of selective inflammatory responses in dendritic cells deficient for ATF6  $\alpha$ . *March*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1089728>
- Hetz, C., Chevet, E., & Oakes, S. A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*, 17(7), 829–838. <https://doi.org/10.1038/ncb3184>
- Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(8), 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Hillary, R. F., & Fitzgerald, U. (2018). A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0453-1>
- Imai, J., Otani, M., & Sakai, T. (2019). Distinct subcellular compartments of dendritic cells used for cross-presentation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). <https://doi.org/10.3390/ijms20225606>
- Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., & Miura, M. (2004). A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nature Medicine*, 10(1), 98–102. <https://doi.org/10.1038/nm970>
- Kapsenberg, M. L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 3(12), 984–993. <https://doi.org/10.1038/nri1246>
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>
- Krieg, A. M., & Vollmer, J. (2007). Toll-like receptors 7, 8, and 9: Linking innate immunity to autoimmunity. *Immunological Reviews*, 220(1), 251–269. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00572.x>
- Lambrecht, B. N., Iwasaki, A., & Kelsall, B. L. (2015). Mucosal Dendritic Cells: Origins, Subsets, and Biology. In *Mucosal Immunology: Fourth Edition* (Fourth Ed, Vols. 1–2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415847-4.00025-2>
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune

- defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Ng Chee Ping. (2013). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.004>. Dendritic
- Nie, L., Cai, S. Y., Shao, J. Z., & Chen, J. (2018). Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. *Frontiers in Immunology*, 9(July). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01523>
- Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2015). The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10(October 2014), 173–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649>
- Osorio, F., Lambrecht, B. N., & Janssens, S. (2018). Antigen presentation unfolded: identifying convergence points between the UPR and antigen presentation pathways. *Current Opinion in Immunology*, 52, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.04.020>
- Osorio, F., Tavernier, S. J., Hoffmann, E., Saeys, Y., Martens, L., Veters, J., Delrue, I., De Rycke, R., Parthoens, E., Pouliot, P., Iwawaki, T., Janssens, S., & Lambrecht, B. N. (2014). The unfolded-protein-response sensor IRE-1 $\alpha$  regulates the function of CD8 $\alpha$  + dendritic cells. *Nature Immunology*, 15(3), 248–257. <https://doi.org/10.1038/ni.2808>
- Palam, L. R., Baird, T. D., & Wek, R. C. (2011). Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(13), 10939–10949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216093>
- Reis E Sousa, C. (2004). Activation of dendritic cells: Translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.007>
- Sichien, D., Lambrecht, B. N., Guilliams, M., & Scott, C. L. (2017). Development of conventional dendritic cells: From common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal Immunology*, 10(4), 831–844. <https://doi.org/10.1038/mi.2017.8>
- Swiecki, M., & Colonna, M. (2015). The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 15(8), 471–485. <https://doi.org/10.1038/nri3865>
- Tavernier, S. J., Osorio, F., Vandersarren, L., Veters, J., Vanlangenakker, N., Van Isterdael, G., Vergote, K., De Rycke, R., Parthoens, E., Van De Laar, L., Iwawaki, T., Del Valle, J. R., Hu, C. C. A., Lambrecht, B. N., & Janssens, S. (2017a). Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival. *Nature Cell Biology*, 19(6), 698–710. <https://doi.org/10.1038/ncb3518>
- Tavernier, S. J., Osorio, F., Vandersarren, L., Veters, J., Vanlangenakker, N., Van Isterdael, G., Vergote, K., De Rycke, R., Parthoens, E., Van De Laar, L., Iwawaki, T., Del Valle, J. R., Hu, C. C. A., Lambrecht, B. N., & Janssens, S. (2017b). Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival. *Nature Cell Biology*, 19(6), 698–710. <https://doi.org/10.1038/ncb3518>
- Thuerauf, D. J., Marcinko, M., Belmont, P. J., & Glembotski, C. C. (2007). Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22865–22878. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701213200>
- Thuerauf, D. J., Morrison, L., & Glembotski, C. C. (2004). Opposing roles for ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  in endoplasmic reticulum stress response gene induction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 21078–21084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400713200>
- Wang, Q., Zhu, X., Li, Z., Feng, M., & Liu, X. (2021). ATF6 promotes liver fibrogenesis by regulating macrophage-derived interleukin-1 $\alpha$  expression. *Cellular Immunology*, 367(January), 104401. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104401>
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., & Mori, K. (2007). Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by

- Single or Combined Action of ATF6 $\alpha$  and XBP1. *Developmental Cell*, 13(3), 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.07.018>
- Ye, Y., Gaugler, B., Mohty, M., & Malard, F. (2020). Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases. *Clinical and Translational Immunology*, 9(5), 1–19. <https://doi.org/10.1002/cti2.1139>
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., & Mori, K. (2001). XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor phosphorylation, the activated Ire1p specifically cleaves HAC1 precursor mRNA to remove an intron of 252 nucleotides. The cleaved 5' and 3' ends are joined. *Cell*, 107, 881–891.
- Yu, Z., Sheng, H., Liu, S., Zhao, S., Glembotski, C. C., Warner, D. S., Paschen, W., & Yang, W. (2017). Activation of the ATF6 branch of the unfolded protein response in neurons improves stroke outcome. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(3), 1069–1079. <https://doi.org/10.1177/0271678X16650218>