

***ESTRÉS DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO Y FAGOCITOSIS:
PAPEL DE LAS VÍAS PERK E IRE-1***

MEMORIA DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO POR

CÉSAR VILLA FRANCISCO

TUTORES:

Dr. Mariano Sánchez Crespo

Dra. M^a Nieves Fernández García

En Valladolid, Septiembre 2011

ÍNDICE

Introducción

- Las células dendríticas
- Las citoquinas implicadas en la polarización de la respuesta inmune
- Papel del estrés de retículo endoplasmático en la respuesta inmune

Objetivos

Materiales y métodos

- Obtención de monocitos y diferenciación de células dendríticas
- Obtención de lisados celulares
- Obtención de extractos nucleares
- Inmunodetección de proteínas
- Obtención de RNA
- Síntesis de DNA complementario y amplificación por PCR (RT-PCR)
- PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR)
- Detección de cDNA por electroforesis en gel de agarosa

Resultados

Conclusiones y perspectivas

Bibliografía

INTRODUCCIÓN

1. Las células dendríticas

Las células dendríticas (CD) juegan un papel central en el desarrollo de la inmunidad innata y en la iniciación de la inmunidad adaptativa. Las CD se caracterizan por su capacidad de presentación de antígenos, de donde se deriva la abreviatura APC (*antigen-presenting cells*) y están presentes en su fase inmadura en los tejidos periféricos, donde exploran la presencia de antígenos procedentes de microorganismos invasores para migrar posteriormente cargadas de este material a los ganglios linfáticos. Su función de captación de antígenos se realiza a través de los procesos de endocitosis y macropinocitosis, y tras entrar en contacto con los antígenos sufren el denominado proceso de maduración, que incluye la inducción de la actividad coestimuladora, la adquisición de la capacidad de procesar antígenos, el incremento de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), la liberación de citoquinas y la anteriormente referida migración a los nódulos linfáticos donde presentan los antígenos procesados a las células T. La activación del sistema inmune adaptativo sólo se produce tras la presentación del antígeno a los linfocitos por parte de las CD.

2. Las citocinas implicadas en la polarización de la respuesta inmune y su regulación

Las citocinas de la familia IL-12 juegan un papel importante en la polarización de la respuesta inmune. La IL-12 p70 es necesaria para la producción de IFN γ por las células Th1, mientras que la IL-23 se precisa para la proliferación de las células Th17.

El balance de estas citocinas tiene una característica fundamental derivada del hecho de que ambas citocinas comparten una cadena IL-12/23 p40 (codificada por el gen *il12/23b*), mientras que se diferencian por otra cadena: IL-12 p35 (*il12a*), en el caso de IL-12 p70 e IL-23 p19 (*il23a*), en el caso de IL-23 (1).

La regulación de estas citoquinas se produce a nivel transcripcional y presenta notables diferencias en lo que se refiere a la forma en la que se produce su expresión en respuesta a los distintos estímulos. Curiosamente, el lipopolisacárido bacteriano (LPS) estimula la producción de IL-12 p70 e IL-23, mientras que el extracto de la pared de hongos compuesto predominantemente por β -glucanos, estimula la producción de IL-23 e inhibe la producción de IL-12 p70, incluso en presencia de otros estímulos.

Mientras que se ha caracterizado el mecanismo de represión de la producción de IL-12 p35 por el zymosan (2), no se conoce plenamente el mecanismo por el que este estímulo es capaz de activar la transcripción de *il23a*. Por una parte existe acuerdo sobre la relevancia del factor NF- κ B para activar *il23a*; sin embargo, no se sabe si es necesaria la presencia de otros factores que actúen sobre el promotor o sobre *enhancers* de *il23a*.

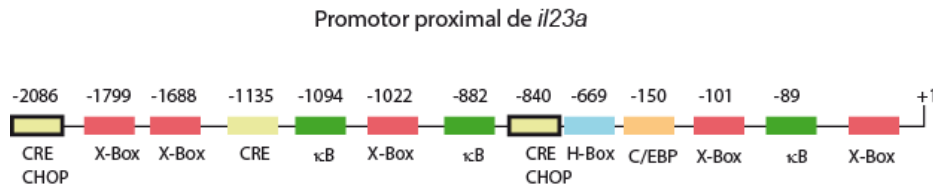


Fig. 1. Estructura del promotor humano de *il23a* mostrando los sitios de unión de los factores de transcripción potencialmente implicados en su regulación. Los sitios CRE/CHOP y las X-boxes son los sitios en los que se unirían los factores activados durante el estrés de retículo endoplasmático.

3. Papel del estrés de retículo endoplasmático en la respuesta inmune

El estrés de retículo endoplasmático (estrés de RE) es un fenómeno que se caracteriza por la activación de varias cascadas de señalización cuya función principal es detener la síntesis proteica con el fin de evitar la acumulación de cadenas proteicas deficientemente plegadas y modular la síntesis de proteínas. La activación prolongada e inadecuada del estrés de RE se ha relacionado con varias enfermedades autoinflamatorias y degenerativas (3).

Los elementos centrales de la respuesta al estrés de RE, que se reúnen colectivamente con el nombre de *unfolded protein response* (UPR) son: la proteína kinasa PERK, el factor de transcripción ATF6 y la kinasa y endonucleasa IRE1 α (*inositol requiring enzyme*). El factor de transcripción CHOP se activa en la cascada de señalización iniciada por PERK, mientras que la activación de IRE produce el *splicing* atípico de un mRNA que tras la pérdida de 26 nucleótidos y el consiguiente cambio de la pauta de lectura da lugar a la producción de un factor de transcripción denominado XBP1.

Aunque las 3 cascadas se activan simultáneamente, las respuestas desencadenadas vía IRE1 son rápidamente atenuadas a pesar de la persistencia de estrés, mientras aquellas desencadenadas vía PERK son mantenidas. Esto sugiere que la función de IRE1/XBP1 está dirigida al mantenimiento de la homeostasis celular en la fase de adaptación de la

UPR, mientras que la activación de la vía PERK/CHOP sería un mecanismo dirigido a favorecer la apoptosis celular ante el fracaso del intento de recuperar la homeostasis (4). Un estudio reciente ha llamado la atención sobre el papel del factor de transcripción CHOP (*C/EBP homologous protein*, también conocido como DDIT3 y GADD153) basándose en el efecto de la tunicamicina, un agente productor de estrés de RE, y su capacidad de estimular de forma sinérgica la producción de IL-23 inducida por el LPS (5).

Durante las fases iniciales del estrés de RE, la expresión de CHOP de forma transitoria es beneficiosa, sin embargo, este efecto desaparece en situaciones de estrés puesto que conduce a la aparición de apoptosis y se asocia a numerosas enfermedades como procesos neurodegenerativos, espondiloartritis, enfermedades autoinflamatorias, ateromatosis, diabetes y nefropatías.

La asociación del estrés de RE con estas enfermedades y la posible relevancia de CHOP en la producción de IL-23, sugerirían que el estrés de RE inducido durante la fagocitosis de las partículas de zymosan podría ser la causa de la activación de CHOP y de la iniciación de la transcripción de *il23a* en colaboración con NF- κ B.

Asimismo, se ha referido una nueva función de la vía IRE1/XBP1 en la producción de citocinas (6), puesto que los macrófagos que desarrollan estrés de RE son hiperrespondedores a la estimulación de TLR en una manera dependiente de XBP1. Esto sugeriría que XBP1 actúa como un regulador positivo de la respuesta TLR y que las distintas ramas de la UPR pueden operar de forma independiente y regular la respuesta inflamatoria a través de su efecto en la respuesta innata. Estos datos indicarían que además de ser necesario el estudio de la vía PERK/CHOP en respuesta a la activación del receptor dectin-1 por parte de los β -glucanos, debe analizarse la

participación de XBP1, dada la capacidad de estos receptores para estimular la producción de citocinas.

ATF6 se sintetiza como un precursor inactivo y es retenido en el RE. Bajo condiciones de estrés de RE, ATF6 se trasloca al Golgi donde se procesa por proteasas en dos sitios distintos. Esta proteólisis libera el dominio citoplasmático de ATF6 y permite que actúe como un activador transcripcional que regula al alza muchos genes de UPR.

LA REACCIÓN UPR

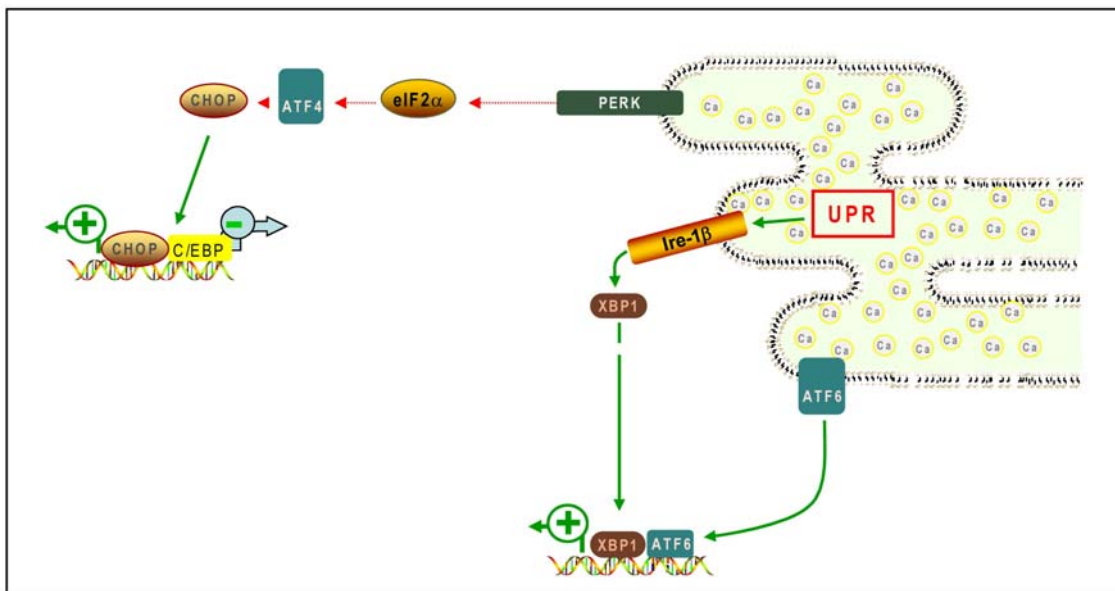


Fig. 2. **Los distintos componentes de la *unfolded protein response* que se ponen en marcha tras la aparición de estrés de retículo endoplasmático.** La activación de IRE1 da lugar a la producción de XBP1 y la activación de PERK conduce a la inducción de CHOP. La unión de estos factores a distintos promotores puede activar o inhibir la transcripción.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo ha sido: **Analizar la producción de estrés de retículo endoplasmático durante la estimulación de las CD por patrones moleculares derivados de patógenos y su influencia en la producción de citocinas implicadas en la polarización de la respuesta inmune.**

Los objetivos específicos propuestos son:

1. Analizar la producción de IL-23 en CD tras estimulación de receptores de la inmunidad innata y su relación con la inducción de estrés de RE.
2. Analizar la activación de los factores de transcripción CHOP y XBP-1 en respuesta a estímulos de la inmunidad innata durante el estrés de RE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de monocitos y diferenciación a células dendríticas

Los leucocitos se obtuvieron de la capa leuco-plaquetaria mediante los procedimientos convencionales de centrifugación de la sangre total en Ficoll-Paque y posterior centrifugación en gradiente de OptiPrep para eliminar los linfocitos. Los monocitos se purificaron mediante adherencia a placas de plástico. Para promover la diferenciación de los monocitos a células dendríticas inmaduras (iDC), las células se cultivaron durante cinco días en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y citoquinas [800 U/ml del factor estimulador del colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y 500 U/ml de IL-4] a 37°C y en atmósfera con 5% de CO₂.

Obtención de lisados celulares

Las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) frío y se recogieron en tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas (20 mM Hepes, 40 mM β -glicerofosfato, 2 mM ortovanadato, 10 mM EGTA, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% NP40, 1 mg/ml leupeptina, 5 mg/ml aprotinina, 0.1 M PMSF, 1M NaF, 0.1M pNPP). Se incubaron durante 30 minutos en hielo y el lisado celular se centrifugó 10 minutos a 10000 x g a 4°C. Se descartó el precipitado, se cuantificó la proteína presente en el sobrenadante y se añadió el tampón de Laemmli (60 mM Tris, 10% glicerol (v/v), 2% SDS (p/v), 0.002% azul de bromofenol (p/v), pH 6.8) suplementado con 20 mM de DTT. Por último, las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se almacenaron a -20° C hasta su uso.

Obtención de extractos nucleares

La obtención de extractos nucleares se realizó empleando el *Nuclear Extract Kit* de Active Motif. Las células se recogieron en PBS frío en presencia de inhibidores de fosfatasas para evitar las modificaciones proteicas. A continuación, las células se resuspendieron en un tampón hipotónico para hinchar las células y debilitar las membranas plasmáticas, posteriormente se añadió detergente. Para separar las proteínas citoplasmáticas liberadas de la fracción nuclear, se centrifugó la suspensión para precipitar los núcleos celulares. Éstos se resuspendieron con un tampón de lisis que se dejó actuar 30 minutos. Después de una centrifugación se obtuvieron las proteínas nucleares presentes en el sobrenadante.

ELISA para medir la expresión de citoquinas

El ELISA para la detección de la citoquina IL-23 se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 50 μ l de sobrenadante de 10^6 CD/ml. Las placas de ELISA están preparadas con un anticuerpo monoclonal específico adherido a su superficie. Las muestras se añaden a los pocillos, lo que permite que toda la proteína de interés se pueda unir al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar, se añadió a los pocillos un anticuerpo policlonal frente a la citoquina conjugado con biotina y una solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano. La reacción de la peroxidasa con un sustrato específico da lugar a un producto coloreado que permite cuantificar la cantidad de cada citoquina midiendo la absorbancia a 450 nm.

Inmunodetección de proteínas (*Western blot*)

Para la separación de las proteínas, las muestras se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras, según el procedimiento descrito por Laemmli, de forma que las proteínas se separaron en función de su tamaño. Se utilizaron geles con un 10% de acrilamida en presencia de un tampón de electroforesis

(25 mM Tris, 0.2 M glicina, 1 g/l SDS). A la vez que las muestras, se corrieron estándares preteñidos de diferentes tamaños moleculares, para poder asignar los pesos moleculares a las bandas de proteína. La electroforesis se llevó a cabo durante 110 minutos a 25 mA en tampón de electroforesis. A continuación, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó en condiciones de humedad en una cubeta de electroforesis de Bio-Rad usando un tampón de transferencia (25mM Tris, 0.2M glicina, 20% metanol (v/v), SDS 1g/l), a 100 V durante 90 minutos. Las membranas transferidas se bloquearon por incubación en una solución rica en proteínas compuesta por TTBS (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.6) y 5% de leche desnatada (p/v) o de albúmina en los casos en que las proteínas de la leche pudiesen interferir con la especificidad del anticuerpo. La incubación se realizó con agitación suave durante una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4° C.

Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C. Posteriormente se realizaron varios lavados de 10 minutos con TTBS con el fin de eliminar el anticuerpo primario no adherido específicamente a la membrana. Seguidamente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo durante una hora con agitación lenta y a temperatura ambiente. Tras la incubación, se hicieron nuevos lavados con TTBS para eliminar el anticuerpo secundario no adherido específicamente a la membrana. Las membranas se incubaron con el reactivo comercial ECL, que permite la detección de los anticuerpos conjugados con peroxidasa, y se expusieron a películas autorradiográficas que se revelaron con un equipo Curix-60 de AGFA.

Obtención de RNA

La obtención del RNA total de las células se realizó siguiendo el protocolo descrito por Chomezynski y Sacchi utilizando TRIzol. Es un método basado en la diferente solubilidad de los ácido nucleicos y los contaminantes entre dos fases no miscibles. El TRIzol está compuesto por una mezcla de fenol, en la que los ácidos nucleicos son insolubles, y tiocianato de guanidina, que actúa como agente desnaturalizante de proteínas e inhibidor de las proteasas a pH 4.5. El TRIzol se añadió en la proporción de 1 ml para cada 10^7 células. Tras conseguir una solución homogénea, se añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12000 x g, a 4° C durante 15 minutos. De esta forma se obtuvieron dos fases: la acuosa, que contenía el RNA, y la orgánica con las proteínas y el DNA. Se recogió la fase acuosa y se añadieron 250 μ l de isopropanol y 250 μ l de solución de sales (0.8 M citrato sódico y 1.2 M NaCl). Se centrifugó de nuevo a 12000 x g a 4° C durante 10 minutos para precipitar el RNA. El precipitado se lavó con etanol al 75% en H₂O-DEPC (agua desionizada MilliQ, Millipore, 0.01% dietilpirocarbonato). El pellet se resuspendió en H₂O-DEPC y se almacenó a -80° C hasta su uso. La cantidad de RNA presente en la muestra se determinó mediante la valoración de la razón A260/280 en NANO DROP.

Síntesis de DNA complementario y amplificación por PCR (RT-PCR)

Se partió de muestras con 3 μ g de RNA para obtener 20 μ l de DNA complementario (cDNA) utilizando la enzima transcriptasa inversa (RT). Los 3 μ g de muestra se diluyeron hasta un volumen de 11.3 μ l en solución de H₂O-DEPC y se calentaron a 68° C durante 10 minutos para permitir la completa disociación del RNA. Después se añadió a cada tubo la mezcla de RT: Tampón 5x, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 4 μ M N6 (mezcla de hexanucleótidos), 1 U/ μ l RNasin, 10 U/ μ l de RT del virus de la leucemia

murina (MMLV) y H₂O-DEPC hasta completar un volumen de 20 µl. Las muestras se incubaron a 37° C durante una hora. El cDNA obtenido se almacenó a -20° C.

PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR)

La PCR a tiempo real es un método basado en la detección continua del producto de amplificación del RNA durante el transcurso de la PCR. Para la detección se usó un agente intercalante que aumenta su fluorescencia en más de 100 veces tras su unión con el DNA de doble cadena, el *SYBR Green I*. En particular, se utilizó la mezcla comercial (*DNA Master Mix SYBR Green I* de KAPA Biosystems) compuesta por *SYBR Green I*, Taq polimerasa y una mezcla de dNTPs.

Para llevar a cabo la PCR se partió de 1,5 µl de cDNA obtenidos de la RT, a los que se añadió: 0,5 µl de primer sense, 0,5 µl de primer antisense y la mezcla comercial *DNA Master Mix SYBR Green I*, hasta completar 25 µl. La polimerasa necesita un paso previo de activación por calor (15 minutos a 95°C), lo cual minimiza la amplificación de productos no deseados. Todas las reacciones se realizaron por duplicado. Mediante PCR se amplificaron las secuencias específicas de los genes de interés. Los cebadores se diseñaron según las secuencias humanas obtenidas del *GeneBank* (Tabla1). Para poder descartar la contaminación genómica, los cebadores se eligieron flanqueando distintos intrones.

Tabla 1: Relación de cebadores empleados en PCR.

GAPDH, *GeneBank* AC NM002046

5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3' (s)

5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3' (as)

CHOP, *GeneBank* AC NM001195057

5'-GCAGAGATGGCAGCTGAGTC-3' (s)

5'-AGCCAAGCCAGAGAAGCAGGGT-3' (as)

XBP1, *GeneBank AC* NM001079539

5'-TAAGACAGCGCTTGGGGATGGA-3' (s)

5'-CTGCACCTGGTCGCGGACTCA-3' (as)

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador LightCycler M480 System de Roche. El programa de amplificación estándar incluyó: una desnaturalización inicial a 94° C durante 5 minutos y 40 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 1 minuto; hibridación durante 1 minuto por cada kilobase del fragmento a amplificar; elongación a 72° C durante 1 minuto por cada kilobase del fragmento amplificado; y elongación final a 72° C durante 10 minutos. Para comprobar la eficiencia del proceso de la Q-PCR, se amplificó en todas las muestras un gen con expresión constitutiva, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La cuantificación se realizó determinando el ciclo de la PCR en el que la amplificación comenzó a ser exponencial y que se denomina ciclo umbral (CT).

Detección de cDNA por electroforesis en gel de agarosa

Se realiza electroforesis-detección de cDNA. Para ello se prepara un gel de agarosa al 3,5% al que se le añade tras hervir un agente intercalante RedSafe. Se deja solidificar en placa de 4 x 4 cm colocando un peine para la formación de pocillos. Las muestras se cargan en cada pocillo con 15 µl de cDNA y 3 µl de buffer de carga (proporción final 1x); se añaden en 2 pocillos 5 µl de marcadores de migración de distintos tamaños (pares de bases). Finalmente se visualiza el tamaño de cDNA (inversamente proporcional a la velocidad electroforética) amplificado bajo lámpara UVA.

RESULTADOS

El zymosan y el LPS fueron estímulos potentes de la producción de IL-23 en CD derivadas de monocitos humanos, mientras que otros estímulos como los complejos antígeno/anticuerpo OVA/anti-OVA realizados a equivalencia (IC), que son reconocidos por los receptores Fc γ R, y el IFN- γ fueron inactivos (Fig. 3A).

El zymosan indujo una producción de IL-23 más elevada que la producida por el LPS, pero no pudo observarse una diferencia significativa dada la gran dispersión de resultados que se observó, y que incluye algunos sujetos que no produjeron IL-23. La respuesta máxima al zymosan se observó con concentraciones superiores a 0.5 mg/ml (Fig. 3B), lo que concuerda con estudios previos en los que se describía que la producción óptima se obtiene con concentraciones superiores a 0.2 mg/ml y que se los patrones de dosis-respuesta son distintos para cada citocina.

En línea con publicaciones recientes que indican que el LPS ultrapuro no induce cantidades detectables de IL-12 e IL-23 en las CD humanas, la respuesta al LPS no se saturó con concentraciones tan altas como 20 μ g/ml (Fig. 3C), lo que sugiere que el proceso de diferenciación de monocitos a DC, que se asocia con una caída de la expresión de CD14, podría explicar estos hallazgos. Alternativamente, la respuesta óptima al LPS podría depender de la presencia concomitante de señales producidas por otros agonistas, por ejemplo, IFNs.

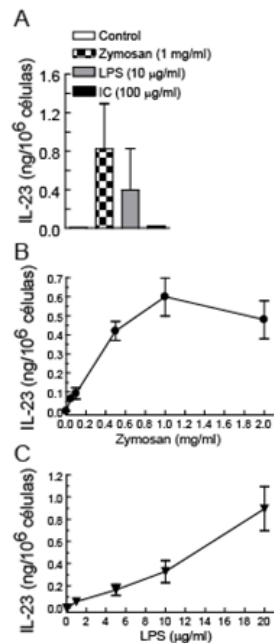


Fig. 3. **Producción de IL-23 por diferentes estímulos.** La producción de IL-23 en un grupo de 20 muestras de CD estimuladas durante 24 horas con los estímulos indicados se muestra en (A). El efecto de diferentes concentraciones de zymosan y LPS se muestran en (B) y (C), respectivamente.

Puesto que se ha referido que un factor determinante de la producción de IL-23 es la activación del factor de transcripción CHOP (10), uno de los elementos fundamentales del estrés de RE, y que la producción de IL-23 es un factor fundamental de la respuesta al zymosan, se estudió la activación de este factor en respuesta a los patrones moleculares de patógenos.

Como se muestra en la Fig. 4A, las CD en reposo muestran un cierto grado de estrés basal de RE, a juzgar por la presencia de cantidades detectables de CHOP en el núcleo; en forma similar a lo observado en células RAW264.7, que presentan estrés constitutivo secundario a la expresión de un retrovirus. Curiosamente, las células plasmáticas y las células plasmocitoides dendríticas también muestran un cierto grado basal de estrés de ER que es necesario para su supervivencia (7).

Es llamativo que tanto la estimulación con zymosan como con LPS produjo la desaparición de CHOP del núcleo celular, lo que indicaría que contrariamente a nuestra hipótesis inicial, la estimulación de las CD por estímulos de la inmunidad innata conduce a la inactivación de uno de los componentes más importantes de la UPR.

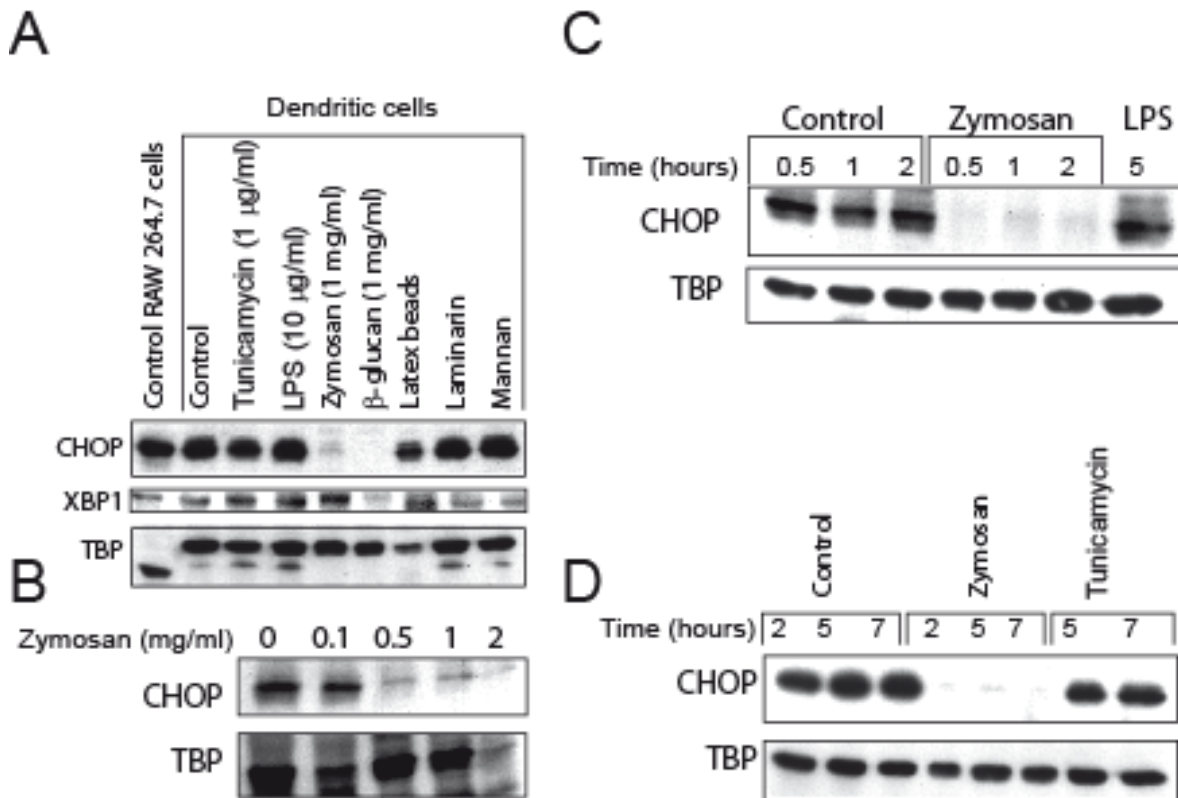


Fig. 4. Efecto de la fagocitosis de las partículas de zymosan y de la tunicamicina sobre la expresión de CHOP en extractos nucleares. Como control de expresión se utilizó un modelo bien conocido de línea celular (RAW 264.4) que expresa de manera basal CHOP, y se muestra en la calle de la izquierda. Por tratarse de una línea murina, se observa que existe diferente migración de la proteína TBP usada como control de carga (A). Se observa que las CD en reposo contienen cantidades detectables de proteína CHOP (A-D) que desaparece tras la estimulación con concentraciones de zymosan superiores a 0.1 mg/ml (B) incluso a tiempos tan cortos como media hora. Curiosamente la tunicamicina no aumenta de forma apreciable el nivel de CHOP sobre el detectado en las células en reposo (D).

Con el fin de determinar si la desaparición de CHOP se produce como consecuencia de su degradación o como consecuencia de cambios a nivel transcripcional, se estudió la expresión del mRNA de *chop*. Como se muestra en la Fig. 5, los niveles de mRNA de

chop no se modificaron por la estimulación con LPS y zymosan, y sólo la tunicamicina indujo un aumento de la expresión, lo que indicaría que la reducción de la expresión de proteína CHOP se debe a un aumento de degradación, más que a una reducción de su transcripción.

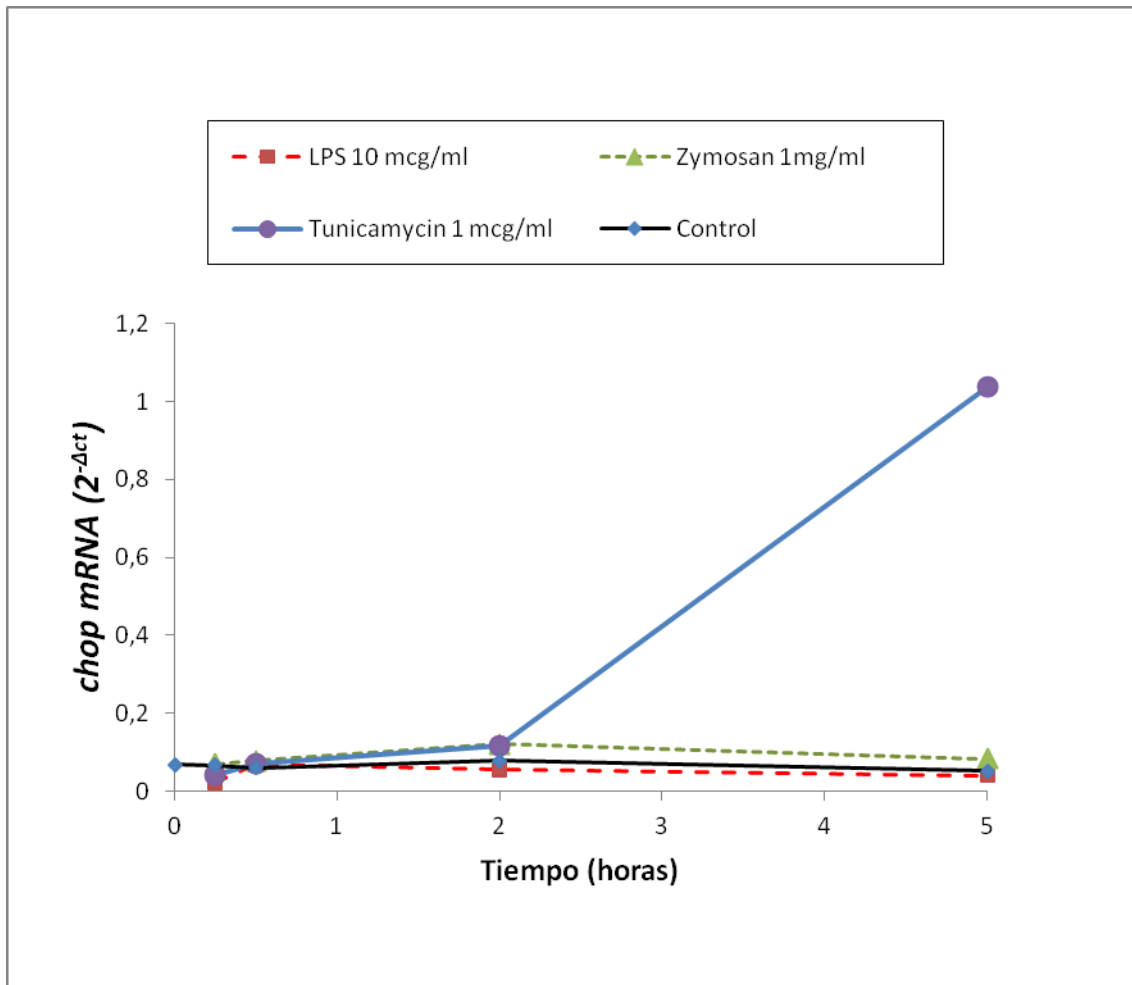


Fig. 5. **Cinética de la inducción del mRNA de CHOP en CD frente a distintos estímulos.** Las CD se estimularon en presencia de distintos estímulos y a los tiempos indicados se procedió a extraer el RNA total para la detección del mRNA de *chop*.

Otro de los componentes de la UPR es el *splicing* atípico de XBP1 y la aparición de las formas sXBP1 y de híbridos de las dos isoformas. Como se muestra en la Fig. 6, el zymosan fue capaz de producir un cierto grado de *splicing* de XBP1, sin embargo, su

intensidad fue notablemente inferior a la producida por la tunicamicina y por ello fue necesario realizar experimentos adicionales para definir la relevancia fisiológica de estos cambios. Para ello se utilizó el abordaje de PCR en tiempo real para cuantificar sXBP1, mediante el empleo de un primer antisense con 20 nucleótidos seleccionados en los bordes del área de splicing para amplificar exclusivamente este transcrito (Fig. 7).

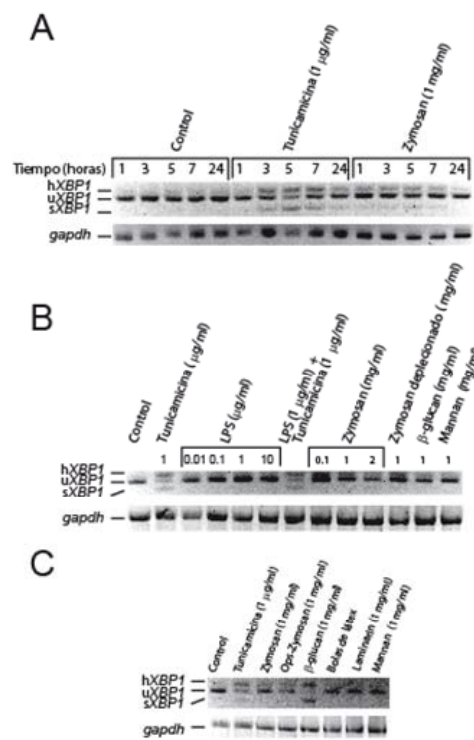


Fig. 6. **Efecto de distintos estímulos sobre la activación de XBP1.** Las CD se estimularon durante los tiempos indicados con distintos estímulos. Al final del periodo de incubación, el RNA total se extrajo para la detección de las formas sin *splicing* (*XBP1u*), con *splicing* (*XBP1s*) e híbridos (*XBP1h*) resultantes del *annealing* de las formas *XBP1u* y *XBP1s*. La electroforesis se desarrolló en geles con agarosa al 3,5% desarrollados tiempo suficiente para permitir el diferente comportamiento electroforético de productos que se diferencian en 26 pares de bases.

La falta de respuesta de la transcripción de *chop* y de *sXBP1* ante un estímulo como zymosan, en contraste con la respuesta a tunicamicina (estímulo de estrés de RE no

fisiológico); nos sugirió la conveniencia de estudiar posibles mecanismos de control de la aparición de estrés de RE, dado que se ha descrito que la defosforilación de eIF2B por la fosfatasa PP2A es un mecanismo de resistencia a la aparición de estrés de RE. En la Fig. 7, se muestra que la activación de la fosfatasa PP2A por el compuesto 1,9-dideoxi-forskolin produce un descenso de la expresión de los mRNAs que codifican los factores de transcripción involucrados en las vías de PERK e IRE-1, en respuesta a la tunicamicina, mientras que en caso del zymosan, el pequeño aumento de la expresión de *sXBP1* no se modifica por el tratamiento. Estos resultados indicarían en el caso de la tunicamicina, un mecanismo de inducción de estrés de retículo modulable por la fosfatasa PP2A; mientras que este no sería el caso del estrés inducido por zymosan.

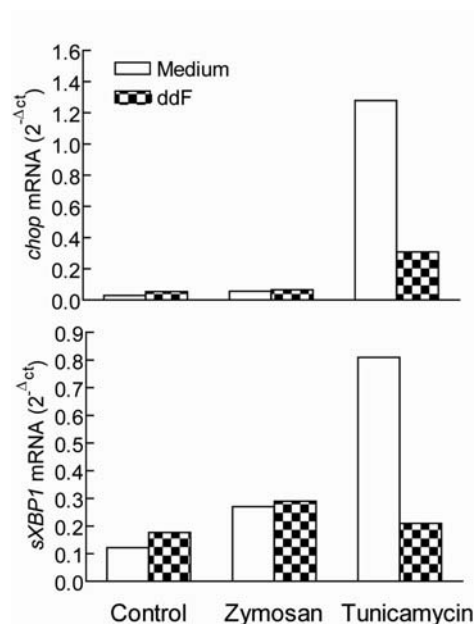


Fig. 7. **Efecto del zymosan y de la tunicamicina sobre la expresión de sXBP1 y CHOP.** Las CD se estimularon durante 5 horas con zymosan o tunicamicina. El RNA total se extrajo para la detección de CHOP y de la forma sXBP1 mediante RT-PCR en tiempo real. En experimentos en paralelo, las CD se trataron con el activador de fosfatasa PP2A (1,9-dideoxi-forskolin [ddF] 40 μ M), que produce resistencia a la inducción de stress mediante la defosforilación de serinas en IRE1, bloqueando a nivel proximal la activación de IRE1 y el splicing de XBP1 (11).

El efecto de la activación PP2A sobre el splicing XBP1 se muestra también en la Fig. 8, al confirmarse en la RT-PCR semicuantitativa la inhibición de la producción de *splicing* de XBP1 en respuesta a tunicamicina, pero no a zymosan, por el tratamiento con dideoxi-forskolin.

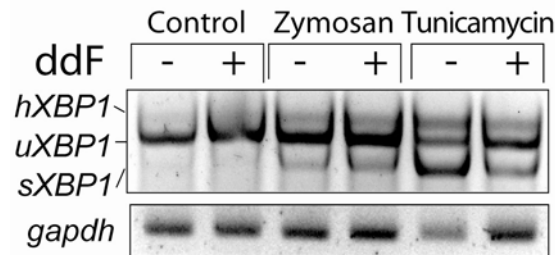


Fig. 8. Efecto del zymosan y de la tunicamicina sobre el splicing de XBP1. Las CD se estimularon durante 5 horas con zymosan o tunicamicina en presencia y ausencia de 1,9-dideoxi-forskolin (ddF).

Estos datos indicarían que las CD no responden a la fagocitosis de partículas de zymosan mediante la producción de estrés de RE, aunque sí lo hacen con estímulos más potentes, pero sin relevancia fisiológica, como es la tunicamicina.

El hecho de que la producción de IL-23 inducida por el zymosan se acompañe de degradación de la proteína CHOP y no produzca *splicing* de XBP1 indicaría que los factores de transcripción directamente activados en el estrés de RE no influyen en la regulación transcripcional de *il23a*.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La activación de las CD por patrones moleculares de patógenos derivados de la pared de hongos, no produce estrés de RE, al contrario de la predicción inicial. Puede especularse que ello sea un mecanismo de defensa para mantener la capacidad fagocítica y evitar una apoptosis masiva que comprometería la defensa del huésped.

Respecto a la resistencia al estrés de RE, recientemente se ha publicado que la sirtuina 1 atenúa el estrés de RE y la resistencia a la insulina en el hígado (8). Puesto que el zymosan es un potente activador de la sirtuina 1, es posible que la inducción de esta proteína sea la responsable de la resistencia al estrés de RE.

El mecanismo más comúnmente asociado con la resistencia al estrés de RE es la activación de PP2A (12). La Fig. 9 refleja cómo la activación de PP2A durante la estimulación de receptores de reconocimiento de patrones bloquea la síntesis de CHOP al promover la resistencia a p-eIF2 α . Por otra parte, la activación de PP2A también bloquea el stress de retículo al defosforilar IRE1 α , ocasionando un descenso de XBP1, como se muestra en la Fig. 7.

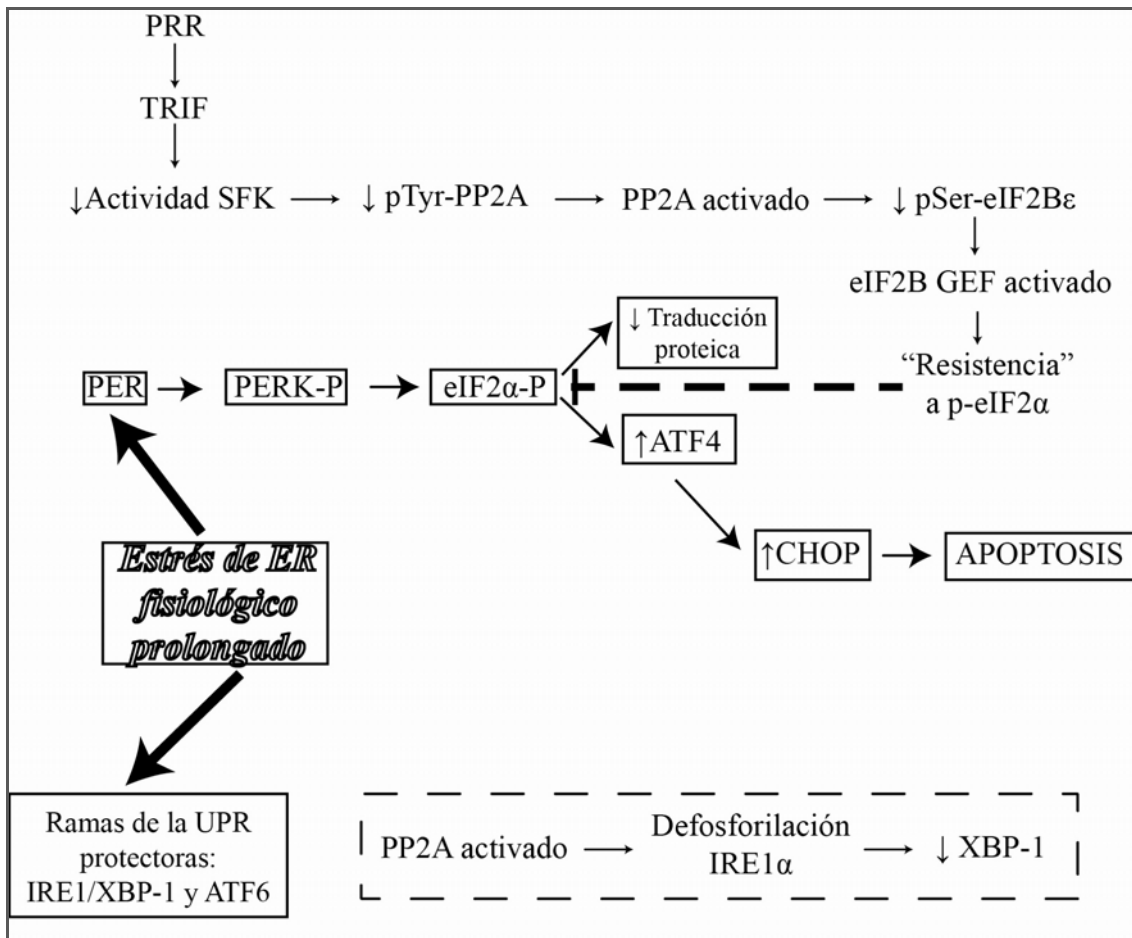


Fig 9. **Modelo de regulación de CHOP y XBP1.** Explica cómo ante una situación de estrés fisiológico se pone en marcha un sistema regulador que previene de la muerte celular y promueve la transcripción de mRNAs involucrados en la defensa del huésped, regulando a la baja CHOP y al alza XBP1. En recuadro con guiones se muestra la participación de la vía de PP2A en la regulación de IRE1 α .

Sin embargo, estos datos no explican los mecanismos subyacentes a esta respuesta ni como pueden influir en la producción de IL-23.

Dos son las posibles hipótesis que podrían explicar la activación de la transcripción de *il23a* en ausencia de estrés de RE:

- La primera de ellas tendría en cuenta el papel inhibitorio de la transcripción de CHOP. De hecho, CHOP es capaz de formar heterodímeros con C/EBP β , que actúan como inhibidores de la transcripción dependiente de C/EBP β . Sobre esta

base, la degradación de CHOP supondría la desaparición de un freno para la transcripción dependiente de C/EBP β .

- Otra explicación podría depender de la activación de la sirtuina 1, que es una desacetilasa de lisina cuyo substrato son proteínas sobre las que se producen reacciones de acetilación/desacetilación. Curiosamente, C/EBP β acetilado en las lisinas 264 y 265, que son homólogas de las lisinas 215 y 216 en el ratón, carece de capacidad para unirse al DNA (9). Así, una hipótesis unificadora de la relación entre la fagocitosis de zymosan, la resistencia al estrés de RE y la activación transcripcional de *il23a* podría hacerse a través de la activación de sirtuina 1, que además de proteger del estrés de RE desacetilaría C/EBP β y mantendría su capacidad de unión al promotor de *il23a* para producir su activación transcripcional en colaboración con NF- κ B.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, and Trinchieri G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170:827-846.
2. Alvarez Y, Municio C, Hugo E, Zhu J, Alonso S, Hu X, Fernández N, Sánchez Crespo M. (2011). Notch- and transducin-like enhancer of split (TLE)-dependent histone deacetylation explain interleukin 12 (IL-12) p70 inhibition by zymosan. *J. Biol. Chem.* 286:16583-95.
3. Park H, Bourla AB, Kastner DL, Colbert RA, and Siegel, RM. (2012). Lighting the fires within: the cell biology of autoinflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 12:570-580.
4. Woo CW, Kutzler L, Kimball SR, and Tabas I. (2012). Toll-like receptor activation suppresses ER stress factor CHOP and translation inhibition through activation of eIF2B. *Nat. Cell Biol.* 14:192-200.
5. Goodall JC, Wu C, Zhang Y, McNeill L, Ellis L, Saudek V, Gaston JS. (2010). Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107:17698-703.
6. Fabio Martinon, Xi Chen, Ann-Hwee Lee, and Laurie H. Glimcher. (2010). Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* 11:411–418.

7. Iwakoshi NN, Pypaert M, Glimcher LH. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204:2267-2275.
8. Li Y, Xu S, Giles A, Nakamura K, Lee JW, Hou X, Donmez G, Li J, Luo Z, Walsh K, Guarente L, Zang M. (2011). Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *FASEB J.* 25:1664-1679.
9. Serrat N, Pereira-Lopes S, Comalada M, Lloberas J, Celada A. (2012). Deacetylation of C/EBP β is required for IL-4-induced arginase-1 expression in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* doi: 10.1002/eji.201242413.
10. Goodall J, Wu C, Zhang Y, McNeill L, Ellis L, Saudek V (2010). Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *PNAS.* 41:17698-17703.
11. Rossana Trotta, David Ciarlariello, Jessica Dal Col, Hsiaoyin Mao, Li Chen, Edward Briercheck, Jianhua Yu, Jianying Zhang, Danilo Perrotti, and Michael A. Caligiuri. (2010). The PP2A inhibitor SET regulates granzyme B expression in human natural killer cells *Blood.* 117:2378–2384.
12. Yifu Qiu, Ting Mao, Yongliang Zhang, Mengle Shao, Jia You, Qiurong Ding, Yan Chen, Dongmei Wu, Dong Xie, Xu Lin, Xiang Gao, Randal J. Kaufman, Wenjun Li, and Yong Liu (2010). A crucial role for RACK1 in the regulation of glucose-stimulated IRE1 α activation in pancreatic β -cells. *Sci Signal.* doi:10.1126/scisignal.2000514.