

# Modulación de la expresión de citoquinas por cambios metabólicos y estrés de retículo endoplasmático

Máster en investigación biomédica

José Javier Fernández Rodríguez  
Valladolid 2016



---

**Universidad de Valladolid**



**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**  
Departamento de bioquímica, biología molecular y fisiología  
Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

**Tutores:**  
Dra. M<sup>a</sup> Nieves Fernández García  
Dr. Mariano Sánchez Crespo



# Abreviaturas

- **2-DG**: 2-desoxi-D-glucosa.
- **2-DG-6-P**: 2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato.
- **APCs**: Células presentadoras de antígeno.
- **Asn**: Asparragina.
- **ATF2**: *activating transcription factor-2*.
- **ATF4**: *activating transcription factor-4*.
- **ATF6**: *activating transcription factor-6*.
- **BiP**: *immunoglobulin binding protein*.
- **C/EBP $\beta$** : *CCAAT/enhancer-binding proteins  $\beta$* .
- **CBP**: *CREB-binding protein*.
- **CLRs**: Receptores lectina tipo-C.
- **CHOP**: *CCAAT-enhancer binding protein homologous protein*.
- **COX**: Cicloxigenasa.
- **CREB**: *cAMP response element-binding*.
- **Cys**: Cisteína.
- **DAMPs**: Señales endógenas asociadas a daño tisular.
- **DC-SIGN**: *Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin receptor*.
- **DCs**: Células dendríticas.
- **cDCs**: Células dendríticas convencionales.
- **iDCs**: Células dendríticas inmaduras.
- **moDCs**: Células dendríticas derivadas de monocitos.
- **pDCs**: Células dendríticas plasmocitoides.
- **DoI-PP**: Dolicol-difosfato.
- **ECAR**: Ratio acidificación extracelular.
- **eIF2 $\alpha$** : Factor de iniciación de la traducción eucariota-2.
- **ER**: Retículo endoplásmico.
- **ERK**: *Extracellular signal-regulated kinases*.
- **FCCP**: *carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxy-phenylhydrazine*.
- **Glc**: Glucosa.
- **GlcNAc**: N-acetil-glucosamina.
- **GLUTs**: Transportadores de glucosa.
- **GM-CSF**: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
- **GRP78**: *glucose-regulated protein-78*; chaperona más conocida como BiP.
- **GRP94**: *Glucose-regulated protein-94*.
- **HK**: Hexoquinasa.
- **IFN- $\gamma$** : Interferon gamma.
- **IL1B**: interleuquina-1B.
- **pro-IL-1B**: pro-interleuquina-1B.
- **IL4**: Interleuquina-4.
- **IL10**: Interleuquina-10.
- **IL12p70**: Interleuquina-12p70.
- **IL23**: Interleuquina-23.
- **IRE1 $\alpha$** : *Inositol-requiring protein-1 $\alpha$* .
- **LPS**: Lipopolisacárido bacteriano.
- **Man**: Manosa.
- **MAPK**: *Mitogen-Activated Protein Kinases*.
- **MEK**: derivado de *MAPK/ERK Kinase*.
- **MHC**: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- **MR**: Receptor de manosa.
- **MSK1**: *Mitogen-and stress-activated protein kinase*.
- **NF- $\kappa$ B**: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- **NK**: *Natural Killers*.
- **OCR**: Ratio consumo de oxígeno mitocondrial.
- **OXPHOS**: Fosforilación oxidativa.
- **PAMPs**: Patrones moleculares asociados a patógenos.
- **PERK**: *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*.
- **PKA**: Proteína quinasa A.
- **PKC**: Proteína quinasa C.
- **PMN**: polimorfonucleares.
- **Pro**: Prolina.
- **PRRs**: Receptores de reconocimiento de patrones.
- **Rot/AA**: Rotenona y Antimicina A.
- **S1P/S2P**: *site 1 y site 2 protease*.
- **Ser**: Serina.
- **SRC**: Capacidad respiratoria de reserva.
- **TCA**: Ciclo de las ácido tricarboxílicos.
- **TCR**: Receptor célula T.
- **Thr**: Threonina.
- **TLRs**: Receptores tipo *Toll*.
- **Tregs**: Células T reguladoras.
- **UPR**: Respuesta a proteínas mal plegadas.
- **XBP1**: *X-box binding protein-1*.
- **sXBP1**: *splicing XBP1*.
- **uXBP1**: *Unsplicing XBP1*.

# Índice

## I Introducción

1. El sistema inmunitario
  - 1.1. Reconocimiento de patógenos
  - 1.2. La inmunidad innata y adaptativa
  - 1.3. Células del sistema inmune: células dendríticas derivadas de monocitos humanos
2. Inmunometabolismo
3. El retículo endoplásmico
  - 3.1. Plegamiento de proteínas y modificaciones post-traduccionales
  - 3.2. Estrés de retículo endoplásmico y respuesta a proteínas mal plegadas
4. Regulación de la producción de citoquinas
5. Regulación transcripcional de *IL23A*

## II Hipótesis y objetivos

## III Materiales y métodos

1. Cultivos celulares
  - 1.1. Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos humanos a partir de *buffy coats*
  - 1.2. Reactivos y medios de cultivo
  - 1.3. Caracterización metabólica a tiempo real
2. Análisis de la expresión génica
  - 2.1. Extracción de ARN total
  - 2.2. Síntesis de ADN complementario (cDNA)
  - 2.3. RT-qPCR
  - 2.4. Ensayo *splicing* XBP1
3. Preparación de extractos celulares y Western Blot
  - 3.1. Obtención de extractos celulares
  - 3.2. Obtención de extractos nucleares y citosólicos
  - 3.3. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y transferencia a membrana de nitrocelulosa
4. Inmunoprecipitación de cromatina (chIP)
5. Análisis estadístico

## IV Resultados

1. Caracterización de la respuesta metabólica de las células dendríticas a la estimulación con zimosan
2. Influencia del metabolismo de la glucosa sobre el perfil de producción de citoquinas
3. Estudio de los elementos implicados en el mantenimiento de la homeostasis del retículo endoplásmico en presencia de 2-DG y en ausencia de glucosa
  - A. Efectos de la 2-DG sobre la N-glicosilación de la cicloxigenasa-2
  - B. El aumento en la expresión génica de *CHOP* se regula post-traduccionamente en células estimuladas con zimosan
  - C. Activación del *splicing* de XBP1
4. Regulación transcripcional de *IL23A*

## V Discusión

## VI Conclusiones

## VII Bibliografía

# I. Introducción

## 1. El sistema inmunitario

El sistema inmunitario se ha desarrollado a lo largo del proceso evolutivo para combatir las infecciones y proteger al organismo frente a elementos que suponen una amenaza para su integridad mediante una respuesta que permita la supervivencia. Por este motivo, el sistema inmune es el encargado de mantener la homeostasis celular mediante la eliminación del patógeno y reparación del daño causado.

Las células del sistema inmunitario tienen la cualidad de poder diferenciar lo propio de lo extraño, “*self non-self model*” (1) sugerido por Burnet en los años 60 cuando trataba de explicar la tolerancia inmune. Posteriormente, Janeway precisó con más acierto esta cualidad al enunciar como principio funcional del sistema inmune la propiedad de distinguir lo “Propio no infeccioso de lo infeccioso no propio”. Este concepto ha permitido reconocer el papel de los patrones moleculares como elementos fundamentales en el reconocimiento de los patógenos. Como una continuación de esta teoría del reconocimiento por el sistema inmune, Matzinger P. sugirió el modelo de peligro “*Danger model*” (2) que añade a la capacidad del organismo para discriminar lo potencialmente peligroso mediante el reconocimiento de patógenos, la identificación de señales de alarma procedentes de tejidos dañados.

El sistema inmunitario está constituido por un conjunto heterogéneo de células, que en condiciones fisiológicas se encuentran en reposo y pueden activarse rápidamente para responder ante la presencia de microorganismos o cualquier alteración de la composición del medio interno. El mecanismo de activación se debe a que estas células contienen un variado repertorio de receptores que discriminan entre lo propio y lo ajeno y se denominan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) porque reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y señales endógenas generadas durante el daño tisular (DAMPs)(3).

### 1.1 Reconocimiento de patógenos

El reconocimiento de patógenos puede ocurrir de forma directa a través de receptores de membrana y citoplasmáticos. Entre la gran variedad de PRRs expresados en mamíferos, los mejor caracterizados son los receptores de membrana tipo *Toll* (TLRs), que reconocen componentes de la pared bacteriana, proteínas virales o ácidos nucleicos. Por otra parte, la familia de los receptores de lectina tipo-C (CLRs) es fundamental para el reconocimiento de patrones fúngicos (4-5).

Los TLRs se expresan de forma predominante en las células presentadoras de antígeno (APCs); los humanos expresan los TLRs del 1 al 10. Los CLRs forman una gran familia receptores como el receptor de manosa (MR), *dectin-1*, *dectin-2*, *dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin receptor* (DC-SIGN) y las colectinas que están implicados en la defensa frente a la infección fúngica al intervenir en el reconocimiento, captación y eliminación del patógeno. Asimismo, contribuyen al inicio de la respuesta inmune adaptativa (6).

Los microorganismos presentan gran cantidad de PAMPs que no se encuentran en los mamíferos, por lo que representan una diana ideal para el reconocimiento de lo

“infeccioso no propio”. Son estructuras altamente conservadas a lo largo de la evolución porque intervienen en mecanismos indispensables para la supervivencia del microbio.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) está presente en la membrana exterior de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Estructuralmente está formado por tres porciones, de las que dos son hidrofílicas: la porción central compuesta por motivos repetidos de polisacáridos y la porción denominada antígeno O, y un dominio hidrofóbico compuesto por seis cadenas de ácidos grasos, al que se denomina lípido A y que es el componente biológicamente activo del LPS. El LPS es reconocido por el receptor TLR4 y da lugar a la producción de mediadores inflamatorios. (7)

El zimosan es una preparación insoluble y particulada de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se utiliza desde hace más de 50 años como modelo de estímulo fagocítico e inflamatorio. Se compone principalmente de  $\beta(1-3)$  y  $\beta(1-6)$  glucanos y  $\alpha$ -mananos. También incluye quitinas, proteínas y lípidos. Es reconocido principalmente por TLR2 y *dectin-1* (8).

En general, los microorganismos contienen más de un PAMP, esta multiplicidad es reconocida en la sinapsis fagocítica, donde múltiples componentes de la pared celular activan a más de un PRR. Este proceso continúa con la degradación microbiana en los fagolisosomas, lo que permite la liberación de nuevos PAMPs (ADN o ARN) capaces de activar PRR intracelulares. La integración de las señales de diferentes PRRs durante la fagocitosis induce la liberación de citoquinas y mediadores lipídicos y la expresión de los genes implicados en la respuesta inmune (9).

## **1.2 La inmunidad innata y adaptativa**

El estudio de los mecanismos de defensa del huésped han permitido distinguir una respuesta inmune innata, inmediata e inespecífica; y una respuesta inmune adaptativa, adquirida y específica. Este conjunto de mecanismos y células guardan una estrecha relación y permiten al sistema inmune la capacidad de detectar y eliminar patógenos eficientemente. Las APCs, en especial las células dendríticas y los macrófagos, tienen un papel fundamental en la conexión entre inmunidad innata y la adaptativa, ya que son las responsables de reconocer, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T (10).

La respuesta inmune adaptativa se inicia cuando las células T reconocen péptidos “no propios” unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresadas en la superficie de las APCs a través del receptor de las células T (TCR). El reconocimiento mediante este estímulo no es suficiente para la activación de las células T y se requiere la formación de un complejo de unión con moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 en las APCs, así como la liberación de citoquinas por las APCs que permite la diferenciación de los linfocitos T y la expansión clonal para dar lugar a una respuesta inmunitaria a gran escala (11).

## **1.3 Células del sistema inmune: Células dendríticas derivadas de monocitos humanos**

Las células del sistema inmune de los vertebrados se originan a partir de un progenitor común pluripotencial que da lugar a dos linajes celulares diferentes, el precursor mieloide y el precursor linfoide que, a su vez, dan lugar a células efectoras de la inmunidad innata y adaptativa.

Los monocitos procedentes de la médula ósea, viajan por el torrente sanguíneo y pueden migrar a diferentes tejidos. Tienen la capacidad de fagocitar y de diferenciarse a macrófagos o células dendríticas.

Las células dendríticas (DCs) poseen pseudópodos retráctiles de gran envergadura que le permiten fagocitar y atrapar patógenos. Son responsables de la captación, procesamiento y presentación de los antígenos para activar a las células T vírgenes (12). Existen cuatro subclases principales de DCs en humanos: DCs convencionales (cDCs), células de Langerhans, células dendríticas plasmocitoides (pDCs) y células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs).

El proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas se controla por citoquinas que actúan como factores de crecimiento y diferenciación. En presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleuquina-4 (IL4) se generan las células dendríticas (moDCs) *in vitro*. Estas células poseen la capacidad de capturar y procesar antígenos, y presentan en su superficie altos niveles de MHC, CD1, FcγRII, CD40, complejo B7 (CD80/CD86), CD44, ICAM-1 y CD11c; y a diferencia de los monocitos, escasa expresión de CD14 (13).

## 2. Inmunometabolismo

La necesidad de producir ATP para disponer de energía, es esencial para la activación de las células en reposo. La glucosa puede utilizarse para sustentar estos mecanismos por dos vías: i) La glicólisis, que consiste en la conversión de glucosa a piruvato en el citoplasma. En esta vía, los fosfatos se transfieren a partir de intermediarios glicolíticos a ADP para la generación de ATP. ii) La segunda vía, el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) genera NADH y FADH<sub>2</sub>, que donan electrones a la cadena de transporte de electrones para alimentar la fosforilación oxidativa (OXPHOS), el proceso por el cual se genera ATP en la mitocondria.

La glicólisis y el ciclo TCA se pueden integrar cuando el piruvato se convierte en acetil-CoA en el ciclo de Krebs. Las células del sistema inmune también tienen la capacidad de metabolizar otros sustratos, como la glutamina o los ácidos grasos a través de la glutaminólisis y la β-oxidación.

En situaciones de hipoxia, las células pueden producir ATP principalmente mediante glicólisis en el citoplasma y desviar el piruvato hacia lactato en lugar de transportarse a las mitocondrias para producir acetil-CoA (14). Este mecanismo de producción de ATP llevado a cabo aunque haya presencia de oxígeno ocurre en algunas células cancerosas y se conoce como metabolismo Warburg (15).

Las células del sistema inmune tienen una gran plasticidad para orientar su metabolismo en la forma más eficiente dependiendo de la disponibilidad de sustrato y de la necesidad de producir precursores metabólicos e intermediarios químicos con capacidad de señalización bioquímica adecuados a su función homeostática. A su vez, la modulación del estado metabólico de las DCs puede usarse para modificar la respuesta inflamatoria con fines terapéuticos (16). En la actualidad existen técnicas precisas para medir el consumo de oxígeno y la acidificación del medio extracelular en tiempo real (17).

Aún no se conoce en detalle como en la transición entre las células dendríticas inmaduras (iDCs) y las DCs activadas por los PRRs, se lleva a cabo la síntesis de componentes lipídicos y proteicos necesarios para la maduración. Sin embargo, es obvio que diversos orgánulos celulares como el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi deben soportar estas demandas celulares y realizar la síntesis de proteínas con una estructura óptima para su función (18).

### **3. El retículo endoplásmico**

El retículo endoplásmico es un orgánulo presente en todas las células eucariotas, que desempeña un papel fundamental en numerosos procesos celulares necesarios para la supervivencia y el funcionamiento normal de la célula. Entre las funciones más importantes del retículo endoplásmico se encuentran el plegamiento y el transporte de proteínas de la ruta secretora, la biosíntesis de lípidos y el almacenamiento de calcio intracelular.

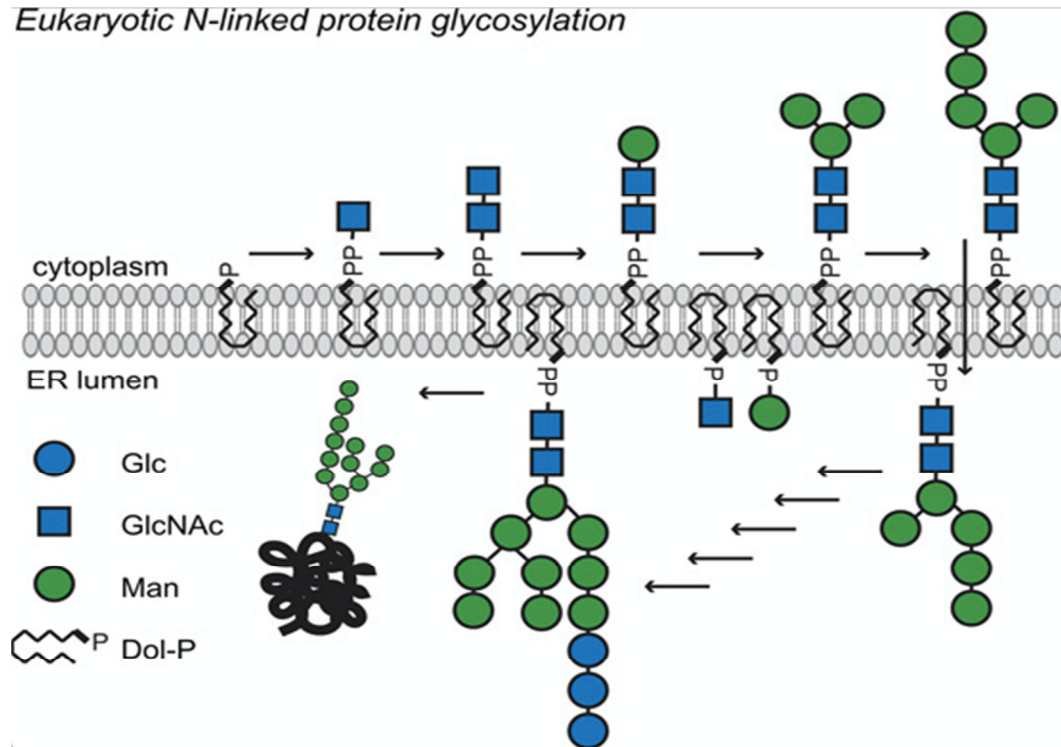
#### **3.1 Plegamiento de proteínas y modificaciones post-traduccionales**

Las proteínas por sus propiedades estructurales y la gran variedad de funciones enzimáticas que son capaces de realizar, determinan prácticamente todos los aspectos de la vida. Necesitan alcanzar su conformación tridimensional, necesaria para realizar su función, por lo que están en continuo peligro de sufrir un mal plegamiento y agregación (19). Además, la biogénesis de proteínas es un proceso con susceptibilidad de error ya que mutaciones genéticas, compuestos tóxicos, el estrés celular y errores espontáneos durante los procesos de transcripción y traducción pueden darse con cierta frecuencia, lo que puede comprometer el plegamiento de estas proteínas (20). Especial importancia en el plegamiento de proteínas tiene el retículo endoplásmico, puesto que contiene multitud de chaperonas que participan en el plegamiento y en la degradación de las formas defectuosas (21).

Modificaciones post-traduccionales como la N-glicosilación también se producen en el retículo endoplásmico y requieren de un control específico para que las proteínas alcancen su conformación definitiva. La manosa es un componente importante para la formación de los N-glicanos unidos a las proteínas. La N-glicosilación se produce sobre los residuos de asparragina (Asn) de las proteínas y modifica las propiedades y funciones de estas proteínas. La N-glicosilación en los residuos de Asn es el mecanismo mejor conocido, aunque son también posibles C-glicosilaciones en residuos de triptófano y O-glicosilaciones en residuos de Serina (Ser) y Threonina (Thr). La N-glicosilación en mamíferos se produce sobre una secuencia consenso Asn-Xxx-Ser/Thr/Cys (Xxx≠Pro) (22) en la vía secretora del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi mediante la transferencia de precursores de glicanos inmaduros (Glc3Man9GlcNAc2) a los residuos de Asn. Los defectos de la glicosilación de proteínas puede deberse a una restricción en la accesibilidad a los sitios de glicosilación, a una disminución de la actividad de las enzimas encargadas del proceso o a falta de disponibilidad de sustrato (23). En estos casos se puede producir una respuesta a proteínas mal plegadas que de no ser suficiente, permitiría la aparición de estrés de retículo endoplásmico.



### Eukaryotic N-linked protein glycosylation



**Figura 1. Esquema N-glicosilación en proteínas.** La vía de N-glicosilación en células eucariotas requiere la presencia de dolicol-difosfato (Dol-PP) para la articulación de un esqueleto de glicanos que en su conformación más extendida está compuesto por 2 N-acetil-glucosamina, 9 manosas y 3 glucosas (Glc3Man9GlcNAc2) que se unen a residuos de Asn. Imagen tomada de Hartley MD (2012) (59).

### 3.2 Estrés de retículo endoplásmico y respuesta de proteínas mal plegadas

Para asegurar el correcto plegamiento y ensamblaje de todas las proteínas que salen del retículo endoplásmico, la célula ha desarrollado mecanismos de control específicos en este orgánulo. Gran variedad de factores pueden afectar la homeostasis del retículo y a los procesos de plegado de proteínas, lo que puede conducir a la acumulación de proteínas mal plegadas y estrés del retículo. Con el fin de mitigar el estrés en el retículo endoplásmico, la célula ha desarrollado una respuesta coordinada conservada a lo largo de la evolución denominada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (24).

Las señales de estrés en el retículo endoplásmico se transmiten de la membrana del retículo hasta el citosol mediante tres transductores, cada uno de los cuales determina una rama de señalización distinta. Estos transductores son: *inositol-requiring protein-1α* (IRE1α), *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) y *activating transcription factor-6* (ATF6). Todos ellos son proteínas de membrana cuya porción no integrada expuesta al lumen del retículo es capaz de detectar el nivel de estrés de este orgánulo y transmitir la información a través de la membrana (24).

Estos tres sensores se mantienen en un estado inactivo cuando están unidos a la chaperona GRP78, más conocida como *immunoglobulin binding protein* (BiP). Las fracciones N-terminales de los tres sensores transmembrana se encuentran adheridas a BiP en el lumen, lo cual previene su agregación. Cuando en el retículo endoplásmico se acumulan proteínas mal plegadas, BiP se libera de estas proteínas de señalización para

asistir como chaperona en el plegamiento de las proteínas mal plegadas, permitiendo así la oligomerización de los transductores y, de esta manera, la activación de la UPR (25).

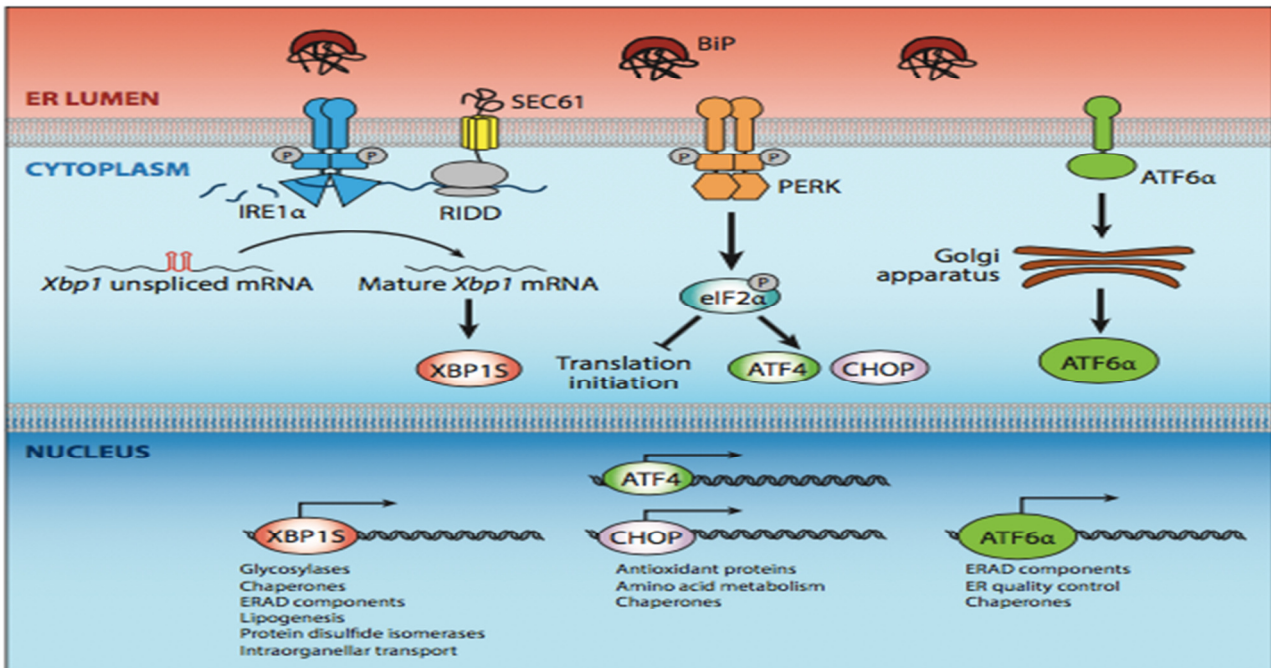
De forma conjunta, la activación de estos sensores conduce a una serie de eventos de transducción de señales que llevan al aumento de la expresión de determinadas chaperonas del retículo, a la inhibición de la entrada de proteínas en el retículo impidiendo la traducción del ARNm y a la aceleración de los procesos de exportación retrógrada de proteínas desde el retículo al citosol para su posterior ubiquitinación y degradación en el proteosoma.

A continuación describiremos el funcionamiento de cada una de las ramas de la UPR:

**IRE1 $\alpha$ :** Es una proteína transmembrana con actividades quinasa de Ser/Thr y endorribonucleasa. Cuando se produce estrés en el retículo endoplasmático, la proteína BiP se separa e IRE1 $\alpha$  oligomeriza en el plano de la membrana, permitiendo la trans-autofosforilación de los dominios quinasas yuxtapuestos. La fosforilación de IRE1 $\alpha$  produce un cambio alostérico de la proteína que deja expuesto el dominio endorribonucleasa. Esto permite el procesamiento endonucleolítico y escisión de un intrón intermedio del ARNm del factor de transcripción *X-box binding protein-1* (XBP1). El ARNm resultante del *splicing* codifica un factor de transcripción capaz de unirse al promotor de genes involucrados en la maduración y el plegamiento de proteínas, así como de genes relacionados con la salida del retículo y degradación en el citoplasma de proteínas no nativas. Igualmente, el IRE1 $\alpha$  es capaz de degradar por medio de su dominio endorribonucleasa muchos ARNm y permite reducir directamente la carga proteica en el retículo (26).

**PERK:** Es una proteína transmembrana con actividad Ser/Thr quinasa. Cuando BiP detecta deficiencias en el plegamiento de proteínas en el retículo y libera PERK, se produce la oligomerización y la trans-autofosforilación en el residuo Thr981, en el caso de los humanos. Este proceso confiere a PERK actividad catalítica completa y le permite la fosforilación de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la traducción eucariota-2 (eIF2 $\alpha$ ) en el residuo Ser51. Esta fosforilación produce la inactivación de eIF2 $\alpha$  resultando en una disminución de la traducción de ARNm y, por tanto, de la síntesis de nuevas proteínas (27). Sin embargo, hay que señalar que algunos ARNm, incluyendo el ARNm del factor de transcripción ATF4, son traducidos de manera más eficiente en condiciones en las que eIF2 $\alpha$  está fosforilado, a través de un sitio de iniciación de la traducción alternativo (28). ATF4 regula la transcripción de diversos genes implicados en la UPR, entre los que se encuentran BiP y GRP94 además de actuar como regulador positivo del factor de transcripción *CCAAT-enhancer binding protein homologous protein* (CHOP).

**ATF6:** posee un mecanismo de activación muy particular. Una secuencia hidrofóbica se ocupa del anclaje de esta proteína a la membrana del retículo endoplásmico en su forma inactiva. En condiciones de estrés, BiP libera ATF6 que es transportada al aparato de Golgi donde es cortada por dos proteasas distintas, *site 1* y *site 2 protease* (S1P y S2P). Como resultado de este proceso proteolítico, se libera al citosol el factor de transcripción ATF6-N (fracción N-terminal de ATF6), que podrá entonces entrar en el núcleo para regular la expresión de genes de respuesta a estrés del retículo (29).



**Figura 2. Esquema respuesta UPR.** Tras el estrés de retículo endoplásmico. BiP se disocia de los tres mediadores de la UPR, lo que conlleva su activación. IRE1 $\alpha$  provoca el *splicing* del ARNm de XBP1 y puede también degradar ARNm localizados en el retículo endoplásmico (ER) por la vía *IRE1 $\alpha$ -dependent decay* (RIDD). PERK fosforila eIF2 $\alpha$ , que inhibe la traducción de proteínas y facilita la producción de ATF4 y CHOP. ATF6 $\alpha$  se trasloca al aparato de Golgi donde proteasas de membrana liberan el factor de transcripción N-terminal. Las tres ramas funcionan de manera cohesiva para corregir el estrés, pero también pueden conducir apoptosis si el estrés ER no es solucionado. Imagen tomada de Bettigole SE, Glimcher LH (2014) (56).

#### 4. Regulación de la producción de citoquinas

Las citoquinas son proteínas secretadas por las células del sistema inmune que tienen un efecto específico en la comunicación intercelular por su capacidad para unirse a receptores de membrana e inducir mecanismos de señalización que conducen al cambio del patrón de expresión génica, a alteraciones en la organización del citoesqueleto y a diversas funciones complementarias que determinan la naturaleza de la respuesta inmune (30). Estas citoquinas se clasifican según sus propiedades estructurales y funcionales.

La interleuquina-1B (IL1B) es una citoquina proinflamatoria producida predominantemente por monocitos y macrófagos. Se produce en forma de precursor inactivo (pro-IL-1B) que debe sufrir un procesamiento enzimático para producir la proteína bioactiva. Una de las principales enzimas encargadas de este procesamiento es la caspasa 1 intracelular y el proceso se regula por unas plataformas proteicas multiméricas denominadas inflamomas.

La interleuquina-10 (IL10) es una citoquina que posee propiedades antiinflamatorias. Es secretada por la mayoría de leucocitos tras la estimulación celular con agonistas endógenos o exógenos, como el LPS o las catecolaminas que inducen su transcripción. La relevancia de esta citoquina se debe a su capacidad para limitar una reacción inmune excesiva y el daño tisular (31). Puede regular directamente la inmunidad innata y adaptativa (respuestas Th1 y Th2) mediante la diferenciación a células T reguladoras (Tregs) que suprimen la respuesta proinflamatoria en los tejidos y controlan la eliminación del patógeno (32).

La interleuquina-12p70 (IL12p70) es una proteína heterodimérica producida por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas en la fase inicial de la respuesta inmune para activar la inmunidad celular. Fue la primera citoquina descrita con una estructura molecular heterodimérica unida covalentemente y compuesta por dos cadenas, p35 y p40, codificadas por genes independiente (gen *IL12A* para IL12p35 y gen *IL12B* para IL12p40) (33). La liberación de IL12p70 favorece la producción de interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) por las células T y Natural Killers (NK), principalmente, y la diferenciación y proliferación de las células Th1.

La interleuquina-23 (IL23) pertenece a la familia de la IL12. Su cadena p40 común, con la IL12p70, se asocia con la subunidad p19 (codificada por el gen *IL23A*), para formar IL23 y solo se secreta cuando forma un heterodímero (34). La IL23 se produce por las mismas células que la IL12 pero su función es la inducción de una respuesta Th17.

La IL12p70 y la IL23 se producen en respuesta a numerosos estímulos infecciosos e inflamatorios. La subunidad p40 se secreta en exceso y puede formar homodímeros IL12p80 o IL12(p40)<sub>2</sub> que funcionan como antagonistas del receptor IL12 (IL12R) y no desencadenan una respuesta biológica. La regulación de la transcripción de las subunidades específicas (p35 y p19) es el principal mecanismo de regulación de IL12p70 e IL23 y es de suma importancia en la polarización de la respuesta inmune a los tipos Th1 y Th17 respectivamente.

### **5. Regulación transcripcional de *IL23A***

Los promotores contienen múltiples sitios de unión para factores de transcripción que influyen en el patrón de expresión génica. La regulación transcripcional de *IL23A*, presenta en el promotor secuencias consenso para la unión de la familia de factores de transcripción de NF- $\kappa$ B.

En estudios previos de unión de factores de transcripción al promotor se ha observado que el zimosan es capaz de aumentar la unión del miembro de la familia  $\kappa$ B, c-Rel al promotor de *IL23A* junto a la quinasa MSK1 y el coactivador CBP. Esto permite la fosforilación temprana de la ser10 de la histona H3, lo que genera condiciones óptimas para la activación de la transcripción. Por el contrario, el LPS tiene un efecto más débil sobre la unión de c-Rel al promotor de *IL23A* y, sin embargo, induce su unión al promotor de *IL12A*, al menos desde los 30 minutos hasta cuatro horas después de la estimulación. En el caso del zimosan sólo se observa una unión temprana a los 30 minutos, que decae a las dos horas. Estas diferencias en la intensidad y patrón temporal de ocupación de los promotores por c-Rel explican la especificidad de la respuesta a los distintos estímulos de forma que el LPS produce principalmente IL12p70 y el zimosan IL23 (35).

Además de la participación de c-Rel en la regulación de la transcripción de *IL23A* se necesita la participación de otros factores como ATF2, que se regula mediante dos fosforilaciones complementarias. La cascada Ras/Raf/MEK/ERK fosforila la Thr71 y la MAPK p38 fosforila la Thr69. Estas fosforilaciones dependen de PKC y PKA. En el caso del LPS, el papel de ATF2 se desempeña por otros factores como C/EBP $\beta$  y CREB (36). Además de estos factores, el análisis de la regulación de *IL23A* ha incluido otros factores, alguno de los cuales se generan en la UPR CHOP (37) y XBP1 lo que justifica la relación entre el estrés de retículo endoplásmico y la producción de IL23.

## II. Hipótesis y objetivos

La activación de las células dendríticas se asocia con una reprogramación metabólica, por lo que la respuesta inmunitaria puede variar según la disponibilidad de los sustratos que se utilizan como fuente de energía y para la biosíntesis de proteínas y lípidos. Asimismo, la disponibilidad de sustratos puede influir en la homeostasis del retículo endoplásmico y trascender en el patrón de la respuesta inmune.

El objetivo general del estudio es determinar el fenotipo metabólico de las células dendríticas tras su activación por patrones moleculares asociados a patógenos. Este objetivo se ha desglosado en los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar el patrón de expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con zimosan y LPS en presencia y ausencia de glucosa y en presencia del inhibidor de la hexoquinasa, 2-desoxi-D-glucosa.
2. Identificar los elementos de la respuesta de proteínas mal plegadas (UPR) que se activan para mantener la homeostasis del retículo endoplásmico en células dendríticas y su relación con la producción de citoquinas.
3. Estudiar los factores de transcripción asociados a la UPR que intervienen en la regulación transcripcional del gen *IL23A*.

# III. Materiales y métodos

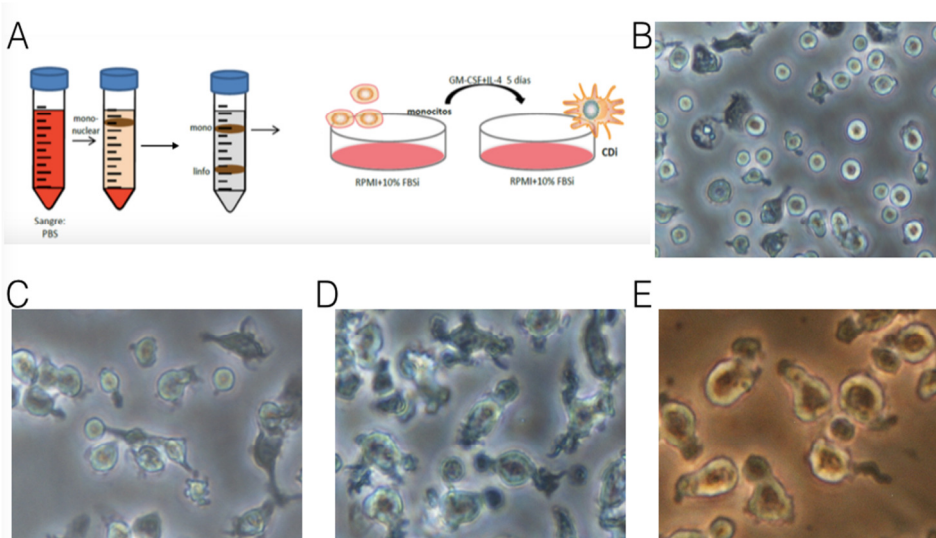
## 1. Cultivos celulares

### 1.1 Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos humanos a partir de buffycoats

Los monocitos se obtuvieron de la capa leuco-plaquetaria (*buffycoat*) que aparece tras la centrifugación de la sangre total entre el plasma y los hematíes. Los *buffycoats* procedían de donantes sanos del grupo 0 y fueron proporcionados por el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León.

El procedimiento experimental consiste en la dilución del concentrado sanguíneo en la proporción 1:1 en PBS y su adición cuidadosa sobre una solución de FicollPaque 3:1 (v/v). Tras la centrifugación, los anillos de la interfase superior, donde se encuentran los mononucleares, se recogieron con pipeta Pasteur. La parte inferior incluye los eritrocitos y los células polimorfonucleares (PMN). Tras lavados con PBS, se procedió a la separación de los monocitos. Para ello, las células mononucleares se resuspendieron en 3 ml de OptiPrep (Sigma). Se creó un gradiente discontinuo al añadir sin mezclar las fases, 7 ml de FicollPaque, 20 ml de solución de densidad =1.065 g/ml (compuesta por 1 mM EDTA + 0,5% de BSA + 33% OptiPrep en HBS) y finalmente 1 ml de HBS (10mM HEPES + 0,8% NaCl, pH 7,4). Tras la centrifugación, se recogió el anillo superior, se lavó con PBS y se repitió de nuevo el proceso de separación de fases por densidad para obtener una población de monocitos de mayor pureza.

Para la diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras (iDCs), se mantuvieron las células durante 5 días en medio RPMI 1640, suplementado con FBS al 10%, 4mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 800 U/ml del factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF; R&D Systems) y 500 U/ml de interleuquina 4 (IL4; R&D Systems) en incubador a 37°C y atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> para promover la diferenciación. Al tercer día se añadió 1ml de medio nuevo con citoquinas y el día del experimento se sustituyó el medio por RPMI, suplementado con FBS al 2%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y citoquinas en placas Petri de 100mm, a la concentración de 1x10<sup>6</sup>células/ml por condición, para proceder a la estimulación.



**Figura 3. Resumen del procedimiento de obtención de moDCs.** (A) Esquema del proceso de obtención de monocitos y su diferenciación a células dendríticas. (B) Monocitos antes del lavado para eliminar linfocitos en suspensión. (C) monocitos después del lavado y adición de citoquinas IL4 y GM-CSF. (D) iDCs 3 días más citoquinas. (E) iDCs 5 días antes de estimulación.

## 1.2 Reactivos y medios de cultivo

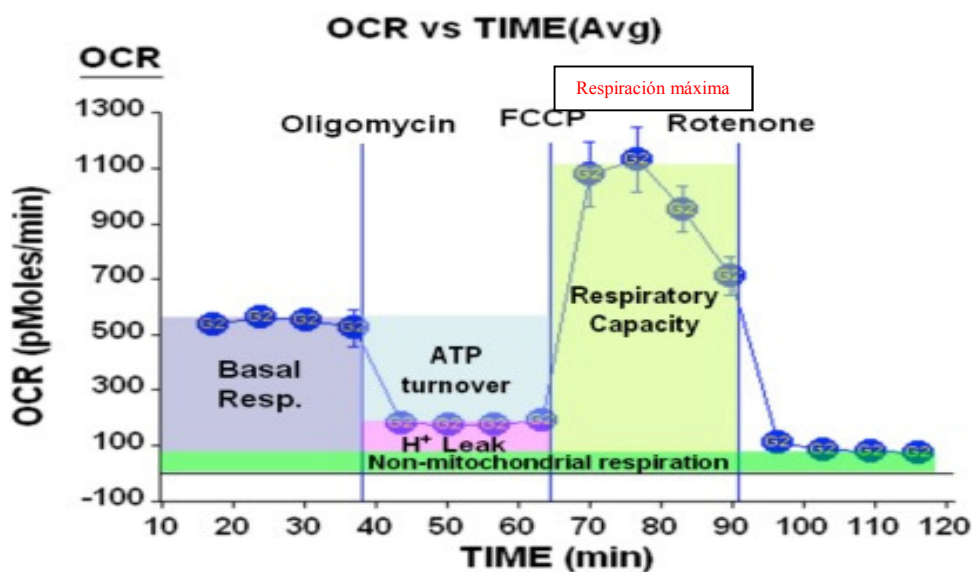
Para los experimentos sin glucosa se utilizó medio de cultivo RPMI 1640 sin glucosa, la 2-desoxiglucosa (2-DG) se utilizó a la concentración de 10mM (Millipore), la D-manosa 1mM (Sigma) y ambas se añadieron 1 hora antes de la estimulación. El inhibidor MKC8860 10 $\mu$ M es añadido 30 minutos antes de la estimulación. El zimosan de *Saccharomyces cerevisiae* y el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* se adquirieron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

## 2. Caracterización metabólica a tiempo real

La medida del consumo de oxígeno (OCR, pmol O<sub>2</sub>/min) y la acidificación extracelular (ECAR, mpH/min) se realizaron por el Dr. Eduardo Rial en el Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Madrid, utilizando la tecnología Seahorse.

Para los estudios OCR las iDCs se mantuvieron en medio de cultivo (RPMI, con 11mM de glucosa, 4mM de glutamina y FBS al 2%). El estudio completo de OCR de las iDCs control y estimuladas con zimosan durante 30 minutos, incluyó cuatro etapas consecutivas: i) Respiración basal. ii) Inhibición del complejo V mitocondrial con oligomicina, que bloquea el canal de protones en la fracción F<sub>0</sub> de la ATP sintasa e inhibe la fosforilación oxidativa y producción de ATP por este mecanismo. iii) Inducción de la respiración máxima mediante *Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone* (FCCP). Es un agente desacoplante que interrumpe la síntesis de ATP al transportar iones de hidrógeno a través de la membrana celular. Esta fase aporta información de la respiración máxima. iv) Inhibición de la cadena transportadora de electrones actuando sobre el complejo I y III mitocondrial con Rotenona y Antimicina A (Rot/AA), reduciéndose drásticamente el consumo de O<sub>2</sub>.

Para los estudios ECAR; se procedió en dos etapas: i) Glicólisis basal. ii) Inhibición del complejo V mitocondrial (oligomicina). Nos aporta información sobre la glicólisis máxima.



**Figura 4. Parámetros de la OCR.** Datos para el análisis de la respiración mitocondrial. La respiración basal (Basal Resp.); respiración máxima tras la adición de FCCP; la capacidad respiratoria de reserva (SRC, Respiratory capacity); el *turnover* de ATP (ATP turnover); fuga de protones tras la adición de oligomicina (H<sup>+</sup>leak) y; protones no perteneciente a la respiración mitocondrial tras añadir Rot/AA (Non mitochondrial respiration).

Los datos cuantitativos de la OCR se normalizaron a partir de la cantidad de proteína inicial y a partir de los siguientes cálculos:

- Respiración basal= (Basal Resp.)-(Respiración no mitocondrial)
- Respiración máxima= (Respiración máxima)-(Respiración no mitocondrial)
- SRC= (Respiración máxima)-(Respiración basal)
- *Turnover* de ATP= (Respiración basal)-(fuga de protones)

También se realizó el análisis cuantitativo de la glicólisis basal y del cociente OCR/ECAR para analizar los cambios en la glicólisis y la OXPHOS.

Los datos analizados corresponden a 7 experimentos en células control y a 2 experimentos en células estimuladas con zimosan a diferentes concentraciones.

### 3. Análisis de la expresión génica

#### 3.1 Extracción de ARN total

La extracción se inicia con Trizol (Invitrogen) a partir de  $10 \times 10^6$  células de iDCs por condición. Para separar el ARN se utiliza cloroformo, precipitación con isopropanol y una solución de sales (0.8 M citrato sódico, 1.2 M NaCl), en el caso de muestras con gran contenido en polisacáridos y, por último, el precipitado de ARN se lava con etanol al 75%, se deja secar, para finalmente resuspender el ARN en H<sub>2</sub>O DEPC libre de nucleasas. Para determinar la concentración del ARN obtenido y su pureza, se midió la relación de absorbancias 260/280nm en el espectrofotómetro Nanodrop.

#### 3.2 Síntesis de ADN complementario (cDNA)

Tras la extracción del ARN se realizó la transcripción reversa a partir de 3 µg de ARN. Las muestras obtenidas se diluyeron hasta un volumen de 11.1 µl en H<sub>2</sub>O DEPC y se calentaron durante 10 minutos a 68°C para permitir la completa disociación del ARN. Para realizar la reacción se añadió a cada muestra: Tampón 5X, 10mM DTT, 0.5mM dNTP, 4µM mezcla de hexanucleótidos, 1U/µl RNasin y 10U/µl transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (RT M-MLV) y se mantuvo la reacción durante una hora a 37°C para obtener el cDNA.

#### 3.3 RT-qPCR

A partir del cDNA se realizó la PCR cuantitativa en un equipo PCR LightCycler®480 (Roche) con placas de 96 pocillos. Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 25 µl, el que se incluyen 1,5µl de muestra (cDNA) y 23,5µl de la solución "master mix" (compuesta de SyBr Green 2X Master (Roche), 10 µM de *primers Forward y Reverse* y H<sub>2</sub>OmilliQ). El programa estándar utilizado para el LightCycler 480 fue el siguiente:

CONDICION	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Preincubación	95	5'	1x
Desnaturalización	95	15"	45x
Hibridación	60	20"	
Elongación	72	5"	1x
Melting	55 a 95	5"	
Cooling	40	10'	

**Tabla 1.** Condiciones generales de la qPCR.



Los *primers* empleados para la qPCR se diseñaron usando las secuencias de referencia presentes en la base de datos de *GenBank*. En la siguiente tabla se detallan los números de identificación de dichas secuencias y los primers diseñados.

Gen	Número de identificación en GenBank	Secuencias	
		Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'	5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'
<i>IL1B</i>	NM_000576.2	5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'	5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'
<i>IL12B</i>	NM_002187	5'-CATGGGCCTTCATGCTATTT-3'	5'-TTTGCATTGTCAGGTTCCA-3'
<i>IL12A</i>	NM_000882	5'-GAGGCCTGTTTACCATTGGA-3'	5'-TCAAGGGAGGATTTTTGTGG-3'
<i>IL23A</i>	NM_016584	5'-GTTCCCATATCCAGTGTGG-3'	5'-TTAGGGACTCAGGGTTGCTG-3'
<i>IL10</i>	NM_000572.2	5'-GAGAACAGCTGCACCCACTT-3'	5'-GGCCTTGCTCTGTTTTCAC-3'
<i>XBP1</i>	NM_005080.3	5'-TAAGACAGCGCTTGGGGATGGA-3'	5'-ATACCGCCAGAATCCATGGGGA-3'
<i>CHOP</i>	NM_001195057.1	5'-GCAGAGATGGCAGCTGAGTC-3'	5'-AGCCAAGCCAGAGAAGCAGGGT-3'

**Tabla 2.** Resumen *primers* utilizados para qPCR.

### 3.4 Ensayo de *splicing* XBP1

Se realizó una qRT-PCR con los primers para XBP1 indicados en el cuadro anterior y se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa al 3% con Gel-Red. El gel se desarrolló a voltaje constante de 100 V durante 20 min. El producto correspondiente al amplicón sXBP1 contiene 26 pb menos que el amplicón de uXBP1.

## 4. Preparación de extractos celulares y Western Blot

### 4.1 Obtención de extractos celulares

Tras la estimulación de las células se procedió al lisado celular. Las células se lavaron con PBS frío y el centrifugado se resuspendió en un tampón de lisis (20mM Hepes, 40 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 2 mM ortovanadato, 10 mM EGTA, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT y Nonidet P-40 al 1%), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las células se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C y el lisado se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó según el método colorimétrico descrito por Bradford.

### 4.2 Obtención de extractos nucleares y citosólicos

La extracción de los extractos nucleares se realizó empleando el Nuclear Extract Kit de Active Motif siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se centrifugaron a 350 x g durante 5 min. Posteriormente se lavaron con 1 ml de PBS con inhibidores de fosfatasas, se centrifugaron a 6000 g durante 30s, y se resuspendió el precipitado por agitación con la micropipeta en 300  $\mu$ l de tampón hipotónico. Se incubó durante 15 min en hielo y a continuación se añadieron 15  $\mu$ l de NP-40 10%. Se agitó durante 10 s y se centrifugó a 14000 x g durante 30 s a 4°C. El sobrenadante contiene los extractos citosólicos y el precipitado con los núcleos se resuspende en 50  $\mu$ l de tampón de lisis (tampón AM1 con cóctel de inhibidores de fosfatasas [PIC] y 1 mM de DTT). Se agitó durante 10s, se incubó 30 min en hielo y se volvió a agitar 30 s. A continuación, se centrifugó a 14000 x g durante 10 min a 4°C para obtener en el sobrenadante los extractos nucleares.

### 4.3 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa

Se cargaron entre 40 µg y 100 µg de proteína en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE) al 10-12% para separarlos por electroforesis a 25 mA. El contenido del gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa a 400 mA durante 90 min. Posteriormente la membrana se lavó con TTBS y se incubó durante 60 min en 5 ml de solución de bloqueo (5% BSA/leche en TTBS). Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche en la cámara fría a 4°C. Al día siguiente se hicieron 4 lavados de 10 min con TTBS y se incubó con una solución 1:3000 del anticuerpo secundario (en 5 ml de 5% BSA /leche en TTBS) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se hicieron 4 lavados de 10 min con TTBS y se incubó durante 1 min con el reactivo ECL (luminol+peróxido de hidrógeno). Finalmente se reveló la membrana en una película fotográfica de autoradiografía.

A continuación se detallan los anticuerpos utilizados para Western Blot:

Proteína	Peso molecular (kD)	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Casa comercial
COX2	72	Anti-Cox-2 (C-20) 1:500	Anti-Goat 1:1000	Santa Cruz
CHOP	31	Anti-GADD 153 1:200	Anti-Mouse 1:3000	Santa Cruz
HISTONA H3	15	Anti-Histona H3 1:1000	Anti-Rabbit 1:3000	Abcam
β-ACTINA	42	Anti-β-Actina 1:5000	Anti-Mouse 1:3000	Sigma

**Tabla3.** Resumen de anticuerpos utilizados para Western Blot.

### 5. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

El ensayo fue realizado con el fin de analizar la unión de factores de transcripción al promotor de *IL23A*. Los reactivos utilizados fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) siguiendo el protocolo Chip Lysis Buffer High SALT: sc-45001 y la cromatina fue inmunoprecipitada con el anticuerpo para XBP1 (Novus). Los *primers* utilizados para PCR en experimentos ChIP fueron los siguientes:

Promotor <i>IL23A</i> NT_029419.12	Secuencias	
	Forward	Reverse
X2box/TRE proximal	5'-CTCTAGCCACAGCAACCACA-3'	5'-GCCCGCCCTTTATACCAGCA-3'
X2-Box/CRE medial	5'-CTTAGCTGTTTCACTCGATGTT-3'	5'-CAGGAGTTCTGGGTAGTCG3'
X2-Box/CRE distal	5'-TTCCATTGGTGTCCACCTTA3'	5'-CTTTAGATTAACATTTCCAGCA-3'

**Tabla 4.** Resumen *primers* utilizados para chip.

#### Fragmentación de la cromatina

Tras la estimulación de las iDCs (20 x 10<sup>6</sup> células/condición), se añadió directamente al medio de cultivo formaldehído al 1%. Durante 15 minutos se mantuvo la incubación a temperatura ambiente en rotor. A continuación se añadió 0,125 M de glicina. Las células se lavaron con PBS frío y se recogieron para mantenerlas en hielo durante 30min en presencia de tampón de lisis. Posteriormente se centrifugaron a 800 x g durante 5 min y

se lavó el precipitado con PBS frío. El sobrenadante se decantó y se congeló el precipitado celular en nitrógeno líquido para proceder posteriormente a mantenimiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para fragmentar la cromatina se utilizó el sonicador Bioruptor<sup>TM</sup> (Diagenode), con una frecuencia de ultrasonidos equivalente a 20kHz. Con este fin, las muestras se descongelaron y se resuspendieron en 300 $\mu\text{l}$  de tampón de lisis de alta salinidad. Se sonicaron las muestras en 4 tandas de 5 minutos en presencia de hielo con el fin de obtener fragmentos de ADN de tamaño comprendido entre 100 y 1000 pb. Los fragmentos sonicados se centrifugaron 15 min a 9300 x g a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### ChIP

Para disminuir las uniones inespecíficas se incubaron las muestras de 600 $\mu\text{l}$  de cromatina durante una hora en un rotor orbital a  $4^{\circ}\text{C}$  en presencia de 50 $\mu\text{l}$  de proteína A/G Plus agarosa (Santa Cruz). Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad y se recogió el sobrenadante. Se añadieron 10 $\mu\text{g}$  del anticuerpo correspondiente y se incubó durante la noche con rotación a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se añadieron 50 $\mu\text{l}$  de la solución de proteína A/G Plus Agarosa durante 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  y la mezcla se centrifugó a 13400 x g. Se eliminó el sobrenadante y se procedió al lavado de las bolas de A/G Plus Agarosa dos veces con un tampón de alta salinidad (Santa Cruz) y cuatro lavados con un tampón de lavado (0,25M LiCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 1% ácido deoxicólico, 10mM Tris-HCl, pH 8,1). Posteriormente se añadió medio de elución para deshacer los entrecruzamientos proteína-ADN y liberar el ADN.

Como control de la fragmentación de cromatina se tomaron 50 $\mu\text{l}$  de la solución de cromatina fragmentada sin incubación con el anticuerpo (denominada INPUT) a los que se le añadieron 300  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O milliQ y 16  $\mu\text{l}$  de NaCl al 5%. La muestra se mantuvo durante 4 horas a  $68^{\circ}\text{C}$  para revertir el entrecruzamiento proteína-ADN.

Tras atemperar las muestras, se añadieron 400 $\mu\text{l}$  de la solución fenol/cloroformo/isoamil alcohol, se mezcló y se centrifugó 3 min a 14000 x g a temperatura ambiente. A la fase acuosa obtenida se añadieron 40 $\mu\text{l}$  de acetato sódico y 1ml de etanol al 100% y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche, para precipitar el ADN. Posteriormente las muestras se centrifugaron durante 25min a 14000 x g a  $4^{\circ}\text{C}$ . El nuevo precipitado se reconstituyó con 100 $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O estéril.

### Visualización de la cromatina

Para la visualización de la cromatina, se tomaron 15 $\mu\text{l}$  de solución la cromatina y se cargó en un gel de agarosa al 1% con marcadores de ADN y se visualizó con tinción GelRed para confirmar que la fragmentación de la cromatina se había realizado de forma correcta. Una vez purificado el ADN, se realizaron las amplificaciones por qPCR en 25 $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción empleando los primers especificados en la tabla para chIP.

### **6. Análisis estadístico**

Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM y se analizaron con el programa estadístico Prism 4.0 (GraphPad Software). La comparación entre 2 grupos de experimentos se llevó a cabo usando el test t de Student de 2 colas. Los niveles de significación fueron, \*\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0,01$  \*\*\* $P \leq 0.001$ .

## IV. Resultados

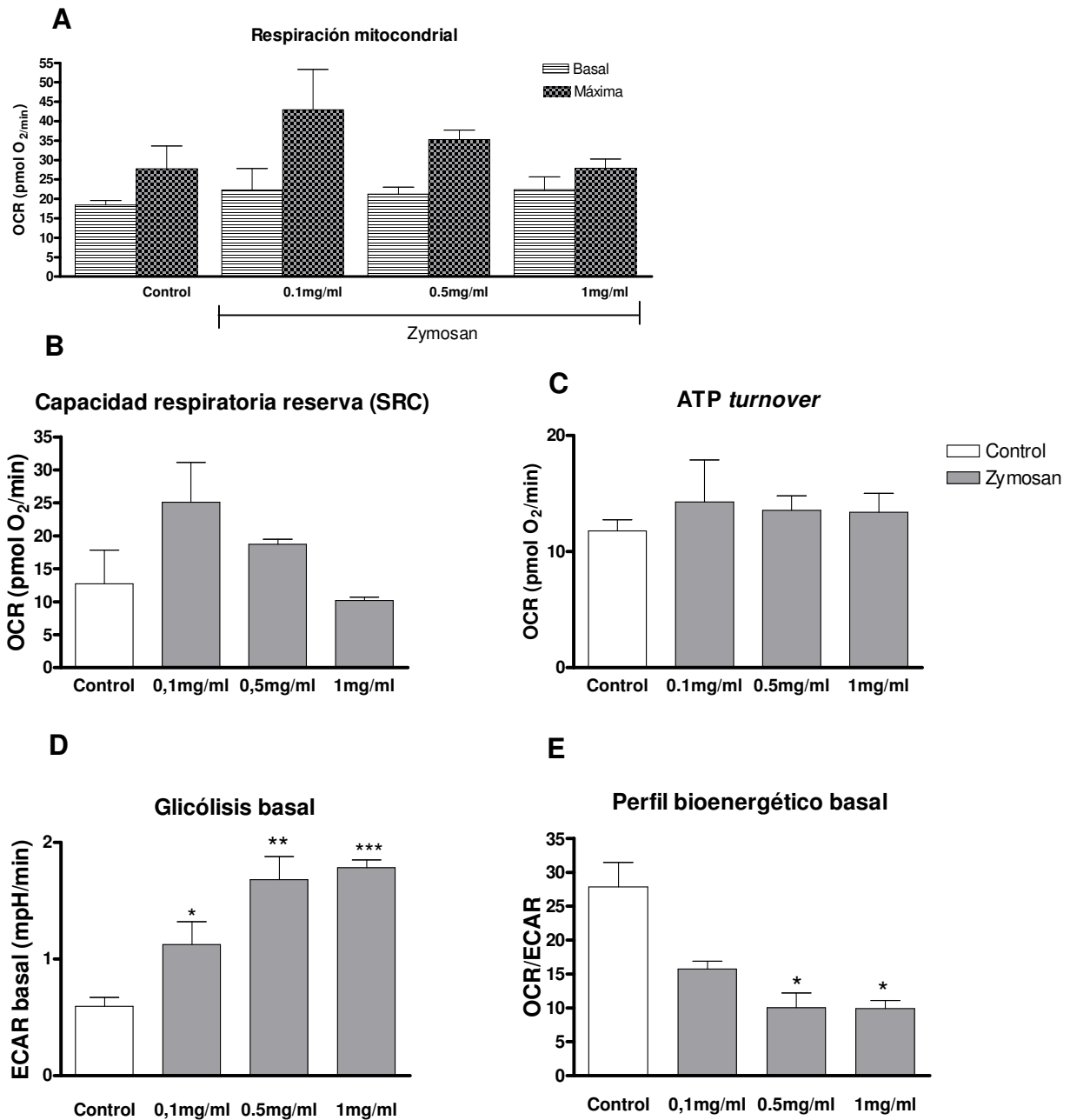
### 1. Caracterización de la respuesta metabólica de las células dendríticas a la estimulación con zimosan

Para analizar la actividad mitocondrial de las células dendríticas tras su activación por zimosan, se midió la actividad de la OXPHOS cuantificando el consumo de  $O_2$  mitocondrial. El análisis cuantitativo de las respiraciones basal y máxima muestra que las células estimuladas con zimosan no presentan diferencias significativas con las células control aunque podemos apreciar que a concentraciones bajas de zimosan (0,1 mg/ml) las células dendríticas presentan una mayor capacidad para consumir  $O_2$  cuando se mide la respiración máxima inducida por FCCP y que esta capacidad disminuye a medida que aumenta la concentración de zimosan (Fig. 5A). Este resultado concuerda con el análisis de la capacidad respiratoria de reserva (SRC), que relaciona el consumo de  $O_2$  en la condición de partida con el consumo de  $O_2$  máximo y la capacidad de producir ATP por la vía mitocondrial, y que también aparece aumentado a concentraciones bajas de zimosan (Fig. 5B). En cuanto al *turnover* de ATP que corresponde al consumo de oxígeno dedicado a la producción de ATP no se aprecian diferencias significativas en ninguno de los casos (Fig. 5C).

Una fuente de energía independiente de la OXPHOS que puede producir ATP en el citoplasma es la glicólisis. El estudio de la glicólisis en tiempo real, mostró un alto grado de acidificación del medio extracelular medido en términos de ECAR, que fue dependiente de la concentración de zimosan (Fig. 5D).

El cociente entre el consumo de oxígeno mitocondrial y la acidificación del medio extracelular (OCR/ECAR) nos aporta información acerca del perfil bioenergético de las DCs. Si observamos el perfil bioenergético de partida muestra diferencias significativas a las concentraciones de 0.5 y 1 mg/ml de zimosan respecto a las células en reposo, lo que confirma que la glicólisis aumenta significativamente tras la estimulación, mientras que la OXPHOX se modifica en menor grado (Fig. 5E).

En resumen, las DCs presentan un fenotipo metabólico que se caracteriza por un mantenimiento de la producción de ATP por medio de la OXPHOS en la mitocondria, que corresponde con aumento en los niveles de consumo de oxígeno tras estimulación con concentraciones bajas de zimosan trascurridos tan sólo 30 minutos de estimulación. Sin embargo, el cambio más significativo se produce a nivel de la glicólisis que aumenta considerablemente en forma dependiente de la concentración de zimosan. Por lo que se confirma que las DCs sufren una reprogramación metabólica tras la activación y que el metabolismo de la glucosa juega un papel importante.



**FIGURA 5. Caracterización metabólica de las células dendríticas estimuladas con zimosan.** (A) Cuantificación del consumo de oxígeno mitocondrial mediante el análisis de la OCR basal y de la máxima respiración obtenida tras la adición de FCCP. (B) Cuantificación de la SRC mediante la sustracción de la respiración basal de la respiración máxima. (C) Cuantificación del *turnover* de ATP mediante la sustracción de la fuga de protones a la respiración basal. (D) Medida de la glicólisis expresada en forma de ECAR basal. (E) Cociente OCR/ECAR para representar los cambios de la glicólisis y la OXPHOS tras estimulación con distintas concentraciones de zimosan. Las células se estimularon con zimosan durante 30 minutos y los valores corresponden a 2 experimentos diferentes, media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas fueron analizadas con el programa estadístico Prism 4.0 (GraphPad Software). La comparación entre 2 grupos de experimentos se llevó a cabo usando el test t de Student de 2 colas. Los niveles de significación fueron, \*\* $P \leq 0.05$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ .

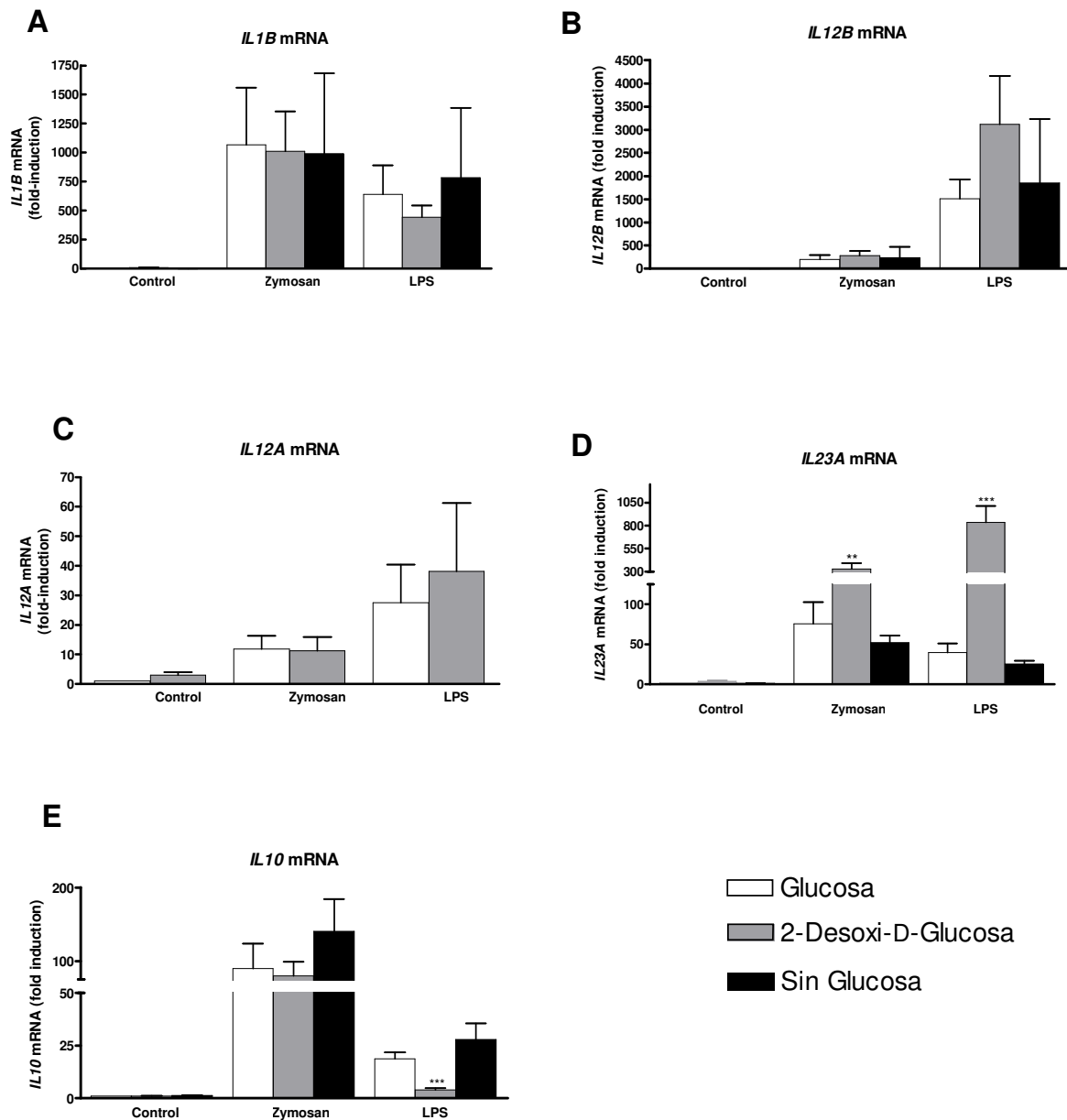
## 2. Influencia del metabolismo de la glucosa sobre el perfil de producción de citoquinas

Para estudiar la expresión de citoquinas producida por las DCs tras su activación por zimosan y LPS, y determinar la influencia del metabolismo de la glucosa en dicho proceso, se incubaron las células en medio sin glucosa y en presencia de glucosa y el inhibidor competitivo de la actividad enzimática de la hexoquinasa (HK): la 2-desoxi-D-glucosa, durante una hora previa a la estimulación con el zimosan y el LPS, que se llevó a cabo durante cuatro horas. Después, se analizó mediante RT-PCR en tiempo real la expresión del ARN mensajero de varias citoquinas. Como se observa en la Figura 6 A-E, las DCs no presentan variaciones en la expresión de las citoquinas *IL1B*, *IL12A*, *IL12B*, *IL10* e *IL23A* cuando se mantenían en ausencia de glucosa. Cuando las DCs se incuban en presencia de 2-DG se observa, que los ARNm de las citoquinas *IL1B*, *IL12A*, *IL12B* tampoco varían su expresión (Fig. 6A-C).

Un hecho relevante es que el LPS induce la expresión de *IL12B* de forma más intensa que el zimosan (Fig. 6B) y ello unido a la limitada capacidad de los patrones fúngicos para producir IL12p35 (Fig. 6C), explica la baja cantidad del dímero de la citoquina IL12p70 detectable en estas condiciones (35).

Por el contrario, la expresión de *IL23A*, que codifica la cadena que forma el dímero de IL23, muestra un aumento significativo de su expresión en respuesta a zimosan y LPS en presencia de 2-DG (Fig. 6D), mientras que el ARNm de *IL10*, disminuyó su expresión tras estimulación con LPS (Fig. 6E).

Estos datos son de gran importancia para estudiar los efectos de los compuestos utilizados de forma habitual para interferir con el metabolismo celular; ya que los resultados obtenidos en presencia de 2-DG muestran una gran diferencia con los obtenidos en ausencia de glucosa, en lo que se refiere a la expresión de citoquinas. Una interpretación plausible de estos resultados, es que la 2-DG posee propiedades distintas de su capacidad para inhibir la HK, relacionadas con el hecho de que la 2-DG es también la 2-desoxi-D-manosa. En este sentido, interferiría con las reacciones en las que interviene la manosa, particularmente, las N-glicosilaciones de proteínas.



**FIGURA 6. Perfil de citoquinas en diferentes condiciones que afectan a la glicólisis.** (A) Expresión del ARNm de *IL1B*. (B) Expresión del ARNm de *IL12B*. (C) Expresión de ARNm de *IL12A* únicamente en presencia de 2-DG (D) Expresión de ARNm de *IL23A* que aumenta significativamente su expresión en presencia de 2-DG en respuesta a zimosan y LPS. (E) Expresión del ARNm de *IL10*. Las células dendríticas se incubaron durante una hora en los diferentes medios de cultivo y se estimularon con zimosan y LPS durante 4 horas. Los datos corresponden a 5-7 experimentos diferentes expresados en forma de media  $\pm$  Error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se analizaron con el programa estadístico Prism 4.0 (GraphPad Software). La comparación entre 2 grupos de experimentos se llevó a cabo usando el test t de Student de 2 colas. Los niveles de significación fueron: \*\* $P \leq 0,01$  y \*\*\* $P \leq 0.001$ .

### **3. Estudio de los elementos implicados en el mantenimiento de la homeostasis del retículo endoplásmico en presencia de 2-DG y en ausencia de glucosa**

La 2-DG además de jugar un papel sobre el metabolismo de la glucosa, ejerce un efecto conocido sobre la glicosilación de proteínas. Este efecto además de ejercerse sobre la formación de N-acetil-glucosamina, se extiende a la incorporación de residuos de manosa durante las reacciones de N-glicosilación, lo que puede provocar alteraciones en el plegamiento de proteínas y la consecuente activación de factores de transcripción implicados en el establecimiento de la UPR para restaurar la homeostasis del retículo endoplásmico (38). Asimismo, la capacidad de fagocitar de las DCs supone un gasto energético y un alto requerimiento de la síntesis de componentes celulares, lo que también contribuye a la aparición de estrés de retículo endoplásmico. A primera vista, los estímulos particulados como el zimosan se asociarían a una mayor necesidad de síntesis de componentes de membrana, mientras que el LPS, por ser un estímulo soluble no requiere una formación de vesículas fagocitarias. Las proteínas ATF4 y CHOP, en la ruta iniciada por PERK, sXBP1 dependiente de la actividad endorribonucleasa de IRE1 $\alpha$  y ATF6 son los factores de transcripción activados durante la respuesta UPR activada para prevenir el estrés de retículo endoplásmico.

#### **A) Efectos de la 2-DG sobre la N-glicosilación de la cicloxigenasa-2**

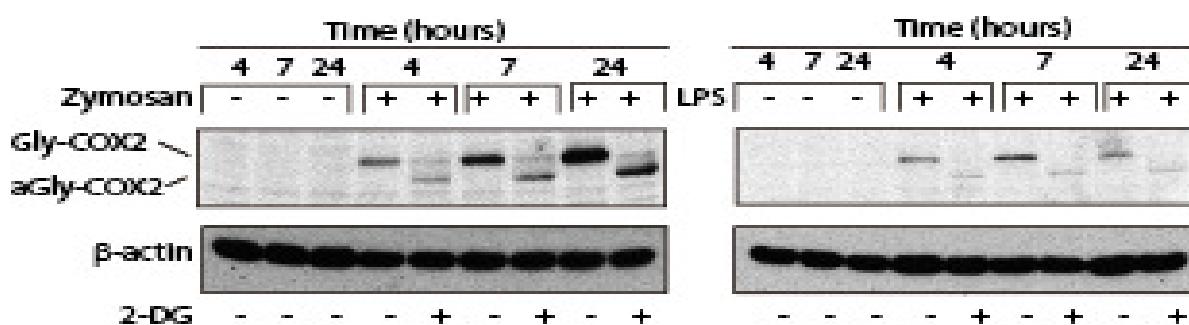
El metabolismo del ácido araquidónico por la vía de las cicloxigenasas (COX) genera diferentes productos de forma rápida, que actúan de forma autocrina y paracrina. La familia de las cicloxigenasas incluye dos isoformas que catalizan las mismas reacciones, pero con diferentes patrones de expresión: COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tipos celulares y es responsable del mantenimiento de las funciones fisiológicas básicas y de la producción basal de prostanooides (39). COX-2 se induce por mediadores inflamatorios y mitógenos y es importante para la regulación de numerosos procesos fisiológicos (39). Además, es responsable del incremento de la producción de prostanooides durante la inflamación y el estrés.

La COX-2 presenta cuatro secuencias consenso de N-glicosilación la Asn68, la Asn 104, la Asn144 y la Asn410. Las glicosilaciones en Asn410 y en las Asn68 y Asn144 del centro activo son necesarias para la actividad de esta enzima. Curiosamente, los residuos de aminoácidos requeridos para la actividad enzimática están conservados en COX-2 y en COX-1. La diferencia entre ambas reside en el extremo carboxilo terminal de la COX-2 que presenta dos zonas consenso de N-glicosilación, en el caso de COX-2 murino está presente en la Asn580 y Asn592 (40).

Dada la relevancia de las N-glicosilaciones de COX-2, su carácter de enzima altamente inducible y las diferencias que produce la ausencia de glicosilaciones sobre la masa molecular y el patrón de migración electroforético, se decidió estudiar la expresión de la proteína COX-2 como un subrogado de las alteraciones de la N-glicosilación inducidas por la 2-DG. En este sentido, la enzima completamente glicosilada posee una masa de 76 kD y la forma no glicosilada en los residuos Asn68, Asn144 y Asn410, presenta una masa molecular de 68 kD, por lo que estos cambios de movilidad electroforética pueden ser detectados mediante SDS-PAGE.



Los resultados muestran una deglicosilación de COX-2 tras estimulación con zimosan y LPS bajo condiciones de 2-DG en ambos casos (Fig. 7).

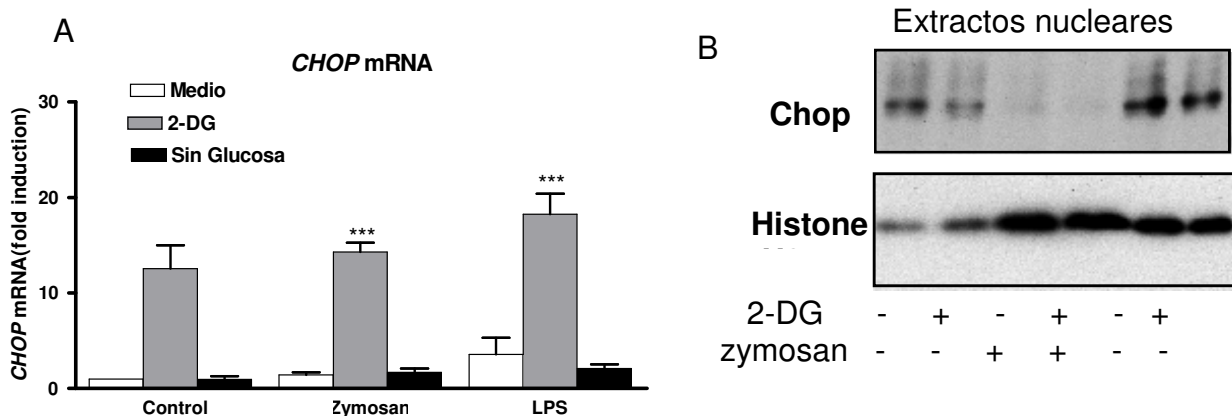


**Figura 7. Efectos de la 2-DG sobre la N-glicosilación de la cicloxigenasa-2.** En células dendríticas estimuladas a diferentes tiempos con zimosan y LPS se muestra una deglicosilación de COX-2 en presencia de 2-DG.

**B) El aumento en la expresión génica de CHOP se regula post-traduccionalmente en células estimuladas con zimosan.**

La estimulación de células dendríticas con zimosan y LPS produjo un ligero aumento de la expresión del ARNm de *CHOP*. La combinación de estos estímulos con 2-DG aumentó significativamente su expresión (8A), siendo la 2-DG el causante principal del aumento del ARNm de *CHOP*. Ya que en células DCs control expuestas a 2-DG también se observó un aumento en la expresión de *CHOP*. En estudios previos se había observado la presencia de la proteína CHOP en extractos nucleares en células dendríticas en reposo y que la adición de diferentes estímulos como LPS o tunicamicina no mostraba diferencias significativas de esta proteína en el núcleo, mientras que el zimosan y el β-glucano puro indujeron la desaparición de la proteína del núcleo tanto en macrófagos como en células dendríticas (36).

Por este motivo se trató de determinar si este mecanismo de inducción de CHOP se reflejaba a nivel de proteína y el posible efecto de la 2-DG. Curiosamente se observó que la proteína CHOP disminuye su presencia en el núcleo incluso cuando se utilizó la combinación de 2-DG y zimosan tras una hora de estimulación (8B), lo que confirmaría el efecto anteriormente descrito de que el zimosan preserva a las DCs de los efectos del factor de transcripción nuclear de CHOP; bien permitiendo con su desaparición la unión de los factores de transcripción de la familia C/EBP(41), bien protegiendo de los efectos proapoptóticos atribuidos a CHOP, lo que permitiría el mantenimiento de la capacidad fagocítica de las células dendríticas durante las infecciones por hongos. (36)



**Figura 8.** (A) Expresión del ARNm de *CHOP* en presencia de 2-DG y en ausencia de glucosa en DCs estimuladas con zimosan y LPS. (B) Expresión de CHOP en extractos nucleares tras 1 hora de estimulación con zimosan y LPS y en condiciones de 2-DG. Los valores corresponden a 3 experimentos diferentes, media  $\pm$  SEM. Las diferencias estadísticas se analizaron con el programa estadístico Prism 4.0 (GraphPad Software). La comparación entre 2 grupos de experimentos se llevó a cabo usando el test t de Student de 2 colas. Los niveles de significación fueron, \*\*\* $P \leq 0.001$ .

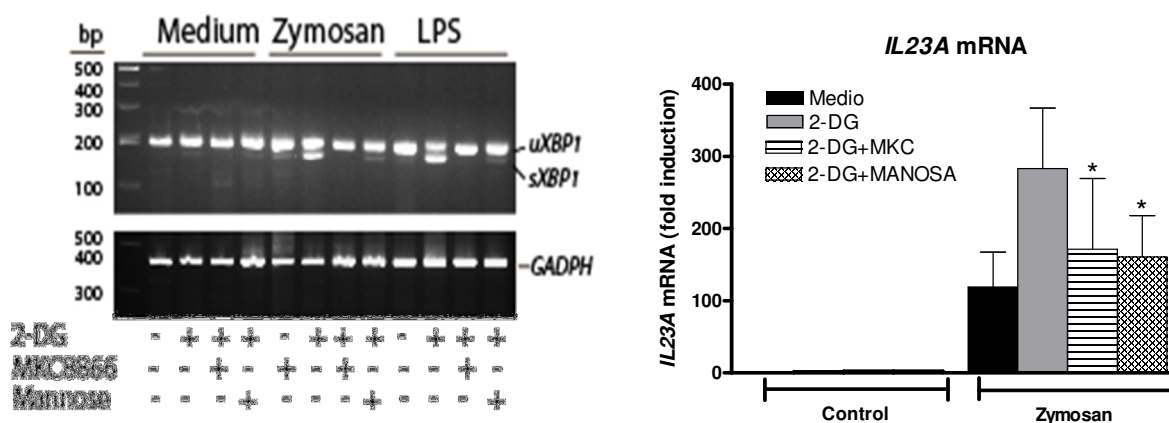
### C) Activación del *splicing* XBP1

Se ha descrito que IRE1 $\alpha$  y su diana XBP1 se encuentran constitutivamente activos en DCs en reposo. Además se ha descrito que la expresión de XBP1 es esencial para el desarrollo en pDCs y cDCs (42) y que estímulos que promueven estrés de retículo durante la activación de macrófagos vía TLR2 y TLR4, precisan la función de IRE1 $\alpha$  y XBP1s para inducir la producción óptima de citoquinas (43,44).

La actividad endorribonucleasa de IRE1 $\alpha$  se inicia tras su activación por trans-autofosforilación. Ello permite la maduración post-transcripcional del ARNm de XBP1 mediante la escisión de una porción de intrón de 26 nucleótidos que sufre *splicing* y conduce a un cambio en el marco de lectura del codón. La traducción de este ARNm pasa de una proteína de 267 aminoácidos inactiva a una forma activa de 371 aminoácidos. Ambas formas de XBP1 tienen un dominio de unión a ADN, pero solo la forma activa (*spliced*) presenta el dominio de transactivación en el C-terminal funcional que le permite actuar como factor de transcripción (45).

En experimentos dirigidos a identificar las dos isoformas correspondientes a la rama IRE1 $\alpha$ /XBP1, se observó que el zimosan y el LPS inducían un ligero *splicing* de XBP1, similar al observado con la simple adición de 2-DG. Por el contrario, la combinación de 2-DG con zimosan o LPS aumentó significativamente el *splicing* de XBP1. Este mecanismo de *splicing* pudo ser inhibido con el inhibidor de la actividad endorribonucleasa de IRE1 $\alpha$  MKC8866 y mediante la adición de 1mM de manosa al medio de cultivo (9A).

En cuanto a la expresión de *IL23A*, cuyo nivel aumentaba en presencia de 2-DG y zimosan, tanto el MKC8866 como la manosa extracelular revirtieron parcialmente el efecto de la 2-DG, reduciendo los niveles de ARNm de *IL23A* valores similares a los producidos por la adición simple de zimosan.



**Figura 9. sXBP1 y la expresión de IL23A.** (A) Ensayo para detectar *splicing* de XBP1 en DCs estimuladas con zimosan y LPS en presencia de 2-DG y su combinación con MKC8866 10 $\mu$ M y manosa 1 mM. (B) Efecto de estas adiciones sobre la expresión de IL23A. Las células se preincubaron 1 hora con 2-DG y manosa y durante 30 minutos con inhibidor MKC8866. La estimulación con zimosan y LPS se mantuvo durante 4 horas. Los valores corresponden a 5-7 experimentos diferentes, media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se analizaron con el programa estadístico Prism 4.0 (GraphPad Software). La comparación entre 2 grupos de experimentos se llevó a cabo usando el test t de Student con datos pareados y de 1 cola. Los niveles de significación fueron, \*P $\leq$ 0.05.

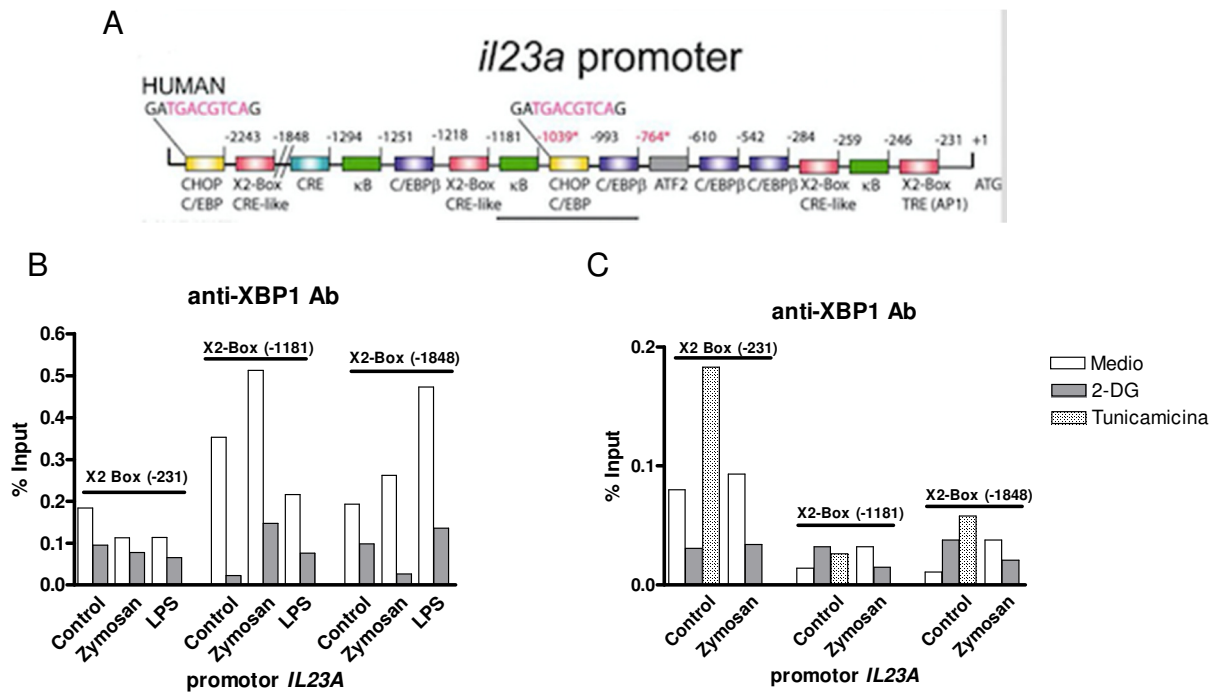
#### 4. Regulación transcripcional de IL23A

El análisis bioinformático en la base de datos TRANSFAC del promotor de IL23A (36) mostró tres secuencias compatibles con elementos regulatorios a los que se podría unir XBP1 (10A).

Anteriormente se observó en DCs que la unión de XBP1 al promotor de IL23A se produce ante estímulos como la tunicamicina, beta-glucano y zimosan deplecionado (capa de  $\beta$ -glucanos) a las 5 horas de estimulación a la zona más proximal del promotor (caja-X2). Puesto que el aumento en la expresión del ARNm de IL23A es significativo tras cuatro horas de estimulación con zimosan y LPS, se procedió a realizar una cinética para optimizar los tiempos idóneos de *splicing* XBP1 que podrían estar implicados en la regulación transcripcional de IL23A. Se observó que la expresión de sXBP1 se detecta tras una hora de estimulación con zimosan y aumenta gradualmente hasta las 4 horas (datos no mostrados).

Seguidamente, se procedió al ensayo de inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpo anti-XBP1, para los sitios de unión al promotor X2-Box proximal (-231), X2-Box medial (-1181) y X2-Box distal (-1848). Se observó que en los tres sitios de unión de XBP1 al promotor, el efecto de la 2-DG previene la unión de XBP1 tanto con zimosan y LPS tras 3 horas de estimulación. Ya que, el zimosan por si sólo si produjo un aumento en la unión de XBP1 a la zona medial y distal de la X2-Box al igual que el LPS a la zona X2-Box distal (4B). A las cuatro horas de estimulación se observaron resultados similares puesto que la combinación de 2-DG con zimosan no aumenta la unión de XBP1 a los tres sitios de unión de la X2-Box respecto a las células estimuladas con zimosan (4C) En este

caso, se utilizó la tunicamicina en Dcs control, ya que es conocido su efecto en la unión de XBP1 a la zona X2-Box proximal.



**Figura 10. Sitios de unión de factores de transcripción al promotor de *IL23A*.** (A) Estructura del promotor de *IL23A* humano en la que se muestran los sitios de unión de los factores de transcripción más relevantes identificados utilizando la base de datos TRANSFAC. (B) Efecto del zimosan y el LPS sobre la unión de XBP1 a los sitios X2-Box proximal (-231), X2-Box medial (-1181) y X2-Box distal (-1848). El experimento se realizó en DCs estimuladas durante tres horas (C) y a las 4 horas de estimulación. La tunicamicina se empleó como control de inducción de la UPR. Los datos preliminares corresponden a un experimento.

## V. Discusión

Las células dendríticas en reposo presentan una escasa actividad anabólica, por lo que su metabolismo se reduce, casi exclusivamente, a la utilización de sustratos en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la producción de ATP mediante la OXPHOX a partir de la utilización de glucosa y la oxidación de ácidos grasos (FAO). Sin embargo, el proceso de maduración de las DCs iniciado por la fagocitosis de patrones moleculares y la activación de los PRRs conducen al aumento de la OXPHOS y a la aparición de glicólisis aeróbica (46), en forma similar al efecto Warburg que ocurre en células tumorales.

Esta situación conduce a la producción de piruvato. El piruvato puede entrar en la mitocondria a través del transportador de piruvato mitocondrial (MPC1) y convertirse en acetil-CoA que será utilizado en el TCA. Asimismo, el piruvato puede convertirse en lactato, con el fin de regenerar el  $\text{NAD}^+$  y permitir el mantenimiento de la glicólisis. Los estudios realizados hasta la fecha han utilizado casi exclusivamente células de ratón, por lo que no puede hacerse una traslación inmediata de estos resultados al humano, dado el gran efecto inhibitorio de la respiración mitocondrial que ejerce el óxido nítrico en esa especie.

En el presente estudio se ha caracterizado el metabolismo energético en DCs estimuladas por diferentes concentraciones de zimosan durante 30 minutos. A partir de los datos de consumo de oxígeno mitocondrial y de la acidificación del medio extracelular, se ha observado tras la estimulación una reprogramación metabólica prominente consistente en un aumento de la glicólisis y del consumo de oxígeno mitocondrial, por lo que el metabolismo de la glucosa juega un papel importante en la función de las DCs. En estas condiciones, el perfil bioenergético muestra una predominancia de la glicólisis frente a un consumo de oxígeno mitocondrial ligeramente elevado respecto al observado en las células en reposo. Se observa también un aumento de la SRC cuando las DCs se estimulan con concentraciones bajas de zimosan, mientras que el consumo de oxígeno dedicado a la producción de ATP no muestra diferencias.

Esto concuerda con estudios precedentes donde los procesos de maduración de las DCs en células de la médula ósea de ratón estimuladas con LPS, donde inicialmente se observó un aumento en la OXPHOS, aunque la literatura prevalente ha insistido en el cambio hacia la glicólisis aeróbica y la regulación negativa de la expresión de los genes relacionados con la OXPHOS durante su maduración tras su activación por los receptores TLRs (47-48-49).

Las DCs presentan grandes cambios fenotípicos desde el estado de reposo al estado de maduración inducido por la activación. Estos procesos envuelven una amplia escala de cambios en la expresión de genes que codifican para una amplia serie de proteínas, en las que se incluyen las asociadas con la respuesta inmune como son citoquinas, chemoquinas y moléculas coestimuladoras, sino también proteínas que intervienen en el metabolismo para garantizar los recursos bioenergéticos y biosintéticos requeridos para la adquisición de nuevas funciones.

Al exponer las DCs a condiciones que afectan a la glicólisis aeróbica hemos observado respuestas diferentes cuando se ha utilizado 2-DG frente a las observadas en

ausencia de glucosa. Las DCs no mostraron cambios notables en la producción de citoquinas cuando se cultivaron en un medio que contenía L-glutamina, pero carente de glucosa. Por el contrario, cuando las células se mantuvieron en un medio con glucosa y 2-DG, se observó un aumento muy marcado en la expresión de *IL23A* en células estimuladas con zimosan y con LPS. Asimismo se apreció una disminución en la expresión de *IL10* en células estimuladas con LPS.

Esta observación nos obligó a profundizar en el mecanismo, dado que la hipótesis de partida no preveía este efecto de la 2-DG. La 2-DG se considera un análogo de la glucosa y se utiliza habitualmente como bloqueante del metabolismo de la glucosa por la vía de la glicólisis. Sin embargo, el uso de 2-DG en estas condiciones no tiene en cuenta que la 2-DG es también químicamente 2-desoxi-D-manosa por lo que puede competir con la manosa durante la N-glicosilación de proteínas.

La 2-DG entra en las células a través de los transportadores de glucosa (GLUTs), se fosforila por la hexokinasa (HK) para formar 2-DG-6-fosfato (2-DG-6-P), pero a diferencia de la glucosa-6-fosfato formada a partir de la glucosa y que puede continuar en la vía glicolítica, la 2-DG-6P se acumula en la célula y no es metabolizada. (50,51, 52).

Dado que la glucosa es un isómero de la manosa que sólo se diferencia de ésta por el grupo hidroxilo del carbono 2', que se encuentran en posiciones opuestas; la 2-Dexoxi-D-glucosa también puede ser considerada 2-dexoxi-D-manosa. Y esta analogía con la manosa hace que posea una capacidad extraordinariamente activa para interferir con la N-glicosilación de proteínas al bloquear la incorporación de N-acetil-glucosamina y de manosa en la Asn. Una consecuencia de esta alteración de la N-glicosilación es la aparición de estrés de ER debido al mal plegamiento de proteínas que no han sido N-glicosiladas en forma adecuada (53). En concordancia con esta interpretación, esta deficiencia en la N-glicosilación puede revertirse con manosa (53).

A la vista de estos resultados, parece posible que el efecto de la 2-DG sobre la expresión de *IL23A* pueda deberse al bloqueo de la glicólisis o a la alteración de la homeostasis del retículo endoplásmico inducida por interferencia con la N-glicosilación.

La inhibición de la N-glicosilación no afecta por igual a la función de todas las proteínas, pero sí a algunas de ellas. En este sentido son particularmente importantes las glicosilaciones de la COX-2, y esta enzima tiene una función importante en las DCs dada la elevada cantidad de ácido araquidónico que pueden liberar estas células. Estos hechos sugirieron la conveniencia de analizar la glicosilación de COX-2 como un indicador de la interferencia de la 2-DG con las reacciones de N-glicosilación. Nuestros resultados concuerdan con esta interpretación al mostrar el alto grado de deglicosilación de COX-2 en presencia de 2-DG.

A la vista de los distintos elementos que conforman la UPR, parece justificado tratar de relacionar los cambios en la transcripción de *IL23A* con estos elementos.

Uno de los elementos de la UPR incluye a CHOP, un miembro de la familia C/EBP que se activa por la ruta de PERK/ATF4 y que, en caso de estrés prolongado puede conducir a la muerte celular. (54). En el modelo de DCs, CHOP se comporta como una proteína que se encuentra constitutivamente presente en DCs en reposo y cuya concentración no varía significativamente con estímulos como el LPS. Por el contrario, tras la estimulación con  $\beta$ -

glucanos particulados como el zimosan, se produce la desaparición de CHOP en las fracciones nucleares y su translocación a la periferia de las partículas fagocitadas (36). Curiosamente, la 2-DG ejerce un papel potenciador sobre la inducción de la expresión del ARNm de CHOP cuando se combina con LPS y zimosan. Sin embargo, estos cambios no se aprecian sobre la expresión de proteína.

XBP1 es otro elemento de la UPR que se ha asociado con la respuesta inmune innata (55). XBP1 se encuentra en las DCs y la estimulación con zimosan y LPS o la incubación con 2-DG sólo inducen un pequeño grado de *splicing*, que sin embargo aumenta extraordinariamente cuando la 2-DG se combina con el estímulo pro-inflamatorio. Dado que en estos experimentos el *splicing* se correlacionaba con el aumento de expresión del mRNA de *IL23A*, la hipótesis de partida era que la transcripción dependiente de XBP1 fuese el mecanismo que explicase el aumento de transcripción. Esta interpretación se apoya en el efecto que la inhibición de la actividad endonucleasa de IRE1 tiene sobre la transcripción de *IL-23A*. Sin embargo, no hemos sido capaces de demostrar unión de XBP1 al promotor de *IL23A* en ninguno de los 3 sitios donde puede unirse en experimentos realizados tras 3 y 4 horas de estimulación, que son tiempos concordantes con la cinética de *splicing* de *XBP1*. Estos resultados dificultan la interpretación de los datos y no se puede descartar que XBP1 pueda unirse al promotor de *IL23A* a tiempos más tempranos o que la unión esté enmascarada por coactivadores o complejos en los que intervienen varios factores de transcripción que sean más relevantes en la regulación del promotor.

Como interpretación alternativa, es posible que independientemente de su actividad endorribonucleasa, IRE1 pueda aumentar la transcripción  $\kappa$ B-dependiente mediante su actividad quinasa y la cascada de MAP quinasas (56), ya que es bien conocido que la unión de c-Rel es básico para la transcripción de *IL23A*, acompañando a otros factores como ATF2 en el caso del zimosan, C/EBP $\beta$  y CREB en el caso del LPS (36) y ATF4 que también es activado en condiciones de estrés de retículo y puede unirse tanto a la caja X2-Box (60) como a los sitios ATF2 del promotor *IL23A*.

Estos hallazgos tienen relevancia médica puesto que la UPR se ha asociado con el aumento de la producción de IL-23, que es un mecanismo patogénico en la aparición de la espondiloartritis anquilosante, debido a la acumulación de homodímeros de la cadena pesada de HLA-B27 mal plegados en monocitos y linfocitos (57, 58), aunque esta asociación entre la UPR y la producción de IL-23 en la espondilartrosis anquilosante ha sido revisada recientemente.

## VI. Conclusiones

- I. La respuesta metabólica de las células dendríticas a los patrones moleculares fúngicos se caracteriza por un aumento de la glicolisis y el mantenimiento de la producción de ATP por fosforilación oxidativa.
- II. Las células dendríticas estimuladas con zimosan y LPS presentan un aumento muy elevado de la expresión del ARNm de *IL23A* en presencia de 2-dexosi-D-glucosa. Asimismo se produce una disminución significativa de la producción del ARNm *IL10* en el caso del LPS.
- III. El tratamiento con 2-desoxi-D-glucosa provoca cambios importantes en la N-glicosilación de proteínas, que se ha confirmado en el caso de la COX-2.
- IV. Las rutas IRE1 $\alpha$ /XBP1s y PERK/ATF4/CHOP se activan cuando las células dendríticas se estimulan con zimosan o LPS en presencia de 2-desoxi-D-glucosa.
- V. A pesar de la activación de la vía PERK y del aumento de la expresión del mRNA de CHOP por la 2-desoxi-D-glucosa, CHOP presenta una regulación post-traduccional que conduce a su desaparición del núcleo tras la estimulación con patrones fúngicos
- VI. La participación de la forma con splicing de XBP1 en la regulación del promotor de *IL23A* no se ha podido determinar.

### Reflexión final

Es evidente la reprogramación metabólica que presentan las células dendríticas tras su activación. No obstante, en el uso de la 2-desoxi-D-glucosa para interferir en el metabolismo de la glucosa no debe obviarse su efecto sobre la glicosilación de proteínas y la consecuente activación de la respuesta a proteínas mal plegadas.



## VII. Bibliografía

- 1) **Burnet FM (1961)**. Immunological recognition of self. *Science* 133(3449):307-11.
- 2) **Matzinger P (2012)**. The evolution of the danger theory. *Expert Rev Clin Immunol* 8(4):311-317.
- 3) **Janeway CA Jr (1989)**. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54:1-13.
- 4) **Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, Hart BA and van Kooyk Y (2004)**. Self- and non-self-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 22:33-54.
- 5) **Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C and Akira S (2008)**. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 3:352-363.
- 6) **Geijtenbeek TB (2009)**. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9(7):465-79.
- 7) **Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS (2008)**. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42(2):145-51.
- 8) **Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning TL, Oswald-Richter K, Kasproicz DJ, Kellar K, Pare J, van Dyke T, Ziegler S, Unutmaz D, Pulendran B (2006)**. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* 116:916-28.
- 9) **Blander JM, Sander LE (2012)**. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol* 12:215-25.
- 10) **Medzhitov R, Janeway CA Jr (1998)**. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 10:351-353.
- 11) **Barton GM, Medzhitov R (2002)**. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 14(3):380-3.
- 12) **Steinman RM (1991)**. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-96.
- 13) **Sallusto F, Lanzavecchia A (1994)**. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179(4):1109-18.
- 14) **Pearce EL, Pearce EJ (2013)**. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 38(4):633-43.
- 15) **Warburg O et al (1927)**. The Metabolism Of Tumors In The Body. *J Gen Physiol* 8(6):519-530.
- 16) **Everts B, Pearce EJ (2014)**. Metabolic Control of Dendritic Cell Activation and Function: Recent Advances and Clinical Implications. *Front Immunol* 5: 203.
- 17) **Gerencser AA, et al. (2009)**. Quantitative microplate-based respirometry with correction for oxygen diffusion. *Anal Chem* 81:6868-6878.
- 18) **Everts B, et al. (2014)**. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1- $IKK\epsilon$  supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nature Immunol* 15:323–332.
- 19) **Douglas PM, Dillin A (2010)**. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *The Journal of cell biology* 190(5):719–29.
- 20) **Buchberger A, Bukau B, Sommer T (2010)**. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Molecular cell* 40(2):238–52.
- 21) **Ma Y, Hendershot LM (2004)**. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *Journal of chemical neuroanatomy* 28(1-2):51–65.
- 22) **Aebi M (2013)**. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* 1833(11):2430-7.
- 23) **Stanley P, Schachter H, Taniguchi N (2009)**. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter 8.
- 24) **Ron D, Walter P (2007)**. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol cell biol* 8(7):519–29.
- 25) **Kim I, Xu W, et al. (2008)**. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* 7(12):1013-30.
- 26) **Hollien J, Weissman JS (2006)**. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)* 313(5783):104-7.
- 27) **Harding, HP, Zhang Y, Ron D (1999)**. Protein translation and folding are coupled by a resident kinase. *Nature* 397(6716):271-274.
- 28) **Vattem KM, Wek RC (2004)**. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(31):11269-74.
- 29) **Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, et al. (2000)**. ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. *Molecular cell* 6(6):1355–1364.
- 30) **Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J (2008)**. Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19: 41-52.
- 31) **Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginat J (2010)**. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 21:331-44.
- 32) **Couper KN, Blount DG, Riley EM (2008)**. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180:5771-7.
- 33) **Hölscher C (2004)**. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med Microbiol Immunol* 193:1-17.

- 34) Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, et al. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.
- 35) Alvarez Y, Rodríguez M, Municio C, Hugo E, Alonso S, Ibarrola N, Fernández N, Sánchez Crespo M. (2012) Sirtuin 1 is a key regulator of the IL-12 p70/IL-23 balance in human dendritic cells. *J. Biol. Chem* 287:35689-35701.
- 36) Rodríguez M, Domingo E, Alonso S, Frade JG, Eiros J, Sánchez Crespo M, Fernández, N (2014). The unfolded protein response and the phosphorylations of activating transcription factor 2 in the trans-activation of IL23A promoter produced by  $\beta$ -glucans. *J Biol Chem* 289:22942-22957.
- 37) 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 USA* 107:17698-17703.
- 38) Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, Savaraj N, Lane AN, Lampidis TJ (2007). Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol Cancer Ther* 6(11):3049-58.
- 39) Smith WL, Langenbach R (2001). Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 107(12):1491-5.
- 40) Otto JC (1993). N-glycosylation of Prostaglandin Endoperoxide Synthases-1 and -2 and their orientation in the Endoplasmic Reticulum. *The journal of biological chemistry* 24:18234-18242.
- 41) Gery S, Park DJ, Vuong PT, Chih DY, Lemp N, Koeffler HP (2004). Retinoic acid regulates C/EBP homologous protein expression (CHOP), which negatively regulates myeloid target genes. *Blood* 104:3911–17.
- 42) 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.
- 43) Martinon F, Glimcher LH (2011). Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Immunol* 23:35–40.
- 44) Muralidharan S, Mandrekar P (2013). Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukocyte Biol* 94:1167–1184.
- 45) Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415:92–96.
- 46) Everts B, Amiel E, van der Windt GJ, Freitas TC, Chott R, Yarasheski KE, Pearce EL, Pearce EJ (2012). Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood* 120(7):1422-31.
- 47) Krawczyk, C. M., T. Holowka, J. Sun, J. Blagih, E. Amiel, R. J. DeBerardinis, J. R. Cross, E. Jung, C. B. Thompson, R. G. Jones, and E. J. Pearce. 2010. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 115: 4742–4749.
- 48) Jin P, Han TH, Ren J, Saunders S, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF (2010). Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J Transl Med* 8: 4.
- 49) Malinarich F, Duan K, Hamid RA, Bijin A, Lin WX, Poidinger M, Fairhurst AM, Connolly JE (2015). High Mitochondrial Respiration and Glycolytic Capacity Represent a Metabolic Phenotype of Human Tolerogenic Dendritic Cells. *J Immunol* 194: 5174-5186.
- 50) Brown J. (1962). Effects of 2-deoxyglucose on carbohydrate metabolism: review of the literature and studies in the rat. *Metabolism* 11:1098–1112.
- 51) Sols A, Crane RK (1954). Substrate specificity of brain hexokinase. *J Biol Chem* 210:581-595.
- 52) Wick, A. N., Drury, D. R., Nakada, H. I., and Wolfe, J. B. (1957). Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* 224:963-969.
- 53) Kurtoglu M, Maher JC, Lampidis TJ (2007). Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells. *Antioxid. Redox Signal* 9:1383–1390.
- 54) He B (2006). Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell death Differ* 13:393:403.
- 55) Cláudio N, Dalet A, Gatti E, Pierre P (2013). Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathway. *Embo J* 32:1214-1224.
- 56) Bettigole SE, Glimcher LH (2014). Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annual Review of Immunology* Vol 33:107-138.
- 57) Kollnberger S, Bird LA, Roddis M, Hacquard-Bouder C, Kubagawa H, Bodmer HC, Breban M, Mcmichael AJ, Bowness P (2004). HLA-B27 heavy chain homodimers are expressed in HLA-B27 transgenic rodents models of spondyloarthritis and are ligands for paired Ig-like receptors. *J Immunol* 173:1699-1710.
- 58) Ciccia F, Accardo-Palumbo A, Rizzo A, Guggino G, Raimondo S, Giardina A, Cannizzaro A, Colbert RA, Alessandro R, Triolo G (2014). Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with ankylosing spondylitis and subclinical gut inflammation. *Ann Rheum Dis* 73:1566-1574.
- 59) Hartley MD, Imperiali B (2012). At the membrane frontier: a prospectus on the remarkable evolutionary conservation of polyprenols and polyprenyl-phosphates. *Arch Biochem Biophys* 517(2):83-97.
- 60) Chaveroux C, Sarcinelli C, Barbet V, Belfeki S, Bartheleix A, Peyret CF, Lebecque S, Toufic R, Bruhat A, Fafaurnoux P, Manié SN (2016). Nutrient shortage triggers the hexosamine biosynthetic pathway via the GCN2-ATF4 signalling pathway. *Scientific Reports* 6:27278.