

Papel de los receptores LXR como reguladores de la respuesta inmunitaria y la migración de las células dendríticas

Susana Beceiro, Noelia Alonso-González, Jose M. Déniz, Irene Hernández, Jose Guillén, M. Mercedes Díaz, Félix López, Carlos M. Ruiz-Gallarreta
 Antonio Castrillo Viguera (director)

Una de las principales causas de muerte en los países desarrollados es la enfermedad cardiovascular, caracterizada por una acumulación de lípidos en las arterias. Los receptores nucleares LXR son proteínas encargadas de regular el metabolismo del colesterol, así como la respuesta inmune innata. Estos receptores también regulan de manera negativa la expresión de genes inflamatorios. Actualmente, la implicación de LXR en la inmunidad adquirida es poco conocida.

Las células dendríticas (DC) representan un sistema único como sensores de patógenos, con capacidad para activar eficientemente linfocitos T vírgenes. Si bien está muy bien caracterizada la implicación de LXR en procesos como inflamación y aterosclerosis, son pocos los estudios que existen acerca de la relación entre LXR y las DC. En este trabajo hemos demostrado que la ausencia de LXR no impide la correcta diferenciación de las DC, si bien influye en la capacidad migratoria de las mismas. Las DC procedentes de ratones modificados genéticamente que carecen de la expresión de LXR, presentan una severa disminución de su capacidad migratoria. Además, el análisis de la expresión génica de las DC reveló que LXR regula la expresión del ectoenzima CD38, una molécula implicada en la migración de los leucocitos.

The leading cause of death in developed countries is cardiovascular disease, characterized by an accumulation of lipids in the arteries. LXR Nuclear receptors are proteins responsible for regulating cholesterol metabolism and the innate immune response. These receptors also negatively regulate the expression of inflammatory genes. Currently, the involvement of LXRs in acquired immunity is poorly understood. Dendritic cells (DC) represent a unique system as sensors of pathogens, with the ability to efficiently activate naïve T cells. While it is well characterized LXR involvement in processes such as inflammation and atherosclerosis, few studies exist about the relationship between LXR and DCs. In this study we demonstrated that the absence of LXR does not prevent the correct differentiation of DC, although it affects the migratory capacity of them. DCs from genetically modified mice lacking the expression of LXR present a severe decrease in their migratory ability. In addition, analysis of gene expression of DCs revealed LXR regulates the expression of the ectoenzyme CD38, a molecule involved in leucocyte migration.

Introducción

La enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de muerte en países desarrollados, y se trata de una enfermedad progresiva caracterizada por la acumulación de lípidos y componentes fibrosos en las grandes arterias. Actual-

mente se sabe que la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica así como un desorden del metabolismo lipídico, provocada por varios factores, entre ellos los elevados niveles de colesterol circulante. Los defectos en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, como por ejemplo la libera-

ción excesiva de citoquinas y proteínas de fase aguda, están claramente asociados con diabetes, aterosclerosis y otros estados patológicos relacionados con el sistema inmune, como sepsis y enfermedades autoinmunes.

Los receptores LXR (Liver X Receptors, LXR α y LXR β) son miembros

FAMILIA
**MEGÍAS
 MARTÍNEZ**

Artículo patrocinado por
Familia Megías

de la superfamilia de receptores nucleares encargados de la regulación de la homeostasis del colesterol (Castrillo and Tontonoz, 2004; Repa et al., 2002; Tontonoz and Mangelsdorf, 2003). Los activadores endógenos de estos receptores son intermediarios de las rutas de biosíntesis del colesterol. Algunos genes diana de LXR están relacionados con el metabolismo del colesterol y ácidos grasos, como ABCA1, ABCG1, SREBP-1c. Otros genes diana, como AIM (SP α), se relacionan con la regulación de la apoptosis y la respuesta inmune innata. LXR tiene también capacidad para regular negativamente la expresión de genes inflamatorios (Joseph et al., 2003). Recientemente en nuestro laboratorio hemos descrito un defecto en la fagocitosis de células apoptóticas en ratones con déficit de LXR (Alonso-González et al., 2009). Sin embargo, poco se sabe de la importancia de los receptores LXR en la biología de las células de la inmunidad adquirida.

Las DC son células especializadas en la presentación de antígenos que juegan un doble papel en la inducción de la respuesta inmune adaptativa frente a antígenos extraños, así como en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica (Banchereau and Steinman, 1998). Estas células ejercen su actividad en localizaciones lejanas a su lugar de origen, lo cual implica que poseen una gran capacidad migratoria que les permite desplazarse a través del organismo. Las DC inmaduras se distribuyen principalmente en los tejidos comunes de entrada de

patógenos, como son la piel y la superficie de las mucosas, así como en los órganos linfoides secundarios, bazo y ganglios linfáticos, donde se inicia la respuesta inmune adaptativa. Poseen la habilidad de penetrar en los pequeños vasos linfáticos de los tejidos periféricos y migrar hacia los ganglios linfáticos locales. De esta manera, en algún lugar de la ruta hacia los ganglios linfáticos, estas células cargadas con antígenos maduran, asumiendo un fenotipo inmunoestimulador que conlleva un incremento de la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), y una mayor regulación de la expresión de moléculas coestimuladoras y citoquinas necesarias para una sensibilización primaria eficiente de los linfocitos T (Banchereau et al., 2000; Pulendran, 2005; Steinman, 1991).

El papel biológico de los receptores nucleares LXR en las DC es poco conocido hasta el momento. Debido al complejo ciclo de vida de estas células, la capacidad para migrar a través del organismo constituye un aspecto crítico en su función inmunológica. Por todo ello, en nuestro laboratorio hemos estudiado la relación entre los receptores nucleares LXR y aspectos de la biología de las DC, como la diferenciación y desarrollo, y capacidad migratoria.

Material y métodos

Animales

En nuestro laboratorio disponemos de ratones deficientes en LXR (LXR y su correspondiente control (WT).

Todos los ratones se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Ciencias de la Salud de la ULPGC, en las condiciones adecuadas y libres de patógenos.

Cultivo celulares

Para obtener DC derivadas de médula ósea de ratón (BMDC) adaptamos el método estándar descrito por Lutz (Lutz et al., 1999). Para ello se usaron las patas traseras de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/- de 8-10 semanas de edad, y se extrajo la médula ósea. Las células obtenidas se filtraron, se sometieron a lisis de glóbulos rojos, y posteriormente se sembraron en placas de cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con penicilina (100U/ml), estreptomicina (100ug/ml), L-glutamina (2m M), 2-mercaptoetanol (50uM Sig- σ) y FBS 10%, y enriquecido con la citoquina GM-CSF para favorecer la diferenciación de estas células a DC. Las células se diferenciaron durante 7 días y posteriormente se indujo la maduración durante 24-48 horas añadiendo al medio 500 ng/ml de LPS. La activación de LXR se indujo con el tratamiento de las DC con el ligando sintético de LXR GW3965 (1 μ M), durante 24 horas tras la maduración.

También aislamos DC procedentes de órganos de ratón, en concreto órganos linfoides, bazo y ganglios linfáticos (inguinales y poplíteos), que fueron disgregados mecánicamente, y la suspensión celular se digirió con Liberasa CI (1ml/bazo de 1.67 Wunsch unidades/

ml) y DNasa I (0.2mg/ml). Las células se lavaron con PBS/EDTA 2mM, al 1% FBS, y se filtró (70µm). El enriquecimiento de la suspensión celular en DC se realizó mediante microesferas inmunomagnéticas acopladas a CD11c y posterior selección positiva en columnas magnéticas MS+, siguiendo las instrucciones del fabricante (MACS, Miltenyi Biotec). Las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio RPMI 1640 al 10% FBS y antibióticos, hasta ser usadas en los distintos experimentos.

Citometría de flujo

El análisis de antígenos de superficie celular se realizó mediante citometría de flujo. Suspensiones celulares de BMDC WT y LXRαβ-/- maduras e inmaduras se lavaron dos veces en tampón de tinción, se resuspendieron e incubaron con anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes, diluidos en este mismo tampón durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células se lavaron de nuevo en tampón de tinción y se analizaron inmediatamente. Las células fueron analizadas en el citómetro LSR II (Becton Dickinson). Se emplearon los siguientes anticuerpos: CD11c, CD69, CD80, CD86, MHCII PE, MHCII FITC, CCR7, hibridoma CD11C y F4/80 (BM8).

Análisis histológico

Se obtuvieron los tejidos (bazo y ganglios linfáticos) y se embebieron

en componente OCT. Se sometieron a una congelación rápida en Nitrógeno líquido e isopentano. Se cortaron secciones congeladas de 4 µm, se fijaron con paraformaldehído 4%, se bloquearon con BSA 6% y 2% de suero preinmune en PBS, y se tiñeron con anticuerpos acoplados a fluorescencia, diluidos en solución de bloqueo. Para aquellos anticuerpos no acoplados a fluorocromos, se emplearon anticuerpos secundarios acoplados a fluorescencia. Así, las DC se identificaron con CD11c-FITC, linfocitos B con CD45R y B220, linfocitos T con CD8 y CD4, macrófagos del seno subcapsular y medular de los ganglios linfáticos con sialoadhesina y macrófagos de la pulpa esplénica roja con F4/80.

Las imágenes se obtuvieron con el microscopio LSM 5 PASCAL Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss, Germany).

Quimiotaxis

La determinación de la quimiotaxis en respuesta a quimioquinas se determinó midiendo el número de células que migraron a través de un filtro de policarbonato (tamaño del poro de 5-µm) en una cámara Transwell de 12 pocillos. El ensayo se realizó por duplicado y con modificaciones, en DC de distinto origen. Las quimioquinas recombinantes (CCL19, CCL21) diluidas en RPMI 1640 al 0.5% de FBS se introdujeron en cada una de las cubetas de la cámara. Las células (3.5-5 x 10⁵ células en cada pocillo) se añadieron a cada uno de

los insertos, y después de incubar la cámara durante 3 horas a 37°C al 5% CO₂, se contabilizaron las células de la cámara inferior, y se calculó el índice quimiotáctico.

Ensayos migración in vivo

Sensibilización in vivo de la piel

Se sensibilizó la piel del abdomen de los ratones (WT y LXRαβ-/-) con solución 0.5% FITC (isotiocianato de fluoresceína isómero, Sigma, St Louis, MO) disuelto en acetona: dibutilftalato 1:1 (vol:vol) (*painting*) (Hill et al., 1990). 24-48 horas más tarde se sacrificaron los ratones y se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales, que fueron analizados por microscopía de fluorescencia.

Migración in vivo

BMDC WT y LXRαβ-/- se marcaron con sustancias fluorescentes (CMFDA, (5-clorometilfluoresceína diacetato), y CMTPIX 0.5 M, 5-(and-6)-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster), durante 30 minutos a 37°C, y posteriormente se inyectaron 10⁶ DC en un volumen de 50µl en la almohadilla plantar de ratones WT. 24-48 horas más tarde, se recogieron y congelaron los ganglios poplíteos para posteriormente ser analizados en el microscopio óptico.

Microarrays de expresión

Se aisló RNA total de BMDC maduras e inmaduras WT y LXRαβ-/- , y

se analizó el perfil transcripcional con los microarrays Affymetrix 430 2.0. Los datos se analizaron con los programas *GeneSpring 7.3*. Sólo se han representado en el mapa de calor las diferencias de expresión estadísticamente significativas.

Análisis de DNA, RNA y proteínas

Se recogió RNA total de BMDC con el reactivo TRIzol. Este RNA total se transcribió a cDNA con reactivos del kit *iScript transcriptasa reversa* de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y se sometió a PCR cuantitativa en tiempo real. La expresión se normalizó con la expresión del gen 36B4.

El ensayo de electromovilidad (*EMSA, electrophoretic mobility shift assay*) se diseñó como se describe en el artículo Laffitte et al., 2001. Proteínas de ratón LXR y RXR se sintetizaron con el sistema rápido de transcripción/traslación TnTT7. La reacción que contiene las proteínas y el tampón se preincubó con el anticuerpo policlonal RXR antes de añadir los oligonucleótidos radiomarcados. Las reacciones de unión se resolvieron en un gel de poli-acrilamida 5% en TBE1X.

Resultados

La ausencia de LXR no impide la correcta diferenciación y maduración in vitro de DC

Los receptores nucleares LXR, LXR α y LXR β , están ampliamente reconocidos como reguladores centra-

les del metabolismo del colesterol en mamíferos, como demuestran estudios previos (Castrillo, and Tontonoz, 2004). Además de su papel clave en la homeostasis del colesterol, LXR también han emergido como importantes reguladores de la expresión de genes inflamatorios y en las células del sistema inmune innato. Varios estudios han demostrado que la activación de LXR por sus ligandos disminuye la inducción de genes inflamatorios clásicos como iNOS, COX-2, MMP-9 y varias citoquinas en respuesta a estímulos de LPS, TNF- α e IL-1 β (Joseph et al., 2003). Por otro lado, estudios recientes han mostrado que existe relación entre el metabolismo del colesterol, LXR y la respuesta inmune adaptativa (Bensinger et al., 2008). Además, un estudio realizado en nuestro laboratorio ha demostrado que la pérdida de LXR altera la capacidad fagocítica de macrófagos (Alonso-González et al., 2009). Así, para profundizar en el posible papel de LXR en la biología de las DC, hemos analizado las DC derivadas de médula ósea (BMDC) procedentes de ratones WT y de ratones LXR $\alpha\beta$ -/-.

En primer lugar, consideramos la posibilidad de que la ausencia de LXR pudiese afectar al correcto desarrollo y diferenciación de las DC. Para ello, diferenciamos BMDC de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/- mediante la adición al medio de la citoquina GM-CSF. Así, al observar las células al microscopio óptico apreciamos una morfología y número de células similar en ambos genotipos (Figura 1).

También se estudió la maduración de BMDC LXR $\alpha\beta$ -/- en respuesta a señales inflamatorias, en comparación con DC WT, mediante análisis por citometría de flujo. Se indujo la maduración de las DC con LPS y se comparó con las DC inmaduras. Como muestra la figura 2, la estimulación con LPS induce un incremento de la expresión de moléculas MHCII, así como moléculas coestimuladoras como, CD80, CD86, CD69, todos ellos marcadores de maduración de las DC. Además, la expresión fue muy similar en BMDC WT y LXR $\alpha\beta$ -/-.

Órganos linfoides de ratones deficientes de LXR exhiben una distribución de los principales componentes celulares similar a los ratones WT

El siguiente paso tras observar que la ausencia de LXR no interfiere en la diferenciación y maduración de las DC, fue el estudio de la distribución y posicionamiento de éstas y otras células del sistema inmune in vivo. Para ello, mediante la técnica de inmunofluorescencia, analizamos la distribución de los distintos tipos celulares de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ -/- en los principales órganos linfoides secundarios, bazo y ganglios linfáticos. Tanto en bazo como en ganglios linfáticos usamos anticuerpos que tiñen selectivamente las poblaciones formadas por linfocitos B, población de linfocitos T, población de DC y otros anticuerpos para varias poblaciones de macrófagos. Como se observa en la Figura 3, la

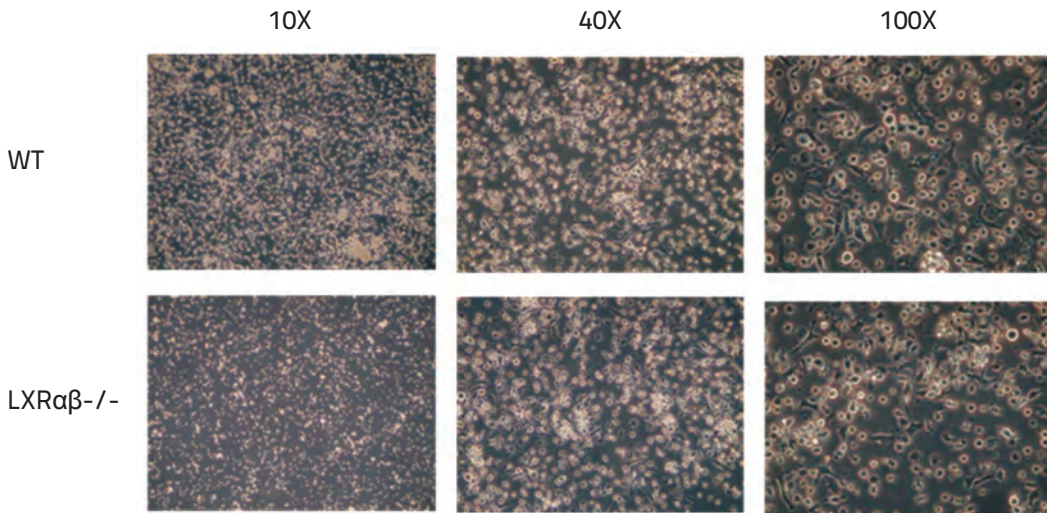


Figura 1. DC deficientes en LXRαβ-/- presentan una morfología y número similares a DC WT. BMDC de ratones WT y LXRαβ-/- se diferenciaron durante 7-8 días con la citoquina GM-CSF y posteriormente se observaron al microscopio óptico (10x, 40x, 100x)

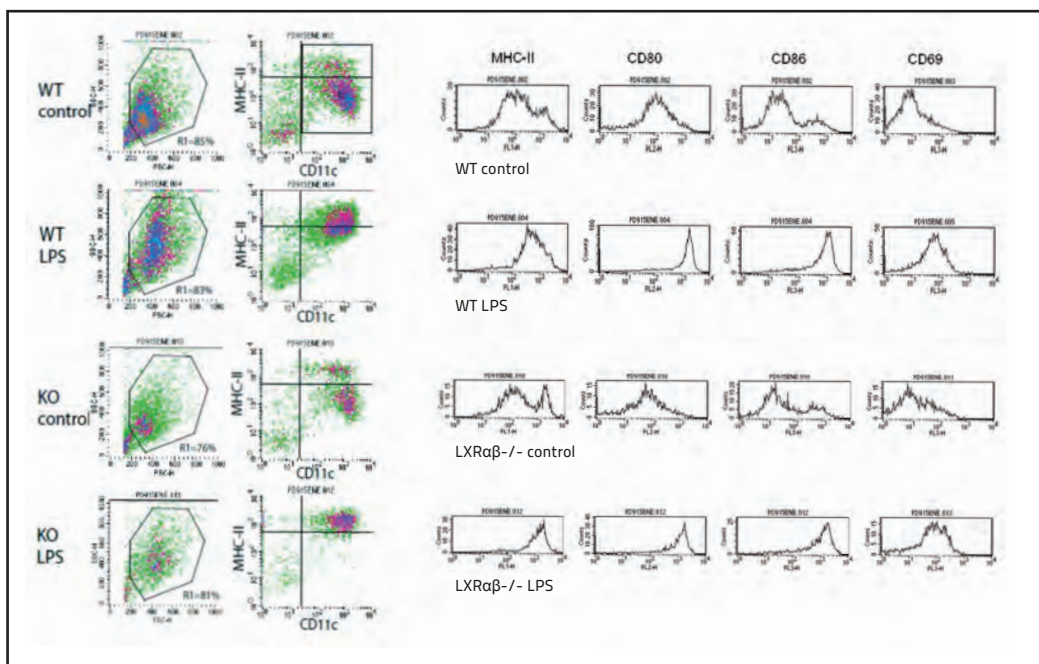


Figura 2. Correcta maduración de BMDC LXRαβ-/- . BMDC WT y LXRαβ-/- inmaduras y maduras se tiñeron con anticuerpos para CD11c, MHC-II, CD80, CD86 y CD69, y se analizaron por citometría de flujo. Estos perfiles citométricos se obtuvieron gateando las células con CD11c

disposición de las principales poblaciones celulares en estos órganos linfoides es muy similar en ambos genotipos.

DC deficientes en LXR exhiben defectos intrínsecos en la respuesta quimiotáctica

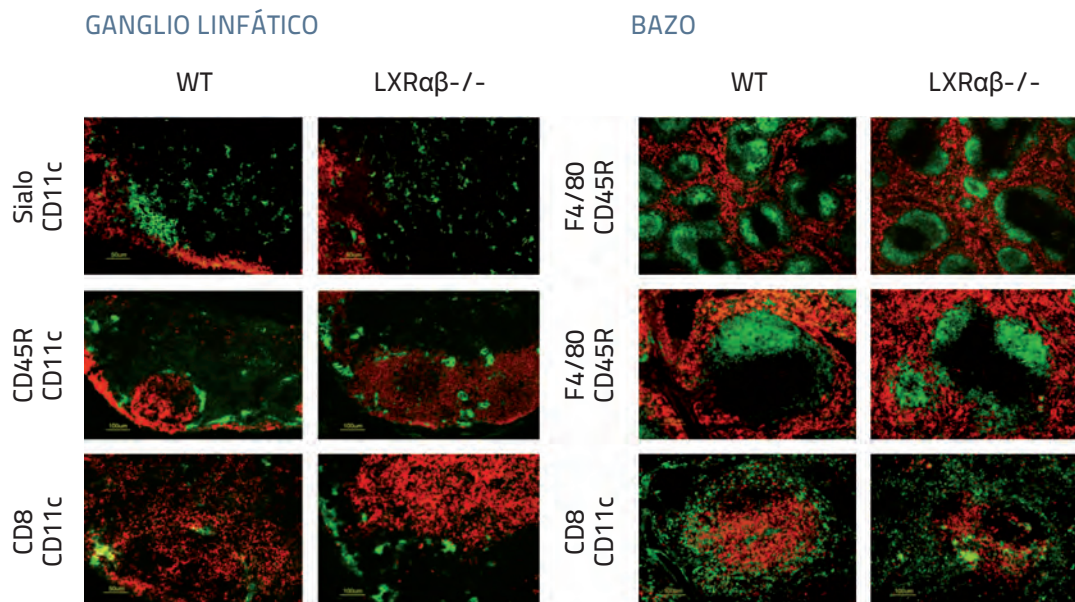
La principal característica de las DC es su capacidad para reconocer y engullir microorganismos invasores, y posteriormente procesarlos y

transportar los antígenos al bazo y/o ganglios linfáticos, órganos donde tendrá lugar la respuesta inmunitaria. Esta capacidad para migrar y presentar los antígenos a los linfocitos T (CD4+ y CD8+) es necesaria para dar inicio a la inmunidad celular contra el agente patógeno. Para dilucidar la posible influencia de LXR en la capacidad migratoria de las DC, desarrollamos en nuestro laboratorio ensayos de quimiotaxis, fenómeno por el cual las células di-

rigen sus movimientos de acuerdo a sustancias químicas presentes en su entorno.

Para llevar a cabo estos ensayos empleamos DC maduras e inmaduras a partir de médula ósea (BMDC) de ratones WT y LXRαβ-/-, obtenidas como se describió anteriormente. Además, las DC fueron tratadas con el ligando sintético de LXR, GW3965 (1μM). El índice quimiotáctico de las DC WT se incrementa en respuesta a las diferentes qui-

Figura 3. Similar morfología de los órganos linfoides secundarios de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Mediante la técnica de inmunofluorescencia observamos que los principales órganos linfoides secundarios, bazo y ganglios linfáticos, presentan una distribución de las células inmunes similar en ratones WT y en LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Para ello, empleamos distintos anticuerpos primarios conjugados a fluorocromos: CD11c (verde) que marca selectivamente DC, CD45R (rojo) para los linfocitos B, CD8 (rojo) para los linfocitos T, sialoadhesina (rojo) para los macrófagos del seno subcapsular y medular y F4/80 (rojo) para macrófagos de la pulpa esplénica roja



mioquinas, en comparación con la quimiotaxis basal observada. Además, al tratar las DC con el ligando sintético GW3965 y activar LXR observamos un aumento mayor del porcentaje de migración de las células WT, tanto en BMDC inmaduras (figura 4A) como en maduras (Figura 4B), en respuesta a las quimioquinas CXCL12 y CCL19, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron al analizar DC de bazo de ratones WT (figura 4C). Por el contrario, las DC procedentes de médula ósea y bazo de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} exhibieron una escasa inducción de la respuesta quimiotáctica con respecto a la quimiotaxis basal, tanto en células inmaduras frente a CXCL12 (Figura 4A), como en células maduras en respuesta a CCL19 y CCL21 (Figura 4B), así como en DC esplénicas (Figura 4C). Además, tampoco el tratamiento de las DC LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} con GW3965 incrementó la capacidad quimiotáctica de las DC LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}. Tras estos ensayos de quimiotaxis, concluimos que la activación de LXR incrementa la respuesta qui-

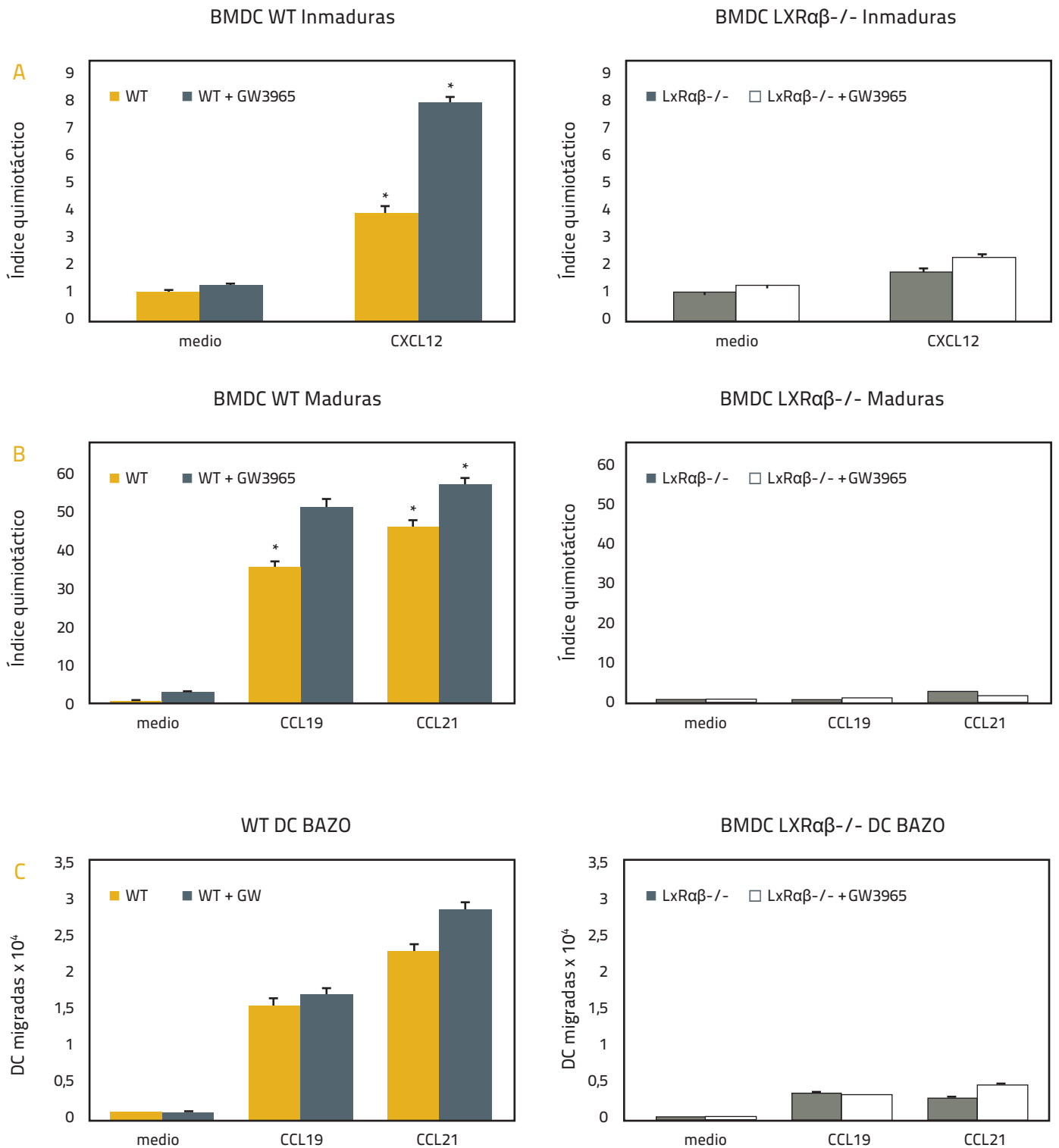
miotáctica de las DC, y la ausencia de LXR repercute negativamente en esta función de las DC, reduciendo en gran medida la respuesta de estas células a las quimioquinas ensayadas. De este modo podemos afirmar que la respuesta quimiotáctica de las DC no es independiente de LXR.

Análisis de la migración in vivo de DC WT y LXR

Como pudimos observar en los ensayos quimiotácticos realizados, las DC de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} exhiben un defecto en su capacidad para migrar hacia un gradiente químico promovido por agentes quimiotácticos como diferentes quimioquinas. De esta manera, estos resultados obtenidos in vitro indican que LXR puede influir en la capacidad migratoria de las DC, por lo que para demostrarlo realizamos un ensayo de sensibilización de contacto de la piel. La técnica consiste en exponer la piel de los animales a un hapteno o antígeno sensibilizante (*pain-*

ting), tras lo cual se produce una reacción inicial promovida por la migración de las DC hacia los ganglios linfáticos, para así activar las células T específicas. En concreto, el ensayo realizado y que se ilustra en la figura 5 consiste en la sensibilización de contacto de la piel, donde la sustancia sensibilizante son el dibutilftalato (DBF) y el fluorocromo FITC, el cual actúa como un indicador de la migración. Tras la aplicación de esta mezcla sobre la piel de los ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, se extrajeron los ganglios linfáticos correspondientes y se analizaron mediante inmunofluorescencia, empleando distintos anticuerpos para visualizar la localización de la sustancia sensibilizante, así como el número de DC presentes en los ganglios linfáticos tras dicha sensibilización.

Como se puede observar en la figura 5, las células acopladas a la sustancia fluorescente verde (FITC⁺) fueron fácilmente detectadas en los ganglios linfáticos WT a las 24 horas post-sensibilización, y se lo-

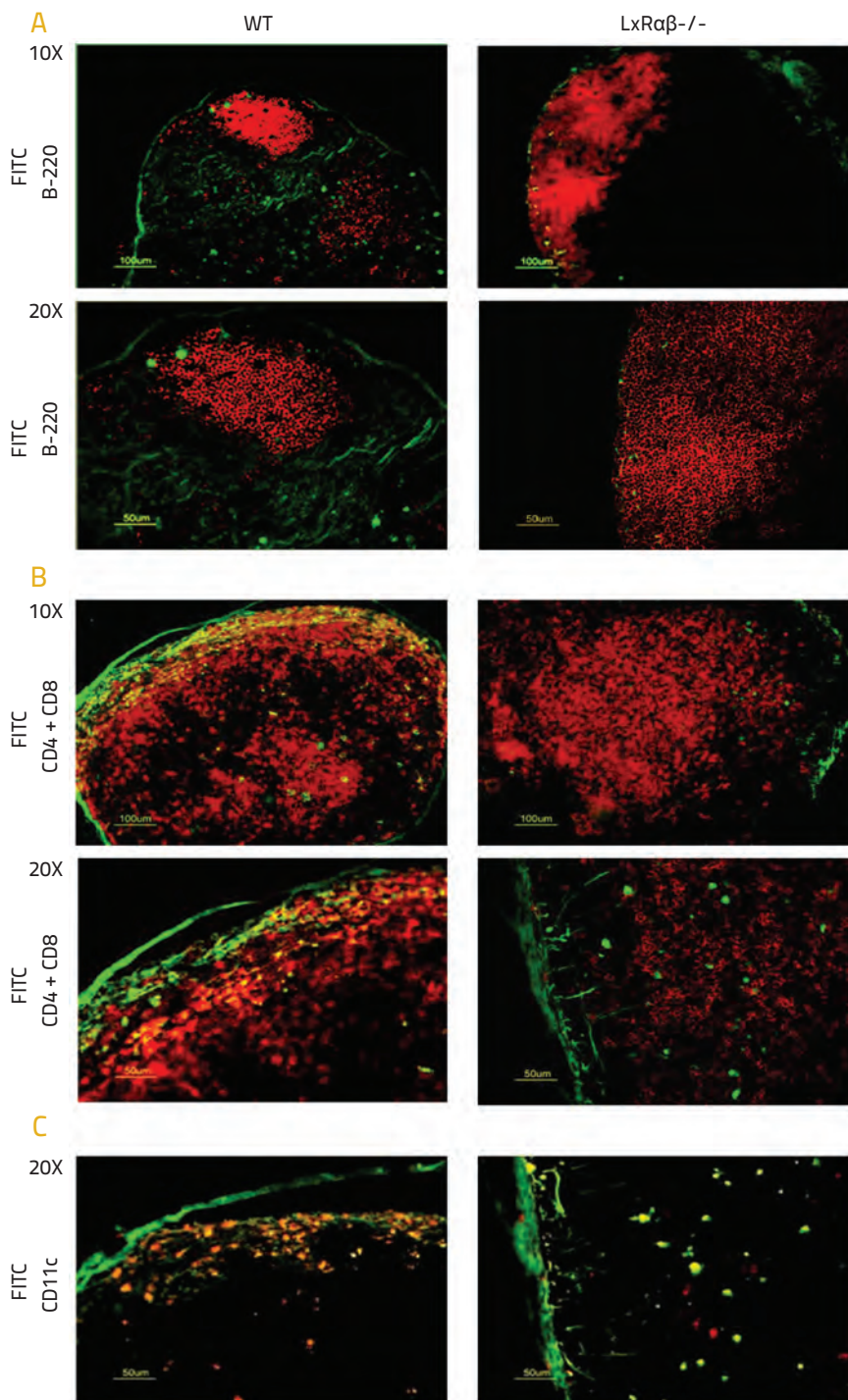
Figura 4. LXR repercute en la capacidad quimiotáctica de las DC in vitro


calizaron en el área de los linfocitos T (Figura 5B). Muchas de estas células FITC⁺ también se muestran comarcadas con el anticuerpo frente

a CD11c (células amarillo/naranja, Figura 5C), lo cual sugiere que estas células marcadas son DC que han migrado en respuesta al estímulo

antigénico. Por el contrario, pocas células FITC⁺ se observaron en secciones de ganglios linfáticos inguinales de ratones LXRαβ-/-, incluso

Figura 5. Análisis de la migración de las DC tras la sensibilización in vivo de la piel con FITC. Criosecciones de ganglios linfáticos inguinales de ratones WT y LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, cuya piel fue sensibilizada con FITC-acetona/dibutilftalato (verde), fueron teñidas con diferentes combinaciones de anticuerpos (rojo): B220 (A), CD4+CD8 (B), CD11c (C). Las imágenes se obtuvieron en el microscopio de fluorescencia con aumentos de 10X y 20X.



en ensayos de sensibilización con una duración de 48 horas (datos no mostrados). El número de DC FITC⁺CD11c⁺ detectadas en los ganglios linfáticos de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} sen-

sibilizados con FITC fue significativamente menor comparado con el número de DC FITC⁺ presentes en los ganglios linfáticos de ratones WT sensibilizados. Estos datos in-

dican que las DC presentes en la piel de ratones LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} fueron ineficientemente reclutadas en los ganglios linfáticos en respuesta a un estímulo antigénico aplicado en la piel. Este defecto de las DC LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} para posicionarse correctamente en respuesta a un estímulo inflamatorio, sugiere que el tráfico de las DC de la piel hacia los ganglios linfáticos es dependiente, al menos en parte, de la actividad de LXR.

Defecto en la migración in vivo de las DCLXR $\alpha\beta$ ^{-/-}

Con el fin de confirmar el defecto observado en la migración de las DC LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}, realizamos un segundo modelo de migración in vivo. En este ensayo consiste en la migración de las DC desde la piel hacia los ganglios linfáticos, vía la expresión en vasos linfáticos de CCL21, por lo que esta migración requiere la participación del receptor CCR7 (Martín-Fontecha et al., 2003). Para ello se marcaron diferencialmente DC maduras obtenidas in vitro como en anteriores experimentos LXR $\alpha\beta$ ^{-/-} y WT con los marcadores citosólicos fluorescentes CMFDA (LXR $\alpha\beta$ ^{-/-}) y CMTPX (WT), y se inyectaron conjuntamente, en igual concentración y volumen (mezcla 1:1), en la dermis de las almohadillas de las patas traseras de ratones WT. Se recogieron los ganglios linfáticos poplíteos a las 24 y 48 horas, se seccionaron y se tiñeron con los anticuerpos B-220 (linfocitos B), CD4+CD8 (linfocitos T), CD11c (DC) y laminina (lámina basal).

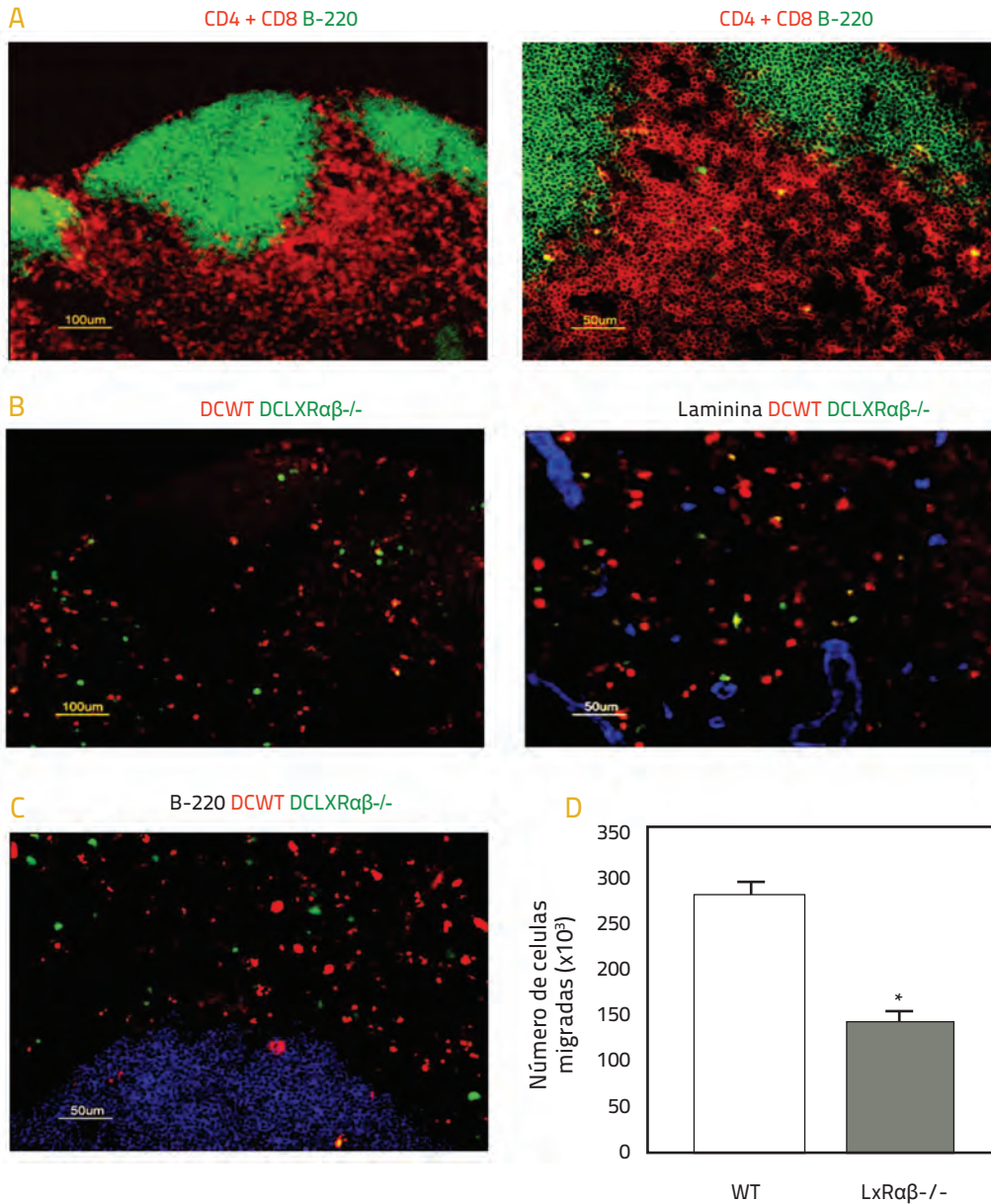


Figura 6. Defecto en la migración in vivo de DC LXRαβ-/. DC maduras procedentes de ratones LXRαβ-/- y WT se marcaron con los marcadores vitales CMFDA (verde) y CMPTX (rojo), respectivamente, y se inyectaron subcutáneamente en la almohadilla de la pata trasera de ratones WT. Los ganglios linfáticos poplíteos se recogieron a las 24 horas y se tiñeron criosecciones con CD4 y CD8 (A, rojo), B-220 (A, verde), y laminina (B, azul), y se examinaron por microscopía de fluorescencia. Aumento 10X y 20X. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

Como se aprecia en la figura 6, el número de DC LXRαβ-/- (verde) localizadas en el área de linfocitos T de los ganglios poplíteos 24 (figura 6A, B, C) y 48 horas (datos no mostrados) tras la inyección de las células fue significativamente menor en comparación con las DC WT (rojo). Experimentos similares alternando estos dos colorantes fluorescentes revelaron resultados similares. Al cuantificar el número de células fluorescentes LXRαβ-/- y WT migradas a los ganglios linfáticos poplíteos mediante el análisis de 20 secciones diferentes (figura

6D) se corroboró que el número de DC LXRαβ-/- presentes fue considerablemente menor al de DC WT. Con este ensayo de migración in vivo confirmamos que existe un defecto significativo en la migración de las DC LXRαβ-/- a través de los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos drenantes. Todos estos resultados en conjunto sugieren que los receptores LXR juegan un importante papel en el tráfico de las DC en respuesta a estímulos quimiotácticos.

LXR regula positivamente CD38

Con el objetivo de profundizar en la relación y el efecto de la activación de LXR en DC, realizamos un estudio del perfil transcripcional de las DC WT y LXRαβ-/- mediante análisis de microarrays de cDNA (figura 7). Así, pudimos observar genes cuya activación es dependiente de LXR, genes diana como ABCA1, ABCG1, SREBP1c, AIM. Este estudio identificó además el ectoenzima CD38 como un gen respuesta a LXR.

CD38 es una molécula de la superficie celular que actúa como un ec-

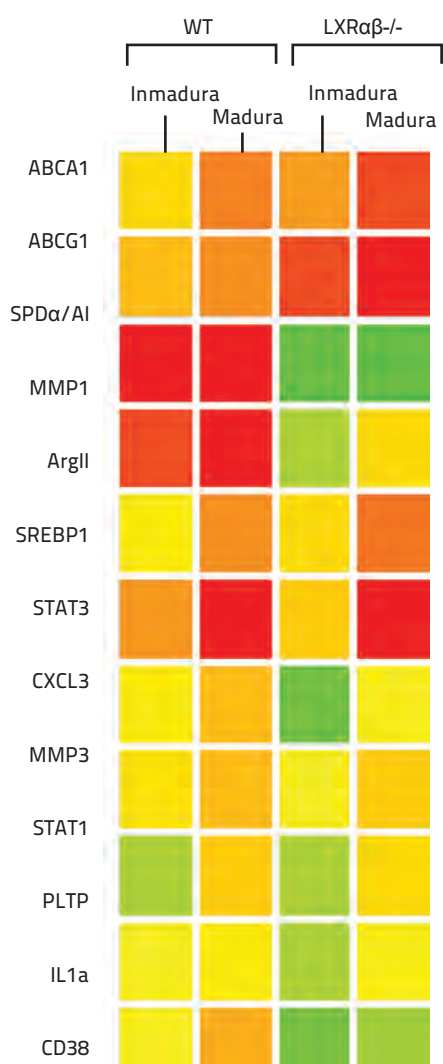


Figura 7. Resultados del análisis de microarrays de la expresión de genes diana conocidos de LXR, como ABCA1, SREBP1c, ABCG1, relacionados con el metabolismo del colesterol. BMDC WT y LXRαβ-/- fueron maduradas con LPS durante 24 horas. RNA total se purificó y se hibridó con arrays *Affymetrix 430 v2.0*; los datos se analizaron con el software *GeneSpring 7.3*. Los datos se representaron con un mapa de calor (rojo, mayor expresión; verde, menor expresión).

gulación de la migración de los leucocitos en respuesta a diferentes quimioatrayentes endógenos y quimioquinas.

Mediante PCR cuantitativa en tiempo real corroboramos los resultados obtenidos en los microarrays (figura 8), confirmando así que CD38 es un gen diana de LXR. La expresión de CD38 se incrementó tras la maduración con LPS en células WT, pero no en aquellas LXRαβ-/-.

La expresión de los genes ABCA1, SREBP1c, ABCG1, IL-12, IL-6 Y CD38 en BMDC inmaduras y maduras WT y LXRαβ-/- se analizó por PCR cuantitativa en tiempo real.

Regulación directa de la expresión de CD38 por el heterodímero LXR/RXR

Para determinar si el gen CD38 era un target directo de LXR, analizamos la región promotora 5' de dicho gen. Un potencial elemento de respuesta a LXR (LXRE) se identificó a 2 kb del sitio de iniciación de la transcripción (figura 9A). La llamativa conservación de este elemento en las tres especies (ratón, rata y humano) sugiere que probablemente se trate de una importante secuencia reguladora. Para determinar las interacciones proteína: ADN se realizó un ensayo de retardo en gel (EMSA), usando proteínas LXR y RXR y oligonucleótidos marcados radiactivamente. El análisis de EMSA (figura 9B) confirmó que in vitro las proteínas LXR y RXR se unen como heterodímeros al oligonucleótido marcado radiactivamen-

te, que contiene este LXRE en el promotor de CD38 del ratón. Como control se empleó una secuencia específica del gen diana de LXR SREBP1c, donde comprobamos esa unión a LXR. También observamos una interrupción de esta interacción al añadir a la reacción un anticuerpo específico frente a RXR, lo que generó un complejo de masa superior en las células, resultando en una disminución de la movilidad del complejo proteína-ADN (*supershift*), demostrando así que la proteína unida a la secuencia usada era el heterodímero LXR-RXR y no otra. La especificidad de la reacción de unión de LXR con la secuencia usada se evaluó realizando un ensayo de competición, añadiendo un exceso de oligonucleótidos sin marcar (sonda fría) junto con la sonda marcada. De esta forma observamos que la unión de ADN se impidió con un exceso razonable (20-100 veces de exceso molar) de sonda fría (competidor específico sin marcar), revelando así la afinidad de este LXRE por LXR/RXR. También se empleó una sonda mutada de CD38 en exceso que fue incapaz de competir con la sonda radiactiva.

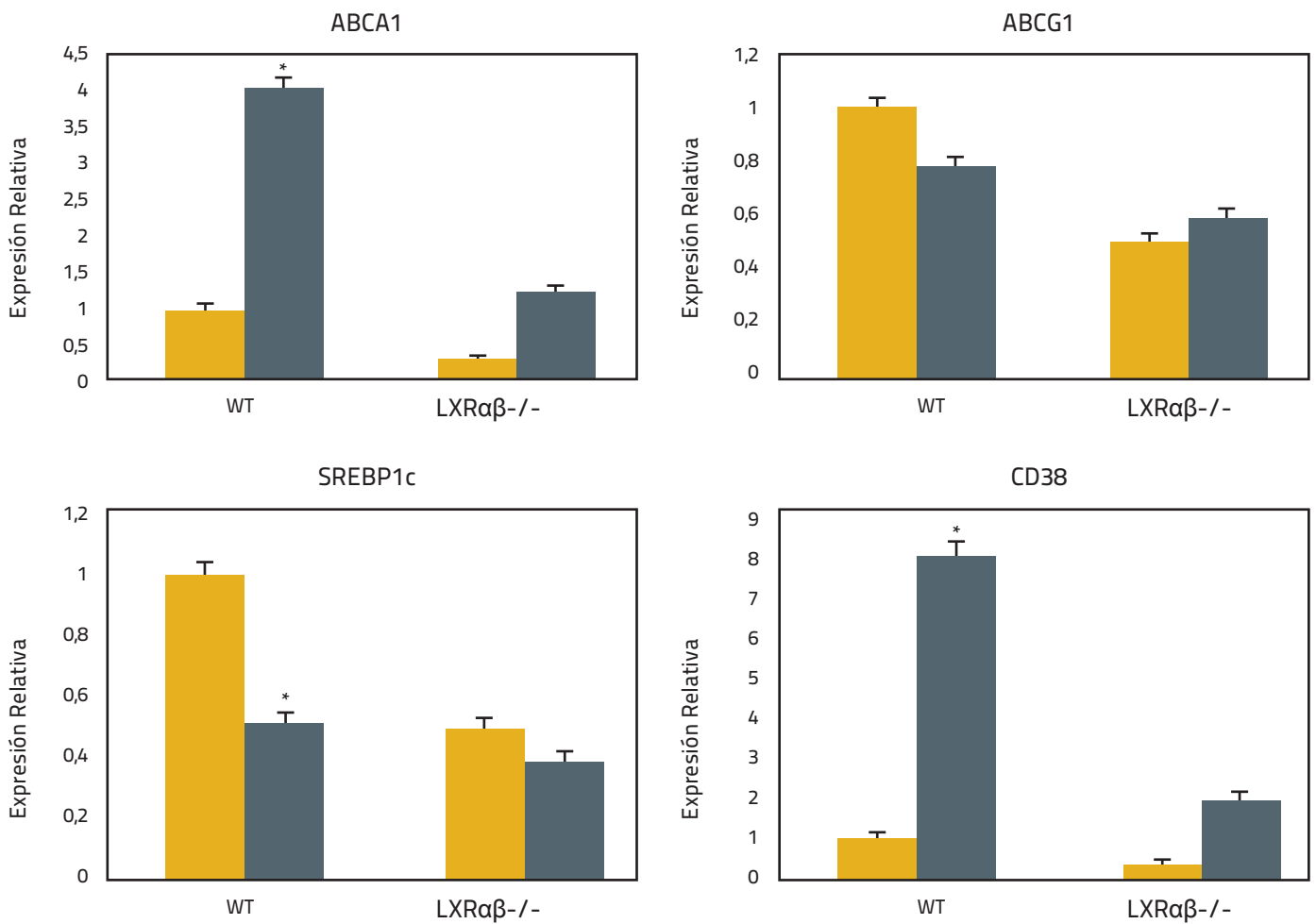
Discusión

Los receptores nucleares regulan la expresión de genes relacionados con una gran variedad de procesos fisiológicos, incluyendo el metabolismo, el desarrollo y las respuestas inmunitarias. Si bien, la importancia de LXR en los macrófagos se encuentra ampliamente descrita,

toenzima capaz de producir cADPR (*cyclic adenosine diphospho (ADP)-ribose*) a partir de NAD⁺ (*nicotinic acid adenine dinucleotide*). CD38 se expresa de forma variable en células del linaje linfóide y mielóide (Fernandez et al., 1998; Malavasi et al., 1992), y es sobreexpresado en respuesta a estímulos inflamatorios (Musso et al., 2001; Bauvois et al., 1999), por lo que, a través de la producción de metabolitos movilizantes del calcio, regula la respuesta inmune (Deaglio et al., 2002; Lund et al., 1998). Además de estar involucrado en la capacidad para generar la respuesta inflamatoria innata frente a infecciones (Partida-Sanchez et al., 2001; Partida-Sanchez et al., 2003), CD38 participa en la re-

Figura 8. Identificación de CD38 como un gen respuesta a LXR por perfil transcripcional

■ BMDC Inmaduras ■ BMDC Maduras

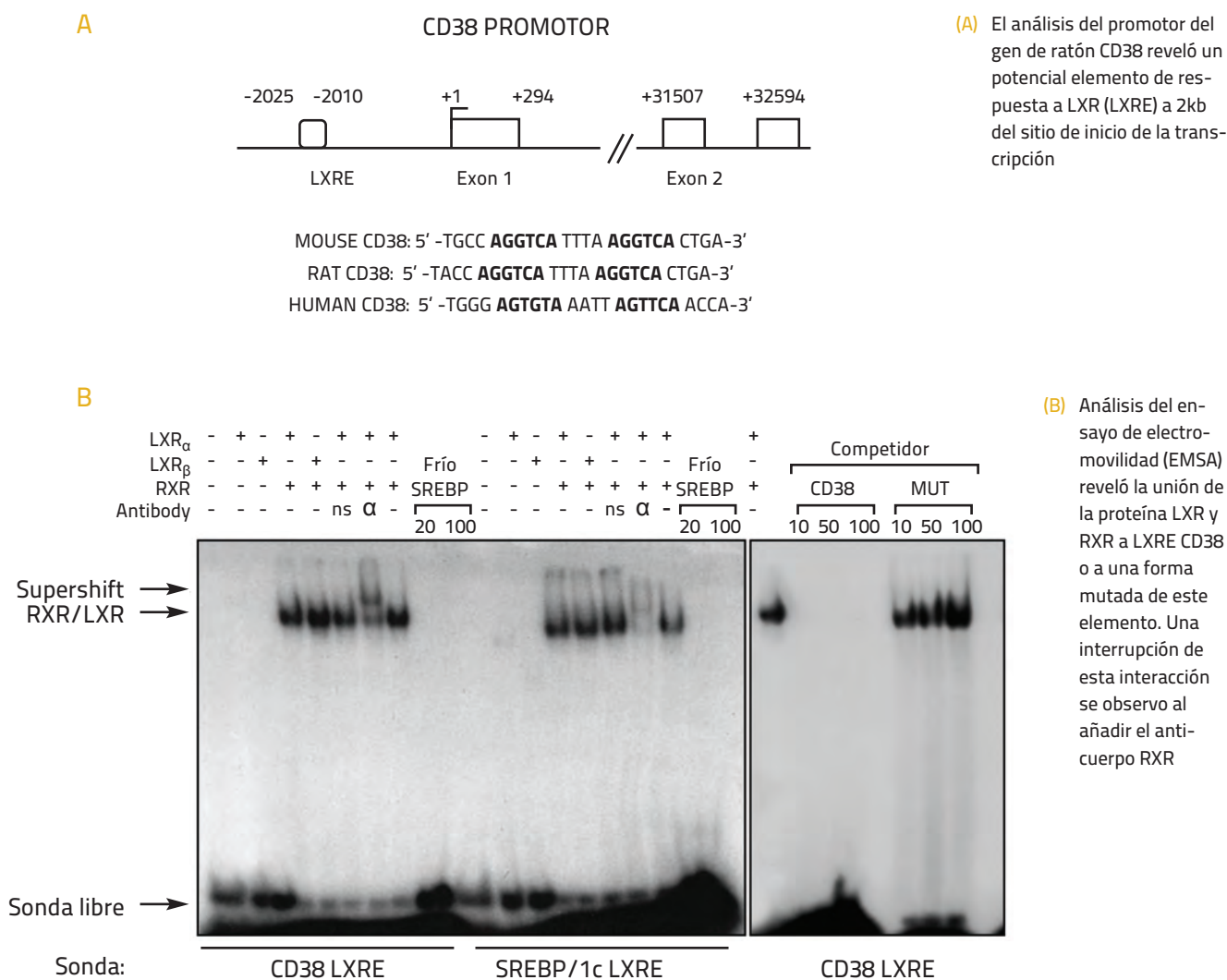


son pocos los estudios que existen analizando las interacciones entre los receptores LXR y otras células del sistema inmune, como linfocitos y DC (Bensinger et al., 2008a; Bensinger et al., 2008b; Feig et al., 2010; Geyeregger et al., 2007; Torocsik et al. 2010). En este trabajo analizamos el papel de los recep-

tores LXR en la biología de las DC. La capacidad de las DC para iniciar e organizar la respuesta inmune es consecuencia de su localización dentro de los tejidos y de su específica facultad para movilizarse. Mediante estudios de quimiotaxis en BMDC WT y LXRαβ-/- observamos que la respuesta quimiotác-

tica está disminuida en ausencia de LXR. Tras analizar la capacidad para migrar de la DC mediante ensayos de migración in vivo, observamos que las DC LXRαβ-/- presentan una significativa reducción de la capacidad para migrar hacia ganglios linfáticos, lo cual nos indica que los receptores nucleares LXR

Figura 9. Regulación directa de la expresión de CD38 por el heterodímero LXR/RXR



intervienen en modo alguno en la emisión de las señales necesarias para que dicha migración tenga lugar.

El análisis de microarrays de DNA reveló la regulación positiva del ectoenzima CD38 por parte de los receptores LXR, y una menor expresión del mismo en DC LXR $\alpha\beta$ -/- . Posteriormente confirmamos, mediante EMSA, que se trata de un nuevo gen diana de LXR. CD38 regula la res-

puesta al calcio en monocitos, neutrófilos y DC activadas, así como controla la migración de éstas desde el lugar de la inflamación hacia los tejidos linfoides secundarios mediante regulación de la señal de CCR7 (Partida-Sanchez et al., 2004; Partida-Sanchez et al., 2007). CD38 controla también la migración de los precursores de las DC desde la sangre hacia los sitios de inflamación a través de la señal de CCR2 y

CXCR4. El hallazgo de ciertas similitudes entre las DC CD38-/- y las DC LXR $\alpha\beta$ -/- pone de manifiesto una posible inter-relación entre CD38 y los receptores LXR. En este estudio describimos por primera vez que la ausencia de LXR disminuye significativamente la capacidad migratoria de las DC, efecto que probablemente es ejercido a través de la mediación de otros genes y señales.

Referencias bibliográficas

- Castrillo, A., and Tontonoz, P. (2004). Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 455-480.
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 277, 18793-18800.
- Tontonoz, P., and Mangelsdorf, D.J. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17, 985-993.
- Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9, 213-219.
- Alonso-Gonzalez N., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Diaz, M., Gallardo, G., *et al.* (2009). Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31, 245-258.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Pulendran, B. (2005). Variagation of the immune response with dendritic cells and pathogen recognition receptors. *J Immunol* 174, 2457-2465.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296.
- Hill, S., Edwards, A.J., Kimber, I., and Knight, S.C. (1990). Systemic migration of dendritic cells during contact sensitization. *Immunology* 71, 277-281.
- Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., and Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 507-512.
- Martín-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U.E., Ugucioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 198, 615-621.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223, 77-92.
- Fernandez, J.E., Deaglio, S., Donati, D., Beusan, I.S., Corno, F., Aranega, A., Forni, M., Falini, B., and Malavasi, F. (1998). Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues. *J Biol Regul Homeost Agents* 12(3):81-91
- Malavasi, F., Funaro, A., Alessio, M., DeMonte, L.B., Ausiello, C.M., Dianzani, U., Lanza, F., Magrini, E., Momo, M., and Roggero, S. (1992). CD38: a multi-lineage cell activation molecule with a split personality. *Int J Clin Lab Res* 22, 73-80.
- Musso, T., Deaglio, S., Franco, L., Calosso, L., Badolato, R., Garbarino, G., Dianzani, U., and Malavasi, F. (2001). CD38 expression and functional activities are up-regulated by IFN-gamma on human monocytes and monocytic cell lines. *J Leukoc Biol* 69, 605-612.
- Bauvois, B., Durant, L., Laboureau, J., Barthelemy, E., Rouillard, D., Boulla, G., and Deterre, P. (1999). Upregulation of CD38 gene expression in leukemic B cells by interferon types I and II. *J Interferon Cytokine Res* 19, 1059-1066.
- Deaglio, S., Zubiatur, M., Gregorini, A., Bottarel, F., Ausiello, C.M., Dianzani, U., Sancho, J., and Malavasi, F. (2002). Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood* 99, 2490-2498.
- Lund, F.E., Cockayne, D.A., Randall, T.D., Solvason, N., Schuber, F., and Howard, M.C. (1998). CD38: a new paradigm in lymphocyte activation and signal transduction. *Immunol Rev* 161, 79-93.
- Partida-Sanchez, S., Goodrich, S., Kusser, K., Oppenheimer, N., Randall, T.D., and Lund, F.E. (2004). Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity. *Immunity* 20, 279-291.
- Partida-Sanchez, S., Randall, T.D., and Lund, F.E. (2003). Innate immunity is regulated by CD38, an ecto-enzyme with ADP-ribosyl cyclase activity. *Microbes Infect* 5, 49-58.

- Partida-Sanchez, S., Rivero-Nava, L., Shi, G., and Lund, F.E. (2007) *Am J Pathol* 164, 263-271). CD38: an ectoenzyme at the crossroads of innate and adaptive immune responses. *Adv Exp Med Biol* 590, 171-183.
- Le Naour, F., Hohenkirk, L., Grolleau, A., Misek, D.E., Les-cure, P., Geiger, J.D., Hanash, S., and Beretta, L. (2001). Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 276, 17920- 17931.
- Geyeregger, R., Zeyda, M., Bauer, W., Kriehuber, E., Sae-mann, M.D., Zlabinger, G.J., Maurer, D., and Stulnig, T.M. (2007). Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* 109, 4288-4295.
- Torocsik, D., Barath, M., Benko, S., Szeles, L., Dezso, B., Poliska, S., Hegyi, Z., Homolya, L., Szatmari, I., Lanyi, A., and Nagy, L. Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. *J Immunol* 184, 5456-5465.
- Bensinger, S.J., Bradley, M.N., Joseph, S.B., Zelcer, N., Janssen, E.M., Hausner, M.A., Shih, R., Parks, J.S., Edwards, P.A., Jamieson, B.D., and Tontonoz, P. (2008a). LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 134, 97-111.
- S.J. Bensinger, P. Tontonoz, Integration of metabolism and inflammation by lipid- 994 activated nuclear receptors, *Nature* 454 (2008b) 470-477.
- J.E. Feig, I. Pineda-Torra, M. Sanson, M.N. Bradley, Y. Vengrenyuk, D. Bogunovic, E. 1495 L. Gautier, D. Rubinstein, C. Hong, J. Liu, C. Wu, N. van Rooijen, N. Bhardwaj, M.J. 1496 Garabedian, P. Tontonoz, E.A. Fisher, LXR promotes the maximal egress of 1497 monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. *J Clin Invest*. 2010.

Reseña curricular

Susana Beceiro Casas es Licenciada en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) en 2005, ha disfrutado de una beca predoctoral del programa de Formación de Personal de Investigador (FPI-MICINN) y en la actualidad disfruta de un contrato ACIISI-ICIC, y ha disfrutado de una beca predoctoral del programa de Formación de Personal de Investigador (FPI-MICINN).

Ha participado en varios congresos de ámbito nacional e internacional y recientemente, junto al grupo de investigación al que pertenece, ha publicado un artículo de investigación en una revista científica internacional de alto impacto.

Actualmente realiza su tesis doctoral en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Salud (ULPGC), tras haber obtenido la suficiencia investigadora.

Equipo de Investigación en Inmunología
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Facultad de Ciencias de la Salud, Campus de San Cristóbal, 35016. Las Palmas de Gran Canaria, España
Teléfono: 34 928459681
E-mail: sbeceiro@gmail.com

Antonio Castrillo Viguera es doctor en Bioquímica por la Universidad Complutense de Madrid (2000). Tras varios años de estancia de investigación en la Universidad de California Los Angeles, se estableció como investigador Ramón y Cajal en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, donde inició y dirige el laboratorio de Señalización Inmunológica en el departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología. Actualmente ostenta el cargo de científico titular del CSIC desde 2008. A lo largo de su carrera ha publicado numerosos artículos de investigación en revistas internacionales de prestigio y ha recibido diversos premios de investigación dirigidos a jóvenes investigadores. Su línea de investigación está orientada al estudio de la regulación génica por los receptores LXR en diversos aspectos del sistema inmune.

Universidad de Las Palmas de GC, Facultad de Ciencias de la Salud,
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular
Plaza Dr. Pasteur s/n. Campus de San Cristóbal, 35016.
Las Palmas de Gran Canaria
Teléfono: 928 45 34 04
E-mail: acastrillo@iib.uam.es
acastrillo@ramonycajal.ulpgc.es