

Papel de los Receptores LXR en la Diferenciación y Especialización de Macrófagos



TESIS DOCTORAL
José A. Guillén Salgado
2015



Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



CSIC

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL,
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS

PROGRAMA DE DOCTORADO:
CLÍNICA E INVESTIGACIÓN TERAPÉUTICA



Memoria para Obtener el Grado de DOCTOR:

***"PAPEL DE LOS RECEPTORES LXR EN LA DIFERENCIACIÓN Y
ESPECIALIZACIÓN DE MACRÓFAGOS"***

presentada por:

José Ángel Guillén Salgado
Lic. Bioquímica

José A. Guillén Salgado

Fdo. Doctorando

Dr. Antonio Castrillo Viguera

Fdo. Director

Dr. Félix I. López Blanco

Fdo. Codirector

Dr. Germán Gallardo Campos

Fdo. Codirector

Las Palmas de Gran Canaria, a 15 de Abril de 2015



**UNIDAD DE BIOMEDICINA
CSIC-ULPGC**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA,
BIOLOGÍA MOLECULAR,
FISIOLOGÍA, GENÉTICA E
INMUNOLOGÍA**

El Trabajo experimental de la presente memoria fue desarrollado por D. José A. Guillén Salgado en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología de la Facultad de Medicina en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) y en la Unidad Asociada de Biomedicina del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Agencia Estatal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Este Trabajo en su conjunto ha sido desarrollado gracias a las ayudas siguientes: Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) BOE 2008 Julio-13026, Proyecto INNOVA 2010 de la Fundación Universitaria de Las Palmas (FULP), un contrato asociado al proyecto S2010/BMD-2350 RAPHYME-CAM, y la ayuda de proyectos nacionales financiados por el MICINN y MINECO SAF2008-00057 y SAF2011-29244.

A los que me quieren

Además de enseñar, enseña a dudar de lo que has enseñado
José Ortega y Gasset

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar quiero agradecer a Antonio el haber apostado por mí, su calidad humana y su cercanía. A nivel científico he aprendido mil técnicas: "tu primera chispas" y a madurar e independizarme (aunque no es fácil). Gracias por todo.

A Félix y Germán como codirectores les debo su ayuda desinteresada que trasciende más allá de lo puramente académico. Sin el visto bueno del Dr. CM Ruiz de Galarreta ésta Tesis no hubiera sido posible.

En Granada me inicié en el laboratorio de la Dra. Sabine Hilfiker, quien puso los cimientos. En Toronto, el Dr. Alan Lazarus siempre estuvo dispuesto a escucharme con una sonrisa. El Dr. Félix López y el Dr. Enrique Castro me introdujeron en labores docentes.

A mis compañeros de laboratorio actuales (Merci, Vladi, Ana y Moisés) y pasados (Irene, Su, Noe, Jose D, Cris, Elena, Ele, Berta, Borja, Jesús, Tere, Hugo, David), muchas gracias no solo por la ayuda sino por compartir un poco de vuestros conocimientos conmigo.

Al resto de habitantes y exhabitantes del CULP, principalmente Bioquímica, Genética, Físio & Co (Yeray, Patri, Nico, Carlos, Dácil, Sara, Mirecki, Ruymán, Dioni, Robe, Julia...) gracias por reactivos, protocolos, consejos, cafés y asaderos.

A los damnificados por mi mala memoria. A los damnificados por la buena.

De mi época de estudiante quiero recordar a mis amigos de Biología con los que compartí mis primeros años de vida independiente, en especial a Diego y Helena. Con mis amigos de Bioquímica llegamos a Cuba. Por fin llego mi Tesis: Jesús y Sara!!

Con mis amigos de siempre aprendí a andar (y a caerme), a jugar al fútbol, a balonmano, a montar un grupo de música, a salir, a estudiar y sobre todo a reírme. Sin ustedes el mundo no tendría ese brillo.

Lidia siempre ha estado en los buenos, pero sobre todo en los malos momentos, animándome a seguir. Todo agradecimiento y cariño se quedan cortos.

A mis hermanos y tías, por mantenernos unidos a pesar de las adversidades. A mis padres gratitud eterna. Mi madre me inculcó el hábito de la lectura comprándome libros que me pudieran gustar. Mi padre me enseñó honradez, humildad y esfuerzo. Así como a ser aficionado de la UD. Ojalá hubieran podido disfrutar de su tiempo de jubilación como se merecen. Ojalá hubieran podido disfrutar juntos de esta Tesis. Gracias.

TABLA DE CONTENIDOS.

Agradecimientos

Tabla de Contenidos

Lista de Figuras

Lista de Tablas

Abreviaturas

1 INTRODUCCIÓN.	1
1.1 El Sistema Inmunitario.	3
1.2 Células del Sistema Inmunitario.	4
1.3 Células Presentadoras de Antígeno.	4
1.4 Monocitos, Células Dendríticas y Macrófagos.	4
1.4.1 Monocitos.	7
1.4.2 Células Dendríticas.	9
1.4.3 Macrófagos.	12
1.4.3.a Regulación de la polarización del macrófago por citoquinas.	14
1.4.3.b Señalización por GM-CSF.	17
1.4.4 Receptores de Lectina tipo C.	18
1.4.5 El Receptor CD209a.	18
1.4.5.a CD209a como marcador celular.	22
1.4.5.b Control transcripcional de DC-SIGN/CD209a.	22
1.5 Órganos Linfoides.	23
1.6 El Bazo.	23
1.6.1 Pulpa Blanca.	25
1.6.2 Pulpa Roja.	25
1.6.3 Zona Marginal.	25
1.7 Factores de Transcripción.	28

1.8 LXR.	31
1.8.1 Mecanismo de Acción.	33
1.8.2 Metabolismo Lipídico.	34
1.8.3 Inflamación.	35
1.8.4 Retirada de Células Apoptóticas.	35
1.8.5 Isoformas de LXR.	36
1.8.6 Acciones Específicas de Isoforma.	36
2 OBJETIVOS.	41
3 MATERIAL Y MÉTODOS.	45
3.1 Animales de Experimentación.	47
3.1.1 Ratones Knockout.	47
3.1.2 Ratones Cre/LoxP.	47
3.2 Trasplantes de Médula Ósea.	49
3.3 Cultivo de Líneas Celulares.	53
3.3.1 Cultivos Primarios.	53
3.3.1.a Obtención de macrófagos murinos BMDM.	53
3.3.1.b Obtención de macrófagos humanos MDM.	53
3.3.1.c Obtención de macrófagos peritoneales murinos.	53
3.3.2 Líneas Celulares.	54
3.3.2.a Cultivo de células RAW-LXR α -3FLAG.	54
3.4 Tratamientos <i>in vitro</i>.	54
3.4.1 Captación de azúcares de células BMDM.	54
3.4.2 Tratamientos Farmacológicos e Inhibidores.	54
3.5 Tratamientos <i>in vivo</i>.	55
3.5.1 Plaquetas opsonizadas.	55
3.5.2 Clodronato.	55
3.6 Lentivirus.	56
3.6.1 Promotor.	56
3.6.2 Vectores Lentivirales.	56
3.6.3 Obtención de los Plásmidos.	58
3.6.4 Transfección.	58

3.6.5 Transducción de células de la médula ósea y trasplante.	58
3.7 Análisis de la Expresión de ARN mensajero.	59
3.7.1 Extracción de ARN mensajero.	59
3.7.2 Estudio de perfil transcripcional mediante Microarray.	59
3.7.3 Análisis de ARN mensajero por RT-PCR.	60
3.7.4 Análisis de la inhibición de la expresión génica mediante siRNA.	61
3.8 Análisis de la Expresión de Proteínas.	62
3.8.1 Preparación de extractos proteicos.	62
3.8.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot.	62
3.8.3 Citometría de Flujo.	62
3.9 Análisis "Chip-Seq".	64
3.9.1 Origen de los Chip-Seqs.	64
3.9.2 Análisis de los Chip-Seqs.	65
3.9.3 Búsqueda de secuencias de unión consenso.	65
3.10 Histología.	66
3.10.1 Obtención y conservación de la muestra.	66
3.10.2 Obtención de criosecciones.	66
3.10.3 Tinciones.	66
3.10.3.a Inmunofluorescencia.	66
3.10.3.b Inmunohistoquímica.	67
3.11 Análisis Estadístico.	67
4 RESULTADOS	69
4.1 Estudio de las poblaciones de Macrófagos del bazo.	71
4.2 Estudio de las señales de formación de la Zona Marginal del bazo.	71
4.3 Experimentos de rescate de fenotipo de la Zona Marginal.	73
4.4 Modelo de depleción de las poblaciones de Macrófagos por clodronato.	75
4.5 Generación de una cepa de ratones carentes de LXRα en las	

células hematopoyéticas ($LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-}$).	78
4.6 Estudio de la Zona Marginal en ratones carentes de $LXR\alpha$ en células hematopoyéticas ($LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-}$).	82
4.7 Reconstitución de la actividad de $LXR\alpha$ en progenitores hematopoyéticos mediante Lentivirus.	87
4.8 Estudio de la fagocitosis de plaquetas opsonizadas en la Zona Marginal.	87
4.9 Estudio transcripcional en Macrófagos en respuesta a M-CSF ó GM-CSF.	91
4.9.1 Expresión génica en respuesta a M-CSF.	92
4.9.2 Expresión génica en respuesta a GM-CSF.	96
4.10 La expresión de CD209a es inducida, principalmente, por GM-CSF en ratones y por IL-4 en humanos.	100
4.11 La expresión de CD209a es dependiente de $LXR\alpha$ en células BMDM.	100
4.12 La vida media de $LXR\alpha$ es menor que la de $LXR\beta$.	101
4.13 La expresión de CD209a requiere de la expresión de $LXR\alpha$, pero es independiente de activación farmacológica.	104
4.14 El Lipopolisacarido (LPS) inhibe la expresión de CD209a <i>in vitro</i> .	104
4.15 La captación de Manosa y Fucosa no presenta diferencias significativas entre células WT y $LXR\alpha^{-/-}$.	106
4.16 Estudio de la vía de señalización de GM-CSF.	108
4.17 Factores de Transcripción que intervienen en la regulación de la expresión de CD209a.	111
4.18 Los Factores de Transcripción STAT5, PU.1, C/EBP α y $LXR\alpha$ intervienen en la regulación de CD209a.	115
5 DISCUSIÓN	119
6 CONCLUSIONES	133
REFERENCIAS	137

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1.1. Origen ontogénico propuesto para los macrófagos.

Figura 1.2. Monocitos sanguíneos murinos.

Figura 1.3. Esquema de los principales tipos de Células Dendríticas.

Figura 1.4. Modelo actual de la acción de las citoquinas GM-CSF y M-CSF sobre el número y fenotipo de macrófagos y células dendríticas.

Figura 1.5. Representación esquemática del receptor de GM-CSF (GMR) humano y sus módulos de señalización.

Figura 1.6. Localización genómica y estructura proteica de CD209.

Figura 1.7. Ultraestructura del bazo murino.

Figura 1.8. Modelo por el que los factores de transcripción determinantes de linaje modifican la cromatina y permiten la unión de factores de transcripción dependientes de señal.

Figura 1.9. Esquema de la organización en dominios de un receptor nuclear y mecanismos de acción de heterodímeros RXR.

Figura 1.10. Representación esquemática de la estructura de LXR y la similitud entre las isoformas LXR α y LXR β .

Figura 3.1. La recombinasa Cre induce la escisión de la región flanqueada con sitios LoxP.

Figura 3.2. Estrategia de cruce para la obtención de ratones LXR $\alpha^{fl/fl}$ iCre $^{+/-}$.

Figura 3.3. Representación esquemática del promotor sintético macrófago-específico SP-146 y de los plásmidos lentivirales.

Figura 4.1. Las poblaciones de macrófagos de la zona marginal del bazo dependen de LXR α para su desarrollo.

Figura 4.2. La expresión de citoquinas implicadas en la formación del bazo y la zona marginal no presenta diferencias entre WT y DKO.

Figura 4.3. Trasplantes con médula ósea de ratones que expresan LXR α permiten recuperar las poblaciones de macrófagos de la zona marginal del bazo.

Figura 4.4. La activación farmacológica de LXR α acelera la cinética de repoblación de las poblaciones de macrófagos del bazo.

Figura 4.5. Genotipado para la obtención de las cepas de ratones LXR α -Flox y Vav-iCre.

Figura 4.6. Genotipado de los descendientes del cruce de ratones LXR α -Flox y Vav-iCre.

Figura 4.7. Análisis de la expresión de LXR α a nivel de ARNm en varios tejidos.

Figura 4.8. Análisis de la expresión de LXR α a nivel de proteína en varios tejidos.

Figura 4.9. La escisión de LXR α en células hematopoyéticas determina la ausencia de macrófagos de zona marginal del bazo.

Figura 4.10. La formación de la zona marginal demuestra haplosuficiencia (I).

Figura 4.11. La formación de la zona marginal demuestra haplosuficiencia (II).

Figura 4.12. Ratones LXR α ^{-/-} trasplantados con HSCs transfectadas con Lenti-SP-GFP muestran, 8 semanas después, en torno al 40% de monocitos en sangre GFP positivos.

Figura 4.13. Recuperación parcial de las poblaciones de MMM (CD169⁺) y MZM (MARCO⁺/Tim-4⁺) en ratones trasplantados con HSCs tratadas con lenti-SP-LXR α .

Figura 4.14. Captura de plaquetas opsonizadas en la Zona Marginal.

Figura 4.15. Diagrama de Venn y Mapa de Calor de los genes upregulados por M-CSF en células BMDM WT y LXR α ^{-/-}.

Figura 4.16. Diagrama de Venn y Mapa de Calor de los genes reprimidos por M-CSF en células BMDM WT y LXR α ^{-/-}.

Figura 4.17. Diagrama de Venn y Mapa de Calor de los genes inducidos por GM-CSF en células BMDM WT y LXR α ^{-/-}.

Figura 4.18. Diagrama de Venn y Mapa de Calor de los genes reprimidos por GM-CSF en células BMDM WT y LXR α ^{-/-}.

Figura 4.19. La expresión de CD209a en células BMDM depende de GM-CSF y LXR α .

Figura 4.20. LXR α es sensible a CHX, lo que afecta a la expresión de CD209a.

Figura 4.21. La expresión de CD209a en respuesta a GM-CSF se ve afectada por un inhibidor farmacológico de LXR (GW233) y por LPS, pero no por un agonista específico de LXR (GW3965).

Figura 4.22. La captación de Manosa y Fucosa no muestra diferencias en células derivadas de la médula ósea WT y LXR α ^{-/-}.

Figura 4.23. Efecto de la inhibición de los principales intermediarios de la señalización de GM-CSF sobre la expresión de CD209a.

Figura 4.24. La expresión de CD209a requiere de la fosforilación de Jak2/STAT5.

Figura 4.25. Estudio de la unión de factores de transcripción al gen de CD209a (I).

Figura 4.26. Estudio de la unión de factores de transcripción al gen de CD209a (II).

Figura 4.27. El silenciamiento de LXR α , PU.1 C/EBP α y STAT5 mediante siRNA inhibe la expresión de CD209a inducida por GM-CSF.

LISTA DE TABLAS.

TABLA 1.1. Principales poblaciones de macrófagos.

TABLA 3.1. Cebadores.

TABLA 3.2. Anticuerpos.

TABLA 4.1. El análisis ontogénico revela que el tratamiento con M-CSF induce la expresión, principalmente, de genes de la división celular.

TABLA 4.2. El análisis ontogénico revela que el tratamiento con GM-CSF induce la expresión, principalmente, de genes de la respuesta inflamatoria y la quimiotaxis.

ABREVIATURAS.

ABC Familia de Transportadores de Membrana de unión a ATP tipo "Cassette".
AF Dominio de Función Activadora.
AP Proteína Activadora.
Api6 Inhibidor de la Apoptosis en Macrófagos.
Apo Apolipoproteína.
ADN Ácido Desoxirribonucleico.
ADNc Ácido Desoxirribonucleico Complementario.
APC Células Presentadoras de Antígenos.
ARN Ácido Ribonucleico.
ARNm Ácido Ribonucleico Mensajero.
BMDC Células Dendríticas Derivadas de Médula Ósea.
BMM Macrófagos Derivados de Médula Ósea.
BSA Albúmina de Suero Bovino.
CCL Ligando de Quimioquinas C-C.
CD Cluster of Differentiation.
cDC Células Dendríticas Convencionales.
CDP Precursor Común de Células Dendríticas.
CETP Proteína Transportadora de Ésteres de Colesterol.
ChIP Inmunoprecipitación de Cromatina.
ChIP-Seq Secuenciación de la Inmunoprecipitación de la Cromatina.
CLP Progenitor Linfoide Común.
CLRs Receptores de Lectina tipo C.
CMP Progenitor Mieloide Común.
COX Ciclooxygenasa.
CRD Dominio de Reconocimiento de Carbohidratos.
CSF1 Factor Estimulador de Colonias 1 (sinónimo de M-CSF).
CSF1R Receptor del Factor Estimulador de Colonias 1.
CX3CR1 Receptor 1 de Quimioquina CX3.
Cyp7a1 Citocromo P450, familia 7, subfamilia A, polipéptido 1.
DAMP Patrones Moleculares Asociados a Daño.
DAPI 4,6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato.
DBD Dominio de unión a ADN.
DC Célula Dendrítica.
DEPC Dietil Pirocarbonato.
DKO Double Knock-Out.
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
DMSO Dimetilsulfóxido.
DR Repetición Directa.
ECL Enhanced Chemiluminescence.
EDTA Etilendiamino Tetra-Acetato Sódico.
ERK Extracellular signal-Regulated Kinase.
FAS Sintasa de Ácidos Grasos.
FBS Suero Fetal Bovino.
FC Citometría de Flujo.

FITC Isotiocianato de Fluoresceína.
FSC Tamaño (forward scatter).
GFP Proteína Verde Fluorescente.
GM-CSF Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos.
GO Ontología Génica.
HDAC Deacetilasa de Histona.
HDL Lipoproteínas de Alta Densidad.
HRE Elemento de Respuesta Hormonal.
HSC Células Madre Hematopoyéticas.
ICQ Inmunocitoquímica.
IF Inmunofluorescencia.
IL Interleuquina.
iNOS Sintasa de Óxido Nítrico Inducible.
IRF Factor Regulador del Interferón.
IVIG Inmunoglobulina Intravenosa.
JNK c-Jun N-terminal Kinase.
KO Knock-Out.
LBD Dominio de unión a ligando.
LC Células de Langerhans.
LDTF Factores de Transcripción determinantes de Linaje.
LDL Lipoproteínas de baja densidad.
LFA-1 Antígeno asociado a la función de Linfocitos 1.
LP Lámina Propia.
LPL Lipoproteína Lipasa.
LPS Lipopolisacárido Bacteriano.
LXR Receptores X Hepáticos.
LXRE Elemento de Respuesta a LXR.
MAPK Proteína Kinasa Activada por Mitógenos.
M-CSF Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos.
MCP Proteína Quimioatrayente de Monocitos.
MDP Progenitor de Macrófagos y Células Dendríticas.
MDSC Células Supresoras de origen Mieloide.
MHC Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
MMM Macrófagos Metalofílicos de la Zona Marginal.
MMP Metalopeptidasa de Matriz.
NAD Nicotinamida Adenina Dinucleótido.
MZ Zona Marginal del Bazo.
MZM Macrófagos de la Zona Marginal.
N-CoR Proteína co-represora de Receptores Nucleares.
NF- κ B Factor Nuclear kappa de Células B.
NK Natural Killer.
o/n Toda la noche.
PAMP Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.
PBS Tampón Fosfato Salino.
PI3K Fosfatidilinositol 3 kinasa.
PLTP Proteína Transportadora de Fosfolípidos.
ROS Especies de Oxígeno Reactivo.
PPAR Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales.
PRR Receptor de Reconocimiento de Patrones.
RPMI Medio de cultivo celular desarrollado en Roswell Park Memorial Institute.
RT Room Temperature - temperatura ambiente (~20°C).
RT-qPCR Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa a Tiempo Real.
RXR Receptores X de Retinoico.

SDS Dodecilsulfato Sódico.
SDTF Factor de Transcripción dependiente de Señal.
SIGN Specific ICAM-3-grabbing non-integrin.
SMRT Proteína Silenciadora de Receptores de Retinoico y Hormona Tiroidea.
SREBP-1c Proteína de unión a Elementos de Respuesta a Esteroles 1c.
SSC Complejidad (side scatter).
STAT Signal Transducer and Activator of Transcription.
TAE Tris-Acetato EDTA.
TBM Tingible Body Macrophages.
Th Linfocitos T colaboradores.
Tip-DC TNF- α and iNOS-producing dendritic cells.
TGF β Factor de Crecimiento Transformante Beta.
TLR Receptor tipo Toll.
TNF Factor de Necrosis Tumoral.
VLDL Lipoproteínas de Muy Baja Densidad.
WB Western-Blot.
WT Wild Type - Estirpe Salvaje.

1.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 El Sistema Inmunitario.

La principal función del sistema inmunitario es proteger al organismo de agentes patógenos. Para ello, debe ser capaz de distinguir entre lo propio y lo extraño (Jiang and Chess, 2009; Medzhitov and Janeway, 2002), de manera que desencadene una respuesta frente a lo potencialmente dañino pero respetando a las células y estructuras propias. Los vertebrados presentan un sistema inmunitario en el que se distingue un componente innato y un componente adaptativo (Medzhitov and Janeway, 1998).

La respuesta inmunitaria innata representa la primera línea de defensa del organismo y su principal característica es la rapidez de acción. Está compuesta por células (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células NK), citoquinas y el sistema del complemento. El reconocimiento de lo extraño ocurre gracias a los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, *Pattern Recognition Receptors*) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y señales endógenas asociadas a daño tisular (DAMP, *Damage-Associated Molecular Patterns*) (Bardoel and Strijp, 2011). Respuestas inespecíficas como la inflamación, también se engloban dentro de la inmunidad innata.

La respuesta inmunitaria adaptativa, por contra, es una respuesta específica de antígeno cuya acción es, en principio, más lenta pero sostenida en el tiempo. Su principal ventaja es que, una vez se ha adquirido inmunidad frente a un determinado antígeno, genera una respuesta específica de manera rápida y robusta, lo que se denomina memoria inmunológica. Está compuesta por dos elementos: uno celular (linfocitos B y T) y otro humoral (anticuerpos). El sistema innato juega un papel principal en estimular y guiar (polarizar) la respuesta adaptativa, mayoritariamente a través de las células presentadoras de antígeno que procesan y presentan los antígenos a los linfocitos T, los cuales a su vez activan a los linfocitos B (Bonilla and Oettgen, 2010). Menos conocida, pero igual de interesante, es la capacidad del complemento de regular la respuesta humoral (Carroll and Iseman, 2012).

1.2 Células del Sistema Inmunitario.

Todas las células del sistema inmunitario provienen de células madre hematopoyéticas (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*). Durante las primeras semanas embrionarias, la hematopoyesis tiene lugar en el saco vitelino. Más adelante, ocurre en el hígado y bazo del feto. Finalmente, antes del nacimiento, adquiere prominencia la función hematopoyética de la médula ósea, que será el principal y único órgano hematopoyético en humanos, mientras que en ratones el bazo aún conserva capacidad hematopoyética en adultos (Morita et al., 2011).

Las HSC tienen capacidad de renovarse y dar lugar a células más especializadas y maduras denominadas células progenitoras mieloides (CMP, *Common Myeloid Progenitor*) y linfoides (CLP, *Common Lymphoid Progenitor*). Las CMP darán lugar a granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos mientras que las CLP darán lugar a linfocitos B, linfocitos T y células NK (Iwasaki and Akashi, 2007).

1.3 Células Presentadoras de Antígeno.

Las células presentadoras de antígeno (APC, *Antigen Presenting Cells*), constituyen un tipo funcional de células instrumentales en la inducción de la respuesta T, ya que se encargan de adquirir el antígeno, procesarlo y presentarlo a través del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC, *Major Histocompatibility Complex*). Existen dos tipos de APCs: profesionales y no profesionales. Las no profesionales, entre las que se incluyen por ejemplo células endoteliales y fibroblastos, sólo expresan MHC tipo II en determinadas condiciones, como por ejemplo en respuesta a Interferón- γ . Las profesionales presentan, además de MHC tipo II, señales co-estimulatorias, por lo que son muy eficientes en la activación de la célula T. Incluyen a las células dendríticas y los macrófagos (Woan et al., 2012).

1.4 Monocitos, Células Dendríticas y Macrófagos.

Los macrófagos y células dendríticas (DCs, *Dendritic Cells*) son células fagocíticas esenciales en la inmunidad innata que se encuentran repartidas a lo largo de todo el cuerpo. A modo de centinelas, los macrófagos se encargan de asegurar la integridad tisular, retirando componentes propios alterados, sustancias exógenas y patógenos. Son iniciadores y reguladores de la inflamación y, en general, de la respuesta inmunitaria preprogramada. Las células dendríticas, por otro lado, tienen una gran capacidad de presentar antígenos, siendo el único tipo celular capaz de activar eficientemente linfocitos T *naive* (Jung et al., 2002; Zammit et al., 2005). Por tanto, juegan un papel principal en el inicio y control de la respuesta patógeno-específica del sistema inmunitario. Tanto los macrófagos como las células dendríticas presentan múltiples subpoblaciones que se han definido según su localización anatómica y la expresión de marcadores moleculares, aunque los límites exactos entre ambos tipos celulares son aún objeto de estudio (Satpathy et al., 2012).

Los monocitos se han considerado, de manera clásica, eslabones intermedios entre células HSC y otras células maduras, que se originan en la médula ósea y que tras desplazarse por la sangre dan lugar a macrófagos tisulares (van Furth and Cohn, 1968) y a células dendríticas (Randolph et al., 1999; Sallusto and Lanzavecchia, 1994), probablemente pasando por un estadio intermedio denominado progenitor de macrófagos y células dendríticas (MDP, *Macrophage and Dendritic cell Progenitor*) (Fogg et al., 2006).

Sin embargo, recientemente, estudios genéticos y de mapeo de destino celular sugieren que, en realidad, la mayoría de poblaciones de macrófagos y monocitos representan líneas fagocíticas diferentes (Hashimoto et al., 2013; Schulz et al., 2012; Yona et al., 2013). Mientras que los monocitos circulantes derivan de HSC y progenitores intermediarios que ocupan nichos especializados en la médula ósea (Mercier et al., 2012), muchas de las poblaciones de macrófagos tisulares residentes, incluyendo las del pulmón, hígado, cerebro, peritoneo, médula ósea y algunas específicas del bazo se establecen antes del nacimiento a partir del saco vitelino (Schulz et al., 2012) o precursores de hígado fetal (Guilliams et al., 2013). Estos macrófagos son independientes del factor de transcripción c-Myb y, por tanto, aparecen en el desarrollo embrionario de ratones c-Myb^{-/-} que carecen de HSC y, por tanto, de monocitos. Fenotípicamente, las poblaciones de macrófagos que proceden del saco vitelino se distinguen por ser F4/80^{high}, mientras que las poblaciones que proceden de HSCs son F4/80^{low} (Schulz et al., 2012).

Para estudiar si los macrófagos F4/80^{high} procedentes del saco vitelino se mantienen durante la edad adulta o se renuevan a partir de HSCs, el grupo de Geissmann eliminó las HSCs mediante la delección condicional de c-Myb en adultos y trasplantó médula ósea c-Myb^{+/-} para establecer una quimera. Tras 3 meses, todos los monocitos F4/80^{low} CD11b^{high} procedían de la médula ósea donante, mientras que los macrófagos F4/80^{high} en el hígado (células de Kupffer), piel (células de Langerhans) y cerebro (microglía), y también subtipos del pulmón, riñón, páncreas y bazo, eran del receptor (Schulz et al., 2012). Éste, y otros experimentos, apoyan la idea de que existen dos linajes de macrófagos en el ratón: uno que procede del saco vitelino y da lugar a los macrófagos F4/80^{high} que se suelen asociar con estructuras epiteliales y otro que procede de la médula ósea y da lugar a macrófagos F4/80^{low} CD11b^{high} y células dendríticas. Por ello, el grupo de Geissmann propone restringir el uso del término "macrófago" a aquellas poblaciones de macrófagos residentes con desarrollo c-Myb independiente (macrófagos F4/80^{high}), y usar el término de "células mieloides" a los macrófagos c-Myb dependientes (F4/80^{low} CD11b^{high}). En esta Tesis doctoral, sin embargo, no adoptaremos aún esta nomenclatura y usaremos el término macrófago en su acepción clásica más amplia.

Esta nueva hipótesis debe aún resolver, sin embargo, cómo se mantienen y renuevan (si lo hacen) estas poblaciones de macrófagos independientes de la médula ósea. Es de destacar que durante mucho tiempo se ha considerado a los macrófagos como células sin capacidad de dividirse, que se renovaban a partir de los monocitos circulantes (van Furth and Cohn, 1968). Teniendo en cuenta que los macrófagos tisulares tienen un origen independiente del monocito (Schulz et al., 2012), es necesario conocer cómo es el mantenimiento y renovación de estas poblaciones a lo largo de la vida del individuo.

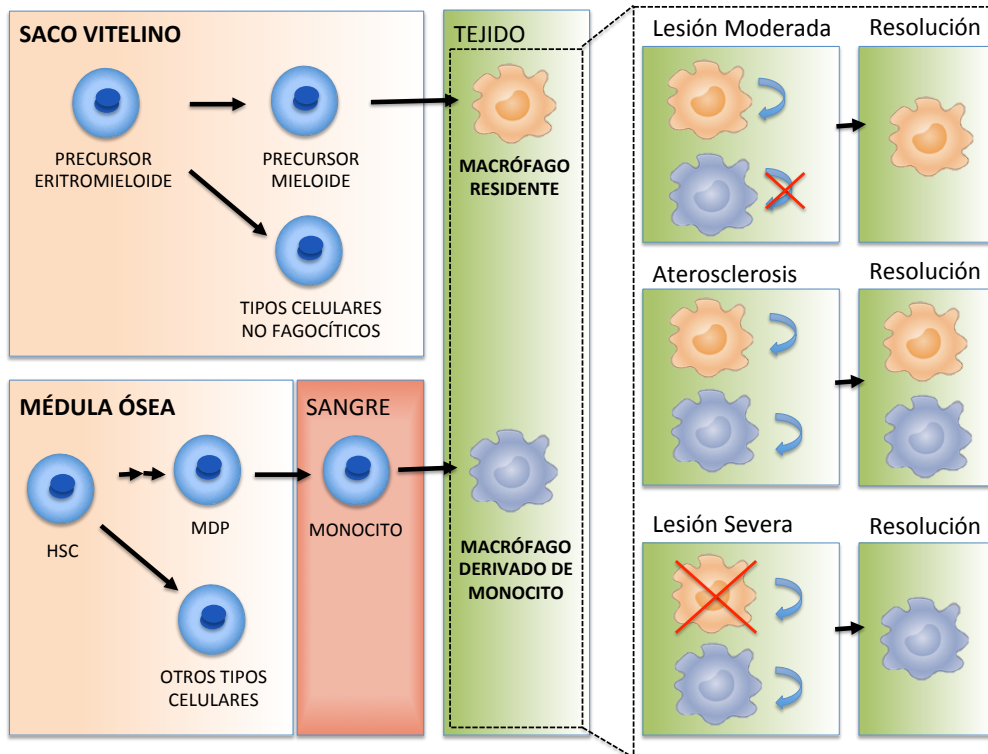


Figura 1.1. Origen ontogénico propuesto para los macrófagos.

Según investigaciones recientes, las poblaciones de macrófagos tienen dos orígenes diferentes: un origen embrionario que daría lugar a las poblaciones de macrófagos residentes ($F4/80^{\text{high}}$) y un origen hematopoyético en la médula ósea adulta que daría lugar a las poblaciones de macrófagos derivados de monocitos ($F4/80^{\text{low}}$), tal y como se detalla en el texto. En lesiones moderadas, en las que hay una cierta pérdida de macrófagos residentes y no se produce reclutamiento de monocitos sanguíneos, la repoblación ocurre a partir de la población inicial de macrófagos residentes. Los macrófagos residentes pueden regenerarse localmente (flecha circular), por ejemplo, durante una infección por nemátodos en la cavidad pleural o en casos de inflamación del sistema nervioso. En el caso de la placa aterosclerótica, se produce la proliferación de macrófagos locales y macrófagos derivados de monocitos, los cuales proliferan localmente y dan lugar a un mosaico de macrófagos o "macrophage chimaera", consistente en una mezcla de macrófagos de origen embrionario y adulto. Este proceso también ocurre en un modelo murino de infección de piel por el virus de herpes simplex (HSV). Sin embargo, aún no se sabe si este mosaico permanece en el tiempo o es un añadido temporal a la población local. En el caso de lesiones severas que impliquen la pérdida de la población de macrófagos residentes (aspa roja), la repoblación tiene lugar a partir de monocitos sanguíneos, como por ejemplo en el caso de sobreexposición de la piel a la luz ultravioleta. HSC = Hematopoietic Stem Cell, MDP = Myeloid Derived Progenitor. Elaborado a partir de Ginhoux and Jung, 2014 y de Neumann and Wekerle, 2013.

Varios grupos de investigación han encontrado evidencias que podrían explicar este aspecto de la biología del macrófago. Según estos autores, el macrófago tiene cierta capacidad de proliferar y autorenovarse, tanto en condiciones basales (Hashimoto et al., 2013) como ante estímulos concretos, como infecciones helmínticas (Jenkins et al., 2011; Robbins et al., 2013) a lo largo de la vida del individuo. Un esquema del origen y mantenimiento de las poblaciones de macrófagos se representa en la Figura 1.1.

1.4.1 Monocitos.

Los monocitos son células mieloides que se encuentran de manera abundante en la sangre, médula ósea y bazo, y que no proliferan en condiciones basales (Swirski et al., 2009). Se originan dependientes del factor CSF1 y su receptor CSF1R, también denominado CD115 (aunque esto se ha puesto en duda, véase Ginhoux et al., 2010) a partir de precursores hematopoyéticos, y están equipados con receptores de citoquinas y de reconocimiento de patógenos que median su quimiotaxis y extravasación desde la sangre a los tejidos durante una infección. Constituyen alrededor de un 10 % de los leucocitos de la sangre en humanos, y un 4 % en ratones (Auffray et al., 2009).

Existen dos subtipos funcionales de monocitos (ver Figura 1.2), unos denominados "inflamatorios", caracterizados por los marcadores CD115⁺ Ly-6C^{high}, y otros denominados "*patrolling*", que se distinguen por los marcadores CD115⁺ Ly-6C^{low} (Auffray et al., 2009).

Los monocitos Ly-6C^{high} son los más numerosos. Expresan receptor de quimioquinas CCR2, la molécula de adhesión L-selectin (CD62L) y bajos niveles del receptor de quimioquinas CX3CR1 (Auffray et al., 2009). En humanos, su equivalente son los monocitos CD14⁺. Acuden selectivamente a los tejidos inflamados y nódulos inflamados *in vivo* y producen una respuesta de tipo M1 con altos niveles de TNF- α e IL-1, por lo que se denominaron "inflamatorios" (Auffray et al., 2009). Dan lugar a macrófagos y DCs en varios modelos de infección.

Por ejemplo, en el caso de infección por *Listeria monocytogenes*, los monocitos Ly-6C^{high} dan lugar a un tipo de DCs denominado Tip-DCs (*TNF α /iNOS-producing DCs*) que producen mediadores inflamatorios como TNF α , óxido nítrico y ROS (Narni-Mancinelli et al., 2007). En el caso de infección con *Toxoplasma gondii*, los monocitos Ly-6C^{high} se diferencian a macrófagos de mucosa que a diferencia de las Tip-DCs son CD11c⁻ (Dunay et al., 2008). En el contexto de un tumor, por otro lado, los monocitos Ly-6C^{high} forman parte de la población de las células supresoras de tipo mieloides (MDSC, *Myeloid-Derived Suppressor Cells*), que interviene en el desarrollo de anergia de las células T hacia el tumor. En particular, las MDSC impiden las respuestas antígeno-específicas de las células T CD8⁺ mediante un mecanismo molecular que involucra la producción de NO y ROS (Auffray et al., 2009; Bronte et al., 2000, 1999; Gallina et al., 2006; Rössner et al., 2005). La inhibición de la señalización CCL2-CCR2 bloquea el

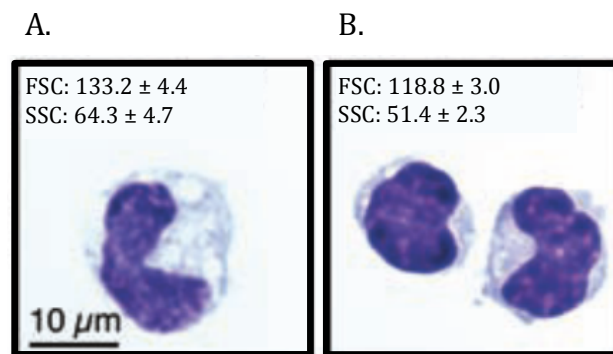


Figura 1.2. Monocitos sanguíneos murinos.

Panel A. Se muestra un monocito sanguíneo Ly-6C^{high} que presenta mayor tamaño (FSC) y complejidad (SSC), que los monocitos Ly-6C^{low}.

Panel B. Se muestran monocitos sanguíneos Ly-6C^{low}.
Obtenido de Swirski et al., 2009.

reclutamiento de monocitos inflamatorios, prolongando la vida de ratones con tumor (Qian et al., 2011).

Los monocitos Ly-6C^{low} son menos numerosos. Se caracterizan por tener menor tamaño, expresar el receptor de quimioquinas CX3CR1, LFA-1 y CD43, y carecer de expresión de CCR2 y L-selectina (Geissmann et al., 2003). También se denominan residentes porque tienen una vida media más larga *in vivo* y se localizan tanto en tejido normal como inflamado. Mediante experimentos de microscopía intravital, se descubrió que los monocitos Ly-6C^{low} patrullan los vasos sanguíneos, rodando por el endotelio gracias a la integrina LFA-1 y al receptor de quimioquinas CX3CR1 (Auffray et al., 2007). Esto podría tener el objetivo de vigilar posibles patógenos y fagocitar células muertas y lípidos oxidados (Auffray et al., 2007).

En el caso de una infección por *Listeria monocytogenes*, los monocitos Ly-6C^{low} se extravasan rápidamente y empiezan a producir TNF- α a las 2 horas de la infección. Tras 8 horas, sin embargo, los mayores productores de TNF- α son los monocitos Ly-6C^{high}. Posteriormente, los monocitos Ly-6C^{low} empiezan un programa de activación alternativa con marcadores de tipo M2 como Arginasa, Mgl2 e IL-4R α (Auffray et al., 2007). Este tipo de respuesta se relaciona con el remodelado tisular, la reparación de heridas y la inmunomodulación (Allavena et al., 2008). Por otro lado, tras un infarto de miocardio, los monocitos Ly-6C^{low} expresan factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF, *vascular-endothelial growth factor*). En este contexto, se piensa que intervienen en la recuperación del tejido promoviendo la atracción de miofibroblastos, la angiogénesis y la deposición de colágeno (Nahrendorf et al., 2007). Sin embargo, su rol en la angiogénesis aún necesita un estudio más profundo (Geissmann et al., 2010).

Por tanto, los monocitos son células de una gran plasticidad, capaces de responder a distintas señales y dar lugar a formas más especializadas, lo que en último término permite una respuesta más eficiente a la inmensa diversidad de retos inmunológicos posibles.

1.4.2 Células Dendríticas.

Las células dendríticas se originan a partir de precursores de la médula ósea, si bien no existe consenso si proceden de uno o varios de ellos, tales como MDP (*Monocyte/macrophage and Dendritic cell Precursor*), CDP (*Common Dendritic Cell Precursor*) o monocitos (Auffray et al., 2009; Varol et al., 2007).

Las células dendríticas se suelen dividir en tres grupos: células de Langerhans (LC), DCs convencionales CD11c^{high} (cDC, conventional DC) y DCs plasmacitoides (pDC, *plasmacytoid DC*) (Shortman and Liu, 2002). A estos grupos se les añaden otros definidos más recientemente, como las Tip-DCs (Narni-Mancinelli et al., 2007) o las DCs derivadas de monocitos (MO-DCs, *MOncocyte-derived Dendritic Cell*) (Cheong et al., 2010) (ver Figura 1.3).

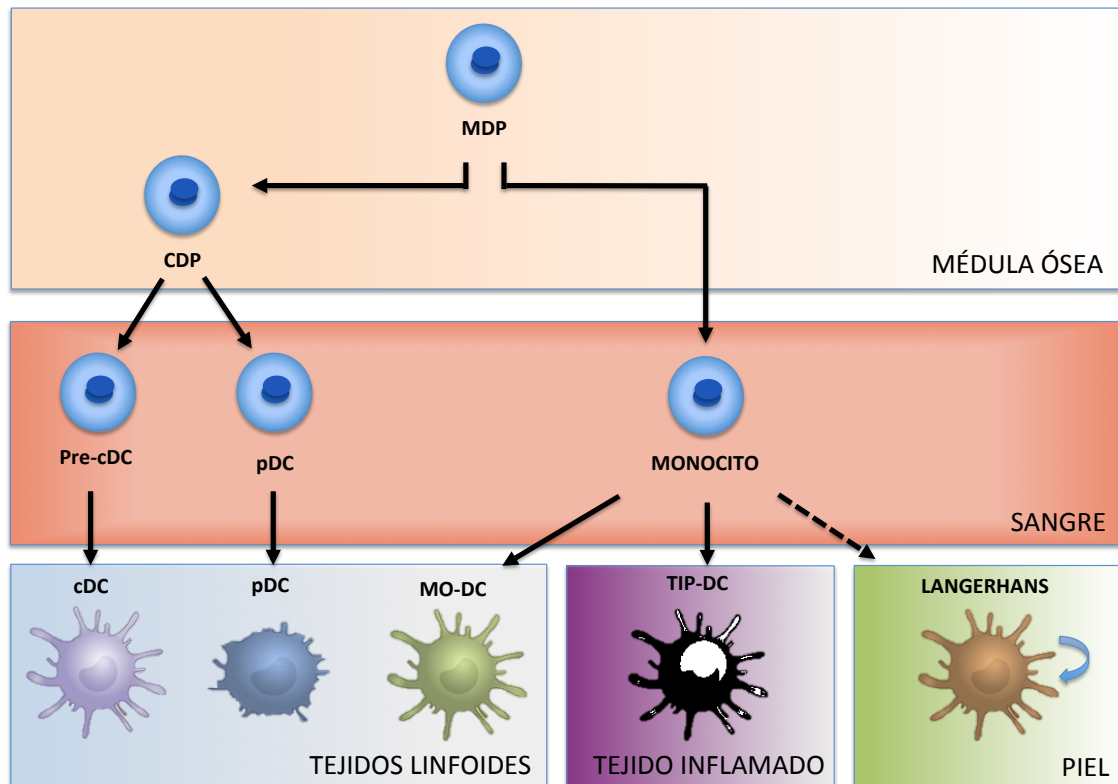


Figura 1.3. Esquema de los principales tipos de Células Dendríticas.

En la médula ósea, el precursor MDP da lugar al precursor CDP y a monocitos. CDP da lugar a pre-cDC y pDC en sangre, que se desplazan a los tejidos linfoides para dar lugar a cDCs y pDCs. El monocito por su parte da lugar a MO-DCs y TIP-DCs. Su papel como precursor de células de Langerhans está cada vez más discutido (ver texto). MDP (*monocyte/macrophages and DC precursor*), CDP (*Common Dendritic Cell Precursor*), pre-cDC (precursor de Células Dendríticas Convencionales), pDC (Células Dendríticas Plasmacitoides), MO-DC (Células Dendríticas derivadas de Monocitos), TIP-DC (*TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells*). Modificado a partir de Geissmann et al., 2010.

Los distintos tipos se distinguen por su localización y por sus marcadores de superficie. Por ejemplo, en el bazo de ratón los subtipos que podemos encontrar son pDC (B220⁺ CD11c^{int} GR1⁻), MO-DC (B220⁻ CD11c^{int} GR1[±]), y cDC (B220⁻ CD11c^{high} GR1⁻). Las cDC se suelen dividir en CD8α⁺ (CD11c^{high}, B220⁻, DEC205⁺, CD24^{high}, CD11b⁻) y CD8α⁻ (CD11c^{high}, B220⁻, DEC205⁻, CD24^{low}, CD11b⁺, CD172⁺, CD4[±]) (Fuertes Marraco et al., 2012).

Las LC se encuentran en la epidermis y se han clasificado tradicionalmente como células dendríticas. Sin embargo, dependen de IL-34 y CSF1R durante su desarrollo (Greter et al., 2012b; Wang et al., 2012), no tienen un origen monocítico (Varol et al., 2007) sino embrionario (Hoeffel et al., 2012) y su programa transcripcional (Satpathy et al., 2012) parece situarlas más dentro del linaje de los macrófagos residentes, por lo que su clasificación como dendríticas responde más a motivos históricos que funcionales. Sin embargo, su clasificación como macrófagos tampoco parece clara, ya que presentan capacidad migratoria, y tras migrar, adquieren la expresión de marcadores típicos de cDCs como Flt3, CCR7 y Zbtb46 (Miller et al., 2012).

Las cDCs fueron descritas originalmente por R. Steinman y A. Cohn (Steinman and Cohn, 1973). Pueden ser de dos tipos: migratorias o residentes. Las cDC migratorias capturan patógenos en el sitio de infección y rápidamente se desplazan al nódulo linfático más cercano para la presentación del antígeno. También son importantes en la regulación de la tolerancia a lo propio (Idoyaga et al., 2013). Según los marcadores de superficie, las cDC migratorias son CD4⁺CD8⁻ y se subdividen en CD11b⁺, CD11b⁻ CD103⁻ y CD103⁺ (Idoyaga et al., 2013). Las cDC residentes actúan más bien como centinelas en órganos linfoides secundarios y otros tejidos para la captura y presentación del antígeno *in situ* (Fuertes Marraco et al., 2012). Según los marcadores de superficie, las cDCs residentes, a su vez, se subdividen en dos (CD8⁻, CD8⁺) (Idoyaga et al., 2013; Shortman and Heath, 2010) o tres subgrupos (CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺) (Vremec et al., 2000).

Las pDCs representan un linaje independiente según su morfología, expresión génica y habilidad para secretar grandes cantidades de interferón tipo I en respuesta a virus (Robbins et al., 2008; Siegal et al., 1999). A diferencia de las cDCs, son ineficientes en la captura y presentación de antígenos. Además, en contraste a la apariencia "dendrítica" de las cDCs, las pDCs exhiben una forma esférica característica similar a células plasmáticas. Según sus marcadores de superficie, las pDCs se distinguen de cDCs por la expresión de B220, Siglec-H y Bst2 en ratón, y BDCA2 (CD303) en humanos (Satpathy et al., 2012).

Las células dendríticas derivadas de Monocitos, Mo-DCs, se descubrieron por primera vez en 1994 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994), y su relevancia como DCs *in vivo* ha sido cuestionada por distintos investigadores desde entonces. El grupo de R. Steinman, sin embargo, las define como auténticas células dendríticas por varias razones. Primero, en términos de motilidad, son células no adherentes que continuamente forman y retraen

extensiones, de manera idéntica a como lo hacen las células dendríticas en las áreas T de los nódulos linfáticos (Lindquist et al., 2004). Además, se concentran en las áreas T, una característica de las DCs clásicas, y esta localización facilita la selección clonal de células T antígeno-específicas del arsenal circulante. Fenotípicamente, son muy similares a las DCs de los tejidos linfoides, incluyendo la pérdida de marcadores que se han usado previamente para definir monocitos inflamatorios *in vivo*, tales como Ly6C, Gr-1 y CD115. Finalmente, cuando se compara la funcionalidad de MO-DCs y cDCs de un mismo ganglio linfático, las MO-DCs son incluso superiores en la presentación de antígenos tanto *in vivo* como *in vitro* (Cheong et al., 2010).

1.4.3 Macrófagos.

Los macrófagos son fagocitos profesionales residentes en tejidos que presentan muy poca capacidad de migrar, y que son, en general, mucho menos eficientes que las células dendríticas en la presentación del antígeno. En contraposición, poseen una alta actividad catabólica y proteolítica, que les permite ingerir y degradar patógenos, objetos extraños, células muertas y *debris* celulares (Murray and Wynn, 2011).

Existe una gran diversidad de tipos de macrófagos, con diversas funciones tales como remodelado óseo, remodelación del tejido y morfogénesis, reproducción, angiogénesis, reciclado del hierro y, por supuesto, función inmunitaria (Ver Tabla 1.1).

En condiciones basales, los macrófagos presentan actividad inmunitaria anti-inflamatoria que contribuye a la homeostasis tisular, en parte por la producción de IL-10 (Denning et al., 2007). En condiciones inflamatorias, los macrófagos se pueden activar de manera "clásica" y participar en la respuesta proinflamatoria hacia los patógenos. Así, el IFN γ producido por células Th1, T citotóxicas CD8+ y células NK convierte a los macrófagos en células con elevada capacidad citotóxica, microbicida y anti-proliferativa. Esta activación clásica, llamada también polarización M1, se caracteriza por la secreción de elevados niveles de IL-12 e IL-23 y bajos niveles de IL-10 en respuesta a infecciones como las causadas por el género *Mycobacterium sp.* (Martinez et al., 2009).

Por otro lado, en respuesta a las citoquinas Th2 IL-4 e IL-13, los macrófagos se pueden activar de manera "alternativa", también llamada polarización M2. En estas condiciones, producen grandes cantidades de IL-10 y TGF β y bajos niveles de IL-12. La respuesta Th2 se caracteriza por eosinofilia, basofilia, mastocitosis, cambio de clase en las células B y producción de anticuerpos IgE e IgG1. Esta respuesta es esencial en el control de parásitos extracelulares. En este contexto, la activación alternativa de los macrófagos disminuye su capacidad de producir óxido nítrico (NO, *Nitric Oxide*) y su actividad clásica frente a virus y bacterias pero induce la expresión de mediadores de remodelado tisular (Martinez et al., 2009).

TABLA 1.1. Principales poblaciones de macrófagos.

Simplificación de las principales poblaciones de macrófagos. El símbolo "-" indica la falta de nombre específico. Elaborada a partir de Pollard, 2009 y Davies et al., 2013.

Tejido	Nombre específico	Función principal
Hueso	Osteoclasto	Remodelado del hueso. Proveer un nicho a las células madre.
	Macrófago de la médula ósea	Eritropoiesis.
Cerebro	Célula microglial	Conectividad y supervivencia neuronal, reparación tras lesión.
Piel	Célula de Langerhans	Vigilancia inmunitaria.
	Macrófagos dérmicos	Vigilancia inmunitaria.
Ojo	-	Remodelado vascular.
Intestino	Macrófago críptico	Vigilancia inmunitaria.
Bazo	Macrófago de la pulpa roja	Reciclado del hierro, fagocitosis de eritrocitos viejos.
	Macrófagos metalofílicos de la zona marginal (MMM)	Vigilancia inmunitaria.
	Macrófagos de la zona marginal (MZM)	Vigilancia inmunitaria.
	Macrófagos de la pulpa blanca	Eliminación de células apoptóticas del centro germinal.
Riñón	-	Desarrollo de conductos.
Hígado	Células de Kupffer	Eliminación de <i>debris</i> sanguíneos, reparación del tejido hepático tras lesión.
Glándula Mamaria	-	Desarrollo de conductos y morfogénesis de las ramificaciones.
Ovario	-	Producción de hormona esteroidea y ovulación.
Páncreas	-	Desarrollo de las islas.
Testículos	-	Producción de hormona esteroidea.
Útero	DC uterina	Angiogénesis y decidualización.
	Macrófago uterino	Maduración cervical.
Tejidos Serosos	Macrófagos peritoneales	Vigilancia inmunitaria.
	Macrófagos pleurales	Vigilancia inmunitaria.
Pulmón	Macrófagos alveolares	Vigilancia inmunitaria y reciclado del surfactante.
	Macrófagos intersticiales	Regulación de la maduración y activación de DCs.
Tejido Adiposo	Macrófagos asociados a Tejido Adiposo	Control de la sensibilidad a insulina y termogénesis.

1.4.3.a Regulación de la polarización del macrófago por citoquinas.

Las citoquinas son pequeñas proteínas que actúan modulando la actividad, expresión génica y polarización de células diana. Dos citoquinas importantes para controlar el número y la función de poblaciones de macrófagos, tanto en el estadio estacionario como en condiciones inflamatorias, son las citoquinas "Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos" (GM-CSF, *Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor*, también llamada CSF2) y "Factor estimulador de colonias de macrófagos" (M-CSF, *Macrophage Colony-Stimulating Factor*, también llamado CSF1).

Estudios en ratones denominados $Csf1^{op/op}$, que poseen una mutación recesiva en el gen del M-CSF, muestran que esta citoquina es esencial en el desarrollo de determinadas poblaciones de macrófagos, tales como osteoclastos, macrófagos peritoneales, macrófagos metalofílicos de la zona marginal del bazo y macrófagos del seno subcapsular de nódulos linfáticos (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982; Witmer-Pack et al., 1993). Otras poblaciones, como células de Kupffer, microglía o macrófagos alveolares, aparecen reducidas, mientras que otras tienen un desarrollo aparentemente normal, como los macrófagos de la lámina propia intestinal (Witmer-Pack et al., 1993). El estudio de ratones KO para el receptor de M-CSF, $CSF1R^{-/-}$, indica que CSF1R (también conocido como CD115) es esencial para la producción de macrófagos derivados del saco vitelino y microglía (Ginhoux et al., 2010). Hay que tener en cuenta que las poblaciones de macrófagos afectadas en ratones $CSF1^{-/-}$ y en ratones $CSF1R^{-/-}$ no tienen por qué ser exactamente coincidentes, ya que al receptor CSF1R se pueden unir otros ligandos diferentes a M-CSF, como IL-34 (Ginhoux et al., 2010; Wang et al., 2012).

CSF1R se usa habitualmente como marcador de monocitos, y se cree que los monocitos tienen un desarrollo CSF1R dependiente (Auffray et al., 2009; Dai et al., 2002). Sorprendentemente, estudios recientes han descrito la posibilidad del desarrollo de monocitos de manera independiente a CSF1R (Ginhoux et al., 2010). Aunque ambos grupos usan ratones $CSF1R^{-/-}$, la explicación a esta aparente contradicción podría ser debida a que el grupo de Dai y colaboradores mide los niveles de monocitos en adultos (6-8 semanas), mientras que el grupo de Ginhoux y colaboradores mide los niveles de monocitos durante el desarrollo embrionario. Además, Dai y colaboradores identifican a los monocitos según su patrón de dispersión de la luz (FSC-SSC) (Dai et al., 2002) mientras que Ginhoux y colaboradores usan los marcadores $CD45^+CD11b^+F4/80^+$ (Ginhoux et al., 2010).

En el mismo sentido, se pensaba que CSF1 era esencial para el desarrollo de los monocitos (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982), aunque parece que el número de monocitos en ratones adultos $Csf1^{op/op}$ es normal (Chitu and Stanley, 2006; Dai et al., 2004), lo que podría explicarse por la técnica usada a la hora de medir los monocitos. En un caso se mide en un frotis sanguíneo con tinción de Wright (Wiktor-Jedrzejczak et al., 1982), mientras que en otro se realizó por citometría de flujo con marcadores $Mac1^+/Gr-1^-$ (Dai et al., 2004). Otro estudio indica que el número de monocitos $F4/80^{low}$ de la médula ósea

es similar o incluso superior en ratones $Csf1^{op/op}$ en comparación con los de fenotipo salvaje WT (*Wilde Type*) (Cecchini et al., 1994).

Curiosamente, un número cada vez mayor de artículos parece indicar que la señalización por CSF1R parece ser importante en el desarrollo de las células dendríticas (Bogunovic et al., 2009; Fancke et al., 2008; Greter et al., 2012a; MacDonald et al., 2005; Satpathy et al., 2012).

Por otro lado, los ratones deficientes en GM-CSF padecen de un tipo de proteinosis alveolar (PAP) debida a la deficiencia de macrófagos alveolares maduros, acumulándose muchos de ellos como células espumosas en los espacios alveolares (Dranoff et al., 1994; Shibata et al., 2001; Stanley et al., 1994), efecto que se ha visto también en humanos con mutaciones en el gen CSF2RA (Suzuki et al., 2008). Estos ratones, sin embargo, presentan poblaciones prácticamente normales de DCs en bazo y nódulos linfáticos (Vremec et al., 1997); lo que es sorprendente, ya que se usa GM-CSF rutinariamente para generar DCs *in vitro* desde su descubrimiento como promotor de la diferenciación de monocitos a células similares a DCs de bazo (Inaba et al., 2009; Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Recientemente, se ha identificado que GM-CSF sí juega un papel esencial en la diferenciación de determinadas poblaciones de DCs, como las CX3CR1⁺ CD103⁺ de la lámina propia intestinal (Bogunovic et al., 2009) y de las células dérmicas CD103⁺ (King et al., 2010).

Mientras que M-CSF se produce de manera ubicua en varios tejidos, la expresión de GM-CSF presenta bajos niveles en condiciones basales, y aumenta en condiciones inflamatorias o de respuesta inmunitaria (Lacey et al., 2012). Dado que los macrófagos en el sitio de inflamación pueden estar sometidos tanto a M-CSF como a GM-CSF (Brochériou et al., 2011; Higgins et al., 2008), se han llevado a cabo estudios *in vitro* para tratar de replicar estas condiciones. Las últimas evidencias parecen indicar que, además de intervenir en la producción de poblaciones mieloides a partir de progenitores de médula ósea, las citoquinas M-CSF y GM-CSF intervienen en la regulación de la polarización y respuesta de estas células (ver Figura 1.4).

En un estudio en el que se usaron macrófagos derivados de médula ósea murina (BMM, *Bone Marrow Macrophages*), se observó que los macrófagos generados con GM-CSF, denominados GM-BMM, producían preferentemente citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6, IL-12p70 e IL-23 en respuesta a LPS, mientras que los macrófagos generados con M-CSF, denominados M-BMM, producían preferentemente citoquinas homeostáticas como IL-10 y CCL2 (Fleetwood et al., 2007). Resultados similares se habían obtenido a partir de monocitos humanos (Verreck et al., 2006, 2004). Esto ha llevado a la hipótesis de que los GM-BMM se corresponden con macrófagos M1, mientras que los M-BMM se corresponden con macrófagos M2 (Fleetwood et al., 2007).

En otro experimento en el que se desarrollaron M-BMM durante 7 días, se les aplicó GM-CSF de manera concomitante con M-CSF (o sólo M-CSF como control)

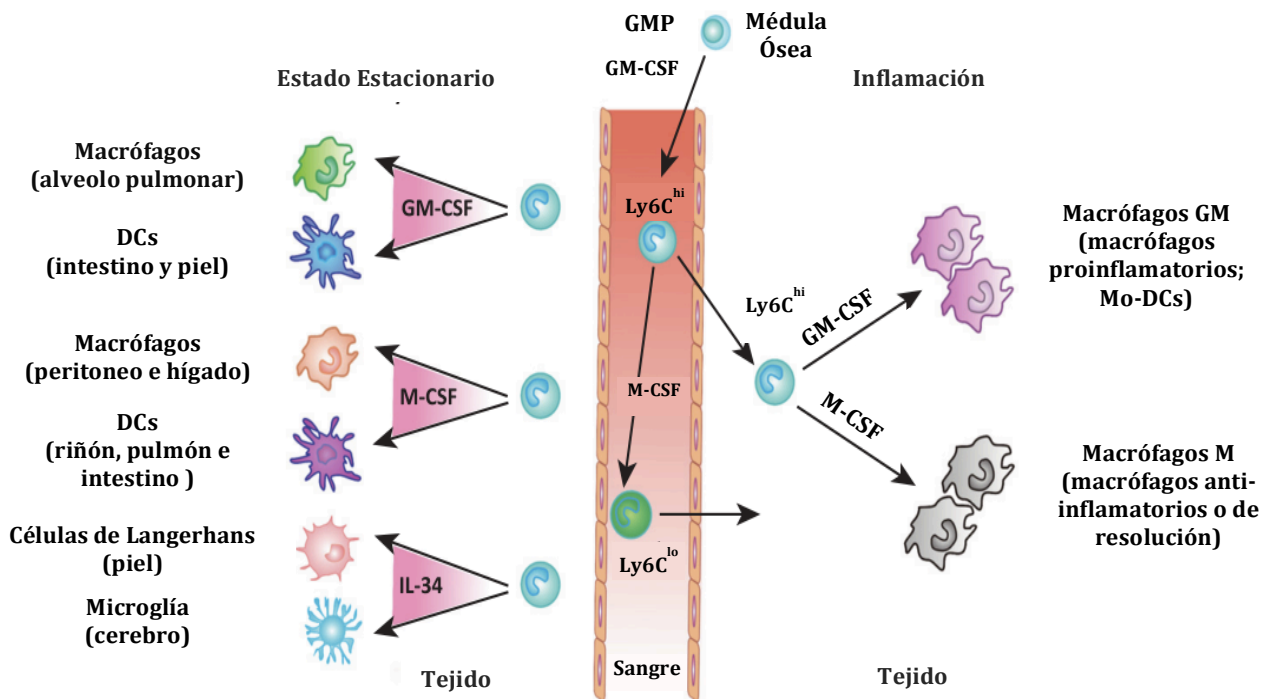


Figura 1.4. Modelo actual de la acción de las citoquinas GM-CSF y M-CSF sobre el número y fenotipo de macrófagos y células dendríticas.

En los tejidos, GM-CSF controla el desarrollo de macrófagos alveolares y DCs del intestino y piel; M-CSF controla la mayoría de poblaciones de macrófagos y algunas DCs; y la IL-34 controla el desarrollo de células de Langerhans y microglia. Los monocitos Ly6C^{high} proceden del progenitor de macrófagos y granulocitos (GMP), y da lugar a Ly6C^{low} quizá a través de M-CSF. Los monocitos Ly6C^{high} es posible que proliferen localmente en sitios inflamados en respuesta a M-CSF y GM-CSF. Basado en estudios *in vitro*, GM-CSF induciría un fenotipo proinflamatorio tipo DC (Macrófago GM o Mo-DCs), mientras que M-CSF induciría un fenotipo antiinflamatorio en un intento de restaurar la homeostasis. Adaptado de Hamilton and Achuthan, 2013.

durante las últimas 16 horas. Lo mismo se hizo con GM-BMM, pero usando M-CSF de manera concomitante con GM-CSF (o sólo GM-CSF como control). Aún en un tratamiento tan corto, se observó que la respuesta a LPS de las M-BMM "cebadas" con GM-CSF presenta mayores niveles de TNF- α , además de IL-12p70 e IL-23. De manera similar, las células GM-BMM "cebadas" con M-CSF producen menos TNF- α , IL-12p70 e IL-23 y más CCL2 en respuesta a LPS (Fleetwood et al., 2007). Éste y otros estudios parecen indicar que, aunque la clasificación M1/M2 se debe tomar con cierta cautela (Lacey et al., 2012), existe una especie de competición entre M-CSF y GM-CSF a nivel de expresión génica que determina, en gran medida, la respuesta del macrófago a retos inmunológicos (Brochériou et al., 2011; Lacey et al., 2012; Verreck et al., 2006; Willman et al., 1989).

Cabe destacar que existe cierta controversia sobre el uso del término GM-BMM para designar a macrófagos obtenidos a partir de médula ósea con tratamiento de GM-CSF, porque el mismo protocolo se usa de manera general para obtener DCs, también designadas BMDCs o MO-DCs (Inaba et al., 2009). Según el grupo de Hamilton, las células adherentes producidas tras tratamiento de BM con GM-CSF durante 7 días presentan marcadores de macrófago como CD11b, F4/80 y CSF1R (Lari et al., 2007), pero también CD11c, tal como las DCs y los macrófagos alveolares (Guilliams et al., 2013). Funcionalmente presentan mayor capacidad de estimular células T que las M-BMM, característica similar a las DCs (Cheong et al., 2010; Fleetwood et al., 2007), pero pueden actuar de precursores de osteoclastos, un tipo especializado de macrófagos (Lari et al., 2007) y según análisis bioinformáticos, el transcriptoma de estas células las sitúa más emparentadas con macrófagos que con DCs (Mabbott et al., 2010; Robbins et al., 2008). Por tanto, al tener características tanto de macrófago como de DCs encontraremos en la literatura autores que denominen a estas células de una manera u otra.

1.4.3.b Señalización por GM-CSF.

El receptor de GM-CSF (GMR, *GM-CSF Receptor*, también llamado CSF2R) presenta dos subunidades: una subunidad específica α (denominada GMR α) y una subunidad β c, compartida con los receptores de IL-3 e IL-5.

La unión de GM-CSF a su receptor activa proteínas quinasas tipo JAK (*Janus Kinase*), principalmente JAK2 (Hercus et al., 2009; Watanabe et al., 2000), que transmiten la señal y modulan la expresión génica a través de la actividad de factores de transcripción como STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) (Perugini et al., 2010; Sebastian et al., 2008; Suzuki et al., 2008). También, se activan las vías de las MAPK, y de PI3K-AKT (Hercus et al., 2009; Perugini et al., 2010). Colectivamente, estas vías regulan varios aspectos de la biología celular como la supervivencia, proliferación y diferenciación, así como la modulación de la respuesta de células maduras (Broughton et al., 2012). Esta multiplicidad de efectos del GM-CSF, común también en otras citoquinas, es lo que se conoce como pleiotropía o multiplicidad de acciones (Hercus et al., 2009).

Por otro lado, la cristalización del GMR humano ha permitido establecer que este receptor se ensambla como un hexámero consistente en dos subunidades α , dos subunidades β y dos moléculas de ligando, que a su vez forma un dodecámero formado por la asociación de dos hexámeros (Hansen et al., 2008; Hercus et al., 2009). Esta estructura es bastante inusual, y podría explicar los efectos dosis-dependientes de GM-CSF. Así, a bajas concentraciones GM-CSF interviene en la supervivencia, mientras que a concentraciones crecientes, tiene efectos sobre supervivencia y proliferación (ver Figura 1.5).

1.4.4 Receptores de Lectina tipo C.

Una ruta importante en la adquisición de antígenos por parte de las APCs ocurre a través de los receptores de lectina tipo C (CLRs, *C-type Lectin Receptors*) que internalizan antígenos para su procesado. Los CLR constituyen un subgrupo dentro de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), receptores inmunitarios que intervienen en el reconocimiento de moléculas asociadas a patógenos tales como carbohidratos, ácidos nucleicos o peptidoglicano entre otros (Pyz et al., 2006). Los CLRs contienen uno o varios dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs, *Carbohydrate Recognition Domains*), que están presentes en la superficie de muchos patógenos pero también en antígenos propios. Por tanto, los CLRs están no solo involucrados en el reconocimiento de patógenos sino también en la unión a modo de receptores de adhesión (Figdor et al., 2002) y en la homeostasis (Gordon, 2002). La activación inmunitaria no ocurre directamente por la unión del antígeno al CLR, ya que estos receptores por si mismos inducen tolerancia inmunitaria. Se requiere de la señalización simultánea de receptores tipo Toll (TLRs, *Toll-Like Receptors*) que reconocen específicamente estructuras distintivas de patógenos, para desencadenar respuestas inmunitarias patógeno-específicas durante la infección (Hawiger, 2001).

La familia SIGN (*Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*) de CLRs consiste en DC-SIGN y DC-SIGNR en humanos y varios receptores SIGNR en ratones. Todos los miembros de SIGN son CLRs de tipo 2 que contienen una región CRD que determina la especificidad del ligando.

1.4.5 El Receptor CD209a.

CD209a, también denominado SIGNR5 (*Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin Receptor 5*) o mDC-SIGN (*murine Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-integrin*), es un receptor CLR homólogo del gen humano DC-SIGN/CD209 (Park et al., 2001).

En humanos, DC-SIGN se expresa en células mieloides de tipo dendrítico (Geijtenbeek et al., 2000b; Relloso et al., 2002) y macrófagos (Krutzik et al., 2005), participando en la captura y presentación de antígenos (Engering et al., 2002; Schjetne, 2002) y en las interacciones intercelulares con linfocitos T *naive* y células endoteliales (Geijtenbeek et al., 2000a; Tacke et al., 2005). En ratones humanizados (ratones

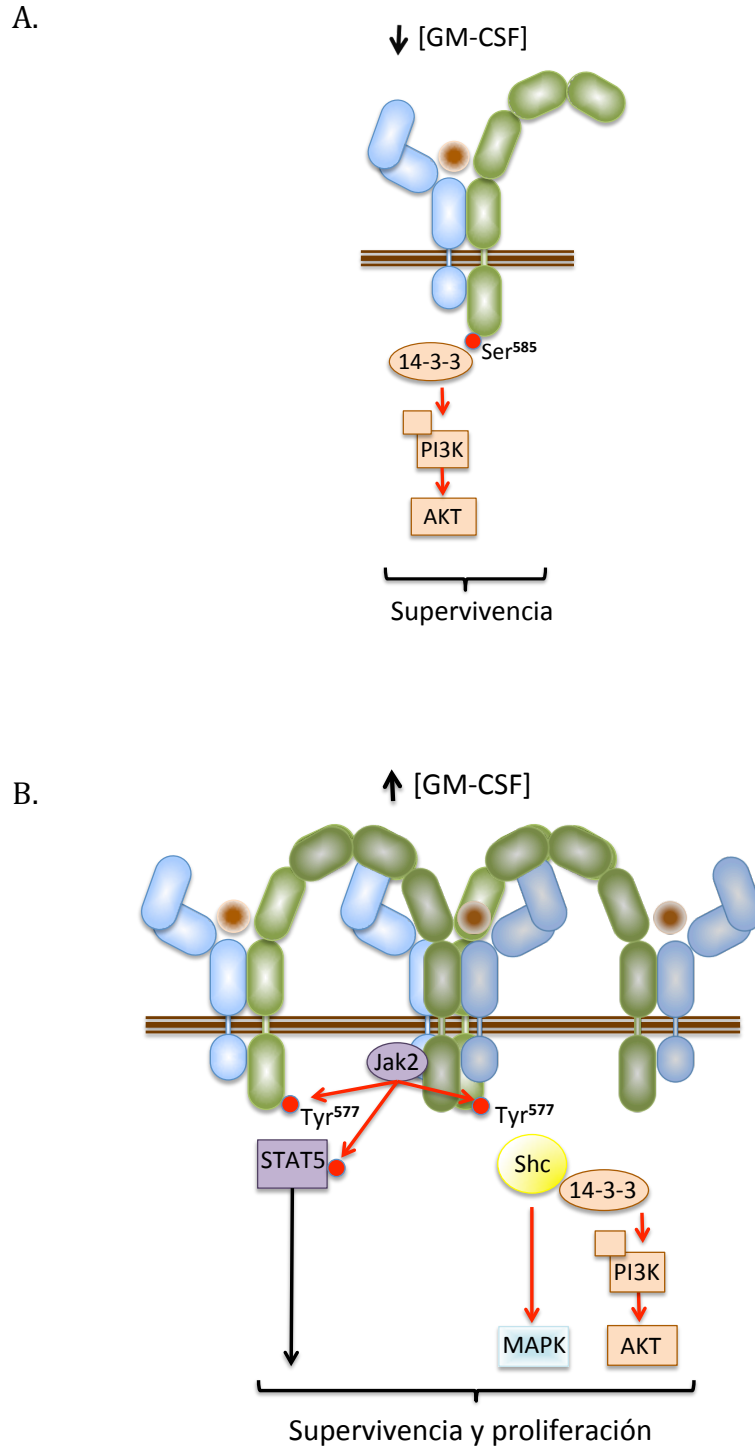


Figura 1.5. Representación esquemática del receptor de GM-CSF (GMR) humano y sus módulos de señalización.

Panel A. Se representa un trímero formado por las dos cadenas del receptor GMR denominadas GMR α (en azul) y β c (en verde) y una molécula de GM-CSF (en marrón). A bajas concentraciones de GM-CSF, se produce la fosforilación en la Serina⁵⁸⁵ de la subunidad β c, lo que inicia una ruta de supervivencia celular mediada por AKT.

Panel B. A mayores concentraciones de GM-CSF se produce el ensamblaje de un dodecámero formado por cuatro trímeros. En este caso, Jak2 transfosforila las subunidades β c en las Tirosinas⁵⁷⁷, lo que inicia rutas tanto de supervivencia como de proliferación.

Basado en Hercus et al., 2009.

carentes de células B, T y NK trasplantados con células hematopoyéticas humanas), se ha demostrado que la ausencia de células dendríticas CD209⁺ (DC-SIGN) puede ser una de las causas de la falta de respuesta mediada por anticuerpos antígeno-específica (Chen et al., 2012). Este defecto se puede corregir con la expresión de las citoquinas GM-CSF e IL-4 humanas, que estimulan la producción de DCs CD209⁺, la maduración de células B y T y la producción de anticuerpos antígeno-específicos (Chen et al., 2012). Precisamente, algunos patógenos como el VIH aprovechan la interacción vía DC-SIGN de células dendríticas y células T para diseminarse (Venkatachari et al., 2009).

En humanos, DC-SIGN presenta un gen parálogo denominado DC-SIGNR, con el que comparte un 77 % de similitud a nivel de aminoácidos (Bashirova et al., 2001), situado de manera adyacente en el genoma (ver Figura 1.6). A pesar de la similitud, DC-SIGNR, también llamado L-SIGN, CD299 o CLEC4M, no se expresa en DCs *in vivo* o en DCs derivadas de monocitos *in vitro*, sino en células endoteliales especializadas presentes en hígado y nódulos linfáticos con capacidad de presentación de antígenos (Bashirova et al., 2001; Engering et al., 2004). Recientemente, se ha descubierto que DC-SIGNR media en la captura e internalización del factor de *von Willebrand*, influyendo en su concentración en plasma (Rydz et al., 2013).

Además de CD209a, en el genoma murino se encuentran otros genes ortólogos de DC-SIGN situados en *loci* adyacentes denominados CD209b (SIGNR1), CD209c (SIGNR2), CD209d (SIGNR3), CD209e (SIGNR4), CD209f (SIGNR8) y CD209g (SIGNR7) (ver Figura 1.6). CD209a se encuentra próximo al gen CD23 (Fcer2a), al igual que ocurre en el genoma humano. La presencia de DC-SIGN y DC-SIGNR, genes que presentan una gran similitud y que se encuentran situados adyacentemente, junto a la disposición en tándem de los genes CD209/SIGNR en el genoma murino, sugiere que se trata de una subfamilia altamente relacionada de lectinas tipo C que se debe de haber originado hace relativamente poco tiempo evolutivo, quizá después de la divergencia de humanos y ratones. La estructura y disposición de esta localización genómica, con genes altamente relacionados situados a muy poca distancia, es probable que haya ocurrido por eventos de duplicación génica (Caminschi et al., 2001).

Estructuralmente, todas las proteínas SIGNR contienen un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que comparte alrededor de un 65 % de similitud con el CRD de DC-SIGN humano, un cuello extracelular, un dominio transmembrana y una región intracelular, a excepción de CD209c (SIGNR2) que se expresa como soluble ya que carece de dominio transmembrana y región intracelular y SIGNR6 que es un pseudogen (ver Figura 1.6).

Según su patrón de expresión, CD209a es el único de los genes parálogos presente abundantemente en células dendríticas, por lo que se identificó como el homólogo "*bona-fide*" de DC-SIGN humano y se propuso su designación como mDC-SIGN (Caminschi et al., 2001; Park et al., 2001). Adicionalmente, también se detectó

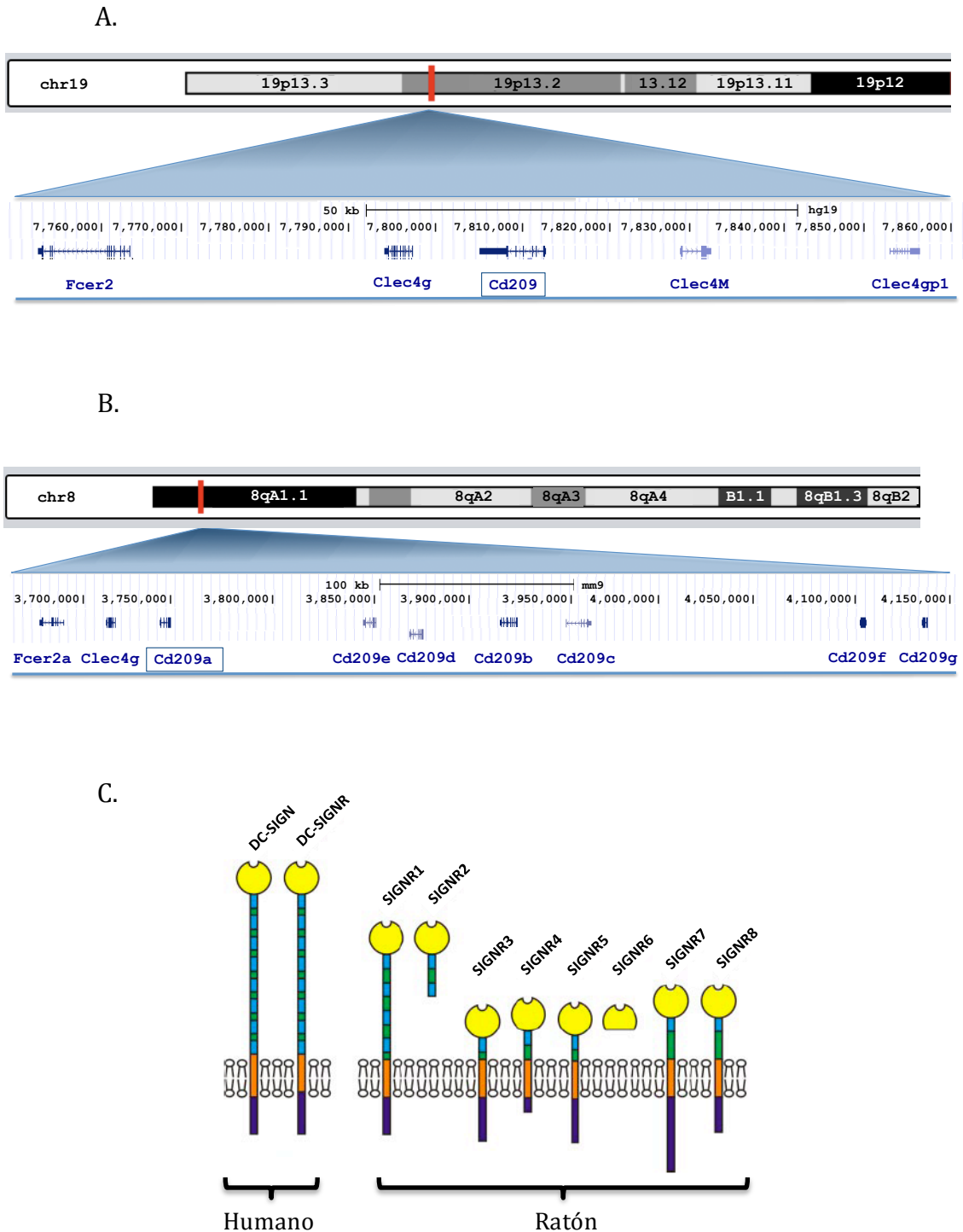


Figura 1.6. Localización genómica y estructura proteica de CD209.

Panel A. Localización del gen CD209 en el cromosoma 19 del genoma humano (versión GRCh37/hg19) según *UCSC Genome Browser*.

Panel B. Localización de los genes de la familia CD209 en el cromosoma 8 del genoma murino (versión NCBI37/mm9) según *UCSC Genome Browser*.

Panel C. Representación esquemática de los dominios de la familia CD209/SIGNR en humano y ratón. En azul se representan segmentos que se repiten a lo largo del cuello del receptor mientras que en verde se representan dominios variables. Según Powlesland et al., 2006.

expresión de CD209b y CD209d en células dendríticas, pero a mucho menor nivel (Park et al., 2001).

La función principal de los componentes de la familia SIGNR es el reconocimiento de carbohidratos. Powlesland y colaboradores estudiaron la habilidad relativa de manosa y fucosa para competir por la unión de casi todos los componentes de la familia SIGNR. Según sus resultados, los miembros de SIGNR con unión preferente a fucosa serían DC-SIGN humano (CD209), SIGNR1 (cd209b), SIGNR3 (cd209d) y SIGNR7 (cd209g), mientras que los que presentan unión preferente a manosa serían DC-SIGNR humano (CD209L), SIGNR5 (cd209a, DC-SIGN) y SIGNR8 (cd209f). En este contexto, los autores sugieren que, según su unión a carbohidratos, CD209a recuerda más a DC-SIGNR y CD209b a DC-SIGN (Powlesland et al., 2006).

CD209b (SIGNR1) es quizá la proteína más estudiada de los homólogos, gracias en parte a que se identificó como el antígeno que reconoce el anticuerpo monoclonal ER-TR9 (Kang et al., 2003). SIGNR1 se expresa en macrófagos de la zona marginal y macrófagos peritoneales, y colabora en la captura de patógenos como *Streptococcus pneumoniae* inyectados vía intraperitoneal (Lanoue et al., 2004) o vía intranasal (Koppel et al., 2005). También se ha relacionado con el efecto terapéutico de la inmunoglobulina intravenosa (IVIG, *IntraVenous ImmunoGlobulin*) en enfermedades como la púrpura trombocitopénica idiopática (Anthony et al., 2008b).

1.4.5.a CD209a como marcador celular.

En humanos, DC-SIGN está presente en células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs) (Bergman et al., 2004; Geijtenbeek et al., 2000b) y se ha propuesto también como marcador de macrófagos M2 (Verreck et al., 2006).

En ratones, CD209a se ha mostrado útil para distinguir entre Mo-DCs y DCs clásicas en suspensiones celulares y en secciones de tejido (Cheong et al., 2010), lo que tiene implicaciones importantes para entender las funciones de estas células. De manera consistente, en otro estudio con células aisladas de bazo, se detectó la expresión de CD209a a nivel de ARNm en pDC y DC CD11b⁺, pero no en DCs CD8a⁺, células mieloides, NK, T CD8⁺, T CD4⁺ o células B (Robbins et al., 2008).

1.4.5.b Control transcripcional de DC-SIGN/CD209a.

En humanos, la expresión de DC-SIGN depende de IL-4 (Relloso et al., 2002; Teles et al., 2010) y está regulada por PU.1 (Dominguez-Soto et al., 2005). En ratones, aunque la expresión de CD209a no se ha estudiado en detalle, existe un precedente donde se describe cómo su expresión aumenta en respuesta a GM-CSF e IL4 (Cheong et al., 2010), pero su regulación por PU.1 no ha sido estudiada.

Por otro lado, aunque se ha descrito que la estimulación con LPS moviliza las Mo-DCs CD209a⁺ CD206⁺ en ratones *in vivo* (Cheong et al., 2010), tanto el LPS como el TNF α disminuyen la expresión de DC-SIGN/CD209a en ratones y humanos *in vitro* (Caminschi et al., 2001; Geijtenbeek et al., 2000b). La explicación probablemente resida en la activación de las células T, las cuales median en la producción *in vivo* de Mo-DCs CD209a⁺, en un proceso mediado por CD40L (Davidson et al., 2013).

1.5 Órganos Linfoides.

Los órganos linfoides se clasifican funcionalmente en dos tipos: primarios y secundarios. Los primarios suministran el microambiente necesario para la maduración de los linfocitos, mientras que los secundarios facilitan el encuentro con el antígeno. Los distintos órganos linfoides están interconectados por vasos sanguíneos y linfáticos, de modo que forman una red unitaria. Los órganos linfoides primarios son el timo, donde se producen las células T, y la médula ósea, donde se producen las células B. Los órganos linfoides secundarios son los ganglios, el tejido asociado a mucosas y el bazo.

1.6 El Bazo.

El bazo es el principal órgano linfoide secundario, tanto en tamaño como en funcionalidad. Además, es el único que se encuentra intercalado en el torrente circulatorio. En él se produce la captura y procesamiento de antígenos y su presentación a las células T para empezar la respuesta adaptativa. A parte de su función inmunitaria, el bazo desempeña otras funciones como eliminar los eritrocitos senescentes para el reciclaje del hierro de su grupo hemo, actuar de reservorio de sangre liberada en caso de hipovolemia, y constituir un reservorio de determinados tipos celulares como plaquetas y monocitos (Bronte and Pittet, 2013; Swirski et al., 2009).

El bazo se encuentra recubierto por un tejido conjuntivo capsular, que se reúne en un cordón llamado hilio a través del que entran y salen los vasos sanguíneos. La vascularización del bazo se organiza, en esencia, como un “árbol” de arterias denominadas branquiales, procedentes de una arteria esplénica que después se ramifica en pequeñas arteriolas, las cuales terminan en un sistema sinusoidal venoso (Mebius and Kraal, 2005). Esta especial vascularización, en la que interviene un sistema sinusoidal abundante, permite al bazo desempeñar una eficaz tarea de captura de las células rojas senescentes y posibles antígenos presentes en la sangre.

El parénquima esplénico se denomina pulpa, y puede ser de dos tipos: la pulpa blanca y la pulpa roja, distinguibles a simple vista. En medio, se organiza la llamada zona marginal, distinguible sólo con ayuda de un microscopio (ver Figura 1.7).

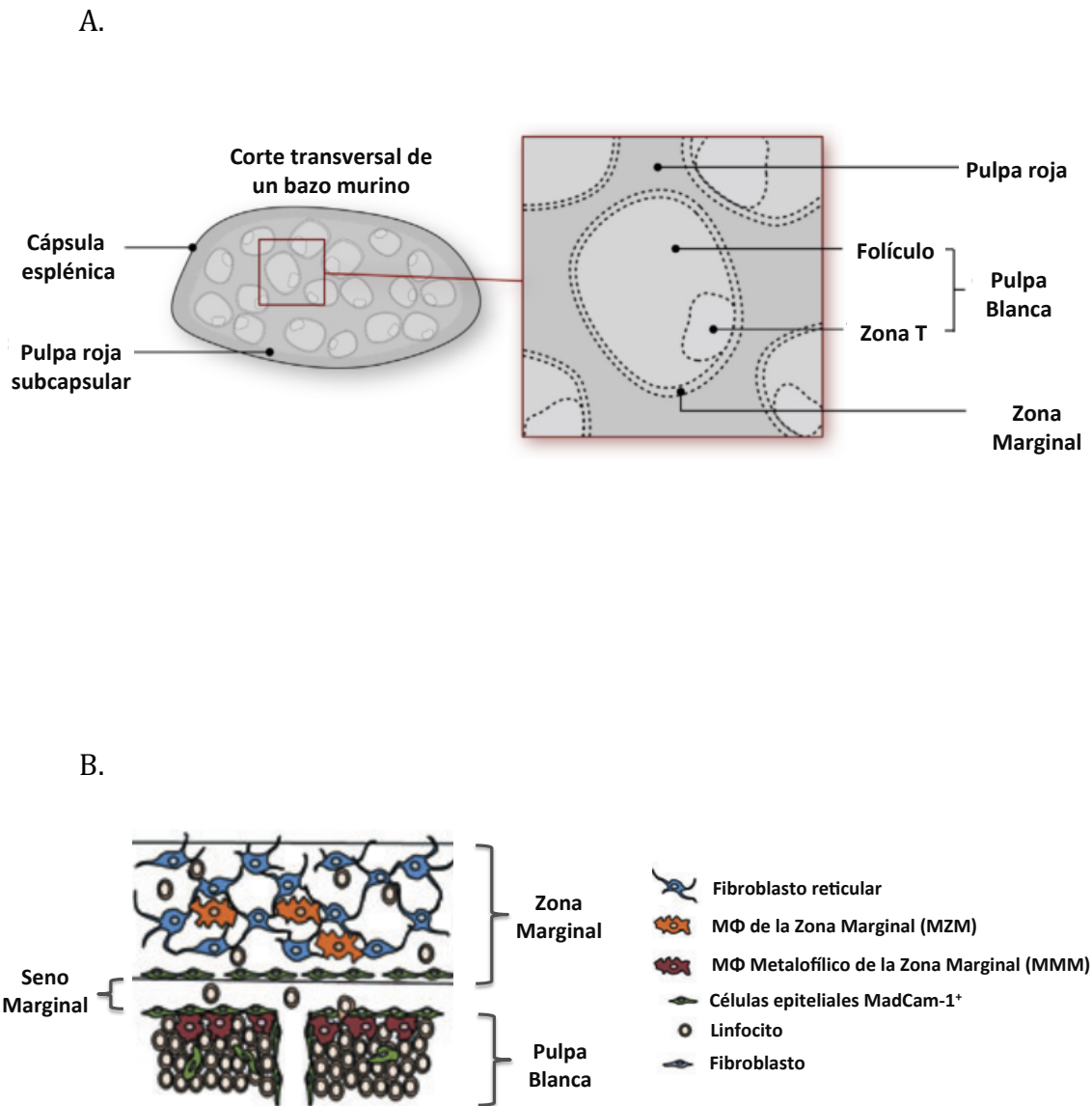


Figura 1.7. Ultraestructura del bazo murino.

Panel **A**. Representación de la organización microscópica del bazo en la que se destaca la cápsula, pulpa roja, zona marginal y pulpa blanca. Según Bronte and Pittet, 2013.

Panel **B**. Representación de los tipos celulares más abundantes de la zona marginal del bazo, seno marginal y pulpa blanca. Según O'Neill et al., 2013.

1.6.1 Pulpa Blanca.

La arteria esplénica aferente se encuentra rodeada de zonas de linfocitos T y a su vez las arteriolas se rodean por linfocitos B organizados en folículos. Estas zonas de tejido linfoide forman lo que se denomina la pulpa blanca del bazo. La pulpa blanca es estructuralmente similar a un nódulo linfático, con un compartimento de linfocitos B y T además de células reticulares y un subtipo de células dendríticas conocidas como células dendríticas foliculares. Los linfocitos T se organizan en forma de vainas de linfocitos T periarteriolas conocidas como PALS (*Periarteriolar Lymphoid Sheath*). Estas células T reconocen los antígenos presentados por las células dendríticas y linfocitos B, promoviendo la generación de anticuerpos. Los folículos de linfocitos B se sitúan alrededor de estas zonas T, y es el lugar en el que ocurre el proceso de expansión clonal una vez el linfocito B entra en contacto con el antígeno. La organización y mantenimiento de la pulpa blanca está controlada por ciertas quimioquinas que atraen a los linfocitos B y linfocitos T a sus zonas específicas dentro de la pulpa blanca (Mebius and Kraal, 2005). Al igual que en otros órganos linfoides secundarios, existen poblaciones de macrófagos en las zonas T y las zonas B que se denominan macrófagos de la pulpa blanca, y que se caracterizan por ser F4/80^{lo/-}CD68⁺Tim-4⁺. En las zonas B, también denominadas centros germinales, que son lugares en los que ocurre la proliferación, diferenciación y maduración de los linfocitos B, estos macrófagos reciben el nombre de *Tingible Body Macrophages* (TBM) (den Haan and Kraal, 2012).

Las arteriolas pequeñas vierten al espacio marginal, área entre la pulpa blanca y la zona marginal, mientras que otras atraviesan la zona marginal y se introducen en la pulpa roja, donde pasan a formar parte del sistema venoso.

1.6.2 Pulpa Roja.

En la pulpa roja la sangre fluye a través de sinuoides, que constituyen un sistema sanguíneo abierto sin lámina endotelial entre los que se encuentran los cordones de Billroth constituidos por fibroblastos y fibras reticulares (Groom et al., 1991). Este sistema abierto con una organización reticular permite la retención de los eritrocitos viejos que presentan membranas menos flexibles, impidiendo su retorno al torrente sanguíneo a través de la vena colectora. Los macrófagos de la pulpa roja F4/80⁺CD68⁺ están especializados en la fagocitosis de los eritrocitos retenidos, iniciándose el proceso de reciclado del hierro (Kohyama et al., 2009).

1.6.3 Zona Marginal.

La zona marginal (MZ) se describe histológicamente como una capa celular rodeando a la pulpa blanca, cuyo límite lo marcan células epiteliales MadCAM-1⁺ (Kraal, 1992). Su presencia se describió por primera vez en 1929 por Ward J. MacNeal (MacNeal, 1929), quien ya subrayó su importancia en la fagocitosis. Quizá la característica anatómica más llamativa de la zona marginal es la presencia de un seno o espacio marginal en el que vierten muchos vasos sanguíneos. Esto permite que la mayor parte de la sangre que entra al bazo sea cribada por varios tipos celulares residentes, incluyendo dos subtipos de macrófagos y una población de linfocitos B (ver Figura 1.7).

Los dos subtipos de macrófagos especializados se denominan macrófagos de zona marginal (MZM) y macrófagos metalofílicos de zona marginal (MMM) y se caracterizan por ser CD68⁺F4/80^{low}. Ambos expresan un amplio conjunto de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que les permiten fagocitar patógenos y empezar la respuesta innata. Por ejemplo, en un estudio se estableció que los macrófagos de la zona marginal (MZM y MMM) son necesarios para generar respuestas T-CD8⁺ en un modelo de infección viral intravenosa (Hu et al., 2011). Además, parecen estar relacionados con la captura de células apoptóticas y la autotolerancia. Mediante la depleción de los macrófagos de la zona marginal, la inyección de células apoptóticas asociadas con autoantígenos concretos y la posterior inducción de un síndrome autoinmune (EAE) en ratones normales, se comprobó que aquellos ratones que no tenían macrófagos en la zona marginal presentaban una menor tolerancia inmunitaria y desarrollaban la enfermedad antes (Miyake et al., 2007), lo que se ha demostrado en otros modelos como lupus eritematoso sistémico (McGaha et al., 2011). Así, los autores sugieren un papel regulador para los macrófagos de zona marginal de la respuesta inmunitaria a antígenos asociados a células apoptóticas.

Los MMM se identificaron por primera vez en 1964 por Snook (Snook, 1964) y se diferencian fenotípicamente de los MZM y de los macrófagos de la pulpa roja en la expresión de la molécula Sialoadhesina (Sn). La Sialoadhesina es un miembro de la familia de las lectinas tipo-inmunoglobulina que unen ácido siálico, (Siglec-1, *Sialic acid-binding Ig-like Lectin*) que se describió originalmente como un receptor de eritrocitos (Crocker and Gordon, 1989) y está codificada por el gen CD169. Previamente, y de manera independiente, se había desarrollado otro anticuerpo denominado MOMA-1 que reconocía específicamente los MMM (Kraal and Janse, 1986) y que posteriormente se comprobó que reconocía la misma molécula de Sialoadhesina (Oetke et al., 2006a). La Sialoadhesina está involucrada en la activación de las células T, ligando la inmunidad innata a la adquirida (Backer et al., 2010; Jiang et al., 2006; Oetke et al., 2006b). Recientemente, se ha descubierto el rol de los MMM en la fagocitosis de exosomas a través de Sialoadhesina (Saunderson et al., 2014). Los exosomas son vesículas circulantes que contienen autoantígenos y que podrían intervenir en la regulación de la respuesta inmunitaria frente a autoantígenos, incluyendo tumores (Saunderson et al., 2014).

Los macrófagos de zona marginal, MZM, se sitúan en forma de anillo compuesto por dos o tres capas celulares alrededor de los MMM y el espacio o seno marginal. Estos macrófagos se distinguen fenotípicamente por la expresión de las moléculas SIGN-R1, que es una lectina tipo-C homóloga a la molécula DC-SIGN en humanos, MARCO, que es un receptor *Scavenger* de tipo-I y TIM-4, una glicoproteína que une fosfatidilserina de células apoptóticas.

Los MZM presentan una gran actividad fagocítica que, unido a su ubicación en la zona marginal, les confiere un papel esencial en la retirada de patógenos y antígenos transportados por la sangre (Geijtenbeek et al., 2002). En concreto, la molécula SIGN-R1 presenta una gran afinidad en el reconocimiento e internalización de polisacáridos de

dextrano, los cuales están presentes en algunas bacterias (Geijtenbeek et al., 2002; Kang et al., 2004, 2003). La ausencia de expresión de MHC clase II en estas células y su gran actividad en el reconocimiento y fagocitosis de patógenos y antígenos, podrían parecer antagónicos ya que tras la fagocitosis de esos antígenos debería haber un procesamiento y presentación de los mismos para generar la respuesta inmunitaria frente a ellos. Se piensa que los MZM internalizan los patógenos y, más tarde, los productos de degradación se desprenden de la superficie de la célula y son captados por linfocitos B de zona marginal que migran al interior del folículo y los presentan, provocando así el inicio de la respuesta inmunitaria (Geijtenbeek et al., 2002). Por tanto, existe una interdependencia entre los macrófagos y los linfocitos B de zona marginal en la generación de la respuesta inmunitaria.

Los linfocitos B de zona marginal (MZB) se distinguen de los linfocitos B de la pulpa blanca en que no forman folículos, capturan antígenos transportados en la sangre mediante receptores de complemento y promueven respuestas inmunitarias dependientes e independientes de células T (Cinamon et al., 2008; Fagarasan, 2000; Pillai and Cariappa, 2009). Tanto las células B foliculares como las MZB expresan el receptor CXCR5, y por tanto tienen capacidad de respuesta a CXCL13, que atrae a las células B al folículo. Sin embargo, las MZB presentan altas cantidades de receptores S1PR1 y S1PR3. La unión de esfingosina 1 fosfato (S1P) a estos receptores induce la acumulación de MZB en la MZ y la pulpa roja, donde S1P se encuentra en altas concentraciones (Cinamon et al., 2004). La expresión de integrinas como VLA-4 y LFA-1 en las MZB facilita su fijación en el torrente circulatorio de la MZ. Sin embargo, estas células no son sésiles, sino que se mueven continuamente entre la MZ y los folículos. Esto se ha visto gracias a técnicas de microscopía intravital, y el mecanismo subyacente parece ser la desensibilización transitoria de S1PR1 hacia su ligando (que permite la migración desde la MZ al folículo), seguida por una resensibilización (que permite la migración de vuelta a la MZ). Este proceso de desensibilización cíclico está regulado por GRK2, y explica la entrada de los MZB al folículo en contra de gradiente de S1P (Arnon et al., 2013, 2011). Allí pueden presentar el antígeno, iniciándose la respuesta inmunitaria humoral (Cinamon et al., 2008). Adicionalmente, las MZB parecen desempeñar un papel estructural en la retención de los MZM mediante la interacción con el receptor MARCO, expresado en estos macrófagos (Karlsson et al., 2003). Esta función de retención de las células parece ser recíproca, y por tanto, habría una cierta interdependencia entre los linfocitos B y los macrófagos de zona marginal.

Por último, algunos estudios llevados a cabo en los últimos años relacionan los macrófagos de la zona marginal con el desarrollo y el tratamiento de las enfermedades autoinmunes. La administración en ratones de IgG intravenosa, IVIG, sustancia que se administra con éxito en clínica para combatir los síntomas de la Artritis Reumatoide y de la Púrpura Trombocitopénica Idiopática (ITP), reveló que estas inmunoglobulinas estaban dirigidas específicamente a los macrófagos de zona marginal (Anthony et al., 2008b). Concretamente, son las moléculas de SIGNR1 las que se proponen como receptores de esta sustancia y las que serían responsables del inicio de la supresión inflamatoria promovida por la administración del IVIG (Anthony et al., 2008b).

1.7 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

Los factores de transcripción (TF, *Transcription Factors*) son proteínas que regulan la expresión génica de la célula en respuesta a las señales del medio que le rodea. En un organismo pluricelular con diferentes tipos celulares, los factores de transcripción juegan un papel importante en la activación y regulación del conjunto génico característico de cada linaje celular.

Por ejemplo, el factor de transcripción c-Myb es necesario para la producción de HSC fuera del saco vitelino. La mutación de este gen genera una anemia severa en los fetos a partir del día 15 de gestación, momento en el que cesa la hematopoyesis en el saco vitelino y empieza la hematopoyesis adulta definitiva (Mucenski et al., 1991). Sin embargo, no interfiere en el desarrollo de una línea precursora de macrófagos c-Myb-independiente (Clarke et al., 2000), que finalmente dará lugar a los macrófagos tisulares (Schulz et al., 2012).

Por otro lado, varios estudios han destacado la importancia de los factores de transcripción determinantes de linaje (LDTF, *Lineage-Determining Transcription Factors*), también denominados factores pioneros o reguladores principales, en la selección de *enhancers* específicos de tipo celular (Garber et al., 2012; Trompouki et al., 2011). Los *enhancers* no son más que regiones del ADN donde los factores de transcripción se pueden unir y regular la expresión génica. Según el modelo actual, la unión de los LDTFs a los *enhancers* predispone a esa región de ADN mediante modificaciones histónicas en regiones reguladoras *cis* activas. Estas modificaciones permiten la unión de TFs dependientes de señal (SDTF, *Signal-Dependent Transcription Factors*), que finalmente regulan la expresión génica (Ghisletti et al., 2010; Heinz et al., 2010; Mullen et al., 2011). Los patógenos parecen haber descubierto hace tiempo esta regulación de la cromatina en su carrera armamentística, pues presentan mecanismos para intentar usarla a su favor (Arbibe, 2008), por lo que esta regulación se está empezando a investigar en autoinmunidad y cáncer (Woan et al., 2012). El modelo propuesto podría explicar 1) por qué TFs diferentes tienden a colocalizar en el genoma en un mismo tipo celular, 2) por qué el mismo TF presenta patrones de unión al genoma diferentes en distintos tipos celulares (Heinz et al., 2010).

Diversos estudios han identificado a PU.1 y C/EBP α como LDTFs importantes en el desarrollo mielo-monocítico (Friedman, 2007; Heinz et al., 2013, 2010; Schulz et al., 2012).

PU.1 (*PUrine-rich box 1*, codificado por el gen Spi-1) es un factor de transcripción de la familia ETS (*E-Twenty Six*), que puede regular la expresión génica mediante la unión a motivos ETS canónicos u otros sitios gracias a su interacción con otros factores de transcripción, como Irf4, Irf8, C/EBP α , C/EBP β y c-Jun (Carotta et al., 2010). En células mieloides, PU.1 se encuentra en las regiones reguladoras de prácticamente todos los genes analizados, incluyendo receptores de citoquinas (CSF1R y CSF2R), marcadores de superficie (CD11b, CD18, CD45, FcRs), y enzimas con acción

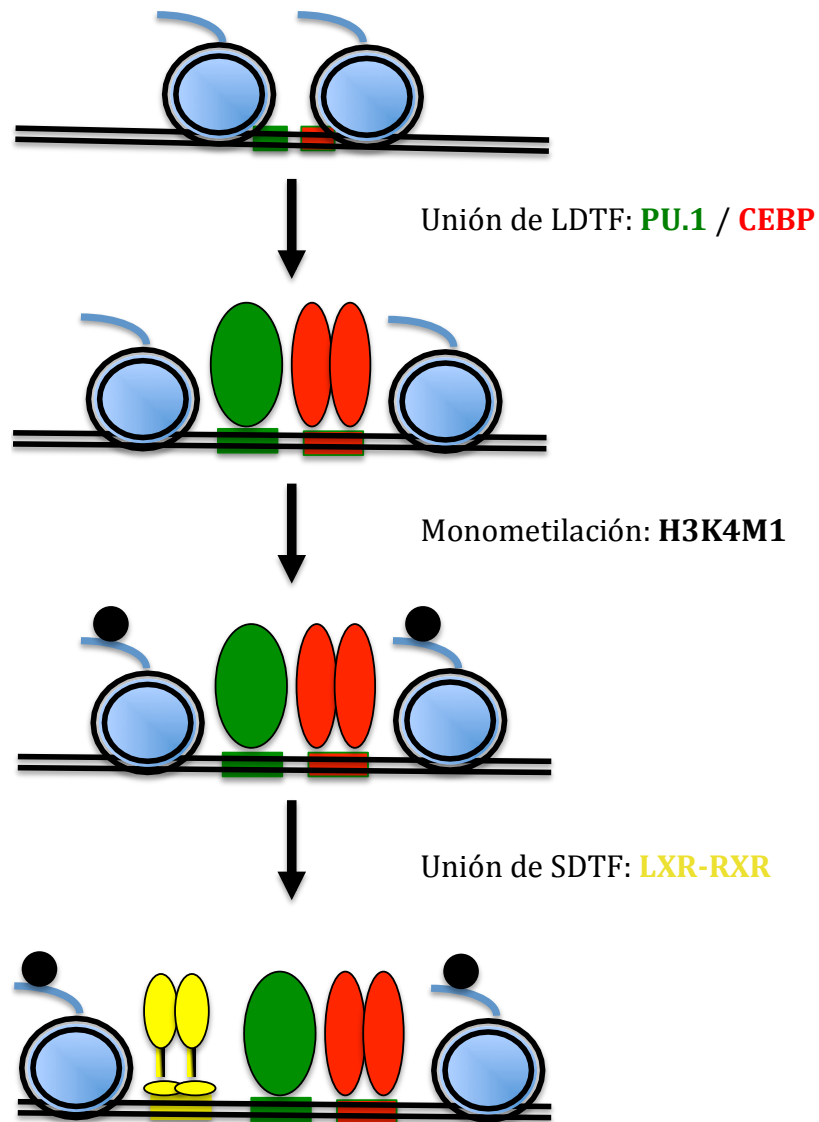


Figura 1.8. Modelo por el que los factores de transcripción determinantes de linaje modifican la cromatina y permiten la unión de factores de transcripción dependientes de señal.

La unión de los factores de transcripción determinantes de linaje (LDTF) como PU.1 y CEBP a *enhancers* abren la cromatina y facilitan la monometilación de la lisina 4 de las histonas (H3K4Me1). Esta modificación permite la unión de factores de transcripción dependientes de señal (SDTF), como LXR-RXR. Modificado de Heinz et al., 2010.

microbicida como gp91 (Carotta et al., 2010). Efectivamente, mediante la técnica del ChIP-Seq se identifican unos 45.000 sitios de unión de PU.1 al genoma de macrófagos (Ghisletti et al., 2010; Heinz et al., 2010). Los ratones PU.1^{-/-} carecen de linfocitos B y monocitos, y presentan un menor número de neutrófilos (McKercher et al., 1996; Scott et al., 1994). Por otro lado, las células mieloides presentan mayores niveles de PU.1 que las células linfoides, y la introducción de PU.1 en progenitores linfoides los redirige hacia el linaje monocítico (DeKoter and Singh, 2000).

C/EBP α (*CCAAT/Enhancer Binding Protein*) es un factor de transcripción de la familia C/EBP, cuyos miembros forman homo o heterodímeros a través de una cremallera de leucina y se unen al ADN a través de una región de carácter básico (Miller et al., 2003). C/EBP α puede formar heterodímeros con PU.1 (Carotta et al., 2010) y miembros de las familias CREB (Shuman et al., 1997) y AP-1 (Hong et al., 2011), y se ha demostrado que, al igual que PU.1, regula los genes de CSF1R y CSF2R, y el propio gen para PU.1 (Kummalu and Friedman, 2003). Mediante ChIP-Seq, se identifican unos 40.000 sitios de unión de C/EBP α , un 35 % de ellos situados a menos de 100pb de PU.1 (Heinz et al., 2010). Ratones C/EBP α ^{-/-} recién nacidos presentan monocitos pero carecen de granulocitos, mientras que los adultos carecen tanto de monocitos y granulocitos debido a un defecto en la formación del progenitor de granulocitos y monocitos (GMP, *Granulocyte-Monocyte Progenitor*) (Heath et al., 2004; Zhang et al., 1997).

PU.1 y C/EBP α presentan funciones diferentes en cuanto a la determinación del linaje monocito/granulocito, siendo PU.1 esencial para la diferenciación de monocitos a expensas de la diferenciación granulocítica (Dakic et al., 2005) y antagonizando a C/EBP α (Dahl et al., 2003), que es esencial para el desarrollo de granulocitos (Zhang et al., 1997). A pesar de reprimir mutuamente el programa transcripcional del otro, es de destacar que es necesaria la presencia de ambos TFs para el normal desarrollo de monocitos y granulocitos. Así, ratones PU.1^{-/-} presentan menores niveles de neutrófilos (McKercher et al., 1996) y ratones C/EBP α ^{-/-} presentan defectos en el desarrollo de macrófagos (Heath et al., 2004). Además, en experimentos de expresión ectópica se ha observado que ambos TFs son necesarios para la reprogramación de células B (Xie et al., 2004), progenitores T (Laiosa et al., 2006) y fibroblastos (Feng et al., 2008) hacia macrófagos.

Una hipótesis para explicar esta aparente paradoja es el denominado sistema biestable, según el cual una célula progenitora (inestable en el tiempo) presenta bajos niveles de expresión de ambos TFs, que se encuentran correprimidos. Una pequeña diferencia en los niveles de expresión de uno de los dos TFs inclinará la balanza hacia uno de los dos destinos celulares posibles (estables): monocito o granulocito (Laslo et al., 2006; Muzzey and van Oudenaarden, 2006). Esto subraya la importancia de las moléculas con las que interacciona un TF para regular su función (Sieweke and Graf, 1998), incluido sus represores.

En cuanto a los TFs dependientes de señal, los cuales se unen a sitios del DNA primados por los LDTFs, los trabajos de Heinz et al. y Ghisletti et al. han identificado a los receptores LXR, NFκB, IRF y AP1 como pertenecientes a este grupo (Ghisletti et al., 2010; Heinz et al., 2010). Otros miembros podrían ser los componentes de la familia STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), que interviene en la respuesta a un amplio abanico de citoquinas y mediadores inmunitarios (Paukku and Silvennoinen, 2004; Stark and Darnell, 2012; Zhu et al., 2012).

Existen otros muchos factores de transcripción que se ha visto que presentan una función reguladora de células mieloides, pero cuya pertenencia al grupo de LFTFs o TFs dependientes de señal no se conoce. Ejemplos serían MafB, c-Maf (Auffray et al., 2009) e IRF8-KLF4 (Kurotaki et al., 2013), aunque hay muchos más (Jojic et al., 2013). Además, las bases transcripcionales que regulan la formación de subpoblaciones especializadas de macrófagos están aún empezando a conocerse. Recientemente, se ha descubierto que el factor de transcripción Spi-C es esencial para el desarrollo de los macrófagos de la pulpa roja del bazo (Kohyama et al., 2009). Los ratones IRF8^{-/-}, por otra parte, carecen de macrófagos residentes de la médula ósea, monocitos Ly6C⁺, y varios tipos de DCs y niveles reducidos de monocitos Ly6C⁻ (Kurotaki et al., 2013). Harán falta más estudios para comprobar si esta clasificación de los TFs según su función en el remodelado de la cromatina es correcta.

1.8 LXR.

Los Receptores X Hepáticos (LXR, *Liver X Receptors*) son Receptores Nucleares (NRs, *Nuclear Receptors*), una familia de TFs activados por ligando que regulan diferentes procesos tales como el desarrollo, la reproducción y el metabolismo. Gracias a su actividad ligando-dependiente, los NRs actúan a modo de puente entre las señales del ambiente que rodea a la célula y su genoma.

A nivel de proteína, los miembros de la familia de los NRs presentan una organización en seis dominios (A-F) bastante conservada (ver Figura 1.9), con una región N-terminal (A/B) que contiene un motivo activador ligando-independiente (AF-1, *Activation Function 1*), un dominio (C) de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*), una región intermedia (D) de longitud variable que actúa a modo de bisagra (*hinge region*), un dominio (E) de unión a ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) que incluye un motivo activador ligando-dependiente (AF-2, *Activation Function 2*) y una región C-terminal (F) de longitud variable y función poco conocida (Bevan et al., 1999; Olefsky, 2001).

Los receptores nucleares se pueden subdividir en tres grupos en función de sus ligandos endógenos: los receptores de hormonas esteroideas, los receptores “huérfanos” y los receptores “huérfanos adoptados”. El primer grupo que se describió fue el de los receptores esteroideos clásicos, familia que incluye los receptores de estrógenos, progesterona, andrógenos o glucocorticoides. Posteriormente se identificó un nuevo grupo

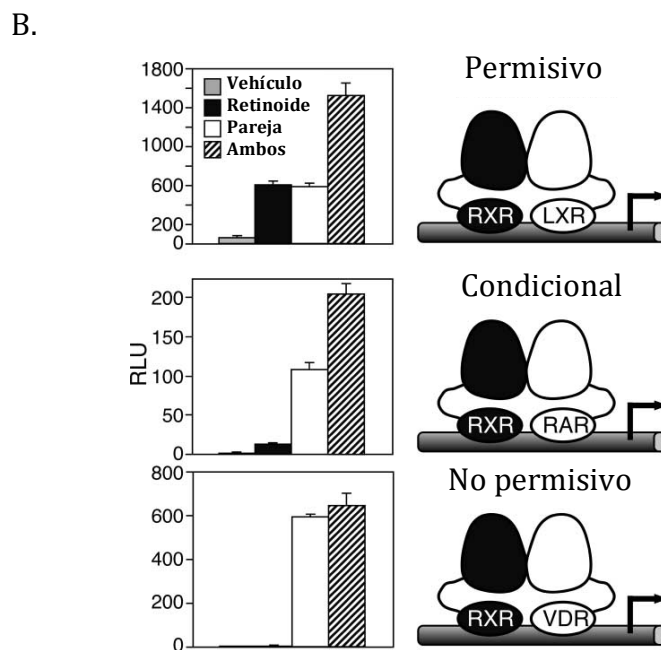
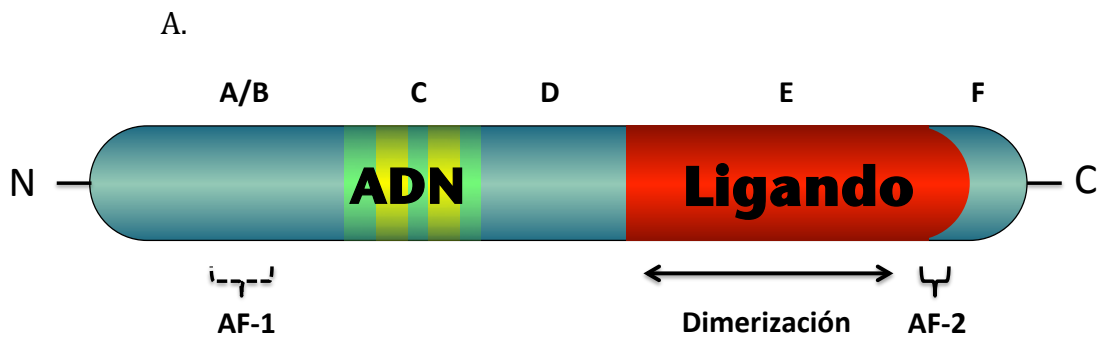


Figura 1.9. Esquema de la organización en dominios de un receptor nuclear y mecanismos de acción de heterodímeros RXR.

Panel A. Los miembros de la familia de los NRs presentan una organización en seis dominios (A-F) bastante conservada, con una región N-terminal (A/B) que contiene un motivo activador ligando-independiente (AF-1, *Activation Function 1*), un dominio (C) de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*), una región intermedia (D) de longitud variable que actúa a modo de bisagra (*hinge region*) y un dominio (E) de unión a ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) que incluye un motivo activador ligando-dependiente (AF-2, *Activation Function 2*) y un una región C-terminal (F) de longitud variable y función poco conocida. Modificado de Olefsky, 2001.

Panel B. Se muestra la expresión prototípica de células transfectadas con un plásmido de expresión estimuladas con los ligandos indicados, según los datos recopilados por Shulman et al., 2004.

Arriba: RXR-LXR como ejemplo de heterodímero permisivo. Se usó el LG268 (10nM) como ligando de RXR y T0901317 (1µM) como ligando de LXR.

Centro: RXR-RAR como ejemplo de heterodímero condicional. Se usó el LG268 (10nM) como ligando de RXR y TTNPB (10nM) como ligando de RAR.

Abajo: RXR VDR como ejemplo de heterodímero no permisivo. Se usó el LG268 (100nM) como ligando de RXR y 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ (100nM) como ligando de VDR.

RLU = unidades de luz relativas (*Relative Light Units*).

de receptores nucleares, mediante clonaje por homología de secuencia con estos receptores clásicos, pero sus ligandos específicos no eran conocidos, por lo que fueron denominados receptores "huérfanos" (Mangelsdorf and Evans, 1995). Los receptores "huérfanos adoptados" son originalmente "receptores huérfanos" cuyos ligandos y función se ha conseguido descubrir con la ayuda de métodos genómicos, estructurales o químicos. En muchos casos, los ligandos endógenos han resultado ser productos o intermediarios de rutas metabólicas (Blumberg and Evans, 1998). Los receptores LXR se encuadran dentro de este grupo. Otros miembros son los Receptores X de Farnesoide (FXR, *Farnesoid X Receptors*) y los Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPAR, *Peroxisome Proliferator-activated Receptors*) (Mangelsdorf and Evans, 1995).

1.8.1 Mecanismo de Acción.

Todos los receptores "huérfanos adoptados" presentan una localización constitutivamente nuclear y se unen al ADN formando heterodímeros con otro receptor "huérfano adoptado" denominado Receptor X de Retinoides (RXR, *Retinoid x Receptor*). Los heterodímeros RXR se unen en las regiones reguladoras de los genes a repeticiones denominadas elementos de respuesta a hormonas (HRE, *Hormone Response Element*), que constan de dos secuencias de reconocimiento dispuestas en el mismo sentido, y se denominan repeticiones directas (DR, *Direct Repeats*). La secuencia canónica de las repeticiones es AGGTCA. El número de bases que separa los dos motivos determina la especificidad de la unión de distintos heterodímeros y homodímeros. Por ejemplo, los heterodímeros PPAR-RXR se unen preferentemente a repeticiones directas separadas por una base (DR-1), mientras que los heterodímeros LXR-RXR se unen a repeticiones separadas por cuatro bases (DR-4) (Glass and Ogawa, 2006; Mangelsdorf and Evans, 1995).

En ausencia de ligando, se cree que los heterodímeros se encuentran unidos al ADN acomplejados con proteínas represoras, como por ejemplo SMRT (*Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor*) y NCoR (*Nuclear receptor CoRepressor*). En estas condiciones, la actividad transcripcional de los genes se encuentra reprimida. La unión del ligando induce un cambio conformacional que desplaza al represor, facilita la interacción con moléculas coactivadoras tales como el coactivador del receptor de esteroides (SRC, *Steroid Receptor Coactivator*) y promueve la transcripción de genes diana (Ghisletti et al., 2009; O'Malley et al., 2008). Además, existe una tercera vía de modulación de la transcripción denominada transrepresión, según la cual los heterodímeros pueden inhibir la actividad transcripcional de otros TFs mediante una unión proteína-proteína, sin necesidad de unión al ADN (Glass and Saijo, 2010). Se ha descrito la relevancia de este fenómeno en la inhibición por parte de LXR y PPAR γ de genes proinflamatorios dependientes de TLR4, en un proceso dependiente de SUMOilación (SUMO, *small ubiquitin-like modifier*) (Ghisletti et al., 2007).

Por otro lado, la capacidad de RXR de unir ligandos confiere a los heterodímeros el potencial de activarse por agonistas de RXR y por ligandos del otro miembro del heterodímero (Chawla et al., 2001b). Según su respuesta a ligandos, se puede clasificar los heterodímeros de RXR en tres categorías: permisivos, condicionales y

no permisivos (ver Figura 1.9). En los heterodímeros permisivos, los ligandos de ambos miembros son capaces de activar la transcripción, y en combinación actúan sinérgicamente. Un ejemplo es RXR-LXR. En los heterodímeros condicionales, la respuesta es similar al permisivo pero con la diferencia que el ligando de RXR en solitario tiene nulo o escaso efecto, pero en combinación actúa sinérgicamente. Un ejemplo es RXR-RAR. En los heterodímeros no permisivos sólo se observa activación con el ligando de uno de los miembros, pero en combinación no se observa efecto sinérgico. Un ejemplo es RXR-VDR (Shulman et al., 2004).

A concentraciones fisiológicas, varias formas modificadas de colesterol tales como 22-(R), 24-(S) y 27-hidroxicolesterol y 24(S), 25-epoxicolesterol actúan como ligandos naturales de LXR, modulando su actividad transcripcional (Forman et al., 1997; Janowski, Willy et al., 1996; Lehmann et al., 1997). Altas concentraciones de D-glucosa y β -sitosterol también son capaces de actuar de ligandos de LXR (Mitro et al., 2007; Plat et al., 2005). Por otro lado, compañías farmacéuticas han generado potentes ligandos sintéticos como GW3965 de Glaxo Wellcome (Collins et al., 2002) y T0901317 de Tularik (Schultz et al., 2000) que han facilitado el estudio de las funciones biológicas de LXR. Además, al actuar como un heterodímero permisivo, los ligandos de RXR como el ácido 9-cis retinoico y el compuesto sintético LG100268 de Ligand Pharmaceuticals (Boehm et al., 1995) también modulan su actividad transcripcional (Shulman et al., 2004).

1.8.2 Metabolismo Lipídico.

Los receptores LXR tienen un papel importante en el metabolismo lipídico a varios niveles. Por un lado, regulan el transporte reverso de colesterol, incrementando la síntesis de ABCA1 (*ATP Binding Cassette transporter A1*) (Costet et al., 2000; Venkateswaran et al., 2000) y ABCG1 (Kennedy et al., 2001). Además, aumentan los niveles de colesterol HDL (*High-Density Lipoprotein*) (Miao et al., 2004) gracias a la expresión de las enzimas de remodelamiento de lipoproteínas como PLTP (*PhosphoLipid Transfer Protein*) (Laffitte et al., 2003), LPL (*LipoProtein Lipase*) (Zhang et al., 2001) y CETP (*CholesterylEster Transfer Protein*) (Luo and Tall, 2000) y apolipoproteínas como ApoE (*Apolipoprotein E*) (Laffitte et al., 2001) y ApoC (*Apolipoprotein C*) (Mak et al., 2002). Además, los receptores LXR promueven la eliminación del colesterol vía biliar mediante la inducción de la enzima limitante de la síntesis biliar, la colesterol 7 α hidroxilasa (CYP7A1, *CYtochrome P450 7A1*) (Lehmann et al., 1997) y los transportadores ABCG5 y ABCG8 (Repa et al., 2002). ABCG5 y ABCG8, además, disminuyen la absorción de colesterol de la dieta a nivel entérico (Repa et al., 2002).

Por otro lado, los receptores LXR regulan no sólo el transporte, sino también la síntesis de colesterol y de ácidos grasos. Así, ratones LXR $\alpha\beta^{-/-}$ presentan una deficiente expresión de SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*) (Repa, 2000), FAS (*Fatty Acid Synthase*) (Joseph et al., 2002), SCD-1 (*Stearoyl CoA Desaturase-1*) (Repa & Mangelsdorf, 2000) y ACC (*Acetyl CoA Carboxylase*) (Peet et al., 1998). SREBP-1c es un TF implicado en la regulación de la síntesis de colesterol y triglicéridos, mientras que FAS, SCD-1 y ACC son enzimas implicadas en la síntesis y modificación de ácidos

grasos, que junto con el glicerol constituyen el principal precursor de los triglicéridos. Se ha comprobado que la activación de LXR mediante ligandos sintéticos eleva los niveles de triglicéridos en el plasma y provoca esteatosis en el hígado, órgano importante en la lipogénesis (Repa, 2000; Schultz et al., 2000). Esta hipertrigliceridemia inducida por la activación de LXR constituye uno de los principales obstáculos para el desarrollo de tratamientos farmacológicos para la hipercolesterolemia basados en ligandos específicos de LXR (Miao et al., 2004).

1.8.3 Inflamación.

El macrófago es un fagocito profesional, capaz de fagocitar patógenos como bacterias y células propias dañadas o que deben ser eliminadas durante la morfogénesis del individuo (Pollard, 2009). Las células constan de una membrana altamente lipídica cuyos productos tras la fagocitosis afectarían a la viabilidad del macrófago en caso de acumularse en su interior. Los receptores LXR promueven la eliminación del exceso de componentes lipídicos y el transporte reverso mediante la inducción de transportadores como ABCA1, tal y como describimos en la sección anterior. Pero además, LXR juega un papel importante en otro aspecto fundamental de la biología del macrófago como es la respuesta inflamatoria. Así, la activación de LXR en macrófagos es capaz de inhibir la inducción de mediadores inflamatorios como iNOS, COX-2 e IL-3 y de remodelado tisular como MMP-9 en respuesta a LPS, IL-1 β y TNF- α (Castrillo et al., 2003; Joseph et al., 2003). De manera similar, los ratones LXR $\alpha\beta^{-/-}$ presentan una respuesta sistémica inflamatoria exacerbada *in vivo* cuando se les administra LPS intraperitonealmente (Joseph et al., 2003), o en un modelo de dermatitis alérgica (Fowler et al., 2003; Joseph et al., 2003), y esta respuesta se puede inhibir mediante agonistas de LXR en ratones WT (Fowler et al., 2003; Joseph et al., 2003).

Esta inhibición de la respuesta proinflamatoria se corresponde con un fenómeno de transrepresión, y a nivel molecular se puede explicar de la siguiente manera. El correpresor NCoR se encuentra de modo basal en las zonas promotoras de genes proinflamatorios, reprimiendo su expresión. Tras un estímulo proinflamatorio como es la señalización TLR3 o TLR4, NCoR se desplaza, lo que permite la expresión génica. Sin embargo, el ligando de LXR es capaz de inducir la SUMOilación de LXR, que se recluta a las zonas promotoras de genes proinflamatorios, donde impide el desplazamiento de NCoR. El resultado es que NCoR permanece unido y se observa una represión de la expresión génica, incluso ante estímulos TLR3 o TLR4 (Ghisletti et al., 2007).

1.8.4 Retirada de Células Apoptóticas.

Las células tienen una vida media limitada y necesitan renovarse frecuentemente para el correcto funcionamiento del organismo. Este proceso de renovación se debe hacer de forma coordinada y evitando la lisis de la célula, ya que el interior celular contiene sustancias que podrían ser detectadas como extrañas por el sistema inmunitario. Por eso, las células en el final de su vida útil entran en un proceso conocido como apoptosis o muerte celular programada, que es también de vital importancia durante el desarrollo embrionario o remodelado tisular, por ejemplo durante

la formación de los conductos lactíferos en mamíferos. La apoptosis se caracteriza por varios cambios celulares que incluyen la localización de señales en el exterior celular encaminadas a su retirada por parte de los macrófagos.

Recientemente, un trabajo de nuestro laboratorio ha mostrado que ratones $LXR\alpha\beta^{-/}$ presentan una fagocitosis normal de bacterias y esferas inertes, pero una fagocitosis deficiente de timocitos apoptóticos *in vitro*. Además, en ratones WT la fagocitosis de células apoptóticas se incrementa en respuesta a un tratamiento con ligando de LXR. Esto es debido a la inducción por parte de LXR de Mer, un receptor de células apoptóticas, que aumenta tanto *in vitro* como *in vivo* tras la activación farmacológica de LXR (Alonso-Gonzalez et al., 2009). Las propias células apoptóticas son capaces de activar a LXR, aumentando a su vez la fagocitosis de nuevas células apoptóticas en un mecanismo de tipo "feedforward" o prealimentación. Esta activación mediada por células apoptóticas es probable que sea debida a formas del colesterol presentes en las mismas, y que se liberen en el macrófago tras la fagocitosis. Además la activación de LXR promueve también el transporte reverso de colesterol y la inhibición de genes proinflamatorios, contribuyendo a la correcta eliminación de células propias. Así, ratones $LXR\alpha\beta^{-/}$ presentan una respuesta inflamatoria aberrante ante la retirada de células apoptóticas, lo que les puede predisponer a enfermedades autoinmunes. Por el contrario, la administración crónica de GW3965 a un modelo murino de lupus (los ratones $B6^{lpr/lpr}$), aminora la progresión de esta enfermedad (Alonso-Gonzalez et al., 2009). También se ha reportado la implicación de LXR en la retirada de células apoptóticas en humanos (Rébé et al., 2009).

1.8.5 Isoformas de LXR.

Existen dos genes de la subfamilia, denominados $LXR\alpha$ (codificada por el gen NR1H3) y $LXR\beta$ (codificada por el gen NR1H2), que comparten más de un 75 % de identidad en sus dominios DBD y LBD (ver Figura 1.10), tanto en ratones como en humanos (Tontonoz and Mangelsdorf, 2003).

$LXR\alpha$ se expresa abundantemente en el hígado, en el intestino, riñón, tejido adiposo y macrófago, mientras que $LXR\beta$ presenta un patrón de expresión ubicuo, habiéndose identificado en casi todos los tejidos examinados (Repa and Mangelsdorf, 2000). La expresión de $LXR\alpha$ puede ser inducida por ligandos de PPAR γ (Chawla et al., 2001a), ligandos de LXR (Whitney et al., 2001) e infecciones bacterianas (Joseph et al., 2004), mientras que $LXR\beta$ presenta un patrón de expresión constitutivo (Alonso-Gonzalez and Castrillo, 2011).

1.8.6 Acciones Específicas de Isoforma.

Ambas isoformas forman heterodímeros con RXR capaces de unirse a motivos DR-4 con una afinidad similar, y regulan prácticamente el mismo set de genes diana (Alonso-Gonzalez and Castrillo, 2011). Sin embargo, como ya hemos indicado, las dos isoformas presentan un patrón de expresión diferente. Como $LXR\alpha$ es la forma

predominante en hígado, lugar donde se lleva a cabo la lipogénesis, y LXR β se expresa de manera ubicua y tiene teóricamente más peso en el transporte reverso del colesterol, se están buscando agonistas LXR β específicos para aumentar el transporte reverso del colesterol sin aumentar la lipogénesis hepática (Lund et al., 2006; Miao et al., 2004).

Por otro lado, varios estudios parecen indicar que LXR α podría ser la principal isoforma funcional de macrófagos, mayormente en cuanto a la regulación de su función inmunitaria. Por ejemplo, se ha demostrado que LXR α es primordial en la supervivencia de los macrófagos a la infección por *Listeria monocytogenes* (LM) (Joseph et al., 2004). Este efecto está mediado por la inducción del gen antiapoptótico AIM/Spa (*Apoptosis Inhibitor expressed by Macrophages*, Aim/Spa) (Miyazaki et al., 1999) que es un gen diana exclusivo de LXR α (Joseph et al., 2004; Valledor et al., 2004). Otro gen diana regulado por LXR α en macrófagos es SCD-1 (Erbay et al., 2009), que media en la resistencia a la muerte celular inducida por sobrecarga de lípidos, en un proceso mediado por estrés del retículo endoplásmico y que termina en apoptosis (Erbay et al., 2009). LXR α también reduce los efectos proaterogénicos de *Chlamydia pneumoniae* en un modelo de aterosclerosis (Naiki et al., 2008), es más eficiente que LXR β en la inducción de Arginasa I (Pourcet et al., 2011) y mediante aproximaciones transcriptómicas se ha identificado como uno de los TFs reguladores de macrófagos (ver tablas suplementarias 11 y 13 de Jojic et al., 2013). Por otro lado, se ha descubierto que LXR α es importante en hígado para la homeostasis de los niveles de colesterol (Zhang et al., 2012).

LXR β , por su parte, podría ser más importante en el control lipídico y proliferación. Así, LXR β interacciona directamente con ABCA1 (Hozoji et al., 2008; Hozoji-Inada et al., 2011), y el control de los esteroides se ha relacionado con la modulación de la proliferación celular y la inmunidad adquirida (Bensinger et al., 2008). El trabajo de Bensinger y colaboradores demuestra que la regulación de la proliferación de varios tipos celulares, entre ellos los linfocitos T y B, es dependiente de la homeostasis de esteroides por parte de LXR β . Más concretamente, al disminuir la viabilidad de esteroides, la isoforma LXR β inhibe la expansión de linfocitos en respuesta a TCR (*T Cell Receptor*) y BCR (*B Cell Receptor*). Ratones LXR β ^{-/-} presentan hiperplasia linfoide y una mayor respuesta a antígenos, indicando que la regulación de esteroides dependiente de LXR β es importante en la respuesta inmunitaria (Bensinger et al., 2008).

Además, en cuanto a modificaciones postranscripcionales, parece ser que la fosforilación ocurre en LXR α (Chen et al., 2006; Torra et al., 2008) y que la SUMOilación podría llevarse a cabo de manera diferente en una isoforma que otra, al menos en astrocitos (Lee et al., 2009), mientras que otras modificaciones como la modificación O-beta-N-acetilglucosamina (Anthonisen et al., 2010) o la acetilación (Li et al., 2007) serían equivalentes en ambas isoformas.

2.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En resumen, los Objetivos planteados para esta Tesis son los siguientes:

* Estudiar la relevancia de los receptores nucleares LXR en la formación de las poblaciones de macrófagos esplénicos.

* Establecer el origen ontogenético de las células mieloides que dan lugar a las poblaciones de macrófagos de la zona marginal del bazo.

* Estudiar la respuesta transcripcional de células mieloides carentes de receptores LXR α a las citoquinas M-CSF y GM-CSF.

* Analizar la regulación transcripcional de genes inducidos por estas citoquinas en los que LXR α juegue un papel primordial.

3.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales de Experimentación.

Se utilizaron ratones de entre 8 y 10 semanas de edad a menos que se indique lo contrario. Los ratones fueron mantenidos libres de patógenos con dieta estándar en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC) y se sacrificaron mediante anestesia con sevoflurano (Abbott). Los experimentos se realizaron conforme al comité de Ética y Experimentación Animal de la ULPGC. Las cepas usadas en este trabajo son:

3.1.1 Ratones Knockout.

Ratones pertenecientes a la cepa C57BL6/Sv129 fondo mixto cedidos amablemente por el Dr. David Mangelsdorf (Peet et al., 1998), de diferentes genotipos:

- Wild Type, cepa salvaje
- Knock-out $LXR\alpha^{-/-}$, carentes del gen Nr1h3.
- Knock-out $LXR\beta^{-/-}$, carentes del gen Nr1h2.
- Double knock-out $LXR\alpha\beta^{-/-}$, carentes de ambos genes.

3.1.2 Ratones Cre/LoxP.

El sistema de recombinación Cre-LoxP permite que la delección de genes sea selectivamente dirigida a determinados tejidos (Lakso et al., 1992) o ante determinados estímulos (Kühn et al., 1995), en contraposición al caso de los Knockout, en los que la delección ocurre en todos los tejidos.

La recombinasa Cre es una proteína del bacteriófago P1 que cataliza la recombinación de DNA entre sitios específicos de 34 pares de bases conocidos como sitios loxP (Sternberg and Hamilton, 1981). Si se introducen dos sitios loxP con la misma orientación flanqueando un determinado locus genómico, la expresión de Cre resultará en la delección de dicho locus (Sauer and Henderson, 1988). Si los dos sitios loxP se introducen en el genoma de manera que flanqueen una parte importante de un determinado gen, la delección mediada por Cre del segmento flanqueado por secuencias loxP determinará la inactivación del gen (ver Figura 3.1). La inactivación génica *in vivo* se puede restringir a un determinado tipo celular cruzando ratones con un gen "floxeado"

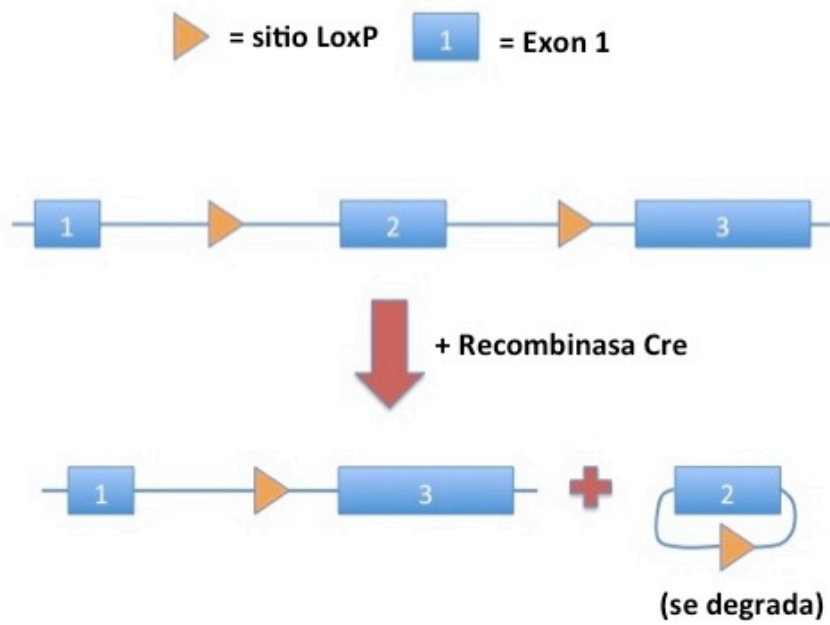


Figura 3.1. La recombinasa Cre induce la escisión de la región flanqueada con sitios LoxP.

En el ejemplo se produce la escisión del exón 2, que se degrada.

esto es, flanqueado por secuencias loxP, con ratones que expresen Cre bajo el control de un promotor específico de tejido. Uno de dichos promotores es el del gen Vav, expresado únicamente en células hematopoyéticas (de Boer et al., 2003).

En esta Tesis hemos usado ratones portadores de LXR α "floxeado" que hemos cruzado con ratones portadores de Vav-iCre, de manera que hemos obtenido por primera vez un knock-out LXR α específico de células hematopoyéticas. Los ratones heterocigotos para LXR α floxeado (LXR $\alpha^{\text{fl/+}}$) con fondo C57Bl/6 proceden del Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France). Los ratones C57Bl/6 transgénicos para Vav-iCre (nombre Jackson: B6.Cg-Tg(Vav1-cre)A2Kio/J) proceden del Dr. D. Kioussis (de Boer et al., 2003) a través de una colaboración con la Dra. Susana Gonzalez (CNIC, Spain). Estos ratones presentan una variante denominada iCre (*improved Cre*) cuya secuencia ha sido mejorada de acuerdo al uso codónico de mamíferos, lo que incrementa el nivel de expresión (Shimshek et al., 2002). Primero, se cruzaron los ratones heterocigotos LXR $\alpha^{\text{fl/+}}$ para obtener ratones homocigotos LXR $\alpha^{\text{fl/fl}}$. A continuación, se procedió al cruce de los ratones flox con los ratones Cre, tal y como se indica en la Figura 3.2.

Para el genotipado, se extrajo el DNA genómico de fragmentos de cola de 0,2 cm siguiendo el método HotSHOT (Truett et al., 2000). Brevemente, el fragmento de cola se introduce en un tubo de 1'5 ml al que se añade 75 μ l de solución alcalina (NaOH 25mM, EDTA 0,2 mM) y se calienta a 95°C durante 30 minutos. Finalmente, se añade solución neutralizante (Tris-HCl 40mM), y se usan 2 μ l para la PCR con el programa de termociclado indicado en la Figura 3.2. Las secuencias de los cebadores se encuentran en la Tabla 3.1.

Para el análisis de LoxP se usó la pareja de cebadores Lf/Lr que en caso de WT da una banda de 350 pb, en caso de LXR $\alpha^{\text{fl/fl}}$ da una banda de 416 pb, y en caso de escisión mediada por Cre no produce amplificación. Por el contrario, la pareja Lf/Er da una banda de 456 pb en caso de escisión, y una ausencia de banda en caso de no escisión. La eficiencia de la escisión se estudió en varios tejidos como control de la especificidad.

Para el análisis de Vav-iCre se usaron las parejas de cebadores oIMR73338 / oIMR73339 y oIMR9266 / oIMR9267 en una misma reacción de PCR. La primera pareja da una banda de control positivo de 324 pb, mientras que la segunda pareja amplifica el transgen resultando en una banda de 236 pb. Los resultados de esta PCR no permiten distinguir homocigotos de heterocigotos, pero la presencia de un único alelo Cre es suficiente para causar la escisión.

3.2 Trasplantes de médula ósea.

Para los trasplantes de médula ósea se irradiaron ratones WT y LXR-DKO de 6 a 8 semanas de edad con una dosis letal de 900 rads y se trasplantaron con 3×10^6 células de médula ósea de ratones donantes (WT, LXR $\alpha^{-/-}$, LXR $\beta^{-/-}$ o LXR-DKO) mediante inyección retro-orbital. Los ratones trasplantados se alimentaron con pienso y agua autoclavada y se sacrificaron a las 8-12 semanas tras el trasplante para el estudio de las poblaciones de macrófagos del bazo mediante análisis histológico.

A.

Cruce 1

P $LXR\alpha^{fl/fl} iCre^{-/-} \times LXR\alpha^{+/+} iCre^{+/-}$
 F1 $LXR\alpha^{fl/+} iCre^{+/-}$ (50 %)
 $LXR\alpha^{fl/+} iCre^{-/-}$ (50 %)

Cruce 2

F1 $LXR\alpha^{fl/+} iCre^{+/-} \times LXR\alpha^{fl/+} iCre^{+/-}$
 F2 $LXR\alpha^{fl/fl} iCre^{+/-}$ (25 %)
 $LXR\alpha^{fl/+} iCre^{+/-}$ (25 %)
 $LXR\alpha^{fl/+} iCre^{-/-}$ (25 %)
 $LXR\alpha^{fl/fl} iCre^{-/-}$ (25 %)

B.

Programa Flox	Programa Vav-iCre
94°C - 3'	94°C - 1,5'
94°C - 1' } x2	94°C - 30" } x35
66°C - 1' }	64°C - 45" }
72°C - 1' }	72°C - 45" }
94°C - 30" } x30	72°C - 2'
66°C - 30" }	4°C - ∞
72°C - 30" }	
4°C - ∞	

Figura 3.2. Estrategia de cruce para la obtención de ratones $LXR\alpha^{fl/fl} iCre^{+/-}$.

Panel A. Se tienen que realizar dos cruces. En el cruce 1 un 50 % de los descendientes serán $LXR\alpha^{fl/+} iCre^{+/-}$, que se usarán como padres en el cruce 2. En el cruce 2 un 25 % de los descendientes serán $LXR\alpha^{fl/fl} iCre^{+/-}$.

Panel B. Ciclos de PCR usados para el genotipado de los alelos Flox y Vav-iCre.

TABLA 3.1. Cebadores.

Todos los cebadores están diseñados para ratón, menos los cebadores de DC-SIGN que son para humano.

Secuenciación Cre		
Nombre	Orientación	Secuencia
oIMR73338	F	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
oIMR7339	R	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
oIMR9266	F	AGATGCCAGGACATCAGGAACCTG
oIMR9267	R	ATCAGCCACACCAGACACAGAGATC
Secuenciación Flox		
Nombre	Orientación	Secuencia
Lf	F	GGATTTGGAGAAGGTAAAGTCTCCC
Lr	R	TGGACTCAAGTGATCTTGTCTCAGC
Er	R	ATGCCTGAAAAGGGCATCAGATGCC
RT-PCR		
Nombre	Secuencia	
36B4_F	GGCCCTGCACTCTCGCTTTC	
36B4_R	TGCCAGGACGCGCTTGT	
CD209a_F	GCTGGTTGTCATCCTTGTC	
CD209a_R	CTTGGAAGTGCGTCCAGTC	
CCL19_F	TGTGGCCTGCCTCAGATTAT	
CCL19_R	AGTCTTCCGCATCATTAGCAC	
CCL21_F	TCCAAGGGCTGCAAGAGA	
CCL21_R	TGAAGTTCGTGGGGGATCT	
LTA_F	TCCCTCAGAAGCACTTGACC	
LTA_R	GAGTTCGTGCTTGGGGTA	
LTBR_F	GCTCCAGGTACCTCCTACTCG	
LTBR_R	ATGGCCAGCAGTAGCATTG	

TIM4_F	AAAGGGTCCGCCTTCACTAC
TIM4_R	TGCTTCTTTGAGAGTGATTGGA
AIM_F	TTTGTTGGATCGTGTTTTTCAGA
AIM_R	CTTCACAGCGGTGGGCA
PU.1_F	GGAGAAGCTGATGGCTTGG
PU.1_R	CAGGCGAATCTTTTTCTTGC
ABCA1_F	GCAGATCAAGCATCCCAACT
ABCA1_R	CCAGAGAATGTTTCATTGTCCA
LXRa_F	CCTTCCTCAAGGACTTCAGTTACA
LXRa_R	CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT
CLEC10a_1_F	TAAAGCAGCTCCTTCCCAGT
CLEC10a_1_R	CCCAGGGAGAACAGGAGGA
C/EBP_a_F	TAACTCCCCCATGGAGTCGG
C/EBP_a_R	CTGGAGGTGACTGCTCATCG
STAT5AB_F	ATGATGGGGCTATCCTGGGT
STAT5AB_R	AATGGTGATGCCCCGATTT
iNOS_F	GCAGCTGGGCTGTACAAA
iNOS_R	AGCGTTTCGGGATCTGAAT
IRF4F	ACAGCACCTTATGGCTCTCTG
IRF4R	ATGGGGTGGCATCATGTAGT
h_DCSIGN_F	CCCAGCTCGTCGTAATCAA
h_DCSIGN_R	GAAGCGGTTACTTCTGGAAGAC

3.3 Cultivo de Líneas Celulares.

Todas las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera que contenía 5 % de CO₂ – 95 % de aire. A menos que se especifique lo contrario, los medios empleados son RPMI 1640 (Lonza) completo o DMEM (Lonza) completo - suplementados con 10 % de FBS (PAA Laboratories GmbH), Penicilina (100U/ml) (Sigma) y Estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma).

3.3.1 Cultivos Primarios.

3.3.1.a Obtención de macrófagos derivados de médula ósea murina (BMDM).

La médula ósea del interior del fémur y la tibia se extrae haciendo pasar una solución de PBS (Tampón fosfato salino pH 7,4) con una jeringuilla de 10 ml y una aguja de 0,5 mm. El tejido medular se disgrega a través de un separador celular de Nylon, con un tamaño de poro de 70 µm (BD Falcon™, BD Bioscience). La suspensión celular se centrifuga a 1500 rpm 4°C durante 5 minutos, y se resuspende en medio hipotónico (*Red Blood Lysis Buffer*, Sigma) durante 2 minutos para favorecer la lisis de los eritrocitos. Tras 2 minutos, se añade PBS y se centrifuga a 1500 rpm 4°C durante 5 minutos. Las células se siembran en platos bacteriológicos con 10ml de medio RPMI 1640 completo suplementado con 1/3 de medio L929. La médula ósea procedente de 1 ratón se siembra finalmente en 4 platos (5 x 10⁶ células aproximadamente). Tras 7 días de cultivo, las células se recogieron con varios lavados de PBS y PBS-EDTA 10 mM, se contaron y se sembraron en platos tratados (Nunc) con medio RPMI 1640 completo suplementado con 10 ng/ml de citoquinas recombinantes murinas M-CSF o GM-CSF (Immunotools), según se indique.

3.3.1.b Obtención de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica humana (MDM, monocyte-derived macrophages).

La sangre de voluntarios sanos se separó mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep, y de los *buffy coats* se aislaron las células CD14+ mediante enriquecimiento magnético (Miltenyi). Las células obtenidas se cultivaron en medio de cultivo: DMEM completo suplementado con 10 ng/ml de M-CSF humano (Peprotech). La citoquina se añadió cada tercer día. Tras 7 días las células se subcultivan en platos tratados con medio de cultivo fresco DMEM completo + 10 ng/ml de M-CSF humano (Peprotech). Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se añadieron los tratamientos M-CSF, GM-CSF o IL-4 humano (Peprotech) durante 24 horas.

3.3.1.c Obtención de macrófagos peritoneales murinos.

Para inducir el reclutamiento de los macrófagos del peritoneo, inyectamos 3ml de tioglicolato en la cavidad peritoneal de ratones LXR $\alpha^{fl/fl}$ Vav-iCre^{-/-}, LXR $\alpha^{fl/-}$ Vav-iCre^{+/-} y LXR $\alpha^{fl/fl}$ Vav-iCre^{+/-}. Tres días después se sacrificaron y se aislaron las células del peritoneo mediante tres lavados de la cavidad peritoneal con 10 ml de PBS, que se filtró a través de un separador celular de Nylon con un poro de 70 µm (BD Falcon™, BD Bioscience) para eliminar impurezas. Las células se centrifugaron a 300g durante 10', se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo y se sembraron en placas de cultivo. Al

cabo de 4 horas, se realizaron lavados con PBS para retirar las células no adheridas, y las células adheridas se lisaron para el análisis de proteínas tal y como se detalla en la sección 7.1.

3.3.2 Líneas celulares.

3.3.2.a Cultivo de células RAW-LXR α -3FLAG.

Las células RAW264.7 que sobreexpresan LXR α unido a tres repeticiones del octapéptido FLAG (Alonso-Gonzalez et al., 2009; Chen et al., 2006) se cultivaron en platos tratados (Nunc) con medio DMEM completo.

3.4 Tratamientos *in vitro*.

Los tratamientos *in vitro* se realizaron en cultivos celulares de células BMDM. Por un lado, se estudió la influencia de CD209a en la captación de azúcares y por otro se realizaron estudios farmacológicos para estudiar las vías de señalización que regulan la expresión de CD209a.

3.4.1 Captación de azúcares de células BMDM.

El estudio de captación de azúcares se realizó modificando ligeramente las indicaciones de Serrano-Gomez et al., 2008. Brevemente, $0,3 \times 10^6$ células BMDM WT o LXR $\alpha^{-/-}$ se sembraron en platos de 35 mm con cubreobjetos tratados previamente con poli-L-Lisina (Sigma P4707) en medio RPMI completo con M-CSF o GM-CSF (10 ng/ml). Al día siguiente, las células estaban ya adheridas al cubreobjetos. Los cubreobjetos se lavaron con PBS y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con azúcares a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ en medio RPMI completo. Los azúcares (α -D-Manosa o α -L-Fucosa) se encuentran conjugados a esferas de poliacrilamida (PAA)-FITC, proceden de la compañía Lectinity (Rusia) y han sido usados previamente (Serrano-Gomez et al., 2008). Como control se usaron esferas de PAA-FITC sin conjugar. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 4 %, se volvieron a lavar con PBS, se montaron con medio de montaje *Vectashield Mounting Medium with DAPI* (Vector laboratories), se fotografiaron en el microscopio de fluorescencia Eclipse 80i (Nikon) y se analizaron en el programa NIS-Elements F3.0 (Nikon).

3.4.2 Tratamientos Farmacológicos e Inhibidores.

Los tratamientos farmacológicos se llevaron a cabo en $2,5 \times 10^6$ células BMDM cultivadas en platos de 60 mm y a las concentraciones indicadas en la sección de Resultados.

Para el estudio de la función de LXR-RXR se usaron los ligandos sintéticos GW3965 (GSK), LG268 (Ligand Pharmaceuticals) y el antagonista GW233 (Zuercher et al., 2010).

Para el estudio de las rutas de señalización de GM-CSF las células se levantaron, contaron y sembraron en RPMI completo + M-CSF (10 ng/ml). Al día siguiente se lavaron con PBS y se cultivaron con medio RPMI completo (sin citoquina). Tras 1 hora se añadieron los inhibidores y tras 2 horas se dispensó GM-CSF (10 ng/ml). A las 6 horas del tratamiento con GM-CSF se procedió a la extracción del ARNm con Trizol. Los inhibidores usados fueron PD98059, BI605906, SN50, SB203580, LY294002, wortmanina (cedidos amablemente por el Dr. Lisardo Boscá y la Dra. Susana Alemany), Jak1 (cedido amablemente por la Dra. Sonsoles Hortelano), AG490 (cedido amablemente por el Dr. Borja Guerra) y Cicloheximida (Sigma).

3.5 Tratamientos *in vivo*.

3.5.1 Plaquetas opsonizadas.

Las plaquetas se prepararon siguiendo el protocolo del laboratorio del Dr. John W. Semple (Semple et al., 2007), obtenido durante una estancia en el laboratorio del Dr. Alan H. Lazarus. Primero, se recoge la sangre de la vena cava de ratones sacrificados mediante inhalación de sevoflurano (Abbot) y se deposita en tubos de cristal "BD Vacutainer Serum" (Ref 366430) con 500 μ l de PBS y el anticoagulante citrato-fosfato-dextrosa-adenina (CPDA, Sigma C4431) (ratio 10:1). La sangre de varios ratones se centrifuga a 150g, y se aísla el plasma rico en plaquetas (PRP). Las plaquetas se lavan en PBS y se ajustan a 10^9 células/mL en PBS-CPDA. A continuación, 150×10^6 plaquetas se opsonizan con 5 μ g de anticuerpo frente a CD41 (BD PharMingen #553847), o se dejan opsonizar como control, se lavan, y se inyectan por la vía de la vena de la cola. La presencia de CD41 en el bazo se detecta mediante Inmunohistoquímica, empleando un anticuerpo secundario anti-rata-AF488. Alternativamente, las plaquetas se incuban con 20 μ M de Red CellTracker CMTPX (Invitrogen C34552) y 5 μ g de anticuerpo frente a CD41 a 37°C 30 minutos, empleando plaquetas sin marcar como control. En ambos casos, el aislamiento de los bazos para posterior análisis se realizó tras 90 minutos de tratamiento.

3.5.2 Clodronato.

El clodronato (Cl2MBP; diclorometileno-bifosfonato) es un compuesto que se ha usado previamente para eliminar temporalmente las poblaciones de macrófagos (Van Rooijen and Sanders, 1994). Se administra por vía intravenosa encapsulado en el interior de liposomas (Encapsula Nanosciences) que son fagocitados y causan la muerte del macrófago. Como control se usan liposomas vacíos sin clodronato. Se emplearon animales $LXR\alpha^{-/-}$ y $LXR\beta^{-/-}$, y a las 48h una parte de los ratones se sacrificaron para comprobar la eficacia del tratamiento con clodronato.

Tras dos semanas, un grupo de ratones se trató vía intraperitoneal con una solución de GW3965 a 20 mg/kg de peso corporal o vehículo cada 2 días. Una semana después de empezar el tratamiento con GW3965, se sacrificaron los animales y se analizó la reconstitución de macrófagos esplénicos mediante inmunohistoquímica, empleando para ello anticuerpos específicos.

3.6 Lentivirus.

La terapia génica es una técnica consistente en la introducción de un gen funcional para suplir un gen defectuoso *in vivo*. Se ha empleado con cierto éxito para el tratamiento de enfermedades monogénicas como la deficiencia en adenosina deaminasa (ADA) (Wirth et al., 2013). En nuestro caso, usamos la terapia génica para reconstituir progenitores de médula ósea $LXR\alpha\beta^{-/-}$ con el gen de $LXR\alpha$ murino empleando un sistema lentiviral especial. En esta terapia génica, las HSCs se transducen *ex vivo* con vectores lentivirales para permitir la integración estable del gen de interés y se reintroducen de manera autóloga. Como el gen se encuentra regulado por un promotor específico de macrófagos, se expresará preferentemente en estas células. Por tanto, la elección de un promotor adecuado es de vital importancia para la especificidad de esta técnica.

3.6.1 Promotor.

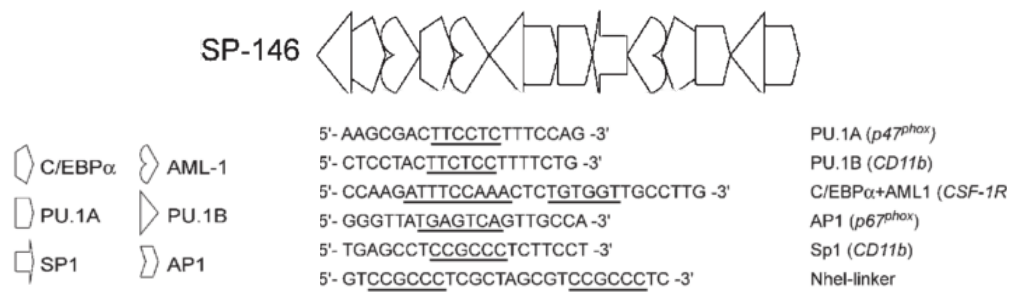
En la literatura podemos encontrar varios promotores específicos para macrófagos: *sheep visna virus long terminal repeat*, promotor de CD68, *chicken lysozyme minigene construct* o el promotor del receptor *scavenger A* (SA), pero resultan no ser lo suficientemente potentes y/o específicos para las finalidades de la terapia génica (He et al., 2006). En esta Tesis usaremos un promotor sintético específico de células mieloides, que ha sido usado previamente con éxito en animales trasplantados (He et al., 2006). Para generar el promotor específico, los autores unieron al azar en la zona 5' del promotor de $p47^{\text{phox}}$ elementos *cis* para PU.1, C/EBP α , AML-1, Sp1 y AP-1, (ver Figura 3.3A) y determinaron la eficiencia y especificidad mediante un sistema de luciferasa en células monocíticas THP-1, así como en células no monocíticas tales como células epiteliales del intestino Caco-2, células de carcinoma epitelioide de cérvix Hela o células embrionarias de riñón HEK293.

3.6.2 Vectores Lentivirales.

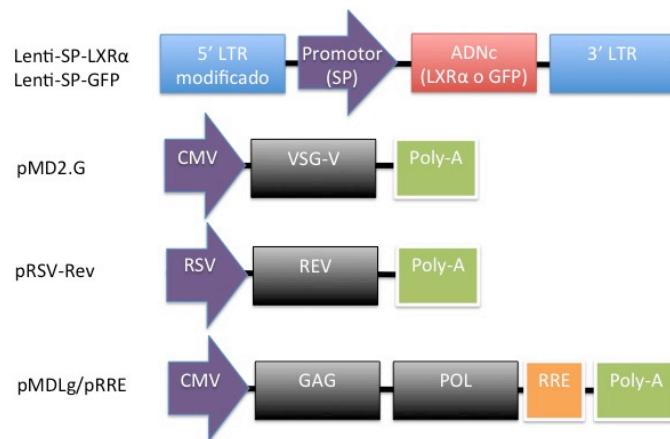
Los Lentivirus son Retrovirus, es decir, tienen un genoma de ARN que deben transcribir reversamente a ADN para integrarse en el genoma de la célula hospedadora y así poder multiplicarse. Como vectores presentan la ventaja de poder infectar tanto a células quiescentes como a células en división, mientras que el resto de Retrovirus sólo puede infectar células en división.

Los vectores lentivirales que hemos usado en esta Tesis están basados en el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) y proceden del laboratorio del Dr. Li (Li et al., 2011). Pertenecen a la tercera generación de vectores lentivirales, en los que se ha incrementado la seguridad mediante un sistema de 4 plásmidos (ver Figura 3.3B y 3.3C) desprovistos de todas las secuencias codificantes y que únicamente aportan *en trans* las secuencias del ARN viral necesarias para la transcripción reversa, la integración y el encapsidamiento del ARN genómico (Dull et al., 1998). En concreto, contienen un tracto polipurínico (PPT, *polypurine tract*) necesario para la síntesis de la segunda cadena,

A.



B.



C.

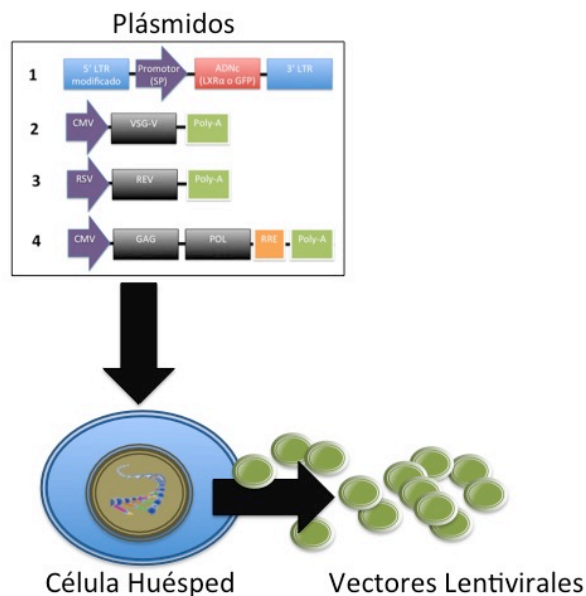


Figura 3.3. Representación esquemática del promotor sintético macrófago-específico SP-146 y de los plásmidos lentivirales.

Panel A. En la parte superior se representa la secuencia de módulos de unión del promotor SP-146. En la parte inferior izquierda, la leyenda de cada uno de los módulos, y en la parte inferior derecha, su secuencia. (He et al., 2006).

Panel B. Representación esquemática de los 4 plásmidos usados en la obtención de vectores lentivirales. Elaborado a partir de información de Dull et al., 1998 y Li et al., 2011.

Panel C. Obtención de vectores lentivirales tras transfección de una célula huésped con los plásmidos adecuados.

secuencia de terminación central (CTS, *central termination sequence*) y elementos regulatorios post-transcripcionales del virus de la hepatitis de marmota. Por otra parte, carecen de todos los genes accesorios (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*), genes reguladores (*tat*) y utilizan una repetición terminal larga auto-inactivante. Además, están pseudo-tipados con la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSVg), el cual tiene un amplio tropismo, lo que significa que una gran cantidad de tipos celulares se pueden transducir con este sistema. La VSVg también confiere una gran estabilidad a las partículas virales, lo que permite concentrarlas por ultracentrifugación (Naldini et al., 1996).

3.6.3 Obtención de los Plásmidos.

Los plásmidos necesarios para obtener lentivirus de tercera generación pMDLg-pRRE, pRSV/Rev, pMD.G, Lenti-SP-GFP y Lenti-SP-LXR α proceden del laboratorio del Dr. S. Li (Li et al., 2011), y se usaron para transformar células competentes DH5 α . Posteriormente, se realizaron minipreps (Qiagen Qiaprep Spin Miniprep Kit), se comprobó la identidad de los plásmidos mediante digestión con enzimas de restricción específicas y se procedió a amplificarlos por maxiprep (Omega Bio-tek EZNA Endo-Free Plasmid Maxi Kit).

3.6.4 Transfección.

Los plásmidos Lenti-SP-GFP o Lenti-SP-LXR α junto con los plásmidos accesorios pMDLg-pRRE, pRSV/Rev y pMD.G se co-transfectaron en células 293T a un ratio de 10:6:1.5:2.5, usando FuGENE HD (Promega). El medio con virus se recolectó a 48h, se centrifugó a 2500G 10 minutos a 4°C para descartar debrís celulares, y el sobrenadante se centrifugó a 86000G durante 90 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckman Optima L-100 XP usando un rotor SW41Ti. El pellet resultante se resuspendió en StemPro-34 SFM (Life Technologies) 1 % L-Glut, 1 % Pen+Strep y se almacenó a -80°C. La eficiencia de las partículas lentivirales se examinó por citometría en células RAW264.7.

3.6.5 Transducción de células de la médula ósea y Trasplante.

Para aumentar los niveles de HSCs, los ratones donantes se trataron con 5-fluorouracilo (110mg/kg) i.p. 4 días antes de su sacrificio. Posteriormente, la médula ósea obtenida de fémures y tibias se centrifugó en el medio de separación por densidad Lympholyte-M (Tebu-Bio) para concentrar las células blancas, que se recuperaron y cultivaron en StemPro-34 (Life Technologies) 1 % L-Glut, 1 % Pen+Strep, 2 % Stem Pro-34 Nutrient Supplement (Life Technologies), y 10 ng/ml de IL-3, IL-6, IL-1 α y mSCF (Peprotech) durante 18 horas a 37°C y 5 % de CO $_2$. Los vectores lentivirales más Sulfato de Protamina 8 μ l/ml (Sigma P3369) se añaden a las células y la mezcla se incuba durante 5 horas.

Seis horas antes del trasplante se irradian los ratones LXR α ^{-/-} recipientes con un dosis letal de 900 rads. Las HSCs transfectadas se centrifugan, se resuspenden en PBS 2

% FBS, se cuentan y se inyectan 2×10^6 de HSCs transfectadas junto a una fracción de células totales de médula ósea de un LXR $\alpha^{-/-}$ sano (50×10^4) en un volumen de 200 μ l vía plexo retro-orbital. Tras 8-12 semanas, se recoge la sangre y el bazo de los animales trasplantados para su análisis por citometría e histología, respectivamente.

3.7 Análisis de la Expresión de ARN mensajero.

3.7.1 Extracción de ARN mensajero.

El ARN se extrajo según la técnica del fenol/cloformo usando el reactivo comercial TRIZOL (Invitrogen). Para tejidos se usó el homogenizador ULTRA-TRURRAX (IKA). Posteriormente, se añadió cloroformo en una proporción 1:5 respecto al volumen de TRIZOL y se agitó vigorosamente 10 segundos. Tras 5 minutos a RT, se centrifugaron 15 minutos a 4°C y 13.000 rpm. A 4°C, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se añadió isopropanol frío en una proporción 1:1 al sobrenadante. La precipitación se obtuvo a 1h RT o -20°C toda la noche, y a continuación se centrifugó 15 minutos a 4°C y 13.000 rpm. El precipitado se lavó con una solución fría de etanol al 75 % en agua estéril tratado con DEPC, se centrifugó 5 minutos a 4°C y 13.000 rpm y se resuspendió en un volumen conveniente de agua estéril tratada con DEPC. La cantidad de ARN se cuantificó mediante espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000 *Spectrophotometer*, *Nanodrop Technologies*) y comprobó su calidad según ratio A260/A280 y ratio 18S/28S en electroforesis de agarosa 1,5 % con buffer MOPS.

3.7.2 Estudio de perfil transcripcional mediante *Microarray*.

Los microarrays o chips de ADN son placas que permiten analizar la expresión de miles de genes de manera simultánea. Para estudiar los cambios transcripcionales, se realizaron tres experimentos independientes en los que se diferenciaron BMDM procedentes de WT o α KO con citoquina M-CSF (10 ng/ml) durante 7 días. Al séptimo día, se levantaron, contaron, sembraron y se trataron con M-CSF (10 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml) o vehículo durante 24 horas. Las citoquinas son proteínas recombinantes murinas y proceden de Immunotools. Tras el tratamiento, se obtuvo el ARN según el método previamente descrito. Posteriormente, se procedió a la reunificación del ARN de los tres experimentos (en cantidades iguales) y se purificó con el kit RNeasy (Qiagen).

El microarray se realizó en el Parque Científico de Madrid - UCM. La placa empleada fue el modelo Affymetrix Mouse *Gene 2.0* ST Array y el software de procesado de datos el GeneChip Analysis Suite (Affymetrix). Las representaciones de Diagramas de Venn y Mapas de calor (*heatmaps*) las realizamos usando Bioconductor (Gentleman et al., 2004), un paquete en lenguaje R (versión 2.14.1, en interfaz RStudio versión 0.97.173). La Ontología Génica (*Gene Ontology* [GO] en inglés) es un campo de estudio encargada de la descripción y catalogación de los genes según la función que lleve a cabo la proteína a nivel molecular (p. ej. kinasa, nucleasa, receptor...), procesos biológicos en los que participa (p. ej. ruta de señalización, transporte de sustratos, apoptosis...) y localización dentro de la célula (p.ej. núcleo, citosol...). Mediante el análisis GO de los resultados de un microarray se puede conocer los procesos, funciones y localizaciones que se encuentran diferencialmente alterados debidos al factor experimental a estudio. Para el análisis GO se

empleó la herramienta GOrilla (Eden et al., 2009), a la que proporcionamos dos listas denominadas "*target*" y "*background*". La lista "*target*" contiene los genes diferencialmente upregulados o downregulados de los que se quiere conocer las categorías GO enriquecidas respecto al "*background*". La lista "*background*" corresponde a todos los genes presentes en el microarray, en nuestro caso el Affymetrix Mouse *Gene* 2.0 ST Array. En ambos casos, el programa usará sólo aquellas sondas y genes que tengan asignado una categoría GO. De cada categoría GO obtenemos una lista de genes, un FDR "q-value" y un "Enrichment (N,B,n,b)". Procederemos a explicar con más detalle estos últimos parámetros.

GOrilla obtiene el "valor P" según el modelo hipergeométrico (*hypergeometric*, HG). Una distribución hipergeométrica es una distribución de probabilidad discreta relacionada con muestreos aleatorios sin reemplazamiento. La tasa de descubrimientos falsos (*False Discovery Rate*, FDR) es la corrección del "valor P" según el método de Benjamini y Hochberg (1995), que ajusta el "valor P" teniendo en cuenta los errores tipo I (falsos positivos) para múltiples *tests*. En resumen, el valor "FDR q-value" representa la proporción esperada de falsos positivos entre aquellos elementos que fueron significativos.

El enriquecimiento "Enrichment (N,B,n,b)" se define como el número de veces más que se encuentra un grupo GO respecto a lo esperado. Por ejemplo, un valor de 2 significa que ese grupo GO está el doble de representado respecto a lo esperado.

N - número total de genes en la lista "*background*".

B - número total de genes que se encuentran asociados en la base de datos a un determinado término GO.

n - número de genes presentes en la lista "*target*".

b - número de genes de la lista "*target*" que se asocian al término GO.

El enriquecimiento se calcula como $(b/n)/(B/N)$

También se analizó el experimento de microarray GSE13125 disponible de manera pública en las bases de datos. El objetivo del microarray GSE13125 es detectar diferencias de expresión tras la activación de PU.1. Para ello se emplean células PUER, células procedentes de precursores hematopoyéticos murinos a las que se transduce retroviralmente a expresar PU.1 fusionado con el receptor de estrógenos. De esta manera, al añadir tamoxifeno (ligando del receptor de estrógenos) se produce la activación de PU.1. En el experimento, se recoge la expresión génica en condiciones basales y tras 24 horas de tamoxifeno, en triplicados. Estos datos en formato .CEL los hemos analizado mediante la interfaz Microarray Я Us (Dai et al., 2012), usando el paquete Limma (Smyth, 2004) y análisis estadístico *1-way Anova* (Anova de un factor).

3.7.3 Análisis de ARN mensajero por RT-PCR.

Para el análisis de los niveles relativos de ARN mensajero (ARNm) se utilizó la técnica de la *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) y el método de análisis

$\Delta\Delta C_t$. Este método permite cuantificar la abundancia relativa de un ARNm con respecto a un gen de referencia cuya expresión no cambia en las condiciones experimentales, y que se suele denominar *housekeeping gene*.

Primero, una cantidad de 0,5-1 μg de ARNm fue retrotranscrita a ADN complementario (ADNc) usando *iScript cDNA Synthesis Kit* (BioRad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se usaron 12,5-25 ng de ADNc para realizar la RT-PCR con 400 nM de cebadores específicos y 15 μl de cóctel *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (SYBR Green 2X, Diagenode) en un volumen de reacción de 20 μl . La amplificación y detección se llevó a cabo en un termociclador (*iQTM5, Multicolor Real-Time PCR Detection System*, BioRad), y los datos se analizaron con *iQ5 Software Data Analysis* (BioRad). En todos los casos, la expresión relativa de ARNm se normalizó con respecto a la expresión endógena del gen 36B4.

3.7.4 Análisis de la inhibición de la expresión génica mediante siRNA.

La tecnología del siRNA (*small interfering RNA*) se basa en que la unión de un ARN complementario (el siRNA) a un ARN mensajero impide su traducción, haciendo que la expresión absoluta del gen disminuya. En nuestro caso, se realizaron estudios con los siguientes siRNA comerciales: control siRNA (Ambion 4390843), C/EBP α (sc-37048), PU.1 (sc-36331 e Invitrogen 5255362, con resultados similares), LXR α (sc-38829), STAT5 (sc-29496). Para la transfección se usaron células BMDM de 4 días de diferenciación. Las células se lavaron con PBS, levantaron con PBS-EDTA 10 mM, y se sembraron en platos de cultivo tratados de 60 mm (BD FALCON #353004) a $1,5 \times 10^6$ células en 2,5 ml de medio RPMI completo + 1/3 medio L929. Al día siguiente, se transfectan las células con medio Opti-MEM I (Gibco #11058) y Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen #13778-075) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se usa siRNA a una concentración final de 20 nM, en una mezcla con Opti-MEM I y RNAiMAX, de la siguiente manera:

Tubo A	300 μl Opti Mem I + siRNA
Tubo B	300 μl Opti Mem I + 10 μl RNAiMAX

Tras 5 minutos, se mezclan los tubos A y B y la mezcla se deja reposar 25 minutos a temperatura ambiente. En este periodo, se procede al lavado de las células con PBS. Entonces se añade 1 ml de Opti-MEM I por plato y 600 μl de mezcla A+B y se deja transfectar durante 8 horas. Pasado este tiempo, se pone 1600 μl de medio 2X consistente en RPMI 20 % + Ab. 2X+20 ng/ml M-CSF o GM-CSF, según el tratamiento. Tras 48 horas, se aísla el ARN con Trizol para medir la expresión génica.

3.8 Análisis de la Expresión de Proteínas.

3.8.1 Preparación de extractos proteicos.

Las células se lisaron en buffer RIPA (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, Tritón X100 1 %, deoxicolato sódico 0,5 %, SDS 0,1 % y un cóctel de inhibidores de proteasas *Complete protease inhibitor cocktail*, (Roche #11697498001). En las muestras en las que se midió la fosforilación proteica, el buffer contenía adicionalmente cóctel de inhibidores de fosfatasa (Sigma #P-2850 y #P-5726). Los tejidos se homogenizaron en buffer RIPA en el triturador Ultra-Trurrax (IKA). A continuación, los lisados de células o tejidos se centrifugaron 5 minutos a 4°C y 14.000 rpm. Se separaron los sobrenadantes y se cuantificaron según el método del ácido bicinonínico (Smith et al., 1985). Como control de detección de LXR α se usaron extractos de células RAW264.7 que sobreexpresan LXR α -3FLAG, descritas en la sección 3.3.2.a de Material y Métodos.

3.8.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot.

Las proteínas se separaron según su tamaño mediante electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se empleó acrilamida (Bio-Rad) con una proporción 29:1 de acrilamida:bisacrilamida. La electroforesis se realizó en cubetas Mini Protean II[®] (Bio-Rad), con tampón de electroforesis compuesto por glicina 1.25 M, Tris-HCl 12mM y SDS 0.2 %.

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Blottansfer Medium, Bio Rad Laboratories) a un amperaje constante de 400 mA, durante 90 minutos, a 4° C en un medio de transferencia constituido por Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 %, pH 8,3. Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una solución que contenía leche desnatada al 5 % disuelta en TBS (Tris-HCl, 50 mM pH 7.4, NaCl 200 mM), con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en agitación suave con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo al 1:2 en TBS-T (Tampón salino de Tris con el detergente Tween-20 al 0,1 %). Al día siguiente se realizaron 3 lavados de cinco minutos con TBS-T. Posteriormente, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario que lleva acopladas moléculas de peroxidasa de rábano (Horseadishperoxidase, HRP). Tras realizar otros tres lavados, la presencia de las proteínas se reveló con luminol (ECL Plus, Amersham), un compuesto que en su oxidación por la peroxidasa emite luminiscencia que puede ser detectada por exposición en una película fotosensible o con el sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad). Los anticuerpos empleados se describen en la Tabla 3.2.

3.8.3 Citometría de Flujo.

El análisis de proteínas de membrana por citometría de flujo constituye un método eficaz y preciso que permite cuantificar y comparar la expresión de determinados marcadores celulares entre varias muestras, y determinar distintas poblaciones celulares.

TABLA 3.2. Anticuerpos.

Dilución de trabajo de los anticuerpos empleados en experimentos de western-blot (WB), inmunocitoquímica (ICQ), inmunohistoquímica (IHQ) y citometría de flujo.

Primarios					
Especificidad	Origen	Proveedor	WB	IHQ/IF	Citometría
STAT5	Conejo	Santa Cruz sc-836	1:2.000		
P-STAT5	Conejo	Cell signaling #9359	1:2.000		
P-Jak2	Conejo	Cell signaling #3776	1:2.000		
P-AKT	Conejo	Cell signaling #9271	1:500		
AKT	Conejo	Cell signaling #9272	1:500		
ABCA1	Conejo	Novus NB400-105	1:4.000		
LXR α	Ratón	Abcam AB41902	1:1.000		
LXR $\alpha\beta$	Conejo	Cedido amablemente por el Dr. Knut R Steffensen	1 μ g/ml		
GAPDH	Conejo	Abcam AB9485-100	1:1.000		
F4/80	Rata	Cedido amablemente por el Dr. Siamon Gordon		1:20	
Sialoadhesin	Rata	Cedido amablemente por el Dr. Siamon Gordon		1:50	
SIGNR1	Hámster	Hibridoma adquirido a la ATCC (clon 22D1).		1:200	
Marco	Rata	Serotec mca1849		1:200	
Tim-4	Rata	Biologend #130001		1:300	
Laminin	Conejo	Sigma L9393		1:300	
Primarios Marcados					
Especificidad	Marcaje	Proveedor	WB	IHQ/IF	Citometría
CD115	PE	Biologend #135506			0,2-0,5 μ g/ml
Ly6C	PerCP-Cy5.5	Biologend #128012			0,2-0,5 μ g/ml
Secundarios					
Especificidad	Marcaje	Proveedor	WB	IHQ/IF	Citometría
Conejo	HRP	Santa Cruz sc-2004	1:10.000		
Ratón	HRP	Santa Cruz sc-2005	1:10.000		
Rata	Biotin	Dako		1:150	
Hámster	AF594	Invitrogen a21113		1:500	
Conejo	AF350	Invitrogen a11046		1:200	
Rata	AF488	Invitrogen a11006		1:400	
Rata	AF594	Invitrogen a11007		1:500	

También permite detectar fluorescencia debida al GFP en el caso de células transfectadas con un vector lentiviral.

Los monocitos se identificaron a partir de sangre anticoagulada con PBS-EDTA obtenida de la vena cava inferior de ratones sacrificados con sevoflurano. Las células se lavan con PBS-Staining (1 % BSA, 0.01 % de NaNH₃ y 1 % de FBS en PBS) y se incuban con los anticuerpos CD115 y Ly6-C a la dilución indicada (Ver Tabla 3.2) durante 15 minutos a 4° C y en oscuridad. La expresión de los marcadores celulares se normalizó usando un isotipo control de la especie en la que se hubiera generado los anticuerpos. Por último, las células se resuspendieron en PBS y fueron cuantificadas en el citómetro de flujo Coulter EPICS XL-MCL (Beckman Coulter). Los datos fueron analizados mediante el programa WinMDI 2.8.

3.9 Análisis "ChIP-Seq".

La técnica del ChIP-Seq tiene como objetivo conocer las regiones del genoma a las que se encuentra unido un determinado TF, y por extensión conocer qué condiciones modifican su patrón de unión. En la realización de un ChIP-Seq hay dos fases diferenciadas. Primero, se fija y rompe la cromatina en tamaños adecuados (rango óptimo de entre 200 y 400 pb) y se procede a inmunoprecipitar un determinado TF. Posteriormente, se secuencian los fragmentos de cromatina a las que se encuentra unido el TF.

3.9.1 Origen de los ChIP-Seqs.

La mayoría de ChIP-Seqs usados han sido publicados previamente y se encuentran alojados en los servidores públicos www.ebi.ac.uk/arrayexpress y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>, excepto donde se indique.

- Raw264.7-BLRP-LXR β , publicado con número de acceso GSM538015. Las células de la línea monocítica Raw264.7 se transfectaron con la isoforma murina LXR β asociada a un péptido de reconocimiento BLRP.

- Raw264.7-BLRP-LXR α no publicado. Cortesía del Dr. C.K. Glass. Realizado de manera similar a GSM538015.

- PU.1 en BMDM, publicado con número de acceso GSM538017, GSM940924 y GSM881099.

- PU.1 en BMDM de LXR DKO, publicado con número de acceso GSM538018.

- PU.1 en Macrófagos peritoneales obtenidos con tioglicolato, publicado con número de acceso GSM537983.

- C/EBP α en Macrófagos peritoneales obtenidos con tioglicolato, publicado con número de acceso GSM537984.

- C/EBP β en Macrófagos peritoneales obtenidos con tioglicolato, publicado con número de acceso GSM537985.

- p65 en Macrófagos peritoneales obtenidos con tioglicolato estimulados 3 horas con LPS, publicado con número de acceso GSM611116.
- STAT5B en Células dendríticas de bazo sin tratar, publicado con número de acceso GSM671417.
- STAT5B en Células dendríticas de bazo estimuladas 2 horas con GM-CSF, publicado con número de acceso GSM671418.
- POL-II en BMDM, publicado con número de acceso GSM652857.
- POL-II en BMDC, publicado con número de acceso GSM881103.
- POL-II en BMDC, estimuladas 1 hora con LPS publicado con número de acceso GSM881106.
- RXR en células BMDM, publicado con número de acceso, en hígado publicado con número de acceso GSM864674 y tejido adiposo publicado con número de acceso GSM686978.
- DHS (*DNaseI hypersensitive sites*) en células BMDM publicado con número de acceso GSM652857.

3.9.2 Análisis de los ChIP-Seqs.

La información de un ChIP-Seq se suele encontrar almacenada en servidores públicos en formato SRA. Este formato comprimido se descomprimió a formato .fastq usando la herramienta fastq-dump (NCBI SRA *Toolkit*). Posteriormente, se alineó con un genoma murino de referencia (mm9) usando bowtie2 y se transformó a formato .bedgraph para su representación en el UCSC *Genome Browser*. Esta transformación se realizó mediante HOMER (*Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment*), una colección de herramientas para el descubrimiento de motivos y análisis de datos de secuenciación de nueva generación (Heinz et al., 2010). Algunos ChIP-Seq ya estaban en formato .bedgraph para la versión del genoma mm8 y se usaron directamente. En algunos casos, se tuvo que alinear el .bedgraph con una versión diferente del genoma. Para convertir las coordenadas de una versión del genoma a otra se usó una versión local de la herramienta Liftover (UCSC *Genome Browser*). Por ejemplo, la conversión de las coordenadas de GSM611116 de mm9 a mm8 se realizó con esta herramienta.

3.9.3 Búsqueda de secuencias de unión consenso.

Para la búsqueda de secuencias consenso de unión de factores de transcripción se analizó la secuencia de ADN de interés mediante el software de Lasergene (DNASTar) usando la opción de Patterns/Signals - TFD.dat, menos en el caso de STAT5, para el que se introdujo la secuencia consenso TTCYNRGWA mediante la opción *Type-in Pattern*. Esta secuencia consenso de STAT5 se obtuvo mediante HOMER, a partir de los datos de ChIP-Seq de STAT5B en células dendríticas aisladas de bazo (GSE27161), en concreto de las muestras sin tratar (GSM671417) y tratadas con GM-CSF durante 2 horas (GSM671418).

3.10 Histología.

La histología nos permite estudiar la microestructura de los órganos, así como la localización de proteínas y tipos celulares mediante el uso de anticuerpos específicos.

3.10.1 Obtención y conservación de la muestra.

El bazo se extrajo rápidamente de animales sacrificados mediante sevoflurano (Abbot) y se sumergió en OCT™ Compound (Tissue-Tek® Sakura), un polímero que solidifica a -20° C y preserva la estructura del tejido, situado dentro de un molde desechable para histología (Lab-box). Inmediatamente a continuación se sumergió en isopentano frío en nieve carbónica, congelándose rápidamente. Estos moldes de tejido se conservaron en un congelador a -80° C.

3.10.2 Obtención de criosecciones.

Los tejidos conservados en OCT™ congelado se cortaron a 4 µm en un criostato (Tissue-Tek® Cryo3®, Sakura). Las secciones realizadas se recogieron en portaobjetos (Superfrost® plus, Thermo Scientific) que se dejaron secar al aire durante 2 minutos, antes de proceder a la tinción histológica o de nuevo a -80° C para su conservación a largo plazo.

3.10.3 Tinciones.

La inmunohistología es una técnica que permite detectar la localización exacta de proteínas en los diferentes tipos celulares de un tejido. En esta memoria se realizaron dos tipos de tinciones inmunorreactivas en tejido: inmunofluorescencia e inmunohistoquímica.

3.10.3.a Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia se basa en la detección de antígenos en el contexto de un tejido mediante la utilización de anticuerpos que están acoplados a moléculas fluorescentes (Ver Tabla 3.2). Los tejidos se fijaron con acetona durante 8 minutos a temperatura ambiente. La acetona permite permeabilizar el tejido a la vez que fija. Tras la fijación de los tejidos se lava 3 veces con PBS-T (PBS-Tritón 0,1 %) durante 5 minutos y se realiza el bloqueo de las muestras con PBS-T al 6 % de BSA y 2 % de suero normal de cabra o conejo, en función del origen del anticuerpo secundario. A continuación se incubaba con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo-PBS, (ratio 1:1). La incubación de los anticuerpos primarios se realizó en una cámara húmeda, durante una hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4° C, en función de las características de cada epítipo o anticuerpo. Se lava 3 veces con PBS-T (PBS-Tritón 0,1 %) durante 5 minutos y se incubaba con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. En algunos casos se realizó un doble marcaje, para lo cual, tras la incubación con el secundario se hizo otra incubación con el segundo anticuerpo de interés acoplado a moléculas fluorescentes. Finalmente, las muestras se montaron en medio de montaje *Vectashield Mounting Medium with DAPI* (Vector laboratories), se fotografiaron en el

microscopio de fluorescencia Eclipse 80i (Nikon) y se analizaron en el programa NIS-Elements F3.0 (Nikon).

3.10.3.b Inmunohistoquímica.

En la inmunohistoquímica la posición del antígeno se revela mediante una reacción enzimática, que en nuestro caso puede ser de dos tipos: la reacción de la peroxidasa, cuyo sustrato (Diaminobencidina, DAB) produce un color pardo o la reacción de la fosfatasa alcalina cuyo sustrato (Nitroazul de tetrazolio) produce un color azul. La fijación en este caso se realiza con PFA 4 % durante 15 minutos, ya que conserva mejor la microestructura tisular. El bloqueo e incubación con el anticuerpo primario se realizan igual que en el caso de la inmunofluorescencia, excepto en el caso de la reacción de la peroxidasa en la que es preciso bloquear previamente las peroxidasas endógenas del tejido incubando las muestras con una solución de metanol al 10 % y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 1 % durante 10 minutos en frío. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lava y se incuba con el anticuerpo secundario, que en el caso de la inmunohistoquímica se encuentra acoplado a biotina. Los anticuerpos biotinilados permiten la amplificación de la señal gracias a la reacción biotina-estreptavidina. En esta reacción, varias moléculas de estreptavidina pueden unirse a una única molécula de biotina, permitiendo de esta manera aumentar la señal. La estreptavidina se encuentra conjugada a moléculas de peroxidasa (VECTASTAI6® Universal Elite® ABC Kit, Vector laboratorios), o fosfatasa alcalina (VECTASTAI6® Universal ABC-APKit, Vector laboratorios). Finalmente, la reacción colorimétrica para cada una de las enzimas acopladas a los anticuerpos se realizó con el kit comercial *Vector® Blue AP substrate* (Vector) para la fosfatasa alcalina. Los núcleos se contratiñeron con verde metilo (*Methyl Green*, Vector Laboratories).

3.11 Análisis estadístico.

Los valores presentados son la media \pm el error estándar de la media de los resultados obtenidos de un número variable de experimentos que se especifica en cada caso. Las comparaciones de las medias se efectuaron mediante el test de la t de Student de dos colas (Excel, Microsoft). Cuando se indica que los resultados son estadísticamente significativos el nivel de significación se define como $p < 0.05$, a no ser que se indique lo contrario.

4.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de las poblaciones de macrófagos del bazo.

Tal y como se detalló en la introducción, el estroma del bazo se divide en pulpa roja y pulpa blanca, delimitadas ambas regiones por la zona marginal. Las principales poblaciones de macrófagos en el bazo se corresponden con los macrófagos metalofílicos de la zona marginal (MMM), característicos por la elevada expresión de CD169 o Sialoadhesina (CD169⁺), los macrófagos de la zona marginal (MZM) que destacan por ser SIGNR1⁺, MARCO⁺ y Tim-4⁺, los macrófagos de la pulpa blanca que son CD68⁺ y los macrófagos de la pulpa roja, distinguibles por su expresión de F4/80⁺. Por otro lado, un número creciente de publicaciones demuestran la importancia del receptor nuclear LXR en la biología del macrófago, principalmente en el contexto del transporte de lípidos y control de la respuesta inflamatoria (Joseph et al., 2003) y la retirada de células apoptóticas (Alonso-Gonzalez et al., 2009).

Con el objetivo de estudiar la influencia de LXR sobre las poblaciones de macrófagos esplénicos, realizamos tinciones inmunohistoquímicas de bazos procedentes de ratones WT, LXR α ^{-/-}, LXR β ^{-/-} y LXR-DKO -carente de ambas isoformas-. De esta manera, pudimos comprobar el normal desarrollo de la población de macrófagos de la pulpa roja (F4/80⁺) en ratones de todos los genotipos (Ver Figura 4.1A). Sin embargo, observamos que los bazos de ratones que no expresan LXR α , en concreto los genotipos LXR α ^{-/-} y LXR-DKO, carecen de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal MMM y MZM, mientras que los ratones con genotipos que expresan LXR α como WT y LXR β ^{-/-}, presentan ambas poblaciones bien definidas (ver Figura 4.1.B).

Con este experimento pudimos concluir que la expresión de LXR α es esencial para la formación de ciertas poblaciones de macrófagos en el bazo, en concreto MMM y MZM, pero no de otras, como los macrófagos de la pulpa roja.

4.2 Estudio de las señales de formación de la zona marginal del bazo.

Procedimos entonces a realizar una búsqueda bibliográfica sobre vías de señalización importantes para la formación de las poblaciones de macrófagos de la zona

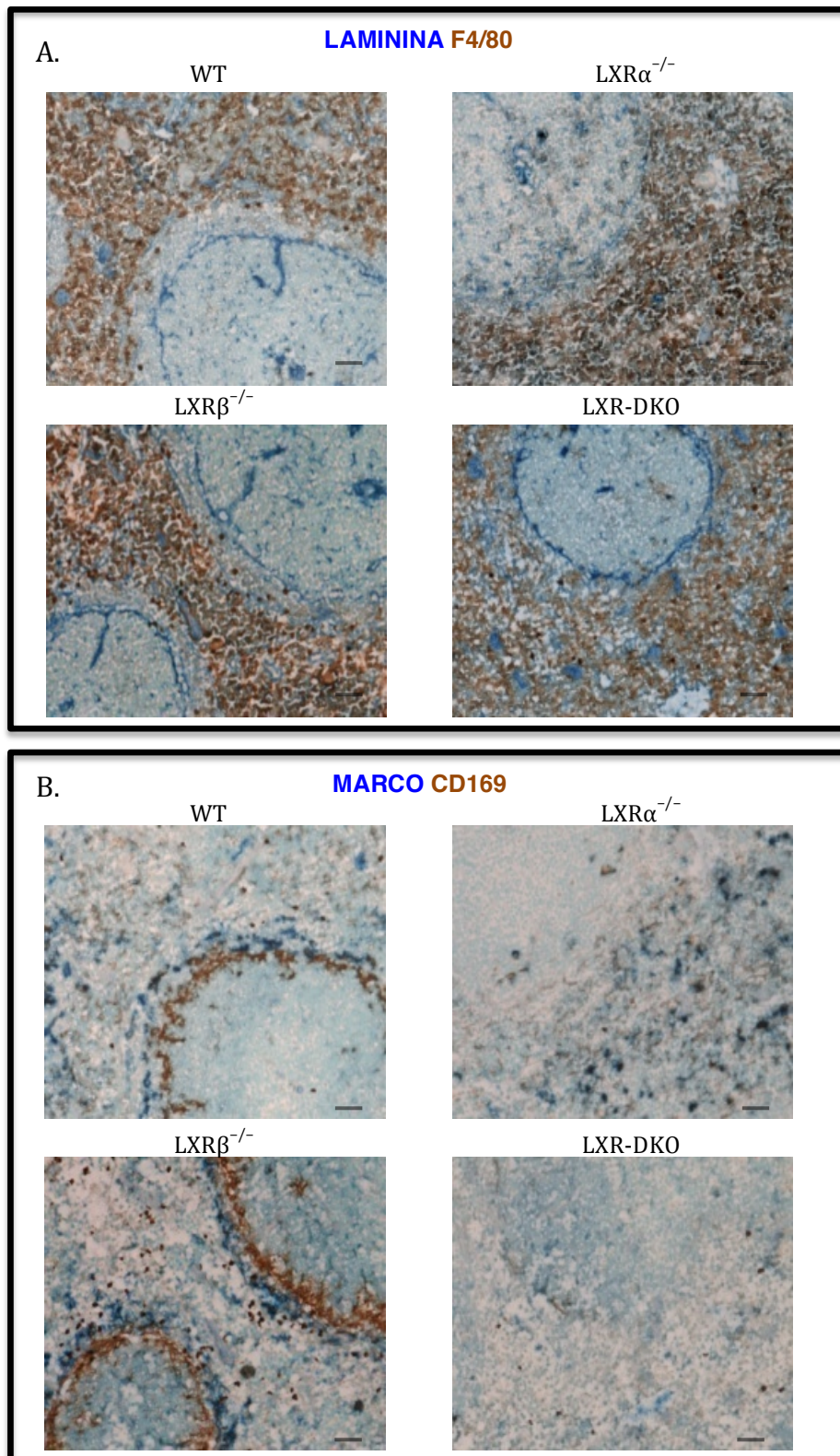


Figura 4.1. Las poblaciones de macrófagos de la zona marginal del bazo dependen de $LXR\alpha$ para su desarrollo.

Tinciones inmunohistoquímicas de las poblaciones de macrófagos esplénicos en bazos procedentes de ratones WT, $LXR\alpha^{-/-}$, $LXR\beta^{-/-}$ y LXR-DKO.

Panel **A**. Inmunodetección de Laminina (azul) y F4/80 (marrón) en la que no se aprecian diferencias en la población de macrófagos de la pulpa roja ($F4/80^{+}$) entre genotipos.

Panel **B**. Inmunodetección de Marco (azul) y CD169 (marrón) en la que se aprecia la ausencia de las poblaciones de macrófagos metalofílicos de la zona marginal (MMM, $CD169^{+}$) y de macrófagos de la zona marginal (MZM, $MARCO^{+}$) en los genotipos carentes de $LXR\alpha$ ($LXR\alpha^{-/-}$ y DKO).

Los datos son representativos de 4 experimentos con $n=3-5$ ratones por grupo. La barra representa $50\ \mu\text{m}$.

marginal en el bazo. Encontramos que los ratones *plt/plt*, que carecen de la expresión funcional de las quimioquinas CCL19 y CCL21, presentan un menor número de macrófagos MZM en comparación con ratones normales C57BL/6, debido a un defecto en la localización (Ato et al., 2004). Es decir, existe un menor número de macrófagos en la zona marginal porque las señales involucradas en su localización anatómica están ausentes.

Por tanto, nos preguntamos si la ausencia de macrófagos de la zona marginal en los ratones que carecen de LXR α podría tener relación con un defecto en las citoquinas responsables de la localización de los macrófagos, es decir, del microambiente de señalización esplénico.

Estudios previos de nuestro laboratorio nos permitieron conocer que en ratones la localización de los macrófagos en la zona marginal ocurre aproximadamente en la tercera semana del desarrollo postnatal. Consecuentemente, aislamos bazos de ratones WT y LXR-DKO recién nacidos de 1, 2 y 3 semanas de edad, y medimos la expresión de CCL19 y CCL21 mediante RT-PCR. Como se puede observar en la figura 4.2, la expresión de estas quimioquinas aumenta con la edad, pero no se observan diferencias entre ambos genotipos que pudieran explicar la ausencia de poblaciones de macrófagos de la zona marginal. Tampoco observamos diferencias en la expresión de LT α (*lymphotoxin α*) y su receptor, LTBR (*lymphotoxin β receptor*), moléculas que intervienen en la formación de los órganos linfoides (Tumanov et al., 2003). Por otro lado, la expresión de LXR α aumenta de manera paralela a la formación de la zona marginal, de manera similar al patrón de expresión de Tim-4 -un marcador de los macrófagos de la zona marginal MZM- virtualmente ausente en bazos de ratones LXR-DKO.

Estos resultados indican que la expresión de las quimioquinas CCL19 y CCL21 implicadas en la organogénesis linfoide y localización de los macrófagos de la zona marginal no presenta grandes diferencias que pudieran explicar el fenotipo observado.

4.3 Experimentos de rescate de fenotipo de la zona marginal.

LT α es una citoquina de la familia de TNF que interviene en el desarrollo de los órganos linfáticos, organización y mantenimiento del microambiente linfoide y en el proceso de inflamación (Ware, 2005). Los ratones deficientes en linfotoxina LT α carecen de zona marginal, pero a diferencia de los ratones carentes de LXR α , presentan defectos adicionales en los ganglios linfáticos que no observamos en los ratones LXR α ^{-/-}. Este fenotipo es debido al papel de la linfotoxina LT α en la quimiotaxis y localización, es decir, LT α proporciona las señales apropiadas para la localización de los tipos celulares involucrados en la organización de los órganos linfoides secundarios como bazo y ganglios linfáticos. Es importante tener en cuenta que los trasplantes de médula ósea de ratones WT a ratones deficientes en LT α no consiguen recuperar las poblaciones de la zona

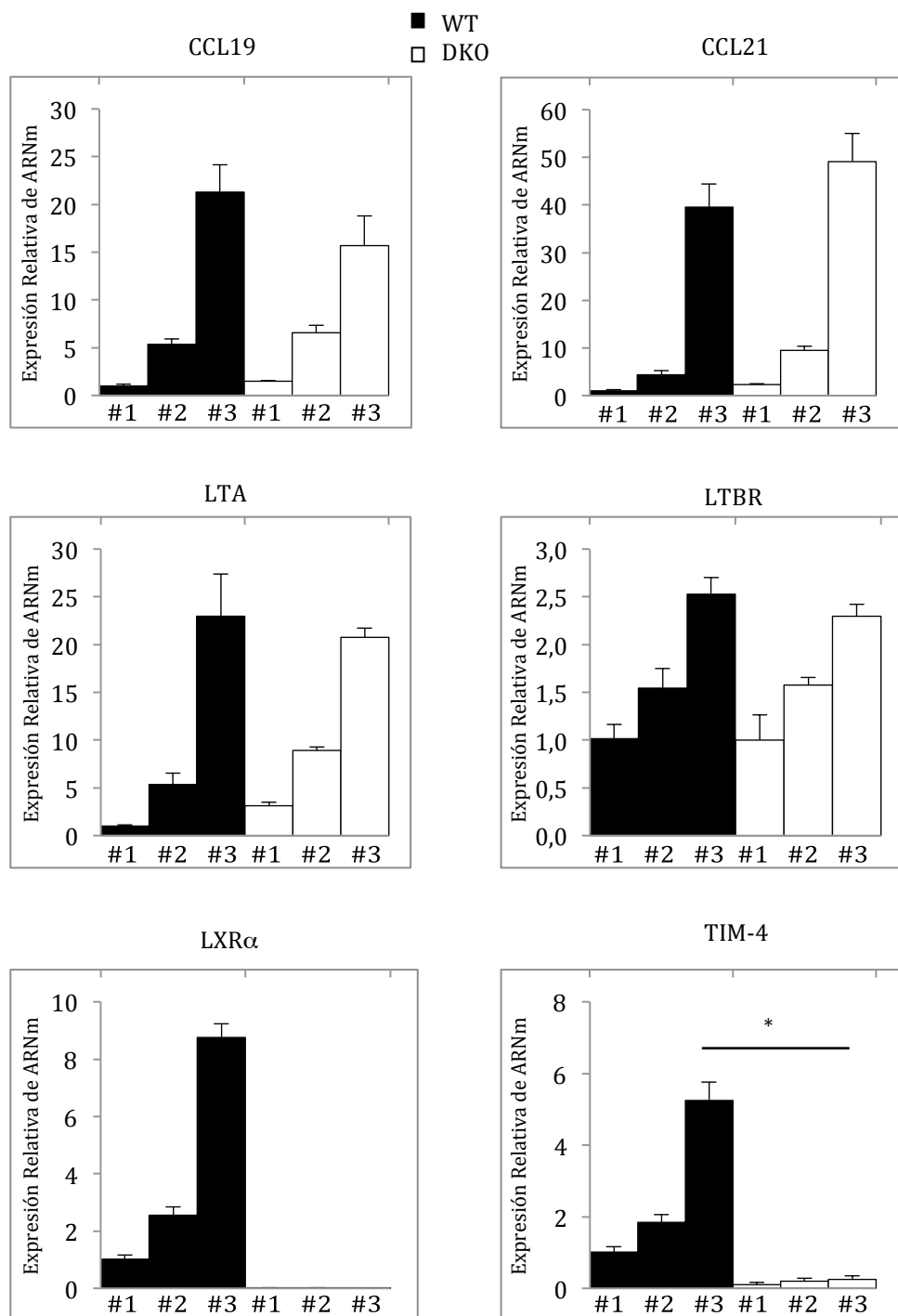


Figura 4.2. La expresión de citoquinas implicadas en la formación del bazo y la zona marginal no presenta diferencias entre WT y DKO.

Se estudió los niveles de expresión de CCL19, CCL21, LTA, LTBR, LXR α y TIM-4 en bazo de ratones recién nacidos de 1, 2 y 3 semanas de edad WT y LXR-DKO. La expresión de todos ellos aumenta con la edad sin diferencias significativas entre genotipos, salvo la expresión de LXR α y TIM-4. Se indica la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$.

marginal (Tumanov et al., 2003), probablemente debido a que este defecto en la señalización no permite a los precursores localizarse donde deben.

Con el objetivo de comprobar si las poblaciones de macrófagos de la zona marginal se podían recuperar en ratones carentes de expresión de $LXR\alpha$, trasplantamos médula ósea procedente de ratones WT, $LXR\alpha^{-/-}$, $LXR\beta^{-/-}$ y LXR-DKO a ratones LXR-DKO. Comprobamos que el trasplante con médula ósea de ratones que expresan $LXR\alpha$ (en concreto WT y $LXR\beta^{-/-}$) permite la recuperación de los macrófagos de la zona marginal en ratones LXR-DKO (Ver Figura 4.3A), efecto que no se observa cuando los donantes de médula ósea son ratones carentes de $LXR\alpha$ como $LXR\alpha^{-/-}$ y LXR-DKO. Por otro lado, la población de macrófagos de la pulpa roja $F4/80^+$ no se ve afectada por la presencia o ausencia de LXR (Ver Figura 4.3B).

Estos resultados apoyan la idea de que el microambiente de señalización en el bazo de los ratones carentes de $LXR\alpha$ es correcto y por ello los precursores de la médula ósea que expresan $LXR\alpha$ son capaces de repoblar la zona marginal de ratones LXR-DKO. Esto nos permite formular la hipótesis de que la acción de $LXR\alpha$ debe ocurrir a nivel de estos precursores hematopoyéticos.

4.4 Modelo de depleción de las poblaciones de macrófagos por clodronato.

El clodronato es un bisfosfonato, una sustancia que al ser captada por los macrófagos se transforma en un análogo tóxico del ATP que causa la muerte celular por apoptosis. Para facilitar la captación y fagocitosis, las moléculas de clodronato se administran incluidas dentro de liposomas. Con el objetivo de estudiar la influencia de LXR en la cinética de repoblación de las poblaciones de macrófagos del bazo, se administró liposomas de clodronato a distintas cohortes de ratones para promover primero la desaparición de dichas poblaciones. Posteriormente, tratamos a los ratones con un agonista de LXR para inducir su activación y observar su influencia en la repoblación.

Según estudios anteriores, tras un tratamiento de liposomas con clodronato la repoblación de los macrófagos de la pulpa roja ocurre en 2 semanas aproximadamente, mientras que la repoblación de los macrófagos de la zona marginal ocurre a lo largo de 4 semanas (van Rooijen et al., 1989). Los liposomas, que contenían clodronato o PBS como control, se administraron por vía intraperitoneal a ratones $LXR\beta^{-/-}$ y $LXR\alpha^{-/-}$. Tras 48 horas se sacrificó una parte de los ratones y se comprobó la eficacia del clodronato en inducir la desaparición de macrófagos en el bazo. Efectivamente, se comprueba que el clodronato consigue eliminar tanto las dos poblaciones de macrófagos de la zona marginal ($CD169^+$ y $MARCO^+$) como los macrófagos de la pulpa roja ($F4/80^+$) (ver Figura 4.4).

Tras dos semanas, a los restantes ratones se les administró una dosis del agonista de LXR (GW3965) o vehículo cada 2 días. Tras una semana de tratamiento con GW3965 (3 semanas desde el tratamiento con clodronato), se sacrificaron los ratones y se

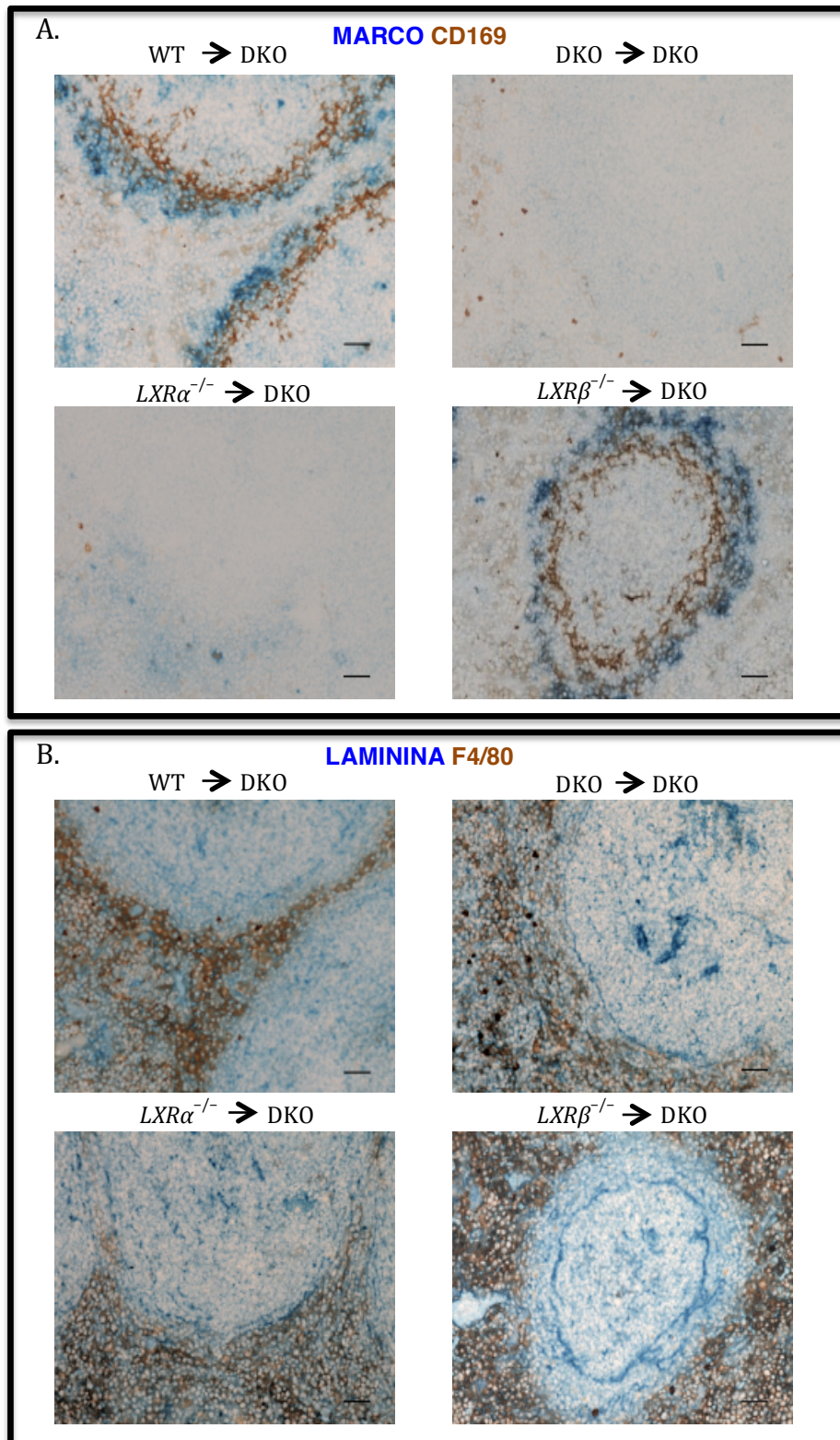


Figura 4.3. Trasplantes con médula ósea de ratones que expresan *LXRα* permiten recuperar las poblaciones de macrófagos de la zona marginal del bazo.

Tinciones inmunohistoquímicas de bazos procedentes de ratones DKO a los que se ha trasplantado con médula ósea de ratones WT, *LXRα*^{-/-}, *LXRβ*^{-/-} o DKO, según se indica.

Panel **A**. Se observa la recuperación de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal en los ratones trasplantados con médula ósea procedente de genotipos que expresan *LXRα* (WT y *LXRβ*^{-/-}).

Panel **B**. La población de macrófagos de la pulpa roja F4/80⁺ permanece inalterada.

Los datos son representativos de 2 experimentos con n=6 ratones por grupo. La barra representa 50 μm.

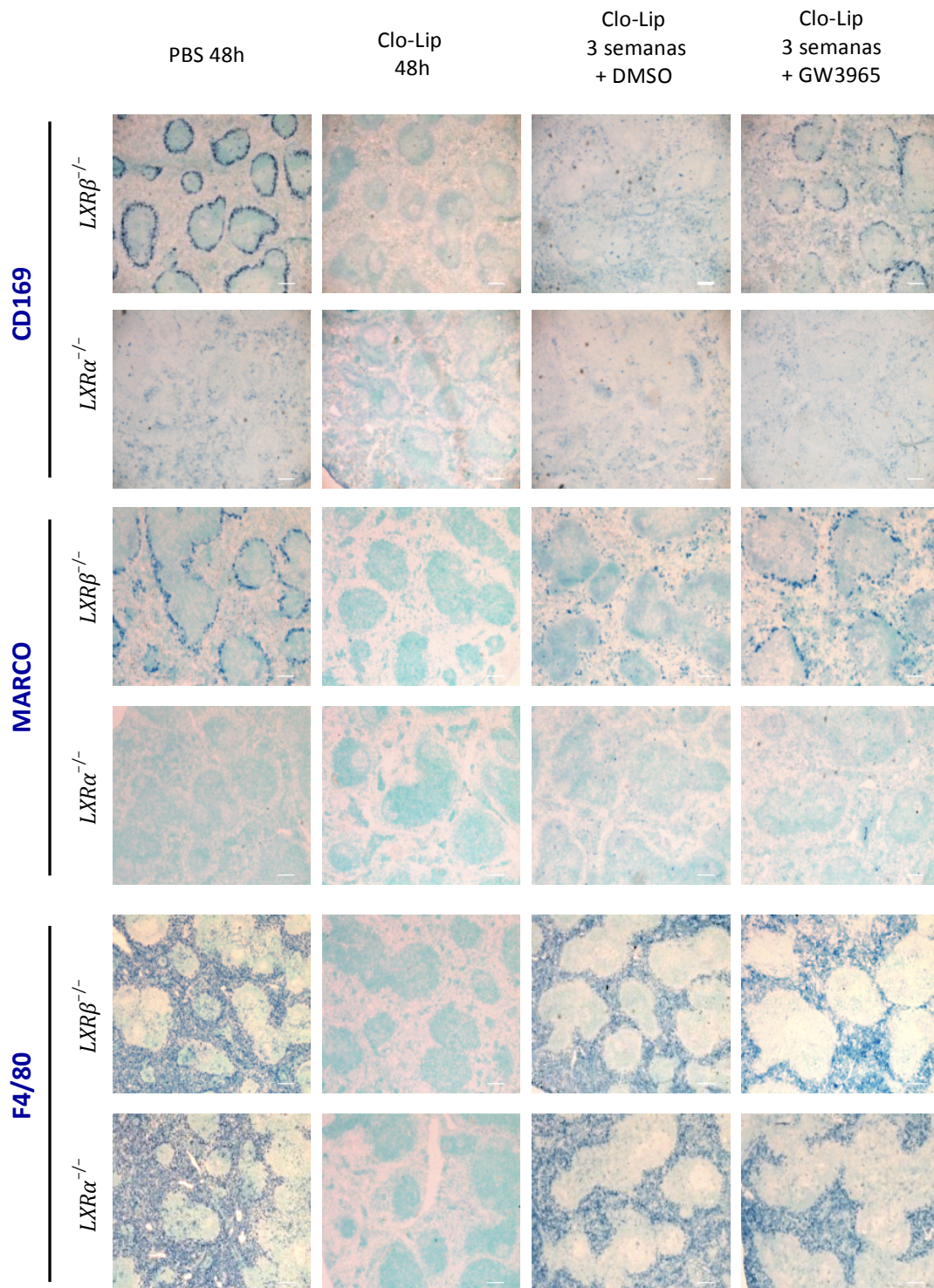


Figura 4.4. La activación farmacológica de $LXR\alpha$ acelera la cinética de repoblación de las poblaciones de macrófagos del bazo.

La activación de $LXR\alpha$ con el ligando sintético GW3965 aumenta sensiblemente la velocidad de repoblación de los macrófagos de la zona marginal $CD169^+$ y $MARCO^+$, mientras que la repoblación de los macrófagos de la pulpa roja $F4/80^+$ es independiente de esta activación.

Imágenes representativas de un experimento con 5 ratones por grupo. Escala 150 μm .

estudiaron las poblaciones de macrófagos esplénicos. Mediante inmunohistoquímica, se observa que los macrófagos de la pulpa roja F4/80⁺ se han recuperado de manera eficiente independientemente de LXR α . Sin embargo, se observa una mayor recuperación de la zona marginal en ratones tratados con GW3965, tal y como indican los marcadores CD169 y MARCO, con respecto a los ratones tratados con vehículo. Además, esta recuperación es dependiente de LXR α ya que sólo se observa en los ratones LXR β ^{-/-} y no en ratones LXR α ^{-/-} (Ver Figura 4.4).

Esta aproximación nos permite comprobar que LXR α es importante en la recuperación de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal tras un tratamiento fagotóxico, y que este proceso se puede acelerar mediante activación farmacológica.

4.5 Generación de una cepa de ratones carentes de LXR α en las células hematopoyéticas (LXR α ^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-}).

Con el objeto de confirmar el papel de LXR α en los precursores de la médula ósea, generamos un modelo murino carente de la expresión de LXR α en células hematopoyéticas. Para ello, se realizaron una serie de cruces entre ratones con el gen de LXR α "floreado" (LXR α ^{fl/fl}) y ratones con el gen de Vav-iCre, tal y como se detalla a continuación.

Primero, para obtener ratones homocigotos LXR α ^{fl/fl}, se cruzaron ratones heterocigotos LXR α ^{fl/+} entre sí (ver Figura 4.5A). Para aumentar el número de individuos, también se debieron de cruzar los ratones Vav-iCre entre sí. Es de destacar que por la naturaleza del genotipado de este gen es imposible distinguir homocigotos de heterocigotos, por lo que emplearemos el símbolo Vav-iCre^{+/-} para designar a los portadores (ver Figura 4.5B). En cualquier caso, una única copia del gen es suficiente para escindir la región floxeada (de Boer et al., 2003).

Finalmente, se realizaron los cruces 1 y 2 descritos en la sección 3.1.2 de Material y Métodos para obtener los ratones LXR α ^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-} (ver Figura 4.6). Para el genotipado del cruce LXR α ^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-} se empleó ADN de células de la médula ósea. En la cola de ratón no se observa la escisión, porque Vav-iCre sólo se expresa en células hematopoyéticas.

Para comprobar el grado de escisión se estudió la expresión a nivel de ARNm de LXR α en distintos tejidos. Observamos que en órganos en los que la mayoría de células tienen un origen hematopoyético como el bazo y en células derivadas de la médula ósea (BMDM), la expresión de LXR α ha sido prácticamente anulada, pero en otros órganos como el hígado en los que el porcentaje de células hematopoyéticas es mucho menor la expresión de LXR α se conserva (ver Figura 4.7A). Además, como es de esperar, sólo los ratones homocigotos LXR α ^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-} presentan delección total de LXR α

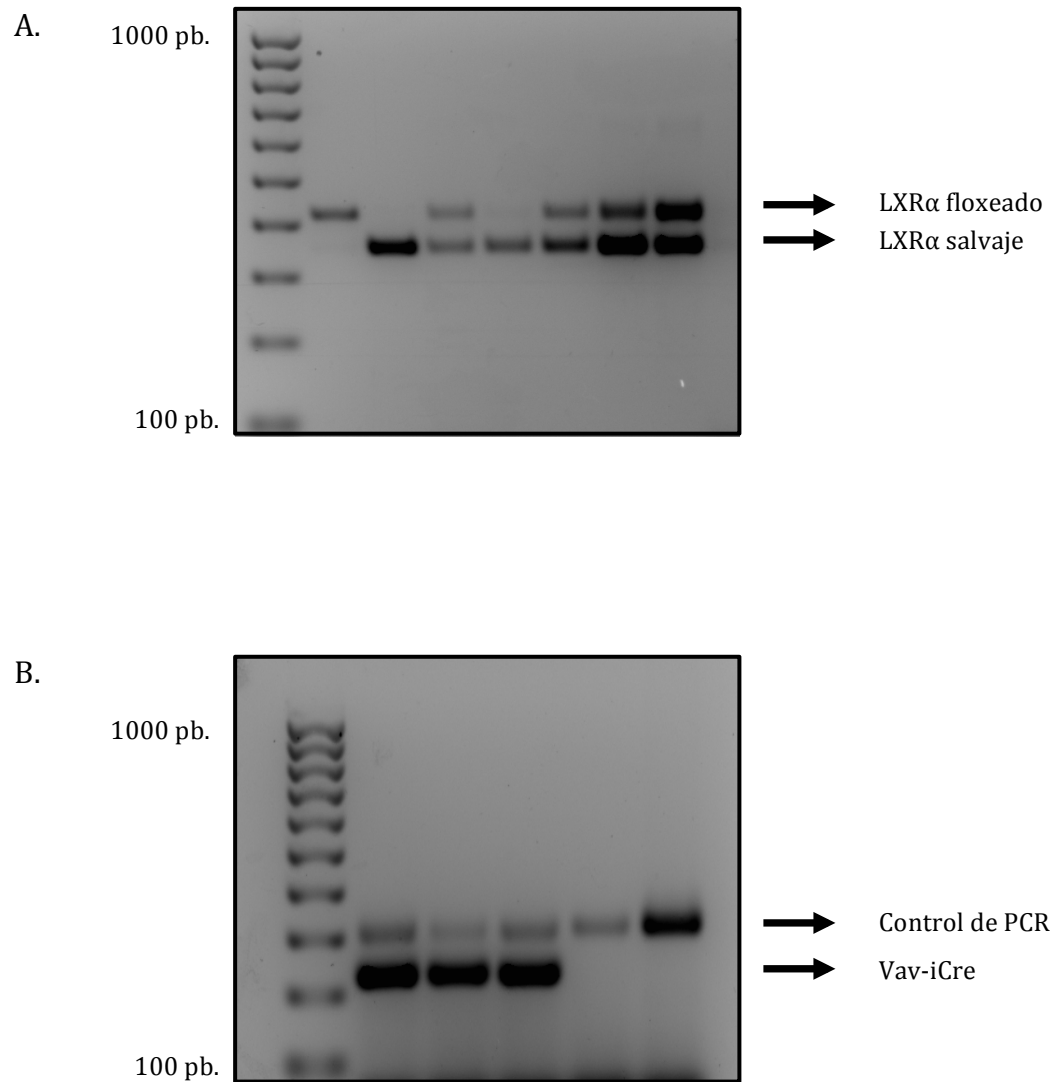


Figura 4.5. Genotipado para la obtención de las cepas de ratones *LXRα-Flox* y *Vav-iCre*.

Panel A. Genotipado del alelo *LXRα-Flox* con la pareja de primers Lf/Lr. Se observa una banda a 416pb. que corresponde con el alelo *LXRα* floxado y otra banda a 350pb. que corresponde con el alelo *LXRα* salvaje.

Panel B. Genotipado del alelo *Vav-iCre* con dos parejas de primers: oIMR73338 / oIMR73339 y oIMR9266 / oIMR9267. La primera pareja de primers amplifica una banda de control positivo de 324pb., mientras que la segunda pareja amplifica el transgen resultando en una banda de 236pb.

En todos los casos se usó DNA genómico obtenido de la cola del animal.

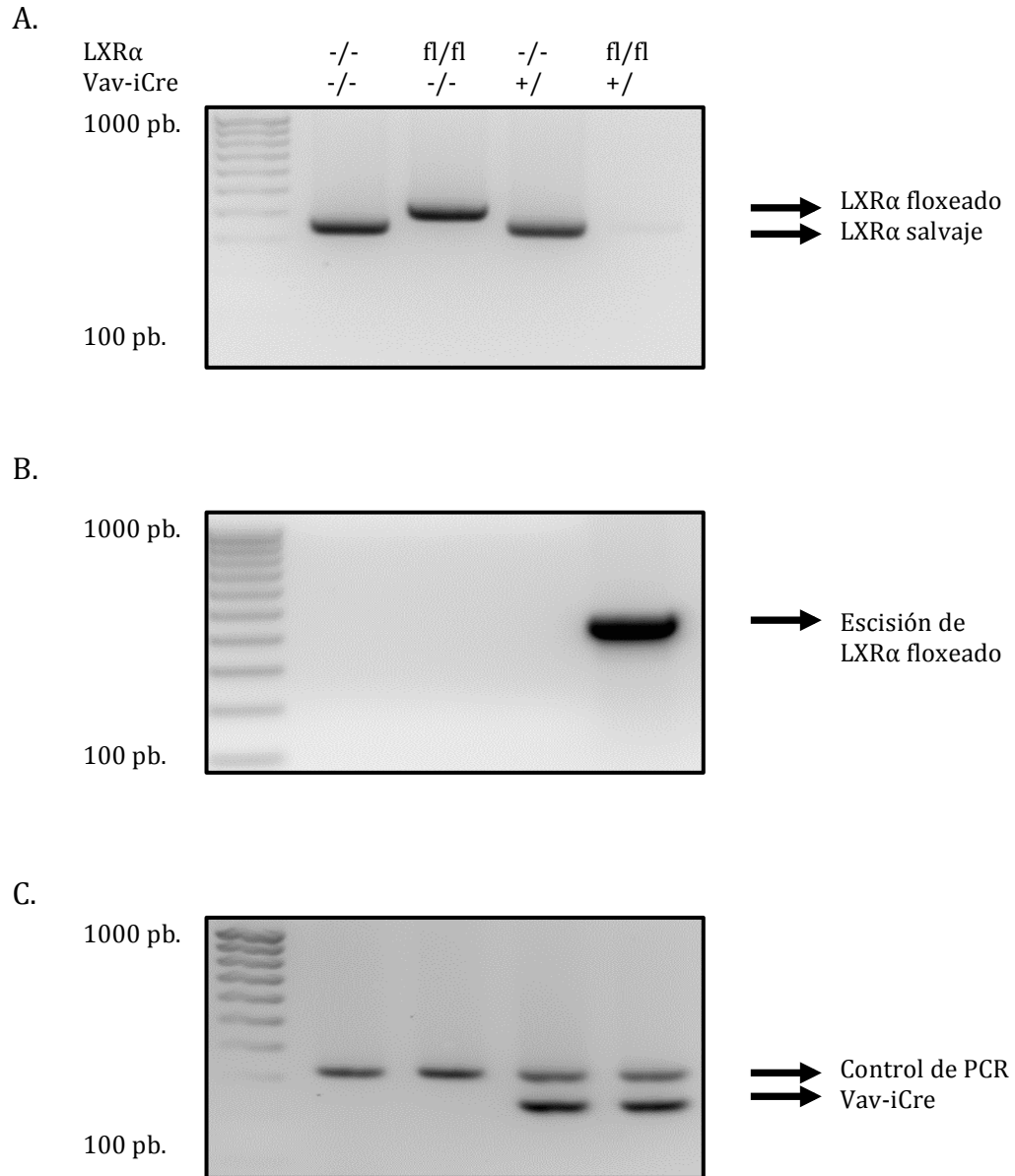


Figura 4.6. Genotipado de los descendientes del cruce de ratones LXR α -Flox y Vav-iCre.

Los 4 genotipos analizados son los siguientes: WT (línea 1), LXR α floxado (línea 2), Vav-iCre (línea 3) y LXR α floxado - Vav-iCre (línea 4).

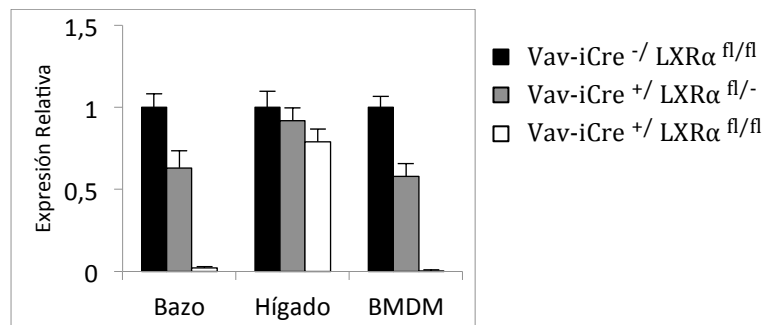
Panel **A.** Genotipado de Flox con la pareja de primers Lf/Lr. La falta de amplificación en la línea 4 se debe a escisión del alelo.

Panel **B.** Genotipado con la pareja de primers Lf/Er, que da una banda de 456pb. sólo en caso de escisión.

Panel **C.** Genotipado de Vav-iCre con las parejas oIMR73338 / oIMR73339 y oIMR9266 / oIMR9267. Se muestran los portadores en las líneas 3 y 4.

En todos los casos se usó DNA genómico obtenido de células de la médula ósea del animal.

A.



B.

Médula Ósea

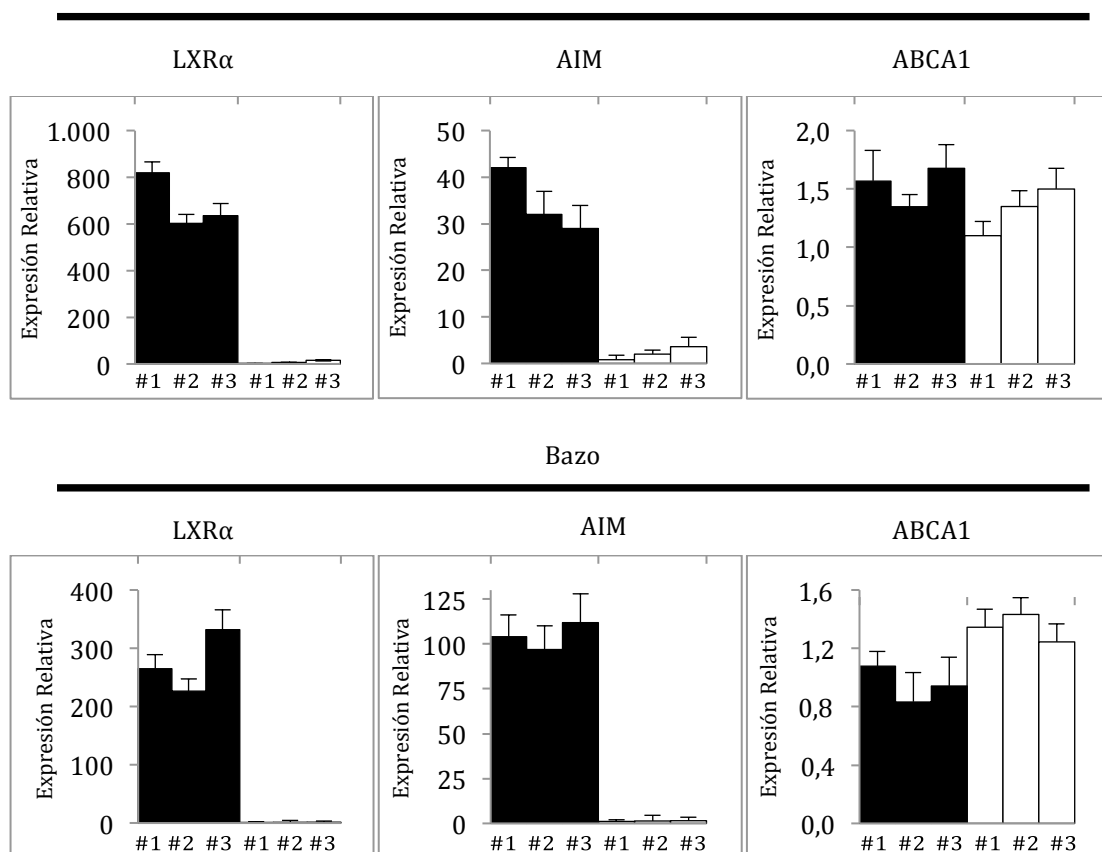


Figura 4.7. Análisis de la expresión de LXRα a nivel de ARNm en varios tejidos.

Panel A. La expresión de LXRα en heterocigosis (LXRα^{fl/-}) es de aproximadamente la mitad, debido a la delección de sólo uno de los alelos. En el hígado la proporción de células de origen hematopoyético es menor, por lo que se conserva la expresión de LXRα. Datos de 4 experimentos independientes, con pool de 3 individuos por grupo.

Panel B. Niveles de ARNm de LXRα, AIM y ABCA1 en Médula Ósea y Bazo. La expresión del gen diana AIM disminuye drásticamente en ausencia de LXRα, mientras que la expresión de ABCA1 no se ve significativamente alterada. Datos de 3 ratones por grupo.

mientras que los heterocigotos $LXR\alpha^{fl/+}/Vav-iCre^{+/-}$ expresan un nivel de expresión intermedio (ver Figura 4.7A). Adicionalmente, se estudió el efecto de la delección de $LXR\alpha$ sobre la expresión de dos genes diana de LXR bien conocidos como son AIM y ABCA1 en dos órganos de alto contenido en células hematopoyéticas como la médula ósea y el bazo (ver Figura 4.7B). Comprobamos que la deficiencia de $LXR\alpha$ compromete en gran medida la expresión de AIM, consistente con su regulación dependiente de $LXR\alpha$ (Joseph et al., 2004), mientras que ABCA1, al estar regulado por ambas isoformas de LXR (Costet et al., 2000), mantiene su expresión.

Resultados similares se obtuvieron a nivel de proteína. Por ejemplo, los macrófagos peritoneales de ratones $LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-}$ no presentan niveles detectables de $LXR\alpha$, mientras que los macrófagos peritoneales de ratones heterocigotos $LXR\alpha^{fl/+}/Vav-iCre^{+/-}$ presentan un nivel de expresión de $LXR\alpha$ que se corresponde aproximadamente a la mitad del nivel de expresión detectado en ratones en los que no ha habido delección (ver Figura 4.8A). Adicionalmente, el nivel de expresión de $LXR\alpha$ en distintos tejidos también se midió a nivel de proteína para comprobar el grado de escisión. Al igual que en el caso de la expresión de ARNm, comprobamos que el nivel de proteína de $LXR\alpha$ es prácticamente indetectable en órganos en los que la mayoría de células tienen un origen hematopoyético como el bazo o los nódulos linfáticos, pero en otros órganos como el hígado en los que el porcentaje de células hematopoyéticas es mucho menor la expresión de $LXR\alpha$ se conserva (ver Figura 4.8B). En otros, como el pulmón, se aprecia una cierta escisión, consistente con un origen mixto embrionario y hematopoyético de sus poblaciones de macrófagos (Schulz et al., 2012).

4.6 Estudio de la zona marginal en ratones carentes de $LXR\alpha$ en células hematopoyéticas ($LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-}$).

Los resultados obtenidos con los trasplantes de médula ósea apuntan a un papel de $LXR\alpha$ en las células hematopoyéticas. Con el objetivo de sustanciar estos resultados procedimos a estudiar las poblaciones de macrófagos esplénicos en nuestros ratones carentes de $LXR\alpha$ en células hematopoyéticas ($LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-}$) mediante técnicas de inmunofluorescencia. Con esta aproximación, comprobamos una ausencia muy significativa de ambas poblaciones de macrófagos de la zona marginal (Macrófagos Metalofílicos de la Zona Marginal $CD169^+$ y Macrófagos de la Zona Marginal $SIGNR1^+/MARCO^+$), mientras que no se observan diferencias en los macrófagos de la pulpa roja, identificados por el marcador F4/80 (ver Figura 4.9). Esto indica que la ausencia de $LXR\alpha$ en células hematopoyéticas es suficiente para observar el defecto en la zona marginal, y descarta que sea debido a la ausencia de $LXR\alpha$ en otros tipos celulares.

Por otro lado, en la Figura 4.10 se observa un desarrollo adecuado de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal en ratones $LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{-/-}$ y $LXR\alpha^{fl/-}/Vav-iCre^{+/-}$, que están ausentes en ratones $LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-}$. Similares resultados se observan en la Figura 4.11. Esto indica que la heterocigosis de $LXR\alpha$ en

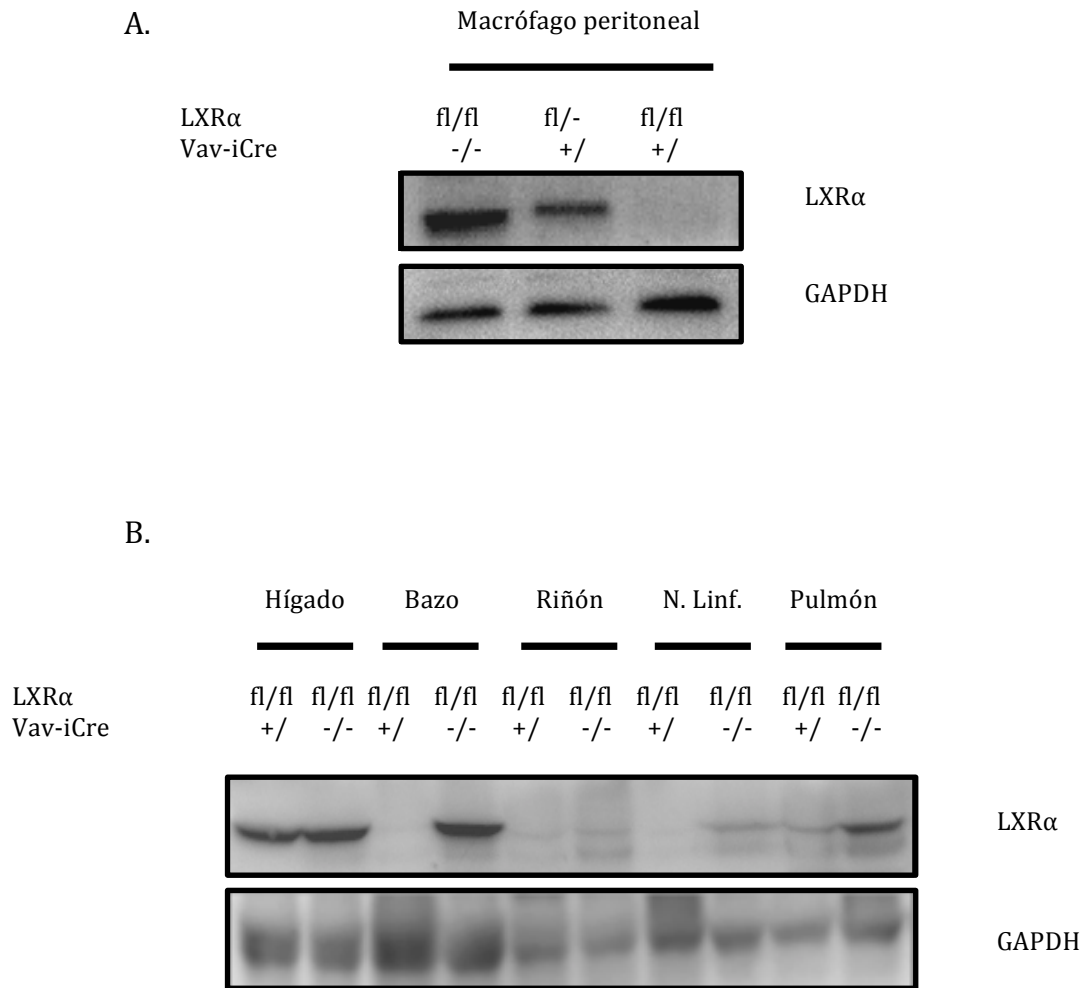


Figura 4.8. Análisis de la expresión de LXR α a nivel de proteína en varios tejidos.

Panel **A.** Western Blott que muestra la delección de LXR α en macrófagos peritoneales. En heterocigosis (LXR α ^{fl/-}) el nivel de proteína es de aproximadamente la mitad, debido a la delección de uno de los alelos.

Panel **B.** Western Blott de LXR α en varios órganos. Se observa la delección de LXR α en tejidos en los que predominan los tipos celulares de origen hematopoyético, como el bazo.

Datos representativos de 4 experimentos independientes, con pool de 3 individuos por grupo.

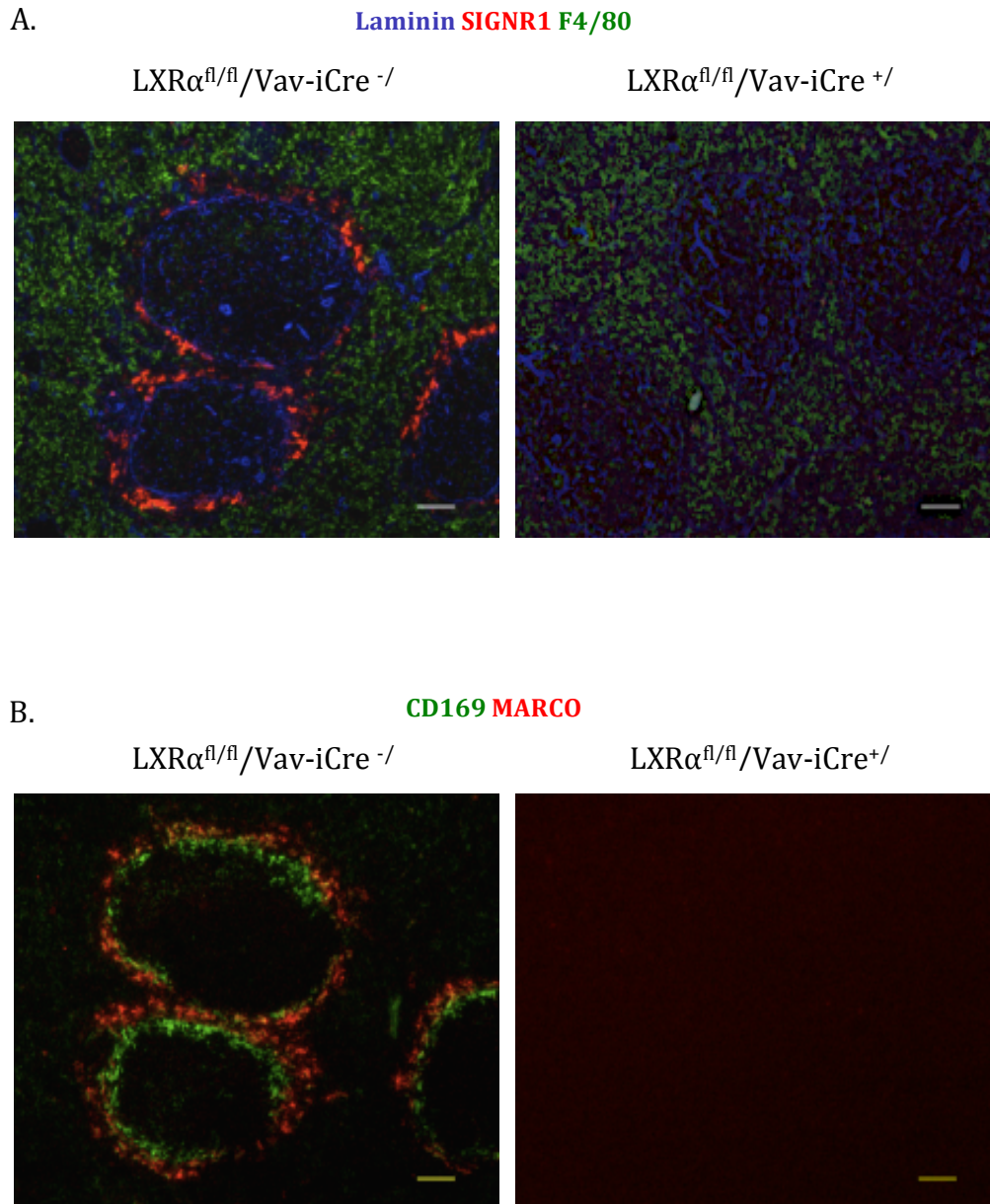


Figura 4.9. La escisión de $LXR\alpha$ en células hematopoyéticas determina la ausencia de macrófagos de zona marginal del bazo.

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.10 de Material y Métodos, se extrajeron los bazos de ratones $LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{-/}$ y $LXR\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/}$ y se sometieron a una tinción inmunofluorescente para detectar distintas poblaciones de macrófagos.

Panel **A**. Identificación de macrófagos de la pulpa roja (F4/80+, en verde) y macrófagos de la zona marginal (SIGNR1+, en rojo). Como referencia se usó un marcador de láminas basales (Laminin, en azul).

Panel **B**. Identificación simultánea de las dos poblaciones de macrófagos de la zona marginal (CD169+, en verde y Marco+, en rojo).

La barra representa 50 μ m. Se muestra un experimento representativo de, al menos, otros tres por grupo.

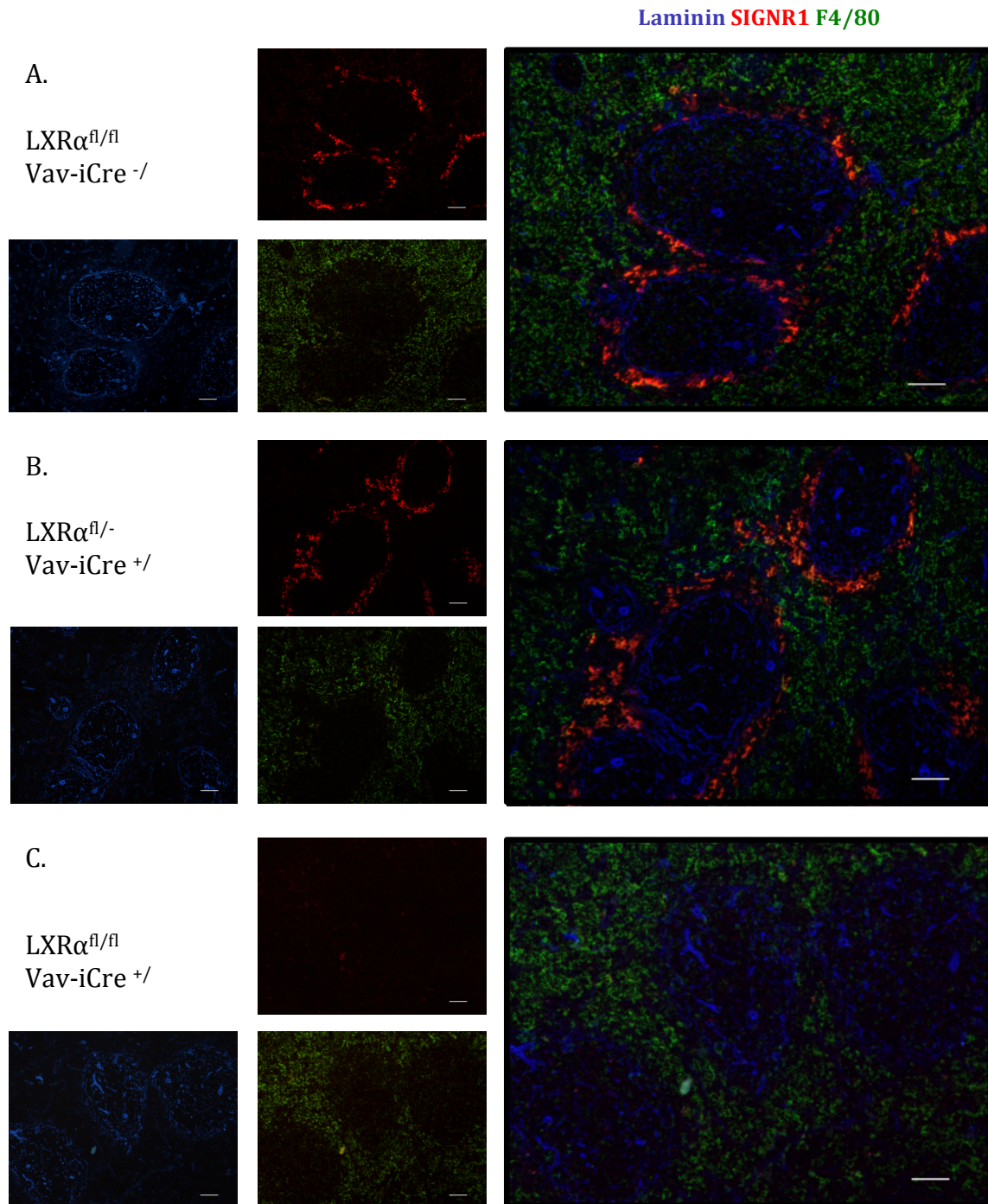


Figura 4.10. La formación de la zona marginal demuestra haplosuficiencia (I).

Identificación de macrófagos de la pulpa roja ($F4/80^{+}$, en verde) y macrófagos de la zona marginal ($SIGNR1^{+}$, en rojo). Como referencia se usó un marcador de láminas basales (Laminin, en azul). En el Panel **B** se observa que los ratones heterocigotos ($LXR\alpha^{fl/-}$ y $Vav-iCre^{+/+}$), los cuales expresan un nivel intermedio de $LXR\alpha$ (figura 4.6 y 4.7), presentan una población normal de MZM. La barra representa $50\ \mu\text{m}$. Se muestra un experimento representativo de, al menos, otros tres por grupo.

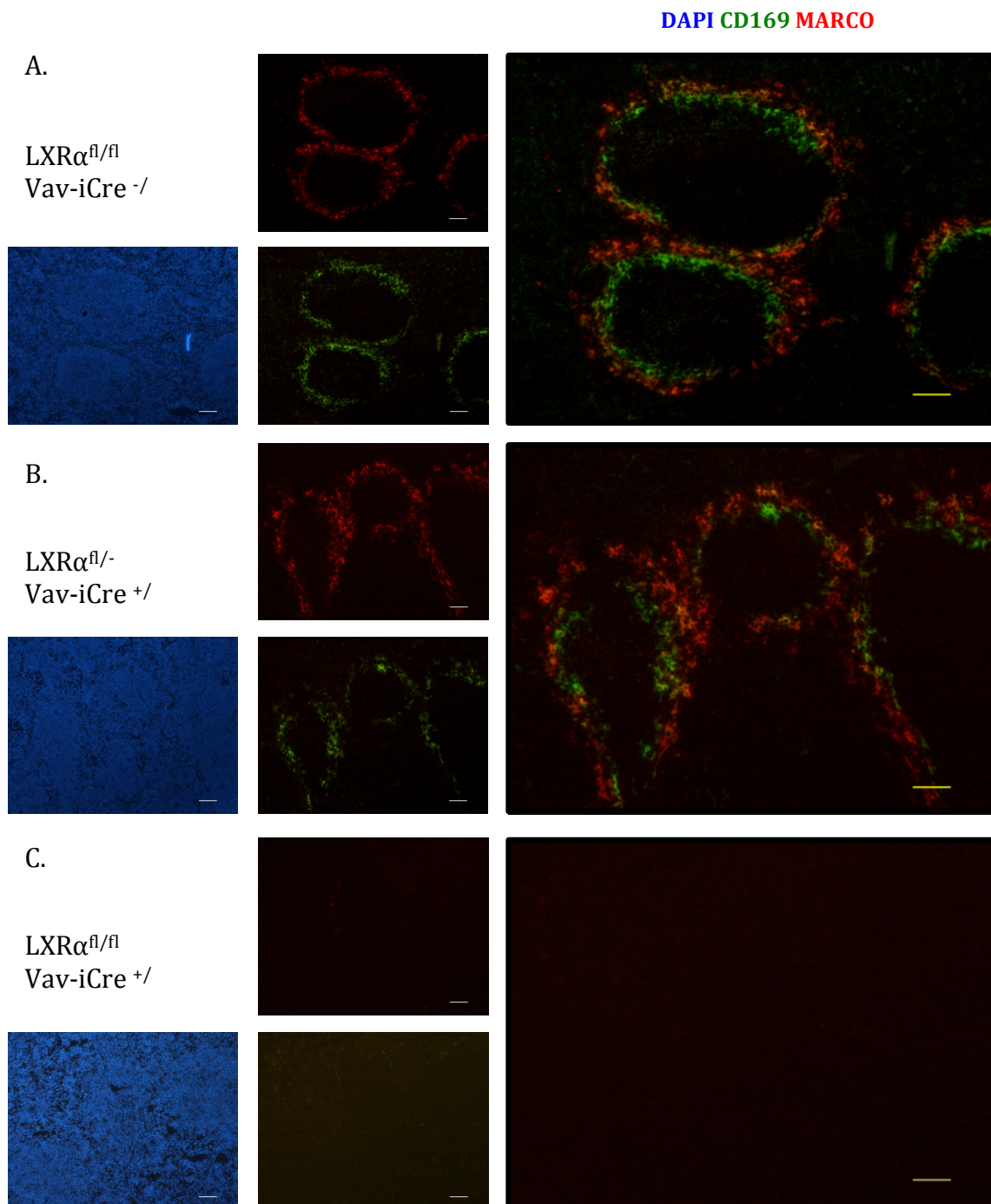


Figura 4.11. La formación de la zona marginal demuestra haplosuficiencia (II).

Identificación simultánea de las dos poblaciones de macrófagos de la zona marginal (MMM CD169⁺, en verde y MZM Marco⁺, en rojo). Como referencia se usó un marcador de núcleos (DAPI, en azul). En el Panel B. se observa que los ratones heterocigotos (LXR $\alpha^{fl/-}$ y Vav-iCre $^{+/-}$), los cuales expresan un nivel intermedio de LXR α (figura 4.6 y 4.7), presentan poblaciones normales de MMM y MZM. La barra representa 50 μ m. Se muestra un experimento representativo de, al menos, otros tres por grupo.

células hematopoyéticas es suficiente para el desarrollo de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal, fenómeno conocido como haplosuficiencia.

4.7 Reconstitución de la actividad de LXR α en progenitores hematopoyéticos mediante Lentivirus.

Para ahondar en el estudio de la formación de la zona marginal y de la señalización dependiente de LXR α , establecimos un modelo de ganancia de función de LXR α . Para ello, reconstituimos la expresión de LXR α en HSCs de ratones LXR α ^{-/-} usando un sistema lentiviral específico de células mieloides (Li et al., 2011). Estos lentivirus están pseudotipados con la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSVg), lo que les confiere un alto tropismo y por tanto, capacidad para transducir muchos tipos celulares diferentes. Por otro lado, el promotor sintético SP (*Synthetic Promoter*) que dirige la expresión del gen se activa sólo en células mieloides, por lo que la expresión de LXR α estará restringida a dicho linaje, tal y como se detalla en la sección 3.6 de Material y Métodos. Como control de la expresión se empleó un lentivirus que en lugar de LXR α contiene la proteína verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*), cuya presencia es fácilmente detectable.

Primero, examinamos la expresión de GFP en monocitos de animales LXR α ^{-/-} trasplantados con medula ósea enriquecida con HSCs transfectadas con Lenti-SP-GFP o Lenti-SP-LXR α . Observamos que tras 8 semanas, entre un 30 % a un 40 % de los monocitos de sangre periférica son GFP⁺ (ver Figura 4.12). Estos datos indican que la transfección de las células HSCs con el lentivirus ha dado lugar a un porcentaje sustancial de monocitos sanguíneos transfectados, por lo que, a las 12 semanas, procedimos a estudiar la reconstitución de la zona marginal de estos ratones. Los análisis de secciones de bazo muestran una recuperación parcial en los ratones trasplantados con células tratadas con lenti-SP-LXR α de ambas poblaciones de macrófagos de la zona marginal según los marcadores CD169, Marco y Tim-4, mientras que los ratones trasplantados con HSCs tratadas con lenti-SP-GFP carecen de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal, en consonancia con nuestra hipótesis inicial (ver Figura 4.13).

Con estos resultados mostramos que la re-introducción del gen LXR α en células de médula ósea LXR-deficientes es suficiente para, mediante trasplante, inducir una recuperación de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal.

4.8 Estudio de la fagocitosis de plaquetas opsonizadas en la Zona Marginal.

Como parte de otros estudios realizados en nuestro laboratorio, habíamos comprobado la gran capacidad de los macrófagos de la zona marginal para fagocitar antígenos sanguíneos tales como dextrano o partículas de *S. aureus* (A-Gonzalez et al., 2013). A continuación, nos propusimos estudiar el papel de los macrófagos de la zona

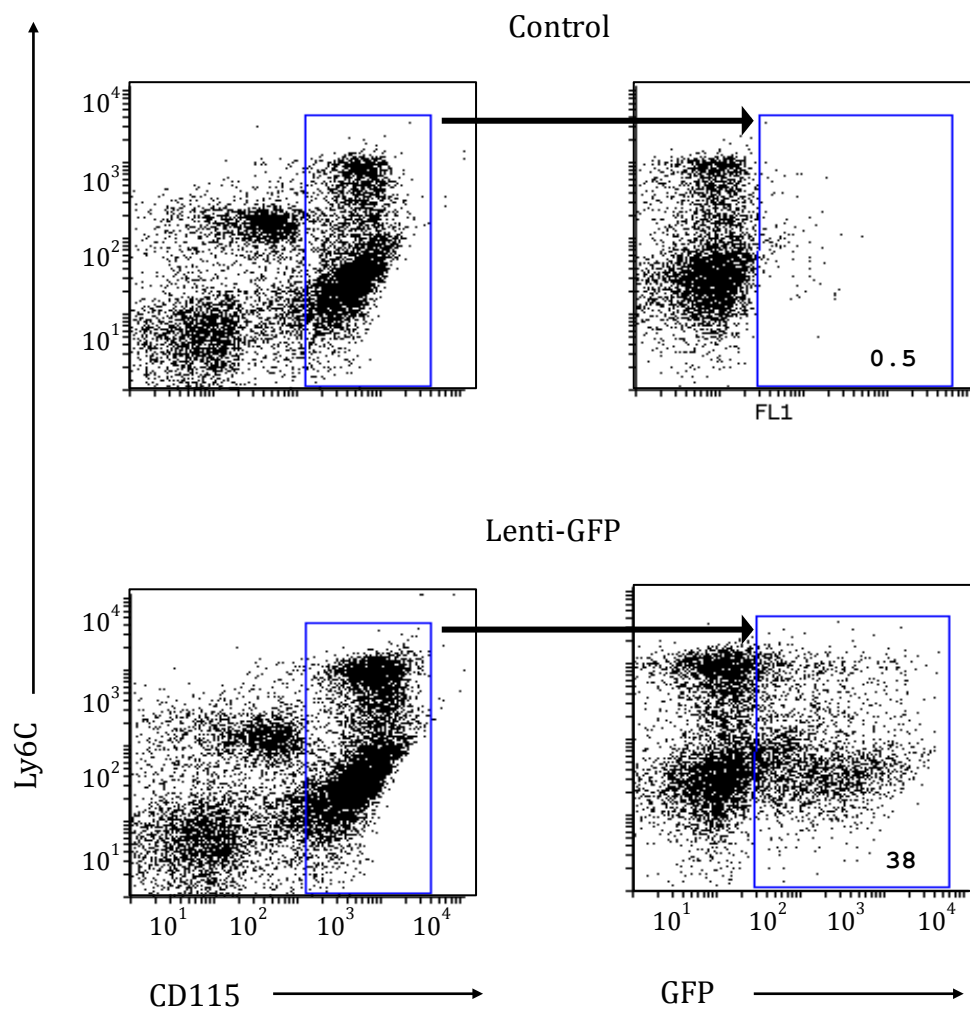


Figura 4.12. Ratones $LXR\alpha^{-/-}$ trasplantados con HSCs transfectadas con Lenti-SP-GFP muestran, 8 semanas después, en torno al 40 % de monocitos en sangre GFP positivos.

Siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos (sección 3.8.3), los monocitos obtenidos a partir de la sangre de ratones $LXR\alpha^{-/-}$ fueron detectados mediante citometría de flujo. El número mostrado dentro de la zona enmarcada en azul (derecha) indica el porcentaje de células GFP+ de la población CD115+ (izquierda).

Se muestra un experimento representativo de otros tres, cada uno de ellos con n=4-5 ratones por grupo.

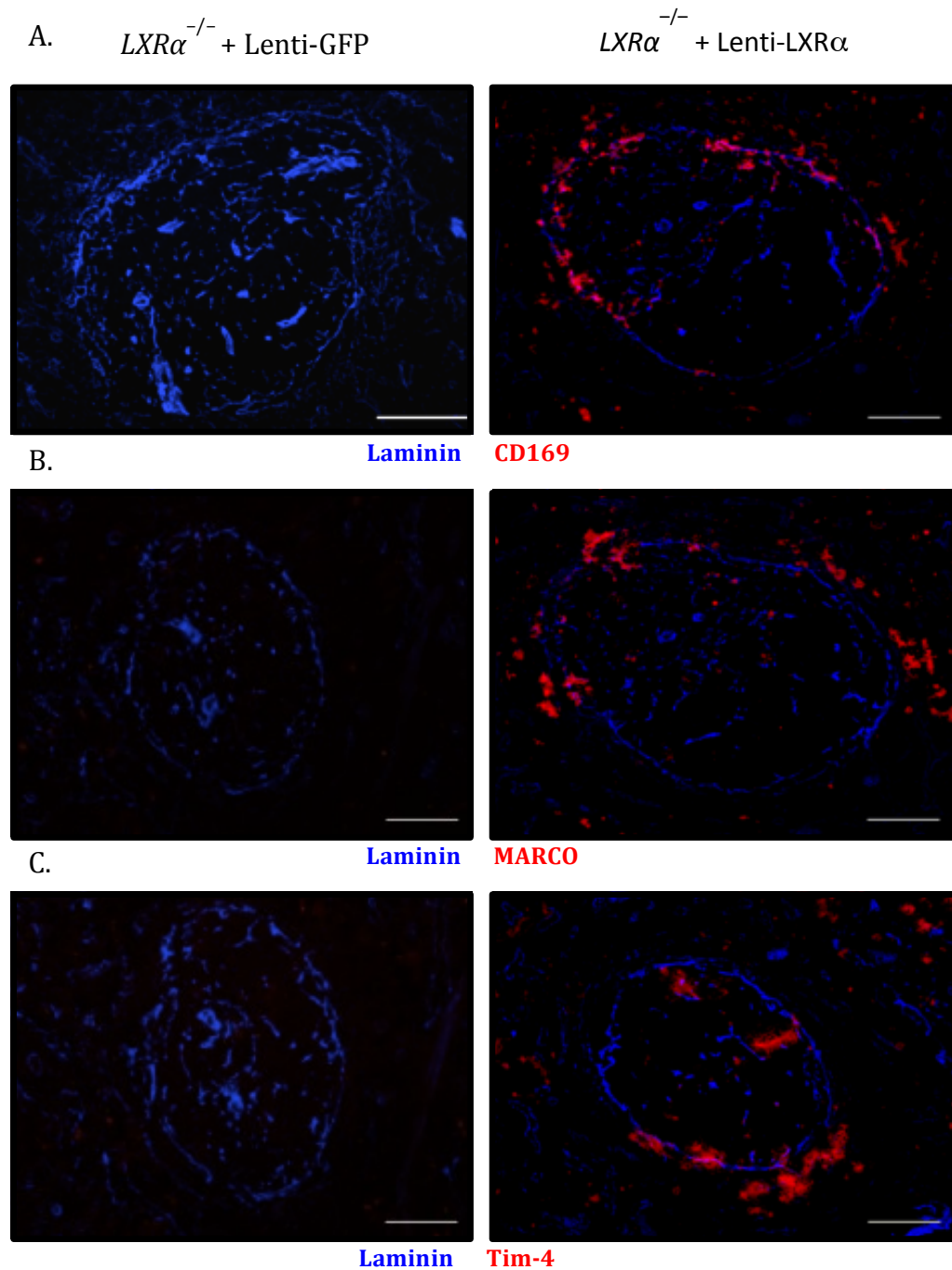
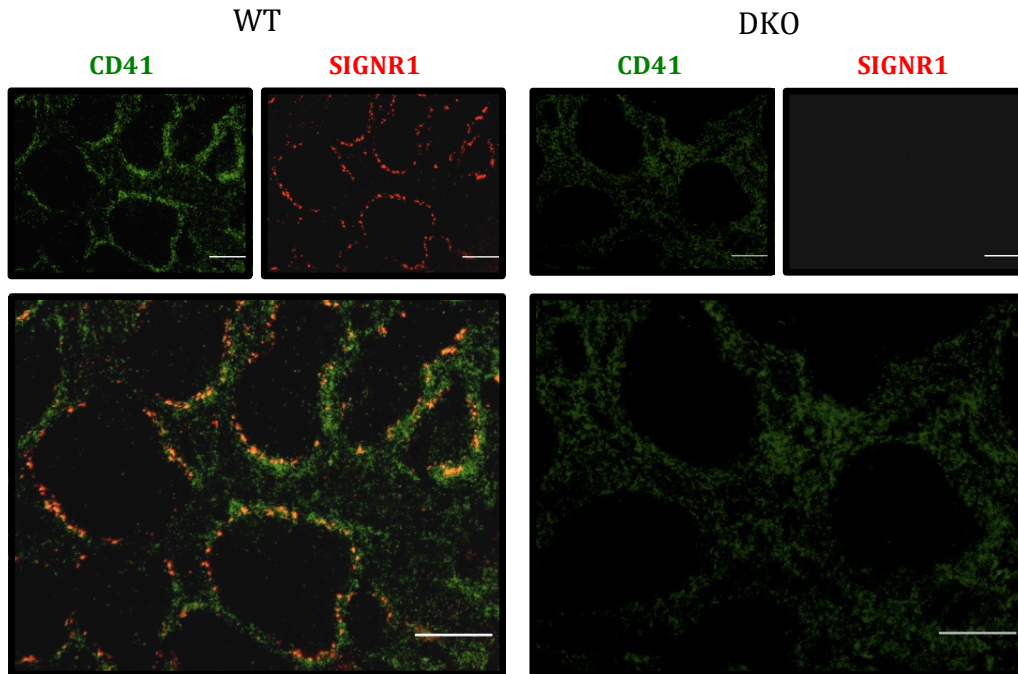


Figura 4.13. Recuperación parcial de las poblaciones de MMM ($CD169^+$) y MZM ($MARCO^+/Tim-4^+$) en ratones trasplantados con HSCs tratadas con lenti-SP-LXR α .

Los bazo de ratones $LXR\alpha^{-/-}$ tratados con lentivirus se recolectaron tras 12 semanas y se realizó una inmunodetección fluorescente según se describe en Material y Métodos (sección 5). En azul se muestra Laminin. En rojo se muestra en el Panel A. CD169, en el Panel B. MARCO y en el Panel C. Tim-4. La barra representa 100 μ m. Imágenes representativas de 2 experimentos independientes con resultados similares, con n=4-5 ratones por grupo.

A.



B.

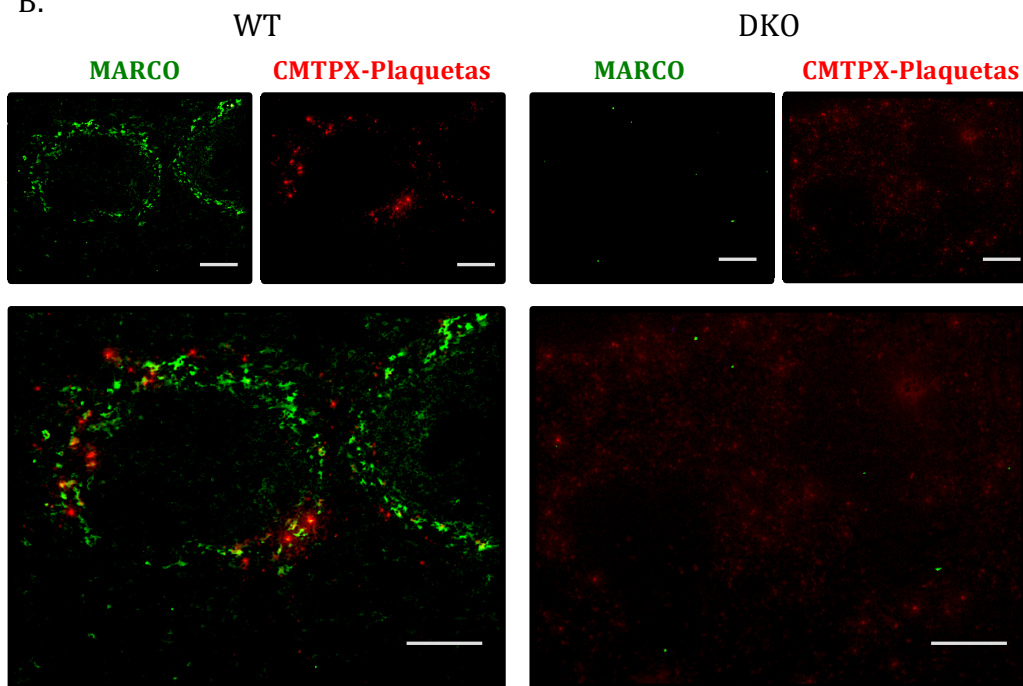


Figura 4.14. Captura de plaquetas opsonizadas en la Zona Marginal.

Inmunofluorescencia de secciones seriadas de bazo de ratones WT y LXR-DKO a los que se les inyectó plaquetas opsonizadas frente a CD41, según se explica en Material y Métodos sección 3.5.1.

Panel **A**. El reconocimiento de las plaquetas opsonizadas por CD41 se reveló usando un anticuerpo secundario anti-rata AF488. La unión inespecífica del secundario se valoró en ratones a los que se les inyectó plaquetas sin opsonizar. Como marcador de la zona marginal se usó SIGNR1 (en rojo). La barra representa 300 μm .

Panel **B**. Las plaquetas se marcaron con celltracker-CMTPX previo a su opsonización, lo que les confiere un color rojo. Como marcador de la zona marginal se usó Marco (en verde). La barra representa 120 μm .

Las fotos son representativas de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo.

marginal en la fagocitosis de plaquetas en un modelo murino de Púrpura Trombocitopénica Idiopática (cuyas siglas en inglés son ITP), una enfermedad con una prevalencia de 9,5 casos por cada 100.000 personas en los EEUU (Michel, 2009), que se caracteriza por un bajo conteo de plaquetas y médula ósea normal, en la que hay una destrucción elevada de plaquetas por autoanticuerpos frente a antígenos de membrana plaquetarios (George et al., 1994).

Procedimos a aislar plaquetas de sangre de ratones donantes y las opsonizamos con un anticuerpo frente a la integrina $gp\alpha_{Ib}$ (CD41), situada en la superficie de plaquetas (Mizutani et al., 1993), tal y como se describe en la sección 3.5.1 de Material y Métodos. Las plaquetas opsonizadas se inyectaron en ratones WT y DKO, y como procedimiento control se inyectaron plaquetas sin opsonizar. Tras 90 minutos, se aislaron los bazos y se reveló la presencia de CD41 mediante un anticuerpo secundario específico y la población de macrófagos de la zona marginal con un anticuerpo frente a SIGNR1. Se observa que las plaquetas opsonizadas son capturadas de forma mayoritaria en la zona marginal en ratones WT, mientras que en ratones LXR-DKO, en los que no hay macrófagos de zona marginal, las plaquetas opsonizadas se observan dispersas por la pulpa roja (Ver Figura 4.14A).

Para corroborar los resultados obtenidos, procedimos a realizar un experimento adicional con un enfoque diferente. En vez de detectar el anticuerpo anti-CD41 que opsoniza a las plaquetas, la detección la conseguimos marcando a las plaquetas con CMTPX, un producto fluorescente no tóxico capaz de marcar células *in vivo*. De esta manera, tras la opsonización e inyección, pudimos detectar de manera directa los lugares en los que se acumulan las plaquetas opsonizadas. Pudimos comprobar que, al igual que en el caso anterior, las plaquetas colocalizan con macrófagos de la zona marginal (MARCO⁺) en ratones WT, mientras que en ratones LXR-DKO las plaquetas se encuentran dispersas por la pulpa roja (Ver Figura 4.14B).

Por tanto, hemos podido comprobar que los macrófagos de la zona marginal no sólo son importantes en la captura de bacterias y cuerpos extraños, sino que contribuyen a la captura de células propias opsonizadas, fenómeno posible en enfermedades autoinmunes como la ITP.

4.9 Estudio transcripcional en Macrófagos en respuesta a M-CSF o GM-CSF.

Los resultados hasta aquí presentados, así como otros experimentos realizados en nuestro laboratorio, parecen demostrar que los progenitores de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal proceden de la médula ósea. Además, hemos mostrado que la ausencia de expresión de LXR α en estos progenitores hematopoyéticos es la que impide la formación de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal, tal y como se observa en los ratones LXR $\alpha^{fl/fl}/Vav-iCre^{+/-}$ y en los ratones LXR $\alpha^{-/-}$ trasplantados con médula ósea reconstituida con Lentivirus-LXR α , y que la activación farmacológica acelera la cinética de repoblamiento en ratones con actividad LXR α .

Con el objeto de estudiar las rutas génicas gobernadas por LXR α que nos permita profundizar en el conocimiento de estos fenómenos, nos planteamos un estudio transcripcional empleando como modelo la diferenciación *in vitro* de progenitores de médula ósea en presencia o ausencia de LXR α . Para ello, estudiamos mediante *microarray* la expresión génica de monocitos derivados de médula ósea (BMDM) procedentes de ratones WT y LXR α ^{-/-} a los que se estimuló durante 24 horas con las citoquinas M-CSF, GM-CSF o vehículo, de manera similar a la aproximación descrita en Fleetwood et al., 2007. De esta manera, pretendemos sustanciar el papel regulatorio de LXR α sobre los genes modulados por estas citoquinas.

4.9.1 Expresión génica en respuesta a M-CSF.

Tras la estimulación de células BMDM con M-CSF recombinante murina durante 24 horas, un total de 222 genes se encuentran inducidos de manera común en ambos genotipos con respecto al control sin tratar, mientras que se inducen de manera diferencial 74 genes en WT y 78 genes en LXR α ^{-/-} (ver Figura 4.15A).

La expresión de cada uno de los genes se representa en la Figura 4.15B en forma de código de colores (*heatmap*), así como la expresión y el nombre de los 20 genes más inducidos de cada grupo en la Figura 4.15C. El análisis de la Ontología Génica (GO) indica que el proceso más representado por los genes cuya expresión es inducida por M-CSF es el de la división celular (*cell division*), tanto en los genes inducidos en WT como en los genes inducidos en LXR α ^{-/-} y en los genes inducidos en ambos, tal y como se observa en la Tabla 4.1. Otras categorías diferencialmente representadas corresponden a genes involucrados en el mantenimiento de la replicación del ADN (*maintenance of fidelity involved in DNA-dependent DNA replication*) y genes con actividad helicasa (*helicase activity*).

De manera exclusiva en LXR α ^{-/-} se encuentran inducidos genes involucrados en la actividad quimioquina (*chemokine activity*) y respuesta inflamatoria (*inflammatory response*) (Tabla 4.1), lo que sugiere que las células BMDM carentes del receptor nuclear LXR α presentan una mayor respuesta proinflamatoria a M-CSF.

Por otro lado, la estimulación con M-CSF conduce a la represión de la expresión de 5 genes de manera común en WT y LXR α ^{-/-}, 8 genes en WT y 25 en LXR α ^{-/-} (ver Figura 4.16). Debido al bajo número de genes reprimidos, el análisis GO en este caso no nos aporta categorías significativamente reguladas.

Por tanto, el tratamiento de células BMDM con la citoquina M-CSF tiene como efecto principal la inducción de genes involucrados mayoritariamente en la división celular.

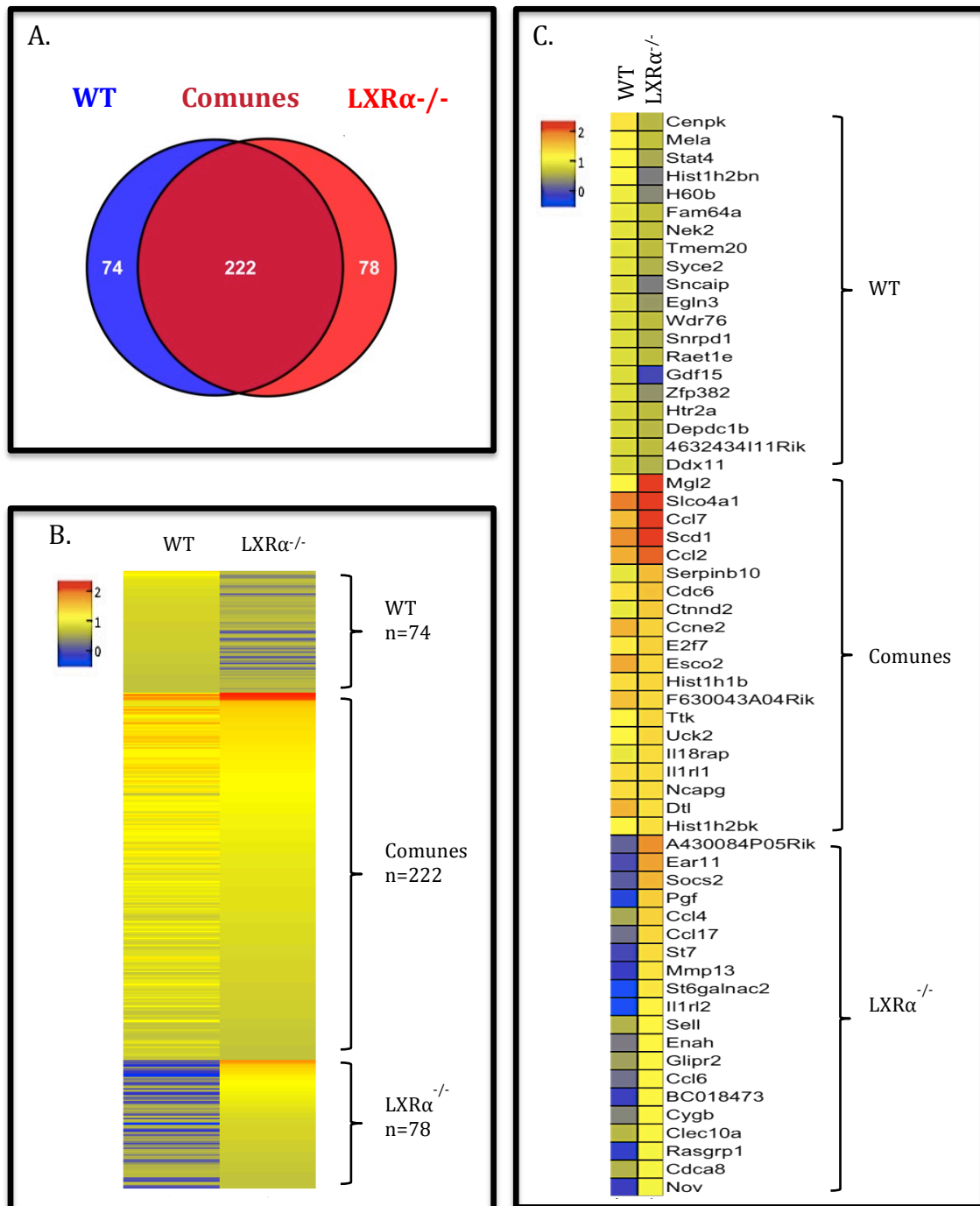


Figura 4.15. Diagrama de Venn y Mapa de Calor de los genes upregulados por M-CSF en células BMDM WT y LXRα^{-/-}.

Tras 7 días de diferenciación, las células BMDM se trataron con M-CSF durante 24h y se analizó la expresión génica con respecto al control sin tratar, tal y como se detalla en Material y Métodos sección 3.3.1.a.

Panel A. Diagrama de Venn que permite visualizar tres grupos de genes: genes inducidos exclusivamente en WT (n=74), genes inducidos de manera común en ambos grupos (n=222) y genes inducidos exclusivamente en LXRα^{-/-} (n=78).

Panel B. Mapa de calor de los genes inducidos por M-CSF en células BMDM WT (columna izquierda) y LXRα^{-/-} (columna derecha). Se representa la expresión de los genes agrupados según el Diagrama de Venn del Panel A.

Panel C. Mapa de calor de los 20 genes con mayor diferencia de expresión con respecto al control agrupados según el Diagrama de Venn del Panel A.

Valores de expresión en escala logarítmica.

TABLA 4.1. El análisis ontogénico revela que el tratamiento con M-CSF induce la expresión principalmente de genes de la división celular.

Selección de categorías GO significativamente enriquecidas en cada uno de los tres grupos establecidos por el Diagrama de Venn (Figura 4.12). Descripción detalla del FDR q-value y Enrichment en el apartado de Material y Métodos sección 3.7.2. En la columna "Abundancia" se representa en un gráfico el número de genes de cada grupo ("WT" en negro, "Comunes" en gris y "LXR α -/-" en blanco) presentes en cada categoría GO.

GO	Descripción	WT		Comunes		LXR α -/-		Abundancia
GO:0051301	cell division	Syce2,Nek2,Ska1, Nup43,Cenpw,Cdca3, Ube2c,Cks1b.		Cenph,Cdca7,Mastl,Zwilch,Kntc1,Dsn1,Wee1,Cdca2,Lig1,Nuf2,Fbxo5,Cit, Tipin,Spc25,Sgol1,Aurkb,Aurka, Cdca5,Racgap1,Casc5,Kif18b,Mad211, Top2a,F630043A04Rik,Ncaph,Spag5, Ncapd2,Cdc6,Kif11,Plk1,Ercc61, Mcm5,Tpx2,Ccna2,Cep55,Anln,Ect2, Ccne1,Ccnd2,Ccnd1,Ccnb1,Smc2, Ccnf,Cks2,Ccne2,Ndc80,Cdc7, 6720463M24Rik,Kif2c, Cdk1,Cdc25c,Kif20b,Cdc45,Prc1, Bub1b,Bub1,Hells,Nsl1,Nusap1, Birc5, Oip5.		Fam83d,Cenpe,Ccnb2,Cdca8, Sgol2,Cdc25a,Cenpt,		
		FDR q-value 4.95E-2	Enrichment (N,B,n,b) 6.83 (21400,353,71,8)	FDR q-value 2.85E-54	Enrichment (N,B,n,b) 16.96 (21400,353,218,61)	FDR q-value 9.63E-2	Enrichment (N,B,n,b) 5.66 (21400,353,75,7)	
GO:0045005	maintenance of fidelity involved in DNA-dependent DNA replication	Zranb,3, Pold1.		Brca2,Tonsl, Tipin,Mms22l.		-		
		FDR q-value 5.52E-1	Enrichment (N,B,n,b) 46.37 (21400,13,71,2)	FDR q-value 6.54E-4	Enrichment (N,B,n,b) 30.20 (21400,13,218,4)	-	-	
GO:0004386	helicase activity	-		Mcm8,Hells,Mcm2,Mcm4, Polq,Rad54l,Mcm3,Mcm7, Ercc6l,Brip1,Mcm5,Mcm6.		-		
		-	-	FDR q-value 2.44E-6	Enrichment (N,B,n,b) 8.54 (21400,138,218,12)	-	-	
GO:0008009	chemokine activity	-		-		Ccl12,Ccl6,Cxcl3, Ccl17,Ccl3,Ccl4.		
		-	-	-	-	FDR q-value 8.79E-6	Enrichment (N,B,n,b) 48.91 (21400,35,75,6)	
GO:0006954	inflammatory response	-		-		Il1a,Ccl12,Cxcl3,Ccl3, Rasgrp1,Ccl4.		
		-	-	-	-	FDR q-value 1.06E-1	Enrichment (N,B,n,b) 6.69 (21400,256,75,6)	

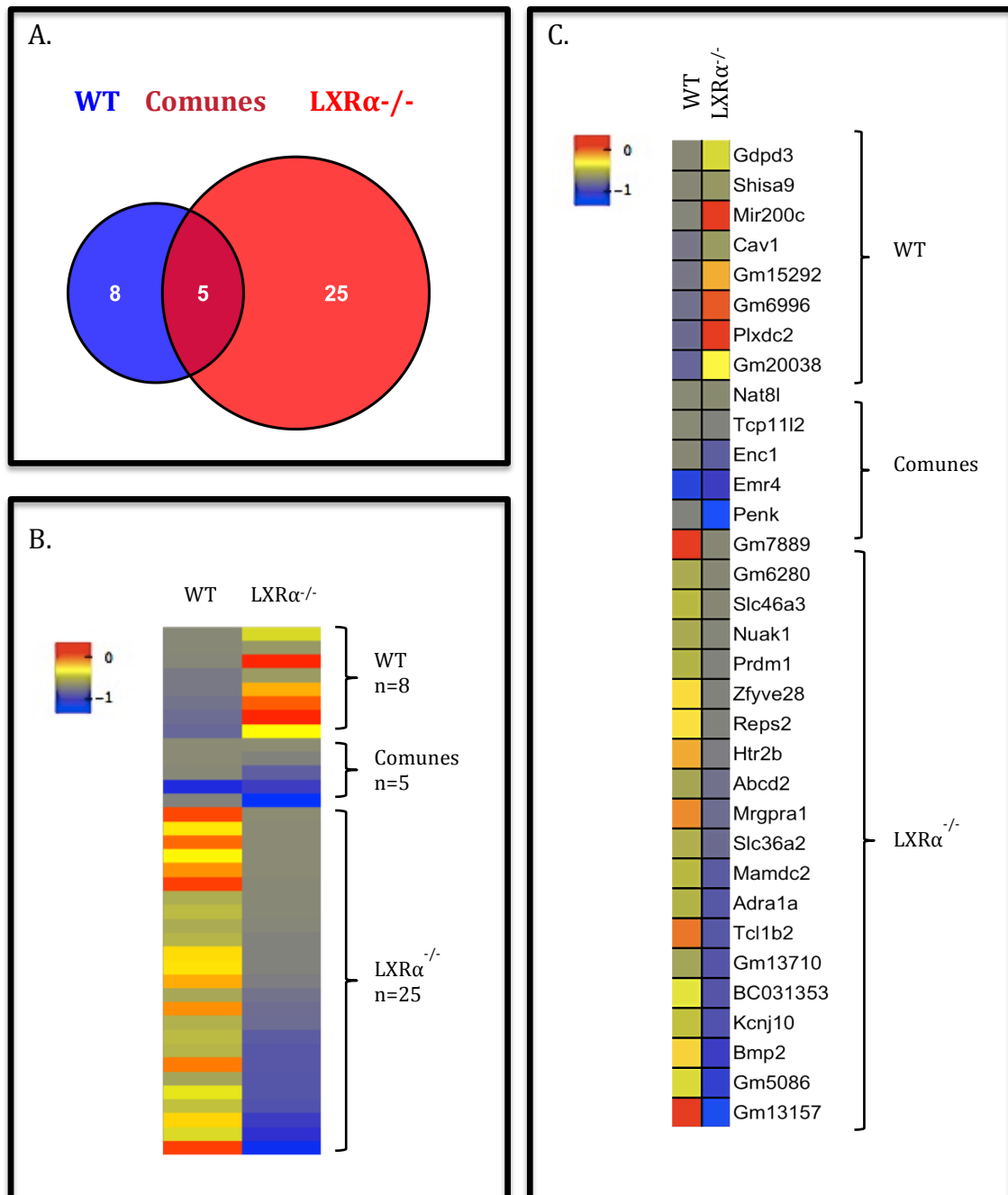


Figura 4.16. Diagrama de Venn y Mapa de Calor de los genes reprimidos por M-CSF en células BMDM WT y LXR α ^{-/-}.

Tras 7 días de diferenciación, las células BMDM se trataron con M-CSF durante 24h y se analizó la expresión génica con respecto al control sin tratar, tal y como se detalla en Material y Métodos sección 3.3.1.a.

Panel A. Diagrama de Venn que permite visualizar tres grupos de genes: genes reprimidos exclusivamente en WT (n=8), genes reprimidos de manera común en ambos grupos (n=5) y genes reprimidos exclusivamente en LXR α ^{-/-} (n=25).

Panel B. Mapa de calor de los genes reprimidos por M-CSF en células BMDM WT (columna izquierda) y LXR α ^{-/-} (columna derecha). Se representa la expresión de los genes agrupados según el diagrama de Venn del Panel A.

Panel C. Mapa de calor de los 20 genes con mayor diferencia de expresión con respecto al control agrupados según el diagrama de Venn del Panel A.

Valores de expresión en escala logarítmica.

4.9.2 Expresión génica en respuesta a GM-CSF.

El tratamiento con GM-CSF recombinante murina durante 24 horas disminuye la expresión de 75 genes de manera común en células WT y $LXR\alpha^{-/-}$, mientras de manera diferencial disminuye 99 genes en células WT y 89 genes en células $LXR\alpha^{-/-}$ (ver Figura 4.18A). Una visión global de la expresión de cada uno de los genes se representa en la Figura 4.18B, así como la expresión de los 20 genes más reprimidos de cada grupo en la Figura 4.18C.

Por otro lado, el tratamiento con GM-CSF durante 24 horas incrementa la expresión de 210 genes de manera común en WT y $LXR\alpha^{-/-}$, mientras que de manera diferencial aumenta 72 genes en WT y más del doble en $LXR\alpha^{-/-}$, 158 genes (ver Figura 4.17A).

Al igual que en el caso anterior, la expresión de cada uno de los genes se representa en forma de código de colores en la Figura 4.17B, así como la expresión de los 20 genes más inducidos de cada grupo en la Figura 4.17C. Nótese que en este caso los niveles de expresión son mucho mayores con GM-CSF que en respuesta a M-CSF, pues con GM-CSF hay genes que presentan un valor de expresión superior a 5 en escala logarítmica, mientras con M-CSF el valor máximo está cercano a 2. El análisis de la Ontología Génica (GO) indica que el proceso más representado en los genes inducidos por GM-CSF es el de quimiotaxis (*chemotaxis*), respuesta inflamatoria (*inflammatory response*), regulación positiva de la respuesta inflamatoria (*positive regulation of inflammatory response*), y actividad quimioquina (*chemokine activity*) (Tabla 4.2).

Estos procesos pro-inflamatorios se corresponden a funciones ya descritas de GM-CSF (Broughton et al., 2012) y se encuentran inducidos de manera común en ambos genotipos, pero exacerbados en $LXR\alpha^{-/-}$, ya que además de los genes comunes, las células $LXR\alpha^{-/-}$ inducen un mayor número de genes que participan en estos procesos. Por otro lado, la biosíntesis de prostaglandinas (*prostaglandin biosynthetic process*, GO:0001516) se encuentra únicamente activada en $LXR\alpha^{-/-}$. Las prostaglandinas son moléculas que intervienen como intermediarios en diversos procesos, entre los que destaca la respuesta inflamatoria, por lo que en su conjunto estos datos concuerdan con la idea de que los ratones carentes de LXR tienen una exacerbación de la respuesta inflamatoria (Alonso-Gonzalez and Castrillo, 2011). Finalmente, la unión de carbohidratos (*carbohydrate binding*, GO:0030246) se encuentra activada en ambos genotipos de manera común, pero el proceso de unión de manosa (*mannose binding*, GO:0005537) solamente se encuentra activado en WT (Tabla 4.2). Uno de los genes presentes en este grupo es CD209a, que además se encuentra en el top20 de genes más inducidos en WT (Ver Figura 4.17C).

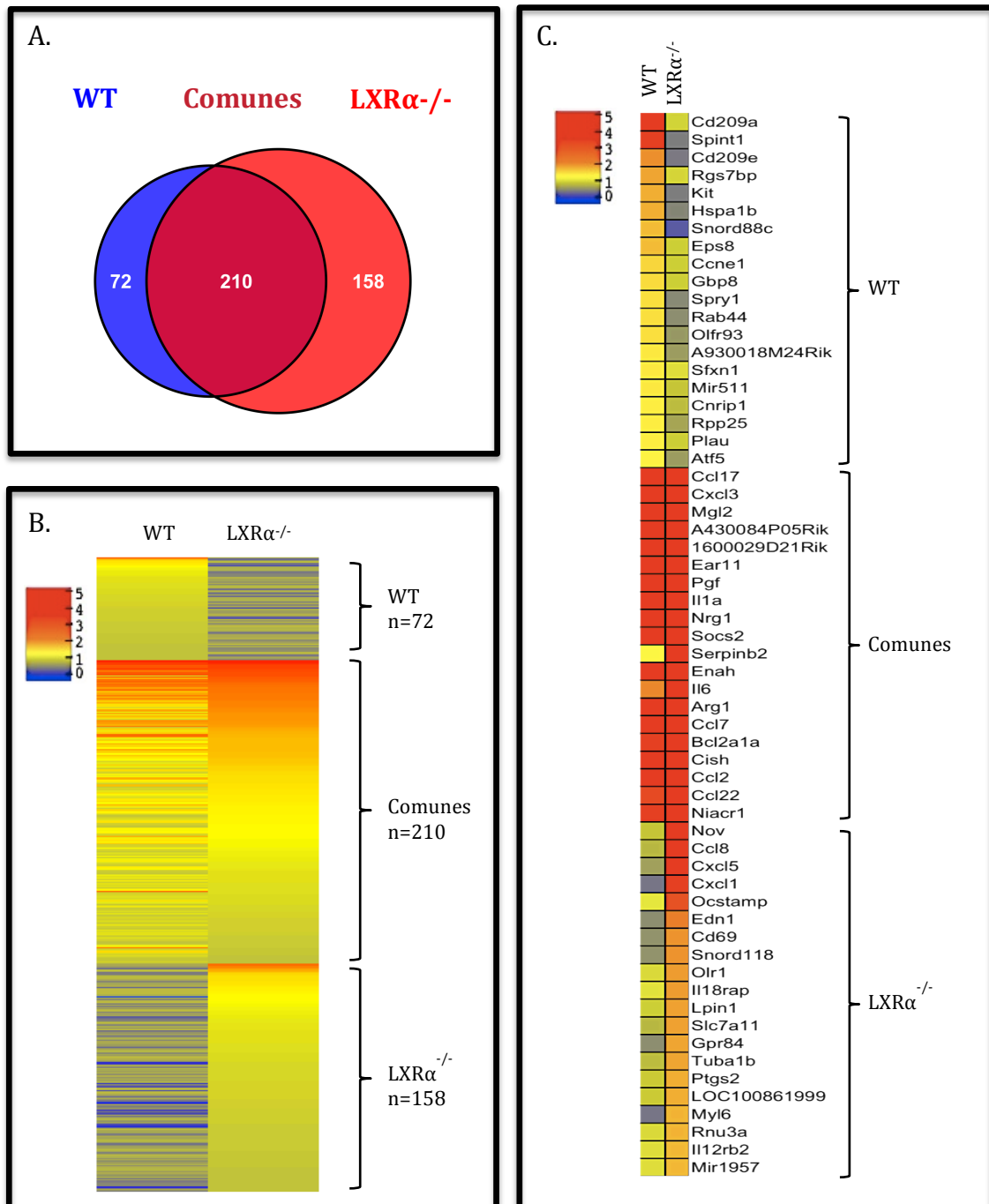


Figura 4.17. Diagrama de Venn y Mapa de Calor de los genes inducidos por GM-CSF en células BMDM WT y LXR α ^{-/-}.

Tras 7 días de diferenciación, las células BMDM se trataron con GM-CSF durante 24h y se analizó la expresión génica con respecto al control sin tratar, tal y como se detalla en Material y Métodos sección 3.3.1.a.

Panel A. Diagrama de Venn que permite visualizar tres grupos de genes: genes inducidos exclusivamente en WT (n=72), genes inducidos de manera común en ambos grupos (n=210) y genes inducidos exclusivamente en LXR α ^{-/-} (n=158).

Panel B. Mapa de calor de los genes inducidos por GM-CSF en células BMDM WT (columna izquierda) y LXR α ^{-/-} (columna derecha). Se representa la expresión de los genes agrupados según el diagrama de Venn del Panel A.

Panel C. Mapa de calor de los 20 genes con mayor diferencia de expresión con respecto al control agrupados según el diagrama de Venn del Panel A.

Valores de expresión en escala logarítmica.

TABLA 4.2. El análisis ontogénico revela que el tratamiento con GM-CSF induce la expresión principalmente de genes de la respuesta inflamatoria y la quimiotaxis.

Selección de categorías GO significativamente enriquecidas en cada uno de los tres grupos establecidos por el Diagrama de Venn (Figura 4.14A). Descripción detalla del FDR q-value y Enrichment en el apartado de Material y Métodos sección 3.7.2. En la columna "Abundancia" se representa en un gráfico el número de genes de cada grupo ("WT" en negro, "Comunes" en gris y "LXRα^{-/-}" en blanco) presentes en cada categoría GO.

GO	Descripción	WT		Comunes		LXRα ^{-/-}		Abundancia
GO:0006935	chemotaxis	-		Enah,Ccl12, Cxcl3,Ear11,Pf4, Ccl7, Il1b, Ccl6,Cxcl2,Prkca,Ccl22, Enpp2,Itga1,Ccl17,Ccl2, Ccl3,Ccl4,Ccr1,Egr2.		Cxcl10,Ccl8,Cxcl1,Runx3, Fcgr3,Flt1,Cxcl5,Cxcl11, Nr4a3,Cmklr1		
		-	-	FDR q-value 2.43E-8	Enrichment (N,B,n,b) 6.67 (21400,316,203,20)	FDR q-value 7.81E-3	Enrichment (N,B,n,b) 4.91 (21400,316,138,10)	
GO:0006954	inflammatory response	-		Fn1,Ccl12,Il6,Cxcl3,Gja1, Klk1b1,Ccl7,Il1a,Il1b,Cxcl2,Ccl22,Ccl 2,Ccl3,Ccl4,Rasgrp1,Csf1,Ccr1		Cxcl1,Fcgr3,Tnf,Olr1,Ptgs2, Cxcl10,Ccl8,Nupr1,Tnfsf4, Cxcl11,Cxcl5,Il1rn,Il2ra,Il23r.		
		-	-	FDR q-value 1.92E-7	Enrichment (N,B,n,b) 7.00 (21400,256,203,17)	FDR q-value 4.6E-6	Enrichment (N,B,n,b) 8.48 (21400,256,138,14)	
GO:0050729	positive regulation of inflammatory response	-		Il1b, Il1rl1,Il6, Pla2g4a, Prkca, Adora2b, Ccl3.		Fcgr3,Tnfsf4,Cd24a, Tnf,Ptgs2,		
		-	-	FDR q-value 2.6E-4	Enrichment (N,B,n,b) 11.90 (21400,62,203,7)	FDR q-value 9.15E-3	Enrichment (N,B,n,b) 12.51 (21400,62,138,5)	
GO:0001516	prostaglandin biosynthetic process chemokine activity	-		-		Edn1,Ptgs1, Ptgs2.		
		-	-	-	-	FDR q-value 1.67E-2	Enrichment (N,B,n,b) 29.08 (21400,16,138,3)	
GO:0008009	chemokine activity	-		Ccl7,Ccl12,Ccl6,Cxcl2,Cxcl3, Ccl22,Ccl17,Ccl2,Ccl3, Ccl4,Pf4.		Cxcl10,Cxcl1,Ccl8, Cxcl5,Cxcl11.		
		-	-	FDR q-value 5.66E-11	Enrichment (N,B,n,b) 33.13 (21400,35,203,11)	FDR q-value 1.12E-2	Enrichment (N,B,n,b) 22.15 (21400,35,138,5)	
GO:0030246	carbohydrate binding	-		Cd209d,Mgl2,Clec4n,Siglec5, Cd209c,Vcan,Clec10a,Enpp2, Egl3.		-		
		-	-	FDR q-value 5.66E-2	Enrichment (N,B,n,b) 4.31 (21400,220,203,7)	-	-	
GO:0005537	mannose binding	Cd209a, Cd209e, Mrc1		-		-		
		FDR q-value 1.11E-1	Enrichment (N,B,n,b) 49.67 (21400,19,68,3)	-	-	-	-	

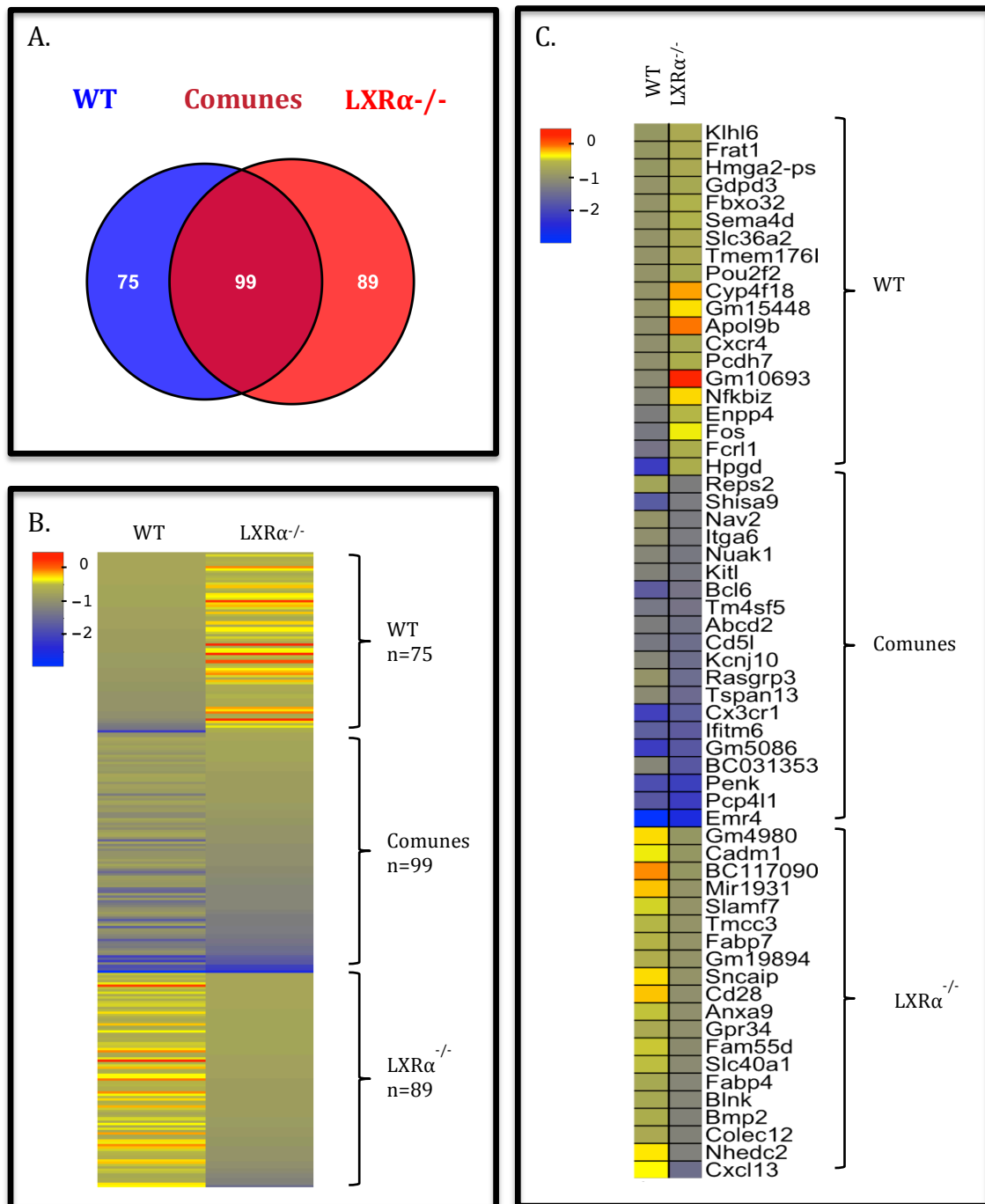


Figura 4.18. Diagrama de Venn y Mapa de Calor de los genes reprimidos por GM-CSF en células BMDM WT y LXRα^{-/-}.

Tras 7 días de diferenciación, las células BMDM se trataron con GM-CSF durante 24h y se analizó la expresión génica con respecto al control sin tratar, tal y como se detalla en Material y Métodos sección 3.3.1.a. Valores de expresión en escala logarítmica.

Panel A. Diagrama de Venn que permite visualizar tres grupos de genes: genes reprimidos exclusivamente en WT (n=75), genes reprimidos de manera común en ambos grupos (n=99) y genes reprimidos exclusivamente en LXRα^{-/-} (n=89).

Panel B. Mapa de calor de los genes reprimidos por GM-CSF en células BMDM WT (columna izquierda) y LXRα^{-/-} (columna derecha). Se representa la expresión de los genes agrupados según el Diagrama de Venn del Panel A.

Panel C. Mapa de calor de los 20 genes con mayor diferencia de expresión con respecto al control agrupados según el Diagrama de Venn del Panel A.

Regulación de la expresión de CD209a

4.10 La expresión de CD209a es inducida principalmente por GM-CSF en ratones y por IL-4 en humanos.

CD209a codifica para una proteína de membrana tipo lectina, cuya principal función es la unión de carbohidratos (Powlesland et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado que CD209a puede ser un marcador útil para la identificación de células MoDCs (Cheong et al., 2010) y su implicación en diversos procesos inmunitarios; es por ello que nos propusimos estudiar la regulación de este gen en mayor detalle.

CD209a se ha propuesto como homólogo del gen humano DC-SIGN (ver Introducción). Dado que la citoquina IL-4 es un regulador de la expresión de DC-SIGN en humanos (Relloso et al., 2002) y que según los resultados del *microarray* CD209a se induce en respuesta a GM-CSF en células murinas, decidimos estudiar la expresión de DC-SIGN/CD209a en respuesta a ambas citoquinas.

Observamos que, en consonancia con el *microarray*, en células BMDM murinas la citoquina GM-CSF induce la expresión de CD209a (Ver Figura 4.19A). Sin embargo, la IL-4 sólo proporciona un efecto sinérgico en la expresión de CD209a cuando se estimula de manera simultánea con GM-CSF (Ver Figura 4.19A). En el caso de las células MDM (*monocyte-derived macrophages*) humanas, se confirma que el principal regulador de la expresión de DC-SIGN es la citoquina IL-4, y que, a diferencia de las células murinas, el tratamiento con GM-CSF no es capaz de inducir la expresión de DC-SIGN por sí mismo (Ver Figura 4.16A).

Estos resultados indican que la regulación de CD209a y DC-SIGN parece no estar conservada entre ratones y humanos, ya que las principales citoquinas implicadas en su regulación no tienen los mismos efectos en su expresión. Por tanto, es probable que sean distintos los factores de transcripción que regulen su expresión en ambas especies.

4.11 La expresión de CD209a es dependiente de LXR α en células BMDM.

En nuestro *microarray*, CD209a constituye el gen que más diferencia presenta en células BMDM de ratones WT con respecto a LXR α ^{-/-} en respuesta a GM-CSF (ver Figura 4.17C). Para confirmar el resultado, se realizó una RT-PCR en células BMDM obtenidas de ratones WT, LXR α ^{-/-}, LXR β ^{-/-} y LXR-DKO, a las que se estimuló con las citoquinas M-CSF, GM-CSF o vehículo durante 16 horas, tal y como se detalla en la sección 3.7 de Material y Métodos.

De manera similar a los resultados obtenidos mediante *microarray*, la expresión de CD209a es dependiente de LXR α , ya que las células BMDM procedentes de los genotipos que carecen del gen de LXR α (LXR α ^{-/-} y LXR-DKO) no son capaces de inducir la expresión de CD209a (Ver Figura 4.19B). Además, se observa que la expresión

de CD209a en células murinas depende exclusivamente de su inducción por GM-CSF y no por M-CSF.

Para comprobar que las células carentes de LXR α responden correctamente a GM-CSF, y que el defecto está restringido sólo a un subgrupo de genes como CD209a, se analizó la expresión de genes que, basándonos en los resultados obtenidos en el *microarray*, se inducen en respuesta a GM-CSF tanto en células WT como LXR α . De esta manera, confirmamos que el patrón de expresión de genes como IRF4 y Clec10a1 en células BMDM en respuesta a GM-CSF es similar en ambos genotipos (Ver Figura 4.19C). Estos datos sugieren que la vía de señalización de GM-CSF no se encuentra afectada de manera general en células WT y LXR α , pero que la expresión de CD209a requiere de la presencia de LXR α .

4.12 La vida media de LXR α es menor que la de LXR β .

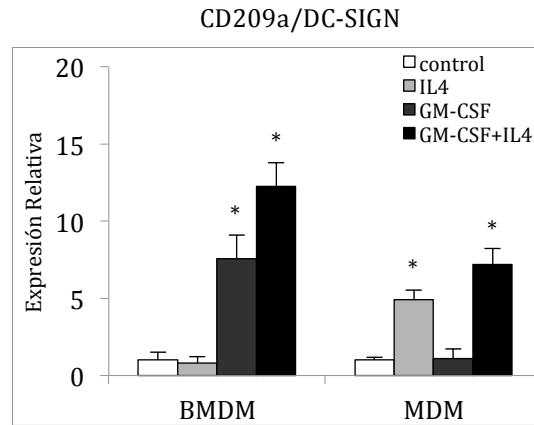
Recientemente, se ha descrito que LXR α tiene una tasa de renovación molecular mucho más alta que LXR β en células humanas (Ignatova et al., 2013). Para estudiar este efecto en células murinas, hemos empleado un inhibidor de síntesis proteica denominado cicloheximida (CHX) (Schneider-Poetsch et al., 2010) tanto en células RAW264.7 transfectadas con LXR α -3FLAG como en células BMDM WT (Figura 4.20 A).

Hemos comprobado por *western blot* que tras un tratamiento de CHX de 6 horas, los niveles de LXR α disminuyen significativamente (Ver Figura 4.20A). De manera similar, los niveles de ABCA1 se reducen de manera muy llamativa tras el tratamiento con CHX. Esto concuerda con trabajos previos (Arakawa et al., 2009; Zhou et al., 2010) en los que se describe la alta tasa de renovación de ABCA1, sustentada en una alta tasa de degradación y síntesis proteica.

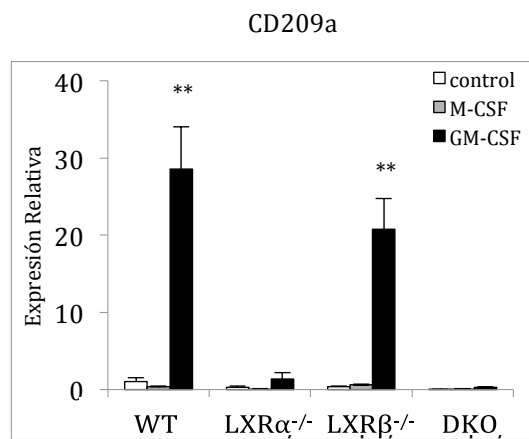
La expresión de LXR β , STAT5 o β -actina no se ven afectadas por el tratamiento con CHX (Ver Figura 4.20A). Esto se debe a que tienen una mayor vida media y una menor tasa de recambio que LXR α y ABCA1, y por tanto, la inhibición de la síntesis proteica durante un intervalo de 6h no modifica sus niveles de proteína.

Por otro lado, el tratamiento con CHX conduce a un bloqueo en la inducción de la expresión de CD209a en respuesta a GM-CSF (Figura 4.20 B). Esto es consistente con un papel de LXR α en la regulación de CD209a, ya que hemos comprobado mediante *western blot*, que el tratamiento con CHX consigue prácticamente suprimir los niveles de proteína de LXR α .

A.



B.



C.

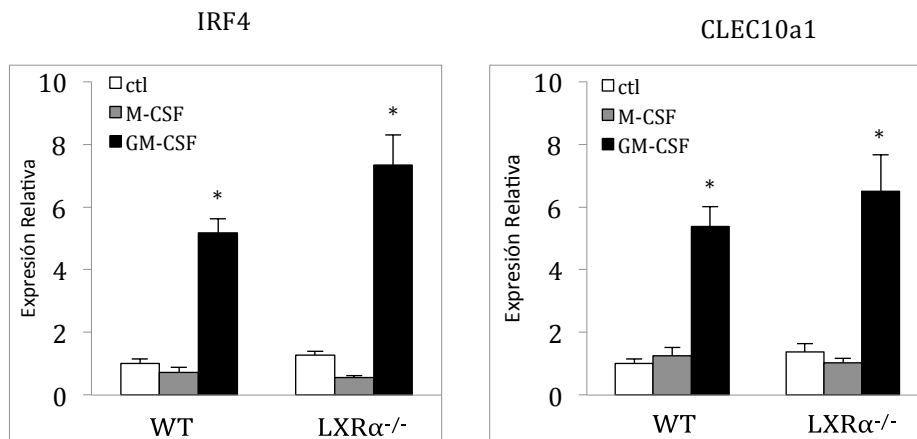


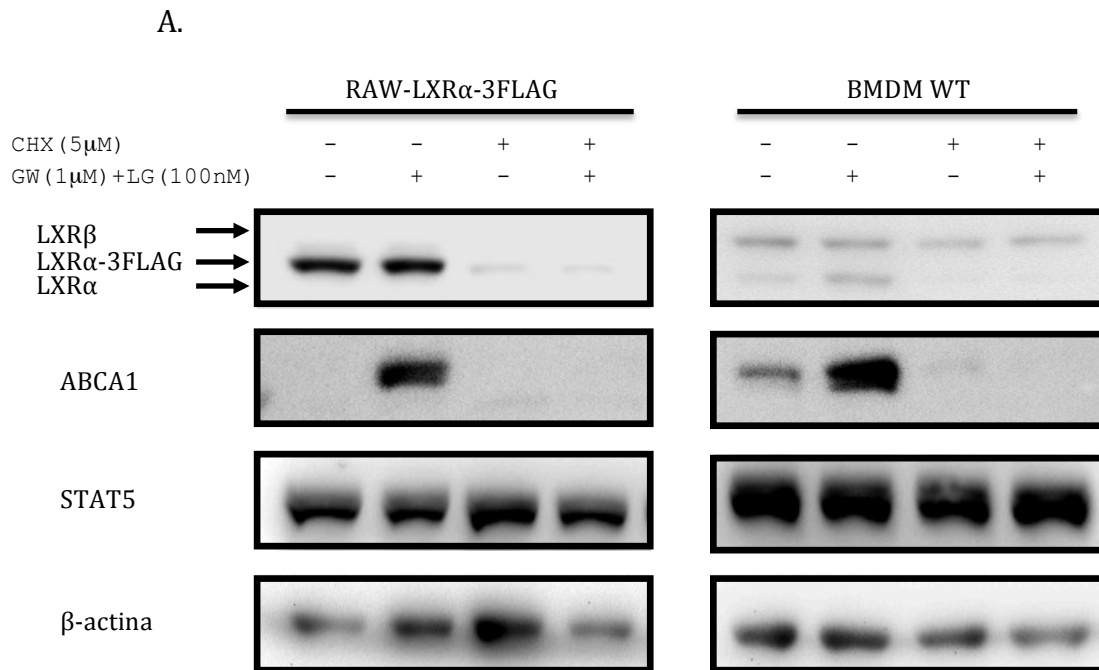
Figura 4.19. La expresión de CD209a en células BMDM depende de GM-CSF y LXR α .

Panel A. Se midió la expresión de CD209a en BMDM (ratón) tratadas con GM-CSF o IL4 murinas (10 ng/ml en cada caso) y DC-SIGN en MDM (humano) tratadas con IL-4 (1000 U/ml), o GM-CSF (100 ng/ml) humanas durante 16 horas. Como control se usaron células tratadas con M-CSF.

Panel B. Se midió la expresión de CD209a en BMDM procedentes de ratones de los 4 genotipos indicados, tratadas con M-CSF o GM-CSF (10 ng/ml) o vehículo durante 24 horas.

Panel C. Se midió la expresión de IRF4 y Clec10a1 en BMDM extraídas de ratones WT o de LXR α ^{-/-}, tratadas con M-CSF o GM-CSF (10 ng/ml) o vehículo durante 24 horas.

Se indica la media \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, $p < 0,01$ con respecto a su control.



B. CD209a

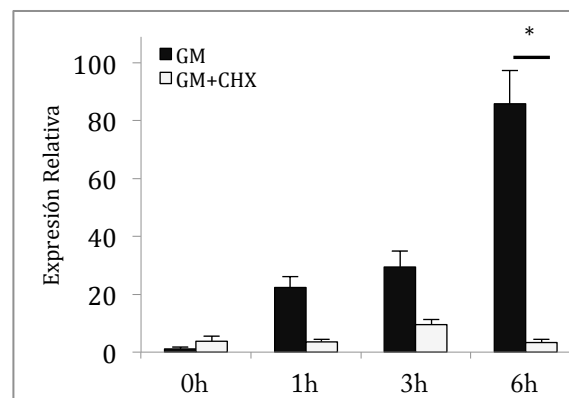


Figura 4.20. LXR α es sensible a CHX, lo que afecta a la expresión de CD209a.

Panel **A.** Inmunodetección de los niveles de LXR α , LXR β , ABCA1, STAT5 y β -actina en células RAW-LXR α -flag y BMDM WT en respuesta a ligandos y Cicloheximida (CHX). Se comprueba el efecto de un tratamiento de 6h. de CHX en proteínas de alto recambio como LXR α y ABCA1, mientras que proteínas de menor recambio molecular como LXR β , STAT5 y β -actina no se ven afectadas. Se muestran imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Panel **B.** Expresión de CD209a medida mediante RT-PCR en células BMDM WT tratadas con GM-CSF (10 ng/ml) y cicloheximida (CXH, 5 μ M) o vehículo durante los tiempos especificados. Se indica la media \pm SD de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$.

4.13 La expresión de CD209a requiere de la expresión de LXR α , pero es independiente de activación farmacológica.

Previamente, hemos demostrado que las células BMDM de ratones carentes de LXR α no son capaces de inducir la expresión de CD209a en respuesta a GM-CSF (Ver Figura 4.19B). A continuación, nos preguntamos si es posible inducir la expresión de CD209a mediante la activación farmacológica de LXR con el ligando GW3965, o por el contrario inhibirla con el antagonista GW233.

Observamos que el ligando GW3965 no incrementa la expresión de CD209a ni en solitario (Ver Figura 4.21A), ni en conjunción con GM-CSF (datos no mostrados). Por otro lado, como era de esperar, el tratamiento con GW3965 sí incrementa la expresión de ABCA1, una diana conocida de LXR (Ver Figura 4.21A).

Paralelamente, realizamos un tratamiento con el antagonista de LXR llamado GW233 (Zuercher et al., 2010). Está descrito que GW233 es capaz de antagonizar con el ligando GW3965 en la inducción farmacológica de ABCA1 y que, además, puede disminuir los niveles de ABCA1 por debajo de los niveles sin estimulación farmacológica, es decir, es capaz incluso de disminuir los niveles basales de ABCA1 (Zuercher et al., 2010), lo que hemos podido comprobar en nuestros experimentos (Ver Figura 4.21A). Además, se observa que la inhibición de LXR mediante GW233 disminuye la expresión basal de CD209a alrededor de un 70 % (Ver Figura 4.21A), y que cuando GW233 se usa en conjunción con GM-CSF, se produce una inhibición de la inducción de CD209a de alrededor de un 40 % (Ver Figura 4.21B).

Estos sorprendentes resultados obtenidos con GW3965, contrarios a nuestra hipótesis previa, nos indican que a pesar de que la expresión de CD209a es dependiente de LXR α , la estimulación farmacológica con este ligando sintético no conduce a cambios significativos en su expresión. Por otro lado, el hecho de que GW233 sea capaz de disminuir los niveles *basales* de ABCA1 podría explicarse por el mayor tamaño molecular del inhibidor, que implicaría una perturbación de la estructura conformacional de LXR que dificulte la asociación de proteínas coactivadoras (Zuercher et al., 2010). Quizá, esto pueda explicar por qué la activación farmacológica no consigue inducir la expresión de CD209a, pero el tratamiento con el antagonista GW233 es capaz de inhibir los niveles basales y la inducción de CD209a.

4.14 El Lipopolisacarido (LPS) inhibe la expresión de CD209a *in vitro*.

Se ha descrito que la inyección de LPS, un componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas, promueve el reclutamiento de células Mo-DCs CD209a⁺ a nódulos linfáticos de la piel (pero no al bazo) en ratones *in vivo* (Cheong et al., 2010). En consecuencia, nos propusimos estudiar la influencia del tratamiento de LPS en la regulación de CD209a mediada por GM-CSF en células BMDM *in vitro*.

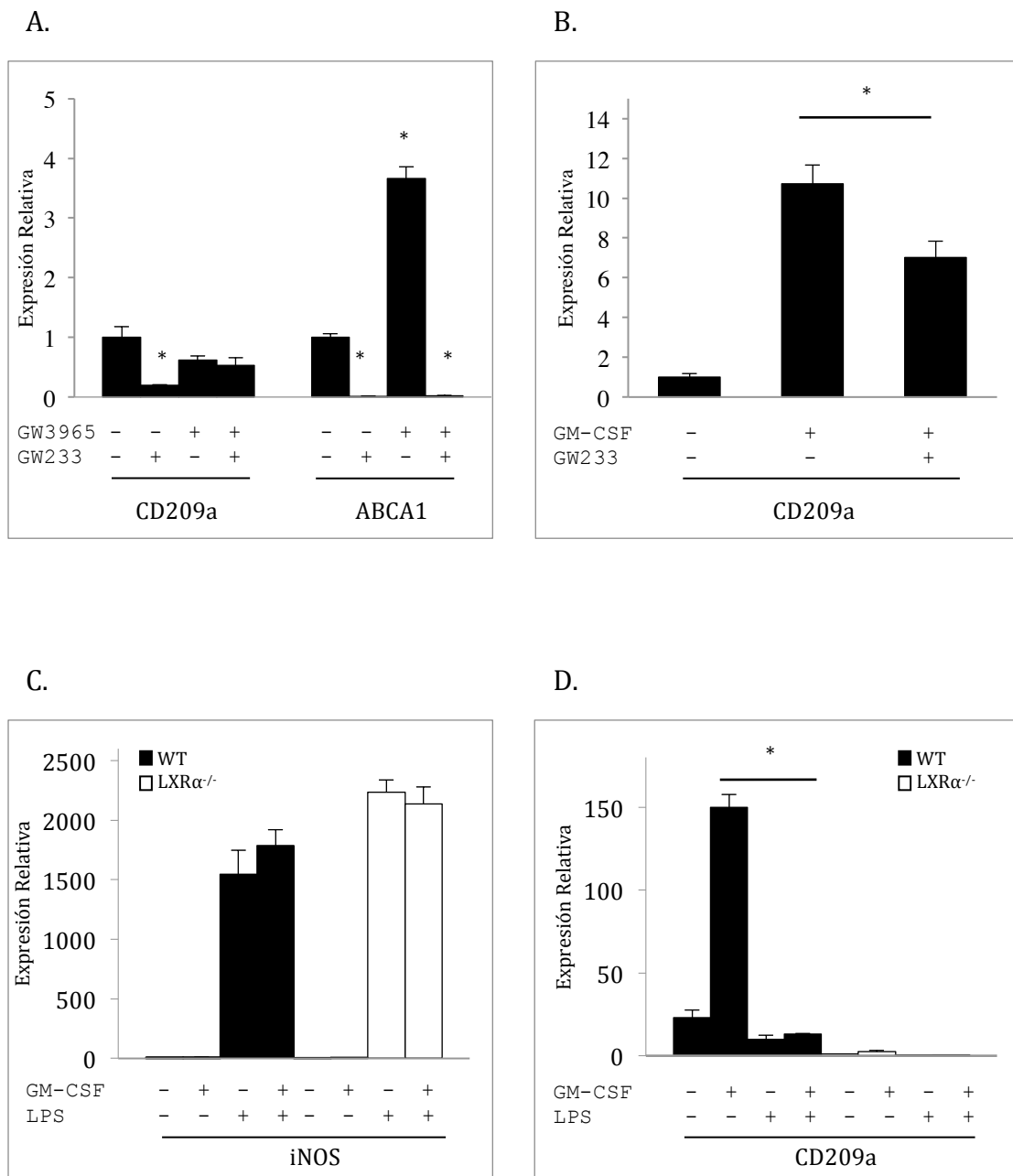


Figura 4.21. La expresión de CD209a en respuesta a GM-CSF se ve afectada por un inhibidor farmacológico de LXR (GW233) y por LPS, pero no por un agonista específico de LXR (GW3965).

Panel A. Niveles de ARNm de CD209a y ABCA1 en células BMDM WT tratadas durante 24h. Se observa que el ligando de LXR GW3965 (1 μ M) no induce la expresión de CD209a, pero el inhibidor de LXR GW233 (2 μ M) si inhibe su expresión basal. * p<0,05 con respecto a su control.

Panel B. Niveles de ARNm de CD209a en células BMDM WT tratadas durante 24h. Se observa una inhibición de la inducción de CD209a por GM-CSF (10 ng/ml) debida al inhibidor de LXR GW233 (2 μ M).

Panel C. y D. Niveles de ARNm de iNOS y CD209a en células BMDM WT (negro) y LXR $\alpha^{-/-}$ (blanco) en respuesta a GM-CSF (10 ng/ml) y LPS (100 ng/ml) durante 24h. Se observa la inhibición inducida por LPS sobre la expresión de CD209a. * p<0,05.

Se indica la media \pm SD de dos experimentos independientes.

La expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) aumenta en respuesta a LPS (Nussler et al., 1992), por lo que en este caso lo usaremos como control de una adecuada estimación inflamatoria. Como podemos ver en la Figura 4.21C, el tratamiento con LPS induce la expresión de iNOS pero inhibe tanto la inducción mediada por GM-CSF como los niveles basales de CD209a (Ver Figura 4.21D). En concordancia con estos resultados, el reclutamiento de la ARN Polimerasa II (Pol2) al promotor de CD209a disminuye tras una exposición de 60 minutos a LPS en células BMDCs, tal y como detallaremos más adelante (Ver Figura 4.26B).

Estas evidencias parecen indicar que la señalización LPS-TLR4 promueve el reclutamiento de monocitos *in vivo*, probablemente a través de las moléculas CD14 y CCR7, hacia las zonas ricas en linfocitos T de determinados ganglios linfáticos en forma de Mo-DCs CD209a⁺ (Cheong et al., 2010), pero *in vitro* tiene un efecto inhibitorio en la expresión de CD209a sobre células derivadas de la médula ósea.

4.15 La captación de Manosa y Fucosa no presenta diferencias significativas entre células WT y LXR $\alpha^{-/-}$.

Ya hemos adelantado en la introducción que CD209a es un receptor de tipo lectina, receptores especializados en la unión de azúcares (Powlesland et al., 2006). El receptor DC-SIGN humano une preferentemente oligosacáridos formados por manosa y fucosa (Guo et al., 2004), al igual que los homólogos murinos (Powlesland et al., 2006), oligosacáridos que se encuentran en estructuras propias pero también en patógenos (Guo et al., 2004).

Debido a las diferencias de expresión de CD209a en células BMDM WT y LXR $\alpha^{-/-}$, y que el proceso de unión de manosa se encuentra diferencialmente regulado en nuestro Microarray (Ver Tabla 4.2), nos propusimos investigar si esta diferencia se traduciría en una diferencia en la unión de manosa o fucosa. Para ello, se cultivaron las células BMDM con esferas de poliacrilamida-FITC conjugadas con manosa (FITC-PAA-Man) o fucosa (FITC-PAA-Fuc) y tras efectuar sucesivos lavados para eliminar esferas no unidas, estudiamos la captación mediante microscopía de fluorescencia (Ver Figura 4.22).

Las células BMDM estimuladas con M-CSF, presentan una mayor captación de esferas de FITC-PAA-Man que de FITC-PAA-Fuc, aunque no se aprecian diferencias significativas entre genotipos. Por otro lado, la captación de esferas de FITC-PAA-Fuc es muy similar a la captación de esferas de FITC-PAA-Man en células BMDM tratadas con GM-CSF.

Por tanto de acuerdo a los resultados de nuestra aproximación, a pesar de la gran diferencia de expresión de CD209a, la captación de esferas de FITC-PAA-Man y FITC-PAA-Fuc no parece presentar grandes diferencias en células BMDM WT y LXR $\alpha^{-/-}$.

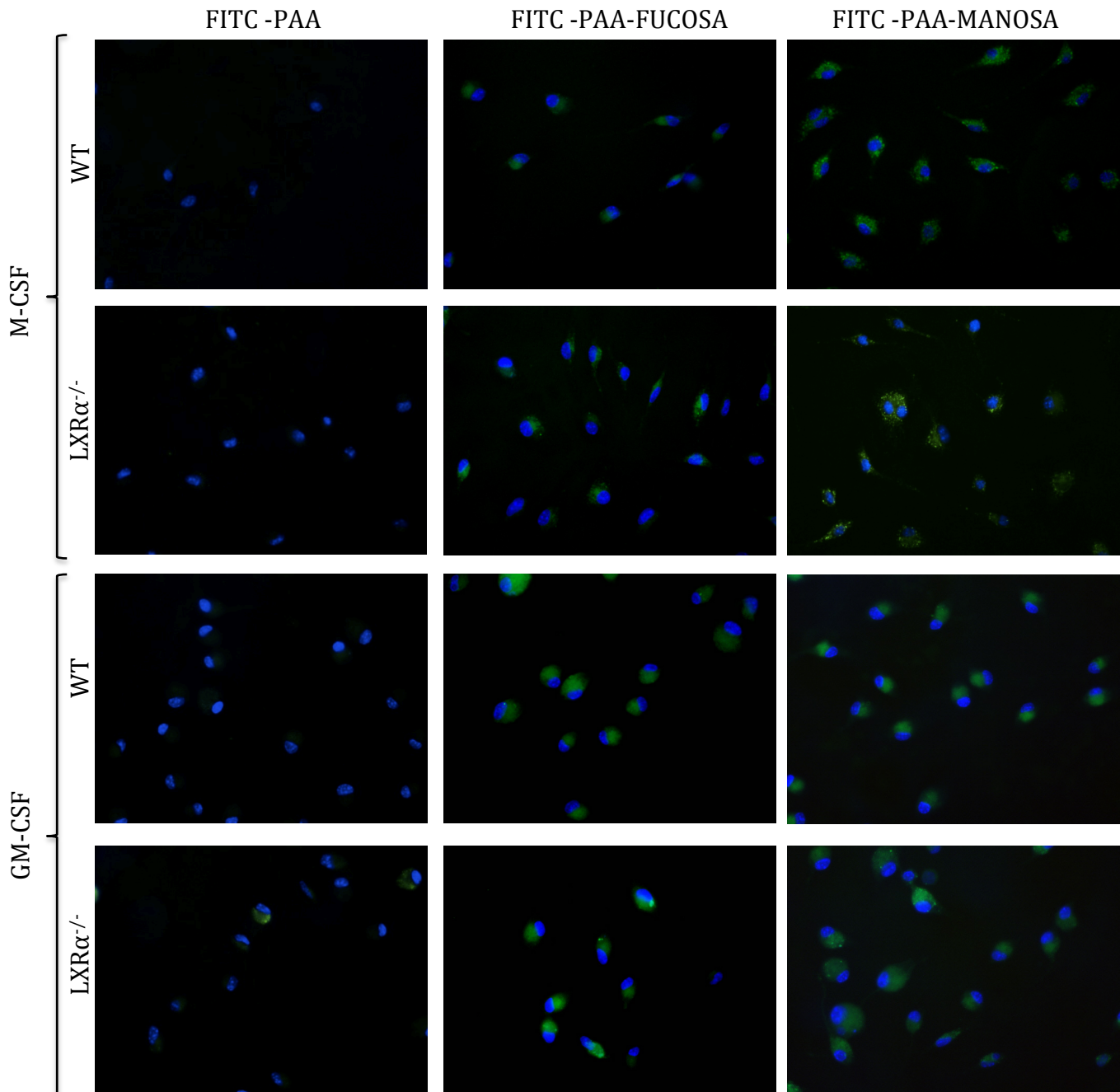


Figura 4.22. La captación de Manosa y Fucosa no muestra diferencias en células derivadas de la médula ósea WT y LXR α ^{-/-}.

Se estudió la captura de las esferas FITC-PAA-azúcar o vehículo FITC-PAA (100 μ g/ml) en células BMDM WT y LXR α ^{-/-} tratadas previamente con M-CSF o GM-CSF durante 24 horas. Mediante microscopía de fluorescencia no se observaron diferencias significativas entre genotipos. Imágenes representativas de 3 experimentos independientes tomadas a un aumento de 40X.

4.16 Estudio de la vía de señalización de GM-CSF.

Tal y como se detalló en la introducción, GM-CSF induce su respuesta a través de un receptor heterodimérico constituido por una subunidad GMR α exclusiva y una subunidad GMR β c común a los receptores de IL3 e IL5. Las principales rutas de señalización son Jak-STAT, PI3K-AKT y ERK-MAPK (Perugini et al., 2010). Para explorar qué intermediarios de señalización juegan un papel relevante en la expresión de CD209a, decidimos emplear inhibidores específicos de dichas rutas (Ver Figura 4.23A).

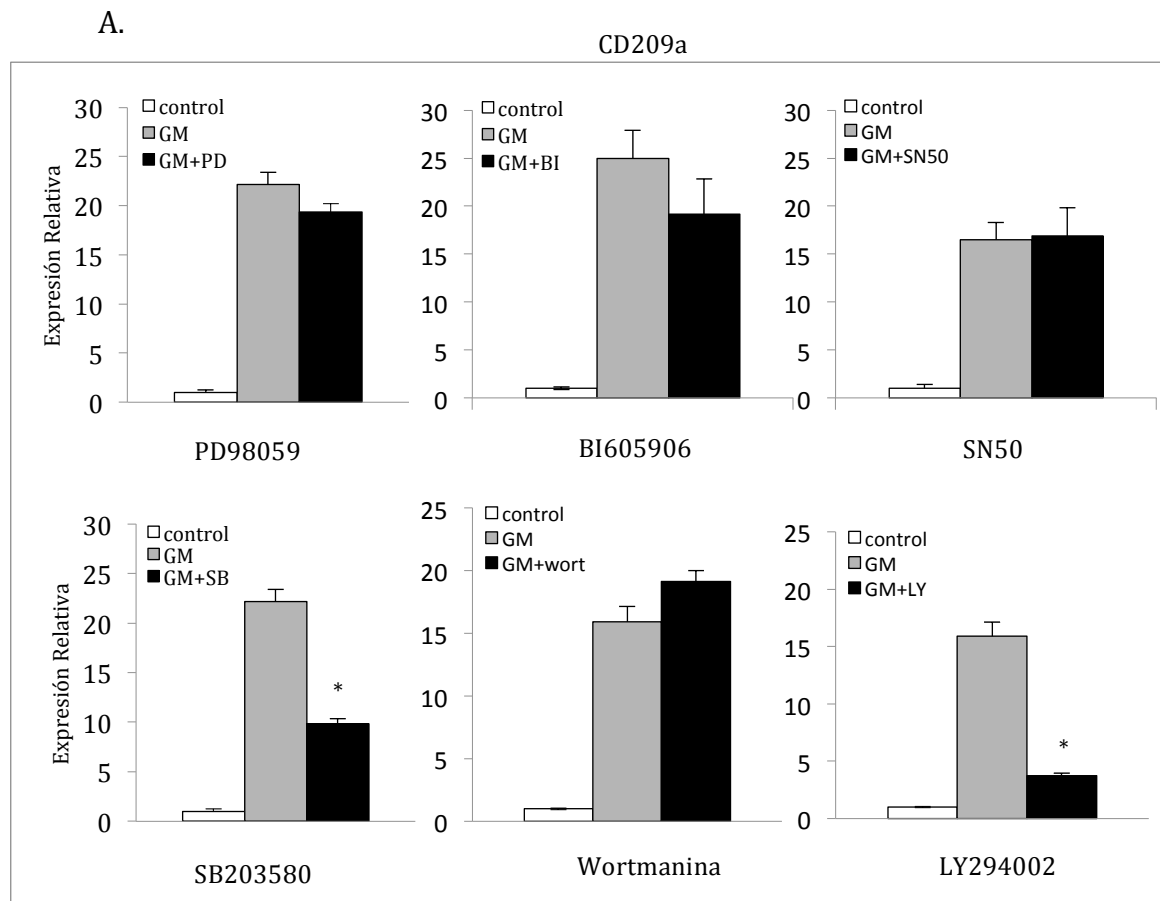
En primer lugar, parece que la vía de ERK no interviene en la regulación de CD209a, ya que un inhibidor específico de esta vía, PD98059, no altera su expresión en respuesta a GM-CSF.

Por otro lado, empleamos dos inhibidores de la actividad de la ruta IKK-NF- κ B denominados BI605906 y SN50. BI605906 es un inhibidor de IKK B, mientras que SN50 es un péptido que contiene la secuencia NLS de p50 y actúa bloqueando la translocación nuclear del dímero RelA:p50. A la vista de los resultados, parece que la señalización de la vía IKK-NF- κ B no tiene un papel primordial en la inducción de la expresión de CD209a por GM-CSF.

El inhibidor de p38 SB203580 inhibe parcialmente la expresión de CD209a. En este caso, puede que la actividad de p38 intervenga en la cascada de señalización que conduce a la inducción de CD209a, aunque se han descrito proteínas diferentes a p38 (*off-target*) afectadas por este inhibidor (Bain et al., 2007), por lo que se requeriría un estudio más detallado.

Con respecto a los inhibidores de PI3K wortmanina y LY294002 hemos obtenido resultados contradictorios. Si bien ambos son capaces de inhibir la fosforilación de AKT en respuesta a estimulación rápida con GM-CSF (Ver Figura 4.23B), esta inhibición no se refleja en una inhibición de la expresión de CD209a a tiempos más largos de estimulación con GM-CSF en el caso de wortmanina, pero sí en el caso de LY294002 (Ver Figura 4.23A). Otros estudios también han obtenido resultados contradictorios usando ambos inhibidores (Hazeki et al., 2006), y esto es posible que sea debido a la inhibición de proteínas diferentes de PI3K (*off-target*) por LY294002 (Gharbi et al., 2007; Hazeki et al., 2006). Considerando que la wortmanina es un inhibidor de PI3K más específico que el LY294002 (Bain et al., 2007), entendemos que los resultados obtenidos con wortmanina reflejan mejor la realidad y, por tanto, no tenemos datos concluyentes que indiquen que la ruta de señalización PI3K-AKT intervenga de manera importante en la inducción de CD209a mediada por GM-CSF.

Finalmente, los inhibidores Jak-I (inhibidor de todas las Jaks) y AG490 (inhibidor de Jak2) impiden la expresión de CD209a en respuesta a GM-CSF (ver Figura 4.24A). Además, hemos comprobado mediante *western blot* el efecto inhibitorio de Jak-I sobre la fosforilación de Jak2 y STAT5 en respuesta a GM-CSF (ver Figura 4.24B).



B.

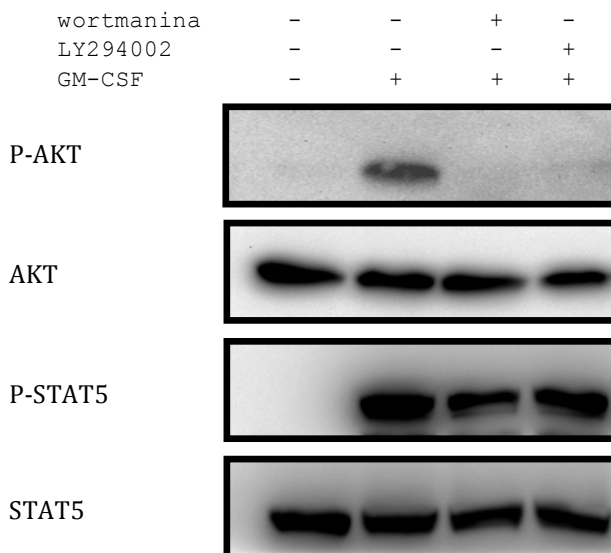


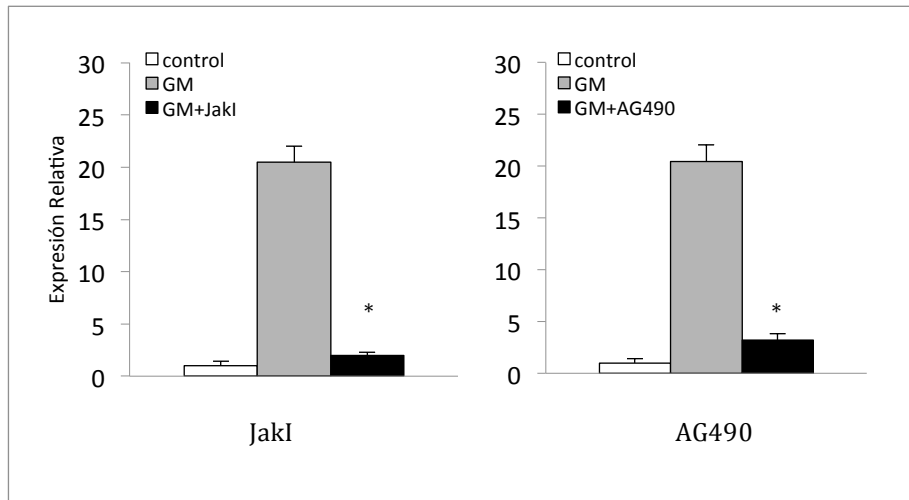
Figura 4.23. Efecto de la inhibición de los principales intermediarios de la señalización de GM-CSF sobre la expresión de CD209a.

Panel **A.** Niveles de ARNm de CD209a en células BMDM WT tratadas con GM-CSF durante 6 horas y preincubadas 1 hora con vehículo o inhibidor según se indica, a las siguientes concentraciones: PD98059 (20 μ M), BI605906 (5 μ M), SN50 (20 μ M), SB203580 (20 μ M), wortmanina (500nM) y LY294002 (25 μ M). Se indica la media \pm SD de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a GM.

Panel **B.** Comprobación del efecto inhibitor de wortmanina y LY294002 sobre la fosforilación de AKT y STAT5 mediante *western blot*.

A.

CD209a



B.

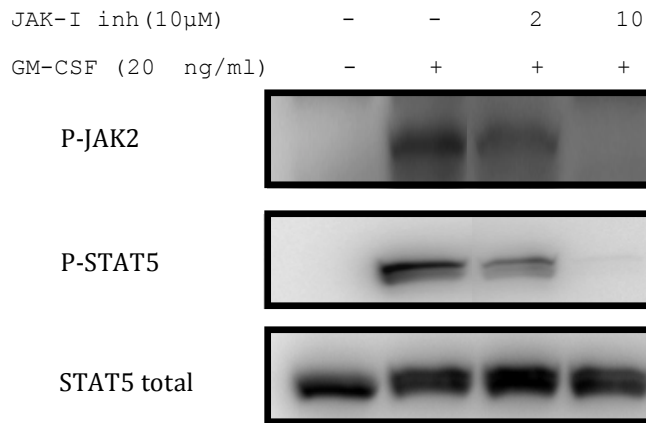


Figura 4.24. La expresión de CD209a requiere de la fosforilación de Jak2/STAT5.

Panel A. Niveles de ARNm de CD209a en células BMDM WT tratadas con GM-CSF durante 6 horas y preincubadas 1 hora con vehículo o inhibidor según se indica, a las siguientes concentraciones: Jak-I (10 μ M) y AG490 (10 μ M). Se indica la media \pm SD de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a GM.

Panel B. Comprobación del efecto inhibitor de Jak-I sobre la fosforilación de Jak2 y STAT5 mediante western blot.

Según estos resultados y dentro de las limitaciones de nuestra aproximación, parece que la principal ruta de señalización implicada en la regulación de CD209a por GM-CSF sea la vía de Jak2-STAT5.

4.17 Factores de Transcripción que intervienen en la regulación de la expresión de CD209a.

Con el objetivo de conocer en mayor profundidad la regulación de la expresión de CD209a, nos planteamos estudiar los factores de transcripción que se encuentran presentes en la zona genómica correspondiente a CD209a. Para ello, analizamos estudios de *ChIP-Seq* en las bases de datos, una aproximación que revela las regiones genómicas a las que se encuentra unido un determinado factor de transcripción. El análisis de los *ChIP-Seq* se realizó con ayuda del software HOMER y los resultados se visualizaron mediante *Genome Browser*, tal y como se detalla en la sección 3.9 de Material y Métodos.

Primero, estudiamos los resultados obtenidos de dos *ChIP-Seq* de LXR en células RAW264.7 que sobreexpresan LXR α (gentileza del Dr. C.K. Glass) o LXR β (GSM538015). Pudimos comprobar la existencia de una señal de unión de LXR a 5,7 Kb del inicio de transcripción (Ver Figura 4.25A), que es del doble de magnitud en RAW264.7-LXR α que en RAW264.7-LXR β . En este lugar genómico identificamos dos posibles secuencias consenso de unión LXRE situadas de manera solapante. Las secuencias son:

LXRE1:

GGGTCA	TAAG	CTTGAA
CAGTAA	GTGC	GGGTCA

 (motivo DR4)

LXRE2:

GGGTCA	TAAG	CTTGAA
CAGTAA	GTGC	GGGTCA

 (motivo DR4)

En un siguiente paso, mediante predicción bioinformática, estudiamos si existían secuencias de unión potenciales para otros factores de transcripción en la vecindad que pudieran jugar algún papel en la regulación de la expresión de CD209a. Para ello, empleamos el *software* de *Lasergene (DNASTAR)*, que contiene una matriz con los elementos consenso de múltiples factores de transcripción (TFD.dat). En la vecindad de la zona de unión de LXR encontramos secuencias de unión para RXR, C/EBP, cREL y PU.1, cuyas secuencias son:

RXRE1: GGGCGGTGTGTACAAAGGTCA GGGA

RXRE2: GTACAAAGGTCA GGGACTTCAAGCT

C/EBP: CCATCCAATCACGAA

cREL: CTGGGAATTCCTCGT

PU.1: AC GAAGG GCGGTGTGTA

Por otro lado, la secuencia consenso de STAT se obtuvo analizando las señales de presencia de STAT5 en los *ChIP-Seqs* de células dendríticas de bazo murino sin tratar (GSM671417) o tratadas con GM-CSF durante 2 horas (GSM671418) con el software

HOMER. De esta manera obtuvimos una secuencia tipo enriquecida o "logo" (Ver Figura 4.25B) a partir del que podemos establecer una secuencia de búsqueda: TWCYNRGAAN, donde según la nomenclatura establecida por la IUPAC, W representa A o T, Y representa T o C, R representa A o G y N cualquier nucleótido. De esta manera, identificamos un posible lugar de unión de STAT5 en la proximidad de la unión de LXR y que presenta la siguiente secuencia:

STAT5: TACTGGGAAT

La posición relativa de cada una de las secuencias se representa en la Figura 4.25A. Se observa que todas estas secuencias consenso quedan alojadas en una zona de unos 90 pares de bases, a modo de "punto caliente" o "*hotspot*" de regulación (ver Siersbæk et al., 2014, 2011), en el que varios factores de transcripción ejercen su función de manera interrelacionada modulando la expresión del gen diana. Esta región presenta, además, una mayor accesibilidad a la cromatina, marcada por la hipersensibilidad a DNase I (*DNaseI hypersensitive sites*, DHS) (GSM652857) (Ver Figura 4.25C), lo que constituye la característica principal de las regiones reguladoras (Bernstein et al., 2012).

Para comprobar la bondad de las predicciones buscamos en las bases de datos estudios publicados de *ChIP-Seq* de estos factores de transcripción en células murinas de linaje mielóide. Encontramos datos de PU.1 tanto en células BMDM (GSM538017, mostrado en la Figura 4.26A, y GSM940924 y GSM881099, no mostrados pero de resultado muy similar) como en macrófagos peritoneales obtenidos con tioglicolato (GSM537983). Estos datos indican, con una fidelidad muy alta, que PU.1 se encuentra presente en el "*hotspot*" (Ver Figura 4.26A) en ambos tipos celulares. Por otro lado, la presencia de PU.1 se detecta también en células BMDM de LXR-DKO (GSM538018), en concordancia con su rol de factor de transcripción que establece el *cistroma* específico de tipo celular, a partir del cual se unen los factores de transcripción dependientes de ligando, tal y como se propone en el trabajo de Heinz et al., 2010. Finalmente, hemos comprobado que la activación de PU.1 se traduce en un aumento de la expresión de CD209a. Para ello, hemos analizado el *microarray* GSE13125, en el que se estudia la expresión génica de células PUER tras un tratamiento con tamoxifeno de 24 horas. Estas células presentan un receptor PU.1 fusionado a un dominio del receptor de estrógenos, que se activa en respuesta a tamoxifeno. Nuestro análisis muestra un aumento de la expresión de CD209a de 3,3 veces ($p=3.05E-07$) en respuesta al tratamiento con respecto a las células control (datos no mostrados).

También encontramos datos que evidencian la unión de C/EBP α (GSM537984) y C/EBP β (GSM537985) en el "*hotspot*" en macrófagos peritoneales obtenidos con tioglicolato. Sin embargo p65 (también denominado RELA, de la familia de NF-kB) (GSM611116) no aparece unido.

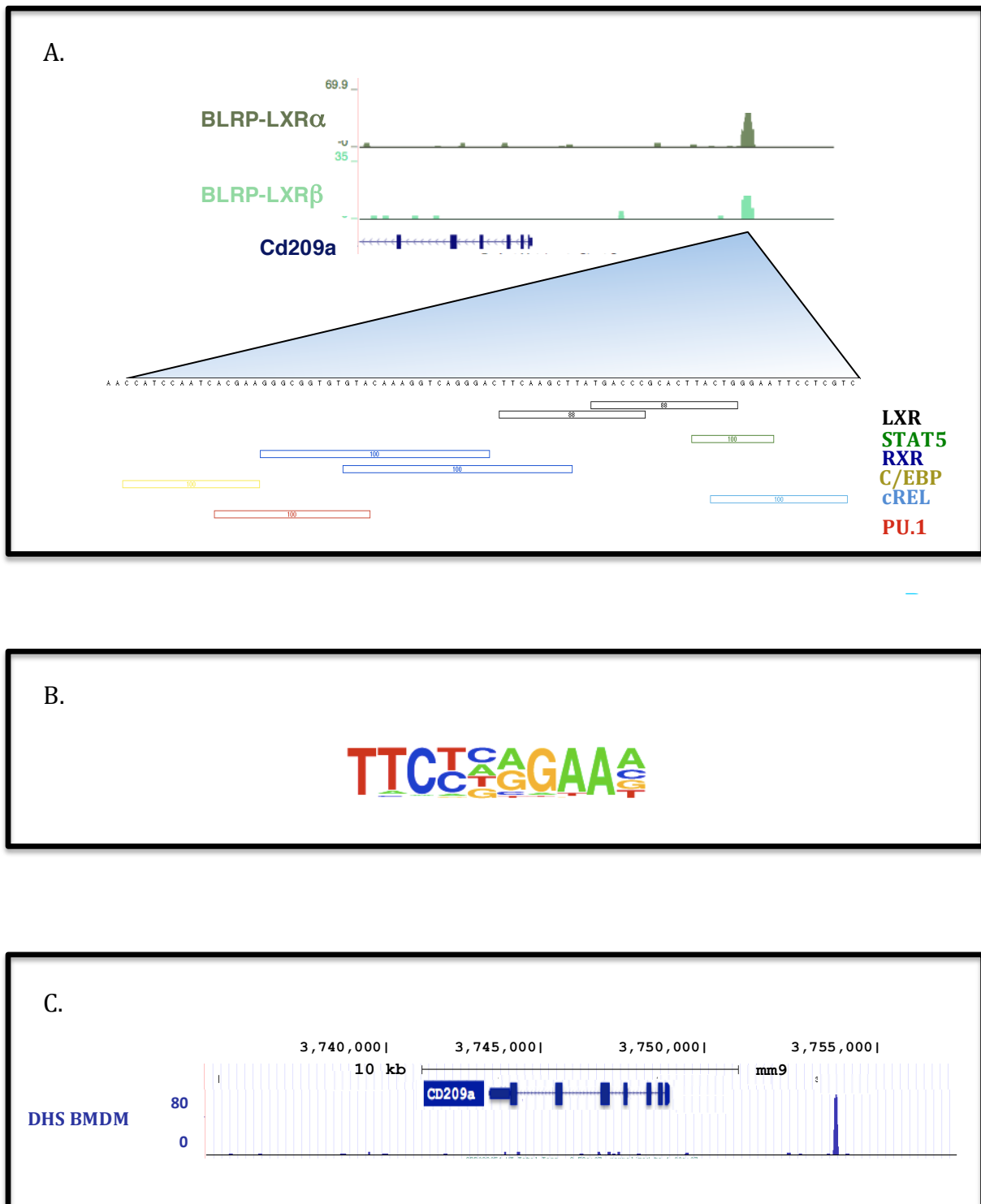


Figura 4.25. Estudio de la unión de factores de transcripción al gen de CD209a (I).

Panel **A**. Unión de LXR en las proximidades del inicio de transcripción del gen de CD209a en células mieloides RAW264.7 que sobreexpresan LXR β (GSM538015) o LXR α (cortesía de CK Glass). El análisis bioinformático de esta región detectó además secuencias consenso para LXR, y otros factores de transcripción como STAT5, RXR, C/EBP, cREL y PU.1.

Panel **B**. Logo de la secuencia consenso de unión de STAT5 generada con HOMER a partir de los datos de ChIP-Seq con número de acceso GSM671417 y GSM671418.

Panel **C**. Regiones con hipersensibilidad a DNasa I en el cromosoma 8 del genoma murino (versión NCBI37/mm9) visualizado en el UCSC Genome Browser (GSM652857).

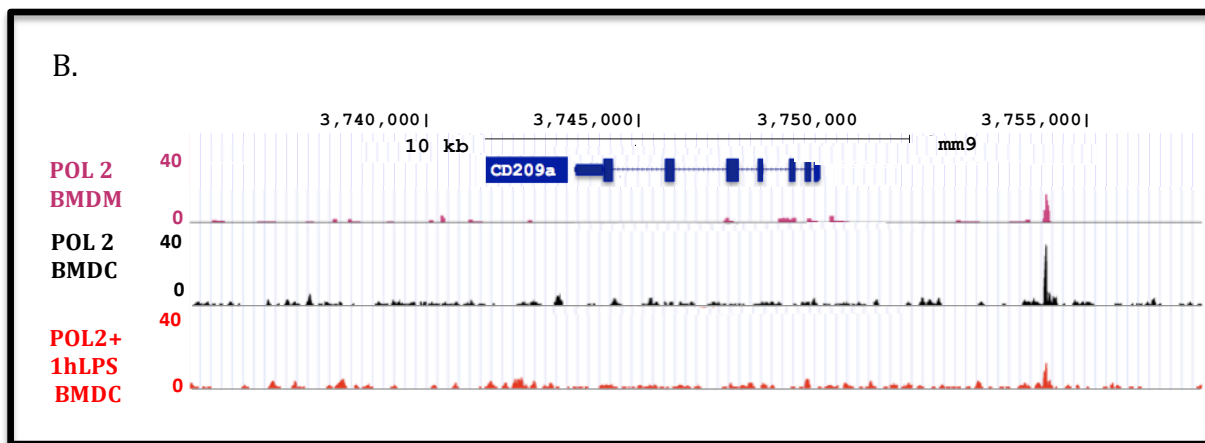
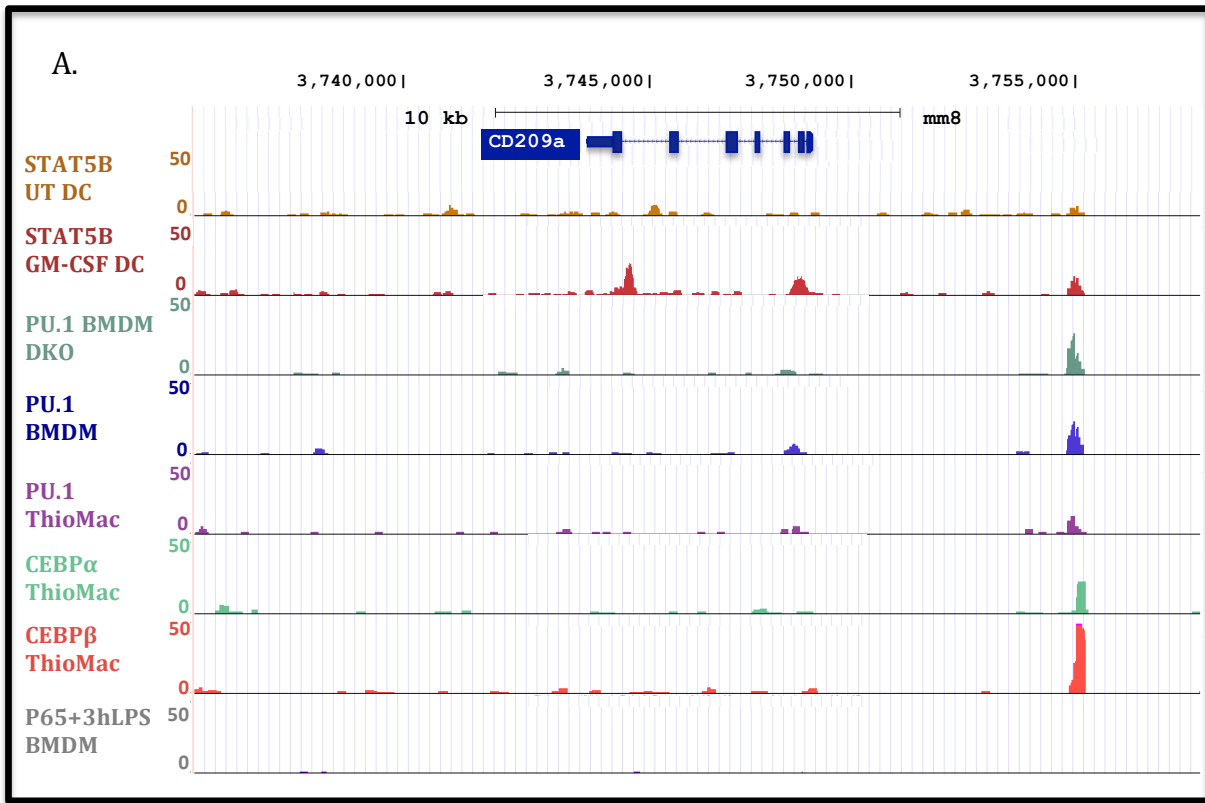


Figura 4.26. Estudio de la unión de factores de transcripción al gen de CD209a (II).

Panel **A**. Picos de unión de varios factores de transcripción en el cromosoma 8 del genoma murino (versión NCBI36/mm8) visualizado en el *UCSC Genome Browser*. Los datos proceden de los siguientes ChIP-Seqs: "STAT5B UT DC" corresponde a células DC sin tratar (GSM671417), "STAT5B GM-CSF DC" a células DC tratadas con GM-CSF (GSM671418), "PU.1 BMDM" (GSM538017), "PU.1 BMDM DKO" (GSM538018), "PU.1 ThioMac" (GSM537983), "C/EBP α ThioMac" (GSM537984), "C/EBP β ThioMac" (GSM537985), "p65 +3hLPS BMDM" (GSM611116).

Panel **B**. Picos de unión de la ADN polimerasa II en el cromosoma 8 del genoma murino (versión NCBI37/mm9) y visualizado en el *UCSC Genome Browser*. Los datos proceden de los siguientes ChIP-Seqs: "Pol2 BMDM" (GSM652857), "Pol 2 BMDC" (GSM881103), "Pol 2 +1hLPS BMDC" (GSM881106).

Es de destacar que en células dendríticas aisladas de bazo se registra la unión de STAT5B en el "*hotspot*" así como en otras regiones de la vecindad del locus de CD209a en respuesta a GM-CSF (GSM671417 y GSM671418). Creemos que esta unión es la que actúa de transmisor de la señal que proviene del receptor de GM-CSF y que desencadena la expresión del gen (Ver Figura 4.26A).

En células BMDM encontramos un enriquecimiento de la presencia de la ARN polimerasa II (POL2) en el "*hotspot*" con un valor de 14,5 (GSM652857). Esta unión es mayor en BMDCs (valor = 31,1) (GSM881103) y disminuye en respuesta a tratamiento con LPS durante 1 hora (valor = 13,0) (GSM881106). Estos resultados (Ver Figura 4.26B) concuerdan con nuestros resultados, en los que el LPS tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de CD209a (Ver Figura 4.21D).

En general, esta aproximación nos ha permitido detectar la presencia de una zona de posible regulación de la expresión de CD209a, apoyado por la hipersensibilidad a la *DNAseI* (DHS), a la que se unen factores de transcripción con un posible papel en la regulación de CD209a. En concreto, estos factores son: LXR, PU.1, C/EBP α y β y STAT5.

4.18 Los Factores de Transcripción STAT5, PU.1, C/EBP α y LXR α intervienen en la regulación de CD209a.

Para estudiar la implicación funcional de los factores de transcripción STAT5, PU.1, C/EBP α y LXR α en la inducción de CD209a mediada por GM-CSF, procedimos a reducir su expresión mediante una estrategia de silenciamiento específico con siRNA (*small interfering RNA*) en células BMDM.

En cada experimento se comprobó la eficiencia del silenciamiento midiendo los niveles de expresión de los genes diana de cada siRNA concreto por RT-PCR, obteniendo resultados superiores al 50 % de media (ver Figura 4.27A). Comprobamos que el silenciamiento de STAT5, PU.1, C/EBP α o LXR α implica una inhibición de la inducción de CD209a mediada por GM-CSF de entre 50 al 70 % (Ver Figura 4.27B).

En conjunto, estos datos revelan la importancia de los factores de transcripción STAT5, PU.1, C/EBP α y LXR α en la regulación de CD209a en células BMDM en respuesta a GM-CSF.

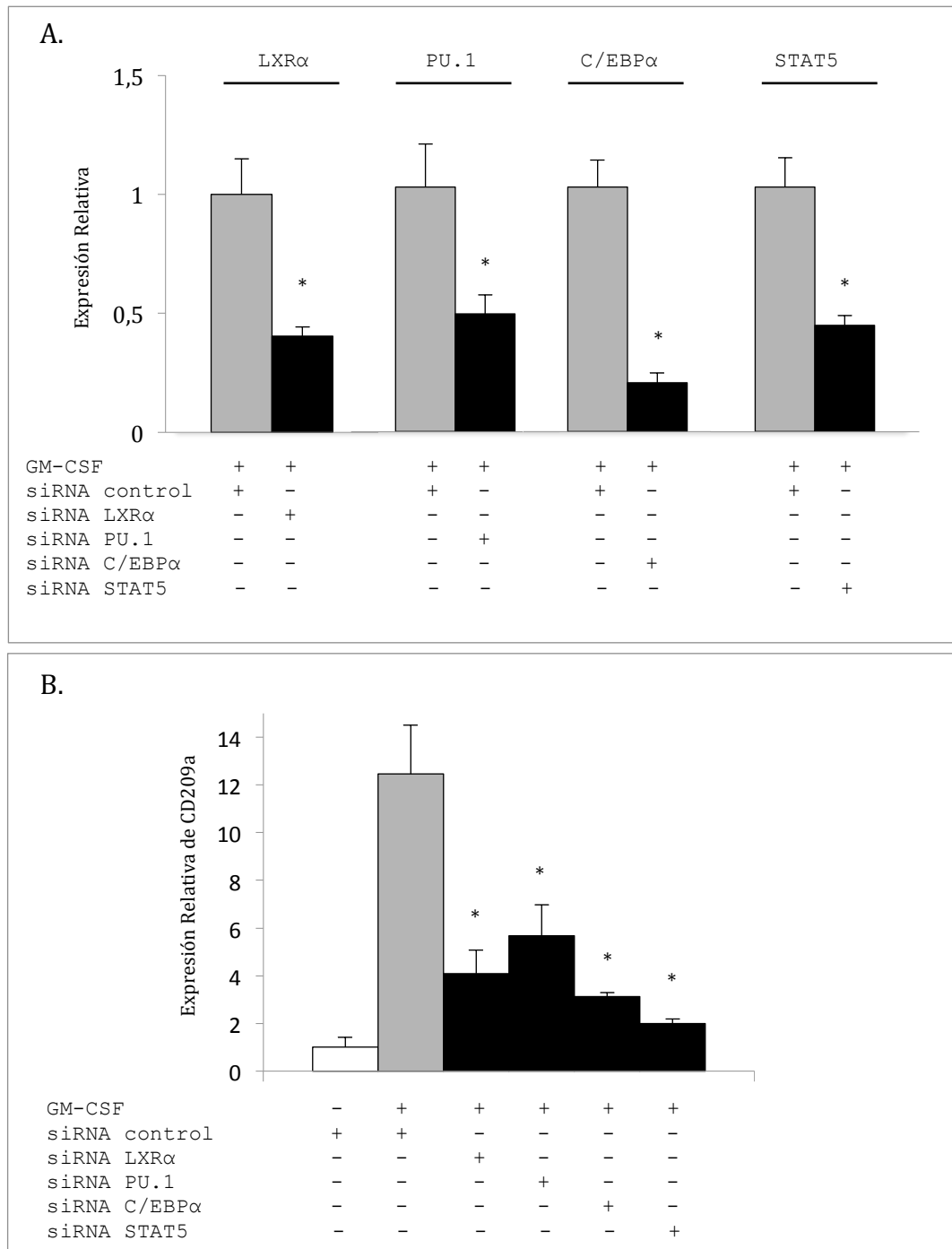


Figura 4.27. El silenciamiento de LXRα, PU.1 C/EBPα y STAT5 mediante siRNA inhiben la expresión de CD209a inducida por GM-CSF.

Panel A. Eficiencia de silenciamiento de los siRNA de LXRα, PU.1 C/EBPα y STAT5 sobre la expresión de cada una de sus dianas. Los niveles de ARN se midieron mediante RT-PCR.

Panel B. Inhibición de la expresión de CD209a inducida por el silenciamiento de LXRα, PU.1 C/EBPα y STAT5.

Se indica la media ± SD de tres experimentos independientes. * p<0,05 con respecto a GM.

5.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Las células mieloides del sistema inmunitario constituyen el eje central de la respuesta innata y un eslabón fundamental de enlace hacia la respuesta adaptativa (Geissmann et al., 2010). Para poder mantener la integridad y salud del individuo, la respuesta inmunitaria debe de ser capaz de responder eficazmente a una enorme variedad de posibles patógenos y, a su vez, reconocer las células y estructuras propias. Esto ocurre gracias a la especialización de las células del sistema inmunitario en función del tejido en el que se encuentran, el ambiente al que se ven expuestas y los retos inmunológicos a los que deben de hacer frente. Es precisamente esta diversidad funcional la que dificulta, en gran medida, una clasificación estándar de todos los tipos celulares, y la que en parte ha estimulado los esfuerzos de la comunidad científica.

Tradicionalmente, los monocitos se han considerado simples precursores sanguíneos que se extravasan a los tejidos para dar lugar a células terminalmente diferenciadas como células dendríticas y macrófagos, las cuales se distinguen a su vez en base a su morfología, marcadores de superficie, capacidad de fagocitosis y capacidad de presentación de antígeno. Existe una gran diversidad de poblaciones de macrófagos (Gautier et al., 2012 y Tabla 1.1) cuyo origen ontogenético está empezando a revelarse. Recientemente, se ha descubierto que muchas poblaciones de macrófagos residentes tienen su origen durante el desarrollo embrionario en el saco vitelino (Schulz et al., 2012; Yona et al., 2013) o precursores de hígado fetal (Guilliams et al., 2013), y hay evidencias que sugieren que su mantenimiento a lo largo de la vida del individuo ocurre por proliferación local de manera independiente de precursores hematopoyéticos de la médula ósea (Hashimoto et al., 2013; Jenkins et al., 2011; Robbins et al., 2013). Estos macrófagos se caracterizan por ser F4/80^{high} e independientes del factor de transcripción c-Myb (Schulz et al., 2012). Otras poblaciones de macrófagos proceden de precursores HSC en la etapa adulta, y se caracterizan por ser F4/80^{low} y dependientes de c-Myb (Schulz et al., 2012). Estos resultados procedentes de nuevas aproximaciones basadas en mapeo del destino celular parecen confirmar estudios anteriores que habían pasado inadvertidos. Por ejemplo, en un experimento clásico Van Furth y Diesselhoff-den Dulk mostraron el origen dual de los macrófagos tisulares marcando monocitos de la médula ósea con Timidina^[3H]. Con este experimento llegaron a la conclusión de que alrededor del 55 % de los macrófagos esplénicos tenían su origen en los monocitos marcados, mientras que el 45 % restante tenía un origen local (Van Furth and Diesselhoff-den Dulk, 1984). Por otro lado, mediante experimentos de quimerismo, se observa que sólo el 10 %

de los macrófagos F4/80^{high} del bazo proceden del donante, es decir, los macrófagos F4/80^{high} del bazo apenas se renuevan a partir de precursores provenientes de la médula ósea (Schulz et al., 2012).

Por otra parte, se han identificado factores de transcripción denominados LDTFs (*Lineage Determining Transcription Factors*), entre los que se encuentran PU.1 (Schulz et al., 2012) y C/EBP α (Heath et al., 2004), cuyo defecto determina la ausencia de la práctica totalidad de los macrófagos tisulares. Es de destacar que las poblaciones de macrófagos presentan una diversidad génica considerable, y únicamente comparten la expresión de unos pocos cientos de ARNm (Gautier et al., 2012). La regulación subyacente a la diferenciación de cada una de estas poblaciones es en gran medida desconocida. Recientemente, se ha descubierto que la ausencia de un único factor de transcripción de la familia de PU.1, denominado Spi-C, dificulta el desarrollo de la población de macrófagos esplénicos de la pulpa roja F4/80^{high} sin afectar otras poblaciones, defecto que se manifiesta fisiológicamente a nivel del reciclado del hierro (Kohyama et al., 2009).

Resultados de nuestro laboratorio muestran que los ratones LXR α ^{-/-} carecen de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal del bazo (Fig. 4.1), por lo que podría estar regulando la localización o la diferenciación celular. Nuestro estudio de los niveles de expresión de citoquinas implicadas en la formación y compartimentalización del bazo, como CCL19, CCL21, LTA y LTBR (descritas en Ato et al., 2004; Mebius and Kraal, 2005), no reveló diferencias en ratones WT y LXR-DKO de 1 a 3 semanas de edad (Fig. 4.2). Estos datos apoyan la idea de que la señalización y la localización no están alteradas en ratones carentes de LXR, aspecto que hemos confirmado mediante una estrategia de trasplantes. En efecto, pudimos comprobar que la médula ósea de ratones WT es capaz de inducir la formación de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal en ratones trasplantados LXR-DKO (Fig. 4.3), y que el defecto es debido a la ausencia de LXR α , ya que la médula de ratones LXR β ^{-/-}, pero no de LXR α ^{-/-}, es capaz de inducir la formación de la MZ (Fig. 4.3).

En esta Tesis, hemos abordado varias aproximaciones que confirman la decisiva influencia del factor de transcripción LXR α en la diferenciación de las dos poblaciones de macrófagos de la zona marginal (MMM y MZM). Por un lado, la reconstitución con lenti-SP-LXR α de células hematopoyéticas adultas aisladas de ratones LXR-DKO confirmó la reversibilidad del fenotipo, al menos de manera parcial. En un plazo de 8 semanas tras el trasplante con lenti-SP-GFP, se detecta un 30 % de monocitos circulantes GFP-positivos mediante citometría (Fig. 4.12). Este porcentaje de transfección es muy similar al 26,4 % publicado en otro laboratorio independiente (Zhong et al., 2014). En concordancia con estos niveles de transfección de la población de monocitos circulantes, los bazos de los ratones trasplantados con médula tratada con lenti-SP-LXR α muestran una recuperación parcial de los marcadores CD169, MARCO y Tim-4 en la MZ (Fig. 4.13). Además, la activación farmacológica de LXR mediante su ligando sintético GW3965 acelera la cinética de repoblación de los macrófagos de la zona marginal en

ratones tratados previamente con clodronato (Fig. 4.4), sin afectar a la cinética de repoblación de los macrófagos de la pulpa roja.

Por otro lado, hemos generado ratones KO tejido específicos mediante la aproximación LoxP-Cre. En concreto, nuestros ratones $LXR\alpha^{fl/fl} Vav-iCre^{+/-}$ presentan una expresión normal de $LXR\alpha$ en todos los tejidos menos en las células derivadas de la médula ósea, tanto a nivel de ARNm (Fig. 4.7) como a nivel de proteína (Fig. 4.8). El fundamento es la escisión específica del gen floxeado $LXR\alpha$ por parte de la recombinasa $Vav-iCre$, que presenta una expresión restringida a células de la línea hematopoyética (de Boer et al., 2003). Con esta aproximación, hemos podido comprobar que los macrófagos de la pulpa roja $F4/80^{+}$ se desarrollan de manera independiente de $LXR\alpha$, mientras que las poblaciones de macrófagos de la zona marginal requieren de la expresión de $LXR\alpha^{+}$ en los precursores hematopoyéticos para poder desarrollarse (Ver Fig. 4.9). Además, la expresión de una única copia de $LXR\alpha$ es suficiente, tal y como se observa en los heterocigotos $LXR\alpha^{fl/+} Vav-iCre^{+/-}$ (Fig. 4.10 y 4.11), fenómeno conocido como haplosuficiencia. Esta aproximación, unida al estudio de las poblaciones esplénicas en distintos estadios del desarrollo postnatal (Fig. 4.2), confirma el origen hematopoyético de los precursores de los macrófagos de la zona marginal. Debemos tener en cuenta que en condiciones de irradiación propias de un trasplante de médula ósea, las poblaciones de macrófagos residentes se pueden ver sustituidas por monocitos procedentes de la médula ósea (Gomez Perdiguero and Geissmann, 2013), lo que hemos podido evitar mediante la tecnología Lox-Cre. Además, el origen hematopoyético de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal concuerda con su fenotipo $F4/80^{-low}$, típico de macrófagos procedentes de precursores HSC (Schulz et al., 2012).

La explicación para la distinta procedencia de las poblaciones de macrófagos, bien sea desarrollo embrionario o médula ósea, aún no se conoce. Es probable que el origen monocítico de los macrófagos de la zona marginal les confiera unas cualidades únicas. Por ejemplo, los macrófagos derivados de los monocitos parecen estar mejor equipados que los que derivan del saco vitelino para empezar y modular la respuesta inmunitaria (Schulz et al., 2012), una característica que puede ser esencial en el ambiente de la zona marginal, lugar donde se criba todo el torrente sanguíneo. Además, es probable que los macrófagos de la zona marginal, al igual que los macrófagos del sistema digestivo (Hashimoto et al., 2013; Yona et al., 2013), nunca estén en estado de "reposo" debido a la repetida exposición a antígenos, lo que determina la acumulación de monocitos y su diferenciación local a macrófagos activados (Bronte and Pittet, 2013).

En la zona marginal se capturan la inmensa mayoría de antígenos circulantes en la sangre (Aichele et al., 2003). La Púrpura Trombocitopenica Idiopática (*Idiopathic Thrombocytopenic Purpura*, ITP), también llamada Púrpura Trombocitopénica Autoinmune (*Autoimmune Thrombocytopenic Purpura*, AITP), es una enfermedad que se caracteriza por un contaje bajo de plaquetas y médula ósea normal, en la que hay una destrucción elevada de plaquetas por autoanticuerpos frente a antígenos de membrana plaquetarios (George et al., 1994). Presenta una prevalencia de 9,5 casos por cada 100.000 personas en los EEUU (Michel, 2009). Dado que el bazo es el principal sitio de captura

de los complejos plaqueta-anticuerpo, una intervención terapéutica muy extendida para evitar el descenso de plaquetas es la esplenectomía, que tiene éxito en alrededor del 66 % de los casos (Kojouri et al., 2004). Para estudiar la relevancia funcional de la zona marginal en una enfermedad como la ITP, hemos puesto a punto un modelo murino en el que se induce la opsonización de las plaquetas mediante un anticuerpo frente a la integrina gp α_{IIb} (CD41). De esta manera, las plaquetas opsonizadas son marcadas para fagocitosis, disminuyéndose sus niveles circulantes (Mizutani *et al.*, 1993; Crow *et al.*, 2001). A las 3 horas de la inyección del anticuerpo hemos comprobado mediante citometría de flujo un descenso del 80 % de los niveles circulantes de plaquetas en ratones WT, lo que demuestra la efectividad del tratamiento (datos no mostrados). En ratones LXR-DKO, el descenso fue del 35 % (datos no mostrados). Esta notable diferencia en la captura de plaquetas opsonizadas puede ser debida a la ausencia de zona marginal, pero no se pueden descartar otras explicaciones. En concreto, se ha descrito que tras la unión del anticuerpo, la plaqueta se vuelve apoptótica (Leytin et al., 2006), y es conocida la menor capacidad de retirada de células apoptóticas por parte de los macrófagos carentes de LXR (Alonso-Gonzalez et al., 2009). Es probable, por tanto, que el resultado sea debido a un efecto conjunto de ambos fenómenos. No obstante, mediante la inyección de plaquetas ya opsonizadas pudimos comprobar que en condiciones normales el principal sitio de captura dentro del bazo es la zona marginal en ratones WT, mientras que en la zona marginal de ratones LXR-DKO existe un defecto en su captura (Fig. 4.14).

El estudio de los macrófagos de la zona marginal es complicado, ya que los marcadores moleculares no son exclusivos de esta población. Aún cuando estos marcadores son muy abundantes en la zona marginal, es probable que las estrategias de silenciamiento de estas proteínas mediante generación de animales *knock-out* o depleción selectiva como en el caso de los animales CD169-DTR, afecten también a otras poblaciones de macrófagos, pues su expresión es también significativa en otros subtipos de macrófagos tisulares. Otras aproximaciones emplean clodronato a baja concentración, que elimina preferentemente los macrófagos de zona marginal. Las conclusiones de estos estudios implican a los macrófagos de la zona marginal en el proceso de la tolerancia inmunitaria y la regulación del tratamiento de enfermedades autoinmunes (Anthony et al., 2008a; McGaha et al., 2011; Miyake et al., 2007; Ravishankar et al., 2012). Por tanto, no deja de ser paradójico que los macrófagos de la zona marginal, que evitan la aparición de enfermedades autoinmunes mediante la retirada de células propias en estado apoptótico (McGaha et al., 2011), contribuyan, mediante la retirada de plaquetas opsonizadas, a las consecuencias adversas de una enfermedad autoinmune como es la Púrpura Trombocitopénica Idiopática.

El mecanismo genético último por el cual LXR α regula la formación de los macrófagos de la zona marginal aún no se conoce, pero hipotetizamos que debe de estar mediado por un programa genético específico de una isoforma de LXR, es decir, regulado por LXR α pero no regulado por LXR β . Un ejemplo de esta regulación es el gen SP α , también conocido como AIM (*Apoptosis Inhibitor of Macrophage*). Los ratones carentes de LXR α son especialmente susceptibles a apoptosis inducida por la bacteria *Listeria Monocytogenes* (LM) debido, en parte, a la pérdida de regulación del gen SP α (Joseph et al., 2004). En la Tesis de la Dra. Noelia Alonso González, de nuestro laboratorio, se

estudió la zona marginal de bazos procedentes de ratones $SP\alpha^{-/-}$, y se comprobó que las poblaciones de macrófagos MMM y MZM presentan un desarrollo normal. Por tanto, concluimos que la ausencia de expresión de $SP\alpha$ no es un determinante génico en la formación o mantenimiento de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal. Por otro lado, los macrófagos son sensibles a la sobrecarga de lípidos, pudiendo entrar en apoptosis por estrés del retículo endoplásmico (Feng et al., 2003). Se ha propuesto que $LXR\alpha$ es el regulador principal de $SCD-1$ (*stearyl CoA desaturase*) en macrófagos, y que su inducción protege a este tipo celular frente a la apoptosis por sobrecarga de lípidos (Erbay et al., 2009). Como hemos indicado anteriormente, la zona marginal es una zona de exposición continua a antígenos (Bronte and Pittet, 2013) y el lugar principal de captura de células apoptóticas (Kraal and Mebius, 2006; Ravishankar et al., 2012). Por tanto, constituye una localización anatómica propensa a una sobrecarga lipídica de los macrófagos por fagocitosis. En consecuencia, sería interesante comprobar en el futuro el desarrollo de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal de los ratones $SCD-1^{-/-}$.

Para estudiar la regulación transcripcional ejercida por $LXR\alpha$ en células mieloides *in vitro*, realizamos un estudio del análisis de la expresión génica mediante *microarray* de células BMDM procedentes de ratones WT y $LXR\alpha^{-/-}$ en respuesta a un tratamiento de 24 horas con las citoquinas M-CSF o GM-CSF, tal y como se describe en la sección 3.7.2 de Material y Métodos. La Tabla 5.1 muestra un resumen del número de genes diferencialmente regulados con respecto al control en WT, $LXR\alpha^{-/-}$ y genes diferencialmente regulados con respecto al control en ambos genotipos, que hemos denominado genes "Comunes".

TABLA 5.1. Número de genes cuya expresión es mayor o menor respecto a su control en respuesta a GM-CSF o M-CSF.

		WT	Comunes	$LXR\alpha$
GM-CSF	Más expresados	72	210	158
	Menos expresados	75	99	89
M-CSF	Más expresados	74	222	78
	Menos expresados	8	5	25

El análisis de la Ontología Génica (GO) indica que el proceso más representado en respuesta a M-CSF es el de la división celular (*cell division*) mientras que en respuesta a GM-CSF los procesos más representados son los de quimiotaxis (*chemotaxis*) y respuesta inflamatoria (*inflammatory response*) (ver Tablas 4.1 y 4.2). Esto concuerda con funciones conocidas de estas citoquinas (Lacey et al., 2012). Se sabe que la producción de la citoquina M-CSF ocurre de manera ubicua y que controla el número de macrófagos en varios tejidos, mientras que la citoquina GM-CSF presenta bajos niveles circulantes que a menudo se elevan durante reacciones inmunitarias o inflamatorias (Lacey et al., 2012). Además, en algunas condiciones patológicas caracterizadas por

inflamación crónica, como es el caso del asma, la producción y liberación de GM-CSF, IL-3 e IL-5 en pulmón causa la infiltración y activación de células mieloides, lo que acentúa el daño en las vías aéreas (Broughton et al., 2012). Es de destacar el mayor número de genes expresados en respuesta a GM-CSF en células BMDM de ratones $LXR\alpha^{-/-}$ (n=158) en comparación con WT (n=72), además de la mayor representación de genes de procesos pro-inflamatorios como la biosíntesis de prostaglandinas (*prostaglandin biosynthetic process*). Se sabe que, en el contexto de la respuesta a LPS, la activación de LXR tiene un efecto antiinflamatorio, actuando ambas isoformas de manera redundante y, que en este mismo contexto, células carentes de LXR presentan una respuesta pro-inflamatoria aberrante (Joseph et al., 2003). Sin embargo, a nuestro entender, es la primera vez que se estudia el efecto de un tratamiento agudo de GM-CSF en células BMDM carentes de una única isoforma ($LXR\alpha$). En este sentido, nuestros datos apuntan a una mayor inducción de genes y vías inflamatorias en células BMDM $LXR\alpha^{-/-}$ que en células BMDM WT en respuesta a GM-CSF.

Debemos tener en cuenta, por otro lado, que la inflamación es un proceso fisiológico normal esencial en la respuesta inmunitaria (Janssen and Henson, 2012). Por eso nos resultó interesante estudiar aquellos procesos fisiológicos que se activan en células BMDM WT en respuesta a GM-CSF, ya que podrían constituir rutas potencialmente reguladas por $LXR\alpha$. Por ejemplo, el proceso de unión a manosa (*mannose binding*, GO:0005537) se encuentra sobre-expresado solamente en WT (Tabla 4.2). Uno de los genes presentes en este grupo es CD209a, que además se encuentra entre los 20 genes más diferencialmente regulados en WT (Ver Figura 4.17C). Este gen constituye un marcador de células Mo-DC (Cheong et al., 2010) y macrófagos de la fase de resolución (Stables et al., 2011). Basándonos en la relevancia e interés de este gen desde el punto de vista inmunitario, decidimos estudiar su regulación en mayor profundidad.

Según el consenso actual, el gen murino CD209a es homólogo del gen humano DC-SIGN (Cheong et al., 2010). Sin embargo, hemos comprobado que la regulación de ambos genes es ligeramente diferente en células mieloides murinas y humanas. Así, la citoquina IL-4 es el principal regulador de la expresión de DC-SIGN en humanos (Relloso et al., 2002); mientras que la principal citoquina implicada en la regulación de CD209a hemos descubierto que es GM-CSF (Ver Figura 4.19A). En este sentido, está descrito que las proteínas JAK1 y STAT6 intervienen en la cascada de señalización de IL-4 (Luzina et al., 2012), mientras que en el caso de la cascada de señalización de GM-CSF intervienen las isoformas JAK2 y STAT5 (Perugini et al., 2010). Es por tanto probable que la diferente regulación de DC-SIGN/CD209a en humanos y ratones se articule también a través de algunas diferencias a nivel de factores de transcripción, activados diferencialmente por las vías mencionadas.

Por otro lado, hemos descubierto que la presencia de $LXR\alpha$ es imprescindible para la expresión de CD209a en respuesta a GM-CSF en células BMDM. Así, células carentes de $LXR\alpha$, como $LXR\alpha^{-/-}$ o LXR-DKO, presentan una inducción deficiente de CD209a en respuesta a GM-CSF, mientras que las células carentes de la isoforma $LXR\beta$ presentan una expresión equiparable a la de células WT. Además, hemos encontrado que

en células mieloides de ratón, la isoforma LXR α tiene una vida media inferior a las 6 horas; sustancialmente menor que la vida media de la isoforma LXR β . Estos resultados son similares a los hallados en células humanas (Schneider-Poetsch et al., 2010), por lo que la vida media de las isoformas de LXR parece estar conservada entre especies. Es relevante destacar que el tratamiento con un inhibidor de la síntesis proteica denominado cicloheximida durante un periodo de 6 horas impide la inducción de la transcripción de CD209a en paralelo a la desaparición de LXR α . Estos resultados ofrecen evidencia adicional de la relación entre los niveles de proteína de LXR α y los niveles de expresión de CD209a.

Para ahondar en el estudio de la regulación de CD209a por parte de LXR, nos preguntamos si es posible modular su expresión mediante activación farmacológica con el ligando GW3965. Para nuestra sorpresa, el ligando de LXR no incrementa la expresión de CD209a, sugiriendo que en este contexto LXR α realiza su función de manera independiente de activación farmacológica.

Los receptores nucleares pueden tener variantes de *splicing* incapaces de interaccionar con su ligando y que realizan, por tanto, acciones independientes de ligando. Un ejemplo lo constituyen las variantes de *splicing* del receptor RXR β . Así, la isoforma truncada RXR β 2E es incapaz de unir el ligando 9-cisRA, a diferencia de la isoforma principal RXR β 2. Esta isoforma puede, sin embargo, formar heterodímeros con los receptores TR, VDR, RAR y LXR, y se ha demostrado que puede actuar de manera cooperativa como pareja de VDR en respuesta a vitamina D3 (Fujita and Mitsuhashi, 1999). PPAR γ también presenta dos variantes denominadas PPAR γ 1 y PPAR γ 2. Se ha demostrado que la isoforma PPAR γ 2 presenta una mayor actividad basal independiente de ligando y es más efectiva induciendo la adipogénesis que PPAR γ 1 (Harmon et al., 2011). También se han detectado variantes transcripcionales de LXR α en células humanas, algunas con acciones ligando independientes (Endo-Umeda et al., 2012)

En otros receptores nucleares, como los receptores esteroideos ER α (*Estrogen Receptor alpha*), ER β (*Estrogen Receptor beta*), PR (*Progesterone Receptor*) y AR (*Androgen Receptor*), el fenómeno de la activación independiente de ligando se conoce desde principios de los años 90 (Carascossa et al., 2010). Así, se descubrió que el receptor de progesterona (PR) puede activarse en respuesta a elevados niveles de AMPc incluso en ausencia de progesterona (Denner et al., 1990). Desde entonces, el descubrimiento de nuevas señales capaces de activar a los receptores esteroideos no ha parado (ver Picard, 2003, para una lista completa ver <http://www.picard.ch/downloads/downloads.htm>). La importancia de este fenómeno de *cross-talk* se ha podido comprobar con diversos ejemplos a nivel fisiológico (Carascossa et al., 2010). Por ejemplo, las proteínas IGF-I (*Insulin-like Growth Factor I*) y EGF (*Epidermal Growth Factor*) estimulan el crecimiento uterino a través de ER α , de manera independiente de ligando (Curtis et al., 1996; Klotz et al., 2002). Para poder evaluar la relevancia de estos efectos independientes de ligando, el grupo de Sinkevicius et al. generó ratones transgénicos *knock-in* con una mutación en el dominio de unión a ligando del receptor ER α , que compromete seriamente la respuesta a estrógenos endógenos (Sinkevicius et al., 2008). Con esta aproximación lograron

demostrar que la estimulación del crecimiento uterino por parte de IGF-I y EGF ocurre a través de ER α de manera independiente de ligando (Sinkevicius et al., 2008).

Sin embargo, el mecanismo que nos parece más plausible para explicar la regulación de CD209a por LXR α sería el reclutamiento independiente de ligando de coactivadores, de modo similar a la regulación descrita para el gen aP2 (*Adipose-specific fatty-acid-binding Protein*, también conocido como Fabp4) por parte del receptor nuclear PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) (Guan et al., 2005). En el trabajo de Guan et al. se describe la regulación de la expresión de dos genes que contienen elementos de respuesta para PPAR γ ; el propio aP2 y el gen denominado GyK (*Glycerol Kinase*). La expresión de aP2 se induce dramáticamente durante la adipogénesis, mientras que la expresión de GyK solo aumenta ligeramente en adipocitos 3T3 respecto a preadipocitos 3T3. En este sentido, el agonista de PPAR γ denominado rosiglitazona induce de manera significativa la expresión de GyK en adipocitos, mientras que la inducción de la expresión de aP2 es mínima (ya se encuentra alta *per se*). Esto es debido al diferente patrón de unión de correguladores y correpresores a las zonas promotoras de ambos genes. En el caso de GyK, los dímeros PPAR γ - RXR α se asocian a correpresores como N-CoR y SMRT, así como a la desacetilasa de histonas HDAC3, proteínas que reprimen e hipoacetilan las histonas de esta región; mientras que en el caso de aP2 se asocian a coactivadores como SRC-1, CBP, p300 y Med220, que determinan que la región esté hiperacetilada y con ARN polimerasa II asociada. De esta manera se explica que aP2 presente una expresión basal elevada en adipocitos, mientras que GyK sólo se active en respuesta a ligandos. En efecto, el tratamiento con el ligando de PPAR γ permite el intercambio de correpresores por coactivadores en el gen de GyK, induciendo su activación transcripcional, en gran parte a través de PGC-1 α (Guan et al., 2005). La unión independiente de ligando de coactivadores como CBP/p300, SHP o PGC-1 α a PPAR γ se ha demostrado también en otros estudios (ver revisión por Kim et al., 2013). Además, también se ha propuesto la regulación de un grupo de genes de manera independiente de ligando por la isoforma PPAR β/δ (Adhikary et al., 2011). En este sentido, se conoce poco acerca de las posibles acciones independientes de ligando de LXR. Resultados recientes parecen sugerir que LXR α es capaz de reclutar al coactivador SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*) de manera independiente del ligando (Zhai et al., 2010). Realizando un paralelismo con el trabajo de Guan et al. 2005, la inducción de aP2 durante la adipogénesis es dependiente de PPAR γ pero independiente de activación farmacológica. De manera similar, pensamos que la diferenciación celular hacia células mieloides DCs/GM-BMM/Mo-DCs mediada por GM-CSF induce la expresión de CD209a de manera dependiente de LXR α pero independiente de activación farmacológica. Para confirmar esta hipótesis habría que demostrar la presencia de coactivadores en la región reguladora de CD209a, en especial de SRC-1, concomitante a la diferenciación celular por GM-CSF. A falta de este resultado, tenemos datos que parecen apoyar de manera indirecta este fenómeno. En concreto, el antagonista GW233 consigue disminuir los niveles basales y la inducción de CD209a (Ver Figura 4.21), y la inhibición ejercida por GW233 se debe a una perturbación de la estructura de LXR, en concreto de las hélices 3, 10, 11 y del giro anterior a la hélice 12. Estas hélices residen en el bolsillo de unión de proteínas coactivadoras, y según los autores responsables de la síntesis y caracterización de GW233, este inhibidor puede en consecuencia alterar la unión de coactivadores ejerciendo así su efecto antagonista (Zuercher et al., 2010). Los

datos de los que disponemos nos llevan, por tanto, a hipotetizar sobre el posible efecto de LXR α en el reclutamiento ligando independiente de coactivadores en el locus de CD209a de manera similar a la regulación de aP2 por parte de PPAR γ .

Por otro lado, mediante una aproximación con inhibidores de rutas de señalización intracelular, hemos descubierto que la principal ruta involucrada en la inducción de la expresión de CD209a por GM-CSF es Jak2/STAT5. Tras la estimulación, la fosforilación de STAT5 en una tirosina de su extremo carboxilo terminal permite su dimerización y translocación al núcleo; donde los dímeros de STAT5 se unen a sitios específicos del ADN y promueven la transcripción (Ivashkiv and Hu, 2004). Es interesante destacar que la activación transcripcional por parte de STAT5 requiere del reclutamiento de coactivadores como CBP/p300 (Pfitzner et al., 1998) y SRC-1 (Litterst et al., 2003), así como de acetilación de histonas (Rascole and Lees, 2003), de manera similar a la regulación independiente de ligando de PPAR γ sobre aP2.

Se ha publicado que el lipopolisacárido (LPS) aumenta el número de células Mo-DCs CD209a⁺ en las zonas T de ganglios linfáticos de la piel *in vivo* (Cheong et al., 2010). Esta acción está mediada por el reclutamiento de monocitos, posiblemente a través de las moléculas CD14 y CCR7 (Cheong et al., 2010). Nuestros estudios *in vitro*, sin embargo, muestran una inhibición de la expresión basal e inducida de CD209a en células BMDM tratadas con LPS (Ver Figura 4.21D). Además, el reclutamiento de la ARN polimerasa II también disminuye tras una exposición de 60 minutos de LPS en células BMDCs (Ver Figura 4.27B), en concordancia con nuestros resultados transcripcionales. Otros laboratorios también han observado una disminución de la expresión de DC-SIGN/CD209a en respuesta a tratamientos *in vitro* con LPS en células murinas y humanas (Caminschi et al., 2001; Geijtenbeek et al., 2000b). Esta aparente discrepancia entre los resultados *in vivo* e *in vitro* son difíciles de explicar, pero podrían apuntar a una acción sinérgica *in vivo* del LPS con otras moléculas que induzca el reclutamiento de células MO-DCs CD209a⁺. En este sentido, se ha descrito que la diferenciación de células Mo-DCs CD209a⁺ requiere de la interacción con células T activadas a través de la molécula de superficie CD40L (Davidson et al., 2013). Los resultados *in vitro*, en consecuencia, quizá podrían explicarse como resultado de un bucle de retroalimentación negativa en ausencia de estimulación con CD40L.

Por otro lado, el receptor CD209a se ha involucrado en la captura de azúcares, principalmente manosa y fucosa (Powlesland et al., 2006). Sin embargo, los resultados presentados en esta Tesis no permiten identificar diferencias significativas en la captación de estos azúcares en células BMDM de WT y LXR α ^{-/-} (Ver Figura 4.22). La explicación probablemente resida en la redundancia funcional, es decir, a la presencia de otros receptores que lleven a cabo una función similar. Un ejemplo es el receptor de manosa MNR (*Mannose Receptor*) (Taylor et al., 2005), cuya expresión, según nuestros datos de *microarray*, es similar en células de ambos genotipos.

Datos procedentes de experimentos de ChIP-Seq muestran la existencia de otros TFs adicionales a LXR α presentes en regiones reguladoras del locus de CD209a. En

concreto, se detecta la presencia de STAT5, PU.1 y C/EBP, TFs cuyo silenciamiento mediante siRNA dificulta la expresión de CD209a (Ver Figura 4.27B). La interacción de varios TFs en la regulación de un único gen es un fenómeno ampliamente conocido (McNagny et al., 1998; Ness et al., 1993; Oelgeschläger et al., 1996). Experimentos recientes parecen confirmar que los TFs pueden unirse tanto a motivos de unión canónicos como a motivos no canónicos, también conocidos como alternativos o degenerados y, de esta manera, facilitar la interacción de varios TFs. Por ejemplo, el grupo de Mansdrup ha encontrado que en las huellas de unión de varios TFs, tales como C/EBPs, KLFs y AP1s, ocurre la unión de otros TFs a motivos alternativos (Siersbæk et al., 2014). Este fenómeno parece sugerir que unos TFs facilitan el reclutamiento de otros TFs, bien mediante unión indirecta al ADN (fenómeno conocido como *tethering*) o a través de uniones directas a sitios de unión que no se corresponden con sus motivos canónicos, proceso que ocurriría mediante una unión asistida dinámicamente (Voss et al., 2011). La unión de los TFs facilita, por tanto, la unión colaborativa de otros TFs y constituye la base de la diferenciación celular. Como señalamos en la introducción, varios estudios han destacado la importancia de los TFs determinantes de linaje (LDTFs) en la selección de *enhancers* específicos de tipo celular (Garber et al., 2012; Trompouki et al., 2011). Según el modelo actual, la unión de los LDTFs permite modificaciones históricas que facilitan la unión de TFs dependientes de señal, que finalmente regulan la expresión génica (Ghisletti et al., 2010; Heinz et al., 2010; Mullen et al., 2011). En este marco, los factores PU.1 y C/EBP actuarían como factores de transcripción determinantes del linaje mielóide (Friedman, 2007; Heinz et al., 2013, 2010; Schulz et al., 2012), mientras que debido a su naturaleza, STAT5 probablemente actúe como factor de transcripción dependiente de señal. El caso de LXR α en la regulación de CD209a sería particular, ya que se considera como factor de transcripción dependiente de señal (Heinz et al., 2010), y en el caso de la regulación de CD209a la señal es GM-CSF pero no la activación farmacológica.

La unión de los TFs ocurre mayoritariamente en regiones genómicas abiertas libres de histonas, que presentan una mayor accesibilidad a la cromatina e hipersensibilidad a la digestión con DNAsa I, enzima que cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster del ADN. Los sitios hipersensibles a DNAsa I se conocen como DHS (*DNaseI hypersensitive sites*) y constituyen las principales regiones reguladoras del genoma (Bernstein et al., 2012). Por ejemplo, en el genoma humano el proyecto ENCODE ha revelado que un 98,5 % de los sitios de unión de TF se encuentran en sitios DHS (Bernstein et al., 2012). Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que la región de regulación de CD209a presenta mayor accesibilidad a la cromatina, marcada por la hipersensibilidad a DNAsa I (*DNaseI hypersensitive sites*, DHS) y una mayor ocupación de ARN polimerasa II (Ver Figuras 4.25C y 4.26B).

En resumen, en esta Tesis hemos evaluado la importancia del receptor nuclear LXR α en las poblaciones de macrófagos de la zona marginal MZM y MMM. Hemos descubierto que estas poblaciones tienen su origen en la médula ósea, lo que concuerda con su fenotipo F4/80^{-low}, y que dependen de la expresión de LXR α para su desarrollo. El análisis transcripcional de células BMDM ha revelado una mayor respuesta proinflamatoria en células carentes de LXR α , así como la regulación de ciertos genes de

importancia inmunitaria como CD209a. Proponemos que LXR α regula la expresión del marcador CD209a de manera independiente de activación farmacológica a través de la colaboración con PU.1, C/EBP α y STAT5 en una región genómica DHS.

En conclusión, esta Tesis ahonda en la regulación del sistema inmunitario innato por parte de los receptores nucleares LXR, en particular de la isoforma LXR α , que es esencial para el desarrollo de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal y para la regulación mediada por GM-CSF del marcador CD209a.

6.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

I) El receptor nuclear LXR α es esencial en la diferenciación de las poblaciones de macrófagos de la zona marginal del bazo, pero no del resto de poblaciones esplénicas.

II) El trasplante con medula ósea WT o médula ósea LXR $\alpha\beta^{-/-}$ a la que se ha introducido el gen LXR α mediante terapia génica, permite recuperar las poblaciones de macrófagos de la zona marginal en ratones LXR $\alpha\beta^{-/-}$.

III) Las poblaciones de macrófagos de la zona marginal del bazo tienen un origen hematopoyético y no embrionario.

IV) En células BMDM la citoquina M-CSF activa la transcripción de genes relacionados mayoritariamente con la división celular, mientras que la citoquina GM-CSF activa genes relacionados mayoritariamente con la respuesta inflamatoria. El número de genes activados por GM-CSF es, aproximadamente, el doble en células carentes de LXR α .

V) El gen humano DC-SIGN se induce principalmente en respuesta a IL-4, mientras que su homólogo murino CD209a se induce principalmente en respuesta a GM-CSF.

VI) LXR α es esencial para la inducción de la expresión de CD209a por GM-CSF. Esta regulación es independiente de ligando y usa la vía de Jak2/STAT5 como principal ruta de señalización.

VII) El promotor de CD209a presenta una región genómica hipersensible a tratamiento con DNAsa (DHS) a la que se une LXR, STAT5, ARN polimerasa II y otros factores de transcripción como PU.1 y C/EBP. El silenciamiento de LXR α , PU.1, C/EBP α y STAT5 interfiere en la inducción de la expresión de CD209a por GM-CSF.

REFERENCIAS

- A-Gonzalez, N., Guillen, J.A., Gallardo, G., Diaz, M., de la Rosa, J. V, Hernandez, I.H., Casanova-Acebes, M., Lopez, F., Tabraue, C., Beceiro, S., Hong, C., Lara, P.C., Andujar, M., Arai, S., Miyazaki, T., Li, S., Corbi, A.L., Tontonoz, P., Hidalgo, A., Castrillo, A., 2013. The nuclear receptor LXR α controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 831–9.
- Adhikary, T., Kaddatz, K., Finkernagel, F., Schönbauer, A., Meissner, W., Scharfe, M., Jarek, M., Blöcker, H., Müller-Brüsselbach, S., Müller, R., 2011. Genomewide analyses define different modes of transcriptional regulation by peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ (PPAR β/δ). *PLoS One* 6, e16344.
- Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H.E., Seiler, P., 2003. Macrophages of the Splenic Marginal Zone Are Essential for Trapping of Blood-Borne Particulate Antigen but Dispensable for Induction of Specific T Cell Responses. *J. Immunol.* 171, 1148–1155.
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A., 2008. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222, 155–161.
- Alonso-Gonzalez, N., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Diaz, M., Gallardo, G., de Galarreta, C.R., Salazar, J., Lopez, F., Edwards, P., Parks, J., Andujar, M., Tontonoz, P., Castrillo, A., 2009. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31, 245–258.
- Alonso-Gonzalez, N., Castrillo, A., 2011. Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. *Biochim Biophys Acta* 1812, 982–994.
- Anthonisen, E.H., Berven, L., Holm, S., Nygård, M., Nebb, H.I., Grønning-Wang, L.M., 2010. Nuclear receptor liver X receptor is O-GlcNAc-modified in response to glucose. *J. Biol. Chem.* 285, 1607–15.

- Anthony, R.M., Nimmerjahn, F., Ashline, D.J., Reinhold, V.N., Paulson, J.C., Ravetch, J. V, 2008a. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* (80-.). 320, 373–376.
- Anthony, R.M., Wermeling, F., Karlsson, M.C., Ravetch, J. V, 2008b. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19571–19578.
- Arakawa, R., Tsujita, M., Iwamoto, N., Ito-Ohsumi, C., Lu, R., Wu, C.A., Shimizu, K., Aotsuka, T., Kanazawa, H., Abe-Dohmae, S., Yokoyama, S., 2009. Pharmacological inhibition of ABCA1 degradation increases HDL biogenesis and exhibits antiatherogenesis. *J Lipid Res* 50, 2299–2305.
- Arbibe, L., 2008. Immune subversion by chromatin manipulation: a “new face” of host-bacterial pathogen interaction. *Cell. Microbiol.* 10, 1582–90.
- Arnon, T.I., Horton, R.M., Grigorova, I.L., Cyster, J.G., 2013. Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature* 493, 684–8.
- Arnon, T.I., Xu, Y., Lo, C., Pham, T., An, J., Coughlin, S., Dorn, G.W., Cyster, J.G., 2011. GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science* 333, 1898–903.
- Ato, M., Nakano, H., Kakiuchi, T., Kaye, P.M., 2004. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. *J Immunol* 173, 4815–4820.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., Geissmann, F., 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666–70.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F., 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669–692.
- Backer, R., Schwandt, T., Greuter, M., Oosting, M., Jüngerkes, F., Tüting, T., Boon, L., O’Toole, T., Kraal, G., Limmer, A., den Haan, J.M.M., 2010. Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 216–21.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S.C., Alessi, D.R., Cohen, P., 2007. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315.
- Bardoel, B.W., Strijp, J.A.G., 2011. Molecular battle between host and bacterium: recognition in innate immunity. *J. Mol. Recognit.* 24, 1077–86.

- Bashirova, A.A., Geijtenbeek, T.B., van Duijnhoven, G.C., van Vliet, S.J., Eilering, J.B., Martin, M.P., Wu, L., Martin, T.D., Viebig, N., Knolle, P.A., KewalRamani, V.N., van Kooyk, Y., Carrington, M., 2001. A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 193, 671–8.
- 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., Tontonoz, P., 2008. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell* 134, 97–111.
- Bergman, M.P., Engering, A., Smits, H.H., van Vliet, S.J., van Bodegraven, A.A., Wirth, H.-P., Kapsenberg, M.L., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., van Kooyk, Y., Appelmek, B.J., 2004. Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *J. Exp. Med.* 200, 979–90.
- Bernstein, B.E., Birney, E., Dunham, I., Green, E.D., Gunter, C., Snyder, M., 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57–74.
- Bevan, C.L., Hoare, S., Claessens, F., Heery, D.M., Parker, M.G., 1999. The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8383–92.
- Blumberg, B., Evans, R.M., 1998. Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev.* 12, 3149–55.
- Boehm, M.F., Zhang, L., Zhi, L., McClurg, M.R., Berger, E., Wagoner, M., Mais, D.E., Suto, C.M., Davies, J.A., Heyman, R.A., 1995. Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J. Med. Chem.* 38, 3146–55.
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., Liu, K., Jakubzick, C., Ingersoll, M.A., Leboeuf, M., Stanley, E.R., Nussenzweig, M., Lira, S.A., Randolph, G.J., Merad, M., 2009. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513–25.
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S33–40.
- Brochériou, I., Maouche, S., Durand, H., Braunersreuther, V., Le Naour, G., Gratchev, A., Koskas, F., Mach, F., Kzhyshkowska, J., Ninio, E., 2011. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 214, 316–24.

- Bronte, V., Apolloni, E., Cabrelle, A., Ronca, R., Serafini, P., Zamboni, P., Restifo, N.P., Zanovello, P., 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96, 3838–46.
- Bronte, V., Chappell, D.B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P., Restifo, N.P., 1999. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J. Immunol.* 162, 5728–37.
- Bronte, V., Pittet, M.J., 2013. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity* 39, 806–18.
- Broughton, S.E., Dhagat, U., Hercus, T.R., Nero, T.L., Grimbaldston, M. a, Bonder, C.S., Lopez, A.F., Parker, M.W., 2012. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunol. Rev.* 250, 277–302.
- Caminschi, I., Lucas, K.M., O’Keeffe, M. a, Hochrein, H., Laâbi, Y., Brodnicki, T.C., Lew, a M., Shortman, K., Wright, M.D., 2001. Molecular cloning of a C-type lectin superfamily protein differentially expressed by CD8alpha(-) splenic dendritic cells. *Mol. Immunol.* 38, 365–73.
- Carascossa, S., Dudek, P., Cenni, B., Briand, P.-A., Picard, D., 2010. CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP. *Genes Dev.* 24, 708–19.
- Carotta, S., Wu, L., Nutt, S.L., 2010. Surprising new roles for PU.1 in the adaptive immune response. *Immunol Rev* 238, 63–75.
- Carroll, M.C., Isenman, D.E., 2012. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 37, 199–207.
- Castrillo, A., Joseph, S.B., Marathe, C., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., 2003. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem* 278, 10443–10449.
- Cecchini, M.G., Dominguez, M.G., Mocci, S., Wetterwald, A., Felix, R., Fleisch, H., Chisholm, O., Hofstetter, W., Pollard, J.W., Stanley, E.R., 1994. Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* 120, 1357–72.
- Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., Evans, R.M., Tontonoz, P., 2001a. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7, 161–171.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., 2001b. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866–70.

- Chen, M., Bradley, M.N., Beaven, S.W., Tontonoz, P., 2006. Phosphorylation of the liver X receptors. *FEBS Lett.* 580, 4835–41.
- Chen, Q., He, F., Kwang, J., Chan, J.K.Y., Chen, J., 2012. GM-CSF and IL-4 stimulate antibody responses in humanized mice by promoting T, B, and dendritic cell maturation. *J. Immunol.* 189, 5223–9.
- Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., Koh, H., Rodriguez, A., Idoyaga, J., Pack, M., Velinzon, K., Park, C.G., Steinman, R.M., 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143, 416–429.
- Chitu, V., Stanley, E.R., 2006. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 39–48.
- Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M.J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R.L., Cyster, J.G., 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nat. Immunol.* 5, 713–20.
- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss Jr., F.W., Cyster, J.G., 2008. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9, 54–62.
- Clarke, D., Vegiopoulos, A., Crawford, A., Mucenski, M., Bonifer, C., Frampton, J., 2000. In vitro differentiation of c-myb(-/-) ES cells reveals that the colony forming capacity of unilineage macrophage precursors and myeloid progenitor commitment are c-Myb independent. *Oncogene* 19, 3343–51.
- Collins, J.L., Fivush, A.M., Watson, M.A., Galardi, C.M., Lewis, M.C., Moore, L.B., Parks, D.J., Wilson, J.G., Tippin, T.K., Binz, J.G., Plunket, K.D., Morgan, D.G., Beudet, E.J., Whitney, K.D., Kliewer, S.A., Willson, T.M., 2002. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem* 45, 1963–1966.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., Tall, a R., 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 28240–5.
- Crocker, P.R., Gordon, S., 1989. Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 169, 1333–1346.
- Curtis, S.W., Washburn, T., Sewall, C., DiAugustine, R., Lindzey, J., Couse, J.F., Korach, K.S., 1996. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12626–30.

- Dahl, R., Walsh, J.C., Lancki, D., Laslo, P., Iyer, S.R., Singh, H., Simon, M.C., 2003. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBP α ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* 4, 1029–36.
- Dai, X., Ryan, G., Hapel, A., Dominguez, M., Russell, R., Kapp, S., Sylvestre, V., Stanley, E., 2002. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99, 111–120.
- Dai, X.-M., Zong, X.-H., Sylvestre, V., Stanley, E.R., 2004. Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient *Csf1op/Csf1op* mice by transgenic expression of cell surface CSF-1. *Blood* 103, 1114–23.
- Dai, Y., Guo, L., Li, M., Chen, Y.B., 2012. Microarray R US: a user-friendly graphical interface to bioconductor tools that enables accurate microarray data analysis and expedites comprehensive functional analysis of microarray results. *BMC Res Notes* 5, 282.
- Dakic, A., Metcalf, D., Di Rago, L., Mifsud, S., Wu, L., Nutt, S.L., 2005. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J. Exp. Med.* 201, 1487–502.
- Davidson, M.G., Alonso, M.N., Kenkel, J.A., Suhoski, M.M., González, J.C., Yuan, R., Engleman, E.G., 2013. In vivo T cell activation induces the formation of CD209(+) PDL-2(+) dendritic cells. *PLoS One* 8, e76258.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., Taylor, P.R., 2013. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–95.
- De Boer, J., Williams, A., Skavdis, G., Harker, N., Coles, M., Tolaini, M., Norton, T., Williams, K., Roderick, K., Potocnik, A.J., Kioussis, D., 2003. Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol* 33, 314–325.
- DeKoter, R.P., Singh, H., 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439–41.
- Den Haan, J.M.M., Kraal, G., 2012. Innate immune functions of macrophage subpopulations in the spleen. *J. Innate Immun.* 4, 437–45.
- Denner, L.A., Weigel, N.L., Maxwell, B.L., Schrader, W.T., O'Malley, B.W., 1990. Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250, 1740–3.
- Denning, T.L., Wang, Y., Patel, S.R., Williams, I.R., Pulendran, B., 2007. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* 8, 1086–94.

- Dominguez-Soto, A., Puig-Kroger, A., Vega, M.A., Corbi, A.L., 2005. PU.1 regulates the tissue-specific expression of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3-grabbing nonintegrin. *J Biol Chem* 280, 33123–33131.
- Dranoff, G., Crawford, A.D., Sadelain, M., Ream, B., Rashid, A., Bronson, R.T., Dickersin, G.R., Bachurski, C.J., Mark, E.L., Whitsett, J.A., 1994. Involvement of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in pulmonary homeostasis. *Science* 264, 713–6.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., Naldini, L., 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72, 8463–8471.
- Dunay, I.R., Damatta, R.A., Fux, B., Presti, R., Greco, S., Colonna, M., Sibley, L.D., 2008. Gr1(+) inflammatory monocytes are required for mucosal resistance to the pathogen *Toxoplasma gondii*. *Immunity* 29, 306–17.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., Yakhini, Z., 2009. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10, 48.
- Endo-Umeda, K., Uno, S., Fujimori, K., Naito, Y., Saito, K., Yamagishi, K., Jeong, Y., Miyachi, H., Tokiwa, H., Yamada, S., Makishima, M., 2012. Differential expression and function of alternative splicing variants of human liver X receptor α . *Mol. Pharmacol.* 81, 800–10.
- Engering, A., Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguet, V., van Kooyk, Y., 2002. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* 168, 2118–26.
- Engering, A., van Vliet, S.J., Hebeda, K., Jackson, D.G., Prevo, R., Singh, S.K., Geijtenbeek, T.B.H., van Krieken, H., van Kooyk, Y., 2004. Dynamic populations of dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive immature dendritic cells and liver/lymph node-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-positive endothelial cells in the outer zones of the paracortex of human lymph nodes. *Am. J. Pathol.* 164, 1587–95.
- Erbay, E., Babaev, V.R., Mayers, J.R., Makowski, L., Charles, K.N., Snitow, M.E., Fazio, S., Wiest, M.M., Watkins, S.M., Linton, M.F., Hotamisligil, G.S., 2009. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat. Med.* 15, 1383–91.
- Fagarasan, S., 2000. T-Independent Immune Response: New Aspects of B Cell Biology. *Science* (80-.). 290, 89–92.
- Fancke, B., Suter, M., Hochrein, H., O’Keeffe, M., 2008. M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* 111, 150–9.

- Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., Sweeney, M., Rong, J.X., Kuriakose, G., Fisher, E.A., Marks, A.R., Ron, D., Tabas, I., 2003. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5, 781–92.
- Feng, R., Desbordes, S.C., Xie, H., Tillo, E.S., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., 2008. PU.1 and C/EBPalpha/beta convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6057–62.
- Figdor, C.G., van Kooyk, Y., Adema, G.J., 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 77–84.
- Fleetwood, A.J., Lawrence, T., Hamilton, J.A., Cook, A.D., 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 178, 5245–5252.
- Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., Geissmann, F., 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83–7.
- Forman, B.M., Ruan, B., Chen, J., Schroepfer, G.J., Evans, R.M., 1997. The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10588–93.
- Fowler, A.J., Sheu, M.Y., Schmuth, M., Kao, J., Fluhr, J.W., Rhein, L., Collins, J.L., Willson, T.M., Mangelsdorf, D.J., Elias, P.M., Feingold, K.R., 2003. Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J Invest Dermatol* 120, 246–255.
- Friedman, A.D., 2007. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 26, 6816–28.
- Fuertes Marraco, S.A., Grosjean, F., Duval, A., Rosa, M., Lavanchy, C., Ashok, D., Haller, S., Otten, L.A., Steiner, Q.-G., Descombes, P., Lubert, C.A., Meissner, F., Mann, M., Szeles, L., Reith, W., Acha-Orbea, H., 2012. Novel murine dendritic cell lines: a powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Front. Immunol.* 3, 331.
- Fujita, a, Mitsuhashi, T., 1999. Differential regulation of ligand-dependent and ligand-independent functions of the mouse retinoid X receptor beta by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 625–30.
- Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Biccato, S., Bronte, V., 2006.

Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8⁺ T cells. *J. Clin. Invest.* 116, 2777–90.

Garber, M., Yosef, N., Goren, A., Raychowdhury, R., Thielke, A., Guttman, M., Robinson, J., Minie, B., Chevrier, N., Itzhaki, Z., Blecher-Gonen, R., Bornstein, C., Amann-Zalcenstein, D., Weiner, A., Friedrich, D., Meldrim, J., Ram, O., Cheng, C., Gnirke, A., Fisher, S., Friedman, N., Wong, B., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Hacohen, N., Regev, A., Amit, I., 2012. A high-throughput chromatin immunoprecipitation approach reveals principles of dynamic gene regulation in mammals. *Mol. Cell* 47, 810–22.

Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., Mazloom, A.R., Ma'ayan, A., Chua, W.-J., Hansen, T.H., Turley, S.J., Merad, M., Randolph, G.J., 2012. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 13, 1118–28.

Geijtenbeek, T.B., Groot, P.C., Nolte, M.A., van Vliet, S.J., Gangaram-Panday, S.T., van Duijnhoven, G.C., Kraal, G., van Oosterhout, A.J., van Kooyk, Y., 2002. Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* 100, 2908–2916.

Geijtenbeek, T.B., Krooshoop, D.J., Bleijs, D.A., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., 2000a. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 1, 353–7.

Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., Figdor, C.G., 2000b. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575–85.

Geissmann, F., Jung, S., Littman, D.R., 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K., 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327, 656–61.

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y.H., Zhang, J., 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5, R80.

George, J.N., el-Harake, M.A., Raskob, G.E., 1994. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 331, 1207–1211.

- Gharbi, S.I., Zvelebil, M.J., Shuttleworth, S.J., Hancox, T., Saghir, N., Timms, J.F., Waterfield, M.D., 2007. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem. J.* 404, 15–21.
- Ghisletti, S., Barozzi, I., Mietton, F., Polletti, S., De Santa, F., Venturini, E., Gregory, L., Lonie, L., Chew, A., Wei, C.-L., Ragoussis, J., Natoli, G., 2010. Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. *Immunity* 32, 317–28.
- Ghisletti, S., Huang, W., Jepsen, K., Benner, C., Hardiman, G., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 2009. Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev* 23, 681–693.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., 2007. Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* 25, 57–70.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M., 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–5.
- Ginhoux, F., Jung, S., 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 392–404.
- Glass, C.K., Ogawa, S., 2006. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 44–55.
- Glass, C.K., Saijo, K., 2010. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 365–376.
- Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., 2013. Myb-Independent Macrophages: A Family of Cells That Develops with Their Tissue of Residence and Is Involved in Its Homeostasis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*
- Gordon, S., 2002. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111, 927–30.
- Greter, M., Helft, J., Chow, A., Hashimoto, D., Mortha, A., Agudo-Cantero, J., Bogunovic, M., Gautier, E.L., Miller, J., Leboeuf, M., Lu, G., Aloman, C., Brown, B.D., Pollard, J.W., Xiong, H., Randolph, G.J., Chipuk, J.E., Frenette, P.S., Merad, M., 2012a. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 36, 1031–46.

- Greter, M., Lelios, I., Pelczar, P., Hoeffel, G., Price, J., Leboeuf, M., Kündig, T.M., Frei, K., Ginhoux, F., Merad, M., Becher, B., 2012b. Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity* 37, 1050–60.
- Groom, A.C., Schmidt, E.E., MacDonald, I.C., 1991. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scanning Microsc* 5, 154–159.
- Guan, H.-P., Ishizuka, T., Chui, P.C., Lehrke, M., Lazar, M.A., 2005. Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes. *Genes Dev.* 19, 453–61.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., Lambrecht, B.N., 2013. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* 210, 1977–92.
- Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D. a, Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I., Drickamer, K., 2004. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 591–8.
- Hamilton, J. a, Achuthan, A., 2013. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends Immunol.* 34, 81–9.
- Hansen, G., Hercus, T.R., McClure, B.J., Stomski, F.C., Dottore, M., Powell, J., Ramshaw, H., Woodcock, J.M., Xu, Y., Guthridge, M., McKinsty, W.J., Lopez, A.F., Parker, M.W., 2008. The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell* 134, 496–507.
- Harmon, G.S., Lam, M.T., Glass, C.K., 2011. PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. *Chem. Rev.* 111, 6321–40.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S.W., Forsberg, E.C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E.R., Ginhoux, F., Frenette, P.S., Merad, M., 2013. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38, 792–804.
- Hawiger, J., 2001. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol. Res.* 23, 99–109.
- Hazeki, K., Kinoshita, S., Matsumura, T., Nigorikawa, K., Kubo, H., 2006. Opposite Effects of Wortmannin and 2- (4-Morpholinyl) -8- phenyl-1 (4 H) -benzopyran-4-one Hydrochloride on Toll-Like Receptor-Mediated Nitric Oxide Production :

Negative Regulation of Nuclear Factor- κ B by Phosphoinositide 3-Kinase 69, 1717–1724.

He, W., Qiang, M., Ma, W., Valente, A.J., Quinones, M.P., Wang, W., Reddick, R.L., Xiao, Q., Ahuja, S.S., Clark, R.A., Freeman, G.L., Li, S., 2006. Development of a synthetic promoter for macrophage gene therapy. *Hum Gene Ther* 17, 949–959.

Heath, V., Suh, H.C., Holman, M., Renn, K., Gooya, J.M., Parkin, S., Klarmann, K.D., Ortiz, M., Johnson, P., Keller, J., 2004. C/EBP α deficiency results in hyperproliferation of hematopoietic progenitor cells and disrupts macrophage development in vitro and in vivo. *Blood* 104, 1639–47.

Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., Glass, C.K., 2010. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol Cell* 38, 576–589.

Heinz, S., Romanoski, C.E., Benner, C., Allison, K. a, Kaikkonen, M.U., Orozco, L.D., Glass, C.K., 2013. Effect of natural genetic variation on enhancer selection and function. *Nature*.

Hercus, T.R., Thomas, D., Guthridge, M.A., Ekert, P.G., King-Scott, J., Parker, M.W., Lopez, A.F., 2009. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood* 114, 1289–1298.

Higgins, D.M., Sanchez-Campillo, J., Rosas-Taraco, A.G., Higgins, J.R., Lee, E.J., Orme, I.M., Gonzalez-Juarrero, M., 2008. Relative levels of M-CSF and GM-CSF influence the specific generation of macrophage populations during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 180, 4892–900.

Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., Choy, S.H.Y., Grisotto, M., Renia, L., Conway, S.J., Stanley, E.R., Chan, J.K.Y., Ng, L.G., Samokhvalov, I.M., Merad, M., Ginhoux, F., 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209, 1167–81.

Hong, S., Skaist, A.M., Wheelan, S.J., Friedman, A.D., 2011. AP-1 protein induction during monopoiesis favors C/EBP: AP-1 heterodimers over C/EBP homodimerization and stimulates FosB transcription. *J. Leukoc. Biol.* 90, 643–51.

Hozoji, M., Munehira, Y., Ikeda, Y., Makishima, M., Matsuo, M., Kioka, N., Ueda, K., 2008. Direct interaction of nuclear liver X receptor-beta with ABCA1 modulates cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 283, 30057–63.

Hozoji-Inada, M., Munehira, Y., Nagao, K., Kioka, N., Ueda, K., 2011. Liver X receptor beta (LXRbeta) interacts directly with ATP-binding cassette A1 (ABCA1) to

- promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* 286, 20117–24.
- Hu, J.K., Kagari, T., Clingan, J.M., Matloubian, M., 2011. Expression of chemokine receptor CXCR3 on T cells affects the balance between effector and memory CD8 T-cell generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E118–27.
- Idoyaga, J., Fiorese, C., Zbytniuk, L., Lubkin, A., Miller, J., Malissen, B., Mucida, D., Merad, M., Steinman, R.M., 2013. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J. Clin. Invest.* 123, 844–54.
- Ignatova, I.D., Angdisen, J., Moran, E., Schulman, I.G., 2013. Differential regulation of gene expression by LXRs in response to macrophage cholesterol loading. *Mol. Endocrinol.* 27, 1036–47.
- Inaba, K., Swiggard, W.J., Steinman, R.M., Romani, N., Schuler, G., Brinster, C., 2009. Isolation of dendritic cells. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 3, Unit 3.7.
- Ivashkiv, L.B., Hu, X., 2004. Signaling by STATs. *Arthritis Res. Ther.* 6, 159–68.
- Iwasaki, H., Akashi, K., 2007. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* 26, 6687–96.
- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., Mangelsdorf, D.J., 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728–31.
- Janssen, W.J., Henson, P.M., 2012. Cellular regulation of the inflammatory response. *Toxicol. Pathol.* 40, 166–73.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., van Rooijen, N., MacDonald, A.S., Allen, J.E., 2011. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332, 1284–8.
- Jiang, H., Chess, L., 2009. How the immune system achieves self-nonsel self discrimination during adaptive immunity. *Adv. Immunol.* 102, 95–133.
- Jiang, H.R., Hwenda, L., Makinen, K., Oetke, C., Crocker, P.R., Forrester, J. V., 2006. Sialoadhesin promotes the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis. *J Immunol* 177, 2258–2264.
- Jojic, V., Shay, T., Sylvia, K., Zuk, O., Sun, X., Kang, J., Regev, A., Koller, D., Best, A.J., Knell, J., Goldrath, A., Cohen, N., Brennan, P., Brenner, M., Kim, F., Rao, T.N., Wagers, A., Heng, T., Ericson, J., Rothamel, K., Ortiz-Lopez, A., Mathis, D., Benoist, C., Bezman, N.A., Sun, J.C., Min-Oo, G., Kim, C.C., Lanier, L.L., Miller, J., Brown, B., Merad, M., Gautier, E.L., Jakubzick, C., Randolph, G.J., Monach, P., Blair, D.A., Dustin, M.L., Shinton, S.A., Hardy, R.R., Laidlaw, D.,

- Collins, J., Gazit, R., Rossi, D.J., Malhotra, N., Kreslavsky, T., Fletcher, A., Elpek, K., Bellemare-Pelletier, A., Malhotra, D., Turley, S., 2013. Identification of transcriptional regulators in the mouse immune system. *Nat. Immunol.* 14, 633–43.
- Joseph, S.B., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bruhn, K.W., Mak, P.A., Pei, L., Hogenesch, J., O'Connell R, M., Cheng, G., Saez, E., Miller, J.F., Tontonoz, P., 2004. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* 119, 299–309.
- Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., 2003. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 9, 213–219.
- Joseph, S.B., Laffitte, B.A., Patel, P.H., Watson, M.A., Matsukuma, K.E., Walczak, R., Collins, J.L., Osborne, T.F., Tontonoz, P., 2002. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* 277, 11019–25.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E.G., Littman, D.R., Lang, R.A., 2002. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211–20.
- Kang, Y.S., Kim, J.Y., Bruening, S.A., Pack, M., Charalambous, A., Pritsker, A., Moran, T.M., Loeffler, J.M., Steinman, R.M., Park, C.G., 2004. The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 215–220.
- Kang, Y.S., Yamazaki, S., Iyoda, T., Pack, M., Bruening, S.A., Kim, J.Y., Takahara, K., Inaba, K., Steinman, R.M., Park, C.G., 2003. SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *Int Immunol* 15, 177–186.
- Karlsson, M.C., Guinamard, R., Bolland, S., Sankala, M., Steinman, R.M., Ravetch, J. V., 2003. Macrophages control the retention and trafficking of B lymphocytes in the splenic marginal zone. *J Exp Med* 198, 333–340.
- Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., Edwards, P.A., 2001. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J Biol Chem* 276, 39438–39447.
- Kim, T.-H., Kim, M.-Y., Jo, S.-H., Park, J.-M., Ahn, Y.-H., 2013. Modulation of the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by protein-protein interactions and post-translational modifications. *Yonsei Med. J.* 54, 545–59.

- King, I.L., Kroenke, M.A., Segal, B.M., 2010. GM-CSF-dependent, CD103⁺ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J. Exp. Med.* 207, 953–61.
- Klotz, D.M., Hewitt, S.C., Ciana, P., Raviscioni, M., Lindzey, J.K., Foley, J., Maggi, A., DiAugustine, R.P., Korach, K.S., 2002. Requirement of estrogen receptor- α in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J. Biol. Chem.* 277, 8531–7.
- Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., Murphy, K.M., 2009. Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* 457, 318–321.
- Kojouri, K., Vesely, S.K., Terrell, D.R., George, J.N., 2004. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood* 104, 2623–34.
- Koppel, E.A., Wieland, C.W., van den Berg, V.C., Litjens, M., Florquin, S., van Kooyk, Y., van der Poll, T., Geijtenbeek, T.B., 2005. Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* 35, 2962–2969.
- Kraal, G., 1992. Cells in the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol* 132, 31–74.
- Kraal, G., Janse, M., 1986. Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. *Immunology* 58, 665–669.
- Kraal, G., Mebius, R., 2006. New insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int. Rev. Cytol.* 250, 175–215.
- Krutzik, S.R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M.T., Liu, P.T., Sharfstein, S.E., Graeber, T.G., Sieling, P.A., Liu, Y.-J., Rea, T.H., Bloom, B.R., Modlin, R.L., 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 11, 653–60.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., Rajewsky, K., 1995. Inducible gene targeting in mice. *Science* 269, 1427–9.
- Kummalu, T., Friedman, A.D., 2003. Cross-talk between regulators of myeloid development: C/EBP α binds and activates the promoter of the PU.1 gene. *J. Leukoc. Biol.* 74, 464–70.
- Kurotaki, D., Osato, N., Nishiyama, A., Yamamoto, M., Ban, T., Sato, H., Nakabayashi, J., Umehara, M., Miyake, N., Matsumoto, N., Nakazawa, M., Ozato, K., Tamura, T., 2013. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* 121, 1839–49.

- Lacey, D.C., Achuthan, A., Fleetwood, A.J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G.M., Chang, M.W., Beckman, S.K., Cook, A.D., Hamilton, J.A., 2012. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol* 188, 5752–5765.
- Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Chen, M., Castrillo, A., Repa, J., Wilpitz, D., Mangelsdorf, D., Tontonoz, P., 2003. The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol Cell Biol* 23, 2182–2191.
- Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., 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.
- Laiosa, C. V, Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., Graf, T., 2006. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 25, 731–44.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Lee, E.J., Manning, R.W., Yu, S.H., Mulder, K.L., Westphal, H., 1992. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6232–6.
- Lanoue, A., Clatworthy, M.R., Smith, P., Green, S., Townsend, M.J., Jolin, H.E., Smith, K.G., Fallon, P.G., McKenzie, A.N., 2004. SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice. *J Exp Med* 200, 1383–1393.
- Lari, R., Fleetwood, A.J., Kitchener, P.D., Cook, A.D., Pavasovic, D., Hertzog, P.J., Hamilton, J. a, 2007. Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis--complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta. *Bone* 40, 323–36.
- Laslo, P., Spooner, C.J., Warmflash, A., Lancki, D.W., Lee, H.-J., Sciammas, R., Gantner, B.N., Dinner, A.R., Singh, H., 2006. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 126, 755–66.
- Lee, J.H., Park, S.M., Kim, O.S., Lee, C.S., Woo, J.H., Park, S.J., Joe, E., Jou, I., 2009. Differential SUMOylation of LXRalpha and LXRbeta mediates transrepression of STAT1 inflammatory signaling in IFN-gamma-stimulated brain astrocytes. *Mol. Cell* 35, 806–17.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., Willson, T.M., 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 3137–40.
- Leytin, V., Mykhaylov, S., Starkey, A.F., Allen, D.J., Lau, H., Ni, H., Semple, J.W., Lazarus, A.H., Freedman, J., 2006. Intravenous immunoglobulin inhibits anti-

- glycoprotein IIb-induced platelet apoptosis in a murine model of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 133, 78–82.
- Li, G., Biju, K.C., Xu, X., Zhou, Q., Chen, C., Valente, A.J., He, W., Reddick, R.L., Freeman, G.L., Ahuja, S.S., Clark, R.A., Li, S., 2011. Macrophage LXRA gene therapy ameliorates atherosclerosis as well as hypertriglyceridemia in LDLR(-/-) mice. *Gene Ther.*
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., Guarente, L., 2007. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* 28, 91–106.
- Lindquist, R.L., Shakhar, G., Dudziak, D., Wardemann, H., Eisenreich, T., Dustin, M.L., Nussenzweig, M.C., 2004. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat. Immunol.* 5, 1243–50.
- Litterst, C.M., Kliem, S., Marilley, D., Pfitzner, E., 2003. NCoA-1/SRC-1 is an essential coactivator of STAT5 that binds to the FDL motif in the alpha-helical region of the STAT5 transactivation domain. *J. Biol. Chem.* 278, 45340–51.
- Lund, E.G., Peterson, L.B., Adams, A.D., Lam, M.-H.N., Burton, C.A., Chin, J., Guo, Q., Huang, S., Latham, M., Lopez, J.C., Menke, J.G., Milot, D.P., Mitnaul, L.J., Rex-Rabe, S.E., Rosa, R.L., Tian, J.Y., Wright, S.D., Sparrow, C.P., 2006. Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem. Pharmacol.* 71, 453–63.
- Luo, Y., Tall, A.R., 2000. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J. Clin. Invest.* 105, 513–20.
- Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G. a W., Shea-Donohue, T., Atamas, S.P., 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives”. *J. Leukoc. Biol.* 92, 753–64.
- Mabbott, N.A., Kenneth Baillie, J., Hume, D.A., Freeman, T.C., 2010. Meta-analysis of lineage-specific gene expression signatures in mouse leukocyte populations. *Immunobiology* 215, 724–36.
- MacDonald, K.P.A., Rowe, V., Bofinger, H.M., Thomas, R., Sasmono, T., Hume, D.A., Hill, G.R., 2005. The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion. *J. Immunol.* 175, 1399–405.
- MacNeal, W.J., 1929. The circulation of blood through the spleen pulp. *Arch. Pathol. (Chic)* 7, 215–227.
- Mak, P.A., Laffitte, B.A., Desrumaux, C., Joseph, S.B., Curtiss, L.K., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., Edwards, P.A., 2002. Regulated expression of the

- apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* 277, 31900–8.
- Mangelsdorf, D.J., Evans, R.M., 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83, 841–850.
- Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–83.
- McGaha, T.L., Chen, Y., Ravishankar, B., van Rooijen, N., Karlsson, M.C.I., 2011. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood* 117, 5403–5412.
- McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., Maki, R.A., 1996. Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J.* 15, 5647–58.
- McNagny, K.M., Sieweke, M.H., Döderlein, G., Graf, T., Nerlov, C., 1998. Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. *EMBO J.* 17, 3669–80.
- Mebius, R.E., Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5, 606–616.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1998. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin. Immunol.* 10, 351–3.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298–300.
- Mercier, F.E., Ragu, C., Scadden, D.T., 2012. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 49–60.
- Miao, B., Zondlo, S., Gibbs, S., Cromley, D., Hosagrahara, V.P., Kirchgessner, T.G., Billheimer, J., Mukherjee, R., 2004. Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res* 45, 1410–1417.
- Michel, M., 2009. Immune thrombocytopenic purpura: epidemiology and implications for patients. *Eur J Haematol Suppl* 3–7.
- Miller, J.C., Brown, B.D., Shay, T., Gautier, E.L., Jojic, V., Cohain, A., Pandey, G., Leboeuf, M., Elpek, K.G., Helft, J., Hashimoto, D., Chow, A., Price, J., Greter, M., Bogunovic, M., Bellemare-Pelletier, A., Frenette, P.S., Randolph, G.J., Turley, S.J., Merad, M., 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13, 888–99.

- Miller, M., Shuman, J.D., Sebastian, T., Dauter, Z., Johnson, P.F., 2003. Structural basis for DNA recognition by the basic region leucine zipper transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J. Biol. Chem.* 278, 15178–84.
- Mitro, N., Mak, P.A., Vargas, L., Godio, C., Hampton, E., Molteni, V., Kreusch, A., Saez, E., 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445, 219–223.
- Miyake, Y., Asano, K., Kaise, H., Uemura, M., Nakayama, M., Tanaka, M., 2007. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J. Clin. Invest.* 117, 2268–78.
- Miyazaki, T., Hirokami, Y., Matsushashi, N., Takatsuka, H., Naito, M., 1999. Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, a novel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *J. Exp. Med.* 189, 413–22.
- Mizutani, H., Engelman, R.W., Kurata, Y., Ikehara, S., Good, R.A., 1993. Development and characterization of monoclonal antiplatelet autoantibodies from autoimmune thrombocytopenic purpura-prone (NZW x BXSB)F1 mice. *Blood* 82, 837–844.
- Morita, Y., Iseki, A., Okamura, S., Suzuki, S., Nakauchi, H., Ema, H., 2011. Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp. Hematol.* 39, 351–359.e3.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Potter, S.S., 1991. A functional c-myc gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell* 65, 677–89.
- Mullen, A.C., Orlando, D.A., Newman, J.J., Lovén, J., Kumar, R.M., Bilodeau, S., Reddy, J., Guenther, M.G., DeKoter, R.P., Young, R.A., 2011. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell* 147, 565–76.
- Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 723–37.
- Muzzey, D., van Oudenaarden, A., 2006. When it comes to decisions, myeloid progenitors crave positive feedback. *Cell* 126, 650–2.
- Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J., 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–47.
- Naiki, Y., Sorrentino, R., Wong, M.H., Michelsen, K.S., Shimada, K., Chen, S., Yilmaz, A., Slepchenko, A., Schröder, N.W.J., Crother, T.R., Bulut, Y., Doherty, T.M., Bradley, M., Shaposhnik, Z., Peterson, E.M., Tontonoz, P., Shah, P.K., Arditi, M., 2008. TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally

- control *Chlamydia pneumoniae*-induced acceleration of atherosclerosis. *J. Immunol.* 181, 7176–85.
- Naldini, L., Blömer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D., 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–7.
- Narni-Mancinelli, E., Campisi, L., Bassand, D., Cazareth, J., Gounon, P., Glaichenhaus, N., Lauvau, G., 2007. Memory CD8⁺ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI⁺ phagocytes. *J. Exp. Med.* 204, 2075–87.
- Ness, S.A., Kowenz-Leutz, E., Casini, T., Graf, T., Leutz, A., 1993. Myb and NF-M: combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes Dev.* 7, 749–59.
- Neumann, H., Wekerle, H., 2013. Brain microglia: watchdogs with pedigree. *Nat. Neurosci.* 16, 253–5.
- Nussler, B.A.K., Mauricio, I.I., Silvio, D., Billiar, T.R., Hoffman, R.A., Geller, D.A., Selby, R., Madariaga, J., Simmons, R.L., 1992. Stimulation of the Nitric Oxide Synthase Pathway in Human Hepatocytes by Cytokines and Endotoxin. *J Exp Med* 176, 261–264.
- O'Malley, B.W., Qin, J., Lanz, R.B., 2008. Cracking the coregulator codes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 310–5.
- O'Neill, A.S.G., van den Berg, T.K., Mullen, G.E.D., 2013. Sialoadhesin - a macrophage-restricted marker of immunoregulation and inflammation. *Immunology* 138, 198–207.
- Oelgeschläger, M., Nuchprayoon, I., Lüscher, B., Friedman, A.D., 1996. C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4717–25.
- Oetke, C., Kraal, G., Crocker, P.R., 2006a. The antigen recognized by MOMA-I is sialoadhesin. *Immunol Lett* 106, 96–98.
- Oetke, C., Vinson, M.C., Jones, C., Crocker, P.R., 2006b. Sialoadhesin-deficient mice exhibit subtle changes in B- and T-cell populations and reduced immunoglobulin M levels. *Mol Cell Biol* 26, 1549–1557.
- Olefsky, J.M., 2001. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 276, 36863–36864.
- Park, C.G., Takahara, K., Umemoto, E., Yashima, Y., Matsubara, K., Matsuda, Y., Clausen, B.E., Inaba, K., Steinman, R.M., 2001. Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int Immunol* 13, 1283–1290.

- Paukku, K., Silvennoinen, O., 2004. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 435–455.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J., 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693–704.
- Perugini, M., Brown, A.L., Salerno, D.G., Booker, G.W., Stojkoski, C., Hercus, T.R., Lopez, A.F., Hibbs, M.L., Gonda, T.J., D'Andrea, R.J., 2010. Alternative modes of GM-CSF receptor activation revealed using activated mutants of the common beta-subunit. *Blood* 115, 3346–3353.
- Pfützner, E., Jähne, R., Wissler, M., Stoecklin, E., Groner, B., 1998. p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol. Endocrinol.* 12, 1582–93.
- Picard, D., 2003. Molecular mechanisms of cross-talk between growth factors and nuclear receptor signaling. *Pure Appl. Chem.* 75, 1743–1756.
- Pillai, S., Cariappa, A., 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–77.
- Plat, J., Nichols, J.A., Mensink, R.P., 2005. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J. Lipid Res.* 46, 2468–76.
- Pollard, J.W., 2009. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 259–270.
- Pourcet, B., Feig, J.E., Vengrenyuk, Y., Hobbs, A.J., Kepka-Lenhart, D., Garabedian, M.J., Morris, S.M., Fisher, E.A., Pineda-Torra, I., 2011. LXR α regulates macrophage arginase 1 through PU.1 and interferon regulatory factor 8. *Circ. Res.* 109, 492–501.
- Powlesland, A.S., Ward, E.M., Sadhu, S.K., Guo, Y., Taylor, M.E., Drickamer, K., 2006. Widely divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins. *J Biol Chem* 281, 20440–20449.
- Pyz, E., Marshall, A.S.J., Gordon, S., Brown, G.D., 2006. C-type lectin-like receptors on myeloid cells. *Ann. Med.* 38, 242–51.
- Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R., Kaiser, E.A., Snyder, L.A., Pollard, J.W., 2011. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475, 222–5.

- Randolph, G.J., Inaba, K., Robbiani, D.F., Steinman, R.M., Muller, W.A., 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11, 753–61.
- Rasclé, A., Lees, E., 2003. Chromatin acetylation and remodeling at the Cis promoter during STAT5-induced transcription. *Nucleic Acids Res.* 31, 6882–90.
- Ravishankar, B., Liu, H., Shinde, R., Chandler, P., Baban, B., Tanaka, M., Munn, D.H., Mellor, A.L., Karlsson, M.C.I., McGaha, T.L., 2012. Tolerance to apoptotic cells is regulated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3909–14.
- Rébé, C., Raveneau, M., Chevriaux, A., Lakomy, D., Sberna, A.-L.L., Costa, A., Bessède, G., Athias, A., Steinmetz, E., Lobaccaro, J.M.A., Alves, G., Menicacci, A., Vachenc, S., Solary, E., Gambert, P., Masson, D., Rebe, C., Bessede, G., 2009. Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Circ. Res.* 105, 393–401.
- Relloso, M., Puig-Kröger, A., Pello, O.M., Rodríguez-Fernández, J.L., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Muñoz-Fernández, M.A., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A.L., Puig-Kroger, A., Rodriguez-Fernandez, J.L., Munoz-Fernandez, M.A., Sanchez-Mateos, P., Corbi, A.L., 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J. Immunol.* 168, 2634–43.
- Rennert, P.D., Browning, J.L., Mebius, R., Mackay, F., Hochman, P.S., 1996. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J Exp Med* 184, 1999–2006.
- Repa, J.J., 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 14, 2819–2830.
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., 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, 18793–800.
- Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., 2000. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 459–81.
- Robbins, C.S., Hilgendorf, I., Weber, G.F., Theurl, I., Figueiredo, J., Gorbатов, R., Sukhova, G.K., Louisa, M.S., Smyth, D., Zavitz, C.C.J., Shikatani, E.A., Parsons, M., Rooijen, V., Lin, H.Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Swirski, F.K., 2013. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* 19, 1166–1172.

- Robbins, S.H., Walzer, T., Dembélé, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., Sharp, F.R., Chan, S., Kastner, P., Dalod, M., 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9, R17.
- Rössner, S., Voigtländer, C., Wiethe, C., Hänig, J., Seifarth, C., Lutz, M.B., 2005. Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur. J. Immunol.* 35, 3533–44.
- Rydz, N., Swystun, L.L., Notley, C., Paterson, A.D., Riches, J.J., Sponagle, K., Boonyawat, B., Montgomery, R.R., James, P.D., Lillicrap, D., 2013. The C-type lectin receptor CLEC4M binds, internalizes, and clears von Willebrand factor and contributes to the variation in plasma von Willebrand factor levels. *Blood* 121, 5228–37.
- 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, 1109–18.
- Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., Murphy, K.M., 2012. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13, 1145–54.
- Sauer, B., Henderson, N., 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5166–70.
- Saunderson, S.C., Dunn, A.C., Crocker, P.R., McLellan, A.D., 2014. CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood* 123, 208–16.
- Schjetne, K.W., 2002. A mouse Ckappa-specific T cell clone indicates that DC-SIGN is an efficient target for antibody-mediated delivery of T cell epitopes for MHC class II presentation. *Int. Immunol.* 14, 1423–1430.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., Liu, J.O., 2010. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* 6, 209–217.
- Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D., Shan, B., 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 14, 2831–8.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., Frampton, J., Liu, K.J., Geissmann, F., 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336, 86–90.

- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., Singh, H., 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* (80-.). 265, 1573–1577.
- Sebastian, C., Serra, M., Yeramian, A., Serrat, N., Lloberas, J., Celada, A., 2008. Deacetylase activity is required for STAT5-dependent GM-CSF functional activity in macrophages and differentiation to dendritic cells. *J Immunol* 180, 5898–5906.
- Semple, J.W., Aslam, R., Kim, M., Speck, E.R., Freedman, J., 2007. Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood* 109, 4803–4805.
- Serrano-Gomez, D., Sierra-Filardi, E., Martinez-Nunez, R.T., Caparros, E., Delgado, R., Munoz-Fernandez, M.A., Abad, M.A., Jimenez-Barbero, J., Leal, M., Corbi, A.L., 2008. Structural requirements for multimerization of the pathogen receptor dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (CD209) on the cell surface. *J Biol Chem* 283, 3889–3903.
- Shibata, Y., Berclaz, P.Y., Chronesos, Z.C., Yoshida, M., Whitsett, J.A., Trapnell, B.C., 2001. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 15, 557–567.
- Shimshek, D.R., Kim, J., Hübner, M.R., Spergel, D.J., Buchholz, F., Casanova, E., Stewart, A.F., Seeburg, P.H., Sprengel, R., 2002. Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis* 32, 19–26.
- Shortman, K., Heath, W.R., 2010. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234, 18–31.
- Shortman, K., Liu, Y.-J., 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 151–61.
- Shulman, A.I., Larson, C., Mangelsdorf, D.J., Ranganathan, R., 2004. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* 116, 417–429.
- Shuman, J.D., Cheong, J., Coligan, J.E., 1997. ATF-2 and C/EBPalpha can form a heterodimeric DNA binding complex in vitro. Functional implications for transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 272, 12793–800.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y.J., 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835–7.
- Siersbæk, R., Baek, S., Rabiee, A., Nielsen, R., Traynor, S., Clark, N., Sandelin, A., Jensen, O.N., Sung, M.-H., Hager, G.L., Mandrup, S., 2014. Molecular Architecture of Transcription Factor Hotspots in Early Adipogenesis. *Cell Rep.* 7, 1434–1442.

- Siersbæk, R., Nielsen, R., John, S., Sung, M.-H., Baek, S., Loft, A., Hager, G.L., Mandrup, S., 2011. Extensive chromatin remodelling and establishment of transcription factor “hotspots” during early adipogenesis. *EMBO J.* 30, 1459–72.
- Sieweke, M.H., Graf, T., 1998. A transcription factor party during blood cell differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 545–51.
- Sinkevicius, K.W., Burdette, J.E., Woloszyn, K., Hewitt, S.C., Hamilton, K., Sugg, S.L., Temple, K. a, Wondisford, F.E., Korach, K.S., Woodruff, T.K., Greene, G.L., 2008. An estrogen receptor- α knock-in mutation provides evidence of ligand-independent signaling and allows modulation of ligand-induced pathways in vivo. *Endocrinology* 149, 2970–9.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.
- Smyth, G.K., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3, Article3.
- Snook, T., 1964. Studies on the perifollicular region of the rat’s spleen. *Anat. Rec.* 148, 149–59.
- Stables, M.J., Shah, S., Camon, E.B., Lovering, R.C., Newson, J., Bystrom, J., Farrow, S., Gilroy, D.W., 2011. Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *Blood* 118, e192–208.
- Stanley, E., Lieschke, G.J., Grail, D., Metcalf, D., Hodgson, G., Gall, J.A., Maher, D.W., Cebon, J., Sinickas, V., Dunn, A.R., 1994. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5592–5596.
- Stark, G.R., Darnell, J.E., 2012. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36, 503–14.
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142–62.
- Sternberg, N., Hamilton, D., 1981. Bacteriophage P1 site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* 150, 467–486.
- Suzuki, T., Sakagami, T., Rubin, B.K., Nogee, L.M., Wood, R.E., Zimmerman, S.L., Smolarek, T., Dishop, M.K., Wert, S.E., Whitsett, J. a, Grabowski, G., Carey, B.C., Stevens, C., van der Loo, J.C.M., Trapnell, B.C., 2008. Familial pulmonary alveolar proteinosis caused by mutations in CSF2RA. *J. Exp. Med.* 205, 2703–10.

- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J., 2009. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* (80-.). 325, 612–616.
- Tacke, P.J., de Vries, I.J.M., Gijzen, K., Joosten, B., Wu, D., Rother, R.P., Faas, S.J., Punt, C.J.A., Torensma, R., Adema, G.J., Figdor, C.G., 2005. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* 106, 1278–85.
- Taylor, P.R., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., 2005. The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 26, 104–10.
- Teles, R.M.B., Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Oliveira, R.B., Sarno, E.N., Modlin, R.L., 2010. Interleukin-4 regulates the expression of CD209 and subsequent uptake of *Mycobacterium leprae* by Schwann cells in human leprosy. *Infect. Immun.* 78, 4634–43.
- Tontonoz, P., Mangelsdorf, D.J., 2003. Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol* 17, 985–993.
- Torra, I.P., Ismaili, N., Feig, J.E., Xu, C.F., Cavasotto, C., Pancratov, R., Rogatsky, I., Neubert, T.A., Fisher, E.A., Garabedian, M.J., 2008. Phosphorylation of liver X receptor alpha selectively regulates target gene expression in macrophages. *Mol Cell Biol* 28, 2626–2636.
- Trompouki, E., Bowman, T. V, Lawton, L.N., Fan, Z.P., Wu, D.-C., DiBiase, A., Martin, C.S., Cech, J.N., Sessa, A.K., Leblanc, J.L., Li, P., Durand, E.M., Mosimann, C., Heffner, G.C., Daley, G.Q., Paulson, R.F., Young, R.A., Zon, L.I., 2011. Lineage regulators direct BMP and Wnt pathways to cell-specific programs during differentiation and regeneration. *Cell* 147, 577–89.
- Truett, G.E., Heeger, P., Mynatt, R.L., Truett, A.A., Walker, J.A., Warman, M.L., 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29, 52, 54.
- Tumanov, A. V, Grivennikov, S.I., Shakhov, A.N., Rybtsov, S.A., Koroleva, E.P., Takeda, J., Nedospasov, S.A., Kuprash, D. V, 2003. Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunol Rev* 195, 106–116.
- Valledor, A.F., Hsu, L.C., Ogawa, S., Sawka-Verhelle, D., Karin, M., Glass, C.K., 2004. Activation of liver X receptors and retinoid X receptors prevents bacterial-induced macrophage apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17813–17818.

- Van Furth, R., Cohn, Z.A., 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128, 415–35.
- Van Furth, R., Diesselhoff-den Dulk, M.M., 1984. Dual origin of mouse spleen macrophages. *J. Exp. Med.* 160, 1273–83.
- Van Rooijen, N., Kors, N., Kraal, G., 1989. Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetics after liposome-mediated elimination. *J. Leukoc. Biol.* 45, 97–104.
- Van Rooijen, N., Sanders, A., 1994. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* 174, 83–93.
- Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., Jung, S., 2007. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 204, 171–80.
- Venkatachari, N.J., Alber, S., Watkins, S.C., Ayyavoo, V., 2009. HIV-1 infection of DC: evidence for the acquisition of virus particles from infected T cells by antigen uptake mechanism. *PLoS One* 4, e7470.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., Tontonoz, P., 2000. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12097–102.
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T.H.M., 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4560–5.
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., van der Zanden, L., Ottenhoff, T.H.M., 2006. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 79, 285–93.
- Voss, T.C., Schiltz, R.L., Sung, M.-H., Yen, P.M., Stamatoyannopoulos, J.A., Biddie, S.C., Johnson, T.A., Miranda, T.B., John, S., Hager, G.L., 2011. Dynamic exchange at regulatory elements during chromatin remodeling underlies assisted loading mechanism. *Cell* 146, 544–54.
- Vremec, D., Lieschke, G.J., Dunn, A.R., Robb, L., Metcalf, D., Shortman, K., 1997. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 27, 40–4.

- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., Shortman, K., 2000. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 164, 2978–86.
- Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M., 2012. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13, 753–60.
- Ware, C.F., 2005. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 787–819.
- Watanabe, S., Aoki, Y., Nishijima, I., Xu, M., Arai, K., 2000. Analysis of signals and functions of the chimeric human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor in BA/F3 cells and transgenic mice. *J. Immunol.* 164, 3635–44.
- Whitney, K.D., Watson, M.A., Goodwin, B., Galardi, C.M., Maglich, J.M., Wilson, J.G., Willson, T.M., Collins, J.L., Kliewer, S.A., 2001. Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRalpha gene in human macrophages. *J Biol Chem* 276, 43509–43515.
- Wiktor-Jedrzejczak, W.W., Ahmed, A., Szczylik, C., Skelly, R.R., 1982. Hematological characterization of congenital osteopetrosis in op/op mouse. Possible mechanism for abnormal macrophage differentiation. *J. Exp. Med.* 156, 1516–27.
- Willman, C.L., Stewart, C.C., Miller, V., Yi, T.L., Tomasi, T.B., 1989. Regulation of MHC class II gene expression in macrophages by hematopoietic colony-stimulating factors (CSF). Induction by granulocyte/macrophage CSF and inhibition by CSF-1. *J. Exp. Med.* 170, 1559–67.
- Wirth, T., Parker, N., Ylä-Herttuala, S., 2013. History of gene therapy. *Gene* 525, 162–9.
- Witmer-Pack, M.D., Hughes, D.A., Schuler, G., Lawson, L., McWilliam, A., Inaba, K., Steinman, R.M., Gordon, S., 1993. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J. Cell Sci.* 104 (Pt 4, 1021–9.
- Woan, K. V, Sahakian, E., Sotomayor, E.M., Seto, E., Villagra, A., 2012. Modulation of antigen-presenting cells by HDAC inhibitors: implications in autoimmunity and cancer. *Immunol. Cell Biol.* 90, 55–65.
- Xie, H., Ye, M., Feng, R., Graf, T., 2004. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117, 663–76.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D. a, Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S., 2013. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.

- Zammit, D.J., Cauley, L.S., Pham, Q.-M., Lefrançois, L., 2005. Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity* 22, 561–70.
- Zhai, Y., Wada, T., Zhang, B., Khadem, S., Ren, S., Kuruba, R., Li, S., Xie, W., 2010. A functional cross-talk between liver X receptor- α and constitutive androstane receptor links lipogenesis and xenobiotic responses. *Mol. Pharmacol.* 78, 666–74.
- Zhang, D.E., Zhang, P., Wang, N.D., Hetherington, C.J., Darlington, G.J., Tenen, D.G., 1997. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 569–74.
- Zhang, Y., Breevoort, S.R., Angdisen, J., Fu, M., Schmidt, D.R., Holmstrom, S.R., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., Schulman, I.G., 2012. Liver LXR α expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1688–99.
- Zhang, Y., Repa, J.J., Gauthier, K., Mangelsdorf, D.J., 2001. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J. Biol. Chem.* 276, 43018–24.
- Zhong, L., Yang, Q., Xie, W., Zhou, J., 2014. Liver X receptor regulates mouse GM-CSF-derived dendritic cell differentiation in vitro. *Mol. Immunol.* 60, 32–43.
- Zhou, X., Yin, Z., Guo, X., Hajjar, D.P., Han, J., 2010. Inhibition of ERK1/2 and activation of liver X receptor synergistically induce macrophage ABCA1 expression and cholesterol efflux. *J Biol Chem* 285, 6316–6326.
- Zhu, B.-M., Kang, K., Yu, J.H., Chen, W., Smith, H.E., Lee, D., Sun, H.-W., Wei, L., Hennighausen, L., 2012. Genome-wide analyses reveal the extent of opportunistic STAT5 binding that does not yield transcriptional activation of neighboring genes. *Nucleic Acids Res.* 40, 4461–72.
- Zuercher, W.J., Buckholz, R.G., Campobasso, N., Collins, J.L., Galardi, C.M., Gampe, R.T., Hyatt, S.M., Merrihew, S.L., Moore, J.T., Oplinger, J.A., Reid, P.R., Spearing, P.K., Stanley, T.B., Stewart, E.L., Willson, T.M., 2010. Discovery of tertiary sulfonamides as potent liver X receptor antagonists. *J Med Chem* 53, 3412–3416.