



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora de los inhibidores solubles del complemento C4BP β - y factor H

Sonia Janneth Cárdenas Brito

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA E INMUNOMODULADORA DE LOS
INHIBIDORES SOLUBLES DEL COMPLEMENTO C4BP β - Y FACTOR H**

SONIA JANNETH CÁRDENAS BRITO

2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA E INMUNOMODULADORA DE LOS
INHIBIDORES SOLUBLES DEL COMPLEMENTO C4BP β - Y FACTOR H**

Memoria presentada por Sonia Janneth Cárdenas Brito para optar al título de
doctor por la Universidad de Barcelona

Director de Tesis,

Tutor de Tesis,

Dr. Josep M. Aran

Dra. Virginia Nunes Martínez

Autora,

Sonia Janneth Cárdenas Brito

IDIBELL 
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge

2016

Es difícil llegar a este punto en donde debes elegir las palabras adecuadas para cada una de las personas que hicieron parte de tu día a día durante los últimos años, en donde das un vistazo atrás y llegan recuerdos de las experiencias vividas con nostalgia y añoranza. Durante este tiempo me he permitido conocer a personas valiosas, de las cuales he obtenido elementos fundamentales en mi formación, su competencia y experiencia me han permitido aprovechar cada uno de los espacios académicos en los cuales me fortalecí.

Quiero principalmente reconocer el trabajo de mi director de Tesis Doctor Josep M. Aran, sus conocimientos, orientación, paciencia, persistencia y motivación, me han sido fundamentales para la realización de este trabajo. Pertenecer a su equipo y trabajar a su lado durante este tiempo ha sido una oportunidad inmensa y valiosa para mí como individuo y profesional.

Ana, por el trabajo conjunto y tiempo compartido, mas del que debería ja..ja. Hacer extensiva mi gratitud a todos los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular, Antonia, Javi Márquez, Sara, Montse Porta, y a cada uno de los que vi pasar durante este tiempo, muchos compañeros para recordar, muchos nombres que mencionar, perdonad que no lo haga con cada uno de vosotros, pero la lista es demasiado larga, más de lo que imagináis.

Pablo, Andrea, Patrizia, Alexandra, Sandra y Lorenzo, no sólo os merecéis palabras de gratitud, también mi aprecio; me habéis permitido compartir incontables momentos importantes e inestimables, que valoráis más, sobretodo cuando estáis lejos de tu familia y amigos. Vosotros habéis sido mi núcleo, habéis soportado mis altibajos y carácter durante estos años.

Paola, me habéis acogido como una más, me he sentido arropada por tu valiosa amistad, y aunque en los últimos meses no pudiésemos compartir al igual que en los primeros años, he de decir que espero conservar esta valiosa amistad.

Mis amigas lejanas en la distancia y cercanas en mi corazón, Laura, Eliana, Mónica España, Graciela, Ivonn, Vannesa, en momentos difíciles habéis estado presentes para apoyarme y no permitir que me derrumbara, sobre todo cuando he empezado a cumplir este nuevo reto, con todos los cambios que me suponían, las palabras de aliento me fueron fundamentales, no es fácil reinventarte cuando estas lejos de tu zona de confort. Aunque el tiempo y la distancia pasan factura, y poco a poco se desdibujan las amistades. Marthica y Luis gracias por hacernos sentir parte de la familia. A las personas que han apagado su luz y a las cuales no he podido despedir...

Juan Esteban, cada día que he estado lejos de ti, intentando cumplir este sueño, he agradecido tu paciencia, has sido mi norte cuando me he perdido, cada día entiendo y aprendo del infinito amor incondicional que sientes hacia un hijo, gracias a tu nobleza y fortaleza he superado otro escalón más, has tenido que crecer y vivir situaciones de desapego arduos y dolorosos, que han hecho de ti el ser que eres ahora, continúa con tus sueños que estaré encantada de apoyar y compartir, como lo has hecho conmigo. Recuerda que siempre has de perseguir lo que quieres, sólo debes soñarlo.

Alfonso, aunque hemos soportado situaciones que nos han puesto a prueba y que nos han sido adversas, las cuales hemos superado y gracias a ello hoy, tu paciencia, sensatez y apoyo incondicional han sido trascendentes en todo este proceso, es el momento de continuar el camino juntos. Una vez más me siento orgullosa de vosotros dos, sois mi equilibrio, espero poder disfrutar de vosotros por muchos años y recuperar el tiempo que he estado lejos de vuestra compañía, aunque he aprendido a disfrutar y valorar de los pequeños momentos.

Martica, es difícil entender que tu hija y nieto estén lejos de ti, intentando cumplir un sueño, gracias por tu paciencia infinita.

Vosotros tres sois mi fuerza y motivación.

Tabla de Contenido

Tabla de Contenido	i
Resumen	v
1. Introducción	1
1.1. Sistema inmune.....	1
1.1.1. Respuesta inmune inespecífica - inmunidad innata	2
1.1.2. Respuesta inmune específica - Inmunidad adaptativa.....	3
1.2. Inmunidad innata	4
1.3. Sistema del Complemento	6
1.3.1. Vías de regulación del Sistema del Complemento.....	8
1.4. Células dendríticas: nexo entre inmunidad innata y adquirida	14
1.4.1. DCs tolerogénicas.....	16
1.4.2. Aislamiento o generación de DCs.....	18
1.4.3. Función Inmunomoduladora de las DCs.....	18
1.5. Patologías Aloinmunes y Autoinmunes.....	20
1.6. Inmunoterapia con DCs.....	22
1.7. Enfermedad del Injerto contra el huésped (GvHD) como prototipo de aloinmunidad	23
2. Antecedentes	25
3. Objetivos	27
3.1. Objetivo general.....	27

3.2.	Objetivos específicos	27
4.	Materiales y métodos	29
4.1.	Caracterización funcional de FH.....	29
4.1.1.	<i>Obtención de PBMCs a partir de sangre total.....</i>	29
4.1.2.	<i>Diferenciación de monocitos a MoDCs.....</i>	30
4.1.3.	<i>Estudio del fenotipo celular mediante citometría de flujo.....</i>	31
4.1.4.	<i>Determinación de la viabilidad celular.....</i>	31
4.1.5.	<i>Efecto de C4BP FH en maduración de MoDCs.....</i>	32
4.1.6.	<i>Actividad inmunomoduladora de los dominios CCP de FH.....</i>	32
4.1.7.	<i>Función efectora de C4BP y FH sobre receptores celulares.....</i>	33
4.1.8.	<i>Capacidad endocítica de las MoDCs.....</i>	34
4.1.9.	<i>Cuantificación de proteínas.....</i>	35
4.1.10.	<i>Cuantificación de citoquinas inflamatorias: IL-12p70 e IL-10.</i>	35
4.1.11.	<i>Electroforesis de FH en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)..</i>	36
4.1.12.	<i>Análisis de fosforilación de receptores.....</i>	36
4.2.	Capacidad anti-inflamatoria e inmunomoduladora de C4BP β - y FH en un modelo de aloinmunidad.....	37
4.2.1.	<i>Mantenimiento de los ratones NSG.....</i>	37
4.2.2.	<i>Potencial terapéutico de MoDCs tolerogénicas inducidas por C4BP β- o FH en un modelo murino xeno-GvHD.....</i>	39
4.3.	Análisis de la expresión génica en MoDCs.....	41
4.3.1.	<i>Obtención y separación de MoDCs (cell sorting).....</i>	41
4.3.2.	<i>Extracción de ARN total de MoDCs.....</i>	41
4.3.3.	<i>RT-qPCR de marcadores de DCs.....</i>	42
4.3.4.	<i>Obtención de los perfiles globales de expresión génica.....</i>	42
4.3.5.	<i>Análisis de los datos de expresión génica basada en microarrays</i>	43
4.3.6.	<i>Validación de los perfiles de expresión.....</i>	44
4.3.7.	<i>Análisis estadístico.....</i>	46

5. Resultados I – Caracterización de la función inmunomoduladora de FH.....	47
5.1. Influencia de FH en la diferenciación/maduración de MoDCs	48
5.2. El tratamiento con FH no afecta a la viabilidad de las MoDCs.....	52
5.3. Efecto inmunomodulador conjunto de C4BP β - y FH.....	55
5.4. Inhibición del perfil inflamatorio de MoDCs mediado por FH.....	58
5.5. Caracterización de la actividad de FH durante los estadios de diferenciación/maduración de MoDCs.....	59
5.6. Modulación de la capacidad endocítica de MoDCs mediada por FH.	63
5.7. Análisis preliminar de potenciales receptores para FH en MoDCs....	65
5.8. Disección de la actividad inmunomoduladora de FH sobre MoDCs..	71
6. Resultados II – Función de MoDCs inducidas por C4BP β- o FH en un modelo de aloinmunidad.....	75
6.1. Verificación de GvHD	76
6.2. Potencial terapéutico de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH para la disminución de xeno-GvHD en el modelo murino humanizado NSG.....	78
7. Resultados III – Análisis preliminar del perfil transcripcional inmunomodulador de MoDCs tratadas con C4BP β- o FH	81
7.1. Extracción y control de calidad de ARN a partir de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH.....	82
7.2. Ensayo de expresión génica en MoDCs mediante <i>microarrays</i>	84
7.3. Análisis de expresión diferencial entre MoDCs tratadas con C4BP β - o FH.....	86
7.4. Validación de la expresión diferencial de genes seleccionados mediante RT-qPCR.....	100
7.5. Predicción de las vías de señalización inducidas por C4BP β - o FH sobre MoDCs.....	103

7.6. Análisis preliminar de la señalización mediada por C4BP β - sobre MoDCs: cribado de Inmunoreceptores	109
8. Discusión	113
8.1. FH induce un estado tolerogénico en MoDCs.....	114
8.2. FH previene el estado pro-inflamatorio de MoDCs activadas	116
8.3. Los dominios CCP19-20 de FH median su función tolerogénica.	117
8.4. Análisis preliminar de receptores de superficie capaces de mediar la actividad inmunomoduladora de FH.....	118
8.5. C4BP β - y FH inducen patrones de expresión diferentes sobre MoDCs.....	119
8.6. Vías de señalización por la cuales FH y C4BP β - podrían inducir tolerancia.....	120
8.7. Capacidad tolerogénica de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH <i>in vivo</i> . Modelo de xeno-GvHD	121
9. Conclusiones	123
10. Bibliografía	125
11. Anexo-Publicaciones.....	135

Resumen

El sistema de complemento es parte fundamental de la inmunidad innata, actúa reconociendo patrones moleculares asociados a microorganismos y patógenos, provenientes de ambiente extracelular. Su función principal es la eliminación de dichos patógenos, pero además contribuye al mantenimiento de la homeostasis y a la prevención de la autoinmunidad. Los inhibidores solubles C4BP y Factor H son componentes importantes del sistema del complemento, coordinando su actividad de tal manera que limitan su acción impidiendo respuestas exacerbadas e inespecíficas que pueden resultar nocivas para el organismo. Por su parte C4BP, actúa en la vía clásica y de las lectinas, presente en el plasma sanguíneo, con una conformación polimérica, y dos subunidades diferentes, la isoforma mayoritaria $\alpha7\beta1$, formada por siete cadenas idénticas α y una cadena β , y otra isoforma minoritaria $\alpha7\beta0$, incrementada en estados de elevada inflamación (fase aguda). Por otro lado, FH es un regulador esencial de la vía alternativa del sistema complemento, también presente en el plasma

sanguíneo y esencial para mantener el equilibrio de esta vía. FH es una glicoproteína compuesta por 20 dominios homólogos, llamados dominios CCP, y participa como cofactor de la proteína C3. Otro componente de la inmunidad innata son las células dendríticas, las cuales juegan un papel fundamental en la respuesta inmune y son nexo de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa. En el presente estudio se abordó la caracterización funcional y molecular de C4BP β - y FH sobre células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs). Dichas MoDCs fueron obtenidas a partir de células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMCs) bajo estimulación con interleuquina 4 (IL-4) y Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y maduras con LPS. Mediante ensayos de citometría de flujo, para el análisis fenotípico de estadios de diferenciación y maduración de MoDCs, se pudo estudiar en profundidad la actividad tolerogénica de C4BP β - y/o FH sobre MoDCs, la viabilidad y la capacidad endocítica de las mismas. Dicho estado tolerogénico de MoDCs se caracterizó por un claro perfil anti-inflamatorio y una alteración en la expresión de las moléculas co-estimuladoras, indispensables para la activación de células T. De igual modo se estableció un modelo murino de enfermedad del xeno-injerto contra el huésped (xeno-GvHD), utilizando ratones inmunodeficientes NSG (NOD *scid gamma*), con el objetivo de evaluar si las MoDCs convertidas en tolerogénicas con las potenciales proteínas inmunomoduladoras caracterizadas en este trabajo C4BP β - y/o FH tenían la capacidad de retrasar o mitigar la enfermedad xeno-GvHD. Así, se observó si se prolongaba la supervivencia al realizar un trasplante de éstas a animales previamente xenoinjertados con PBMCs humanas. Además, se realizaron otros ensayos funcionales que indican un claro papel inmunomodulador C4BP β - y FH. Posteriormente, se inició un análisis de expresión a nivel de genoma humano completo con el objetivo de establecer las bases moleculares de dicha inmunomodulación. Como consecuencia, los resultados obtenidos a partir de la técnica de *microarrays* han permitido realizar predicciones sobre las probables

vías de señalización que pueden estar involucradas en la respuesta anti-inflamatoria e inmunomoduladora dependiente de estas proteínas. Aunque no se ha podido completar aún mediante análisis funcionales la implicación de las vías de señalización predichas, la información obtenida será de gran utilidad para futuros diseños experimentales que permitan dilucidar los receptores celulares y vías de señalización sobre los cuales actúan C4BP β - y FH, y para la caracterización de nuevos fármacos anti-inflamatorios e inmunomoduladores que actúen como agonistas de los receptores moleculares de C4BP β - y/o FH.

1. Introducción

1.1. Sistema inmune

Proteger el cuerpo humano de microorganismos patógenos es una función desarrollada por una compleja organización de células, órganos, tejidos y moléculas que se encargan de responder ante los diferentes ataques provenientes del exterior. De este modo se conforma el sistema inmune, cuya organización se establece a modo multi-capa. En la primera línea de defensa se sitúa la inmunidad innata, dentro de la cual se encuentran las barreras físicas (como piel, epitelio y mucosas) y químicas (como enzimas, y ácidos estomacales), seguida de la segunda línea constituida por la inmunidad adaptativa, una respuesta mediada por células altamente especializadas (Janeway and Medzhitov, 2002). La inmunidad innata representa la primera respuesta del huésped contra microorganismos patógenos invasores. Este mecanismo de defensa actúa rápidamente y a corto plazo; mientras que la inmunidad adaptativa la constituye un grupo de moléculas y células efectoras

generadoras de un mecanismo de respuesta capaz de generar una memoria inmune y caracterizada por la habilidad para proteger el cuerpo a medio y largo plazo si se trata de una infección duradera o si se suceden procesos de re-infección (Moser and Leo, 2010).

1.1.1. Respuesta inmune inespecífica - inmunidad innata

La inmunidad innata es un sistema de defensa ancestral que comprende una amplia variedad de mecanismos moleculares para dar una respuesta rápida y efectiva frente a la entrada de patógenos. Este tipo de inmunidad está presente desde organismos tan simples como bacterias y arqueas, las cuales suelen presentar interesantes mecanismos moleculares como los elementos CRISPR (*Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*) (Bhaya et al., 2011), cuya función principal es defender a estos microorganismos de la infección de bacteriófagos. A lo largo de la evolución, los mecanismos moleculares asociados a la inmunidad innata se han perfeccionado de tal manera que en los organismos vertebrados superiores puede observarse una evidente mejora de las barreras físicas, compuestas de tejidos altamente especializados, que restringen la entrada a la gran mayoría de microorganismos potencialmente perjudiciales. De igual manera, la mejora de las barreras químicas, para dar respuesta a la versatilidad de patógenos emergentes durante la historia evolutiva de los vertebrados, ha conducido hasta la adquisición de una gran variedad de genes codificantes para enzimas líticos de la pared celular bacteriana como las lisozimas, o de genes codificantes para pequeños péptidos antimicrobianos de amplio espectro, conocidos como defensinas (Machado and Ottolini, 2015).

Dado que el eje central de la presente Tesis Doctoral es el estudio de algunos componentes de la inmunidad innata y su papel en la tolerancia inmune, dichos mecanismos moleculares, también enmarcados dentro de la

inmunidad innata, serán descritos con mayor detalle en los siguientes apartados de esta sección.

1.1.2. *Respuesta inmune específica - Inmunidad adaptativa*

Aunque la capacidad de respuesta de la inmunidad adaptativa es más lenta, ésta está mediada por células altamente especializadas permitiendo así la identificación y erradicación de patógenos invasores incluso en re-infecciones distantes en el tiempo (Dempsey et al., 2003). La especificidad del reconocimiento antigénico está mediada por los linfocitos, los cuales poseen receptores de membrana capaces de identificar y diferenciar diferentes antígenos pertenecientes a diversos microorganismos. Durante la respuesta inmune adaptativa se pueden diferenciar dos procesos fundamentales: la respuesta inmune humoral mediada por los anticuerpos secretados por linfocitos B y la respuesta inmune celular mediada por linfocitos T (Chaplin, 2010). A grandes rasgos, la respuesta inmune adaptativa se genera tras una activación en cadena iniciada por una fase de **reconocimiento**, la cual está caracterizada por la unión de los receptores de linfocitos T maduros a los antígenos presentados por las células presentadoras de antígenos (APCs). Posteriormente, la respuesta entra en una fase de **activación**, durante la cual se sucede una secuencia de proliferación y diferenciación celular donde los linfocitos T colaboradores o *helper* (T_H CD4+) juegan un papel fundamental activando a los linfocitos B y a los linfocitos T citotóxicos (T_C CD8+). Por último se encuentra la fase **efectora**, donde los linfocitos T diferenciados se desplazan al lugar afectado y los linfocitos B liberan los anticuerpos específicos para el reconocimiento y opsonización de los microorganismos que desencadenaron originalmente la respuesta (Regueiro et al., 2012).

Como se ha descrito previamente, en la respuesta inmune adaptativa participan varios tipos de linfocitos T, los cuales se caracterizan por la presencia

de diferentes glicoproteínas y receptores de superficie, siendo T_H CD4+ y T_C CD8+ los más abundantes. Los linfocitos T_C reconocen los antígenos presentes en superficie por moléculas CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de clase I, mientras que los linfocitos T_H interactúan con el antígeno a través de las moléculas CMH de clase II (Murphy et al., 2008). Los linfocitos T_H CD4+ pueden adquirir un fenotipo T_{H1} o T_{H2} según el tipo de citoquinas que producen como respuesta a su activación. Las células T_{H1} tienen la capacidad de secretar citoquinas de tipo interleuquina 2 (IL-2), interferon gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), mientras que las células T_{H2} pueden secretar las interleuquinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Las características específicas del antígeno y de las señales co-estimuladoras determinarán si predominará la inmunidad T_{H1} o T_{H2} . Es así como las células T focalizan la respuesta adquirida o adaptativa hacia patógenos extraños, tumores y antígenos propios creando un perfil específico de respuesta T efectora (Mosmann and Coffman, 1989).

1.2. Inmunidad innata

La inmunidad innata constituye un mecanismo ancestral de defensa contra patógenos que se encuentra presente en todos los organismos eucariotas. Aunque dicho mecanismo exhibe una respuesta general no-especializada, y varía mecánicamente entre especies, la inmunidad innata distingue eficientemente las células propias de las células o sustancias extrañas. Además, su relevancia en la defensa contra patógenos estriba en el hecho de que un defecto en cualquiera de sus múltiples componentes incrementa sustancialmente la susceptibilidad a infecciones (Murphy et al., 2011).

La inmunidad innata es un sistema de defensa que se activa a través de un gran número de moléculas proteicas que reconocen los componentes estructurales básicos de microorganismos o virus (antígenos de superficie); la inmunidad innata actúa de forma inmediata tras detectar y reconocer la

entrada de un patógeno en el huésped. Gracias a ello puede empezar a combatir y atenuar la infección desde el primer contacto o durante las primeras fases de su desarrollo entre 0-5 días (Dempsey et al., 2003).

Esta rápida respuesta del sistema inmune innato, se entiende como la principal causa evolutiva de su persistencia en organismos vertebrados a pesar de la adquisición y desarrollo de un sistema más específico de reconocimiento y eliminación, como lo es la respuesta inmune adaptativa mediada por células especializadas. La activación y respuesta de células especializadas como los linfocitos B y T, dentro de las cuales se encuentra su expansión clonal, tarda varios días e incluso semanas. Este tiempo de respuesta resultaría inútil para atajar infecciones por microorganismos que poseen tiempos de duplicación del orden de unos pocos minutos. Por tanto, un sistema inmunológico basado exclusivamente en una inmunidad adaptativa estaría en una clara desventaja dinámica para controlar y erradicar infecciones microbianas. Como resultado, la inmunidad innata se considera el eje central de defensa contra patógenos, y durante la evolución no ha sido desplazada sino perfeccionada para coordinar su respuesta temporal con mecanismos moleculares más sofisticados y específicos desarrollados en las especies vertebradas (Alberts et al., 2014).

La función principal de sistema inmune innato es la de estar en permanente vigilancia, respondiendo de forma inmediata a agentes que generen alguna alteración en las primeras líneas de defensa como lo son la piel y las mucosas. Tras la detección de una infección, esta primera línea se activa rápidamente y a su vez algunos componentes celulares fagocíticos, como macrófagos y células dendríticas, son activados para propagar la respuesta y lograr la resolución de la infección lo más eficientemente posible (Akira et al., 2006). El sistema inmune innato utiliza una gran variedad de moléculas de reconocimiento, denominadas Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs – de *Pattern-Recognition Receptors*), que se expresan en la superficie celular, en

compartimentos intracelulares o bien secretados al flujo sanguíneo y/o tejidos. Aunque como ya se ha mencionado, a pesar de que este sistema de defensa es inespecífico algunos de sus componentes le confieren cierto grado de especificidad al ser capaz de reconocer grupos heterogéneos de patógenos mediante firmas moleculares concretas (Kadowaki et al., 2001). En respuesta a dichos grupos se activan células como fagocitos o algunas moléculas como opsoninas, además del sistema del complemento, induciendo algunas vías de señalización pro-inflamatorias y apoptosis. Así, receptores de tipo *Toll Like Receptors* (TLRs), participan en este tipo de respuesta reconociendo diferentes patrones moleculares asociados a patógenos, como moléculas de lipopolisacáridos (LPS) o ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple activando en último término distintas vías de señalización, que llevan a una respuesta inflamatoria y a su vez proporciona señales que activan la inmunidad adaptativa (Delarosa et al., 2012).

1.3. Sistema del Complemento

El Sistema del Complemento forma parte primordial de la inmunidad innata y actúa principalmente protegiendo al huésped y ayudando a eliminar bacterias, virus o células infectadas, al igual que modula la respuesta inmune adaptativa. Este sistema “complementa” la acción de los anticuerpos, potencia la inflamación y la fagocitosis, y produce la lisis directa de microorganismos (Carroll, 1998). Está conformado por varias proteínas, sintetizadas en su mayoría por el hígado, que permanecen inactivas en el plasma y líquidos intersticiales hasta su activación mediante señales controladas. La mayor parte de los factores del complemento son proteínas plasmáticas mientras que un porcentaje pequeño son proteínas de membrana (Kang et al., 2009). La activación del sistema de complemento genera una serie de respuestas que desencadenan procesos de: lisis de microorganismos, fagocitosis de agentes extraños, migración de células inmunes, inflamación y de eliminación de

inmunocomplejos de la sangre. El sistema de complemento posee tres vías de respuesta: a) la vía **Clásica**, que se activa por la unión antígeno-anticuerpo, principalmente IgG e IgM. Gracias a ello participa en la respuesta inmune específica; b) la vía de las **Lectinas**, que consiste en una especie de variante de la ruta clásica. Su principal componente es una proteína presente en el plasma llamada MBL (Lectina de unión a Manosa) un carbohidrato habitual en los extremos glucoproteicos bacterianos, que actúa principalmente provocando la activación de MASP-1 y MASP-2, proteasas de origen plasmático con función análoga a los factores C1q (Componente 1 del Complemento) y C1r de la vía clásica. Esta vía forma parte de la inmunidad innata y se inicia sin necesidad de anticuerpos y c) la vía **Alternativa**, la cual se activa espontáneamente cuando los factores del complemento interactúan directamente con la superficie de microorganismos, estimulando la hidrólisis de la convertasa C3 mediada por factores como B, D y properdina (**Figura 1**) (Wallis, 2007). Todas estas vías convergen en la formación del primer enzima de la cascada, la convertasa C3, que conduce a la liberación de las fracciones C3a y C5a solubles, las cuales son capaces de inducir degranulación de mastocitos y contracción del músculo liso. Algunos componentes del complemento como las proteínas C2, C3, C4, C6, C7, C8, Factor B y Factor I, presentan un cierto grado de polimorfismo en su estructura primaria, es decir, a nivel de la secuencia de aminoácidos. El hepatocito es el principal productor de factores de complemento y de algunas citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ , las cuales incrementan la síntesis de algunos factores de complemento a manera de retroalimentación positiva. El complemento también posee función de opsonización y quimiotaxis incrementando la fagocitosis de antígenos mediante la atracción de macrófagos al foco de infección. El complemento es considerado como un elemento esencial del proceso inflamatorio y de su regulación por lo tanto muchas de las estrategias y terapias orientadas al tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes se encaminan al

control de la función de sus componentes (Naughton et al., 1996; Sacks et al., 2009; Tang et al., 1999).

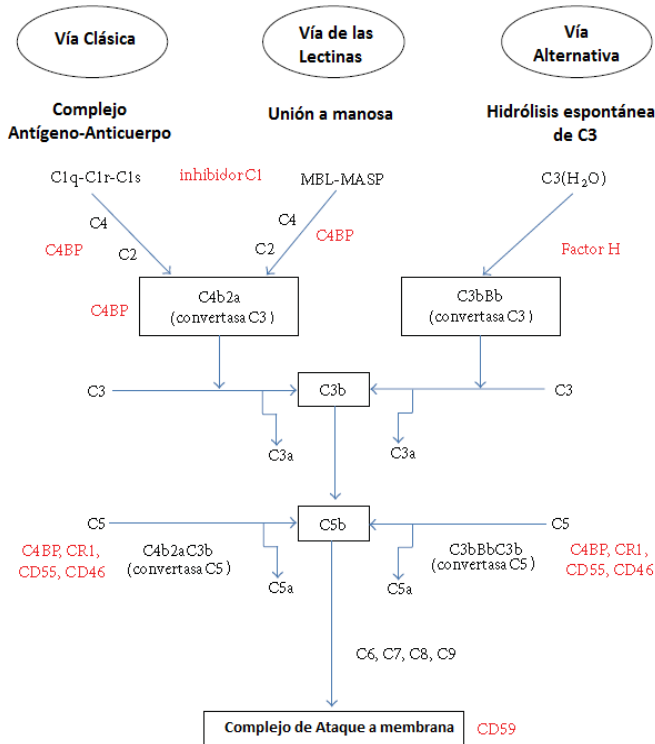


Figura 1. Sistema del Complemento. Conformado por tres vías: Vía Clásica, Vía de las Lectinas y Vía Alternativa. Las tres vías se dirigen a la formación de convertasa C3, convertasa C5 y complejo de ataque a membrana. Reguladores del Complemento en Rojo. MBL: Lectina de Unión a manosa; MASP: MBL-asociada a serin-ptoteasa; C4BP: Proteína de Unión a C4b; CR1: receptor del complemento. Tomado y modificado: (Shastri et al., 2013).

1.3.1. Vías de regulación del Sistema del Complemento

Dada la multitud de funciones efectoras que puede desencadenar el complemento, es preciso que existan mecanismos que limiten su función, ya que una inapropiada activación del sistema complemento puede desencadenar efectos devastadores a nivel sistémico. Así, existen dos mecanismos reguladores para controlar su acción. El primer mecanismo consiste en la regulación generada por la naturaleza de sus componentes. Por ejemplo, en la vía clásica y en la vía de las lectinas, la proteína C3 es procesada por los

complejos C4b2a y C3bBb, respectivamente, formando las moléculas C3b y C3a. La fracción C3b intenta unirse a la superficie de las células que estén a su alcance, pero debido a su actividad auto-proteolítica, genera C3bi, que no es capaz de unirse a la superficie de las células, deteniendo así la propagación del sistema. Por otra parte, la hidrólisis de los componentes C3 y C5, la cual se efectúa rápidamente por carboxipeptidasas, genera las fracciones C3a y C5a (sin residuos de arginina (R) en C-terminal) que tienen un 10% menos de su actividad biológica original (Wagner and Frank, 2010).

El segundo mecanismo regulador del complemento está basado en la acción intrínseca de proteínas reguladoras. Dichas proteínas están especializadas en la inhibición de la activación y amplificación de la cascada. La glicoproteína inhibidora de C1 actúa disociando éste complejo proteico en sus tres diferentes subunidades, C1q, C1r y C1s; evitando así que C2 y C4 se hidrolicen y que, por consiguiente, la convertasa C4b2a que hidroliza C3 no ejerza su función. Dado que el complejo C1qrs actúa en la vía clásica, ésta es la única vía que está afectada. Otro grupo de proteínas implicadas en el control de la activación del complemento son las proteínas reguladoras de la activación de complemento (RCAs), las cuales también regulan la actividad peptidasa de la convertasa de C3. Dentro de la RCAs está la proteína CR1 que es un receptor de alta afinidad por las fracciones C3b y C4b, y que actúa conjuntamente con MCP (*Membrane Cofactor protein*) en las tres vías de activación del complemento. La proteína de unión C4BP, es otra RCA y actúa en la vía clásica y en la vía de las lectinas. Su modo de inhibición es mediante la unión a C4b de tal forma que facilita su hidrólisis por parte de Factor I, hecho que afecta al ensamblaje de la convertasa C3, y a su vez, generan la fracción C4d de unión a membrana y C4c. En la vía alternativa, MCP y CR1 evitan la formación de la convertasa C3 al igual que el Factor I. En lo concerniente a éste último mecanismo regulador, las fracciones C3b y C4b pueden ser rápidamente inactivadas mediante la acción proteolítica

del Factor I generando las fracciones iC3b, C3dg, C3c, C4c y C4d en presencia de cofactores de unión a C3b y C4b, como las proteínas MCP, CR1 y el factor H (Tabla 1) (Wallis, 2007).

Tabla 1. Actividades fisiológicas del Sistema del Complemento. Tomado de: (Walport, 2001).

Actividad		Proteína Encargada
Defensa del huésped frente a Infección	Opsonización	Unión covalente de fragmentos C3 y C4
	Quimiotaxis y activación de linfocitos	Anafilotoxinas (C5a, C3a y C4a); receptor de Anafilotoxinas en Leucocitos
	Lisis de celular y bacteriana	Complejo de ataque a membrana (C5b-C9)
Interfase entre Inmunidad Innata y Adaptativa	Incremento en la respuesta mediada por anticuerpos	Unión de C3b y C4b a complejos inmunes y Antígenos; Receptores de C3 en Linfocitos B y Células presentadoras de Antígeno.
	Mejora de memoria inmunológica	Unión de C3b y C4b a complejos inmunes y Antígenos; Receptores de C3 en células dendríticas foliculares
Eliminación de Residuos	Aclaramiento de complejos inmunes en tejidos	C1q; Unión covalente de fragmentos C3 y C4
	Eliminación de células apoptóticas	C1q; Unión covalente de fragmentos C3 y C4

Otros mecanismos de inhibición subyacen en el control de la función de la proteína CR1, la cual promueve la fagocitosis a través de la formación de inmunocomplejos como consecuencia de la unión con C3b. Deficiencias en la formación de estos inmunocomplejos conducen a su depósito en tejidos y, por consiguiente, a la activación de la vía receptora de la fracción constante del anticuerpo, la cual establece una respuesta inmune adecuada para un antígeno determinado, provocando un daño en el tejido por respuesta inespecífica.

Finalmente, la proteína C4BP (*C4b-binding protein*) es el mayor inhibidor soluble de la vía clásica y de las lectinas, mientras que Factor H inhibe la vía alternativa (Adema, 2009; Sarma and Ward, 2011; Walport, 2001).

1.3.1.1. Inhibidores solubles

Aunque se han descrito anteriormente los mecanismos de acción de algunas vías de regulación del sistema del complemento, merece la pena resaltar dos inhibidores implicados en las vías de regulación.

1.3.1.1.1. C4BP

C4BP es fundamental para desarrollar funciones que mantienen la homeóstasis. Además, es un inhibidor fundamental de la vía clásica y de las lectinas del sistema de complemento. Es una glicoproteína (500 kDa) presente en el plasma sanguíneo a una concentración de 200 mg/L, compuesta por dos subunidades diferentes, la cadena α (con un peso 75 kDa) y la cadena β (con un peso molecular 40 kDa (Ermert and Blom, 2016)). Dichas cadenas están unidas por enlaces de tipo disulfuro, establecidos entre los grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína presentes en sus regiones C-terminales; de tal manera que al formarse los complejos oligoméricos la molécula adopta una estructura de araña o pulpo (Figura 2). Ambos tipos de subunidades están compuestas por dominios CCPs (*Complement Control Protein*), los cuales están conformados por aproximadamente 60 aminoácidos, que a su vez forman un núcleo compacto e hidrofóbico rodeado por cinco o más láminas β (Blom, 2002). Gracias a su particular arquitectura C4BP es capaz de unirse al factor de complemento C4b, a heparina y a la vitamina K. Además, se ha descrito que C4BP es también capaz de modular la interacción CD40/sCD154 en células epiteliales, permitiendo la supervivencia celular en procesos inflamatorios crónicos o tumorales (Williams et al., 2007). Se han descrito tres isoformas presentes en el plasma sanguíneo,

una isoforma mayoritaria $\alpha7\beta1$ y otras dos isoformas minoritarias: $\alpha6\beta1$ ($\beta+$) y $\alpha7\beta0$ ($\beta-$). (Pardo-Manuel et al., 1990), (Criado Garcia et al., 1995). La isoforma $\alpha7\beta0$, denominada C4BP $\beta-$, incrementa su presencia en condiciones de fase aguda, como los politraumatismos o el síndrome de shock séptico, impidiendo la liberación de C5a y la formación del complejo de ataque a membrana y, por tanto, regula la inflamación (Ermer and Blom, 2016). Los genes que codifican para los polipéptidos C4BP α y C4BP β están agrupados en el locus conocido como RCA (*Regulators of Complement Activity*), que se localiza en el brazo largo del cromosoma 1, banda 1q32 (Lester et al., 2008).

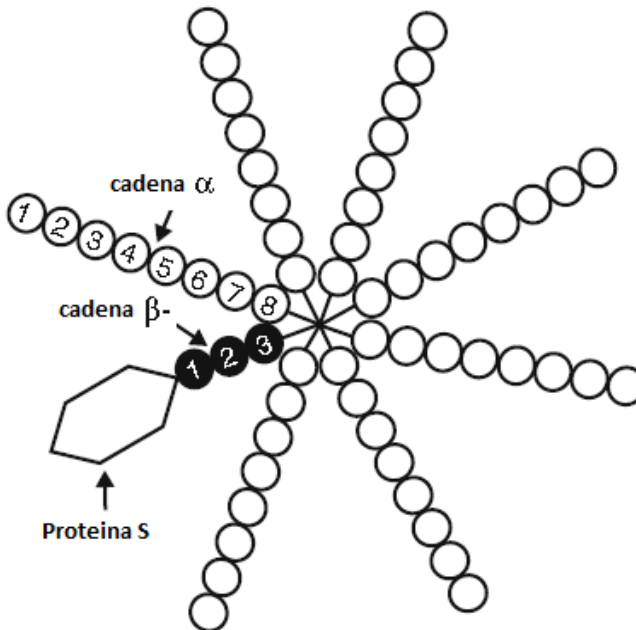


Figura 2. Proteína de Unión a C4b (C4BP). Glicoproteína de 570 kDa. Presente en el plasma a una concentración aproximada de 200mg/L. Es el principal inhibidor de la Vía Clásica y la Vía de las Lectinas. La isoforma mas común de C4BP está conformada por siete cadenas idénticas α y una única cadena β , la cual está covalentemente unida en el extremo C-terminal y forma una estructura de araña. Las cadenas α y β contienen ocho y tres dominios *Complement Control Protein* (CCP), respectivamente. La cadena β está siempre formando un complejo con la proteína S anticouagulante dependiente de vitamina K. Tomado y modificado: (Mohlin and Blom, 2014).

1.3.1.1.2. *Factor H*

El Factor H (FH) forma parte del conjunto de proteínas reguladoras del sistema del complemento, es relativamente abundante en el plasma (300-800 mg/L), (Rodríguez de Córdoba et al., 2004) y fue identificada y caracterizada por primera vez por Nilsson and Muller-Eberhard en 1965. (Nilsson and Mueller-Eberhard, 1965). Al igual que FI, FB y C3, esta proteína es producida principalmente en el hígado (Jozsi and Zipfel, 2008). FH es esencial para mantener bajo control la vía alternativa y está compuesta por una única cadena polipeptídica con un peso molecular de 150 kDa (Sim and DiScipio, 1982). Se compone de una cadena de 20 dominios CCPs (Figura 3), cada uno con una longitud aproximada de 60 aminoácidos. Al igual que para C4BP, su estructura y estabilidad tridimensional es dependiente de la formación de puentes disulfuro internos en los dominios CCP. Dichos dominios CCP también se conocen como dominios SCR (*Short Complement Repeat*) (Aslam and Perkins, 2001).

FH inhibe la activación del complemento y participa como cofactor de FI en la unión a C3b, afectando la actividad de la convertasa C3/C5 de esta vía. FH compite con Factor B (FB) en la unión a C3b y además regula el complemento tanto en fase líquida como en superficies celulares. FH está codificado por el gen CFH, localizado dentro de los reguladores de la activación del complemento (RCA) en la región 1q32. FH es el principal componente de la familia de proteínas relacionadas con FH (CFHR); a la cual también pertenece CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 y CFHR5 (Zipfel et al., 2002), conformados por 4 a 9 dominios de SCR. Su función específica aún es desconocida, pero su relación funcional con FH sugiere que podrían participar también en la regulación de la activación del complemento. Algunas patologías relacionadas con la alteración de FH son: *i*) Síndrome Urémico Hemolítico Atípico (aHUS). Afecta principalmente al riñón. Se ha observado una disminución en la protección de las superficies celulares al daño generado por la actividad del complemento (Campistol et al., 2015); *ii*)

Glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN). Se caracteriza por proliferación anormal de células mesangiales y engrosamiento de las paredes de capilares glomerulares. Esta lesión genera hipocomplementemia (Alchi and Jayne, 2010); *iii*) Enfermedad por depósitos densos. Se refiere a una MPGN tipo II, caracterizada por el engrosamiento de la membrana basal de los glomérulos del riñón, perdiendo gradualmente la capacidad de filtrar la sangre de impurezas (Martinez-Barricarte et al., 2010); *iv*) Degeneración macular asociada a la edad. Se asocia con lipodistrofia parcial, desarrollando depósitos amarillos en la membrana de bruch de la retina. En etapas tempranas tiene poca influencia en la visión, pero puede generar problemas visuales de forma tardía (Zipfel et al., 2010).

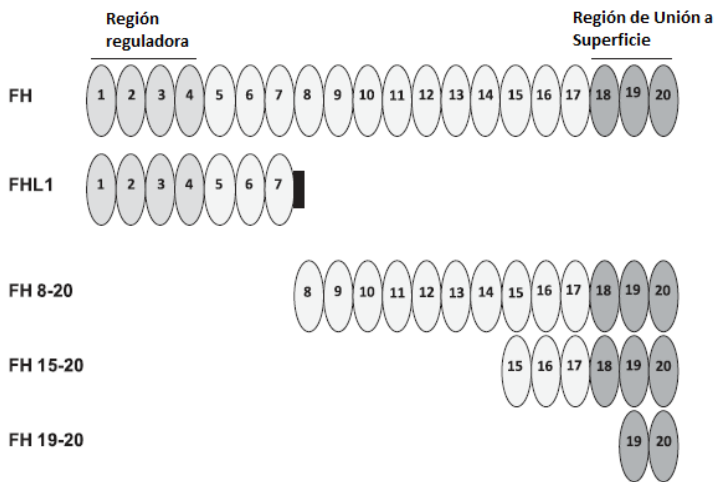


Figura 3. El Factor H (FH), es una abundante glicoproteína plasmática que tiene una función importante en la regulación de la activación del Sistema del Complemento. Su peso molecular es de 150kDa, y está conformada por 20 dominios homologos llamados *Complement Control Protein* (dominios CCP). Cada dominio está conformado por 60 aminoácidos y contienen dos puentes disulfuro internos. Los dominios también son llamados Sushi o SCR (Repeticiones cortas de Complemento). Tomado y modificado: (Olivar et al., 2016).

1.4. Células dendríticas: nexa entre inmunidad innata y adquirida

Las células pertenecientes al sistema inmune se distinguen y clasifican de acuerdo a su función efectora. Las células dendríticas (DCs) constituyen una

parte esencial en la regulación de respuesta inmunológica. El conocimiento de las funciones de las DCs y sus patrones de activación e inhibición proceden de estudios realizados por Steinmann *et al* y Cohn *et al* a comienzos de la década de los 80 (Steinman et al., 1975; Steinman et al., 1979). Gracias a su caracterización inicial y a los posteriores estudios funcionales las DCs son reconocidas como nexo de unión entre la respuesta innata y la adaptativa (Steinman and Hemmi, 2006). El conocimiento del genoma humano junto con el desarrollo y perfeccionamiento de técnicas de análisis molecular como la citometría de flujo, han mediado el gran avance en la caracterización biológica de DCs en las últimas dos décadas. Gracias a este tipo de avances ha sido posible la identificación de un gran número de moléculas moduladoras de la respuesta inmune de DCs, como por ejemplo los denominados *Blood Dendritic Cell Antigens* (BDCAs) (Dzionek et al., 2000). El amplio conocimiento de la biología de las DCs ha permitido caracterizarlas como las principales APCs, fundamentales en la estimulación y activación de linfocitos T.

Varios estudios han demostrado que DCs tienen la posibilidad de inducir diferentes tipos de respuesta inmune celular dependiendo de su origen. Las DCs se pueden clasificar en tres sub-poblaciones diferentes: las localizadas en la piel y órganos linfoides llamadas DCs **intersticiales**, y las presentes en el sistema circulatorio, las cuales se denominan DCs de linaje **mieloide**, (CD11c⁺ y BDCA1⁺ o BDCA3⁺) y **plasmacitoide**, (CD11c⁻ y BDCA2⁺). (Guilliams et al., 2010; Sato and Fujita, 2007). Las DCs también pueden clasificarse de acuerdo a su estadio de maduración. Las células inmaduras (iDCs) emiten señales de alerta y tienen capacidad fagocítica. Al contactar con moléculas de tipo LPS o citoquinas inflamatorias como TNF- α se desencadena una señalización intracelular que promueve una serie de cambios a nivel molecular, funcional y fenotípico que dan lugar a DCs con un fenotipo maduro (mDCs) y especializado en la presentación antigénica. Aunque las DCs poseen la capacidad de dar inicio a la

respuesta inmune, pueden también silenciarla induciendo estados de tolerancia inmunológica, de acuerdo al microambiente en el cual se encuentren y a los estímulos a los cuales sean expuestas (Sato and Fujita, 2007).

1.4.1. DCs tolerogénicas

Gracias a su plasticidad, las DCs se pueden comportar como reguladoras o tolerogénicas al ser expuestas a diferentes estímulos inmunosupresores. Los monocitos son un tipo de leucocitos que tienen la capacidad de fagocitar bacterias o virus que provienen del exterior y de transformarse en macrófagos o en DCs. Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de precursores denominados monoblastos y, una vez en el torrente circulatorio y en respuesta a estímulos inflamatorios pueden diferenciarse a macrófagos, adquiriendo la facultad de fagocitar microorganismos o, alternativamente, pueden diferenciarse a DCs responsables de la presentación de antígenos a los linfocitos T y de activar su respuesta efectora (Huang et al., 2001). Una vez diferenciadas, y en su estadio iDC, las DCs se distribuyen por los diferentes tejidos del cuerpo a la búsqueda de potenciales antígenos a través de PRRs, TLRs y receptores CTL (*C-type-lectin receptors*) (Regueiro et al., 2012). Tras detectar dichos antígenos e incorporarlos dentro de la célula mediante procesos de endocitosis, los antígenos son fragmentados y presentados en su superficie unidos a moléculas de tipo CMH II (Michelsen et al., 2001). Con la captación de dichos antígenos, el proceso de maduración de las DCs da comienzo y, como consecuencia del mismo, incrementa la expresión de moléculas estimuladoras en su superficie, como CD40, CD80 y CD86. De igual manera las DCs maduras secretan citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-12, IL-6, y TNF. Además, expresan en su superficie un mayor número de moléculas de tipo CMH II unidas con los antígenos que han iniciado la maduración. La señal iniciada frente a la detección de elementos extraños se amplifica con la activación de la migración de DCs maduras a los órganos linfoides más

próximos, a partir de la expresión de receptores de tipo CCR7 (*Chemokine Receptor Type 7*) que median la migración hasta el encuentro con células T *naïve*, las cuales iniciarán su diferenciación hacia linfocitos T_H o T_C (Raker et al., 2015; Roncarolo and Battaglia, 2007). Pero aparte de su papel activador de la respuesta contra patógenos (Figura 4), las DCs tienen un papel regulador en la tolerancia contra auto-antígenos. Las DCs tolerogénicas que presentan antígenos propios en su superficie atenúan la producción de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 e incrementan la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Roncarolo and Battaglia, 2007). A grandes rasgos, las señales emitidas por ellas, y por células que no se han activado completamente tras la fagocitosis de antígenos, inducen la diferenciación de células T *naïve* hacia células T_{reg} (T reguladoras), un componente esencial en la tolerancia de auto-antígenos (Raker et al., 2015).

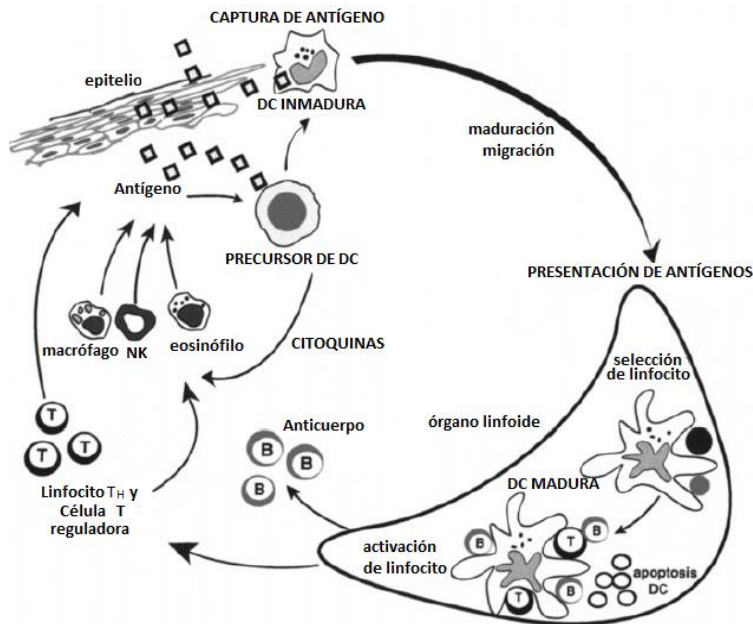


Figura 4. Proceso de activación de células dendríticas. Las DCs inmaduras derivadas de sus precursores entran en estado de maduración tras la detección de antígenos. Al migrar a los tejidos linfoides, activan a los linfocitos T *naïve* mediante la interacción de sus moléculas presentadoras de antígenos, CMH-II, y los receptores específicos de células T. Como consecuencia las DCs activan la inmunidad humoral y celular al igual que estimulan la respuesta de otros componentes de la inmunidad innata vía producción de citoquinas Tomado y modificado: (Banchereau et al., 2000).

1.4.2. Aislamiento o generación de DCs

Las DCs constituyen un tipo celular minoritario en la circulación sanguínea, comparado con otros tipos de células inmunes. Por lo tanto su aislamiento para la experimentación y caracterización *in vitro* constituye, en sí mismo, una dificultad metodológica. Se han desarrollado técnicas de diferenciación *in vitro*, caracterización y de análisis cuantitativo de este tipo de células. Una de dichas estrategias consiste en el enriquecimiento de DCs, las cuales son aisladas por selección negativa tras la utilización de métodos de captura específicos para antígenos de superficie de células T, B, monocitos y células *natural killer* (Zhou and Tedder, 1995). Gracias a dichos protocolos de obtención de poblaciones de DCs de alta pureza, se ha avanzado en el estudio y caracterización de dichas células. Otro tipo de proceso ampliamente utilizado para lograr un gran número de DCs está basado en la diferenciación de DCs *in vitro* a partir de monocitos con la mediación de diferentes combinaciones de citoquinas, entre ellas, la IL-4 conjuntamente con el factor estimulador de colonias granulomonocíticas (GM-CSF) y TNF- α . Otros grupos de citoquinas como IL-10, IL-13 e IL-17 son igualmente utilizadas para tales propósitos. En la actualidad, para la obtención *in vitro* de DCs diferenciadas se emplean dos protocolos de forma más recurrente, el primero es la purificación de células CD34+ a partir de sangre periférica, en presencia de GM-CSF + TNF- α y la segunda es la obtención de DCs a partir de monocitos aislados de sangre periférica y su posterior diferenciación con GM-CSF + IL-4 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). El perfeccionamiento en la obtención de DCs, ha generado la posibilidad de obtener un gran número de éstas para su análisis *in vitro* y a su vez aproximarse a conocer su plasticidad funcional al ser capaces de desencadenar respuestas inmunológicas diversas.

1.4.3. Función Inmunomoduladora de las DCs

Una de las características funcionales de las DCs es su capacidad para inducir

polarización y respuesta antígeno-específica de células T o alternativamente, de inducir tolerancia inmune. (Dhodapkar et al., 2001). En ausencia de estímulos pro-inflamatorios las DCs permanecen en un estadio inmaduro, en el cual su actividad efectora sobre linfocitos B o T esta reprimida (Penna and Adorini, 2000). Además, las DCs poseen una importante capacidad endocítica y su afinidad para captar antígenos circulantes esta mediada por receptores de superficie, entre los cuales cabe resaltar los receptores de complemento, receptores para la fracción constante de las inmunoglobulinas (CD32- *Cluster of Differentiation* 32), integrinas y receptores de tipo *scavenger* (CD91, CD36) (Piemonti et al., 1999). La exposición de las DCs a estímulos pro-inflamatorios desencadena una amplia variedad de cambios funcionales en la célula, dentro de las cuales principalmente se reconocen la acción efectora de activación de linfocitos T y la expresión de una amplia gama de moléculas de superficie involucradas en la co-estimulación de linfocitos T. Al ser estimuladas por citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IFN- γ o complejos como el LPS o CD40L (Ligando CD40), las DCs adoptan un fenotipo maduro, donde su actividad molecular es modificada, permitiendo responder a un gran número de estímulos extracelulares a través de la expresión de receptores de quimioquinas que permiten a las DCs migrar hacia los focos inflamatorios y/o en búsqueda de nodos linfoides donde activar la respuesta inmune celular y humoral (Iliev et al., 2009). Una DC madura expresa en su superficie celular moléculas de tipo CD80, CD83 y CD86 (Figura 5), las cuales le aportan la capacidad para estimular linfocitos T. Además de las características anteriormente mencionadas, las DCs maduras expresan IL-12, una citoquina pro-inflamatoria relacionada con la inducción de la respuesta de linfocitos T_H, la activación de linfocitos T_C y la producción de IFN- γ (Hue et al., 2006).

A su vez, se han desarrollado diferentes estrategias para inducir la capacidad tolerogénica de las DCs. Algunas sustancias empleadas como inmunosupresores

estimulan dicha propiedad, como la Dexametasona, o la forma activa de la Vitamina D, 1,25 dihidroxicolecalciferol vitamina D3, que inducen un estado semimaduro a las DCs, previniendo la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras y la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12 (Gauzzi et al., 2005; Xia et al., 2005).

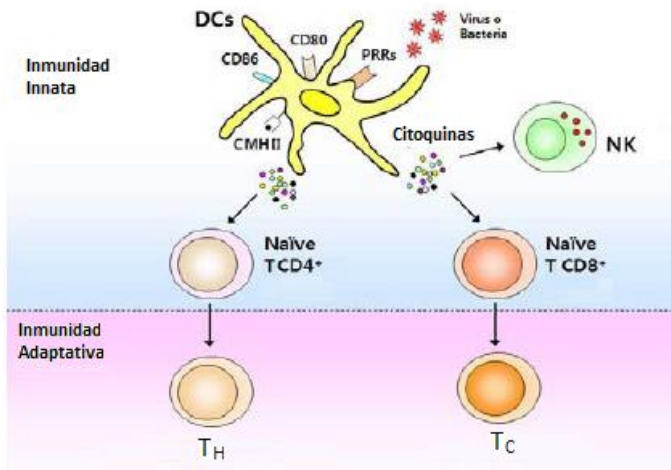


Figura 5. DCs en el sistema inmune., las DCs juega un papel fundamental en la mediación del progreso de enfermedades o protegiendo contra agentes externos. Las DCs son nexo de unión entre la inmunidad innata y adaptativa. Tomado y modificado: (Gi et al., 2009).

1.5. Patologías Aloinmunes y Autoinmunes

El sistema inmune cumple la función principal de organizar una respuesta efectiva frente a patógenos extraños que intentan invadir el organismo, los reconoce, genera una respuesta y los elimina (Moser and Leo, 2010). Si este mecanismo funcional deja de responder a estos ataques del exterior se generan enfermedades a nivel sistémico. Hay varios tipos de alteraciones identificadas dentro del sistema inmune, dentro de los cuales cabe destacar: *i) alergia*, en respuesta a sustancias que, por lo general, no son dañinas pero que desencadenan una respuesta inmune exacerbada; *ii) enfermedad por inmunodeficiencia*, las cuales se refieren a la ausencia de uno o varios de los elementos del sistema inmunitario (Murphy et al., 2008); y *iii) enfermedad*

autoinmune, donde el sistema inmune ataca las células propias del organismo. Se desconoce su origen, pero entre los principales detonantes, se consideran infecciones o reacciones cruzadas dentro de una respuesta inmune. Se conocen factores genéticos asociados, como los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Así, las enfermedades autoinmunes pueden ser mediadas por anticuerpos o por la formación de inmunocomplejos de anticuerpos o de linfocitos T (Salinas et al., 2013). Se conocen tres tipos de enfermedades autoinmunes: a) órgano específicas, b) sistémicas y c) multiorgánicas. Por ejemplo, en el lupus eritematoso sistémico, se forman autoanticuerpos frente a autoantígenos como el ADN (Yurasov et al., 2005); en la esclerosis múltiple, se produce desmielinización y déficit neurológico; en la artritis reumatoide, donde la activación inmune se dirige hacia la síntesis y liberación de diferentes citoquinas, derivando inflamación y daño articular; entre otras patologías asociadas; *iv*) **enfermedad aloinmune**, que es esencialmente un tipo de respuesta adaptativa. Se induce, al reconocer como extrañas moléculas de histocompatibilidad del donante por parte de linfocitos T, actuando principalmente T CD8 efectores. Uno de los aspectos más relevantes es la histocompatibilidad (Seetharam et al., 2010), que evita o atenúa el rechazo de un injerto. Si por el contrario se desarrolla un rechazo, el tratamiento efectivo sigue siendo el uso de fármacos inmunosupresores, como los corticoesteroides o la ciclosporina.

En la actualidad se están empleado terapias alternativas, mejorando las opciones clínicas, como es el caso de las utilización de DCs tolerogénicas. Evidencias procedentes de estudios funcionales en animales revelan que la inducción de la tolerancia es indispensable en la prevención de autoinmunidad (Morelli and Thomson, 2007).

1.6. Inmunoterapia con DCs

La capacidad de las DCs para inducir una respuesta inmune primaria y para coordinar la respuesta innata con la respuesta celular y humoral hace de ellas las dianas perfectas para desarrollar nuevas aproximaciones basadas en la terapia inmunológica (Figura 6). El potencial terapéutico de las DCs ha sido ampliamente documentado en la erradicación de células tumorales mediante la exposición controlada de DCs, *in vitro*, a antígenos específicos asociados con la tumorigénesis. Al re-implantar las DCs activadas en el mismo organismo de origen, se ha podido observar una respuesta inmunogénica y enérgica en la eliminación de células tumorales en modelos animales (Paglia et al., 1996).

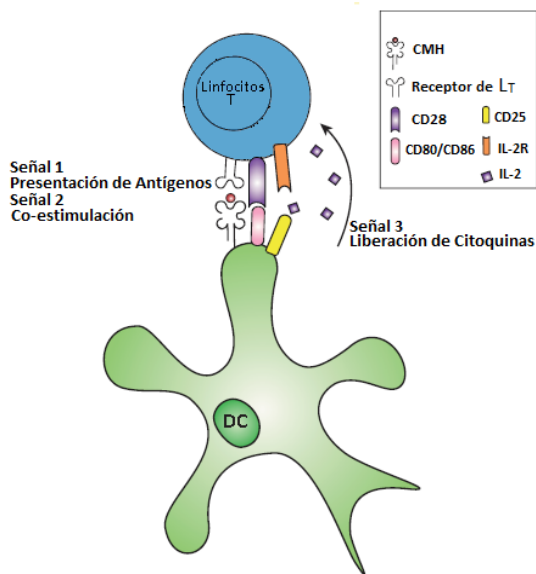


Figura 6. Las DCs se forman en la médula ósea a partir de precursores hematopoyéticos CD34+. La activación ocurre después de que el Linfocito T reconoce un antígeno específico presente en CMH I y/o CMH II. La co-estimulación requiere una segunda señal entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos (APCs), en caso de stress, infección o daño celular. Las moléculas implicadas interactúan principalmente con receptores como CD28 y, a su vez, dicho receptor interactúa con moléculas co-estimuladoras como CD80-CD86 en APCs. Por último, las citoquinas producidas por células T CD4+ y T CD8+ son esenciales, tanto para la generación de la respuesta inmune como para la inducción de inmunotolerancia Tomado y modificado:(Eggermont et al., 2014).

No obstante, la manipulación y alteración de DCs *in vitro* ha sido documentada en el sentido inverso, con el objetivo de atenuar la respuesta

inmune frente a diferentes episodios de inflamación asociados a patologías como la enfermedad de injerto contra el huésped (GvHD), característica en trasplantes de órganos, o en el caso de enfermedades autoinmunes (Chu et al., 2012). Por tanto, la caracterización de moléculas inmunomoduladoras que induzcan estados tolerogénicos en DCs es un campo de investigación activo en donde se pretende establecer modelos de regulación de la respuesta inmunoinflamatoria para dar solución a un gran número de patologías asociadas con la activación inespecífica, o no deseada, de este mecanismo de protección.

1.7. Enfermedad del Injerto contra el huésped (GvHD) como prototipo de aloinmunidad

El trasplante de progenitores hematopoyéticos derivados de médula ósea, sangre periférica o cordón umbilical, es utilizado como opción terapéutica para mejorar diferentes patologías como las enfermedades hereditarias de la sangre, las enfermedades autoinmunes y el cáncer (Bhatia and Walters, 2008). Sin embargo, se ha observado que una de las complicaciones más frecuentes es el alotrasplante (King et al., 2009).

La GvHD es una patología esencialmente autoinmune en la cual linfocitos T del donante ejercen un papel determinante en el ataque inmune a tejidos del huésped. Los linfocitos T del donante atacan directamente los tejidos del receptor, desencadenando procesos de apoptosis en las células de huésped. A su vez, las mismas DCs del huésped son capaces de activar los linfocitos T_H del donante, los cuales liberan IL-2 que simultáneamente activa otras poblaciones de linfocitos como los T_C, causando daño en las células del huésped (Petersen, 2007). Además del daño celular, el proceso también es capaz de generar daño a nivel tisular. En las mucosas se desencadena la liberación de lipopolisacáridos y antígenos celulares, y como resultado, se inicia la activación de macrófagos y

células de tipo *Natural Killer* que amplifican la señal a través de la producción de más citoquinas activadoras de la respuesta inmune. Los daños tisulares más profundos de la GvHD se observan generalmente en órganos como piel, hígado e intestino. La gravedad de las lesiones causadas por la GvHD se relaciona estrechamente con sus formas de presentación: por un parte tenemos la enfermedad “aguda” (expresión de citoquinas tipo T_{H1} y su tiempo de resolución corto), y enfermedad “crónica” (patología específica de histocompatibilidad con elementos y características de una enfermedad autoinmune y una mayor expresión de citoquinas de tipo T_{H2} (Bhatia and Walters, 2008).

Aunque el trasplante de células hematopoyéticas tiene gran potencial terapéutico en casos de anemia y otras disfunciones hematológicas, también se utiliza comúnmente en patologías como sarcomas, neuroblastomas y leucemia aguda tras los respectivos fracasos en los tratamientos primarios. En los últimos años se ha avanzado mucho en el conocimiento de la hematopoyesis y la inmunidad gracias a la utilización de modelos animales como el modelo murino diabético no obeso-inmunodeficiente (NOD-*scid*), que posibilita el injerto de células hematopoyéticas humanas sin que se produzca un fenómeno instantáneo de rechazo. Dicho modelo murino se ha mejorado recientemente con la introducción de una mutación que elimina la expresión de la cadena gamma del receptor de IL-2 (ratones NSG), lo cual permite incrementar la capacidad del injerto y la funcionalidad de las células hematolinfoides humanas sin que se desarrolle rechazo a corto plazo (King et al., 2009). Dicho modelo “humanizado” se utiliza actualmente para el estudio de la hematopoyesis humana, inmunidad innata y adaptativa, autoinmunidad y aloinmunidad (GvHD), enfermedades infecciosas, biología del cáncer y medicina regenerativa.

2. Antecedentes

C4BP y FH se han estudiado ampliamente como inhibidores solubles del sistema de complemento, un componente esencial de la inmunidad humoral. Además se ha postulado que C4BP puede actuar como potencial ligando del receptor CD40 en linfocitos B (Brodeur et al., 2003). Dicha molécula co-estimuladora ocupa un lugar destacado en el desarrollo de la inmunidad celular.

Así, en nuestro laboratorio se inició el estudio del potencial de C4BP sobre las DCs, nexo entre inmunidad innata y adaptativa, cuyo receptor CD40 juega un papel fundamental en la activación de la respuesta inmune adaptativa. Hemos demostrado recientemente que la isoforma minoritaria de C4BP (C4BP β -) es capaz de inducir un estado anti-inflamatorio y tolerogénico a DCs derivadas de monocitos y activadas mediante un estímulo pro-inflamatorio (Olivar et al., 2013). Dicha actividad inmunomoduladora no está ligada a su

conocida función como inhibidor soluble de la vía clásica del sistema de complemento.

A nivel molecular, FH y C4BP son estructuralmente similares al estar compuestos de dominios CCP (*Complement Control Protein*). Por tanto nos planteamos si FH, conocido inhibidor soluble de la vía alternativa del sistema del complemento, sería también capaz de actuar directamente sobre las DCs induciendo un estado anti-inflamatorio y tolerogénico a las mismas, análogo al inducido por C4BP β -, con implicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en trasplante de órganos.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Caracterización de la actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora de los inhibidores solubles del complemento C4BP β - y Factor H sobre DCs derivadas de monocitos humanos (MoDCs).

3.2. Objetivos específicos

I.

Determinar el fenotipo de MoDCs inducidas con IL-4 y GM-CSF, pre-tratadas con FH y posteriormente estimuladas con LPS, cuantificando la expresión de marcadores moleculares de superficie, asociados a su estadio de maduración.

Examinar la capacidad de endocitosis y el perfil de citoquinas inflamatorias de MoDCs tratadas con FH.

Analizar los potenciales receptores moleculares a través de los cuales Factor H podría promover su actividad inmunomoduladora sobre MoDCs maduras.

II.

Evaluar el potencial anti-inflamatorio y tolerogénico de C4BP β - y FH en un modelo *in vivo* de aloinmunidad. Analizar la capacidad de C4BP β - y FH de mitigar la enfermedad del injerto contra el huésped xenogénica (xenoGvHD) en el modelo murino humanizado NSG.

III.

Realizar un estudio comparativo de los perfiles moleculares globales de MoDCs inmaduras y activadas con LPS con el fin de establecer los principales genes y rutas de señalización intracelular inducidos por C4BP β - y FH sobre dichas células.

4. Materiales y métodos

4.1. Caracterización funcional de FH

4.1.1. *Obtención de PBMCs a partir de sangre total*

La obtención de PBMCs y su posterior diferenciación de monocitos a MoDCs se realizó a partir de sangre total, de donantes anónimos, y obtenida previa solicitud al Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona. Las muestras de sangre, con un volumen aproximado de 400 mL por muestra, se centrifugaron a 1500 *xg* durante 20 min a temperatura ambiente con el objetivo de separar el plasma y así realizar un pre-fraccionamiento que facilitase la obtención final de PBMCs durante el gradiente de Ficoll. La fracción de interés, que consistió en una capa leucoplaquetar conformada por leucocitos y plaquetas depositadas sobre la fracción eritrocítica, se diluyó 1:1 en PBS (*Phosphate Buffered Saline*) estéril (PAN Biotech, Aidenbach, Alemania) suplementado con 1mM de EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético). Posteriormente, las muestras diluidas en PBS

se expusieron a un gradiente de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suiza). Para tal fin, el gradiente se realizó en tubos de 50 mL usando 1 volumen de Ficoll sobre el cual se depositaron 2 volúmenes de la muestra diluida. Dicho preparado se centrifugó a 400 $\times g$ durante 30 min a temperatura ambiente. Una vez centrifugadas las muestras, se procedió a recoger la fracción intermedia donde se encuentran las PBMCs, dentro de las cuales los monocitos representan un 75% de la población celular. Las PBMCs purificadas se lavaron dos veces mediante dilución en PBS (PAN Biotech) y centrifugación a 400 $\times g$ durante 10 min a temperatura ambiente.

El conteo de células obtenidas tras el gradiente de Ficoll se realizó mediante citometría de flujo en un BD FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) Calibur (BD Biosciences, NJ, USA) operado con el *software Cell Quest Pro* y utilizando Perfect-Count Microspheres (Cytognos, S.L. Salamanca, España) y el anticuerpo monoclonal anti-CD14 humano (Miltenyi Biotec, Gladbeck, Alemania). La viabilidad celular fue analizada usando 7AAD-(7 amino-actinomicina D-) (BD Biosciences, CA, USA). Tras el cálculo del número total de células, un total de 1×10^6 células por pocillo se sembraron en placas de 24 pocillos (Jet Biofil Co, Guangzhou, China) con el fin de inducir la diferenciación *in vitro* a MoDCs de acuerdo con los procedimientos que se describen a continuación.

4.1.2. Diferenciación de monocitos a MoDCs

Una vez obtenidos los monocitos mediante gradiente de Ficoll, éstos se cultivaron en placas de 24 pocillos (Jet Biofil Co) con una densidad de 1×10^6 células/pocillo y en medio RPMI 1640 completo: Glutamax (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA USA), 10% v/v Suero Fetal Bovino (PAN Biotech), 2mM de L-Glutamina (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA USA), 1% w/v de Penicilina/Estreptomina (Gibco, Thermo Fischer Scientific), suplementado con: 500 UI/mL de IL4 humana recombinante (rHuIL-4, Gentaur Molecular

Products, Voortstraat, Bélgica) y 800 UI/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (rHuGM-CSF, Gentaur Molecular Products). Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 5 días. Al finalizar este periodo de incubación, las células fueron estimuladas con 5 µg/mL de LPS (Sigma Aldrich Co, MO, USA) para conseguir su maduración a MoDCs.

4.1.3. Estudio del fenotipo celular mediante citometría de flujo

Se realizó un estudio de detección de monocitos y MoDCs. Para ello se marcaron 2.5×10^5 de células con 4 µL del anticuerpo anti-CD14-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (Beckman Coulter, CA, USA) en un total de 40 µL de PBS, cuyo objetivo es determinar el número total de monocitos presentes en la población. El estado de maduración de las DCs se evaluó empleado el anticuerpo anti-CD83-FITC, en el canal de fluorescencia FL1 (Beckman Coulter), y la actividad co-estimuladora fue evaluada con el anticuerpo anti-CD86-PE (Ficoeritrina), en el canal de fluorescencia FL2 (Miltenyi Biotec). Las poblaciones celulares se estudiaron en el citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD Biosciences) y el *software Cell Quest Pro* (BD Biosciences).

4.1.4. Determinación de la viabilidad celular

El grado de apoptosis y necrosis de las células maduras se evaluó mediante citometría de flujo con el *software Cell Quest Pro* (BD Biosciences), utilizando el complejo Anexinna V-PE/ 7-ADD (*Anexin V-PE Apoptosis detection kit 1*, / 7 amino-actinomicina D, Becton Dickinson). Los datos obtenidos se analizaron adicionalmente con el *software Flowjo v6.4.7* (Flowjo LLC, Oregon, USA) utilizando la Intensidad Media de Fluorescencia (intensidad del fluorocromo utilizado a una longitud de onda específica, por sus siglas en inglés *MFI*).

4.1.5. *Efecto de C4BP FH en maduración de MoDCs*

Se utilizó la proteína factor H (FH) purificado a partir de plasma humano (Biopur AG, Reinach, Suiza), con el fin de observar su efecto sobre el proceso de diferenciación-maduración de MoDCs. El efecto de dicha proteína fue evaluado adicionándose a una concentración de 5 o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ desde el inicio del cultivo celular de PBMCs. Tras la incubación de las células a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% durante cinco días, se adicionó el estímulo de maduración LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma Aldrich) y una dosis adicional FH. El estímulo de maduración se prolongó durante 24h y una vez finalizado este periodo de tratamiento las células fueron analizadas mediante las técnicas de citometría de flujo antes descritas con el propósito de evaluar el estado de maduración de acuerdo a cada tratamiento realizado.

4.1.6. *Actividad inmunomoduladora de los dominios CCP de FH*

Con el propósito de identificar la región de FH con actividad inhibidora de la maduración de MoDCs, se evaluaron diferentes fragmentos proteolíticos que abarcan diferentes dominios estructurales CCP de la proteína. Los diferentes fragmentos de FH utilizados fueron proporcionados por el Dr. Peter Zipfel (ILRS, Jena, Alemania) y fueron denominados: FHL-1 (comprendiendo los dominios CCP 1 al 7), CCP 8-20, CCP 15-20 y CCP 19-20. La actividad de cada fragmento de FH se evaluó sobre cultivos de monocitos purificados de acuerdo a los protocolos descritos anteriormente y activados con GM-CSF e IL-4. Brevemente, las células en cultivo fueron pre-tratadas individualmente con los diferentes fragmentos CCP y posteriormente se estimularon con LPS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (Sigma Aldrich). El fenotipo de maduración y la activación de MoDCs se evaluaron mediante citometría de flujo al igual que su viabilidad, de acuerdo a los procedimientos descritos en secciones anteriores.

4.1.7. *Función efectora de C4BP y FH sobre receptores celulares*

La actividad inmunomoduladora de FH fue evaluada con el fin de determinar la implicación o no de ciertos receptores comúnmente implicados en la respuesta inflamatoria de las MoDCs activadas.

4.1.7.1. Implicación de moléculas tipo CD11b y CD11c

Las proteínas de superficie CD11b y CD11c constituyen componentes fundamentales de la familia de integrinas de tipo α/β presentes en varias células de sistema inmune humano y participan activamente en la respuesta inmune a través del reconocimiento molecular entre células y sus dianas, controlando la migración y adhesión al endotelio vascular. Monocitos obtenidos de sangre periférica (ver sección 4.1.1.) se incubaron durante 1 h con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo anti-CD11b humano (Southern Biotech, AL USA), 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo anti-CD11c humano (Southern Biotech), o 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticuerpo anti-IgG1 Kappa humano (Southern Biotech); en medio RPMI. Tras la incubación, las células se lavaron con PBS (PAN Biotech) y se centrifugaron a 400 xg . Tras finalizar los lavados, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo suplementado con GM-CSF e IL-4 para estimular la diferenciación de MoDCs. Junto con dichos factores se añadieron de nuevo los anticuerpos contra las moléculas de adhesión CD11b, CD11c, o el isotipo control correspondiente, IgGk conjuntamente con FH (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tras 24h de incubación las células fueron recolectadas, centrifugadas y diluidas en medio RPMI 1640 completo suplementado con los factores de diferenciación IL-4 y GM-CSF. El periodo de incubación se mantuvo durante 5 días tras los cuales se añadió LPS para inducir la maduración. En todos los casos se utilizaron controles positivos y negativos de maduración.

4.1.7.2. Implicación de receptores de glicosaminoglicanos

El estudio de la implicación de receptores de glicosaminoglicanos en la interacción entre MoDCs y FH se realizó mediante adición de 10mM o 20mM de clorato sódico al cultivo celular durante el periodo de activación de 5 días en presencia de 5 µg/mL de FH. Posteriormente a la incubación, se adicionó LPS (5 µg/mL), (Sigma Aldrich) y se observó el fenotipo de maduración mediante citometría de flujo de acuerdo a la metodología antes descrita. En todos los casos se utilizaron los correspondientes controles positivos y negativos de maduración.

4.1.7.3. Implicación de receptores “Scavenger”

Para analizar si la actividad inhibidora de maduración de FH está mediada por receptores tipo *scavenger*, las células se trataron durante 30 min con sulfato de dextrano (100 µg/mL). Después del tratamiento, el periodo de diferenciación de 5 días se llevo a cabo en presencia de FH (5 µg/mL). La maduración se estimuló tras la adición de LPS (5 µg/mL) durante 24h. El fenotipo de maduración se evaluó mediante citometría de flujo de acuerdo a la metodología antes descrita. En todos los casos se utilizaron los correspondientes controles positivos y negativos de maduración.

4.1.8. Capacidad endocítica de las MoDCs

La actividad endocítica de las DCs se analizó de acuerdo a los protocolos publicados previamente por parte de nuestro grupo (Luque et al., 2013). Brevemente, la endocitosis mediada por receptor se cuantificó utilizando DQ-OVA conjugado con BODIPY FL dye (Invitrogen-Thermo Fischer Scientific), mientras que la macropinocitosis determinó mediante incubación con Lucifer Yellow CH fluorescente (λ_{ex} = 426nm y λ_{em} = 540nm en H₂O) (Sigma Aldrich Co) incubando 2 h, a 37°C o a 4°C.

4.1.9. Cuantificación de proteínas

La técnica de BCA (Acido Bicincoínico) se utilizó para cuantificar la cantidad de proteína. Para ello, se realizaron diluciones 1:10 en 100 μL de BCA a partir de las fracciones recogidas para cada experimento. Se elaboró una recta patrón a partir de un stock de 2 mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Roche Applied Science GmbH, Mannheim, Alemania) y se procedió según las instrucciones del fabricante (Pierce-Thermo Fischer Scientific). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C y 5 min a temperatura ambiente previamente a la lectura espectrofotométrica. La lectura de absorbancia se realizó a una longitud de onda de 562 nm.

4.1.10. Cuantificación de citoquinas inflamatorias: IL-12p70 e IL-10

La detección y cuantificación de la citoquina humana IL-12 se realizó mediante el ensayo IL12p40/p70 ELISA (Diaclone SAS, Besançon, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. La curva estándar se preparó con diluciones seriadas de IL-12 desde 200 pg/mL hasta 6,25 pg/mL. La muestra se diluyó 1:5 en el diluyente del estándar. Se emplearon 100 μL por pocillo para el ensayo y cada muestra fue analizada por duplicado. El mismo procedimiento se realizó para la detección y cuantificación de la citoquina humana IL-10, mediante el ensayo IL-10 ELISA (Diaclone SAS) siguiendo las instrucciones del fabricante. La curva estándar se preparó con diluciones seriadas de IL-10 desde una concentración de 400 pg/mL hasta 12.5 pg/mL.

Finalmente, la absorbancia se cuantificó a 450nm utilizando un lector de placas Perkin Elmer 2030, *multilabel reader*, y su *software* de operación V 4.0 (Perkin Elmer, MA, USA).

4.1.11. Electroforesis de FH en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La separación de FH purificado se realizó en gel de poliacrilamida al 8% y en presencia del agente desnaturante SDS. La masa molecular de las proteínas fue calculada utilizando el marcador *Precision Plus Protein™ All blue standards* (BioRad Laboratories Inc, CA, USA).

4.1.12. Análisis de fosforilación de receptores

Con el fin de identificar los receptores encargados de iniciar las vías de señalización que controlan la respuesta anti-inflamatoria e inmunomoduladora de C4BP y FH sobre DCs se realizó un estudio preliminar del estado de fosforilación de residuos de tirosina en dominios de activación e inhibición de inmuno-receptores celulares.

4.1.12.1. Purificación de monocitos mediante selección positiva

Los monocitos se obtuvieron de acuerdo al protocolo previamente descrito en la sección 4.1.1. Un total de 5×10^8 células se marcaron con *CD14 MicroBeads* (Miltenyi Biotec), esto es, al pellet celular resuspendido en 400 μ L de PBS se le adicionó un total de 100 μ L de anti-CD14 *Microbeads* y la mezcla se incubó durante 15 min a 2-8°C. Seguidamente las células se lavaron con 5-10 mL de tampón PBS (PAN Biotech) + EDTA 1mM y se centrifugaron a 400 xg . El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 500 μ L de tampón PBS + EDTA 1mM. La captura magnética se realizó en columnas MACS separadoras y mediante el soporte magnético (Miltenyi Biotec). Se realizaron posteriormente 3 lavados con 3 mL de PBS + EDTA 1mM, para eliminar las células no marcadas. La elución de los monocitos purificados se realizó retirando la columna del soporte magnético seguido de la aplicación de 5 mL de tampón de elución. Las células se recogieron en tubos estériles de 15 mL y se centrifugaron a 400 xg . Las células obtenidas se resuspendieron finalmente en

500 μ L de PBS + EDTA 1mM y se cuantificaron mediante citometría de flujo. Este procedimiento se realizó conforme a lo descrito en la sección 4.1.1.

4.1.12.2. Análisis de Inmunoreceptores fosforilados

Los monocitos de alta pureza, recuperados a partir del protocolo descrito en la sección 4.1.12.1., se estimularon *in vitro* de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 6.1.2 en presencia de las proteínas C4BP β - o FH. Los lisados celulares se prepararon en tampón de lisis suplementado con proteasas y se aplicaron a un *array* de fosforilación de proteínas (*Human Phospho-Immunoreceptor Array Kit*, R&D Systems Europe, Abingdon, UK). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante, permitiendo detectar el perfil de fosforilación de 59 diferentes receptores asociados con la respuesta inmune celular.

4.2. Capacidad anti-inflamatoria e inmunomoduladora de C4BP β - y FH en un modelo de aloinmunidad

El presente estudio pretende establecer un modelo murino de enfermedad del xeno-injerto contra el huésped (xeno-GvHD) utilizando los ratones inmunodeficientes NSG (*NOD scid gamma*; Jackson). La cepa de ratones NSG es la adecuada para la evaluación de estrategias de terapia celular utilizando células dendríticas humanas (Spranger et al., 2012). El estudio que se propone es un paso obligado para evaluar el comportamiento de las MoDCs tolerogénicas derivadas de C4BP β - o FH *in vivo*, en dicho modelo murino.

4.2.1. Mantenimiento de los ratones NSG

Los animales **NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG mice) (NOD.SCID)** fueron obtenidos de la compañía *Charles River Laboratory* (L'Arbresle, Francia).

Los animales fueron alojados, mantenidos y manipulados en el servicio de estabulario del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (SE-IDIBELL), con

número de registro (B-9900010), registro de la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio- (AAALAC Nº1155), bajo condiciones estrictas de aire controlado a través de filtros Hepa, temperatura 20-24°C, 45-65% humedad relativa, ciclos de luz oscuridad de 12h. Los ratones NSG están descritos como animales libres de gérmenes (*germ-free*) y patógenos específicos (SPF), por tal motivo se deben mantener en un sistema cerrado, libre de bacterias y virus que puedan infectarles. Además de las condiciones apropiadas del estabulario, es indispensable para la manipulación de los animales el uso de barreras sanitarias de acuerdo a las normas de seguridad y protección tanto del espacio como del personal en contacto con ellos. El microambiente de hábitat se controló de acuerdo a la guía y a las recomendaciones de criterios sanitarios proporcionados por FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*), que consisten en el mantenimiento de los animales en jaulas con filtro de 330 cm² de superficie y racks ventilados, estabulados en un máximo de 5 animales por jaula, condiciones de higiene y mantenimiento óptimas, material de lecho: viruta de madera autoclavada, agua clorada y pienso irradiado *ad libitum*, pañuelos y tubos de cartón para enriquecimiento ambiental.

Los procedimientos fueron aprobados por el comité ético del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació (DAAM Expediente Nº7251) y supervisado por CEEA-IDIBELL (Comité Ético de Experimentación Animal-IDIBELL). Los procedimientos se llevaron a cabo bajo las normativas vigentes RD53/2013 de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos incluyendo la docencia (transposición de la directiva 2010/63/EU).

4.2.2. Potencial terapéutico de MoDCs tolerogénicas inducidas por C4BP β - o FH en un modelo murino xeno-GvHD

4.2.2.1. Inoculación de PBMCs y tratamiento con C4BP β - o FH

Una vez obtenidas las PBMCs humanas, según el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 4.1.1., se realizó su administración intravenosa de PBMCs con aguja de 25G, a hembras NSG de 8 semanas. Las PBMCs se obtuvieron de tres donantes diferentes. En el registro diario de los animales se valoraron la mejoría de síntomas y tiempo de supervivencia después de la inoculación de MoDCs tratadas previamente *in vitro* con C4BP β - o FH.

Tras los resultados negativos obtenidos al adoptar los protocolos de Notta y colaboradores (Notta et al., 2010), inoculando 1×10^6 PBMCs, y de King y colaboradores (King et al., 2009), con un paso previo de irradiación (2Gy de rayos X, 4h antes de la inoculación de 1×10^6 o 2×10^6 PBMCs, se estandarizó un nuevo protocolo cuya organización se presenta en la [Tabla 2](#).

Tabla 2. Grupos de Administración de PBMCs y MoDCs

Grupos	Inicio experimento	Tras la identificación de síntomas (GvHD)
A	PBS 200 μ L	-
B	2.5×10^7 PBMCs en 200 μ L de PBS *i.v.	-
C		*i.v. 1×10^6 MoDCs+C4BP β -
D		*i.v. 1×10^6 MoDCs+FH

*i.v.: Inoculación Intravenosa.

Se realizaron observaciones periódicas desde el inicio del estudio y una vez identificados los primeros síntomas, se administraron 1×10^6 de MoDCs diferenciadas y tratadas o no con C4BP β - o FH (descrito en el apartado 4.1.2.). Las células fueron resuspendidas en PBS en un volumen máximo de 200 μ L de acuerdo con el peso del ratón (10 mL/kg), en todos los casos con aguja 25G.

4.2.2.2. Cuantificación de células hematopoyéticas humanas y murinas en el modelo xeno-GvHD

Una vez observados los primeros síntomas de *xeno-GvHD*, como la pérdida de pelo, se comprobó la presencia de células inmunes humanas derivadas del injerto de PBMCs mediante citometría de flujo. Se realizaron extracciones de sangre a través de la vena submandibular, obteniendo 10-20 μL de sangre, en tubos de recogida microtainer (Becton Dickinson) y se comprobó la proporción de leucocitos humanos y murinos con 3 μL de anti-CD45 humano conjugado con FITC, (Tonbo Biosciences, CA, USA), y 3 μL del anticuerpo anti-CD45 murino conjugado con PE, (Tonbo Biosciences). Las células se incubaron con los anticuerpos durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 10 volúmenes de solución de lisis *Red Blood Cell Lysis Solution* (Miltenyi Biotec), se mezcló e incubó durante 10 min, se centrifugó durante 5 min, se aspiró el sobrenadante y finalmente las células se resuspendieron en PBS + 0.1% NaN_3 . Además, se analizó la presencia de linfocitos T humanos con los anticuerpos anti-CD3 humano conjugado con FITC, (Tonbo Biosciences), específico de células T; anti-CD8a conjugado con PE (Tonbo Biosciences) para identificar linfocitos T citotóxicos; y anti-CD4 conjugado con APC (Aloficocianina) (BD Pharmingen™, CA, USA) para identificar la subpoblación de linfocitos T cooperadores. Las poblaciones celulares se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando el *software Cell Quest Pro* (BD Biosciences).

4.2.2.3. Determinación Enfermedad y Punto de Criterio Final

Como se describió en el apartado 4.2.2.1., los ratones NSG fueron monitorizados desde el inicio del experimento, con lo cual se realizó un seguimiento exhaustivo, mediante control de peso 2 a 3 veces por semana, llevando a cabo observación de signos clínicos visuales como: postura, alopecia, estado de la piel, encorvamiento y falta de movilidad y se cuantificó la pérdida

de peso. Se determinó el criterio de punto final cuando el peso del animal fue < 10-15% de su peso máximo antes de iniciar el tratamiento, y los criterios descritos como signos clínicos superaron el máximo puntuado como 3, en una escala en donde 0 fue ningún signo y 3 el máximo puntuado del signo analizado.

4.3. Análisis de la expresión génica en MoDCs

4.3.1. Obtención y separación de MoDCs (cell sorting)

Los monocitos obtenidos mediante el procedimiento descrito en la sección [4.1.1.](#), y cuya diferenciación en presencia o ausencia de las proteínas C4BP β - o FH a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y maduración a MoDCs en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS (tratamientos 4 o 16h), se llevó a cabo de acuerdo a lo previamente establecido en la sección [4.1.2.](#), fueron recuperados de las placas de cultivo, centrifugadas a 400 $\times g$ durante 10 min y finalmente resuspendidas en 100 μL de PBS. Con el fin de determinar su viabilidad, se añadió 2 μL de 7AAD-7 Amino Actinomicina D, (Becton Dickinson S.A.) y tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente se diluyeron las células en un volumen final de 400 μL con PBS. Posteriormente se llevó a cabo una separación de las células diferenciadas a DCs en un *Cell Sorter BD FACSAria II* (BD Biosciences), teniendo en cuenta parámetros específicos como los de FSC-tamaño, SSC-granularidad y viabilidad. Las células se recogieron en 500 μL de medio RPMI 1640 completo. Las células se centrifugaron posteriormente a 400 $\times g$ y el sobrenadante se eliminó por aspiración. El pellet celular se almacenó a -80°C para el procesamiento descrito en las siguientes secciones.

4.3.2. Extracción de ARN total de MoDCs

Las MoDCs obtenidas por el anterior procedimiento se procesaron con el *RNeasy Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) para la extracción de ARN

total celular. El ARN total fue obtenido de acuerdo a las instrucciones del fabricante y cuantificado utilizando el analizador *Nanodrop ND-100* (Thermo scientific), observando su calidad mediante la relación de absorbancias Abs_{260}/Abs_{280} estuviese en un rango de (1.8 a 2.0) y la relación Abs_{260}/Abs_{230} (superior a 2.0). El ARN fue almacenado a -80°C en tubos libres de nucleasa hasta su utilización.

4.3.3. RT-qPCR de marcadores de DCs

Con el propósito de confirmar el estado de maduración de las células obtenidas en la sección 4.3.1., previamente al ensayo de expresión génica basado en la obtención de perfiles transcripcionales globales descrito en las siguientes secciones, se realizaron varias reacciones de qPCR para analizar la expresión del marcador de maduración, CD83, y de la molécula co-estimuladora, CD86. Para tal propósito se empleó el sistema *TaqMan Gene Expression Assay*, (Applied Biosystems, CA, USA) solicitando sondas específicas para la detección de la expresión de los marcadores antes descritos (*CD83, assay id Hs00188486_m1, CD86 assay id Hs01567026_m1*). Como control endógeno se utilizaron sondas específicas para detectar la expresión del gen *PPIA* (Ciclofilina A, *assay id Hs99999904_m1*). La amplificación se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el aparato *Real Time PCR 7300* (Applied Biosystems), con el perfil térmico de amplificación: 2 min a 50°C ; 10 min a 95°C ; y 40 ciclos de 95°C durante 15 s, y 60°C durante 1 min.

4.3.4. Obtención de los perfiles globales de expresión génica

Las muestras de ARN obtenidas a partir de los procedimientos en la sección 4.3.1. que describen la obtención MoDCs diferenciadas y maduras en presencia de las proteínas C4BP β - o FH, junto a un control negativo de DCs inmaduras (iDC), se analizaron mediante *micro-arrays*. Para tal fin, un total de 500 ng de ARN total de cada tratamiento se procesaron en la Unidad de

Genómica del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS, Barcelona), donde se analizaron mediante el sistema de análisis genético *Gene Chip* (Affymetrix, Wooburn Green, UK) utilizando el *Affymetrix Human Genome U219 16-Array Plate*. En total se analizaron un total de 32 muestras que incluyeron 2 controles y 10 condiciones por triplicado. Los datos crudos derivados del ensayo de expresión se normalizaron y se analizó su calidad utilizando el software *Affymetrix Expression Console 1.3* (Affymetrix) y el algoritmo *Robust Multi-array Average* (RMA), generando así los valores absolutos de expresión para cada uno de los más de 20.000 genes incluidos en el *micro-array*.

4.3.5. *Análisis de los datos de expresión génica basada en microarrays*

Un primer análisis de los datos de expresión se realizó con el software *Transcriptome Analysis Console*, con el propósito de identificar expresión diferencial entre condiciones. Se realizaron diferentes comparaciones de las replicas analizadas seleccionando aquellas expresiones diferenciales presentando un *fold change* ≥ 2 , con un *p-value* ≤ 0.05 . Los datos obtenidos se representaron en forma de diagramas de Venn para comparar el número de genes sobre-expresados e infra-expresados entre los diferentes tratamientos, utilizando la herramienta *jVenn* (Bardou et al., 2014).

Adicionalmente se utilizó la aplicación *Gene Set Analysis Enrichment* (GSEA) (Subramanian et al., 2005) para detectar la expresión diferencial de grupos de genes con funciones biológicas comunes con el fin de establecer las vías moleculares activadas o reprimidas en cada tratamiento. El análisis de enriquecimiento de grupos de genes se realizó con la información funcional de la base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), (Kanehisa and Goto, 2000) y la selección de grupos de genes con expresión diferencial se

ajustó a los valores obtenidos tras la aplicación de corrección de múltiples comparaciones de tipo FDR (*False Discovery Rate*).

Con el fin de establecer las vías señalización activadas o reprimidas en cada tratamiento, se realizó un análisis específico de expresión diferencial de grupos de genes con funciones biológicas comunes. Dicho análisis fue llevado a cabo con la aplicación *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Qiagen Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) y la lista completa de los transcritos analizados en el ensayo de *microarray* con sus respectivos valores de expresión y significancia estadística obtenidos a partir del análisis con la herramienta *Transcriptome Analysis Console*.

4.3.6. Validación de los perfiles de expresión

4.3.6.1. Síntesis de ADNc

El ARN total obtenido a partir de los diferentes tratamientos establecidos para la obtención de MoDCs, a través de la maduración y activación de monocitos, se utilizó para la síntesis de ADN complementario mediante el *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems*). Dicha reacción se llevo a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen de reacción de 40 μ L y utilizando 1.5 μ g de ARN total en un termociclador Gene Amp 9700 (*Applied Biosystems* - Thermo Fischer Scientific) empleando el siguiente perfil de temperaturas y tiempo: 10 min a 25°C, 2 h a 37°C y 5 min a 85°C. Las reacciones se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

4.3.6.2. Análisis de transcritos mediante PCR cuantitativa (qPCR)

Con la información obtenida a partir de los análisis de expresión génica derivados del ensayo de *microarrays* se seleccionaron un total de 14 genes a validar mediante PCR cuantitativa (ver [Tabla 3](#)). Para tal objeto se utilizó el ensayo *TaqMan Gene Expression Assays Array 96 Well Plate* (*Thermo Fisher*

Scientific, Carlsbad, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho ensayo contenía los oligonucleótidos para amplificar 14 genes diferencialmente expresados en alguno de los diferentes tratamientos analizados y dos controles endógenos: el gen 18S rRNA (*assay id* Hs99999901_s1), y el gen *PPIA* (Ciclofilina A, *assay id* Hs04194521_s1). La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystem, Carlsbad, USA) con el siguiente perfil térmico de amplificación: 2 min a 50°C; 10 min a 95°C; y 40 ciclos de 95°C durante 15 s, y 60°C durante 1 min. La cuantificación relativa se realizó a través de los programas *RQ manager 1.2.1* y *Data Assist V3.0* (Applied Biosystems), utilizándose los valores Ct de Ciclofilina A como control de normalización.

Tabla 3. Lista de genes seleccionados para la validación del ensayo de *microarrays* mediante sondas *Taqman*.

Identificador ¹	Símbolo ²
Hs00924864_g1	CLEC10A
Hs00911250_m1	CSF1R
Hs04187682_g1	CXCL11
Hs00171065_m1	CXCL9
Hs01073447_m1	IL12A
Hs01011518_m1	IL12B
Hs01030384_m1	IL1R2
Hs00175238_m1	IRF8
Hs00234579_m1	MMP9
Hs00234007_m1	MSR1
Hs01045114_g1	NDRG2
Hs01547324_gH	PYCARD
Hs00268049_m1	ROBO1
Hs02330328_s1	SOCS3

1 Información relativa al identificador del gen y a la descripción de su función molecular asociada a la base de datos del proveedor de las sondas *TaqMan*, ThermoFisher®.

2 El símbolo de cada gen se corresponde con la nomenclatura actualizada descrita en por el *HUGO Gene Nomenclature Committee – HGNC*.

Los valores RQ obtenidos para cada gen y condición experimental se analizaron finalmente con *Data Assist V3.0* (Thermo Fisher Scientific). Finalmente se realizó un análisis de correlación lineal (coeficiente de correlación *Pearson*) para comparar los datos de expresión generados entre el ensayo de *microarrays* y el de qPCR.

4.3.7. *Análisis estadístico*

Todos los análisis estadísticos se han realizado con el programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) 12.0 y *GraphPad Prism V4.0* (GraphPad Software Inc, CA USA). Se han hecho análisis descriptivos (N, media, desviación estándar) y análisis de la varianza (One-way ANOVA) con corrección de Bonferroni, para comparar las diferencias entre medias de las variables cuantitativas. Se asumió como diferencias estadísticamente significativas un p-valor ≤ 0.05 .

5. Resultados I – Caracterización de la función inmunomoduladora de FH

De acuerdo con los resultados previos de nuestro laboratorio, se ha reconocido el papel anti-inflamatorio e inmunomodulador o tolerogénico de la isoforma minoritaria del inhibidor del sistema del complemento C4BP β - (Olivar et al., 2013). Los resultados principales de ese estudio demostraron que el fenotipo de maduración de DCs tratadas con C4BP β - y expuestas a LPS asemejan su fenotipo al de las DCs inmaduras (iDCs). Esto sugiere que el factor C4BP β - previene la activación de la respuesta inmune e inflamatoria, y que dicha actividad inmunomoduladora podría tener aplicaciones biomédicas directas en el diseño de terapias destinadas a controlar o atenuar la respuesta inflamatoria en patologías como las enfermedades autoinmunes o el trasplante de órganos.

Este primer apartado de la Tesis Doctoral tuvo como objetivo analizar el potencial inmunomodulador y anti-inflamatorio de la proteína FH. Para ello se utilizó un modelo de diferenciación y maduración de MoDCs sobre las cuales se evaluó la exposición a diferentes estímulos tanto activadores de la respuesta inmune como represores de la misma.

Previamente al inicio de los experimentos dirigidos a caracterizar la función inmunomoduladora de FH, se analizó la pureza de 2 fuentes diferentes de FH purificado a partir de plasma humano y distribuido por 2 casas comerciales diferentes Biopur AG (Reinach, Suiza) y Hycult Biotech (Uden, Netherlands). En el análisis de las respectivas proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE (Figura 7) no se observó una diferencia sustancial entre ambos FH purificados, por lo tanto se decidió realizar la caracterización funcional con el FH de *Biopur*.

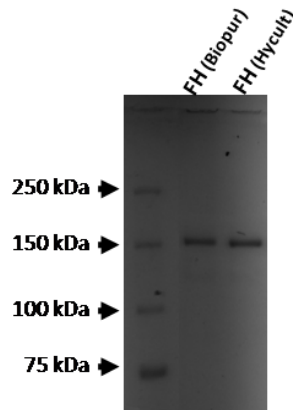


Figura 7. Electroforesis de FH en gel de poliacrilamida. FH humano adquirido de 2 casas comerciales diferentes fue analizado mediante SDS-PAGE para verificar su grado de pureza. El gel fue teñido con *Coomassie Blue* (BioRad). El marcador de masa molecular utilizado para estimar el tamaño de FH fue *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Marker* (BioRad).

5.1. Influencia de FH en la diferenciación/maduración de MoDCs

Las DCs son las principales células presentadoras de antígenos, importantes en estimulación y regulación de la respuesta de linfocitos T en el sistema

inmune. Por tanto, es importante analizar el efecto de FH sobre marcadores específicos de diferenciación/maduración de las DCs.

En primer lugar, los monocitos obtenidos a partir de PBMCs se cultivaron durante 5 días en presencia de IL-4 y GM-CSF para obtener una población celular diferenciada a DCs. Las DCs obtenidas a partir de la diferenciación con IL-4 y GM-CSF representan DCs inmaduras (iDC). El tratamiento adicional con LPS durante un periodo de 24h sobre las DCs diferenciadas nos permitió obtener las DCs maduras (mDC). Se seleccionó el estímulo de maduración LPS (*Lipopolysaccharide from Escherichia coli*) debido a su reconocido papel en la activación de la maduración de DCs vía Toll Like Receptor-4, (TLR-4), (Olivar et al., 2013). Además, el LPS es un importante componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, y se presenta como un potente activador de células inmunes. Varios estudios han demostrado que tras el reconocimiento de LPS las DCs producen citoquinas pro-inflamatorias y expresan el antígeno de maduración CD83, perteneciente a la superfamilia de Inmunoglobulinas de tipo G. (Matasic et al., 1999). A su vez, se estandarizó la monitorización del estado de maduración de las DCs mediante citometría de flujo previo marcaje de las mismas con anticuerpos anti-CD83 y anti-CD86. Como se mencionó anteriormente, el fenotipo CD83+ sería indicador de maduración de DCs, y el fenotipo CD86+ se correspondería con la identificación de células APCs capaces de interactuar y activar células T (Manome et al., 2000). Este protocolo de fenotipación se utilizó para evaluar diferentes aspectos de la inmunomodulación que ejerce FH sobre DCs bajo diferentes condiciones, presentadas en los siguientes apartados de la presente Tesis Doctoral.

En la [Figura 8](#) se presentan los fenotipos respectivos de DCs tras su marcaje con anticuerpos anti-CD83 y anti-CD86 y análisis mediante citometría de flujo. En el panel A se presenta un diagrama de densidad del contenido total de

células recuperadas durante el cultivo, a partir de las cuales se seleccionó la subpoblación de DCs (ver recuadro en el interior del panel), la cual presentaba la granularidad (*SSC-H, Side Scatter*) y el tamaño (*FSC-H, Forward Scatter*) asociado al fenotipo característico de DCs de acuerdo a estudios previos (Olivar et al., 2013). Tras la inspección específica de esta subpoblación celular, se pudo identificar un perfil diferencial entre las células iDCs y mDCs (paneles B y C, respectivamente). En ambos casos la proporción de células con fenotipo CD86+ (señal de PE-anti-CD86 a 585 nm) es superior al 95% de la población celular, lo cual es indicativo del enriquecimiento en APCs. El perfil diferencial entre iDCs y mDCs se observó en las células con fenotipo CD83+, (señal de FITC- anti-CD83 a 530 nm), que el caso de iDCs alcanzó un valor del 44% (cuadrante Q2) mientras que en el caso de las mDCs se observó un perfil de maduración con una proporción de células CD83+ del 94%.

De acuerdo con la proporción de células que expresan el fenotipo CD83+/CD86+, hemos observado FH inhibe la maduración de un gran porcentaje de células (Figura 8, panel E), que representan un fenotipo análogo al observado tanto para células iDCs (células no tratadas con LPS, control negativo de maduración) como para células pre-tratadas con C4BP β - (Figura 8, panel D), (Olivar et al., 2013). Esto sugiere que el FH, al igual que C4BP β -, prevendría la activación de la respuesta inmunoinflamatoria mediada por exposición a LPS.

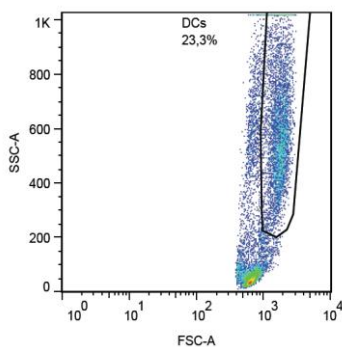
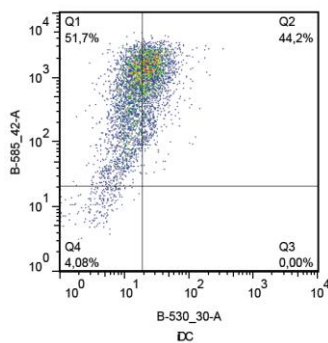
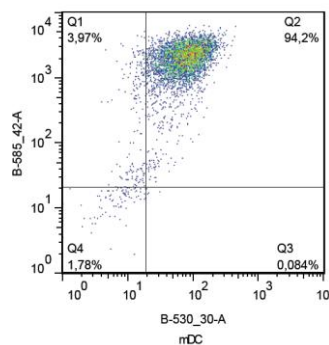
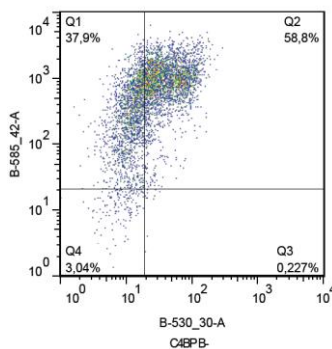
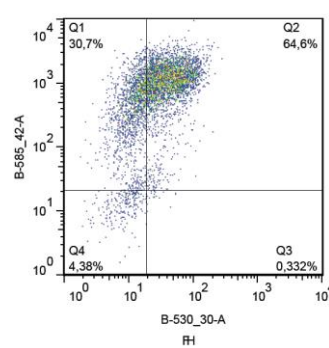
A**B****C****D****E**

Figura 8. Fenotipos de maduración en MoDCs. Las células fueron marcadas simultáneamente con PE-anti-CD86 (585 nm, eje vertical) y FITC-anti-CD83 (530 nm, eje horizontal) para detectar maduración. A – Gráfica de puntos indicando el tamaño y granularidad de células en cultivo. El recuadro al interior indica la población de MoDCs diferenciadas. B y C – Fenotipo de maduración/activación CD86/CD83 para células iDCs y mDCs, respectivamente. D y E – Fenotipo de maduración/activación para células tratadas con C4BP β - y FH, respectivamente y maduras con LPS.

Tras los diversos ensayos realizados y las réplicas analizadas, se pudo establecer que los fenotipos observados para cada tratamiento establecido son

reproducibles, y por tanto, constituyen una herramienta útil para la monitorización de la maduración y activación de mDCs.

Posteriormente, se evaluó la expresión de varios marcadores de superficie y moléculas co-estimuladoras características de DCs durante el tratamiento con FH. A concentraciones de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o superiores se observó que FH disminuye la expresión en superficie de moléculas como CD40, CD80, CD83 y CD86 en MoDCs estimuladas con LPS, mientras que las moléculas CMH-II (HLA-DR) no vieron afectada su expresión bajo las mismas condiciones (Figura 9).

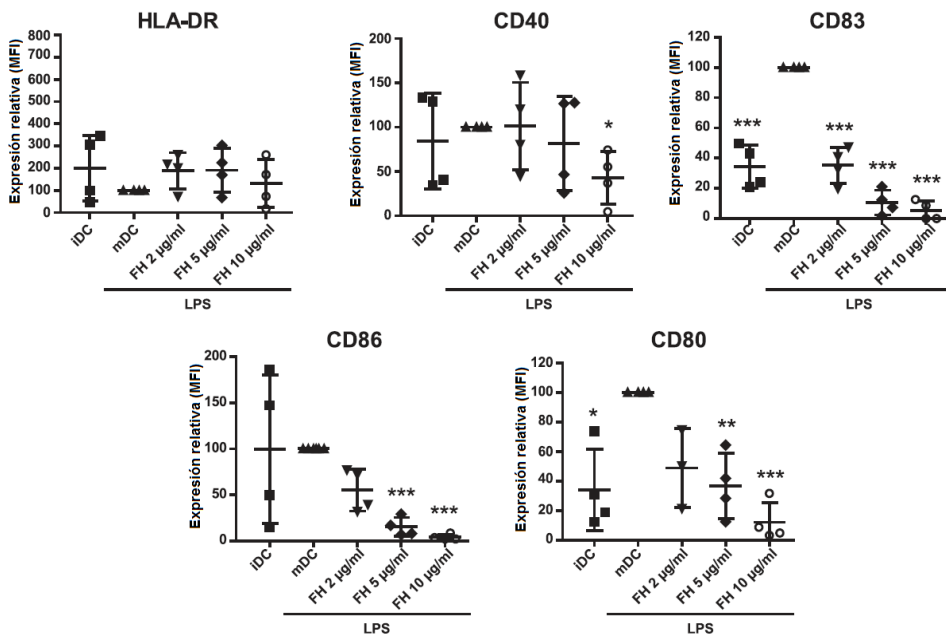


Figura 9. Fenotipo de activación de MoDCs tratadas con FH. La adición de FH a diferentes concentraciones durante el proceso de diferenciación y maduración se evaluó en términos de la intensidad media de fluorescencia (MFI) emitida por los respectivos marcajes fluorescentes asociados a los anticuerpos anti-HLA-DR, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD83 y anti-CD86. Los datos se muestran en % de expresión respecto a la condición control (mDC). (n=4). *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

5.2. El tratamiento con FH no afecta a la viabilidad de las MoDCs

Una vez observada la actividad inhibitoria de FH sobre la maduración de MoDCs, analizamos si FH afectaba a su viabilidad. Para ello, las MoDCs pretratadas o no con FH, fueron analizadas mediante citometría de flujo

utilizando el sistema Anexina-V/7AAD, que permite determinar procesos de apoptosis en sus diferentes estadios. En los paneles A, B, C, y D de la [Figura 10](#) se observan los fenotipos de viabilidad para cada uno de los tratamientos estudiados. Mientras la Anexina V (marcada con el fluoroforo PE) determina la asimetría en la membrana celular a causa de la translocación de los residuos de fosfatidil serina desde la cara interna de la membrana hacia el exterior, el reactivo 7-amino-actinomycin D (7AAD) actúa como indicador de la integridad de la membrana debido a su alta afinidad por el ADN y a su impermeabilidad celular. El porcentaje de células viables (cuadrante Q4) fue del 87%, en promedio, y el análisis estadístico de los diferentes experimentos (n=6), realizados independientemente, demostró que los datos de viabilidad son consistentes y que en ningún caso el tratamiento de MoDCs con FH tiene efectos significativos sobre la viabilidad celular ([Figura 11](#)). Por lo tanto se pudo demostrar que el papel inhibidor de FH muy probablemente sea consecuencia de activación y/o represión de mecanismos celulares específicos mediante interacción directa con receptores celulares de superficie y no a inducción de apoptosis.

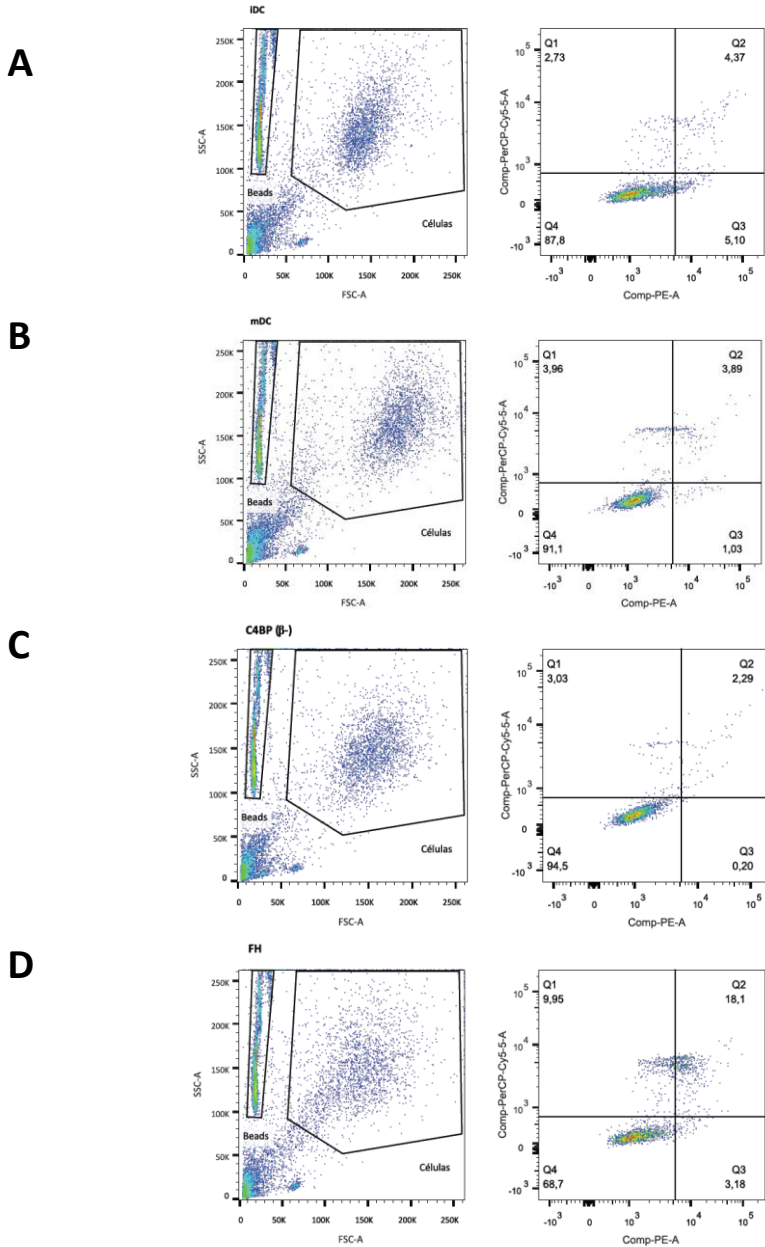


Figura 10. Viabilidad de MoDCs. Marcaje dual de MoDCs con PE-Anexina V (señal en eje horizontal) y con 7AAD (señal en eje vertical) para detectar apoptosis derivada de los pre-tratamientos con C4BP β- y FH durante el proceso de diferenciación y maduración. Los gráficos de puntos indicando el fenotipo de tamaño y granularidad se presentan en los paneles izquierdos, y a la derecha los gráficos de puntos representan la viabilidad celular. A y B fenotipos de viabilidad para células iDC y mDC, respectivamente. C y D fenotipos de viabilidad para células tratadas con C4BP β- y FH, respectivamente.

Para estos ensayos de viabilidad descritos anteriormente se ha incluido como control adicional el tratamiento de células DCs con Vitamina D3 (datos no mostrados), debido a su conocido papel inmunomodulador sobre la diferenciación y maduración de MoDCs, y al efecto sobre la viabilidad de este tipo de células (Nikolic and Roep, 2013; Piemonti et al., 2000).

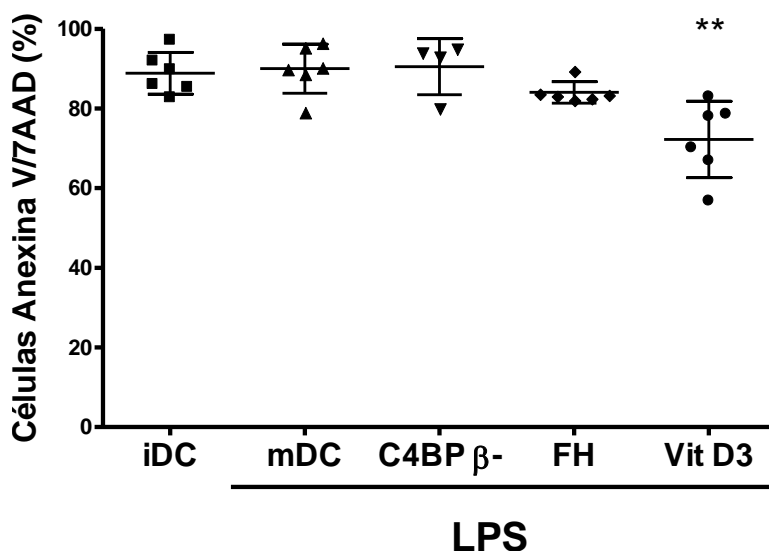


Figura 11. Cuantificación de la viabilidad celular a partir de la tinción con Anexina V y 7AAD. Los valores porcentuales de viabilidad celular obtenidos a partir de 6 réplicas experimentales se presentan en forma de gráfico de dispersión con representación de la media \pm desviación estándar. **, $p \leq 0.01$.

5.3. Efecto inmunomodulador conjunto de C4BP β - y FH

Una vez observada la actividad de FH sobre las MoDCs inducidas con LPS, se evaluó la posibilidad de que existiera una sinergia entre C4BP β - y FH en cuanto su actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora en MoDCs. Se pre-trataron las células con una mezcla de las dos proteínas a diferentes concentraciones y se adicionó LPS para su maduración. El estudio de la acción inmunomoduladora de las proteínas individualmente sirvió como punto de partida para cuantificar un posible efecto aditivo en la inhibición de la activación de MoDCs. Así, las MoDCs fueron pre-tratadas con C4BP β - y FH, individualmente y de forma

conjunta, a concentraciones de 5, 2 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el medio de cultivo. El estudio de su efecto en el fenotipo CD83 y CD86 de MoDCs se efectuó mediante citometría de flujo teniendo en cuenta los respectivos controles de maduración. Los resultados de este experimento se presentan en la [Figura 12](#) donde se observó la ausencia de acción sinérgica o aditiva entre C4BP β - y FH sobre las MoDCs maduras. Particularmente, se observó el máximo efecto inmunomodulador de ambas proteínas a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluyéndose su efecto hasta presentar una actividad inmunomoduladora casi nula a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

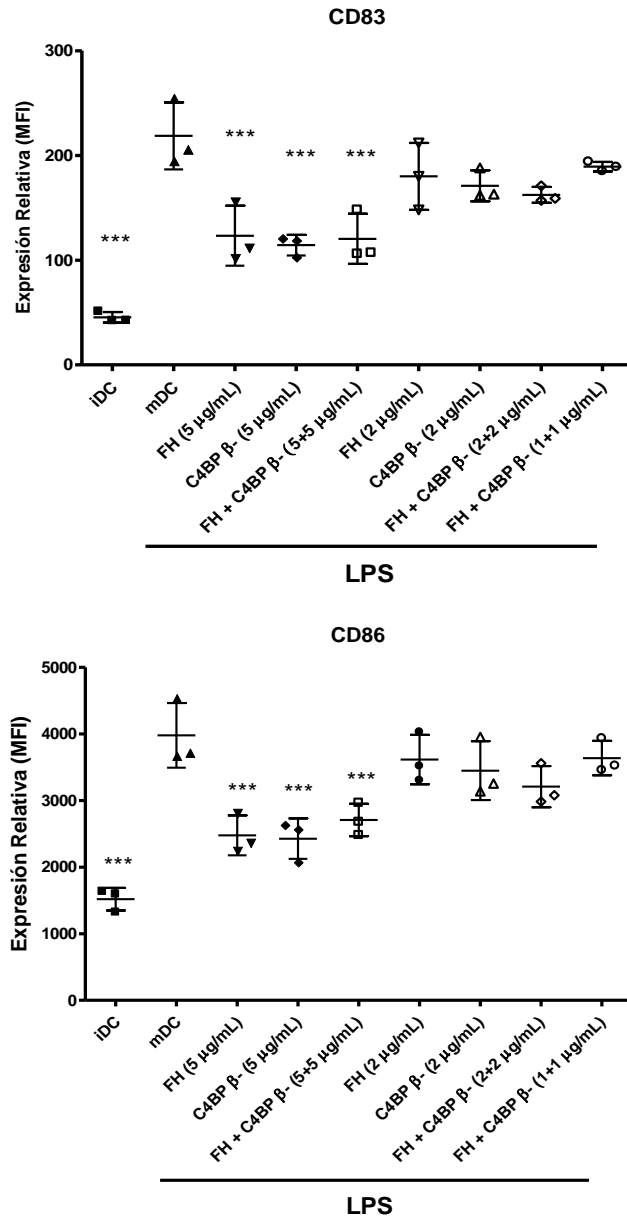


Figura 12. Ausencia de sinergismo en la actividad inmunomoduladora de FH y C4BP β-. Se realizó un pre-tratamiento con DC utilizando diferentes concentraciones de las proteínas, de forma individual o conjunta, sobre las MoDCs. La expresión de los marcadores de superficie se cuantificó en términos de la intensidad media de la fluorescencia (MFI) emitida por los marcajes con PE-anti-CD86 y FITC-anti-CD83. (n=3). ***, $p \leq 0.001$, respecto mDC.

5.4. Inhibición del perfil inflamatorio de MoDCs mediado por FH

Una de las principales características de las MoDCs tras su maduración mediante el estímulo LPS es la producción de una gran variedad de citoquinas señalizadoras de un estado inflamatorio. Además de estudiar el efecto de FH sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de MoDCs, también se analizó la producción de citoquinas anti-inflamatorias para determinar si se producía un cambio en el perfil señalizador de MoDCs en respuesta a la exposición a FH. En la [Figura 13](#) se resume la cuantificación de IL-12, IL-10, IL-8, IL-6, TNF- α e IFN- γ , testadas en sobrenadantes de cultivos de MoDCs diferenciadas, y maduras en contacto con LPS en presencia o no de FH.

El pre-tratamiento con FH revirtió el perfil pro-inflamatorio característico de las MoDCs cuando son estimuladas con LPS, disminuyendo significativamente la secreción de IL-12, IL-8, IL-6, TNF- α e IFN- γ , mientras que la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 fue significativamente mayor a la observada en mDCs sin tratamiento con FH.

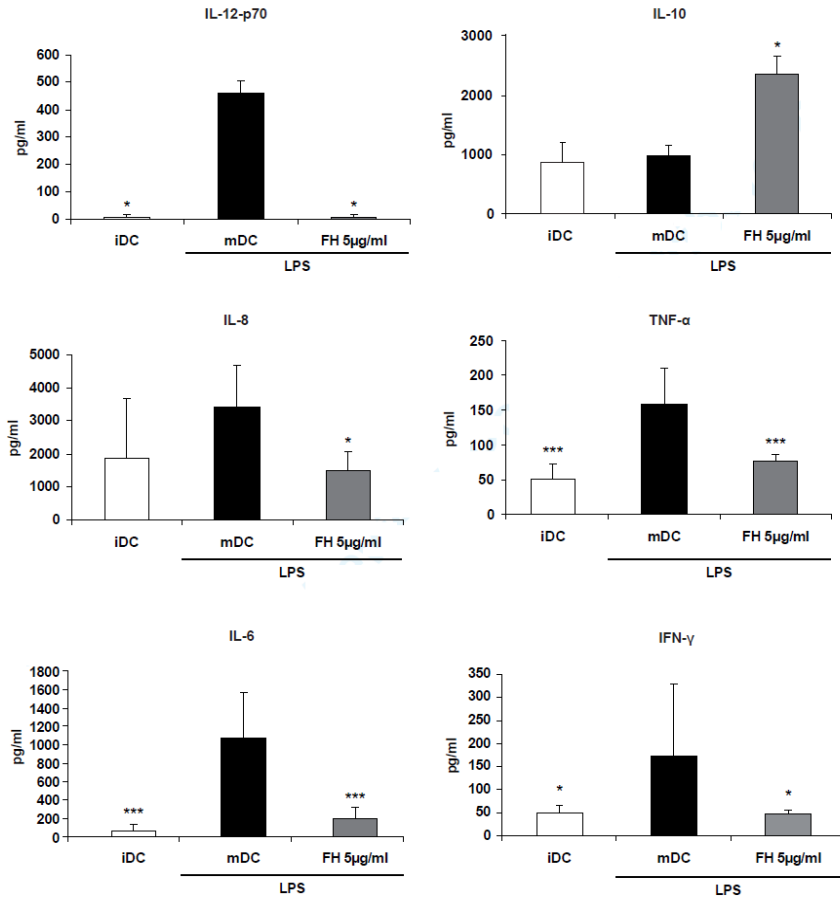


Figura 13. Cuantificación de citoquinas pro- y anti-inflamatorias en sobrenadantes celulares tras la diferenciación y maduración de MoDCs. En todos los casos se muestran los valores obtenidos en células inmaduras (iDC), células maduras (mDC, estimuladas con LPS) y células maduras pre-tratadas con FH y estimuladas con LPS. (n=3) * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, respecto a mDC.

5.5. Caracterización de la actividad de FH durante los estadios de diferenciación/maduración de MoDCs

En las secciones anteriores se ha caracterizado la capacidad inmunomoduladora de FH sobre MoDCs, la concentración a la cual se aprecia dicho efecto, y si dicha actividad tolerogénica puede ser potenciada con otras moléculas con similar capacidad como C4BP β -. No obstante, los ensayos realizados no ofrecen información relevante en lo concerniente al estadio de diferenciación de MoDCs sobre el cual FH ejerce su función. Por ello, se diseñó

un experimento longitudinal para evaluar y dilucidar la etapa de diferenciación de MoDCs en la cual FH es activo.

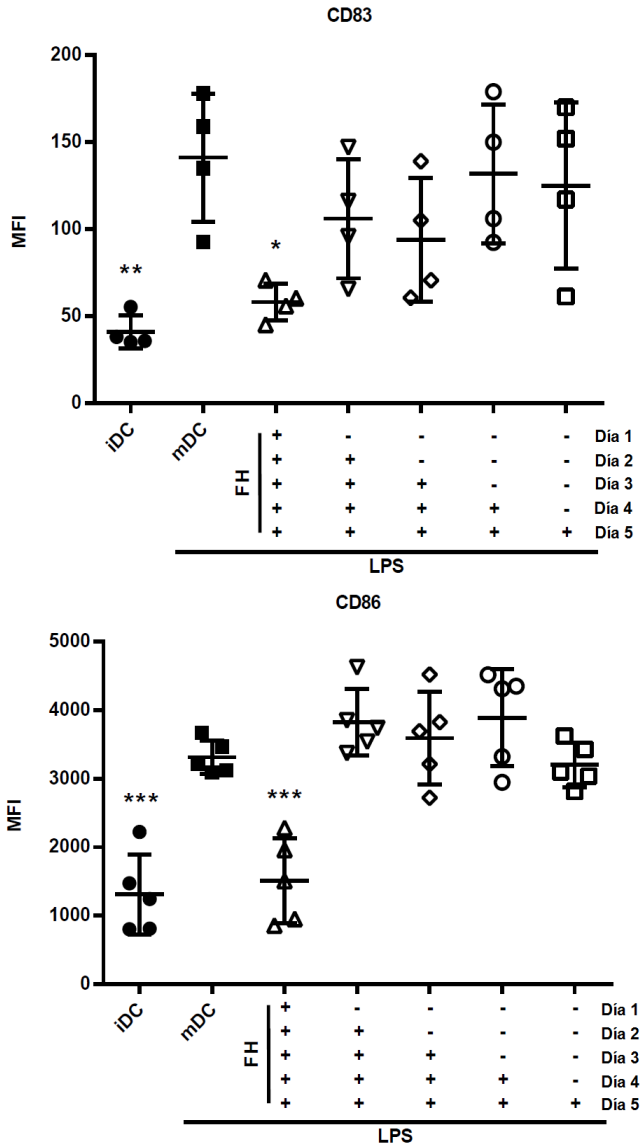


Figura 14. Efecto inmunomodulador de FH durante los diferentes estadios de diferenciación y maduración de MoDCs. La adición de FH de manera progresiva durante el proceso de diferenciación se cuantificó analizando la intensidad media de la fluorescencia (MFI) emitida por los marcajes con FITC-anti-CD83 (panel superior), (n=4) y PE-anti-CD86 (panel inferior). (n=5). ***, p ≤ 001. Respecto a mDC.

En primer lugar se evaluó la adición secuencial de FH (5 µg/mL) durante el proceso de diferenciación de monocitos a MoDCs, mediado por IL-4 y GM-CSF, seguido por estimulación con LPS, en un periodo de 5 días. El efecto de FH sobre los diferentes estadios de diferenciación se analizó mediante análisis de los marcadores de superficie CD83 y CD86, y sus resultados se presentan en la [Figura 14](#). Se observó que la inhibición del proceso de diferenciación y maduración de monocitos a MoDCs, mediada por FH, ocurre en las etapas más tempranas del mismo. La adición de FH a partir del día 2 en adelante no presenta la actividad inmunomoduladora y anti-inflamatoria observada a partir de la adición de FH desde el día 1 del proceso de diferenciación de MoDCs.

Con el propósito de confirmar el papel inmunomodulador y anti-inflamatorio de FH sobre MoDCs a lo largo de su proceso de diferenciación y maduración, se evaluaron también los niveles de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 en el medio de cultivo, en respuesta a la exposición a LPS. Los resultados obtenidos ([Figura 15](#)), confirmaron lo observado a nivel de fenotipación CD83/CD86, demostrando que la adición de FH a partir del día 2 no tiene efecto inmunomodulador y anti-inflamatorio sobre las MoDCs.

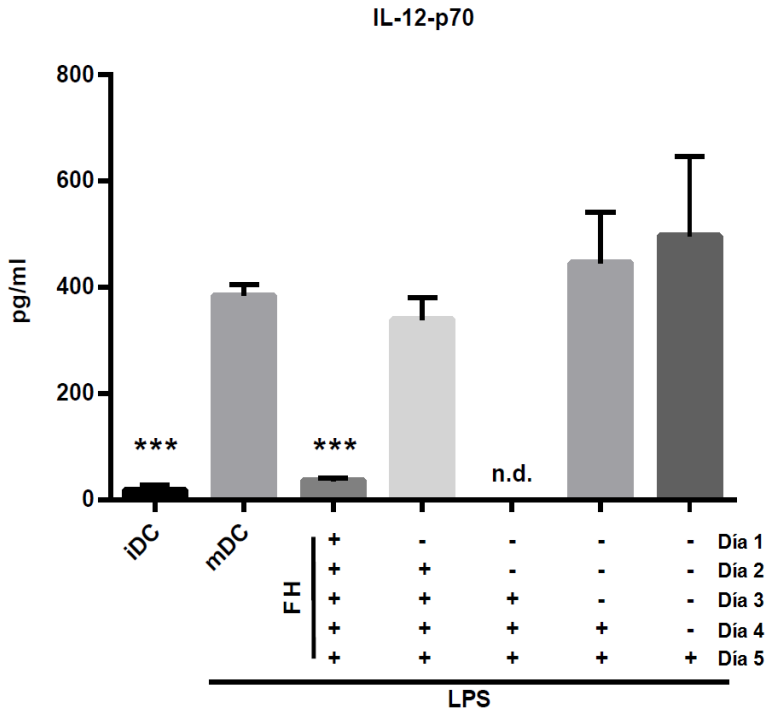


Figura 15. Producción de IL-12 por MoDCs estimuladas con LPS. Se evaluó la producción de dicha citoquina pro-inflamatoria bajo la adición secuencial de FH durante el proceso de diferenciación/maduración (n=3). ***, $p \leq 0.001$. Respecto a mDCs; n.d., no se ha determinado.

Además, se realizó un experimento análogo eliminando la exposición a FH de forma secuencial. Así, la adición de FH (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante el proceso de diferenciación y maduración de MoDCs se hizo desde el día 1, y mediante lavados de las células expuestas a FH, éste se retiraba progresivamente hasta el día 5 de cultivo. Los resultados observados corroboran que la presencia de FH desde día 1 es indispensable para inhibir la maduración de MoDCs en respuesta a LPS (Figura 16).

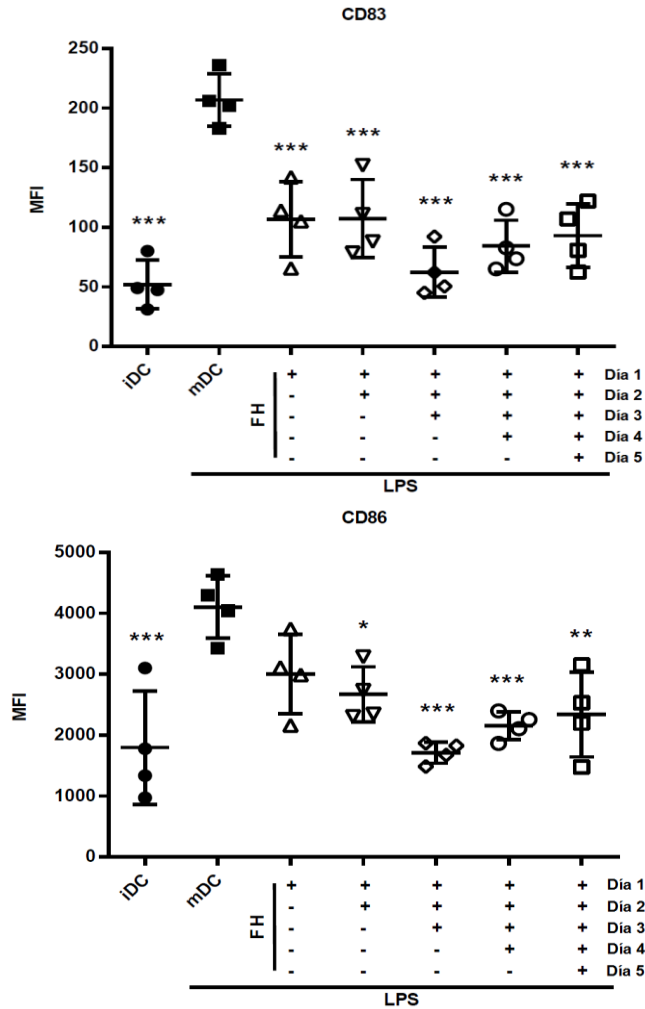


Figura 16. Efecto inmunomodulador de FH durante los diferentes estadios de diferenciación y maduración de MoDCs. La eliminación de FH de manera progresiva durante el proceso de diferenciación se evaluó mediante la intensidad media de la fluorescencia (MFI) emitida por los marcajes con FITC-anti-CD83 (panel superior) y PE-anti-CD86 (panel inferior) (n= 4). ***, p ≤ 0.001. Respecto a mDC.

5.6. Modulación de la capacidad endocítica de MoDCs mediada por FH

Se estudió la capacidad endocítica de las MoDCs, y cómo ésta se ve afectada por la presencia de FH durante su proceso de diferenciación y maduración. Este análisis se realizó utilizando los sistemas DQ Ovalbúmina y *Lucifer Yellow CH* para la detección de endocitosis mediada por receptor y macropinocitosis no específica, respectivamente. En el caso de DQ Ovalbúmina, la correspondiente

señal fluorescente es dependiente de la internalización y digestión proteolítica de la proteína, que al ser procesada por las proteasas intracelulares generarán pequeños péptidos fluorescentes tras la eliminación del *self-quenching* que presenta la proteína intacta.

En cuanto al reactivo *Lucifer Yellow CH*, su alta solubilidad en medio acuoso permite analizar la endocitosis no específica de solutos, nutrientes y/o antígenos, también conocida como macropinocitosis. La internalización de dichas moléculas reporteras se analizó a 37°C y se comparó paralelamente con la efectuada en condiciones control (4°C). En la [Figura 17](#) se observan los resultados de la capacidad endocítica de MoDCs inmaduras, es decir, sin exposición a LPS. Dicha capacidad endocítica se ve significativamente afectada cuando las células son diferenciadas en presencia de FH reduciéndose en, al menos, un 50% el paso de las moléculas reporteras al interior de las células MoDC diferenciadas.

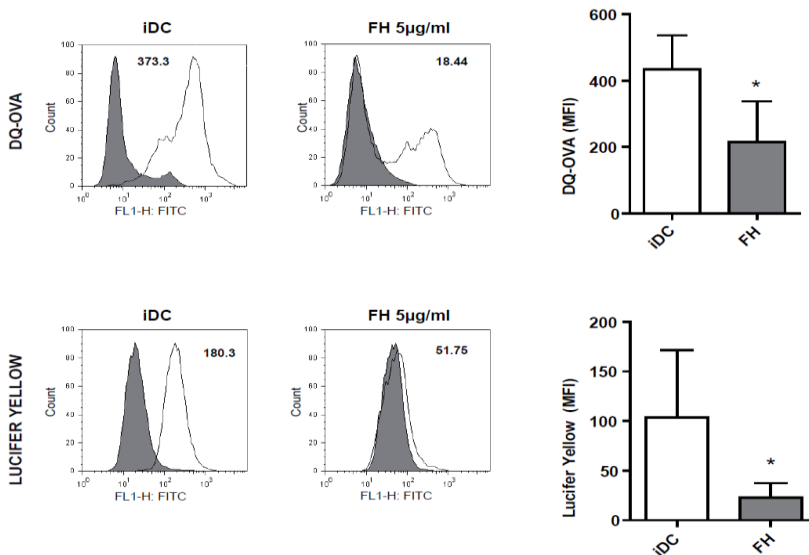


Figura 17. Capacidad endocítica de células MoDCs inmaduras. Las células diferenciadas fueron tratadas con DQ Ovalbúmina y *Lucifer Yellow* y la fluorescencia intracelular derivada de la activación de ambos compuestos se analizó mediante citometría de flujo. Las áreas de color gris indican la endocitosis inespecífica (incubación a 4°C), mientras que las áreas en blanco indican la señal de endocitosis específica. Las gráficas de barras de la derecha fueron calculadas a partir de las intensidades medias de fluorescencia (MFI) obtenidas a partir de los histogramas. * $p \leq 0.05$ respecto a IDC. (n=8, DQ Ovalbúmina; n=3, Lucifer Yellow).

El efecto de FH sobre la capacidad endocítica también se evaluó en células maduras, es decir, expuestas a LPS. Los datos mostrados en la [Figura 18](#) demuestran que el patrón de atenuación de la capacidad endocítica característica de DCs maduras se mantiene intacto durante el tratamiento con FH y que a su vez, ambos se reducen significativamente respecto al patrón observado para MoDCs inmaduras.

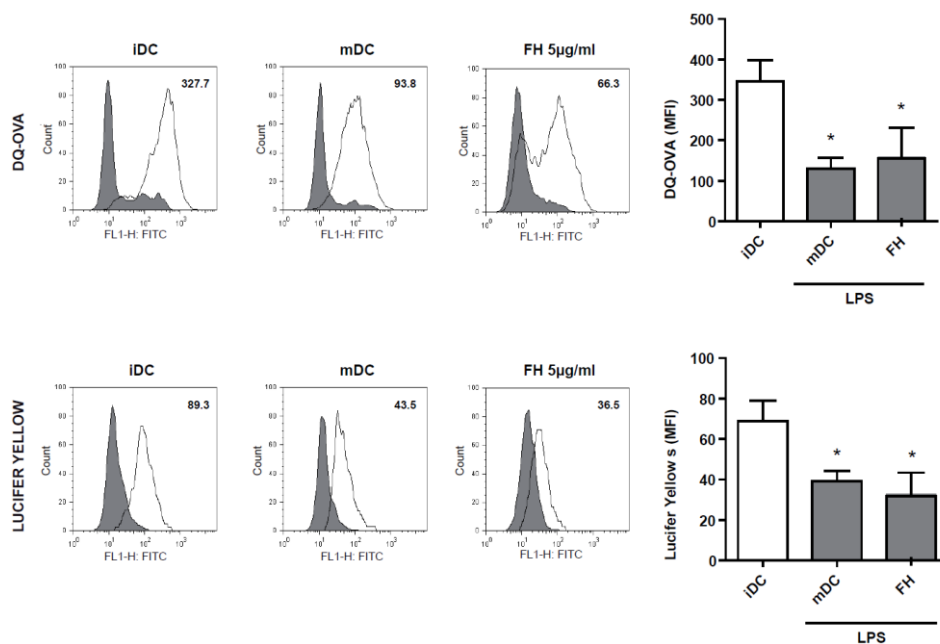


Figura 18. Capacidad endocítica de células MoDCs maduras. Las células diferenciadas y maduras (expuestas a LPS) fueron tratadas con DQ Ovalbumina y *Lucifer Yellow*, y la fluorescencia intracelular derivada de la activación de ambos compuestos se analizó mediante citometría de flujo. Las áreas de color gris indican la endocitosis inespecífica (incubación a 4°C), mientras que las áreas en blanco indican la señal de endocitosis específica. Las gráficas de barras de la derecha fueron calculadas a partir de las intensidades medias de fluorescencia (MFI) obtenidas a partir de los histogramas. * $p \leq 0.05$ respecto a IDC. (n=8, DQ Ovalbumina, n=3, Lucifer Yellow).

5.7. Análisis preliminar de potenciales receptores para FH en MoDCs

Con el fin de profundizar en el mecanismo molecular por el cual FH ejerce su actividad tolerogénica sobre MoDCs, se estudiaron 3 tipos de interacciones potenciales entre FH y receptores de superficie en MoDCs. En primer lugar, se estudió si la acción de FH estaba mediada por los receptores CD11b/CD18 (CR3)

y CD11c/CD18 (CR4), integrinas de superficie implicadas en la adhesión intercelular. Estudios previos han demostrado que CD11b y CD11c actúan como receptores de FH en MoDCs (Svoboda et al., 2015). Tras una co-incubación durante 24h de células iDC con FH y anticuerpos anti- CD11b o anti-CD11c, seguido del correspondiente análisis por citometría de flujo para determinación del fenotipo CD86/CD83, se observó que las integrinas CD11b y CD11c no interfieren con la actividad inmunomoduladora de FH sobre MoDCs (Figura 19).

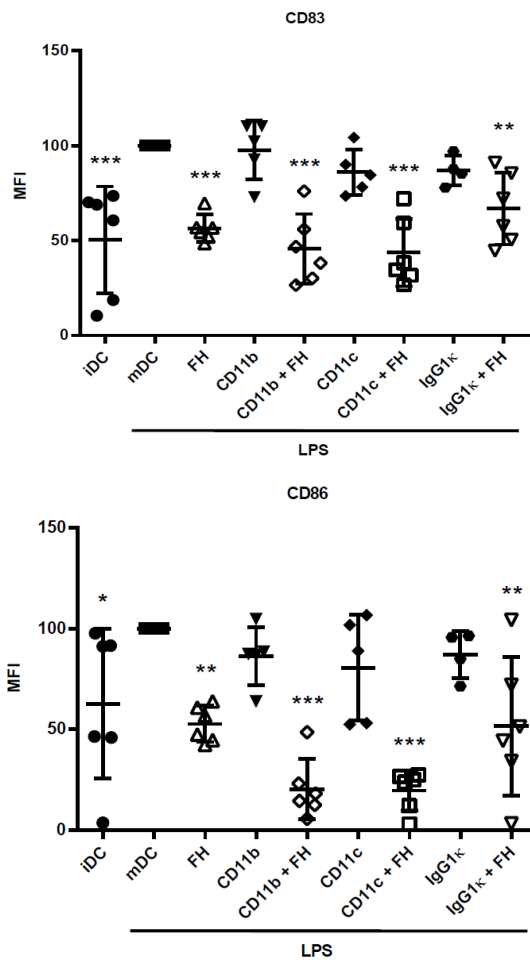


Figura 19. Análisis de la actividad inmunomoduladora de FH durante bloqueo de receptores CD11b y CD11c. La actividad de FH sobre cada tratamiento se cuantificó mediante los porcentajes de intensidad media de fluorescencia (MFI) emitida por los marcajes con FITC-anti-CD83 (panel superior) y PE-anti-CD86 (panel inferior). El tratamiento con IgG1κ se llevo a cabo como control de especificidad de isotipo (n= 6). * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, ***, p ≤ 0.001 respecto a mDCs.

Estudios complementarios basados en la cuantificación de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 secretada en cultivo corroboraron el papel anti-inflamatorio de FH sobre MoDCs maduras a pesar de la presencia de anticuerpos específicos contra CD11b y CD11c utilizados como potenciales bloqueadores de la interacción con FH (Figura 20).

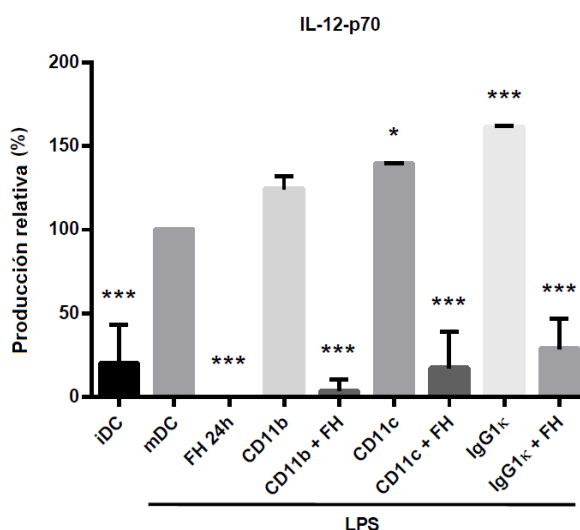


Figura 20. Producción de IL-12 por parte de MoDCs estimuladas con LPS y pre-tratadas con combinaciones de FH y anticuerpos anti-CR3 o anti-CR4. Se evaluó la producción relativa (%) de dicha citoquina pro-inflamatoria bajo los diferentes tratamientos detallados en el eje de las abscisas. (n = 6). * $p \leq 0.05$, ***, $p \leq 0.001$ respecto a mDCs.

Por otra parte, también se evaluó si la unión específica de FH a MoDCs es mediada por las dos regiones polianiónicas de unión a glicosaminoglicanos presentes en FH (den Dekker et al., 2008). Esta potencial unión se ha evaluado de dos formas: 1) Mediante co-tratamiento de FH y heparina de alto peso molecular (forma altamente sulfatada del polianión heparan sulfato) durante el proceso de diferenciación y maduración de MoDCs y 2) Mediante co-tratamiento de MoDCs con concentraciones no tóxicas de clorato de sodio, el cual inhibe competitivamente la formación de 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), previniendo así la sulfatación de los glicosaminoglicanos.

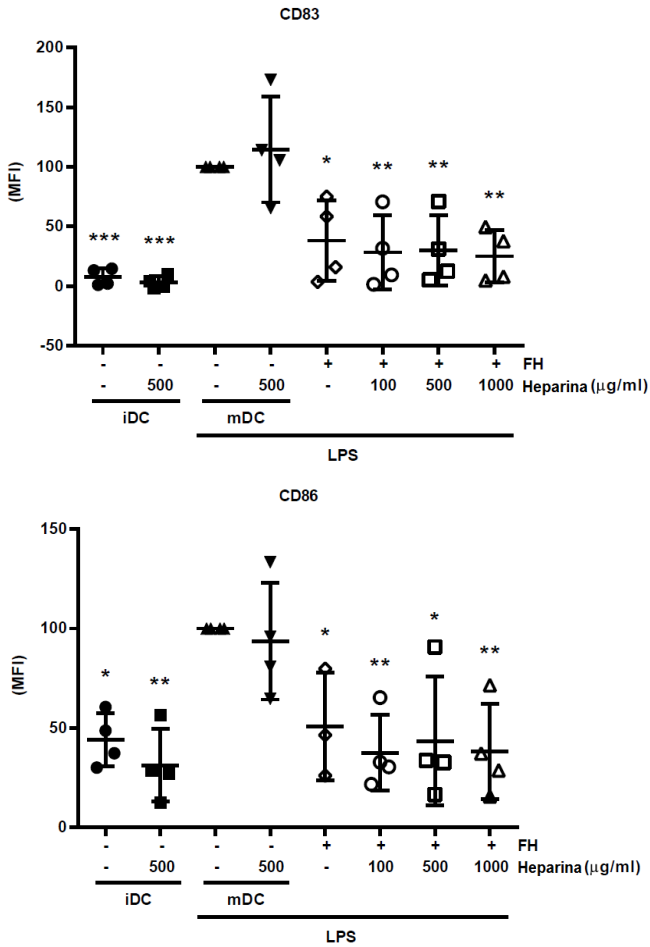


Figura 21. Efecto inmunomodulador de FH durante el bloqueo de regiones polianiónicas de unión a glicosaminoglicanos con heparina. El efecto de FH sobre MoDCs se muestra de acuerdo a los diferentes tratamientos estudiados. La actividad de FH se cuantificó mediante el porcentaje de la intensidad media de la fluorescencia (MFI) emitida por los marcajes con FITC-anti-CD83 (panel superior) y PE-anti-CD86 (panel inferior). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ respecto a mDCs. (n = 4).

Como se observa en las respectivas figuras, los resultados de los experimentos antes descritos indican que ni el co-tratamiento de FH con heparina (Figura 21) ni de FH con clorato de sodio (Figura 22), durante el proceso de diferenciación y maduración de MoDCs, afecta al fenotipo tolerogénico de FH sobre las MoDCs. Por lo tanto, la región de reconocimiento de glicosaminoglicanos en FH tampoco estaría implicada en la interacción entre éste y las DCs.

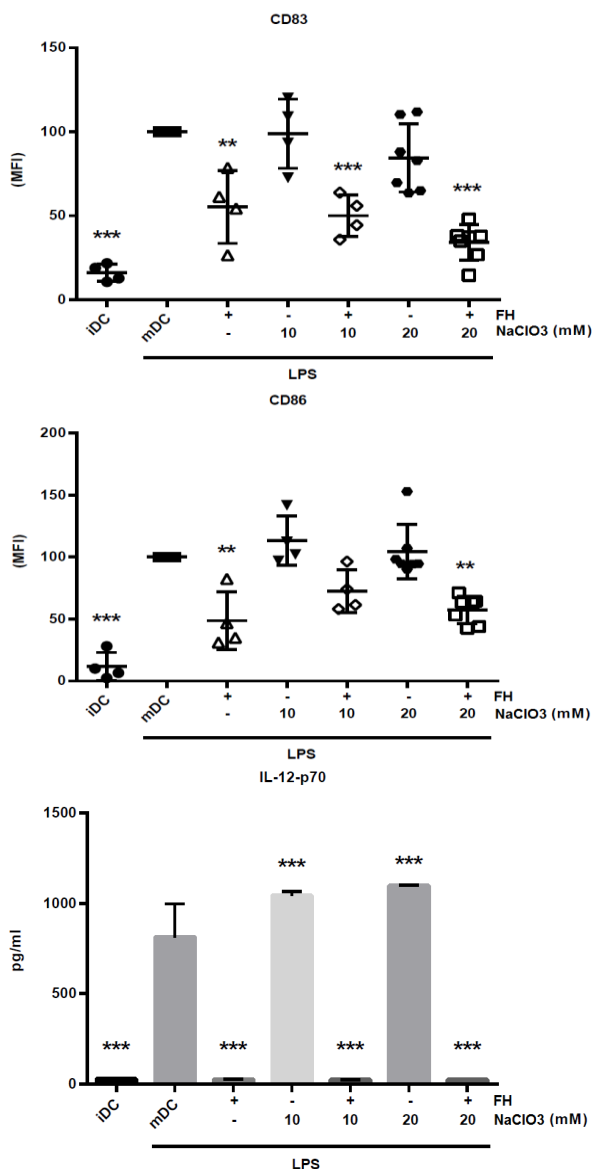


Figura 22. Efecto inmunomodulador de FH durante el bloqueo de regiones polianiónicas de unión a glicosaminoglicanos mediante clorato de sodio (NaClO₃). El efecto de FH sobre MoDCs se muestra de acuerdo a los diferentes tratamientos estudiados. La actividad de FH sobre cada tratamiento se cuantificó mediante el porcentaje de la intensidad media de fluorescencia (MFI) emitida por los marcajes con FITC-anti-CD83 (panel superior) y PE-anti-CD86 (panel central). Producción de IL-12 bajo las condiciones analizadas experimentalmente (panel inferior) (n= 4 a 6). ** p ≤ 0.01, *** p ≤ 0.01 respecto a mDCs.

De nuevo, estudios complementarios basados en la cuantificación de la citoquina pro-inflamatoria IL-12 secretada en cultivo corroboraron la actividad immuno-moduladora y anti-inflamatoria de FH sobre MoDCs maduras a pesar

de la inhibición de los sitios de unión a glicosaminoglicanos en FH, bajo tratamiento con clorato de sodio (Figura 22, panel inferior).

Finalmente, se estudió si FH interacciona con MoDCs a través de receptores *scavenger* encargados del reconocimiento de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Además del reconocimiento de patógenos, los receptores tipo *scavenger* funcionan como limpiadores del sistema inmune mediante la detección y eliminación del material inservible y de sustancias extrañas no antigénicas (Canton et al., 2013). El sulfato de dextrano es una de las moléculas mejor conocidas en su papel de inhibidor competitivo de este tipo de receptores (Peiser et al., 2002; Tsubamoto et al., 1994). Por tal motivo se utilizó en ensayos competitivos, para evaluar su efecto sobre el fenotipo tolerogénico que ejerce FH sobre MoDCs.

Los monocitos en proceso de diferenciación fueron pre-tratados con sulfato de dextrano seguido del protocolo estándar de diferenciación y maduración a MoDCs con IL-4, GM-CSF, FH y LPS. Los resultados de dichos experimentos se presentan en la Figura 23. Tras el análisis de los fenotipos de diferenciación y maduración CD86 y CD83, respectivamente, el tratamiento con sulfato de dextrano no parece interferir en la actividad inmunomoduladora tolerogénica que ejerce FH. Por lo tanto, los receptores de tipo *scavenger* tampoco estarían mediando la función de FH sobre MoDCs.

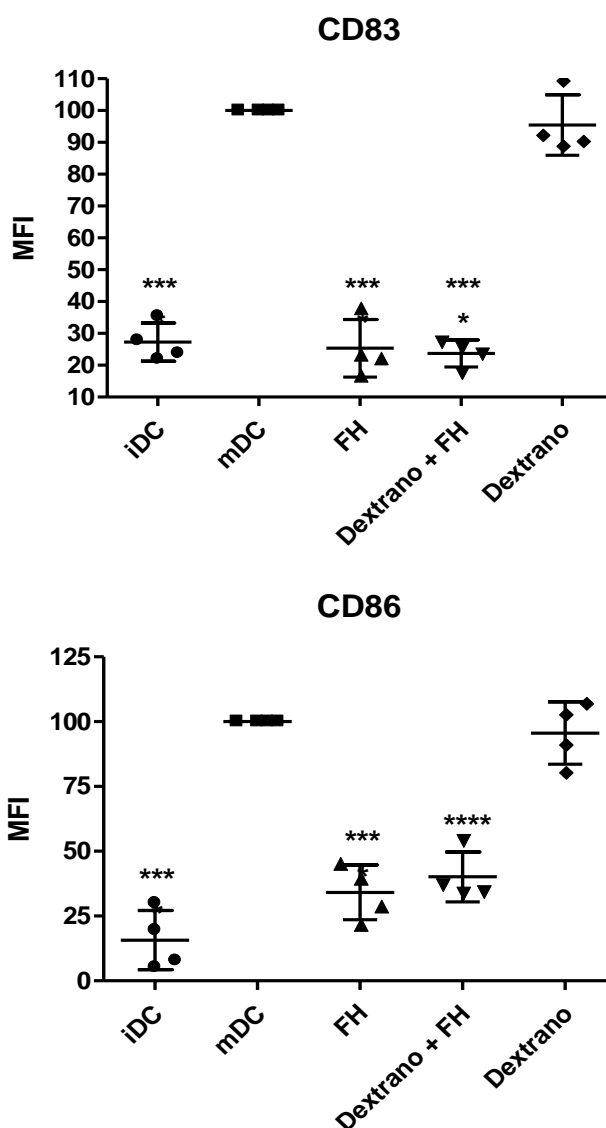


Figura 23. Efecto inmunomodulador de FH durante bloqueo de receptores tipo “scavenger” mediante sulfato de dextrano. La actividad de FH sobre cada tratamiento se cuantificó mediante los porcentajes de intensidad media de fluorescencia (MFI) emitida por los marcajes con FITC-anti-CD83 (panel superior) y PE-anti-CD86 (panel inferior) (n= 4). *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$ respecto a mDC.

5.8. Disección de la actividad inmunomoduladora de FH sobre MoDCs

Se evaluó la acción inmunomoduladora de FH sobre MoDCs empleado diferentes fragmentos de la proteína, los cuales abarcan varios de sus dominios

CCP (*complement control protein*). Los fragmentos de FH utilizados fueron los siguientes: CCPs 1-7 (FHL-1), CCPs 8-20, CCPs 15-20 y CCPs 19-20 (ver [Figura 3](#)). El objetivo principal consistió en analizar los dominios específicos de FH donde reside la actividad inhibidora de la maduración de MoDCs. Tras el estudio del fenotipo de maduración CD83 para cada uno de los diferentes tratamientos utilizando los diferentes fragmentos de FH, se observó con los dominios CCP 8-20, CCP 19-20 y, en menor grado, con el dominio CCP 15-20 un efecto similar al ejercido por FH completo sobre MoDCs. Además los dominios CCP 1-7 no parecen poseer actividad inmunomoduladora. ([Figura 24](#)).

La cuantificación de la expresión de CD83 en MoDCs en respuesta al tratamiento con los diferentes fragmentos permitió dilucidar y acotar la región responsable de la actividad de FH ([Figura 24](#), panel inferior). A partir de dichos datos se pudo observar que el mínimo fragmento que presenta un efecto similar al de FH completo, se compone de los dominios CCP 19-20, que constituye la región de unión a las superficies celulares.

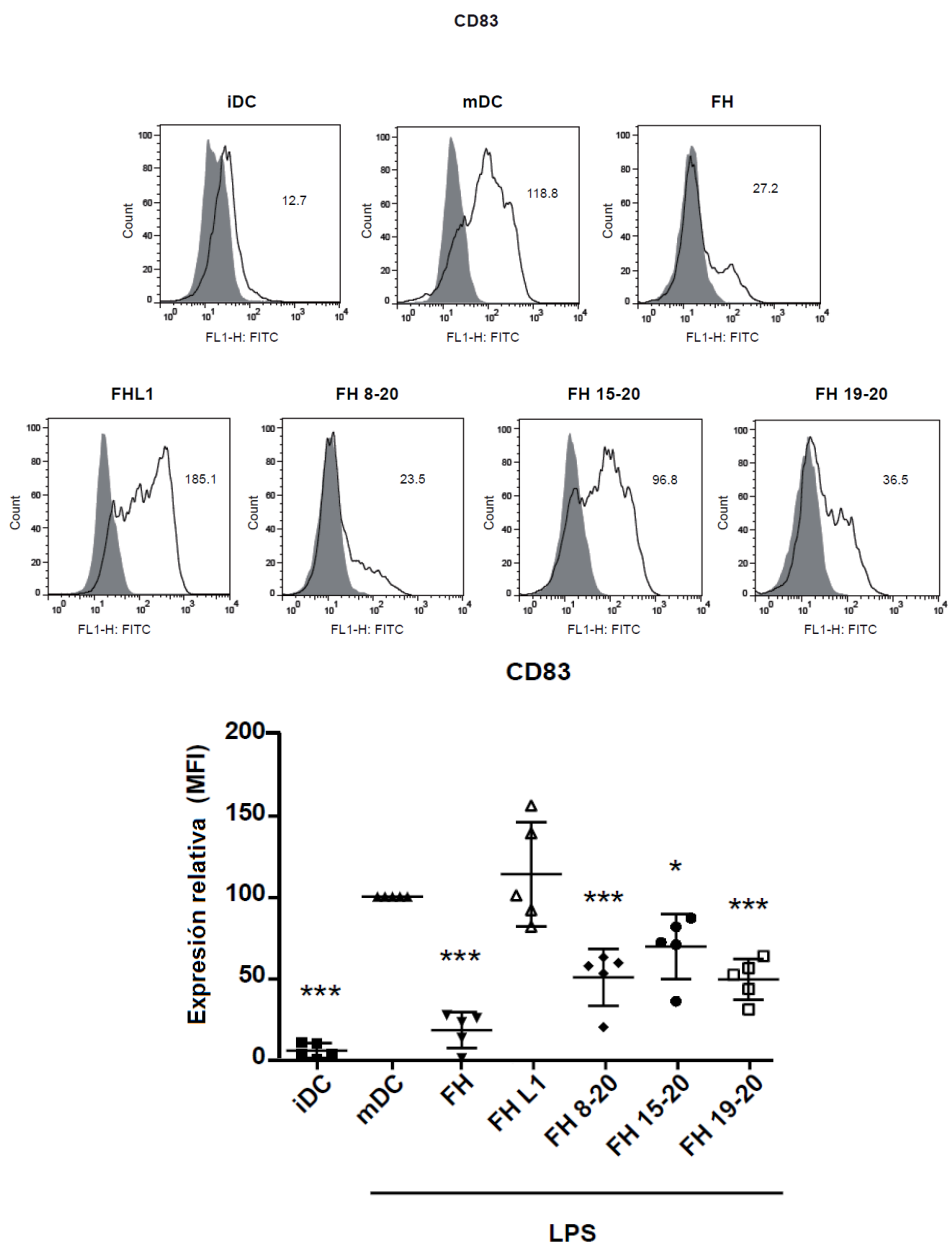


Figura 24. Actividad inmunomoduladora de diferentes regiones de FH. El fenotipo de maduración CD83 fue evaluado, mediante citometría de flujo, para cada uno de los tratamientos sobre MoDCs, utilizando diferentes fragmentos de FH. El área en gris corresponde al isotipo control de la detección (panel superior). La cuantificación de la correspondiente expresión de CD83 en superficie como respuesta a los diferentes tratamientos se realizó mediante análisis del % de la intensidad media de fluorescencia (MFI) emitida por el marcaje con FITC-anti-CD83 (panel inferior) (n= 5). * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ respecto a mDC.

El análisis de la secreción de IL-10 e IL-12 en sobrenadantes de cultivos de MoDCs tratadas con la proteína FH completa, y con los fragmentos FHL-1 y CCP 19-20 (Figura 25). Confirmó que tanto el pre-tratamiento con FH completo como con el fragmento CCP 19-20 induce un incremento significativo de la relación IL-10/IL-12 hacia un estadio anti-inflamatorio.

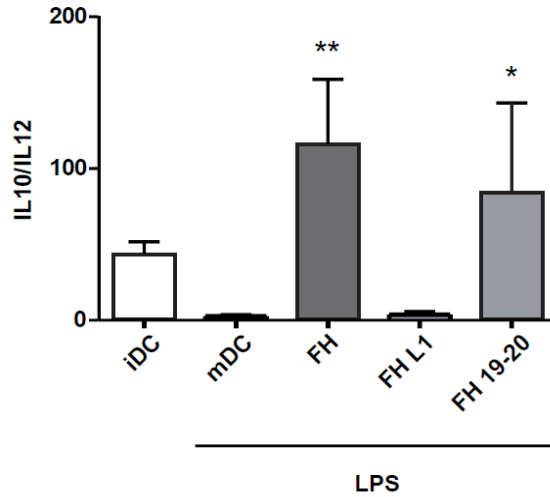


Figura 25. Producción de IL-10 e IL-12 por parte de MoDCs estimuladas con LPS y pre-tratadas con la proteína FH completa o fragmentos CCP 1-7 y CCP 19-20. Se evaluó la producción de dichas citoquinas bajo los diferentes tratamientos. Los resultados se presentan en forma de relación IL-10/IL-12 ($n = 3$). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ respecto a mDCs.

6. Resultados II – Función de MoDCs inducidas por C4BP β - o FH en un modelo de aloinmunidad

El estudio exploratorio desarrollado en este segundo apartado de la Tesis Doctoral tenía como objetivo evaluar la funcionalidad *in vivo* de MoDCs convertidas en tolerogénicas mediante tratamiento con las proteínas con potencial anti-inflamatorio e inmunomodulador como C4BP β - y Factor H. Así se valoró la capacidad de dichas células de mitigar o retrasar la aparición de los síntomas y prolongar la supervivencia de ratones NSG trasplantados con PBMCs humanas como modelo de GvHD (xeno-GvHD), procedimiento denominado inmunoterapia adoptiva (Chu et al., 2012).

Tras los desfavorables resultados obtenidos siguiendo los protocolos descritos por Notta y colaboradores y King y colaboradores (King et al., 2009; Notta et al., 2010), se ha podido estandarizar un nuevo protocolo de tratamiento que reprodujo el fenotipo de la enfermedad de injerto contra huésped. Una vez se pudo inducir con elevada frecuencia la GvHD en el modelo murino de ratones NSG, se quiso indagar el papel inmunomodulador *in vivo* de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH y evaluar si su papel tolerogénico observado *in vitro* podría replicarse en un sistema *in vivo* más complejo, con el propósito de avanzar en el diseño de una potencial terapia celular contra patologías aloinmunes

6.1. Verificación de GvHD

En el modelo de xeno-GvHD se utilizaron como control negativo animales a los que se les inyectó PBS, y como control positivo animales a los que se inyectaron PBMCs sin ningún tratamiento adicional. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las fases iniciales descritas en el apartado 4.2.2.1. se observó que 2.5×10^7 PBMCs era la cantidad adecuada de células a inyectar para generar GvHD con elevada frecuencia a los 20-35 días post-inoculación (Figura 26) confirmada por la aparición de la sintomatología típica de GvHD mediante citometría de flujo (apartado 4.2.2.2.).

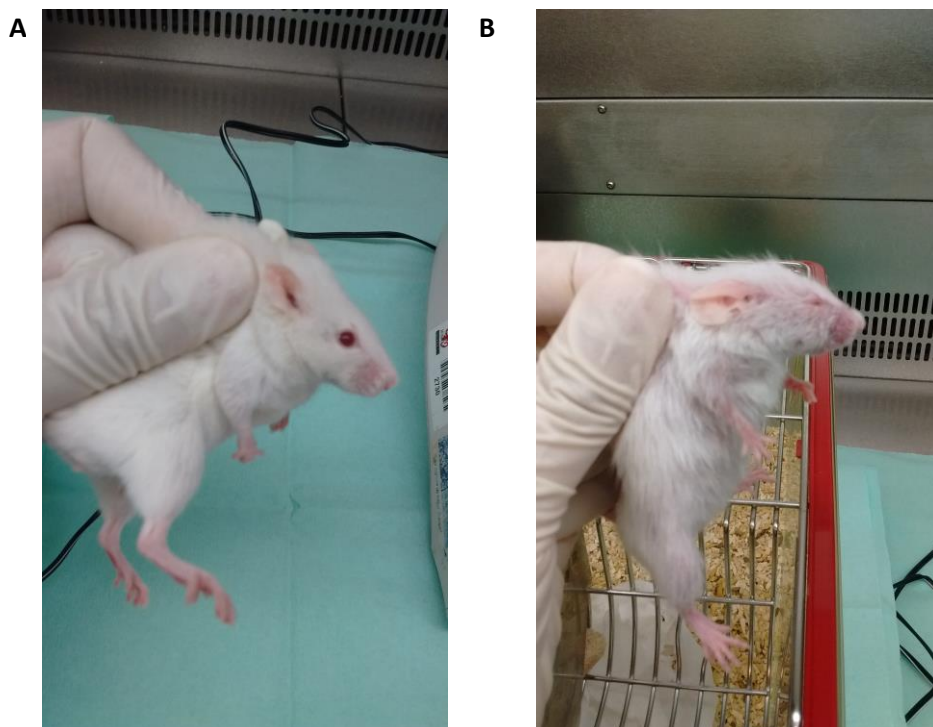


Figura 26. Ratones NSG. A. Modelo murino sano (inyectado con PBS). B . Modelo murino xeno-GvHD (Inyectado con PBMCs humanas).

En aproximadamente el 90% de la población de ratones estudiados y que desarrollaron la enfermedad se observaron poblaciones celulares con fenotipo CD45+ humano. Este dato permite inferir que la presencia de dichos linfocitos T humanos juega un papel determinante en la progresión de la enfermedad. La presencia de este tipo celular fue confirmada con marcajes anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 (Figura 27).

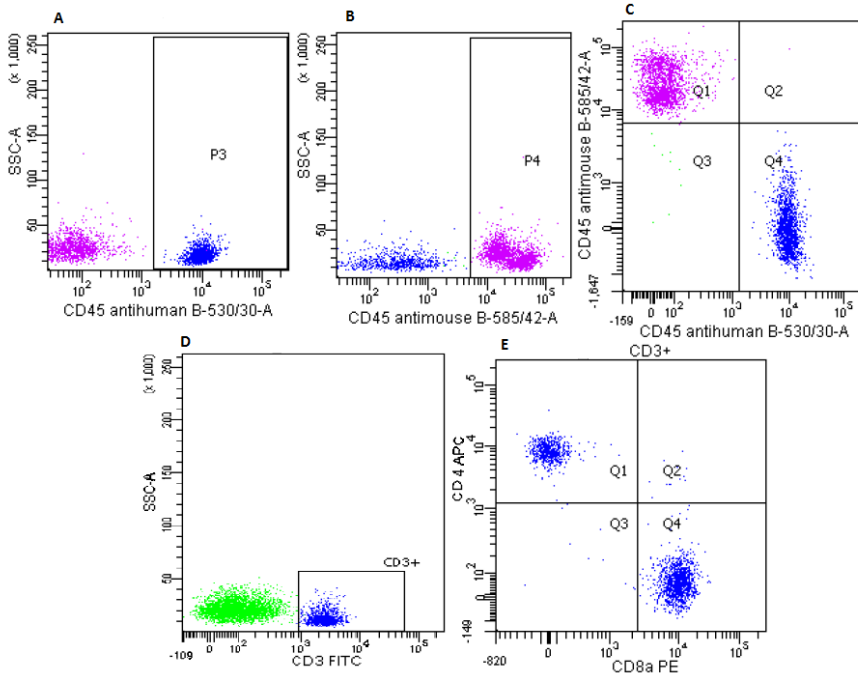


Figura 27. Gráfica de puntos indicando el injerto de células humanas (PBMCs). A. Las células fueron marcadas con FITC-anti-CD45 humano (530 nm) y se separaron por complejidad celular SSC. B. las células fueron marcadas con PE-anti-CD45 de ratón (585 nm) y se separaron por complejidad celular SSC. C. Marcaje simultáneo FITC anti- CD45 humano (530 nm, eje horizontal) y PE-anti-CD45 ratón (585 nm, eje vertical). D. Las células fueron marcadas con FITC-anti-CD3 humano (530 nm) y se separaron por complejidad celular SSC. E. Marcaje simultáneo PE-anti-CD8a (585 nm, eje vertical) y APC anti-CD4 (660 nm, eje horizontal).

6.2. Potencial terapéutico de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH para la disminución de xeno-GvHD en el modelo murino humanizado NSG

Una vez confirmada la generación de un modelo xeno-GvHD el estudio se enfocó en el análisis de la capacidad de C4BP β - y FH para retrasar la enfermedad y/o mitigar su efecto. Se realizó un análisis de la evolución del peso de los ratones monitorizando su pérdida particularmente en los animales tratados con PBMCs humanas, un signo altamente indicativo del desarrollo del GvHD.

Se establecieron dos grupos de animales tratados a partir de MoDCs de dos donantes distintos, D1 y D2. En los animales inoculados con el injerto D1 (PBMCs y MoDCs tratadas) no se observó el desarrollo de la enfermedad.

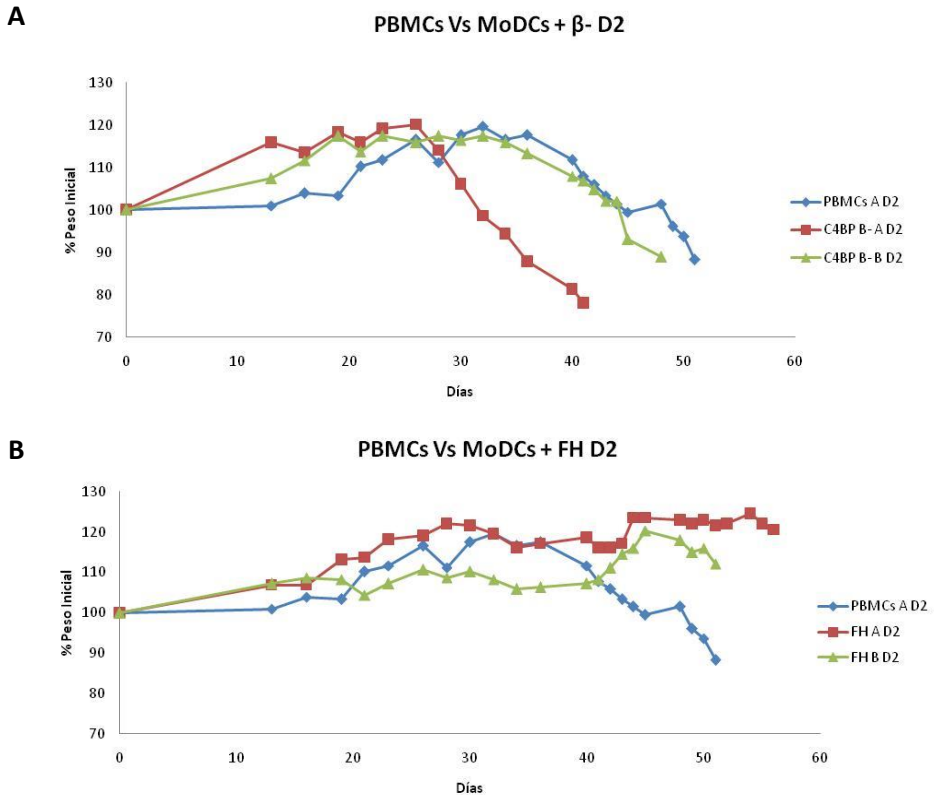


Figura 28. Seguimiento de pesos en el modelo NSG de xeno-GvHD. A. C4BP β -, animales injertados con PBMCs humanas y tratados con MoDCs (D2) + C4BP β - una vez iniciados los síntomas de xeno-GvHD. B. FH, animales injertados con PBMCs humanas y tratados con MoDCs (D2) + FH una vez iniciados los síntomas de xeno-GvHD, animales injertados con PBMCs humanas sin ningún tratamiento posterior. n= 3.

Durante el seguimiento realizado en un periodo de entre 40-60 días, se observó que la mortalidad en el grupo de animales tratados con MoDCs + C4BP β - fue similar a la observada para el grupo control D2 (Figura 28). No obstante, aproximadamente el 50% de los animales alcanzaron la supervivencia hasta el final del estudio, aunque su deterioro físico era muy evidente. Por otra parte, los animales tratados con MoDCs + FH presentaron una tasa de mortalidad menor a la observada para los animales no tratados (PBMCs) o tratados con C4BP β -, aunque los signos de la enfermedad no fueron atenuados del todo.

Uno de los signos físicos más evidentes en el desarrollo de la enfermedad xeno GvHD, es la pérdida de pelo (Figura 29). En el panel A se observa el

desarrollo de la enfermedad en animales tratados con PBMCs humanas. Su evidente alopecia y la confirmación de la presencia de la enfermedad, junto con otros signos como el encorvamiento y la falta de movilidad, determinan un criterio de punto final para el animal. En el panel B, se muestra un animal tratado con PBMCs humanas + C4BP β - en donde se observan signos físicos parecidos al anterior grupo de PBMCs humanas. En el panel C se observa un animal tratado con PBMCs humanas + FH. Aunque el desarrollo de la enfermedad ha sido confirmado mediante el análisis de citometría de flujo como en los anteriores casos, se observa que la enfermedad se ha desarrollado de forma menos agresiva en el animal.

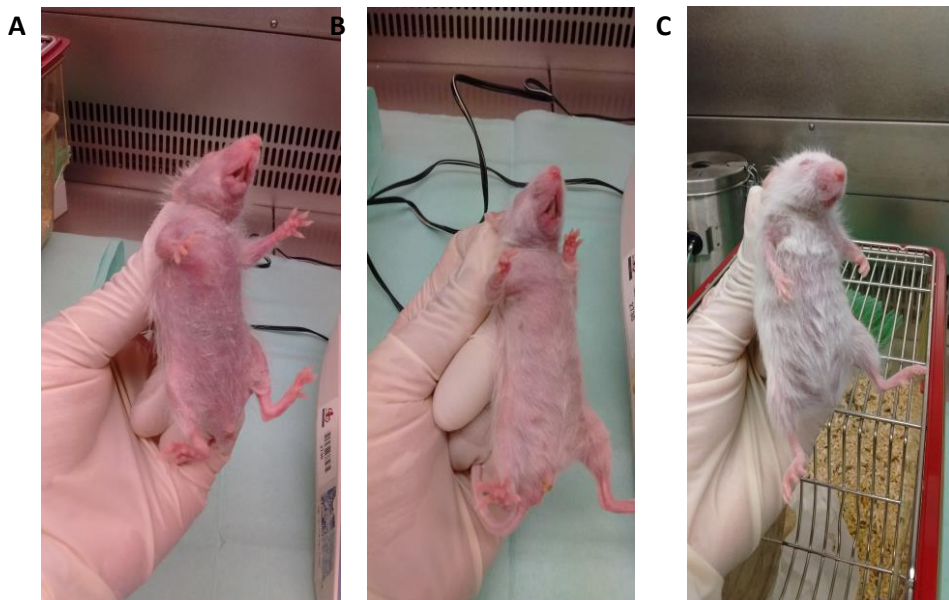


Figura 29. Ratones modelo NSG de xeno GvHD. Desarrollo de enfermedad. A. Modelo murino inyectado con PBMCs humanas. B. Modelo murino inyectado con PBMCs humanas + C4BP β -. C. Modelo murino inyectado con PBMCs humanas + FH.

7. Resultados III – Análisis preliminar del perfil transcripcional inmunomodulador de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH

Con la información previamente descrita sobre el papel anti-inflamatorio e inmunomodulador o tolerogénico de la isoforma minoritaria del inhibidor del sistema del complemento C4BP β - (Olivar et al., 2013), conjuntamente con los resultados presentados sobre la caracterización de ese mismo papel anti-inflamatorio e inmunomodulador o tolerogénico por parte de FH, descritos en la primera sección de esta tesis (Olivar et al., 2016); se propuso una caracterización a nivel transcripcional de dichas respuestas para establecer las señales moleculares desencadenadas respectivamente por C4BP β - y FH sobre las MoDCs.

En este tercer apartado de esta Tesis Doctoral se establecieron los patrones de expresión génica de MoDCs bajo el estímulo inmunomodulador de C4BP β - y FH, con el propósito de caracterizar las vías de señalización intracelular que conllevan al establecimiento del fenotipo anti-inflamatorio y tolerogénico de MoDCs tratadas tanto con C4BP β - como con FH durante su diferenciación y maduración. Dichos análisis de expresión se estudiaron a nivel de genoma humano completo, utilizando la técnica de *microarrays*, y realizando validaciones experimentales mediante técnicas convencionales de cuantificación. Simultáneamente, se realizaron varios análisis bioinformáticos preliminares con los datos de los perfiles transcripcionales obtenidos para tratar de identificar las vías de señalización activadas y reprimidas por C4BP β - y FH durante la maduración de DCs. Ensayos adicionales de tipo *phosphoarray* se incluyen como estrategia complementaria en la identificación de dichas vías de señalización.

7.1. Extracción y control de calidad de ARN a partir de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH

Los monocitos diferenciados a MoDCs con los factores IL-4 y GM-CSF, y posteriormente activadas con LPS, siempre en presencia de C4BP β - o FH, fueron caracterizados utilizando los marcadores de superficie CD86 y CD83 en un ensayo de citometría de flujo. La correcta selección de células para la extracción de ARN total se basó en el fenotipo CD86/CD83 que exhibían las respectivas células y que debían reflejar los resultados descritos en la [Figura 8](#). Por tanto, se obtuvieron células de los tratamientos iDC, mDC, mDC + C4BP β - y mDC + FH a partir de tres experimentos independientes, las cuales se utilizaron para realizar la extracción de ARN total.

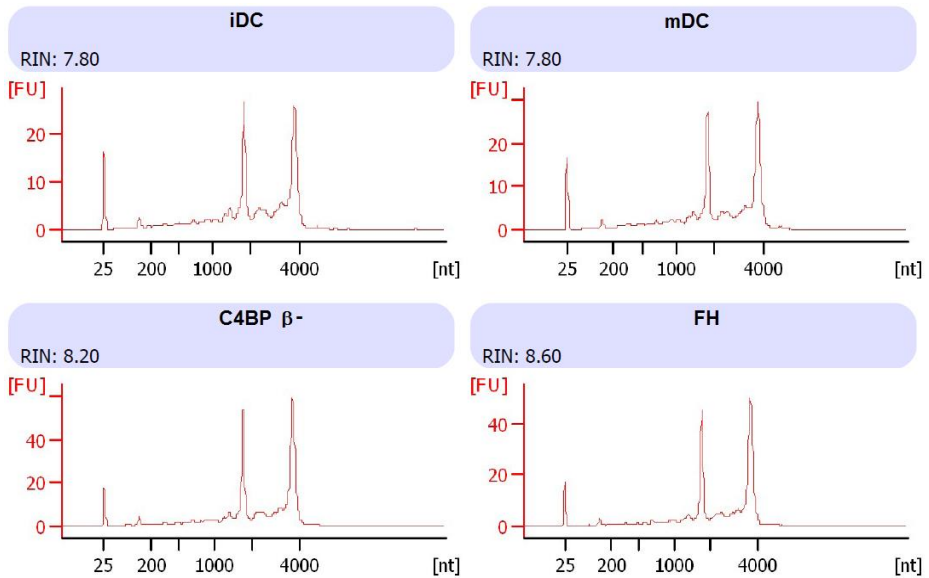


Figura 30. Análisis de integridad de las muestras de ARN total extraídas a partir de células MoDCs diferenciadas y maduras. Los ARNs extraídos a partir de las diferentes muestras de MoDCs fueron cuantificados y su calidad fue evaluada mediante una técnica microfluídica (Bioanalyzer 2100). El número de integridad de ARN (RIN) fue calculado para cada muestra.

Los ARNs totales de las 12 muestras obtenidas se enviaron a la Unidad de Genómica del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS, Barcelona), donde se llevó a cabo un análisis de control de calidad de dichas muestras para establecer su calidad en términos de integridad mediante una técnica microfluídica. En la [Figura 30](#) se presentan los electroferogramas del ensayo con *chips* Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) para una de las réplicas de las 4 condiciones experimentales a analizar, destacándose claramente la presencia de las principales especies de ARN en cada muestra, tRNAs, rRNA 18S y rRNA 28S. Los índices de integridad (RIN – *RNA- Ribonucleic acid integrity number*) calculados para cada muestra siempre estuvieron por encima de 7.5, criterio indispensable para determinar si una muestra de ARN es apta para un ensayo de expresión génica mediante la técnica de *microarrays*.

7.2. Ensayo de expresión génica en MoDCs mediante *microarrays*.

Tras el análisis de control de calidad de los ARNs obtenidos a partir de las diferentes condiciones experimentales para la obtención de MoDCs, dichas muestras fueron procesadas por parte del personal técnico de la Unidad de Genómica del IDIBAPS para realizar un análisis de expresión génica utilizando *microarrays* de genoma humano completo de *Affymetrix*. El *chip* utilizado para tal propósito fue el denominado *Affymetrix® Human Genome U219 Array Plate*, el cual evalúa la expresión de más de 36.000 transcritos por muestra, que representan más de 20,000 genes completamente mapeados y anotados en el genoma humano.

Los resultados de expresión fueron sujetos a un análisis inicial para evaluar la variación entre réplicas. Utilizando la aplicación *Expression Console™ v1.4* se realizó un análisis de control de calidad entre réplicas de la misma muestra en términos de estimación de la intensidad de la señal y así evaluar el éxito de las hibridaciones dentro del *chip* de expresión. El análisis estuvo basado en la normalización de las intensidades, derivadas de las hibridaciones, utilizando el algoritmo *Robust Multi-array Average (RMA)*, el cual corrige las intensidades teniendo en cuenta la señal de fondo y posteriormente las transforma y normaliza de acuerdo a la distribución global de las mismas.

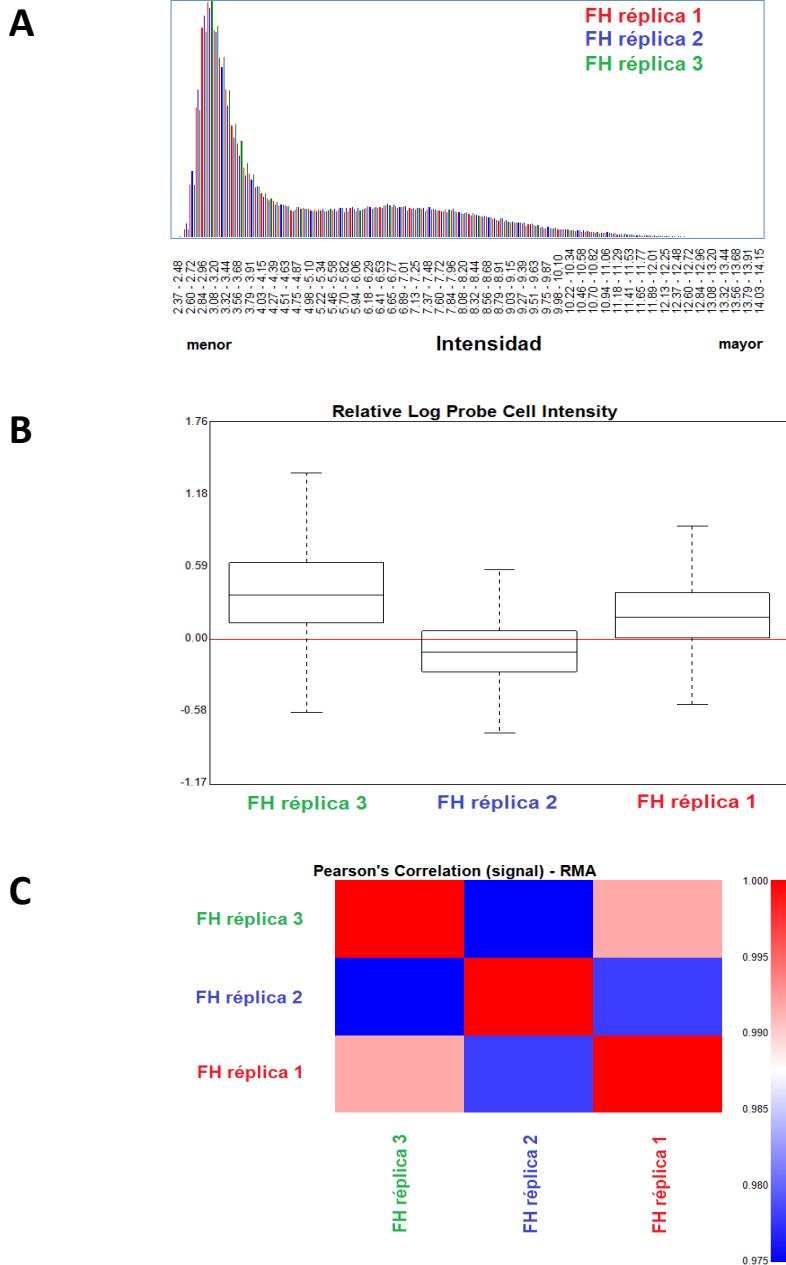


Figura 31. Análisis de corrección y normalización de los ficheros de intensidad. Se presenta como ejemplo la normalización hecha en los ficheros de las 3 réplicas del tratamiento con FH sobre MoDCs. De los múltiples parámetros analizados en la herramienta *Expression Console™*, se muestra la distribución de las intensidades corregidas (A), la variación relativa de la intensidad en cada réplica (B) y la correlación lineal entre los valores de intensidad entre réplicas (C).

Este análisis inicial de los datos produjo varias medidas indicadoras de la eficiencia de la hibridación y la variabilidad entre réplicas. Entre ellas podemos encontrar la distribución de intensidades para cada muestra, la variación relativa de intensidad por sonda en relación al conjunto de réplicas y correlaciones lineares para establecer la variabilidad. En la [Figura 31](#) se muestran los resultados de este análisis preliminar de datos para las réplicas del tratamiento de MoDCs con FH, los cuales reflejan el comportamiento global de todas las muestras y tratamientos. A destacar, se observó una gran reproducibilidad por réplica en términos de las intensidades emitidas tras la hibridación ([Figura 31B](#)). Por otra parte, las correlaciones matemáticas de tipo lineal permitieron también evidenciar una mínima variabilidad entre las réplicas intra-tratamientos (Pearson $r > 0.97$).

7.3. Análisis de expresión diferencial entre MoDCs tratadas con C4BP β - o FH

Los archivos de intensidad normalizados (archivos.chp) se utilizaron para realizar las comparaciones entre tratamientos utilizando la herramienta *Transcriptome Analysis Console* (TAC, Affymetrix®). Los genes diferencialmente expresados se establecieron a partir de las siguientes comparaciones:

- mDCs vs iDCs
- mDCs+C4BP β - vs mDCs
- mDCs+FH vs mDCs

Adicionalmente, la selección de los genes diferencialmente expresados a partir de las anteriores comparaciones se realizó si su cambio de expresión (*fold-change*) fuese mayor o igual a 2, en valor absoluto, con relación al tratamiento mDC, y que dicha diferencia estuviese basada en un q-valor ≤ 0.05 ,

q-valor obtenido a partir de la corrección de p-valor por el método de corrección de análisis múltiple “FDR – *false discovery rate*”.

Un primer análisis global del comportamiento de todos los genes presentes en el *microarray* se presenta en la [Figura 32](#). En dicha figura se presentan los transcritos sobre-expresado e infra-expresados de acuerdo con los criterios establecidos de selección. Tras las comparaciones se detectaron transcritos diferencialmente expresados ([Tabla 4](#)).

Tabla 4. Transcritos con expresión diferencial en células MoDCs tratadas con C4BP β - o FH.

Tratamientos	Transcritos Sobreexpresados	Trasncritos Infraexpresados
mDC vs iDC	13070	866
mDC+C4BP β- vs mDC	659	738
mDC+FH vs mDC	6830	172

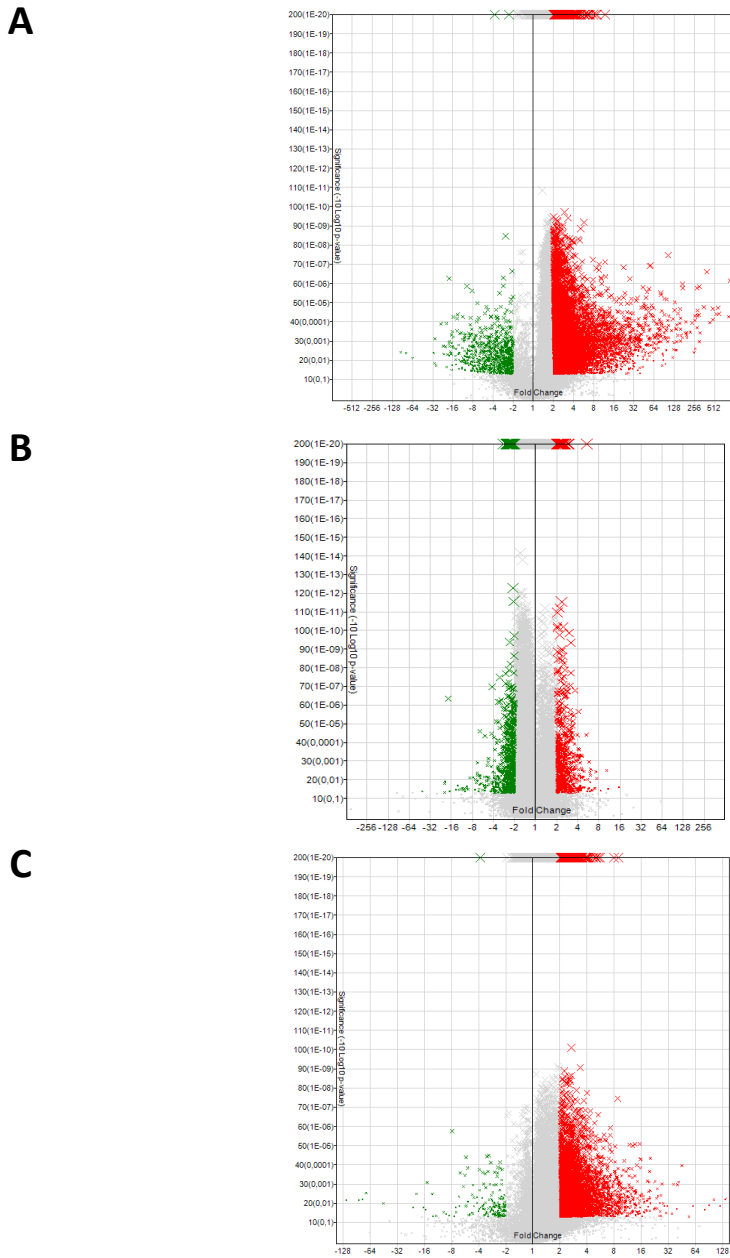


Figura 32. Gráficos de tipo volcán indicando el patrón de expresión diferencial. Las comparaciones iDCs/mDCs (A), mDCs+C4BP β -/mDCs (B) y mDCs+FH/mDCs (C) son representadas en este tipo de gráfico de dispersión, donde en el eje de las abscisas se presentan los valores de *fold-change* y en el eje de las ordenadas el $-\text{Log}_{10}$ del p-valor resultante de la comparación One-Way ANOVA.

De acuerdo al número de transcritos que presentan expresión diferencial, la comparativa entre mDCs e iDCs presentó el mayor número de diferencias, lo que indica que un gran número de genes se activan durante el proceso de maduración de DCs. Más allá de la comparativa a nivel numérico, se realizó otro tipo de análisis que generó información sobre la cantidad de genes que están diferencialmente regulados entre las diferentes condiciones. Para tal fin, se construyeron diagramas de Venn con el listado de genes que mostraron expresión diferencial en cada comparativa. Los listados de genes se compilaron sin tener en cuenta la redundancia de transcritos diferencialmente expresados en cada condición (un gen puede estar representado por más de un transcrito).

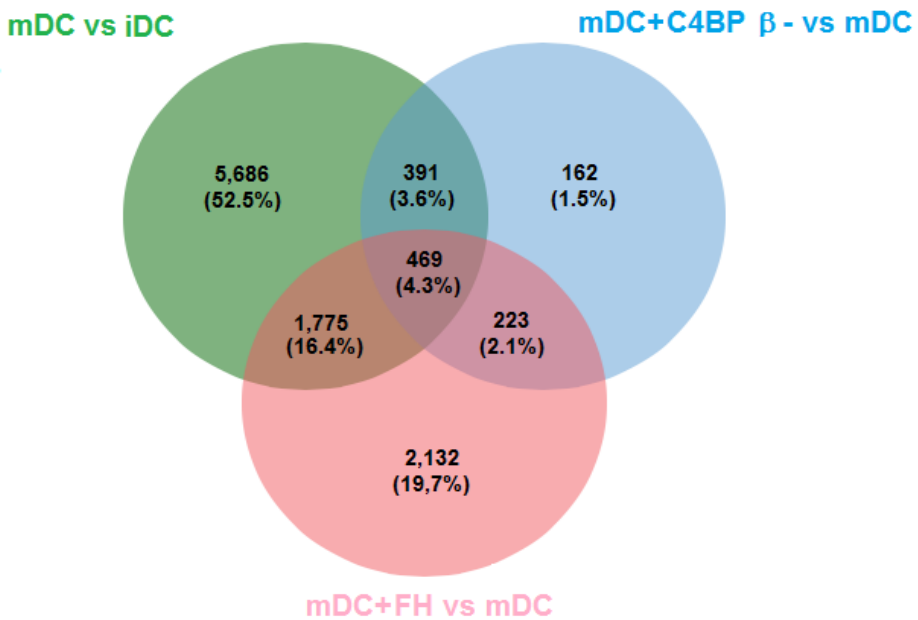


Figura 33. Diagrama de Venn representando los conjuntos de genes cuya expresión fue afectada entre las condiciones de estudio. Los porcentajes presentados corresponden a las proporciones calculadas a partir del total de genes presentes en el diagrama.

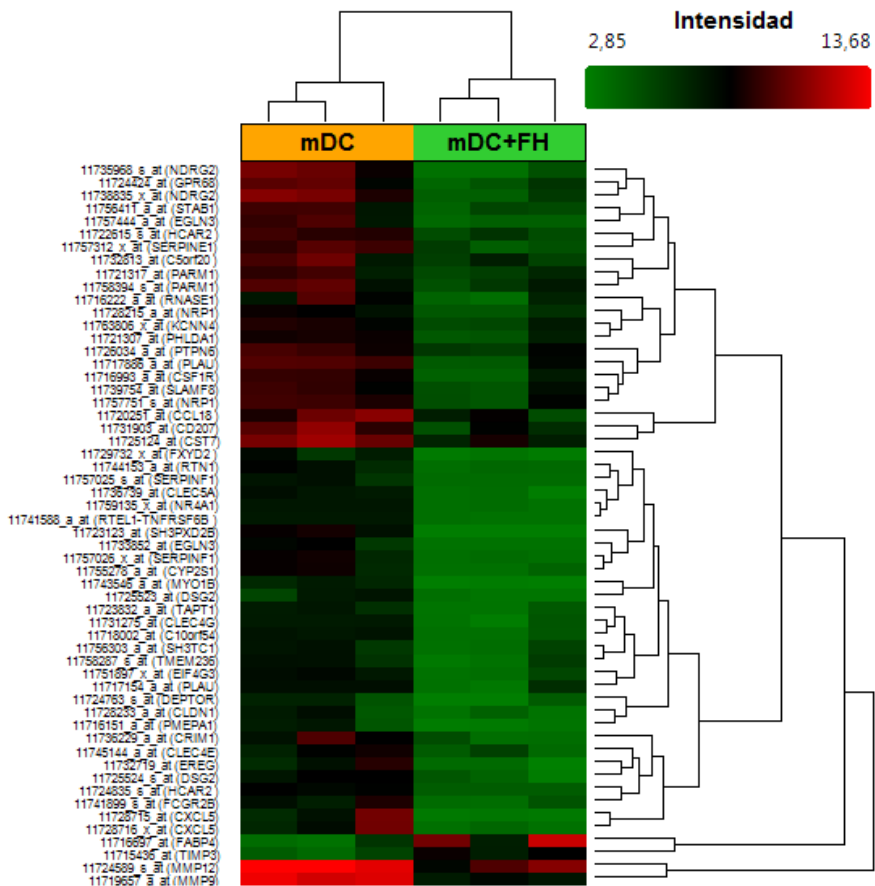


Figura 34. Heatmap en la comparación mDC+FH vs mDC. Un grupo reducido de genes con un *fold-change* ≥ 12 y ≤ -12 ($p < 0.05$) se ha seleccionado para ejemplificar el agrupamiento jerárquico de genes de acuerdo a su patrón de expresión.

En la [Figura 33](#) se muestra el número efectivo de genes diferencialmente expresados en cada condición, analizada. En dicho análisis se observó que en las comparaciones mDC vs iDC y mDC + FH vs mDC existen una gran mayoría de genes distintivos de las mismas, 5,686 y 2,132 genes respectivamente; contrariamente a lo observado para la condición mDC + C4BP β - vs mDC donde la singularidad de esta condición esta representada por un bajo número de genes, 162 en total. Una característica importante a destacar es el gran número de genes que se encuentran igualmente afectados en las comparaciones mDC vs iDC y mDC + FH vs mDC (1,775 genes) lo que sugeriría que el tratamiento inmunomodulador con FH induce DCs semi-maduras con características

similares a las iDCs. El número de genes que se ve alterado en todas las comparaciones es de 469. Este grupo de genes sería de interés para la validación, puesto que el patrón de expresión de un mismo gen informaría sobre los procesos intracelulares desencadenados bajo los diferentes tratamientos establecidos en el diseño experimental.

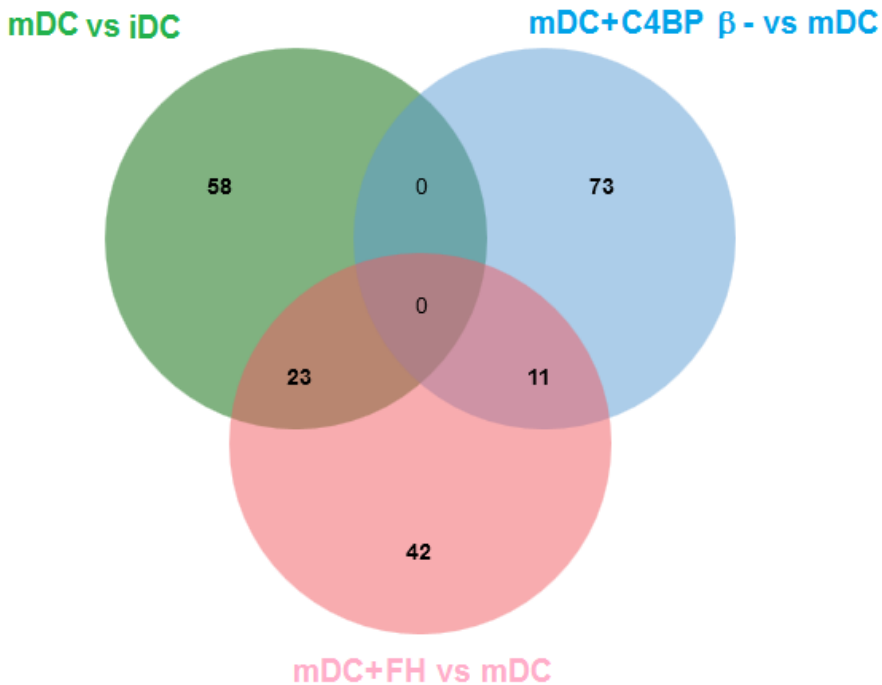


Figura 35. Diagrama de Venn representando los conjuntos de genes con máxima expresión diferencial entre las condiciones de estudio.

El listado de transcritos a seleccionar para su validación mediante técnica cuantitativa de qPCR se acotó mediante la selección de aquellos que presentaron los mayores valores absolutos de *fold-change*. En la [Figura 34](#) se ejemplifica dicha selección para la comparativa mDC + FH vs mDC, donde las señales con valores absolutos mayores que 12 (*fold-change* ≥ 12 o ≤ -12) son asociadas mediante agrupamiento jerárquico. En dicha figura se aprecia claramente que la gran mayoría de transcritos seleccionados en esta comparativa para su correspondiente validación se encuentran infraexpresados

en el tratamiento mDC + FH. Este mismo tratamiento se realizó para las otras dos comparaciones obteniéndose los respectivos listados de los 50 transcritos con los mayores valores de sobreexpresión e inhibición ([Tabla 5 a 10](#)).

De nuevo, los listados de los transcritos con mayores expresiones diferenciales (50 sobreexpresados y 50 infraexpresados, para un total de 100 transcritos seleccionados por comparación) fueron compilados para reducir la redundancia a nivel de gen y comparados en un diagrama de Venn para distinguir aquellos que estaban regulados en más de un tratamiento. El número total de genes compilados fue de 81 para la comparación mDC vs iDC, 84 para la comparación mDC + C4BP β - vs mDC y 76 para la comparación mDC + FH vs mDC. La relación de genes compartidos entre las diferentes comparaciones se muestra en la [Figura 35](#).

Tabla 5. Los 50 Transcritos más sobreexpresados en la comparación mDC vs IDC.

FC	ANOVA p-valor	FDR p-valor	Gen	Descripción
883,98	7,31E-07	0,000005	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
830,93	0,000054	0,000218	IDO1	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
600,13	0,000039	0,000165	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
576,24	0,000019	0,000089	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
543,11	0,00004	0,000169	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
487,8	0,000076	0,000291	CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
480,84	0,000021	0,000098	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1
437,37	0,000109	0,000389	CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8
392,94	2,47E-07	0,000002	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6
356,58	0,000017	0,000084	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6
311,67	0,000367	0,00103	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
306,41	0,000001	0,000009	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
304,76	0,001074	0,002391	IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
300,56	0,000045	0,000188	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
285,84	0,000046	0,000193	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
284,43	0,000027	0,000121	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
278,77	0,000202	0,000638	SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
278,55	0,000002	0,000011	IFI44L	interferon-induced protein 44-like
263,11	0,002581	0,004804	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
262,7	0,00005	0,000204	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1
261,47	0,000083	0,00031	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
254,1	0,003977	0,006845	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
236,52	0,000115	0,000406	IL15RA	interleukin 15 receptor, alpha
220,97	0,000339	0,000968	EBI3	Epstein-Barr virus induced 3
197,89	0,00065	0,001617	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
196,29	0,000384	0,001068	IFI44	interferon-induced protein 44
195,43	0,000499	0,001314	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
189,09	0,000101	0,000365	CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8
188,21	0,000386	0,001073	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)
171,69	0,000002	0,00001	GBP4	guanylate binding protein 4
170,41	0,000667	0,001649	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)
169,87	0,000001	0,000007	CFB	complement factor B
161,99	0,000508	0,001334	CCL19	chemokine (C-C motif) ligand 19
160,23	0,000237	0,000728	USP18	ubiquitin specific peptidase 18
159,91	0,000065	0,000255	CD38	CD38 molecule
159,39	0,001	0,002263	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3
157,48	0,000022	0,000101	BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)
156,06	0,000118	0,000417	GCH1	GTP cyclohydrolase 1
144,83	0,000037	0,000158	BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)
144,07	0,000514	0,001345	HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5
141,25	0,001085	0,002409	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
139,5	0,000147	0,000495	GABBR1 UBD	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1 ; ubiquitin D
137,92	0,00302	0,00546	LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3
137,05	0,000228	0,000705	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27
136,11	0,000246	0,00075	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
134,82	0,002957	0,005364	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
129,53	0,00001	0,00005	LOC100129518 SOD2	uncharacterized LOC100129518 ; superoxide dismutase 2, mitochondrial
129,27	0,000025	0,000113	GBP4	guanylate binding protein 4
129,17	0,001234	0,002664	IL7R	interleukin 7 receptor
125,2	0,002718	0,00501	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)

Resultados III – Análisis preliminar del perfil transcripcional inmunomodulador de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH

Tabla 6. Los 50 Transcritos más infraexpresados en la comparación mDC vs iDC.

FC	ANOVA p-valor	FDR p-valor	Gen	Descripción
-95,91	0,004	0,006877	CLEC10A	C-type lectin domain family 10, member A
-80,01	0,004259	0,007237	CLEC10A	C-type lectin domain family 10, member A
-63,15	0,007683	0,01185	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II
-31,15	0,004105	0,00702	PLAU	plasminogen activator, urokinase
-30,09	0,014822	0,02087	PALD1	phosphatase domain containing, paladin 1
-29,86	0,000757	0,001818	NCAPH	non-SMC condensin I complex, subunit H
-28,53	0,018609	0,025447	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
-24,39	0,00013	0,000449	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
-22,31	0,00183	0,003648	TBXAS1	thromboxane A synthase 1 (platelet)
-21,88	0,004795	0,007979	TMEM45B	transmembrane protein 45B
-20,59	0,001976	0,003875	C1orf162	chromosome 1 open reading frame 162
-19,86	0,000121	0,000423	ANKH	ankylosis, progressive homolog (mouse)
-19,82	0,022353	0,029937	GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like
-19,3	0,004992	0,008248	FOXQ1	forkhead box Q1
-18,35	0,001098	0,002432	TM6SF1	transmembrane 6 superfamily member 1
-18,33	0,001393	0,002929	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A
-18,18	5,42E-07	0,000004	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
-18,15	0,005573	0,009041	LOC101060527 NAIP	baculoviral IAP repeat-containing protein 1-like ; NLR family, apoptosis inhibitory protein
-17,92	0,001955	0,003843	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
-17,83	0,001033	0,00232	MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A
-17,52	0,003515	0,006179	FOXQ1	forkhead box Q1
-16,87	0,004184	0,00713	PYCARD	PYD and CARD domain containing
-16,74	0,004965	0,008211	FA2H	fatty acid 2-hydroxylase
-16,72	0,00049	0,001295	F13A1	coagulation factor XIII, A1 polypeptide
-16,66	0,001269	0,002721	CD200R1	CD200 receptor 1
-16,57	0,033536	0,043046	CDR2L	cerebellar degeneration-related protein 2-like
-16,3	0,00196	0,003851	PYCARD	PYD and CARD domain containing
-16,28	0,000328	0,000943	DTNA	dystrobrevin, alpha
-16,23	0,017829	0,024521	NDRG2	NDRG family member 2
-15,9	0,00191	0,003774	SLC2A14 SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14 ; solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
-15,89	0,000614	0,001545	IL16	interleukin 16
-15,83	0,002256	0,004308	FAM198B	family with sequence similarity 198, member B
-15,66	0,000058	0,000231	CD200R1	CD200 receptor 1
-14,68	0,006166	0,009825	QPRT	quinolinate phosphoribosyltransferase
-14,51	0,009103	0,013704	SOBP	sine oculis binding protein homolog (Drosophila)
-14,35	0,00258	0,004803	EVL	Enah/Vasp-like
-14,32	0,016771	0,023253	DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9
-13,84	0,000294	0,000862	NRP1	neuropilin 1
-13,8	0,00007	0,00027	CD200R1	CD200 receptor 1
-13,58	0,000041	0,000174	LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
-13,34	0,004825	0,008022	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1
-13,17	0,001648	0,00335	CERK	ceramide kinase
-12,98	0,004054	0,006951	RGCC	regulator of cell cycle
-12,91	0,010156	0,015049	DAB2	Dab, mitogen-responsive phosphoprotein, homolog 2 (Drosophila)
-12,9	0,028685	0,037392	NDRG2	NDRG family member 2
-12,88	0,004409	0,007445	RXRA	retinoid X receptor, alpha
-12,55	0,00041	0,001124	UBASH3B	ubiquitin associated and SH3 domain containing B
-12,21	0,01183	0,017139	RNASE6	ribonuclease, RNase A family, k6
-11,86	0,000374	0,001046	FRMD4A	FERM domain containing 4 ^a
-11,74	0,028595	0,037286	GLIPR1	GLI pathogenesis-related 1

Tabla 7. Los 50 Transcritos más sobreexpresados en la comparación mDC+C4BP β - vs mDC.

FC	ANOVA p-valor	FDR p-valor	Gen	Descripción
10,4	0,016436	0,038535	ROBO1	roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila)
7,31	0,034129	0,070269	MCTP1	multiple C2 domains, transmembrane 1
7,29	0,018424	0,042317	WWC3	WWC family member 3
6,01	0,036498	0,07422	TLR2	toll-like receptor 2
5,84	0,007322	0,019766	HCAR2	hydroxycarboxylic acid receptor 2 ; hydroxycarboxylic acid receptor 3
5,68	0,001679	0,005922	DSG2	desmoglein 2
5,52	0,001011	0,003859	SVIL	Supervillin
5,37	0,018772	0,042982	S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1
5,37	0,00E+00	0,00E+00	GBGT1	globoside alpha-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1
5,31	0,003126	0,009869	SH3TC1	SH3 domain and tetra-trico-peptide repeats 1
5,22	0,041937	0,083096	MGAT4A	mannosyl (alpha-1,3-) glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A
5,15	0,026609	0,057263	VCAN	Versican
5,11	0,000497	0,002105	IL32	interleukin 32
5,03	0,040813	0,081258	FERMT2	fermitin family member 2
4,97	0,000214	0,001008	MED16	mediator complex subunit 16
4,72	0,039188	0,078654	CD1E	CD1e molecule
4,68	0,007625	0,020431	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
4,67	0,008853	0,023071	EIF4H	eukaryotic translation initiation factor 4H
4,64	0,000485	0,002061	NIN	ninein (GSK3B interacting protein)
4,52	0,00E+00	0,00E+00	TMEM2	transmembrane protein 2
4,49	0,013358	0,032456	LOC100996668	uncharacterized LOC100996668 ; zinc finger E-box binding homeobox 1
4,4	0,031419	0,06572	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
4,38	0,036043	0,073502	C10orf54	chromosome 10 open reading frame 54
4,31	0,003403	0,010581	WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1
4,29	0,002939	0,009388	C10orf54	chromosome 10 open reading frame 54
4,25	0,00E+00	0,00E+00	IL32	interleukin 32
4,12	0,000534	0,002241	PPA2	pyrophosphatase (inorganic) 2
4,03	0,000483	0,002052	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3
3,99	0,004833	0,014106	NR4A1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
3,97	0,008222	0,02172	FES	feline sarcoma oncogene
3,97	0,000017	0,000097	MICB	MHC class I polypeptide-related sequence B
3,94	0,022233	0,049419	PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
3,91	0,035405	0,072438	RBM26	RNA binding motif protein 26
3,88	0,004064	0,012244	MCM5	minichromosome maintenance complex component 5
3,87	0,0455	0,088841	MKNK1	MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1
3,86	0,044246	0,086812	DSG2	desmoglein 2
3,82	0,000427	0,001841	PCNX	pecanex homolog (Drosophila)
3,81	0,000505	0,002132	TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1
3,78	0,033051	0,068526	LAD1	ladinin 1
3,73	0,006142	0,017122	NOTCH1	notch 1
3,73	0,003265	0,010223	MIDN	Midnolin
3,7	0,013541	0,032815	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
3,68	0,001532	0,005495	TTL12	tubulin tyrosine ligase-like family, member 12
3,66	0,016876	0,039369	LRP11	low density lipoprotein receptor-related protein 11
3,6	0,000243	0,001126	PLXND1	plexin D1
3,6	0,029523	0,06244	SCML1	sex comb on midleg-like 1 (Drosophila)
3,59	0,000413	0,001787	PPP6R2	protein phosphatase 6, regulatory subunit 2
3,58	0,000007	0,000044	MIR4680	microRNA 4680 ; programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)
3,57	0,000007	0,000041	UBE2W	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)
3,57	0,001865	0,006458	SVIL	Supervillin

Resultados III – Análisis preliminar del perfil transcripcional inmunomodulador de MoDCs tratadas con C4BP β- o FH

Tabla 8. Los 50 Transcritos más infraexpresados en la comparación mDC+C4BP β- vs mDC.

FC	ANOVA p-valor	FDR p-valor	Gen	Descripción
-17,41	0,000015	0,000086	KRTCAP2	keratinocyte associated protein 2
-16,97	0,010983	0,027595	IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
-14,12	0,037993	0,07672	CPEB1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
-12,53	0,014789	0,0353	CPEB1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
-9,76	0,043536	0,085639	APOC1	apolipoprotein C-I
-9,73	0,03314	0,068664	CPEB1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
-8,35	0,020036	0,045317	CPEB1	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1
-8,13	0,032139	0,066969	TNFAIP8L3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 3
-7,46	0,010658	0,026923	SCIN	Scinderin
-7,1	0,01908	0,043554	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
-7,09	0,04924	0,094699	JUP	junction plakoglobin
-6,95	0,02317	0,051086	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
-6,83	0,023018	0,050813	RBM11	RNA binding motif protein 11
-6,76	0,000548	0,00229	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
-6,55	0,008316	0,021923	TNFAIP8L3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 3
-6,29	0,00E+00	0,00E+00	TSTA3	tissue specific transplantation antigen P35B
-5,9	0,010757	0,027119	ITGB8	integrin, beta 8
-5,77	0,013911	0,033584	NREP	neuronal regeneration related protein
-5,76	0,007679	0,020538	RGS3	regulator of G-protein signaling 3
-5,57	0,009881	0,025282	DHRS3	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3
-5,44	0,040546	0,080841	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
-5,2	0,038659	0,077803	LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2
-5,19	0,046018	0,08966	GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
-5,18	0,006078	0,01697	ITGB8	integrin, beta 8
-4,99	0,007784	0,020765	STAC3	SH3 and cysteine rich domain 3
-4,97	0,028041	0,0598	ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2
-4,89	0,002611	0,008521	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
-4,85	0,000029	0,000166	ITGB8	integrin, beta 8
-4,84	0,031864	0,066514	ALDH1A2	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2
-4,83	0,00097	0,003726	CNNM4	cyclin M4
-4,82	0,00377	0,011499	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
-4,69	0,010071	0,025686	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
-4,69	0,000429	0,001849	CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta
-4,58	0,018118	0,041745	GUCA1A	guanylate cyclase activator 1A (retina)
-4,55	0,02376	0,052169	GALNT7	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)
-4,41	0,010104	0,025747	KLF3	Kruppel-like factor 3 (basic)
-4,26	0,013564	0,032858	IRF8	interferon regulatory factor 8
-4,22	0,000554	0,002311	DOCK7	dedicator of cytokinesis 7
-4,18	0,007143	0,019359	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
-4,13	0,00736	0,019849	CPEB2	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2
-4,11	0,000273	0,001247	DENND1A	DENN/MADD domain containing 1A
-4,1	0,021031	0,047197	MCOLN2	mucolipin 2
-4,09	0,001035	0,003937	GLDN	Gliomedin
-4,08	0,032032	0,066787	MCOLN3	mucolipin 3
-4,06	0,000005	0,000029	ANXA4	annexin A4
-4,05	0,033973	0,070013	TBC1D4	TBC1 domain family, member 4
-4,01	0,035257	0,072204	CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta
-3,93	0,001935	0,006662	STARD4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4
-3,92	0,028237	0,060145	PAM	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
-3,87	0,006163	0,017168	PANX1	pannexin 1

Tabla 9. Los 50 Transcritos más sobreexpresados en la comparación mDC+FH vs mDC.

FC	ANOVA p-valor	FDR p-valor	Gen	Descripción
136,43	0,006207	0,016958	NDRG2	NDRG family member 2
119,86	0,013778	0,031339	CLEC10A	C-type lectin domain family 10, member A
101,99	0,006661	0,017905	NDRG2	NDRG family member 2
90,52	0,012736	0,029494	CLEC10A	C-type lectin domain family 10, member A
79,88	0,021965	0,044883	IL1R2	interleukin 1 receptor, type II
59,61	0,013485	0,030817	GPR68	G protein-coupled receptor 68
53,79	0,04994	0,085323	SOBP	sine oculis binding protein homolog (Drosophila)
45,06	0,000109	0,000585	PLAU	plasminogen activator, urokinase
41,22	0,000783	0,003217	MMP9	matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
40,08	0,001123	0,004339	SH3PXD2B	SH3 and PX domains 2B
39,45	0,019488	0,040925	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)
36,23	0,001052	0,004112	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
34,84	0,034245	0,063327	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
30,74	0,014093	0,031887	CYP2S1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1
30,12	0,032087	0,060222	STAB1	stabilin 1
28,77	0,014128	0,031949	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1
27,99	0,010409	0,025274	RNASE6	ribonuclease, RNase A family, k6
27	0,001013	0,003986	NRP1	neuropilin 1
26,43	0,003956	0,011886	FRMD4A	FERM domain containing 4 ^a
26,21	0,044968	0,078668	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1
25,95	0,027432	0,053319	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)
25,77	0,009839	0,024206	MMP12	matrix metallopeptidase 12 (macrophage elastase)
25,25	0,046227	0,080329	TMEM45B	transmembrane protein 45B
24,34	0,004351	0,012842	SLAMF8	SLAM family member 8
24	0,001728	0,006165	TBXAS1	thromboxane A synthase 1 (platelet)
23,92	0,018932	0,040046	UBASH3B	ubiquitin associated and SH3 domain containing B
23,45	0,005589	0,015633	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
22,68	0,017235	0,037189	ETV5	ets variant 5
22,62	0,000755	0,003122	SLC2A14	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14 ; solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
22,26	0,021202	0,043664	PYCARD	PYD and CARD domain containing
22,24	0,021158	0,043591	RNASE1	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)
21,9	0,01964	0,041168	PDLIM4	PDZ and LIM domain 4
20,11	0,011055	0,026471	AGPAT9	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9
20,04	0,000046	0,000265	PLAU	plasminogen activator, urokinase
20	0,002252	0,007615	RGCC	regulator of cell cycle
19,99	0,024374	0,048601	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
19,98	0,009736	0,02402	TMEM236	transmembrane protein 236
19,69	0,005051	0,014439	FAM198B	family with sequence similarity 198, member B
19,65	0,000218	0,001079	PHLDA1	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1
19,52	0,00081	0,003312	SDC2	syndecan 2
19,35	0,00606	0,016633	LRRC33	leucine rich repeat containing 33
19,13	0,002447	0,008132	OCSTAMP	osteoclast stimulatory transmembrane protein
18,87	0,015319	0,033969	PYCARD	PYD and CARD domain containing
18,77	0,005901	0,016283	FRMD4A	FERM domain containing 4 ^a
18,54	0,000703	0,002941	EIF4G3	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3
18,51	0,007504	0,019644	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
18,5	0,024875	0,049404	CYB5R1	cytochrome b5 reductase 1
18,24	0,007378	0,019404	MARCH1	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1, E3 ubiquitin protein ligase
17,65	0,022636	0,045938	TAPT1	transmembrane anterior posterior transformation 1
17,24	0,008432	0,021486	NCAPH	non-SMC condensin I complex, subunit H

Resultados III – Análisis preliminar del perfil transcripcional inmunomodulador de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH

Tabla 10. Los 50 Transcritos más infraexpresados en la comparación mDC+FH vs mDC.

FC	ANOVA p-valor	FDR p-valor	Gen	Descripción
-116,29	0,006922	0,018457	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
-85,38	0,006818	0,01824	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
-77,72	0,006311	0,017173	CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
-70,41	0,002908	0,009317	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
-45,11	0,010152	0,024796	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
-21,28	0,016138	0,035363	NREP	neuronal regeneration related protein
-19,58	0,003219	0,010094	IL12A	interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
-16,31	0,016399	0,03577	IL12B	interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
-15,4	0,021483	0,04411	GBP4	guanylate binding protein 4
-14,92	0,000841	0,003414	SCIN	Scinderin
-13,07	0,003316	0,010332	IL27	interleukin 27
-12,81	0,049373	0,084577	GBP4	guanylate binding protein 4
-11,69	0,04569	0,07959	CLEC2D	C-type lectin domain family 2, member D
-9,79	0,029281	0,056118	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
-9,11	0,03687	0,067161	BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)
-8,48	0,043646	0,076824	BCL2L14	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)
-7,9	0,000002	0,000012	KRTCAP2	keratinocyte associated protein 2
-7,5	0,047856	0,082541	ITGB8	integrin, beta 8
-7,15	0,016383	0,035747	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
-7,14	0,029852	0,056961	CYP7B1	cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1
-6,61	0,004526	0,013251	NREP	neuronal regeneration related protein
-6,5	0,013825	0,031422	ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
-6,38	0,000259	0,001255	GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
-5,89	0,001387	0,00516	NREP	neuronal regeneration related protein
-5,68	0,000352	0,001636	LINC00158	long intergenic non-protein coding RNA 158
-5,54	0,014791	0,03307	FAS	Fas cell surface death receptor
-5,53	0,000041	0,000238	SCIN	Scinderin
-5,45	0,013295	0,030496	TBX21	T-box 21
-5,28	0,008197	0,021014	NREP	neuronal regeneration related protein
-5,27	0,000146	0,000758	GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
-5,19	0,008332	0,021288	ETV7	ets variant 7
-5,16	0,043396	0,07647	TXK	TXK tyrosine kinase
-4,99	0,038953	0,070164	ETV7	ets variant 7
-4,71	0,031002	0,058637	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
-4,7	0,003543	0,010897	IRF8	interferon regulatory factor 8
-4,61	0,034098	0,063106	ETV7	ets variant 7
-4,6	0,00112	0,004331	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
-4,53	0,005067	0,014471	RPS6KA5	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5
-4,5	0,01353	0,030899	CACNA1A	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
-4,17	0,004907	0,01411	IRF8	interferon regulatory factor 8
-4,14	0,009804	0,024145	MSR1	macrophage scavenger receptor 1
-3,98	0,025375	0,050175	NEXN	nexilin (F actin binding protein)
-3,96	0,019666	0,041207	CNKSR3	CNKSR family member 3
-3,91	0,002145	0,007331	IRF8	interferon regulatory factor 8
-3,91	0,000181	0,000921	GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
-3,79	0,00E+00	0,00E+00	GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
-3,79	0,015996	0,03513	PAM	peptidylglycine alpha-amidating monoxygenase
-3,67	0,013866	0,031492	PRKAR1B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta
-3,64	0,00528	0,014948	ISCA1	iron-sulfur cluster assembly 1 homolog (S. cerevisiae)
-3,62	0,000247	0,001206	PRKAR2B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta

Entre dichos genes compartidos se encontró que la expresión de 23 de ellos estaba alterada en los tratamientos iDC y mDC + FH mientras que solamente 11

lo estaban a partir de los tratamientos mDC + C4BP β - y mDC + FH. No se detectó ningún gen que estuviera alterado en las tres condiciones de estudio.

Después de establecer dos criterios importantes a la hora de hacer la selección final de genes para su correspondiente validación: *i)* el presentar los valores absolutos de *fold-change* más altos; y *ii)* la identificación de genes con el mismo patrón de regulación entre las diferentes condiciones analizadas; se estableció un tercer tipo de criterio de selección basado en la anotación funcional de cada uno de los genes anteriormente descritos. Para tal propósito se utilizó la herramienta *Gene Set Enrichment Analysis - GSEA* (Subramanian et al., 2005) con el fin de detectar las vías moleculares representadas en el grupo de genes diferencialmente expresados en cada condición. Al utilizar su *Leading Edge Analysis* conjuntamente con el sistema de anotación *C7:immunologic signatures*, consistente en la anotación manual de genes asociados con diferentes estados y perturbaciones del sistema inmune en humanos y modelos murinos a partir de estudios publicados, se pudieron establecer asociaciones entre los genes pre-seleccionados y categorías funcionales específicas dentro de la respuesta inmune, siendo los genes asociados con la respuesta inflamatoria los que representaron mayor interés para los objetivos de la presente Tesis.

Tabla 11. Genes seleccionados para la validación de su expresión mediante RT-qPCR.

Identificador ¹	Símbolo ²	Función ¹
Hs00924864_g1	CLEC10A ⁴	C-Type Lectin Domain Family 10, Member A
Hs00911250_m1	CSF1R ⁴	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
Hs04187682_g1	CXCL11 ⁴	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 11
Hs00171065_m1	CXCL9 ⁴	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 9
Hs01073447_m1	IL12A ³	Interleukin 12A (Natural Killer Cell Stimulatory Factor 1, Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor
Hs01011518_m1	IL12B ⁴	Interleukin 12B (Natural Killer Cell Stimulatory Factor 2, Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor
Hs01030384_m1	IL1R2 ⁴	Interleukin 1 Receptor, Type II
Hs00175238_m1	IRF8 ³	Interferon Regulatory Factor 8
Hs00234579_m1	MMP9 ⁶	Matrix Metalloproteinase 9 (Gelatinase B, 92kda Gelatinase, 92kda Type IV Collagenase)
Hs00234007_m1	MSR1 ³	Macrophage Scavenger Receptor 1
Hs01045114_g1	NDRG2 ⁴	NDRG Family Member 2
Hs01547324_gH	PYCARD ⁴	PYD And CARD Domain Containing
Hs00268049_m1	ROBO1 ⁵	Roundabout, Axon Guidance Receptor, Homolog 1 (Drosophila)
Hs02330328_s1	SOCS3 ⁵	Suppressor Of Cytokine Signaling 3

1 La información relativa al identificador del gen y a la descripción de su función molecular esta asociada a la base de datos del proveedor de las sondas *TaqMan*, ThermoFisher®.

2 El símbolo de cada gen se corresponde con la nomenclatura actualizada descrita en por el *HUGO Gene Nomenclature Committee – HGNC*.

3 Genes con patrón de expresión regulado en las condiciones mDC+FH y mDC+C4BP β -.

4 Genes con patrón de expresión regulado en las condiciones iDC y mDC+FH.

5 Genes con patrón de expresión regulado en las condiciones mDC+ C4BP β -.

6 Genes con patrón de expresión regulado en las condiciones mDC+FH.

Finalmente, a partir de los tres criterios de selección antes descritos, se seleccionaron un total de 14 genes cuya expresión fue analizada mediante una aproximación cuantitativa, qPCR, para determinar de una manera más precisa su perfil de expresión en las diversas condiciones testadas y así determinar el nivel de certeza de los patrones de expresión observados en el ensayo de *microarray* (Tabla 11).

7.4. Validación de la expresión diferencial de genes seleccionados mediante RT-qPCR

La expresión de los genes seleccionados de acuerdo a los criterios establecidos en la sección inmediatamente anterior se analizó en las muestras

de ARN utilizadas originalmente para el ensayo de *microarrays*. Tras la correspondiente síntesis de los ADNc, la expresión de los genes seleccionados se cuantificó con el *TaqMan Gene Expression Assays Array 96 Well Plate* (Thermo Fisher Scientific). Los cambios de expresión se determinaron utilizando la expresión del gen *PPIA* (Ciclofilina A, *assay id* Hs04194521_s1) como control endógeno y la expresión en la muestra mDC como referencia.

Los valores de RQ (*Relative Quantification*) obtenidos para cada gen, en cada condición, mediante el método $\Delta\Delta C_t$, se compararon con los correspondientes valores de expresión obtenidos en el ensayo de *microarrays*. Para tal propósito se realizaron estudios de correlación lineal para determinar el grado de reproducibilidad entre los datos provenientes del ensayo de *microarrays* y de la qPCR, y así finalmente identificar si los genes seleccionados realmente presentan un patrón de expresión diferencial en cada tratamiento estudiado.

Los resultados de dicho análisis comparativo se pueden observar en la [Figura 36](#). En todos los casos se obtuvieron coeficientes de determinación altos ($R^2 > 0.71$, equivalente a un $R > 0.84$) que validaron los patrones de expresión diferencial inferidos a partir de los estudios de expresión génica llevados a cabo a nivel de genoma humano completo mediante el ensayo de *microarrays*.

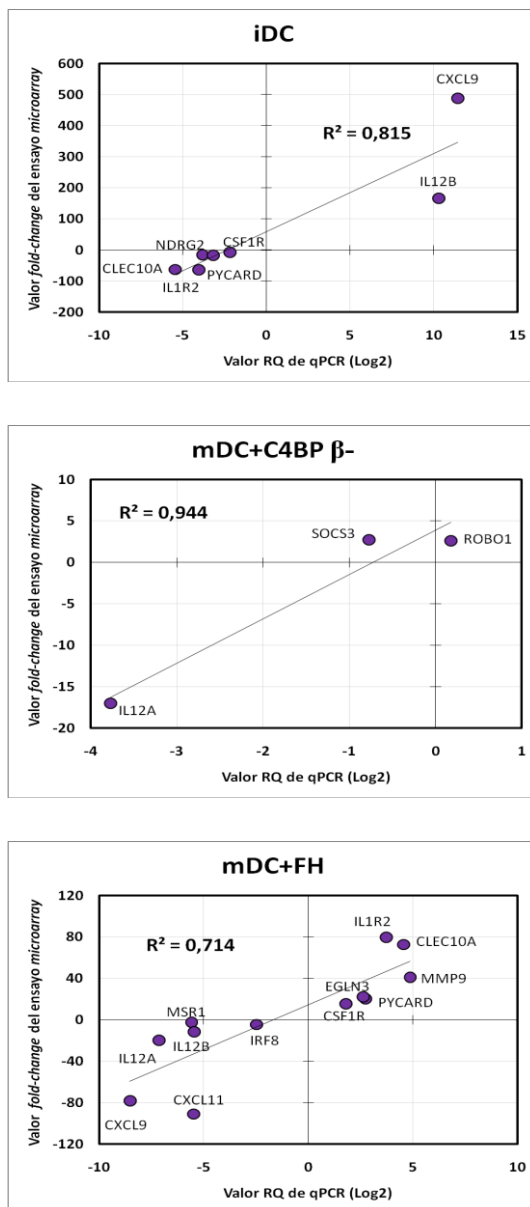


Figura 36. Análisis de correlación lineal entre los datos de expresión del ensayo de *microarrays* y los datos de qPCR para los genes seleccionados. Las correlaciones se presentan de acuerdo a cada tratamiento estudiado, siempre usando como referencia la expresión de los genes en la condición mDC. La correlación lineal esta representada por la línea sólida en pendiente y el coeficiente de determinación R^2 que se presentan dentro de cada gráfico. Los símbolos de cada punto se corresponden con los símbolos de los genes analizados de acuerdo a la nomenclatura HGNC.

7.5. Predicción de las vías de señalización inducidas por C4BP β- o FH sobre MoDCs

Al verificar el nivel certeza de los datos derivados del ensayo de expresión de *microarray* mediante la validación de los perfiles de expresión de 14 genes seleccionados, se continuó con un análisis funcional de las probables vías de señalización reguladas por la molécula inmunomoduladora C4BP β-.

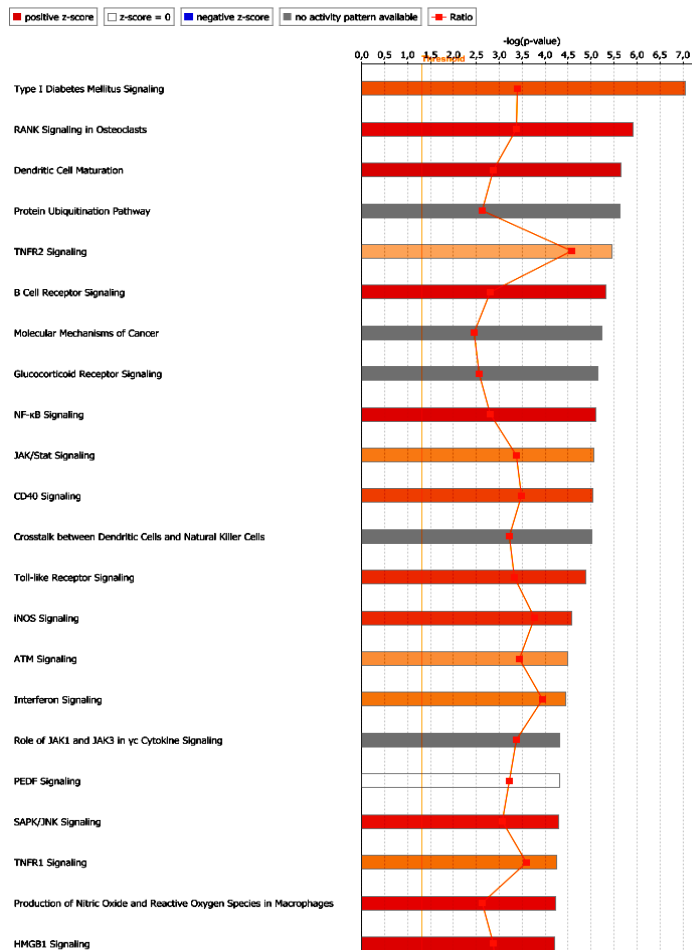


Figura 37. Esquema de las vías de señalización canónicas potencialmente activadas en células mDCs. Los valores de expresión obtenidos del ensayo *microarray* en la comparativa mDC vs iDC se analizaron con la herramienta IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). Las barras representan la evidencia acumulada, en términos de genes involucrados, sobre cada vía de señalización; mientras que los colores indican el tipo de regulación observada. Escala de Rojo a Azul. Rojo = regulación al alta, Azul = regulación a la baja. Se presentan las categorías con mayor puntuación (Z-score).

Al incorporar los datos de expresión de los diversos tratamientos a la plataforma de análisis IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) se pudo cuantificar la expresión acumulada para cada vía de señalización celular anotada en el sistema. En primera instancia, y como control de este análisis, se establecieron las vías de señalización activadas en las células mDC comparadas con iDCs. Allí se pudo observar que la herramienta predijo la activación de un gran número de vías de señalización directamente implicadas en la diferenciación y activación/maduración de DCs en respuesta a estímulos de tipo LPS. Ejemplos de ellas son las vías: *Dendritic Cell Maturation*; *TNFR2 Signaling*, implicadas en procesos de inflamación; *B Cell Receptor Signaling*; *NF- κ B Signaling*; *JAK/Stat Signaling*, que controlan la proliferación y diferenciación de células inmunes; *CD40 Signaling*, característica de APCs; *Toll-like Receptor Signaling*; *Interferon Signaling*; *Nitric Oxide Production in Macrophages*; y *HGMB1 Signaling*, implicadas en la respuesta inflamatoria (Figura 37).

El mismo tipo de análisis se realizó para el tratamiento de mDC+C4BP β - en comparación con mDCs. En donde algunas de las categorías asociadas con la maduración y activación de DCs (Figura 37) como *Nitric Oxide Production in Macrophages*, *ILK Signaling* y *NF- κ B Signaling* se ven reprimidas a como consecuencia del tratamiento con C4BP β - (Figura 38).

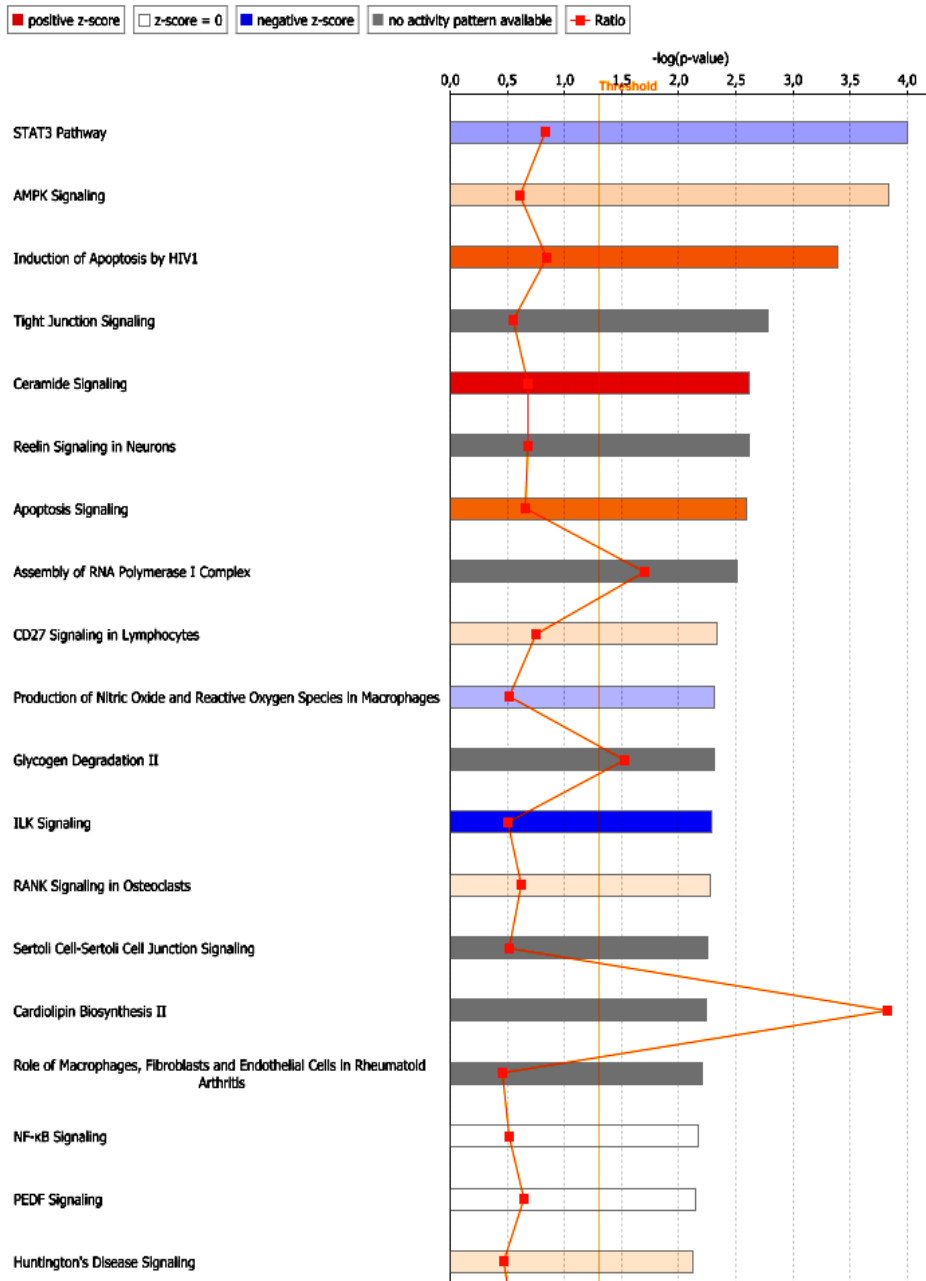


Figura 38. Esquema de las vías de señalización canónicas potencialmente reguladas por C4BP β -. Los valores de expresión obtenidos del ensayo *microarray* en la comparativa mDC+C4BP β - vs mDC se analizaron con la herramienta IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). Las barras representan la evidencia acumulada, en términos de genes involucrados, sobre cada vía de señalización; mientras que los colores indican el tipo de regulación observada. Escala de Rojo a Azul. Rojo = regulación al alta, Azul = regulación a la baja. Se presentan las categorías con mayor puntuación (Z-score).

De igual manera, el análisis predijo una notoria activación de la vía de señalización *Ceramide Signaling*. Dentro de los componentes principales de esta vía se encuentra el receptor 1 de la esfingosina 1 fosfato (SP1R1), el cual en los ensayos de *microarray* presentó un cambio de expresión de 5.37 (Figura 39), indicando que se observa sobre-expresado en células mDC tratadas con C4BP β -.

Símbolo	Nombre	Identificador	Expresión		Esperado
		Affymetrix	Exp Fold Change	Exp p-value	
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	11721377_x_at	↓-4,820	3,77E-03	↓Down
CERK	ceramide kinase	11717116_at	↑2,280	9,45E-03	↑Up
CTSD	cathepsin D	11757848_s_at	↓-2,900	5,22E-03	↑Up
MAPK8	mitogen-activated protein	11759192_a_at	↑3,260	3,76E-03	↑Up
PIK3R2	phosphoinositide-3-	11744004_at	↓-2,110	6,07E-04	↓Down
PIK3R3	phosphoinositide-3-	11754316_a_at	↓-2,210	3,12E-04	↓Down
PPP2R3A*	protein phosphatase 2,	11726102_a_at*	↓-3,020	4,58E-02	↑Up
PPP2R5B	protein phosphatase 2,	11719874_a_at	↑2,050	1,00E-06	↑Up
PPP2R5D	protein phosphatase 2,	11752412_a_at	↑2,630	3,20E-02	↑Up
PPP2R5E*	protein phosphatase 2,	11759024_at*	↑2,870	4,14E-07	↑Up
S1PR1	sphingosine-1-phosphate	11743815_a_at	↑5,370	1,88E-02	↑Up
SPHK2	sphingosine kinase 2	11723662_a_at	↑2,550	3,42E-04	↑Up
TNFRSF1B	tumor necrosis factor	11753025_a_at	↑2,400	4,32E-02	↑Up

© 2000–2016 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 39. Genes expresados a la alta y a la baja en la vía de las ceramidas.

Teniendo en cuenta el papel que juega la esfingosina 1 fosfato en la modulación de la respuesta inmune mediada a través de DCs, se hace imprescindible el estudio de su vía de señalización así como también se hace necesario el entendimiento de su papel regulador en los procesos inmunoinflamatorios a través de interruptores moleculares como el factor NF- κ B (Figura 40), una pieza maestra en la activación y señalización del sistema inmune. Además de la sobre-expresión del receptor *S1PR1*, el cual permite la entrada de la esfingosina al interior de las células, se observó la sobre-expresión de genes como *MAPK8*, *SPHK2* y *TNFRSF1B*, todos participan en mecanismos de respuesta inflamatoria (Figura 40).

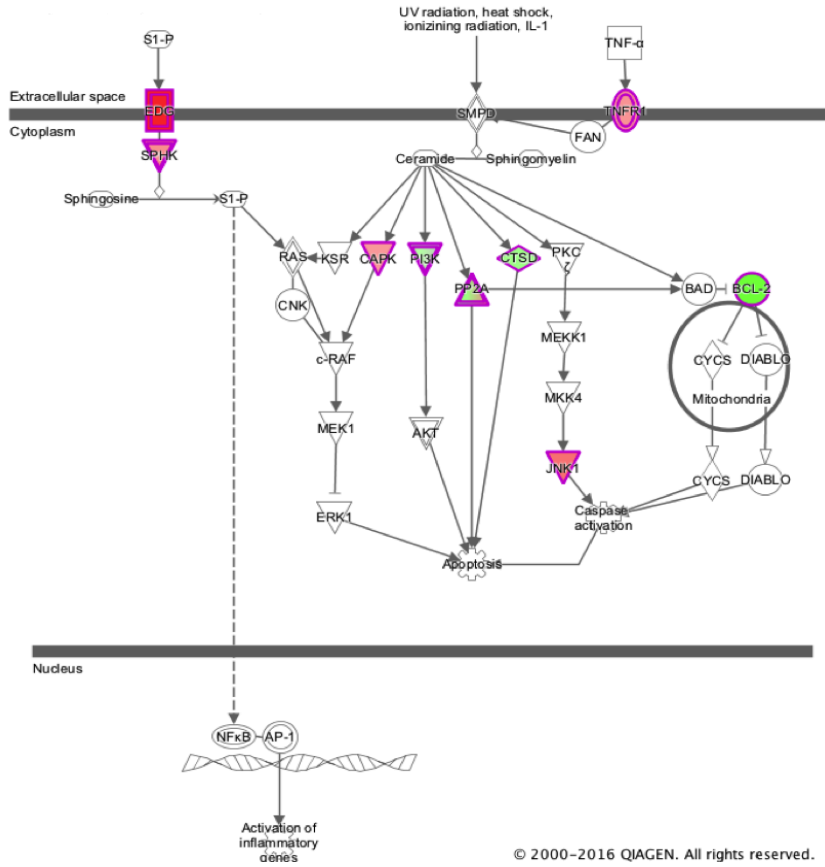


Figura 40. Análisis IPA correspondiente a vía de las ceramidas

Igualmente, recientes estudios han demostrado el papel que juegan los esfingolípidos, como la esfingosina 1 fosfato, en la modulación de la respuesta inflamatoria sobre DCs (Arlt et al., 2014; Maceyka et al., 2012; Spiegel and Milstien, 2011).

El mismo tipo de análisis IPA se realizó para los datos de expresión derivados del ensayo de mDC+FH, los cuales fueron de comparados contra los datos de expresión de células mDCs (Figura 41).

Resultados III – Análisis preliminar del perfil transcripcional inmunomodulador de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH

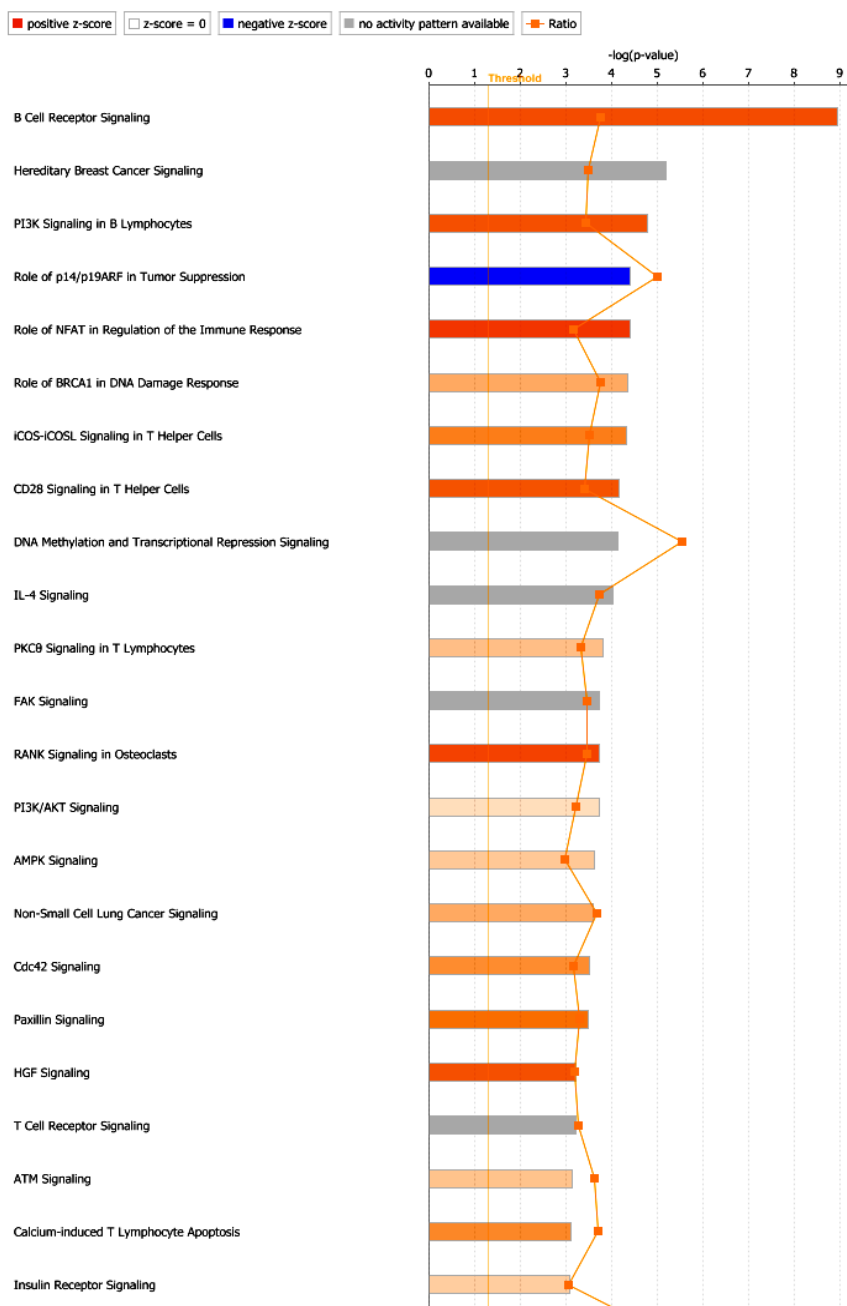


Figura 41. Esquema de las vías de señalización canónicas potencialmente reguladas por FH. Los valores de expresión obtenidos del ensayo *microarray* en la comparativa mDC+FH vs mDC se analizaron con la herramienta IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*). Las barras representan la evidencia acumulada, en términos de genes involucrados, sobre cada vía de señalización; mientras que los colores indican el tipo de regulación observada. Escala de Rojo a Azul. Rojo = regulación al alta, Azul = regulación a la baja. Se presentan las categorías con mayor puntuación (Z-score).

Tras el análisis de la expresión génica activada y reprimida por FH se pudo detectar la activación de una señalización análoga a la inducida a través de receptores de células B, de la señalización en células B mediante la vía PI3K, y de la señalización en células T_H a través de la molécula CD28. Por otra parte, también se observó la activación de la regulación de la respuesta inmune a través de NFAT.

7.6. Análisis preliminar de la señalización mediada por C4BP β - sobre MoDCs: cribado de Inmunoreceptores

Adicionalmente a los resultados obtenidos a partir de los ensayos de expresión, se han obtenido resultados preliminares a partir del estudio directo de la activación de receptores de superficie celular en mDCs. Dicha técnica, conocida como ensayo de *Phosphoarray* es capaz de analizar la respuesta de 59 receptores celulares de superficie asociados con la respuesta inmune (*Proteome Profile Human Phospho-Immune Receptor Array Kit*, R&D Systems).

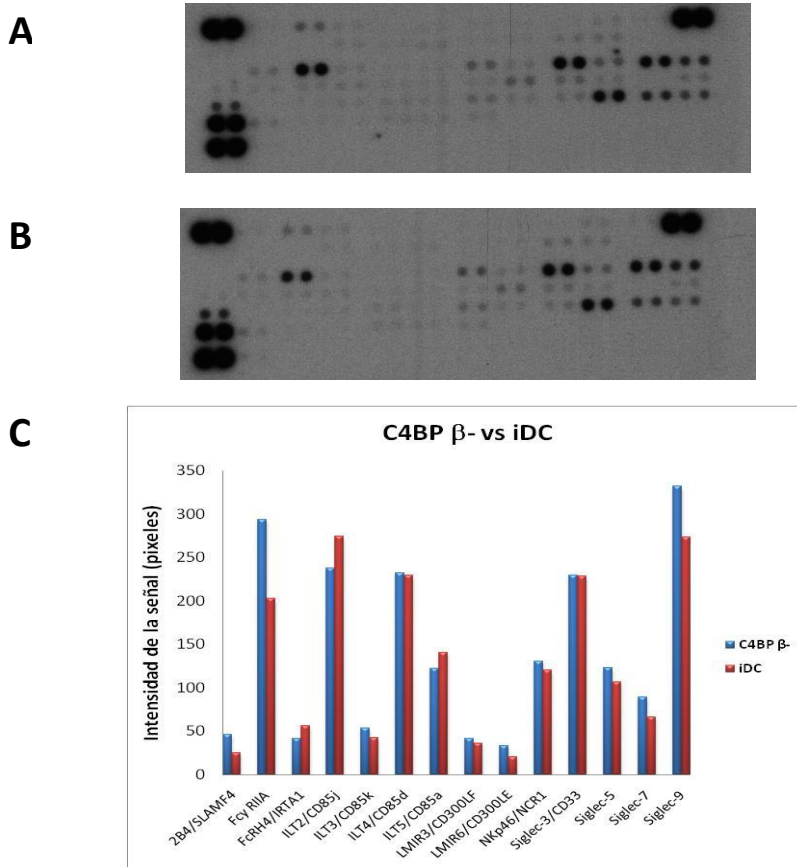


Figura 42. Activación de inmunoreceptores por parte de C4BP β -. Se realizó un ensayo de fosforilación de inmunoreceptores a partir de extractos proteicos de MoDCs: (A) no tratados (B) tratados con C4BP β -. La densitometría de las diferentes señales producidas en los *phosphoarrays* se presenta en el panel C para ambos tratamientos.

Los resultados preliminares presentados en la [Figura 42](#) indican una mayor activación de los receptores B4/SLAMF4 y LMIR6/CD300LE con un aumento de la señal de 85 y 64%, respectivamente. Sin embargo, las intensidades obtenidas para dichas señales están muy próximas al límite de detección. Otras señales con mayor intensidad y aumento en el tratamiento con C4BP β - fueron la señal de los receptores Fc γ RIIA y Siglec-9 con un aumento en la señal de 45 y 22%, respectivamente. Estos resultados aunque preliminares, y a la espera de más réplicas experimentales, resultan de gran relevancia para la selección de receptores diana de superficie sobre los cuales se puedan realizar las

comprobaciones pertinentes sobre la funcionalidad de C4BP β -. Dichas comprobaciones se realizarán en paralelo con aquellas planteadas a partir de las predicciones hechas a partir del ensayo de *microarrays*, todas ellas trazadas sobre el objetivo principal de caracterizar la base molecular de la inmunomodulación ejercida por C4BP β - sobre mDCs.

8. Discusión

El sistema del complemento constituye una pieza fundamental de la respuesta inmune innata en la erradicación de infecciones causadas por microorganismos patógenos. Con el fin de mantener la homeostasis inmunológica, los principales inhibidores solubles del complemento, C4BP y Factor H, comparten actividades complementarias en la regulación de la activación exacerbada del complemento; de tal manera que ofrecen protección contra las consecuencias potencialmente adversas que puedan generarse a partir de la respuesta inflamatoria, de la activación de la respuesta inmune adaptativa, y de las células apoptóticas (Trouw et al., 2007).

En tesis doctorales previamente realizadas en el laboratorio del Dr. Aran se ha caracterizado la función del inhibidor soluble del complemento C4BP, isoforma $\alpha7\beta0$ y descrita aquí como C4BP β -, en la modulación de la actividad de las células dendríticas derivadas de monocitos, MoDCs, y la adquisición de un fenotipo semi-maduro, anti-inflamatorio y tolerogénico (Olivar et al., 2013).

Aunque el Factor H (FH), otro inhibidor soluble del complemento, ha sido implicado en diversas funciones como adhesión, fagocitosis y modulación de la activación celular a través de la unión a receptores específicos en células del huésped (Kopp et al., 2012), no hay información concerniente a un posible papel inmunomodulador de FH sobre MoDCs, similar al previamente caracterizado para la isoforma $\alpha7\beta0$ del inhibidor soluble del complemento C4BP, el complejo multimérico C4BP β -. La caracterización de dicho papel inmunomodulador de MoDCs por parte de FH ha sido uno de los objetivos trazados en la presente Tesis.

8.1. FH induce un estado tolerogénico en MoDCs

En este estudio, se ha demostrado por primera vez que FH, el principal regulador soluble de la proteína C3b activadora de la vía alternativa del complemento, es también capaz de inducir un fenotipo anti-inflamatorio y tolerogénico en un modelo de DCs inflamatorias capaces de inducir la diferenciación de células T_{H1} de acuerdo a estudios previamente descritos (Hespel and Moser, 2012; Leon and Ardavin, 2008; Novak et al., 2004). En consecuencia, FH, al igual que C4BP β -, es capaz de alterar la maduración de MoDCs tras el estímulo con LPS e inducir cambios morfológicos y funcionales que se asemejan a aquellos característicos de las células supresoras y derivadas de linaje mielóide, MDSCs (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Como resultado, FH redujo la capacidad de MoDCs para activar células T, atenuando la expresión de moléculas estimuladoras como CD80, CD86 y CD40, y del marcador de maduración CD83. Dicha atenuación de la expresión de moléculas estimuladoras, a pesar de la estimulación con LPS, impediría la polarización mediada por NF- κ B de células T para su diferenciación a T_{H1} . Contrariamente al efecto observado para CD40, CD80, CD83 y CD86, FH no alteró el patrón de expresión de moléculas de tipo CMH-II (HLA-DR), de igual manera a lo observado con C4BP β - (Olivar et al., 2013), sugiriendo que la capacidad de

presentación de antígenos permanece intacta en MoDCs tratadas con FH. No obstante, la capacidad de internalizar antígenos sí se vio disminuida tras el tratamiento de MoDCs con FH, contrariamente a lo observado en MoDCs tratadas con C4BP β - (Olivar et al., 2013). Esta nueva característica promovida por FH no debería afectar la actividad inmunomoduladora de MoDC debido a que moléculas terapéuticas inmunoreguladoras como el neuropéptido intestinal vasoactivo (VIP) también disminuye la expresión de moléculas CD80 y CD86, induce la producción de IL-10 e inhibe la actividad fagocítica de DCs (Chorny et al., 2006; Chorny et al., 2005).

La alteración del fenotipo de maduración de DCs por parte de FH hacia un estado tolerogénico, el cual fue deducido a partir del estudio de los marcadores de superficie específicos y moléculas estimuladoras, podría estar basado en la activación de señales apoptóticas dentro de DCs. Este tipo de señalización también ha sido asociado con procesos de tolerancia e inmunosupresión, de especial relevancia cuando se activan durante proceso infecciosos patogénicos (Kushwah and Hu, 2010). Los datos presentados en este estudio sugieren que FH no ejerce su papel tolerogénico sobre DCs a través de vías de señalización activadoras de procesos apoptóticos, por tanto, se sugiere que la función de FH podría estar asociada a la activación y/o represión de otros mecanismos celulares específicos mediante interacción entre FH y un receptor celular de superficie. Dicho receptor celular podría ser o no equivalente al utilizado por C4BP β - para ejercer también su efecto tolerogénico sobre DCs, como se ha descrito previamente (Olivar et al., 2013). Los fenotipos analizados tras los tratamientos simultáneos de DCs con FH y C4BP β - indican que no existe un efecto aditivo en la actividad de ambas proteínas, un resultado indicativo de una acción independiente de cada proteína, supuestamente ejercida a través de receptores independientes.

8.2. FH previene el estado pro-inflamatorio de MoDCs activadas

El análisis de la citoquinas implicadas en la biología de las DCs confirmó que FH es capaz de revertir el perfil pro-inflamatorio inducido por la exposición a LPS, reduciendo los niveles de las citoquinas IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e IFN- γ y, a cambio, estimulando la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. El papel de FH en la secreción de IL-10 tendría efectos profundos en la modulación del estado tolerogénico debido a que ella misma bloquea la síntesis de IL-12 e induce la represión de moléculas estimuladoras en DCs, potenciando así su fenotipo tolerogénico (Steinbrink et al., 1997). Adicionalmente, estudios previos también han demostrado que IL-10, en conjunción con TGF- β 1, es capaz de generar DCs tolerogénicas capaces de inducir anergia en células CD4+ e induciendo su diferenciación a células T_{reg} (Torres-Aguilar et al., 2010).

Los estudios cinéticos realizados en el presente estudio indican que para obtener el perfil anti-inflamatorio y fenotipo tolerogénico en MoDCs tratadas con FH, es necesaria la presencia de éste desde el inicio del proceso de diferenciación de MoDCs. Tanto el fenotipo de expresión CD83/CD86 como el perfil anti-inflamatorio, caracterizado por la disminución de la producción de IL-12, se han observado en tratamientos restringidos únicamente a día 1 del estado de diferenciación. Dichos datos soportan la idea de que la actividad inmunomoduladora de FH se ejerce de manera temprana, siendo imposible revertir la maduración de MoDCs por parte de FH. Una vez esta completamente instaurada. Ello avala que el uso de FH para inducir inmunotolerancia en MoDCs para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y de rechazo en trasplantes para la generación de DC tolerogénicas *ex vivo* seguido de trasplantes autólogos con dichas células reguladoras (Raich-Regue et al., 2014; Stoop et al., 2011; Thomson et al., 2016).

8.3. Los dominios CCP19-20 de FH median su función tolerogénica

La actividad tolerogénica de los inhibidores solubles C4BP β - y FH sobre las DCs no es idéntica, análogamente a lo que sucede al comparar diferentes agentes inmunosupresores (Naranjo-Gomez et al., 2011). Datos previos indican que las mutaciones en la región C-terminal de FH predisponen a los portadores al síndrome hemolítico urémico atípico (aHUS) y a otras microangiopatías (de Cordoba and de Jorge, 2008). Por tanto, el papel inmunomodulador descrito para FH en la presente tesis doctoral reviste gran importancia para el completo entendimiento de dichas asociaciones genéticas. Mediante un estudio funcional, utilizando diferentes variantes recombinantes de la proteína FH, se ha demostrado que la región de la proteína donde se localizan los dominios CCP19-20, los cuales se unen a C3b y a polianiones como glicosaminoglicanos (GAGs) para brindar protección en la superficie celular, es donde reside la actividad tolerogénica de la proteína. En consecuencia, estos dos dominios serían también los responsables de la unión de FH con su respectivo receptor en la superficie de la célula. Además, dicha región es aprovechada por varios patógenos microbianos que se unen similarmente a FH a través de los dominios CCP19-20. El uso del fragmento recombinante FHL1, y varios mutantes de delección, indican que la actividad inmunomoduladora de FH no reside en FHL1. Estudios recientes han descrito que los dominios CCP6-8 y CCP19-20 de FH están mediando diferencialmente su unión a diferentes tejidos. Los dominios CCP19-20 se unen débilmente a los GAGs-heparina en comparación con los dominios CCP6-8. Por tanto los resultados obtenidos indicarían que los dominios CCP19-20 de FH, localizados en su región C-terminal, tendrían la capacidad de unirse a un receptor de superficie, aún por determinar, para ejercer su actividad inmunomoduladora (Clark et al., 2013).

8.4. Análisis preliminar de receptores de superficie capaces de mediar la actividad inmunomoduladora de FH

Se ha sugerido que FH es capaz de unir moléculas de adhesión como las integrinas CR3 y CR4 presentes en la superficie de células inmunes (Kopp et al., 2012). De acuerdo con los resultados presentados, ni la integrina CR3 ni la CR4 mediarían la actividad inmunomoduladora de FH sobre MoDCs. Alternativamente, el reconocimiento tisular por parte de FH ha sido caracterizado previamente y está mediado por las regiones de unión a GAG presentes en FH (CCP6-8 y CCP19-20) (Clark et al., 2013). A pesar de ello, los datos presentados indican que la actividad tolerogénica sobre MoDCs por parte de FH tampoco está mediada por GAGs. La última aproximación abordada para explicar el mecanismo molecular de acción de FH sobre MoDCs consistió en estudiar si FH interacciona con éstas células a través de receptores *scavenger*. Además del reconocimiento de patógenos, los receptores *scavenger* funcionan como limpiadores del sistema inmune mediante la detección y eliminación del material inservible y de sustancias extrañas no antigénicas (Canton et al., 2013). De acuerdo a los resultados, FH tampoco ejerce su efecto inmunotolerogénico a través de dichos receptores.

Hasta la fecha, el(los) receptor(es) de superficie celular que median la actividad tolerogénica de los inhibidores solubles del complemento C4BP β - y FH se desconocen. En consecuencia, nuevas estrategias basadas en el análisis de la expresión génica de MoDCs, bajo la influencia de dichos factores inmunomoduladores, se abordaron con el propósito de arrojar luz sobre las vías de señalización activadas en cada condición.

8.5. C4BP β - y FH inducen patrones de expresión diferentes sobre MoDCs

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de expresión génica indican que la respuesta inmunomoduladora activada por C4BP β - y FH sobre MoDCs tiene una base molecular distinta. Diferentes mecanismos de señalización estarían mediando, al menos en parte, la respuesta tolerogénica de DCs. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos funcionales utilizando conjuntamente C4BP β -y FH indicaron que no existía una sinergia o acción aditiva entre ambas moléculas inmunomoduladoras. Los datos de expresión génica corroboraron dicha información al observarse diferencias significativas en los correspondientes perfiles de expresión. El análisis de expresión génica en DCs tolerogénicas iniciado aquí representa una aproximación para explicar dicho fenotipo a nivel molecular considerando el genoma completo. Estudios previos realizados en DCs tolerogénicas humanas indican la sobre-expresión de genes implicados en respuesta inmune, activación de linfocitos, metabolismo, señalización y adhesión celular. Dichos estudios se han realizado utilizando varios agentes tolerogénicos como IL-10, VitD3 o Dexametasona, en conjunción con moléculas activadoras de DCs como LPS (Malinarich et al., 2015; Perrier et al., 2004).

Globalmente, los resultados de expresión génica indican una gran variedad en la respuesta celular mediada por los diferentes agentes usados para generar tolerogenicidad en DCs, lo cual confirma que la búsqueda de reguladores o vías de señalización “maestras” para la activación del estado tolerogénico de DCs puede resultar complicada, (Schinnerling et al., 2015). Ello también se confirma con la respuesta de DCs a agentes tolerogénicos analizada a nivel de proteoma (Ferreira et al., 2012; Ferreira et al., 2009).

8.6. Vías de señalización por la cuales FH y C4BP β - podrían inducir tolerancia

A partir de los ensayos de expresión de genoma completo realizados sobre DCs tratadas con FH se logró discernir la activación de varias vías de regulación de la respuesta celular inmune. Dentro de ellas, la sobre-expresión de los componentes moleculares de la señalización en células T_H a través de la molécula CD28, y de aquellos componentes involucrados en la señalización a través de BCRs. Aunque dichas señalizaciones teóricamente no podrían darse al interior de DCs por ser vías de señalización propias de cada tipo de célula B y T, estos procesos han sido implicados en el control de células autoreactivas y generación de anérgias (Bour-Jordan and Blueston, 2002; Rosenspire and Chen, 2015). En cuanto a la activación de regulación de la respuesta inmune mediante el factor nuclear NFAT, estudios recientes indican que el factor de transcripción nuclear NFAT1 es indispensable para la modulación de la respuesta inmune debido que en su ausencia, las DCs derivadas de ratones NFAT1^{-/-} presentan una exacerbada capacidad de inducir diferenciación de células T_{H1} y con ello una elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias como INF- γ (Barboza et al., 2014).

En el caso particular del inhibidor soluble del complemento C4BP β - utilizado en este estudio para inducir el estado tolerogénico de MoDCs, se pudo establecer que dicho estado está caracterizado por la represión de vías de señalización implicadas en la respuesta inmune como STAT3 e ILK, o la sobre-expresión de la vía de señalización de ceramidas. La asociación entre moléculas de tipo ceramida y la inmunomodulación de DCs ha sido reportada previamente por Sallusto y colaboradores en 1996. En dicho estudio se demostró que la acumulación endógena de ceramidas o la exposición exógena a N-Acetyl-D-sphingosine (ceramida-C2) inhibe la captación y presentación antigénica por parte de las DCs (Sallusto et al., 1996). Además, el papel

antiinflamatorio de la ceramida Esfingosina-1-Fosfato (S1P) también produce similares efectos a la ceramida C2, limitando la quimiotaxis de DCs hacia los nódulos linfoides e inhibiendo la activación de células T (Japtok et al., 2014).

Conjuntamente con el establecimiento de la vía de señalización de las ceramidas como una de las vías por la cual C4BP β - podría estar ejerciendo su papel inmunomodulador, los estudios de *fosfoarray* indican que los inmunoreceptores Fc γ RIIA y Siglec-9 podrían constituirse como candidatos a evaluar para la completa caracterización de la base molecular por la cual C4BP β - induce el estado tolerogénico en MoDCs. En particular, el receptor Siglec-9 ha sido previamente asociado con inmunoregulación de DCs mediante la unión de moléculas de tipo mucina a este receptor, logrando reducir los niveles de IL-12 producidos por las DCs (Ohta et al., 2010).

En consecuencia con los datos presentados, se postula, para futuros estudios experimentales y funcionales, la caracterización de la vía de señalización de los esfingolípidos y el receptor Siglec-9 como potenciales dianas de acción del inhibidor soluble del complemento, C4BP β -.

8.7. Capacidad tolerogénica de MoDCs tratadas con C4BP β - o FH *in vivo*. Modelo de xeno-GvHD

En este ensayo exploratorio se han evidenciado varias limitaciones a tener en cuenta para futuros experimentos:

- 1) Gran variabilidad (heterogeneidad) en los injertos obtenidos dependiendo del donante de PBMCs utilizado. Este factor es imprevisible, ya que se necesitan PBMCs frescas para conseguir la máxima frecuencia de injerto en los animales NSG. Además, es necesario que la inoculación de MoDCs sin tratar o tratadas con las distintas proteínas, una vez iniciados los síntomas, sea a partir de

MoDCs obtenidas del mismo donante para minimizar dicha variabilidad. Por otra parte el número de MoDCs que aislamos de cada donante individual es limitado por el volumen de sangre obtenido del banco de sangre y tejidos, lo cual limita asimismo el número de animales que podemos utilizar por condición.

- 2) La variabilidad en la extensión, estabilidad y composición del injerto en los animales NSG, probablemente debido a la heterogeneidad de los donantes, a la propia variabilidad de la técnica (fallos en la inyección intravenosa de MoDCs,...)
- 3) Modelo muy severo de aloinmunidad. Una vez iniciados los síntomas de xeno-GvHD es muy difícil revertir la enfermedad (King et al., 2009).

Incluso con las anteriores limitaciones, los resultados obtenidos parecen indicar que MoDCs tratadas con FH podrían tener un efecto terapéutico sobre el xeno-GvHD desarrollado en los animales NSG. Será interesante establecer las consecuencias de una intervención preventiva con MoDCs tratadas con C4BP β - o FH antes de que los animales NSG lleguen a manifestar los primeros síntomas de xeno-GvHD (pérdida de pelo,...)

Los experimentos realizados y los anteriormente propuestos representan una vía para establecer el efecto inmunomodulador real de la terapia celular utilizando MoDCs tolerogénicas inducidas con C4BP β - y FH en condiciones de aloinmunidad, en un modelo establecido de enfermedad del injerto contra el huésped.

9. Conclusiones

1. El inhibidor soluble de la vía alternativa del complemento, Factor H (FH), presenta una actividad inmunomoduladora sobre las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (MoDCs).
2. Dicho fenotipo se caracteriza por la atenuación en la expresión del marcador de maduración CD83 y de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40, presentes en la superficie de MoDCs, a pesar de estar expuestas a fuertes estímulos de maduración como el LPS bacteriano.
3. Además, las MoDCs tratadas con FH presentan una baja capacidad endocítica, una reducida producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12 y una síntesis incrementada de mediadores anti-inflamatorios como IL-10.
4. Los dominios CCP19-20 de FH, situados en la región de unión a superficies celulares son necesarios y suficientes para inducir un fenotipo anti-inflamatorio y tolerogénico a las MoDCs.

5. La acción inmunomoduladora de FH no está mediada por receptores de superficie CR3 y CR4, ni por unión a GAGs, ni tampoco por receptores *scavenger*.
6. Tanto C4BP β - como FH actúan en estadios tempranos en la diferenciación de monocitos a MoDCs por lo que dichas proteínas inmunomoduladoras actuarían principalmente sobre las DCs inflamatorias.
7. Un tratamiento indirecto, basado en la infusión intravenosa de MoDCs tolerogénicas tratadas con FH, podría atenuar el proceso xenogénico inmuno-inflamatorio letal (xeno-GvHD), inducido mediante inyección de células mononucleares humanas (PBMCs), a los ratones inmunodeficientes NSG.
8. Los estudios de expresión génica a nivel de genoma completo, indican la inducción de un fenotipo inmunomodulador en las MoDCs en presencia de C4BP β - o FH, aunque ambas proteínas activarían vías de señalización independientes según sus perfiles transcripcionales. Por ejemplo, MoDCs tratadas con FH y estimuladas con LPS inducen vías de señalización y factores de transcripción como GATA1, STAT4, SMAD, TCF4, IRF8, genes HOX, vía RA, vía Wnt/beta-catenin, vía mTOR, genes de polarización T_H1 y T_H2 , vía NF- κ B, vía NOTCH, vía TGF- β , inflamasoma,... Se han validado dichos resultados mediante RT-qPCR.
9. Mediante el análisis de los perfiles transcripcionales globales de MoDCs se han identificado varias rutas de señalización a través de las cuales C4BP β - y FH podrían ejercer su papel inmunomodulador, como la vía de señalización de las ceramidas.

10. Bibliografía

- Adema, G.J. (2009) Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunol Lett*, **122**, 128-130.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801.
- Alberts, A., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2014) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
- Alchi, B. and Jayne, D. (2010) Membranoproliferative glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol*, **25**, 1409-1418.
- Arlt, O., Schwiebs, A., Japtok, L., Ruger, K., Katzy, E., Kleuser, B. and Radeke, H.H. (2014) Sphingosine-1-phosphate modulates dendritic cell function: focus on non-migratory effects in vitro and in vivo. *Cell Physiol Biochem*, **34**, 27-44.
- Aslam, M. and Perkins, S.J. (2001) Folded-back solution structure of monomeric factor H of human complement by synchrotron X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained molecular modelling. *J Mol Biol*, **309**, 1117-1138.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, **18**, 767-811.

- Barboza, B.A., Fonseca, B.P. and Viola, J.P. (2014) NFAT1 transcription factor in dendritic cells is required to modulate T helper cell differentiation. *Immunobiology*, **219**, 704-712.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudie, F., Djemiel, C. and Klopp, C. (2014) jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, **15**, 293.
- Bhatia, M. and Walters, M.C. (2008) Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: past, present and future. *Bone Marrow Transplant*, **41**, 109-117.
- Bhaya, D., Davison, M. and Barrangou, R. (2011) CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet*, **45**, 273-297.
- Blom, A.M. (2002) Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. *Biochem Soc Trans*, **30**, 978-982.
- Bour-Jordan, H. and Blueston, J.A. (2002) CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *J Clin Immunol*, **22**, 1-7.
- Brodeur, S.R., Angelini, F., Bacharier, L.B., Blom, A.M., Mizoguchi, E., Fujiwara, H., Plebani, A., Notarangelo, L.D., Dahlback, B., Tsitsikov, E. and Geha, R.S. (2003) C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity*, **18**, 837-848.
- Campistol, J.M., Arias, M., Ariceta, G., Blasco, M., Espinosa, L., Espinosa, M., Grinyo, J.M., Macia, M., Mendizabal, S., Praga, M., Roman, E., Torra, R., Valdes, F., Vilalta, R. and Rodriguez de Cordoba, S. (2015) An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: diagnosis and treatment. A consensus document. *Nefrologia*, **35**, 421-447.
- Canton, J., Neculai, D. and Grinstein, S. (2013) Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*, **13**, 621-634.
- Carroll, M.C. (1998) The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*, **16**, 545-568.
- Clark, S.J., Ridge, L.A., Herbert, A.P., Hakobyan, S., Mulloy, B., Lennon, R., Wurzner, R., Morgan, B.P., Uhrin, D., Bishop, P.N. and Day, A.J. (2013) Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. *J Immunol*, **190**, 2049-2057.
- Criado Garcia, O., Sanchez-Corral, P. and Rodriguez de Cordoba, S. (1995) Isoforms of human C4b-binding protein. II. Differential modulation of the C4BPA and C4BPB genes by acute phase cytokines. *J Immunol*, **155**, 4037-4043.
- Chaplin, D.D. (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, **125**, S3-23.
- Chorny, A., Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Ganea, D. and Delgado, M. (2006) Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells that prevent acute graft-versus-host disease while maintaining the graft-versus-tumor response. *Blood*, **107**, 3787-3794.

- Chorny, A., Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Pozo, D., Ganea, D. and Delgado, M. (2005) Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 13562-13567.
- Chu, C.C., Ali, N., Karagiannis, P., Di Meglio, P., Skowera, A., Napolitano, L., Barinaga, G., Gryns, K., Sharif-Paghaleh, E., Karagiannis, S.N., Peakman, M., Lombardi, G. and Nestle, F.O. (2012) Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J Exp Med*, **209**, 935-945.
- de Cordoba, S.R. and de Jorge, E.G. (2008) Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin Exp Immunol*, **151**, 1-13.
- Delarosa, O., Dalemans, W. and Lombardo, E. (2012) Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. *Front Immunol*, **3**, 182.
- Dempsey, P.W., Vaidya, S.A. and Cheng, G. (2003) The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 2604-2621.
- den Dekker, E., Grefte, S., Huijs, T., ten Dam, G.B., Versteeg, E.M., van den Berk, L.C., Bladergroen, B.A., van Kuppevelt, T.H., Figdor, C.G. and Torensma, R. (2008) Monocyte cell surface glycosaminoglycans positively modulate IL-4-induced differentiation toward dendritic cells. *J Immunol*, **180**, 3680-3688.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C. and Bhardwaj, N. (2001) Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*, **193**, 233-238.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W. and Schmitz, J. (2000) BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*, **165**, 6037-6046.
- Eggermont, L.J., Paulis, L.E., Tel, J. and Figdor, C.G. (2014) Towards efficient cancer immunotherapy: advances in developing artificial antigen-presenting cells. *Trends Biotechnol*, **32**, 456-465.
- Ermert, D. and Blom, A.M. (2016) C4b-binding protein: The good, the bad and the deadly. Novel functions of an old friend. *Immunol Lett*, **169**, 82-92.
- Ferreira, G.B., Kleijwegt, F.S., Waelkens, E., Lage, K., Nikolic, T., Hansen, D.A., Workman, C.T., Roep, B.O., Overbergh, L. and Mathieu, C. (2012) Differential protein pathways in 1,25-dihydroxyvitamin d(3) and dexamethasone modulated tolerogenic human dendritic cells. *J Proteome Res*, **11**, 941-971.
- Ferreira, G.B., van Etten, E., Lage, K., Hansen, D.A., Moreau, Y., Workman, C.T., Waer, M., Verstuyf, A., Waelkens, E., Overbergh, L. and Mathieu, C. (2009) Proteome analysis demonstrates profound alterations in human dendritic cell nature by TX527, an analogue of vitamin D. *Proteomics*, **9**, 3752-3764.

- Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, **9**, 162-174.
- Gauzzi, M.C., Purificato, C., Donato, K., Jin, Y., Wang, L., Daniel, K.C., Maghazachi, A.A., Belardelli, F., Adorini, L. and Gessani, S. (2005) Suppressive effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol*, **174**, 270-276.
- Gi, M., Im, W. and Hong, S. (2009) Dendritic cells as danger-recognizing biosensors. *Sensors (Basel)*, **9**, 6730-6751.
- Guilliams, M., Henri, S., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M. and Malissen, B. (2010) From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *Eur J Immunol*, **40**, 2089-2094.
- Hessel, C. and Moser, M. (2012) Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol*, **42**, 2535-2543.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S. and Hacohen, N. (2001) The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science*, **294**, 870-875.
- Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S., Powrie, F. and Maloy, K.J. (2006) Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med*, **203**, 2473-2483.
- Iliev, I.D., Mileti, E., Matteoli, G., Chieppa, M. and Rescigno, M. (2009) Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol*, **2**, 340-350.
- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**, 197-216.
- Japtok, L., Baumer, W. and Kleuser, B. (2014) Sphingosine-1-phosphate as signaling molecule in the skin: Relevance in atopic dermatitis. *Allergo J Int*, **23**, 54-59.
- Jozsi, M. and Zipfel, P.F. (2008) Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol*, **29**, 380-387.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F. and Liu, Y.J. (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*, **194**, 863-869.
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, **28**, 27-30.
- Kang, Y., Tan, L., Carroll, M., Gentle, M. and Sim, R. (2009) Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways. In Kishore, U. (ed.), *Target pattern recognition in innate immunity*. Landes Biosciences, New York, USA, pp. 117-128.

- King, M.A., Covassin, L., Brehm, M.A., Racki, W., Pearson, T., Leif, J., Laning, J., Fodor, W., Foreman, O., Burzenski, L., Chase, T.H., Gott, B., Rossini, A.A., Bortell, R., Shultz, L.D. and Greiner, D.L. (2009) Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex. *Clin Exp Immunol*, **157**, 104-118.
- Kopp, A., Hebecker, M., Svobodova, E. and Jozsi, M. (2012) Factor h: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules*, **2**, 46-75.
- Kushwah, R. and Hu, J. (2010) Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity. *J Immunol*, **185**, 795-802.
- Leon, B. and Ardavin, C. (2008) Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol Cell Biol*, **86**, 320-324.
- Lester, S., McLure, C., Williamson, J., Bardy, P., Rischmueller, M. and Dawkins, R.L. (2008) Epistasis between the MHC and the RCA alpha block in primary Sjogren syndrome. *Ann Rheum Dis*, **67**, 849-854.
- Luque, A., Cárdenas-Brito, S., Olivar, R. and Aran, J.M. (2013) Assessment of human dendritic cell antigen uptake by flow cytometry. *Bio-protocol* Vol. 3, p. e974.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S. and Spiegel, S. (2012) Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol*, **22**, 50-60.
- Machado, L.R. and Ottolini, B. (2015) An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. *Front Immunol*, **6**, 115.
- Malinarich, F., Duan, K., Hamid, R.A., Bijin, A., Lin, W.X., Poidinger, M., Fairhurst, A.M. and Connolly, J.E. (2015) High mitochondrial respiration and glycolytic capacity represent a metabolic phenotype of human tolerogenic dendritic cells. *J Immunol*, **194**, 5174-5186.
- Manome, H., Aiba, S., Singh, S., Yoshino, Y. and Tagami, H. (2000) Dexamethasone and cyclosporin A affect the maturation of monocyte-derived dendritic cells differently. *Int Arch Allergy Immunol*, **122**, 76-84.
- Martinez-Barricarte, R., Heurich, M., Valdes-Canedo, F., Vazquez-Martul, E., Torreira, E., Montes, T., Tortajada, A., Pinto, S., Lopez-Trascasa, M., Morgan, B.P., Llorca, O., Harris, C.L. and Rodriguez de Cordoba, S. (2010) Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J Clin Invest*, **120**, 3702-3712.
- Matasic, R., Dietz, A.B. and Vuk-Pavlovic, S. (1999) Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J Leukoc Biol*, **66**, 909-914.
- Michelsen, K.S., Aicher, A., Mohaupt, M., Hartung, T., Dimmeler, S., Kirschning, C.J. and Schumann, R.R. (2001) The role of toll-like receptors (TLRs) in

- bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem*, **276**, 25680-25686.
- Mohlin, F.C. and Blom, A.M. (2014) Purification and functional characterization of C4b-binding protein (C4BP). *Methods Mol Biol*, **1100**, 169-176.
- Morelli, A.E. and Thomson, A.W. (2007) Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol*, **7**, 610-621.
- Moser, M. and Leo, O. (2010) Key concepts in immunology. *Vaccine*, **28 Suppl 3**, C2-13.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, **7**, 145-173.
- Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. (2008) *Janeway's immunobiology*. Garland Science, New York.
- Murphy, K., Travers, P. and Walport, M. (2011) *Janeway's immunobiology*. Garland Science, New York.
- Naranjo-Gomez, M., Raich-Regue, D., Onate, C., Grau-Lopez, L., Ramo-Tello, C., Pujol-Borrell, R., Martinez-Caceres, E. and Borrás, F.E. (2011) Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J Transl Med*, **9**, 89.
- Naughton, M.A., Botto, M., Carter, M.J., Alexander, G.J., Goldman, J.M. and Walport, M.J. (1996) Extrahepatic secreted complement C3 contributes to circulating C3 levels in humans. *J Immunol*, **156**, 3051-3056.
- Nikolic, T. and Roep, B.O. (2013) Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin d3-treated tolerogenic dendritic cells. *Front Immunol*, **4**, 113.
- Nilsson, U.R. and Mueller-Eberhard, H.J. (1965) Isolation of Beta If-Globulin from Human Serum and Its Characterization as the Fifth Component of Complement. *J Exp Med*, **122**, 277-298.
- Notta, F., Doulatov, S. and Dick, J.E. (2010) Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2Rgc-null recipients. *Blood*, **115**, 3704-3707.
- Novak, N., Valenta, R., Bohle, B., Laffer, S., Haberstok, J., Kraft, S. and Bieber, T. (2004) FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J Allergy Clin Immunol*, **113**, 949-957.
- Ohta, M., Ishida, A., Toda, M., Akita, K., Inoue, M., Yamashita, K., Watanabe, M., Murata, T., Usui, T. and Nakada, H. (2010) Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9. *Biochem Biophys Res Commun*, **402**, 663-669.
- Olivar, R., Luque, A., Cardenas-Brito, S., Naranjo-Gomez, M., Blom, A.M., Borrás, F.E., Rodríguez de Córdoba, S., Zipfel, P.F. and Aran, J.M. (2016)

- The Complement Inhibitor Factor H Generates an Anti-Inflammatory and Tolerogenic State in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Immunol*, **196**, 4274-4290.
- Olivar, R., Luque, A., Naranjo-Gomez, M., Quer, J., Garcia de Frutos, P., Borrás, F.E., Rodríguez de Córdoba, S., Blom, A.M. and Aran, J.M. (2013) The alpha7beta0 isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells. *J Immunol*, **190**, 2857-2872.
- Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M. and Colombo, M.P. (1996) Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med*, **183**, 317-322.
- Pardo-Manuel, F., Rey-Campos, J., Hillarp, A., Dahlback, B. and Rodríguez de Córdoba, S. (1990) Human genes for the alpha and beta chains of complement C4b-binding protein are closely linked in a head-to-tail arrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4529-4532.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S. (2002) Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*, **14**, 123-128.
- Penna, G. and Adorini, L. (2000) 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*, **164**, 2405-2411.
- Perrier, P., Martinez, F.O., Locati, M., Bianchi, G., Nebuloni, M., Vago, G., Bazzoni, F., Sozzani, S., Allavena, P. and Mantovani, A. (2004) Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. *J Immunol*, **172**, 7031-7042.
- Petersen, S.L. (2007) Alloreactivity as therapeutic principle in the treatment of hematologic malignancies. Studies of clinical and immunologic aspects of allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Dan Med Bull*, **54**, 112-139.
- Piemonti, L., Monti, P., Allavena, P., Sironi, M., Soldini, L., Leone, B.E., Socci, C. and Di Carlo, V. (1999) Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*, **162**, 6473-6481.
- Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B.E., Dal Cin, E., Allavena, P. and Di Carlo, V. (2000) Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, **164**, 4443-4451.
- Raich-Regue, D., Glancy, M. and Thomson, A.W. (2014) Regulatory dendritic cell therapy: from rodents to clinical application. *Immunol Lett*, **161**, 216-221.
- Raker, V.K., Domogalla, M.P. and Steinbrink, K. (2015) Tolerogenic Dendritic Cells for Regulatory T Cell Induction in Man. *Front Immunol*, **6**, 569.

- Regueiro, J., López Larrea, C., González Rodríguez, S. and Martínez Naves, E. (2012) *Inmunobiología: biología y patología del sistema inmunitario*. Editorial Medica Panamericana, Madrid.
- Rodríguez de Córdoba, S., Esparza-Gordillo, J., Goicoechea de Jorge, E., López-Trascasa, M. and Sánchez-Corral, P. (2004) The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*, **41**, 355-367.
- Roncarolo, M.G. and Battaglia, M. (2007) Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol*, **7**, 585-598.
- Rosenspire, A.J. and Chen, K. (2015) Anergic B Cells: Precarious On-Call Warriors at the Nexus of Autoimmunity and False-Flagged Pathogens. *Front Immunol*, **6**, 580.
- Sacks, S., Lee, Q., Wong, W. and Zhou, W. (2009) The role of complement in regulating the alloresponse. *Curr Opin Organ Transplant*, **14**, 10-15.
- Salinas, G.F., Braza, F., Brouard, S., Tak, P.P. and Baeten, D. (2013) The role of B lymphocytes in the progression from autoimmunity to autoimmune disease. *Clin Immunol*, **146**, 34-45.
- Sallusto, F. and 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**, 1109-1118.
- Sallusto, F., Nicolo, C., De Maria, R., Corinti, S. and Testi, R. (1996) Ceramide inhibits antigen uptake and presentation by dendritic cells. *J Exp Med*, **184**, 2411-2416.
- Sarma, J.V. and Ward, P.A. (2011) The complement system. *Cell Tissue Res*, **343**, 227-235.
- Sato, K. and Fujita, S. (2007) Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int*, **56**, 183-191.
- Schinnerling, K., Garcia-Gonzalez, P. and Aguillon, J.C. (2015) Gene Expression Profiling of Human Monocyte-derived Dendritic Cells - Searching for Molecular Regulators of Tolerogenicity. *Front Immunol*, **6**, 528.
- Seetharam, A., Tiriveedhi, V. and Mohanakumar, T. (2010) Alloimmunity and autoimmunity in chronic rejection. *Curr Opin Organ Transplant*, **15**, 531-536.
- Shastri, A., Bonifati, D.M. and Kishore, U. (2013) Innate immunity and neuroinflammation. *Mediators Inflamm*, **2013**, 342931.
- Sim, R.B. and DiScipio, R.G. (1982) Purification and structural studies on the complement-system control protein beta 1H (Factor H). *Biochem J*, **205**, 285-293.
- Spiegel, S. and Milstien, S. (2011) The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol*, **11**, 403-415.

- Spranger, S., Frankenberger, B. and Schendel, D.J. (2012) NOD/scid IL-2Rg(null) mice: a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies in vivo. *J Transl Med*, **10**, 30.
- Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J. and Enk, A.H. (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*, **159**, 4772-4780.
- Steinman, R.M., Adams, J.C. and Cohn, Z.A. (1975) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med*, **141**, 804-820.
- Steinman, R.M. and Hemmi, H. (2006) Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*, **311**, 17-58.
- Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D. and Cohn, Z.A. (1979) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*, **149**, 1-16.
- Stoop, J.N., Robinson, J.H. and Hilken, C.M. (2011) Developing tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: what can we learn from mouse models? *Ann Rheum Dis*, **70**, 1526-1533.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. and Mesirov, J.P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 15545-15550.
- Svoboda, E., Schneider, A.E., Sandor, N., Lermann, U., Staib, P., Kremlitzka, M., Bajtay, Z., Barz, D., Erdei, A. and Jozsi, M. (2015) Secreted aspartic protease 2 of *Candida albicans* inactivates factor H and the macrophage factor H-receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18). *Immunol Lett*, **168**, 13-21.
- Tang, S., Zhou, W., Sheerin, N.S., Vaughan, R.W. and Sacks, S.H. (1999) Contribution of renal secreted complement C3 to the circulating pool in humans. *J Immunol*, **162**, 4336-4341.
- Thomson, A.W., Zahorchak, A.F., Ezzelarab, M.B., Butterfield, L.H., Lakkis, F.G. and Metes, D.M. (2016) Prospective Clinical Testing of Regulatory Dendritic Cells in Organ Transplantation. *Front Immunol*, **7**, 15.
- Torres-Aguilar, H., Aguilar-Ruiz, S.R., Gonzalez-Perez, G., Munguia, R., Bajana, S., Meraz-Rios, M.A. and Sanchez-Torres, C. (2010) Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J Immunol*, **184**, 1765-1775.
- Trouw, L.A., Bengtsson, A.A., Gelderman, K.A., Dahlback, B., Sturfelt, G. and Blom, A.M. (2007) C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack. *J Biol Chem*, **282**, 28540-28548.

- Tsubamoto, Y., Yamada, N., Watanabe, Y., Inaba, T., Shiomi, M., Shimano, H., Gotoda, T., Harada, K., Shimada, M., Ohsuga, J. and et al. (1994) Dextran sulfate, a competitive inhibitor for scavenger receptor, prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*, **106**, 43-50.
- Wagner, E. and Frank, M.M. (2010) Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov*, **9**, 43-56.
- Walport, M.J. (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, **344**, 1058-1066.
- Wallis, R. (2007) Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology*, **212**, 289-299.
- Williams, K.T., Young, S.P., Negus, A., Young, L.S., Adams, D.H. and Afford, S.C. (2007) C4b binding protein binds to CD154 preventing CD40 mediated cholangiocyte apoptosis: a novel link between complement and epithelial cell survival. *PLoS One*, **2**, e159.
- Xia, C.Q., Peng, R., Beato, F. and Clare-Salzler, M.J. (2005) Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol*, **62**, 45-54.
- Yurasov, S., Wardemann, H., Hammersen, J., Tsuiji, M., Meffre, E., Pascual, V. and Nussenzweig, M.C. (2005) Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, **201**, 703-711.
- Zhou, L.J. and Tedder, T.F. (1995) Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*, **154**, 3821-3835.
- Zipfel, P.F., Lauer, N. and Skerka, C. (2010) The role of complement in AMD. *Adv Exp Med Biol*, **703**, 9-24.
- Zipfel, P.F., Skerka, C., Hellwage, J., Jokiranta, S.T., Meri, S., Brade, V., Kraiczy, P., Noris, M. and Remuzzi, G. (2002) Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans*, **30**, 971-978.

11. Anexo-Publicaciones

 **RayBiotech**
The protein array pioneer
660 Human Protein Biomarkers
200 Mouse Protein Biomarkers
67 Rat Protein Biomarkers



See What You Have Been Missing!
The Largest Multiplex Protein Detection Panels Available



The Complement Inhibitor Factor H Generates an Anti-Inflammatory and Tolerogenic State in Monocyte-Derived Dendritic Cells

This information is current as of April 14, 2016.

Rut Olivar, Ana Luque, **Sonia Cárdenas-Brito**, Mar Naranjo-Gómez, Anna M. Blom, Francesc E. Borràs, Santiago Rodriguez de Córdoba, Peter F. Zipfel and Josep M. Aran

J Immunol published online 13 April 2016
<http://www.jimmunol.org/content/early/2016/04/13/jimmunol.1500455>

-
- Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2016/04/13/jimmunol.1500455.DCSupplemental.html>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright © 2016 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



The Complement Inhibitor Factor H Generates an Anti-Inflammatory and Tolerogenic State in Monocyte-Derived Dendritic Cells

Rut Olivar,^{*1} Ana Luque,^{*1} Sonia Cárdenas-Brito,^{*1} Mar Naranjo-Gómez,^{†,‡}
Anna M. Blom,[§] Francesc E. Borràs,^{†,‡,2} Santiago Rodríguez de Córdoba,^{¶,||,2}
Peter F. Zipfel,^{#,2} and Josep M. Aran^{*}

The activation of the complement system is a key initiating step in the protective innate immune-inflammatory response against injury, although it may also cause harm if left unchecked. The structurally related soluble complement inhibitors C4b-binding protein (C4BP) and factor H (FH) exert a tight regulation of the classical/lectin and alternative pathways of complement activation, respectively, attenuating the activity of the C3/C5 convertases and, consequently, avoiding serious damage to host tissues. We recently reported that the acute-phase C4BP isoform C4BP lacking the β -chain plays a pivotal role in the modulation of the adaptive immune responses. In this study, we demonstrate that FH acts in the early stages of monocyte to dendritic cell (DC) differentiation and is able to promote a distinctive tolerogenic and anti-inflammatory profile on monocyte-derived DCs (MoDCs) challenged by a proinflammatory stimulus. Accordingly, FH-treated and LPS-matured MoDCs are characterized by altered cytoarchitecture, resembling immature MoDCs, lower expression of the maturation marker CD83 and the costimulatory molecules CD40, CD80, and CD86, decreased production of key proinflammatory Th1-cytokines (IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-8), and preferential production of immunomodulatory mediators (IL-10 and TGF- β). Moreover, FH-treated MoDCs show low Ag uptake and, when challenged with LPS, display reduced CCR7 expression and chemotactic migration, impaired CD4⁺ T cell alloproliferation, inhibition of IFN- γ secretion by the allostimulated T cells, and, conversely, induction of CD4⁺CD127^{low/negative}CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells. Thus, this novel noncanonical role of FH as an immunological brake able to directly affect the function of MoDCs in an inflammatory environment may exhibit therapeutic potential in hypersensitivity, transplantation, and autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 2016, 196: 000–000.

The complement system is an ancestral innate immunity defense mechanism present in eukaryotic organisms not only in the fight against invading infectious agents, but also removing dangerous and apoptotic cells, debris, and particles from the body. Nevertheless, complement action is tightly regulated to avoid serious damage of self-tissue. In fact, uncontrolled or excessive complement activation generates toxic effector compounds that, when not properly regulated, trigger the development of a variety of inflammatory and autoimmune diseases (1, 2).

Factor H (FH), the main soluble regulator of the alternative pathway, is synthesized mainly in the liver and secreted into the bloodstream. This pathway plays a central role generating proinflammatory complement activation products *in vivo* (3). Like other members of the regulators of complement activation family, FH share 60-aa globular domains stabilized by two internal disulfide bonds termed complement control protein modules (CCPs), short consensus repeats, or Sushi domains. FH holds 20 homologous CCP domains arranged in tandem, conforming a 150-kDa single-chain glycoprotein that operates in the

*Human Molecular Genetics Group, Bellvitge Biomedical Research Institute, L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain; [†]Innovation in Vesicles and Cells for Application Therapy Group, Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute, 08916 Badalona, Barcelona, Spain; [‡]Nephrology Service, Germans Trias i Pujol University Hospital, 08916 Badalona, Barcelona, Spain; [§]Section of Medical Protein Chemistry, Department of Laboratory Medicine, Lund University, 20502 Malmö, Sweden; [¶]Centro de Investigaciones Biológicas, 28040 Madrid, Spain; ^{||}Ciber de Enfermedades Raras, 28040 Madrid, Spain; and [#]Department of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Products Research and Infection Biology, 07745 Jena, Germany

R.O., A.L., and S.C.-B. share equal contribution.

²F.E.B., S.R.d.C., and P.F.Z. share senior authorship.

ORCID: 0000-0002-7068-2671 (M.N.-G.); 0000-0002-1348-1734 (A.M.B.); 0000-0003-4038-1912 (F.E.B.); 0000-0001-6401-1874 (S.R.d.C.); 0000-0002-6149-2411 (P.F.Z.); 0000-0003-2827-9392 (J.M.A.).

Received for publication February 25, 2015. Accepted for publication February 27, 2016.

This work was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (Madrid, Spain) through ISCIII Grants PI10/1073 and PI13/01490, and cofunded by FEDER funds/European Regional Development Fund (ERDF)-a way to build Europe, Grant 12/1210 from La Marató de TV3 Foundation, and Grant 2014SGR541 (Generalitat de

Catalunya) to J.M.A. J.M.A. is sponsored by the Researchers Consolidation Program from the Sistema Nacional de Salut-Departament de Salut Generalitat de Catalunya (CES06/012). S.R.d.C. is supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2011-26583), the Ciber de Enfermedades Raras, and the Fundación Renal Inigo Alvarez de Toledo. A.M.B. is supported by the Swedish Research Council (K2009-68X-14928-06-3) and the Swedish Cancer Foundation. F.E.B. is supported by Grant 2014SGR804 (Generalitat de Catalunya) to support emerging research groups.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Josep M. Aran, Human Molecular Genetics Group, Bellvitge Biomedical Research Institute, Hospital Duran i Reynals, Gran Via de L'Hospitalet 199, L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain. E-mail address: jaran@idibell.cat

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: aHUS, atypical hemolytic-uremic syndrome; AMD, age-related macular degeneration; C4BP, C4b-binding protein; C4BP(β), C4BP containing the β -chain; C4BP(β -), C4BP lacking the β -chain; CCP, complement control protein module; DC, dendritic cell; FH, factor H; GAG, glycosaminoglycan; MDSC, myeloid-derived suppressor cell; MoDC, monocyte-derived dendritic cell; MSC, mesenchymal stem cell; RT-qPCR, quantitative RT-PCR; SOD2, superoxide dismutase 2; Treg, regulatory T cell.

Copyright © 2016 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/16/\$30.00

fluid phase and on host cellular surfaces. Thus, the region encompassing CCP1–4 of the protein (FH1–4) prevents the formation and promotes dissociation of the C3 convertase and, together with factor I, mediates proteolytic inactivation of C3b, an important opsonin and a major component of the convertase complexes that drive the complement activation cascade (4–6). Moreover, multiple mutagenesis, binding and functional reports, along with the last structural studies (7–10) show that the C-terminal recognition region formed by CCP19–20 of FH (FH19–20) binds to surface-bound C3b and can efficiently discriminate polyanionic host surfaces versus foreign surfaces and protect the former from complement attack. In fact, mutations in the C terminus of FH and binding of deficiency of FH-related plasma proteins and autoantibody-positive form of hemolytic uremic syndrome-associated autoantibodies defined the C-terminal recognition region as a hot spot associated with atypical hemolytic-uremic syndrome (aHUS), leading to disturbances in the physiologic interaction of FH with host endothelial cells (11). Conversely, many pathogens as well as some cancer cells are capable to hijack FH function to its own benefit to avoid complement-mediated lysis (12, 13).

Apart from or as a consequence of its essential role in complement regulation, other relevant functions dependent on interaction with endogenous ligands (pentraxins, extracellular matrix proteins, and DNA) or with receptors (integrins, malondialdehyde epitopes, and anionic phospholipids) have recently been suggested for FH such as modulation of local complement-mediated inflammation (14), protection from oxidative stress (15), modulation of platelet structure and function (16), anticoagulation (17), and regulation of cellular immune-inflammatory responses by interaction with a variety of cells from the immune system (18, 19).

Besides a CCP-based modular composition, FH also shares evolutionary and functional similarities with C4b-binding protein (C4BP), the main soluble inhibitor of the classical and lectin complement pathways (20). We recently reported that a minor isoform of C4BP (C4BP α 7 β 0; C4BP lacking the β -chain [C4BP(β -)]), upregulated under proinflammatory conditions, induces a semimature and anti-inflammatory state in monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) activated by proinflammatory stimuli. The resulting tolerogenic MoDCs were characterized by low surface expression of CD83, CD80, CD86, CD40, and CCR7, inability to release proinflammatory Th1 cytokines (IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-8), and, conversely, increased anti-inflammatory cytokine expression (IL-10 and TGF- β 1). Moreover, C4BP(β -)-treated MoDCs failed to enhance allogeneic T cell proliferation and Th1 polarization and, instead, promoted regulatory T cell (Treg) generation (21).

Given the important role of FH in immune homeostasis, we speculated whether FH could also influence the differentiation/activation and response of MoDCs. In this study, we report that, analogously to C4BP(β -), FH is also able to induce an anti-inflammatory and tolerogenic state in MoDC activated by proinflammatory stimuli reminiscent to myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which seem to play an essential immunoregulatory role under different inflammatory conditions (22). Furthermore, a molecular dissection study indicated that the surface binding region of FH (FH19–20) is necessary to induce the tolerogenic phenotype in MoDCs. Given the fundamental role of DCs in immune surveillance and their capability to bridge innate and adaptive immunity, the emerging role of the soluble complement inhibitors C4BP(β -) and FH controlling inflammatory DC function may open new perspectives in pathological conditions characterized by overreactive immune responses such as autoimmunity and transplantation.

Materials and Methods

Proteins

FH purified from human plasma (Biopur, Reinach, Switzerland) was used throughout the study. The 150-kDa protein was estimated to be >97% pure by SDS-PAGE. FH deletion constructs CCP1–7 (FHL1), CCP8–20 (FH8–20), CCP15–20 (FH15–20), and CCP19–20 (FH19–20) were expressed as histidine-tagged proteins in Sf9 insect cells using the pBSV-8His vacuolavirus expression vector and purified by Ni²⁺-NTA agarose chromatography as previously described (4). The C4BP isoforms C4BP(β -) and C4BP containing the β -chain [C4BP(β +)] were also isolated from pooled human plasma, as previously described (21).

Cell culture and FH or C4BP treatment

RPMI 1640 was supplemented with 100 μ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, 2 mM L-glutamine (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) and 10% heat-inactivated FBS (Linus, Cultek, Spain) (complete medium), unless otherwise stated.

PBMCs were obtained from buffy coat preparations collected from healthy donors from the Blood and Tissue Bank (Barcelona, Spain) after Ficoll-Paque density centrifugation (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden). For surface phenotype determination, monocytes were plated at 1×10^6 cells/ml in 60-mm culture plates (Corning), in RPMI 1640 medium without serum, and allowed to adhere for 2 h at 37°C in 5% CO₂. The nonadherent cells were removed by washing in PBS. The final population contained >75% of monocytes, as demonstrated by flow cytometry of anti-CD14-stained isolates. For all functional assays, including the DC/T cell cocultures, monocytes were purified using colloidal superparamagnetic microbeads conjugated with monoclonal mouse anti-human CD14 Abs (MACS; Miltenyi Biotec, Auburn, CA; or EasySep Human CD14 Positive Selection Kit, Stemcell Technologies, Grenoble, France) and counted using Perfect Count microspheres (Cytognos SL, Salamanca, Spain). The purity of CD14⁺ cells was tested by CD14 staining and flow cytometry analysis (>90% CD14⁺ cells).

MoDCs were generated supplementing the monocyte cultures with complete RPMI 1640 medium plus GM-CSF (800 IU/ml) and IL-4 (500 IU/ml) (both from Gentaur, Kampenhout, Belgium) at days 0 and 3 of culture. At day 5, immature MoDCs (iDCs) were further stimulated for 24 or 48 h, depending on the assay, with either 5 μ g/ml LPS (*Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, Copenhagen, Denmark) or for 48 h with 2 μ g/ml recombinant human sCD40 Ligand/TRAP (ProSpec, Rehovot, Israel) to obtain mature MoDCs (mDCs).

CD3⁺ T cells were isolated from PBMCs by negative selection using EasySep Human T Cell Enrichment Kit (Stemcell Technologies). CD3⁺ T cells were >90% pure, as assessed by CD3 staining through flow cytometry.

Unless otherwise stated, either FH or C4BP(β +)/C4BP(β -) isoforms were added at 2, 5, or 10 μ g/ml, at days 0, 3, and 5 (at the last time point, combined with LPS or CD40L) (differentiation and maturation). For control and comparison purposes, in some assays, we included a parallel, analogous treatment with the immunomodulator vitamin D3 (calcitriol, Calcijex; Abbott Laboratories) at 1 nM.

Inhibition of glycosaminoglycan (GAG) sulfation in MoDCs was achieved by adding sodium chlorate (Sigma-Aldrich) at the indicated concentrations concomitantly with FH along the DC differentiation and maturation stages.

Unfractionated sodium heparin (~15 kDa; \geq 180 IU/mg) (Sigma-Aldrich) at concentrations ranging from 100 to 1000 μ g/ml was added either alone or concurrently with FH to assess its involvement on MoDC differentiation and maturation.

Blockade of CR3 and CR4 complement receptors was accomplished by 1-h preincubation of monocytes with 10 μ g/ml either mouse anti-human CD11b (clone ICRF44) or mouse anti-human CD11c (clone 3.9) mAbs (both from Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) in RPMI 1640 medium without serum, followed by 24-h coinubation with FH at 5 μ g/ml in the above-described complete MoDC differentiation medium. A mouse IgG₁ κ (clone 15H6) was used as isotype control mAb.

Double staining using the fluorescent dyes Annexin V (Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I; BD Pharmingen, San Diego, CA) or 7-aminocoumarin D (BD Pharmingen) and flow cytometry analysis were employed to assess the viability/apoptosis status of MoDCs.

Abs and flow cytometry

Cell-surface phenotypes were analyzed using the following mAbs: FITC-conjugated (anti-HLA-DR [Immu-357], anti-CD83 [HB15a], anti-CD14 [RMO52]), PE-conjugated (anti-CD40 [MAB89], anti-CD1a [BL6], anti-CD80 [MAB104], anti-CD86 [HA5.2B7]) (all from Beckman-Coulter),

Alexa Fluor 488–conjugated anti-CCR7 (TG8/CCR7) (BioLegend, San Diego, CA), and PerCP-conjugated anti-CD3 (BD Pharmingen). The respective isotype controls were: FITC-conjugated (anti-IgG1 [4E02], anti-IgG2b [H2], anti-IgG2a [7T4-1F5]), PE-conjugated (anti-IgG1 [4E02] and anti-IgG2b [H2]), Alexa Fluor 488–conjugated anti-IgG2ak (MOPC-173), and PerCP-conjugated anti-IgG1k were from the same commercial sources. After washing with PBS, cells were subsequently stained with 3 μ l mAb/1 \times 10⁵ cells in 100 μ l FACS buffer (PBS containing 1% BSA and 0.1% sodium azide) for 20 min at room temperature. To exclude dead cells and debris, MoDCs were gated according to forward scatter and side scatter parameters. Stained cells were analyzed using a FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) equipped with CellQuestPro software (BD Biosciences).

Alternatively, all functional assays were evaluated using an FACScanto II flow cytometer equipped with FACSDiva software (BD Biosciences). Subsequent analyses used FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

Quantitative RT-PCR

MoDCs (1 \times 10⁶/condition) were harvested at day 7, and the mRNA was extracted using the RNeasy RNA Isolation kit (Qiagen) and incubated with RNase-free DNase I (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's protocol. A two-step real-time RT-PCR technique was used to determine the relative mRNA levels of human *CCR7*, precursor of miR-155 (*BIC-1*), *IDO* (*IDO*), and mitochondrial superoxide dismutase 2 (*SOD-2*). Reverse-transcription reactions were performed with 500 ng total RNA using the Omniscript RT kit (Qiagen). Quantification of mRNA levels was performed by real-time PCR with the use of the LightCycler technology (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). The following primers were used: *CCR7*-forward (5'-TGGGCATCTGGACTACTAGC-3'), *CCR7*-reverse (5'-AAGAAAGGGTTGACGCAGC-3'); *IDO*-forward (5'-GGTCATGGAGATGTCCGTAA-3'), *IDO*-reverse (5'-ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA-3'); *BIC-1*-forward (5'-AACCTACAGAGACCTTACC-3'), *BIC-1*-reverse (5'-ATGCTTCTTTGTCATCCTCC-3'); *SOD2*-forward (5'-GACAAACCTCAGCCCTAAC-3'), *SOD2*-reverse (5'-ACACATCAATCCCCAGCAGT-3'), yielding products of 435, 227, 296, and 248 bp, respectively. These gene-specific primer pairs were designed using Oligo 4.0 and Primer 3 software (MBI, Cascade, CO) and selected to prevent primer-dimer formation.

All samples were normalized with the use of the following primer set for the constitutively expressed human cyclophilin A gene (*CypA*; *PPIA*): *CypA*-forward (5'-CTCCTTTGAGCTGTTTGCAG-3') and *CypA*-reverse (5'-CACCACATGCTTCCATCC-3'). All primers were purchased from Biosai Technologies (Copenhagen, Denmark).

PCR amplifications were performed in a 20- μ l volume containing 2 μ l ready-to-use reaction mix, 10 \times DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals); MgCl₂ (3 mM for *CCR7*, 4 mM for *BIC-1* and *SOD-2*, and 5 mM for *IDO*); 0.15 μ M each primer; 5% DMSO; and 75 ng cDNA as template. The amplification program used an initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles: 95°C for 1 s; 58°C (*CCR7* and *SOD-2*)/60°C (*BIC-1* and *IDO*) for 5 s; and 72°C for 10 s.

The relative levels of *TGF- β 1* were assessed using TaqMan technology. Briefly, total RNA was converted to single-stranded cDNA using the high-capacity cDNA archive kit according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Each TaqMan gene expression assay contained a forward and reverse primer both for *TGF- β 1* (Hs00998133_M1) and *PPIA* (Hs99999904_M19) (Applied Biosystems) chosen for normalization. The real-time RT-PCR amplifications were run on an ABI Prism 7900HT sequence Detection System (Applied Biosystems). Thermal cycling conditions were as follows: 2 min at 50°C; 10 min at 95°C; 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s; and annealing and extension at 60°C for 1 min.

The reproducibility of the assays was verified, and the expression of the five genes was shown to be within the linear range at the chosen cell concentration.

Scanning electron microscopy

Monocytes were seeded on glass slides covered with either poly-L-lysine (25 μ g/ml) or fibronectin (42 μ g/ml), differentiated for 5 d in complete RPMI 1640 medium supplemented with 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4, in the presence or absence of FH, and further stimulated with LPS for 48 h in the same medium as previously described. The resulting MoDCs were fixed in 1% paraformaldehyde and 1.25% glutaraldehyde in cacodylate buffer for 2 h. Finally, the cells were postfixed in 1% osmium tetroxide and dehydrated with graded series of ethanol followed by acetone. After dehydration, the cells were dried in a critical-point dryer and coated with gold before observation by scanning electron microscopy (Zeiss DSM940A; Carl Zeiss). To quantify the percentage of MoDCs (iDC-like

[few short dendrites, round shape] or mDC-like [numerous long dendrites, elongated shape]) under a given condition, 100 cell profiles were recorded by a blinded scorer using random scans at a fixed magnification (\times 1750).

Endocytic activity

Endocytosis of iDCs and mDCs was assessed using DQ-OVA (1 mg/ml, DQ-OVA; Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) and Lucifer Yellow CH (10 mg/ml; Sigma-Aldrich) as previously described (21). Briefly, 2 \times 10⁵ cells/ml were resuspended in 100 μ l PBS and incubated either with 4 μ l BODIPY FL-conjugated DQ-OVA at 37°C or at 0°C for 15 min (receptor-dependent endocytosis) or with 6 μ l Lucifer Yellow CH at 37°C or at 0°C for 2 h (fluid-phase endocytosis). The incubations were stopped by adding 1 ml cold FACS buffer. The cells were washed two times with cold FACS buffer and their fluorescence analyzed using flow cytometry.

MoDC cytokine secretion

Concentrations of IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6, and IL-8 were determined in supernatants from MoDCs, either untreated or treated with FH, using the Th1/Th2 Flow cytotoxic Multiplex kit (Bender-MedSystems, Vienna, Austria) according to the manufacturer's instructions. Alternatively, the presence of IL-12 in several functional assays, or the IL-10/IL-12 ratio from untreated, FH-, FHL1-, and FH19–20-treated MoDCs were assessed through IL-10- and/or IL-12p70-specific ELISAs (Diac-lone, Besancon Cedex, France).

Chemotaxis assays

MoDCs differentiated and matured (LPS for 48 h) in the presence or in the absence of FH were tested for migration toward the CCL21 chemokine using transwell assays. Briefly, the lower chambers of transwell plates (polycarbonate filters of 8.0- μ m pore size; Costar, Corning, NY) were filled with 400 μ l complete RPMI 1640 medium with or without CCL21 (200 ng/ml). A total of 1 \times 10⁵ DCs in 100 μ l complete RPMI 1640 medium were added into the upper chamber, and cells were incubated at 37°C for 2 h. We verified the absence of filter-associated MoDCs by removing nonmigratory cells from the upper chamber and upper side of the membrane and examining the underside by crystal violet staining. Cells migrated into the lower chambers were harvested and counted with a flow cytometer, acquiring events for a fixed time period of 2 min. The migration assays for all stimulation conditions were performed in triplicate wells. Values are given as percentage of migrated cells relative to the untreated mDCs (100%).

MLR

Allogeneic CD3⁺ T cells (1 \times 10⁵/well) were stimulated in vitro with FH-treated, or vitamin D3-treated, and LPS-activated MoDCs in a 96-well round-bottom plate at various DC/T cell ratios (1:40, 1:80, and 1:160) and cultured in X-VIVO 15 medium (Biowhitaker, Walkersville, MD) supplemented with 2% human AB serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin, and 2 mmol L-glutamine. Alloproliferation was measured after 5 d of incubation. At day 4, the cells were pulsed with [³H]thymidine (1 μ Ci/well; Amersham, Freiburg, Germany), followed by incubation for another 16 h. Labeled cells were then harvested onto glass-fiber filters (Harvester 96; TomTec), and the T cell proliferation rate was determined by the amount of [³H]thymidine incorporation using a scintillation counter (1450 MicroBeta Trilux plate reader; Wallac, Turku, Finland). Results are reported as the mean cpm \pm SD of thymidine incorporation in quadruplicate culture wells.

Intracellular cytokine staining

T cells were labeled with the intracellular fluorescent dye CFSE (Molecular Probes), plated in 96-well round-bottom plates (1 \times 10⁵ cells/well) and stimulated for 5 d with allogeneic MoDCs (1:40 DC/T cell ratio). Cell proliferation was determined by the sequential loss of CFSE fluorescence of cells, as detected by flow cytometry. Then, the cells were stimulated with 50 ng/ml PMA plus 500 ng/ml ionomycin for 5 h in the presence of 10 μ g/ml brefeldin A (all from Sigma-Aldrich). After stimulation, cells were washed with PBS, fixed, permeabilized using an IntraStain kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), and incubated for 30 min at room temperature with anti-human IFN- γ allophycocyanin-conjugated mAb (Miltenyi Biotec). Cells were washed and analyzed by flow cytometry.

Determination of CD4⁺CD127^{low/negative}CD25^{high} and Foxp3⁺ T cells

Negatively selected CD3⁺ T lymphocytes were plated (1 \times 10⁵ cells/well) in 96-well round-bottom plates and cocultured at a 1:40 DC/T cell ratio. After 6 d of coculture without restimulation and any supplemental

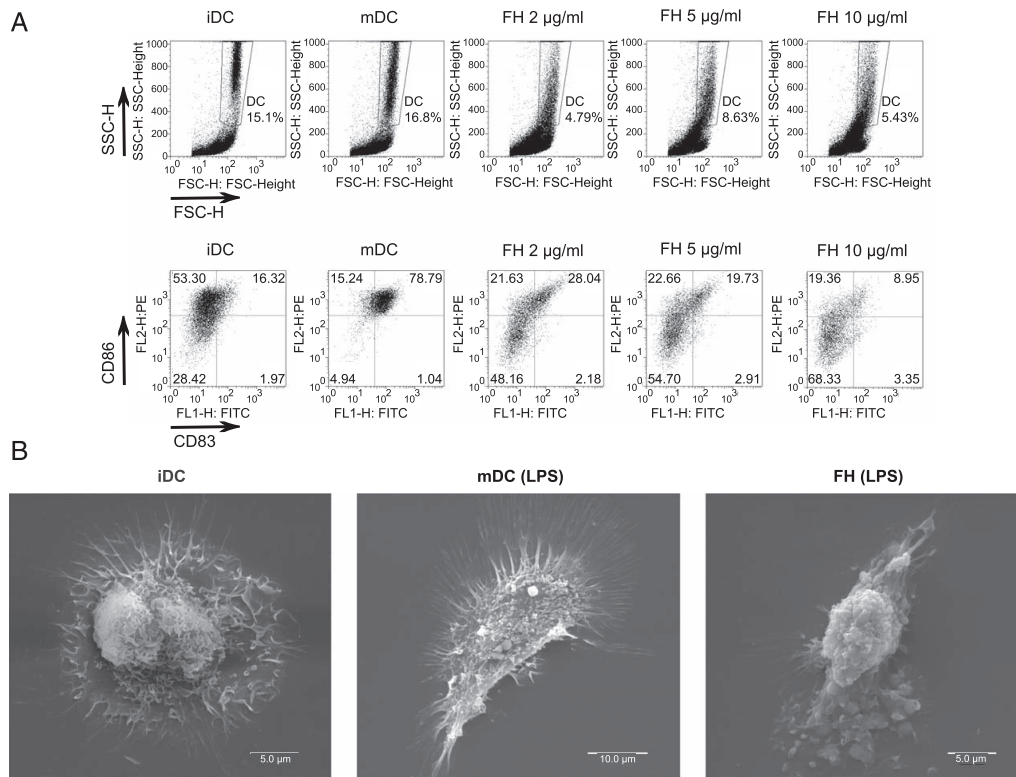


FIGURE 1. Complement FH downregulates CD83 and CD86 surface markers and preserves an iDC-like surface morphology on human MoDCs stimulated by LPS. **(A)** FH inhibits upregulation of key surface markers from human MoDCs. Human MoDCs were incubated throughout their differentiation and maturation process with the indicated concentrations (in micrograms per milliliter) of FH. MoDC maturation was achieved by LPS treatment, cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for size and density (forward scatter height [FSC-H] versus side scatter height [SSC-H]) and for simultaneous CD83 and CD86 cell-surface staining. Dot-plot images are representative of 10 independent experiments. **(B)** The surface morphology of MoDCs treated with FH at 5 µg/ml and matured with LPS was examined by scanning electron microscopy. Note the absence of long dendritic projections in FH-treated MoDCs, closely resembling to the iDC phenotype. FH, FH-treated, LPS-matured MoDCs; iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs.

cytokines, we used flow cytometry to determine the percentage of Tregs defined as CD4⁺, CD127^{low/negative}, CD25^{high}, and intracellular Foxp3⁺ (Human Regulatory T Cell Staining Kit; eBioscience, San Diego, CA).

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, three technical replicates were performed from each independent experiment. Results are presented as means \pm SD. DC variables under different experimental conditions respect to a reference condition (usually mDCs or iDCs) were compared using the ANOVA and Bonferroni correction for multiple comparisons, considering $p < 0.05$ as significant.

Results

FH modifies the morphology and downregulates the phenotypic maturation of MoDCs

We first evaluated the impact of FH in the differentiation of MoDCs by assessing the expression of different monocyte and DC surface markers, including CD14, HLA-DR, CD40, CD80, CD83, CD86, and CD1a. When added concomitantly with the DC differentiation factors GM-CSF and IL-4, FH did not significantly modify the expression of the above surface markers at the stage of iDCs (day 5 after incubation) (data not shown). Nevertheless, upon LPS stimulation, FH-treated MoDCs significantly prevented the up-regulation of the costimulatory molecules CD40, CD80, and CD86

and of the maturation marker CD83 in a dose-dependent manner compared with untreated mDCs (Figs. 1A, 2). Conversely, expression of HLA-DR, CD14, and CD1a was not significantly altered by FH treatment (Fig. 2). A side-by-side comparison of the effect of FH and the C4BP(β^-) isoform over MoDCs revealed an analogous outcome of both soluble complement inhibitors in terms of surface marker expression (Supplemental Fig. 1). This distinctive cell-surface marker pattern induced by FH was essentially maintained when the MoDCs were alternatively matured using CD40L as proinflammatory stimulus (Supplemental Fig. 2).

In addition, although there were no significant scatter modifications between iDCs and mDCs, as previously reported (23, 24), FH-conditioned MoDCs produced a shift toward decreased scatter compared with mDCs (Fig. 1A), indicating that FH had a direct effect on MoDC morphology. A more comprehensive analysis of the MoDC shape by scanning electron microscopy revealed that, before LPS exposure, 95% of the untreated iDCs were essentially round with few short projections, whereas after 48 h of LPS-mediated maturation the dendritic morphology became evident in 80% of the analyzed cells, with numerous long cytoplasmic projections. Conversely, MoDC treatment with FH fully prevented the porcupine-like DC morphology resulting upon LPS induction (72% of the analyzed cells had iDC appearance) (Fig. 1B).

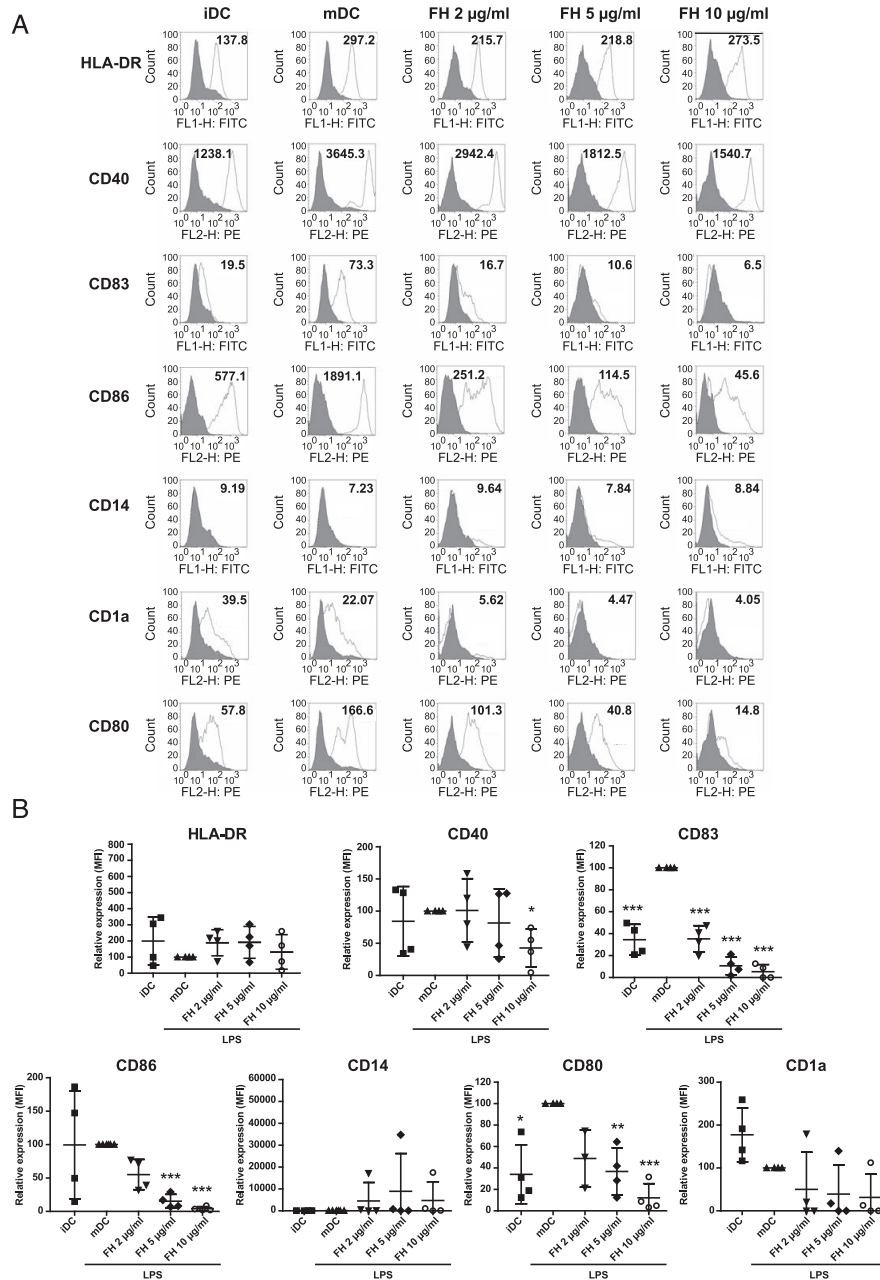
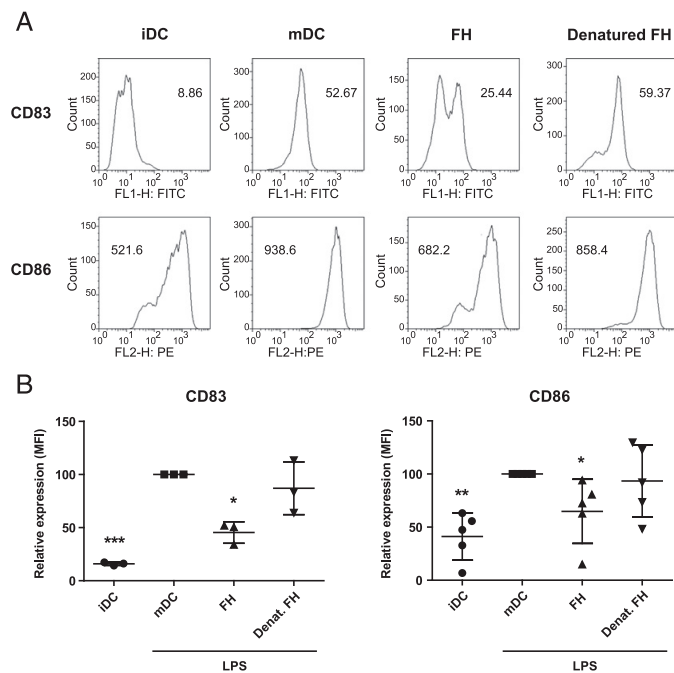


FIGURE 2. FH modulates the overall activation phenotype of human MoDCs. Human MoDCs were incubated throughout their differentiation and maturation process with the indicated concentrations (in µg/ml) of FH. MoDC maturation was achieved by LPS treatment. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell-surface expression of HLA-DR, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, and CD1a. **(A)** Each histogram is representative of three to eight independent experiments. Isotype controls are shown in gray. The mean fluorescence intensities (MFIs) for the different cell-surface markers are indicated. **(B)** Relative MFI for the different cell-surface markers. The results shown are the mean ± SD from three to five independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared with mDC. FH, FH-treated, LPS-matured MoDCs; iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs.

The yield of the FH-treated and LPS-matured MoDCs obtained (>85%) was slightly although significantly reduced compared with mDCs. Nevertheless, these cells remained viable throughout

the differentiation/maturation process, as assessed by Annexin V/7-aminoactinomycin D staining, with <17% of apoptotic cells evidenced at 48 h after LPS-mediated MoDC maturation. Con-

FIGURE 3. Heat-denatured FH does not hamper the maturation of LPS-stimulated human MoDCs. Human MoDCs were incubated throughout their differentiation and maturation process with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of native (FH) or heat-denatured FH (denatured FH) after heating the purified protein at 98°C for 30 min. MoDC maturation was achieved by LPS treatment. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for CD83 and CD86 cell-surface staining. The mean fluorescence intensity (MFI) for the indicated cell-surface marker is shown in each representative histogram (A). (B) Relative MFIs for the different cell-surface markers. The results shown are the mean \pm SD from three to five independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with mDC. Denat. FH, heat-denatured FH-treated, LPS-matured MoDCs; FH, FH-treated, LPS-matured MoDCs; iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs.



versely, an analogous treatment with the reference immunomodulator vitamin D3 significantly reduced MoDC viability and yield (Supplemental Fig. 3).

C4BP and FH hold unusually stable activities regarding complement inhibition (25). Additionally, FH needed to be exposed to harsh denaturing conditions (98°C; 30 min.) to hamper its capacity to confer a semimature phenotype on MoDCs (Fig. 3).

Together, these data are evidence that FH, analogously to the C4BP(β -) isoform, has the potential to modify proinflammatory MoDC differentiation and/or maturation as judged by changes in both their morphology and the expression pattern of various DC surface markers.

FH affects the expression profile of LPS-induced MoDCs

We next assessed the effect of FH on relevant transcripts shaping the molecular signature of LPS-matured MoDCs. Thus, we analyzed by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) the expression of the genes coding for the immunomodulatory factor TGF- β 1, involved in Treg generation, the immunoregulatory enzyme IDO, involved in tryptophan metabolism, the mitochondrial antioxidant enzyme SOD-2, and miR-155 (BIC-1), an important miRNA involved in immune function and part of a negative-feedback loop downmodulating inflammatory cytokine production in response to LPS stimulation. As reported (26), expression of *IDO*, *SOD-2*, and *BIC-1* were upregulated, whereas *TGF- β 1* was downregulated, upon LPS-mediated MoDC maturation. In contrast, FH-conditioned MoDCs suppressed the subsequent induction of *IDO* and *BIC-1* by LPS, while maintaining *TGF- β 1* expression, which is normally reduced by LPS (Fig. 4). Thus, all four molecular biomarkers analyzed reached transcript levels comparable to those from iDCs.

FH downregulates the endocytic activity of MoDCs

The Ag internalization capacity of MoDCs was assessed at 37°C by flow cytometry of both self-quenching DQ-OVA (mannose

receptor-mediated endocytosis marker) and Lucifer Yellow CH (macropinocytosis marker). The high endocytic activity of iDCs was significantly reduced by treatment with FH (Fig. 5A). Uptake of both DQ-OVA and Lucifer Yellow CH was further inhibited by incubation at 0°C (gray histograms), confirming that the fluorescence shifts from both dyes under different conditions were due to active internalization rather than nonspecific binding. Likewise, FH-treated MoDCs behaved analogously to untreated mDCs after LPS-induction, showing a reduced endocytic capacity for soluble proteins (Fig. 5B). These data indicate that FH alter the endocytic capacity of MoDCs.

FH inhibits the release of inflammatory cytokines by LPS-induced MoDCs

We next assessed whether the effect of FH on the MoDC phenotype was accompanied by changes in the release of cytokines (IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6, TNF- α , and IFN- γ). Compared to untreated iDCs, secretion of each of the proinflammatory cytokines was upregulated when iDCs were matured with LPS. In contrast, pretreatment with FH prevented the release of IL-12p70 and significantly decreased the secretion of TNF- α , IFN- γ , IL-8, and IL-6 and, conversely, increased the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Fig. 6). Thus, Th1 proinflammatory cytokine production upon LPS-mediated MoDC stimulation was significantly diminished in FH-treated MoDCs.

FH alters the chemotaxis of MoDCs

The expression of the chemokine receptor CCR7 in DCs is inhibited by TGF- β 1 (27). Accordingly, FH treatment significantly suppressed the induction of CCR7 at both the transcriptional and the translational level upon LPS-mediated activation of MoDCs (Fig. 7A, 7B). Reduced surface CCR7 expression, in turn, significantly decreased the migration of LPS-activated MoDCs to

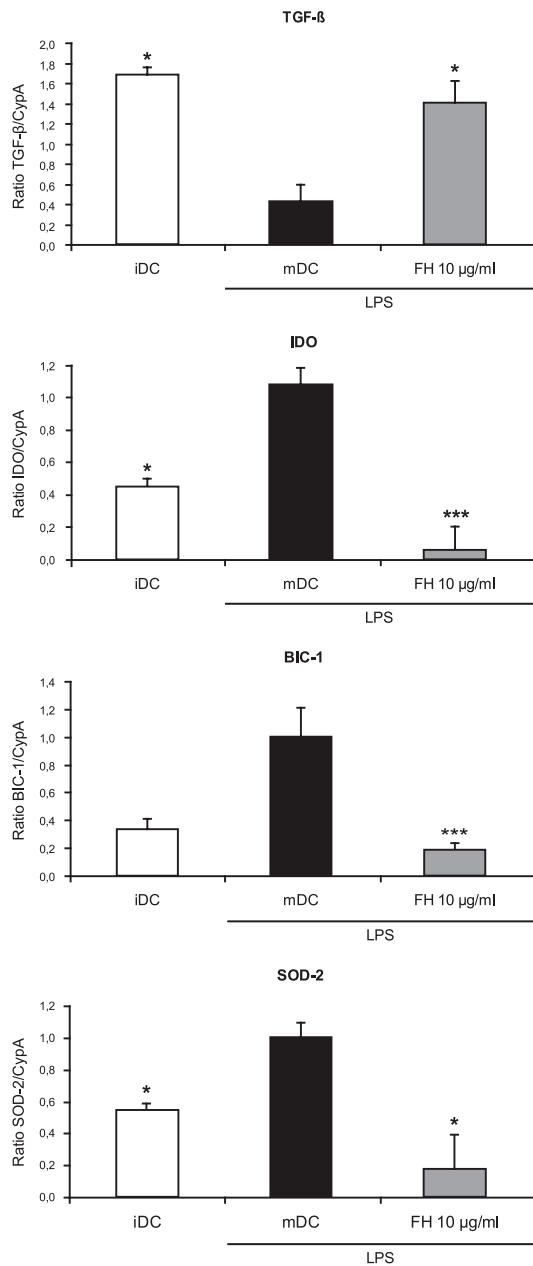


FIGURE 4. Human MoDCs exposed to FH upregulate *TGF-β1* and downregulate *IDO*, *BIC-1*, and *SOD-2* upon LPS induction. Gene expression profile of FH-treated (10 µg/ml) and LPS-matured MoDCs. Relative quantification of *TGF-β1*, *IDO*, *BIC-1*, and *SOD-2* gene expression by RT-qPCR. Normalization was performed using the housekeeping cyclophilin A gene (*CypA*; *PPIA*). Results shown are the mean ± SD from three (*TGF-β1*, *BIC-1*, and *SOD-2*) or four (*IDO*) independent experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

ward the chemokine CCL21 (Fig. 7C). In contrast, LPS-mediated activation of untreated MoDCs (mDCs) induced maximal migration in response to CCL21.

MoDCs exposed to FH fail to stimulate allogeneic T cell proliferation

Given that FH was found to impact on phenotypic maturation and the amount of inflammatory cytokines released by MoDCs, we next examined the T cell immunostimulatory capacity of MoDCs exposed to FH at different MoDC/T cell ratios. When untreated MoDCs were matured with LPS, maximal allogeneic T cell proliferation was observed. In contrast, mature MoDCs preincubated with FH failed to enhance CD3⁺ T cell proliferation, approaching the levels observed using iDCs (Fig. 8).

MoDCs exposed to FH elude differentiation toward a Th1-polarizing phenotype and, conversely, promote adaptive Treg generation from allogeneic T cells

To assess the functional outcome of T cells allostimulated with FH-treated MoDCs, the resulting T lymphocytes were restimulated with PMA plus ionomycin and IFN-γ production was measured by intracellular staining. A significant reduction in IFN-γ production (~50%) was evident from T cells exposed to FH-treated and LPS-matured MoDCs relative to T cells exposed to mDCs, approaching the IFN-γ levels achieved by T cells allostimulated with iDCs (Fig. 9A, top panel, Fig. 9B). When only the CSFE^{low} (proliferating) T cell population was analyzed, FH-conditioned MoDC-allostimulated T cells showed again a significant decrease in IFN-γ production relative to untreated MoDC-allostimulated T cells (Fig. 9A, bottom panel, Fig. 9C).

Finally, we further investigated the presence of adaptive Tregs, defined as CD4⁺CD127^{low/negative}CD25^{high}Foxp3⁺, under the above MoDC/T cell coculture conditions. Blast T cells exposed to FH-treated MoDCs showed a significant increase in the percentage of CD4⁺CD127^{low/negative}CD25^{high}Foxp3⁺ cells, analogously to that achieved by blast T cells allostimulated with iDCs (Fig. 10). Taken together, the above results support the FH-mediated induction of a tolerogenic, anti-inflammatory phenotype in MoDCs.

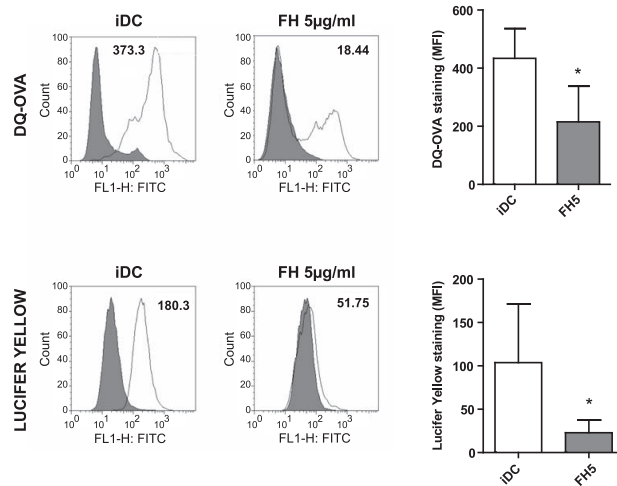
The C-terminal binding region (CCP19–20) of FH determines its tolerogenic activity over MoDCs

Given the modular composition of FH, including 20 CCP domains arranged linearly, and the functional involvement of the CCP domains in the inhibition of the alternative complement pathway, with CCP1–4 encompassing the complement regulatory region and CCP18–20 engaging the central surface binding region, we aimed to dissect the major region(s) responsible for the immunomodulatory or tolerogenic activity of FH over MoDCs. Thus, recombinant FHL1 (including CCP1–7) and truncated variants FH8–20 (comprising CCP8–20), FH15–20 (comprising CCP15–20), and FH19–20 (comprising CCP19–20) (Fig. 11A) were tested for their ability to modify the activation phenotype of LPS-induced MoDCs. Consequently, FHL1 conditioning of MoDCs did affect neither upregulation of the CD83 maturation marker nor skewing of cytokine secretion toward a proinflammatory profile (low IL-10/IL-12 ratio) induced by LPS (Fig. 11B–D). Hence, FHL1 lacked the immunomodulatory activity characteristic of full-length FH. In contrast, all progressive FH deletion variants—FH8–20, FH15–20, and FH19–20—significantly blocked the upregulation of the CD83 maturation marker (Fig. 11B, 11C) and increased the IL-10/IL-12 ratio toward an anti-inflammatory phenotype upon LPS induction (Fig. 11D). Thus, the surface-binding region of FH (domains CCP19–20) appears necessary for the immunomodulatory activity of FH in MoDCs.

FH acts in the early stages of monocyte differentiation toward MoDCs

To delineate which stage of the differentiation and/or maturation process of MoDC was affected by the tolerogenic ac-

A DIFFERENTIATION



B MATURATION

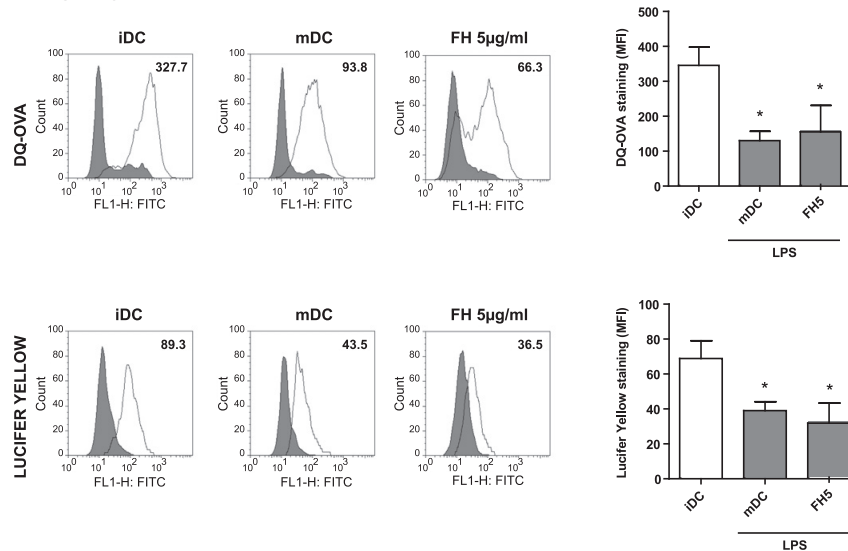


FIGURE 5. FH treatment affects the endocytic capacity of human MoDCs. The endocytic activity of MoDCs was assessed by flow cytometry, measuring both the fluorescent DQ-OVA internalization and processing (receptor-mediated endocytosis) and Lucifer Yellow CH uptake (fluid-phase endocytosis) at the differentiation and maturation stages. **(A)** Monocytes were differentiated either with (FH 5 $\mu\text{g/ml}$) or without (iDC) FH treatment. **(B)** MoDCs were differentiated and LPS-matured either with (FH 5 $\mu\text{g/ml}$) or without (mDC) FH treatment. Representative histograms for each condition are shown. Dye uptake controls are displayed in gray. The mean fluorescence intensities (MFIs) for the different fluorescent cell populations is indicated in each histogram. In both cases, data shown are the mean MFI \pm SD from six (DQ-OVA) or three (Lucifer Yellow) independent experiments. * $p < 0.05$ compared with iDC.

tivity of FH, we performed several time-course experiments. We first added FH consecutively to each of the 5-d differentiation process from monocytes to iDCs mediated by IL-4/GM-CSF, followed by LPS-mediated MoDC maturation, and assessed their phenotypic outcome (Fig. 12A). Both CD83/CD86 surface expression and IL-12 production were found significantly reduced after LPS-mediated MoDC maturation only when FH was added in the early monocyte to iDC differentiation process. FH added from day 2 of differentiation onwards did not affect the normal differentiation and maturation phenotype of

MoDCs. An analogous inverse experiment in which we consecutively removed FH from initially exposed monocytes to each of the 5-d monocyte to iDC differentiation process, followed by LPS-mediated MoDC maturation (Fig. 12A, *bottom panels*), confirmed that 24-h FH exposure at the initial stage of monocyte to iDC differentiation was necessary and sufficient to confer an anti-inflammatory and tolerogenic phenotype to MoDCs.

An equivalent experiment was additionally performed to evaluate the outcome of FH exposure only at the level of mDCs. Analysis of

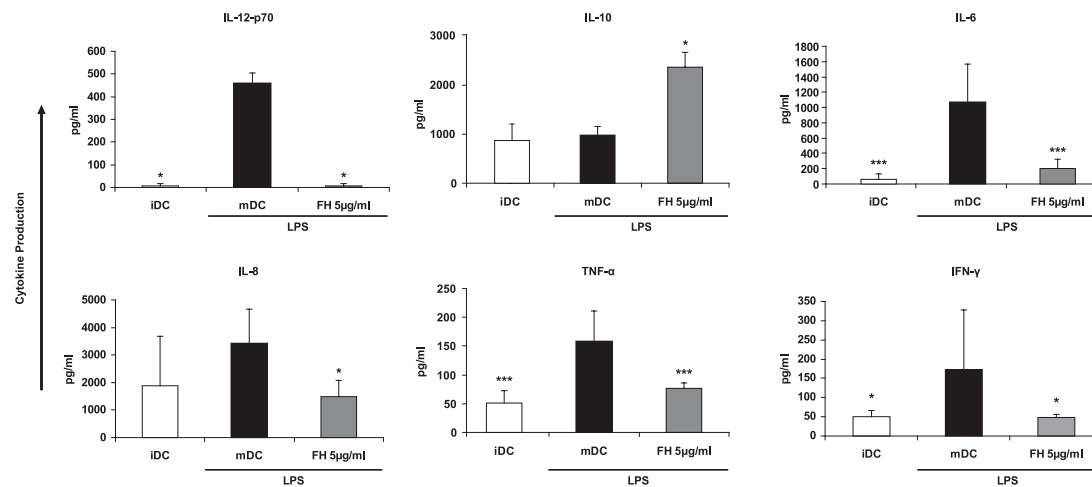


FIGURE 6. FH inhibits the release of inflammatory cytokines by LPS-matured human MoDCs. MoDCs untreated or treated with FH at 5 µg/ml were matured with LPS and the concentrations of IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-8, TNF-α, and IFN-γ were analyzed in the respective supernatants. Results shown are the mean ± SD from three independent experiments, performed in duplicate. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared with mDC. FH, FH-treated, LPS-matured MoDCs; iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs.

CD83/CD86 surface marker expression and IL-12 production evidenced the lack of FH anti-inflammatory and tolerogenic activity when acting over LPS-matured MoDCs (Fig. 12B).

FH immunomodulatory activity is mediated neither by CR3 or CR4 complement receptors nor by surface GAG interaction

To gain further insight about the molecular mechanism mediating the tolerogenic activity of FH over MoDCs, we focused on the potential role of the highly abundant GAGs and of complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) present on the monocyte/MoDC surface. It has been recently shown that both CR3 and CR4 function as FH receptors on monocyte-derived macrophages (28). Thus, we exposed monocytes to blocking mAbs against integrins CD11b and CD11c, followed by 24-h coincubation with FH at the monocyte to iDC early differentiation stage. Blockade neither of CD11b nor of CD11c was able to abolish the activity of FH on LPS-matured MoDCs in terms of surface CD83/CD86 expression and IL-12 production, suggesting that the corresponding complement receptors do not affect the FH-induced tolerogenic phenotype in MoDCs (Supplemental Fig. 4A).

Tissue-specific host recognition by FH is mediated by differential activities of its two polyanionic GAG-binding regions (29). Thus, we first evaluated whether soluble high m.w. heparin (a highly sulfated form of the polyanion heparan sulfate) might be able to alter the FH-mediated tolerogenic phenotype in MoDCs. Heparin alone had no apparent effect in MoDC differentiation and/or maturation, whereas coincubation of FH and increased heparin concentrations failed to reverse the tolerogenic activity of the former regarding CD83/CD86 surface expression and IL-12 secretion (Supplemental Fig. 4B). An analogous result was obtained using bemiparin, a low m.w. form of heparin (data not shown). Moreover, exposure of the monocyte/MoDC culture to nontoxic concentrations of sodium chlorate, which competitively inhibits the formation of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate, preventing GAG sulfation, was unable to affect the FH-induced MoDC phenotype regarding surface CD83/CD86 expression and IL-12 production (Supplemental Fig. 4C). In contrast, inhibition of this high-energy sulfate donor by sodium chlorate

efficiently suppressed the expression of the IL-4-induced DC marker CD1a (30) (Supplemental Fig. 4C, *bottom left panel*). Furthermore, surface GAG digestion with heparinase III and chondroitinase ABC was again incapable to reverse the FH-induced tolerogenic phenotype in MoDCs (data not shown). Taken together, the above data indicate that cell-surface GAG do not mediate the immunomodulatory actions of FH over MoDCs.

Discussion

The complement system constitutes a key arm of the innate immune response in the fight against pathogen infection. To maintain immune homeostasis, the main fluid-phase complement inhibitors C4BP and FH share complementary activities in the regulation of excessive complement activation and offer protection against its deleterious consequences into the host by modulating inflammation and the development of adaptive immune responses and by disposal of cellular debris and apoptotic cells (31). Interestingly, we have recently shown that the α7β0 isoform of C4BP [C4BP(β-)] was able to directly modulate the biological behavior of MoDCs toward a semimature, anti-inflammatory, and tolerogenic phenotype (21). Although FH has been suggested to be involved in adhesion, phagocytosis, and modulation of cell activation through binding to specific receptors in host cells (18), it remained unknown whether FH could also directly affect the function of MoDCs.

In this study, we demonstrate for the first time, to our knowledge, that FH, the major fluid-phase regulator of the central protein C3b in the alternative pathway of complement activation, is also able to induce an anti-inflammatory and tolerogenic phenotype in MoDCs activated by proinflammatory stimuli, a model of inflammatory DCs able to initiate Th1 cell differentiation (32–34). Thus, analogously to that previously reported for C4BP(β-), FH skewed the LPS-induced maturation of MoDCs and induced new morphological and functional features reminiscent of the monocytic subtype of MDSCs (22), resulting in a reduced capacity to activate T cells. In fact, although nontoxic, FH conditioning of MoDCs prevented upregulation of costimulatory molecules, such as members of the B7 family (CD80 and CD86) and CD40, and

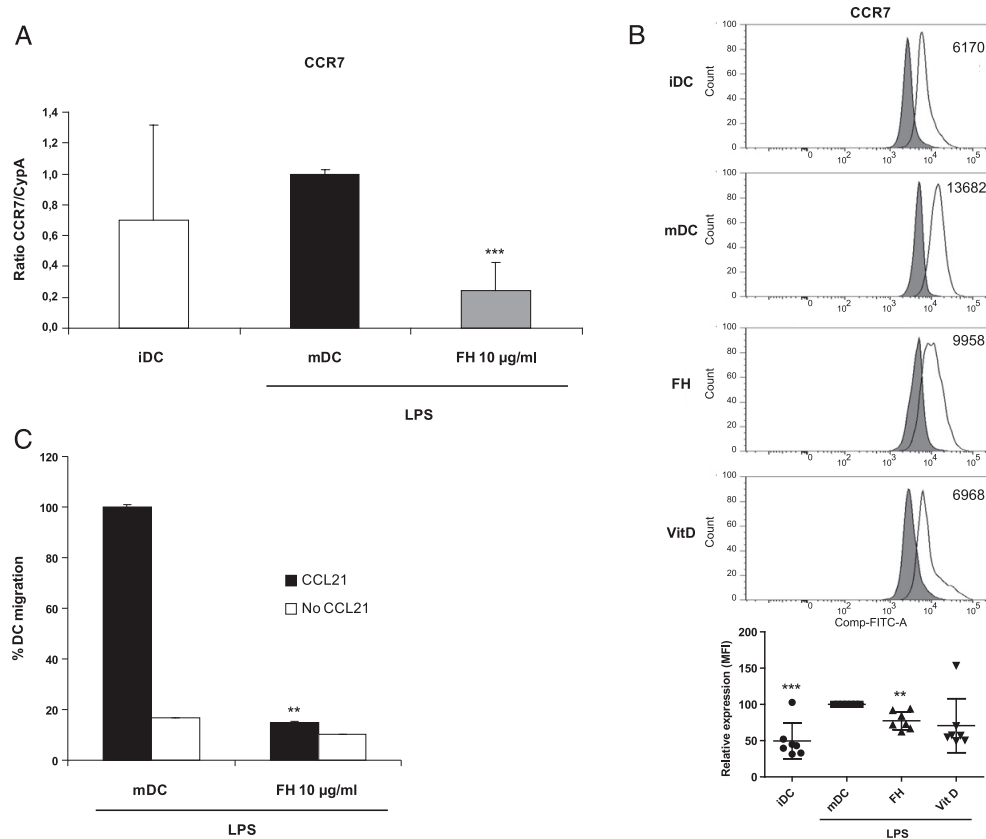


FIGURE 7. FH downregulates *CCR7* expression and alters the chemotaxis of human MoDCs. *CCR7* expression analysis of MoDCs at both the transcriptional (**A**) and the translational (**B**) level. (**A**) Relative quantification of *CCR7* gene expression by RT-qPCR. Results shown are the mean \pm SD from six independent experiments. (**B**) Representative histograms illustrating *CCR7* surface expression on FH-treated and LPS-matured MoDCs and on VitD3-treated and LPS-matured MoDCs (reference). Isotype control is shown in gray. The mean fluorescence intensities (MFIs) for *CCR7* cell-surface expression are indicated. Results shown are the mean \pm SD from seven independent experiments. (**C**) Migration of untreated and FH-treated (10 μ g/ml) MoDCs toward the chemokine CCL21 after LPS maturation was assessed in a transwell assay. Shown are the percentages of MoDCs migrated toward the lower CCL21-containing chamber after 2-h incubation, relative to the migration values from untreated, LPS-matured MoDCs (100%) (black bars). Spontaneous migration of MoDCs toward the lower chamber without CCL21 was also assessed (white bars). Results are the mean \pm SD from four independent experiments performed in duplicate. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with mDC. FH, FH-treated (10 μ g/ml), LPS-matured MoDCs; iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs.

the maturation marker CD83 upon LPS engagement of TLR4, further precluding the NF- κ B-mediated polarization of the T cell response toward Th1.

It has also been reported that LPS activation is essential for inducing migratory and Ag-presenting activity in tolerogenic DCs (35). In contrast to other immunomodulatory agents such as IL-10, dexamethasone, or vitamin D3 (36), surface HLA-DR expression was not reduced by FH treatment, similarly to that previously observed for C4BP(β^-), suggesting that the Ag-presentation capability remains viable in FH-conditioned MoDCs. Conversely, C4BP(β^-) and FH conditioning diverged regarding their capability to influence Ag uptake in MoDCs. Whereas C4BP(β^-) treatment did not affect the Ag internalization capacity of immature MoDCs (21), FH treatment significantly reduced their endocytic activity. Moreover, FH conditioning of MoDCs activated by LPS triggered the downregulation of the *CCR7* surface receptor and, consequently, significantly reduced their migration in response to the CCL21 ligand. Accordingly, it has been shown

that *CCR7* controls the cytoarchitecture, rate of the endocytosis, survival, migratory speed, and maturation of DCs (37). Nevertheless, the reduction of surface *CCR7* and endocytic activity of FH-conditioned MoDCs should not compromise their immunomodulatory activity. For instance, the well-characterized immunoregulatory neuropeptide vasoactive intestinal peptide, which has shown therapeutic potential in autoimmune disorders, also causes a decrease in the expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86, induce significant production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10, and inhibits the phagocytic activity of DCs (38, 39).

Furthermore, analysis of selected transcripts and secreted cytokines involved in DC biology confirmed that both C4BP(β^-) (21) and FH were able of reverting LPS-induced proinflammatory Th1 polarization of MoDCs (showing reduced expression of IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-8) and, instead, promoted the development of an anti-inflammatory profile (yielding increased expression of TGF- β 1 and IL-10). It is well known that IL-10

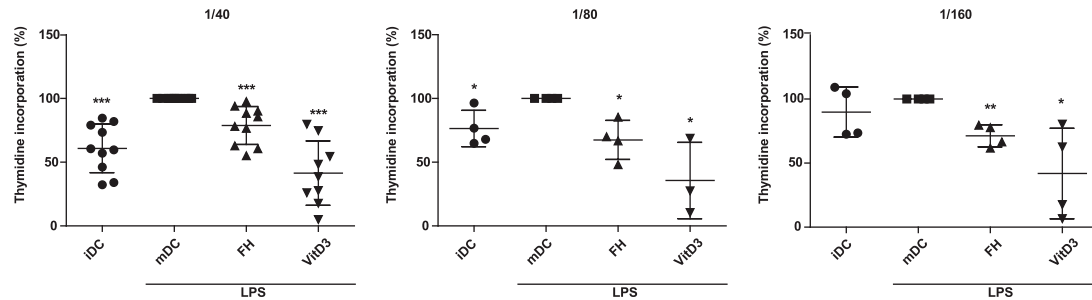


FIGURE 8. Human MoDCs exposed to FH fail to induce allogeneic T cell proliferation. Untreated immature (iDC), untreated and LPS-matured (mDC), FH-treated (5 $\mu\text{g/ml}$), LPS-matured (FH), or vitamin D3-treated and LPS-matured (VitD3) MoDCs were cultured in triplicate with allogeneic, purified CD3⁺ T cells (1×10^5 /well) at 1:40 ($n = 10$), 1:80, and 1:160 ($n = 4$) MoDC/T cell ratio for 5 d. [³H]Thymidine (1 μCi /well) was added for the last 16 h of culture, and incorporation was measured in a β -plate counter. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with mDC.

blocks IL-12 synthesis by DCs, downregulates the expression of costimulatory molecules, and potentiates their tolerogenicity (40). Moreover, IL-10 and TGF- β 1 synergistically generate tolerogenic DCs capable of inducing anergy in Ag-specific memory CD4⁺ T cells and differentiating them into IL-10-producing Tregs (41). Concordantly, we have demonstrated that the cross-talk between allogeneic T cells and FH-conditioned MoDCs: 1) induce T cell

hyporesponsiveness and prevent Th1 polarization, characterized by a significant reduction of IFN- γ secretion; and 2) promote the generation of CD4⁺CD127^{low/negative}CD25^{high}Foxp3⁺ cells (adaptive Tregs).

From the foregoing, it seems evident that there might be many similarities in the responses induced by C4BP(β -) and FH over MoDCs, although these responses are not identical, in agreement

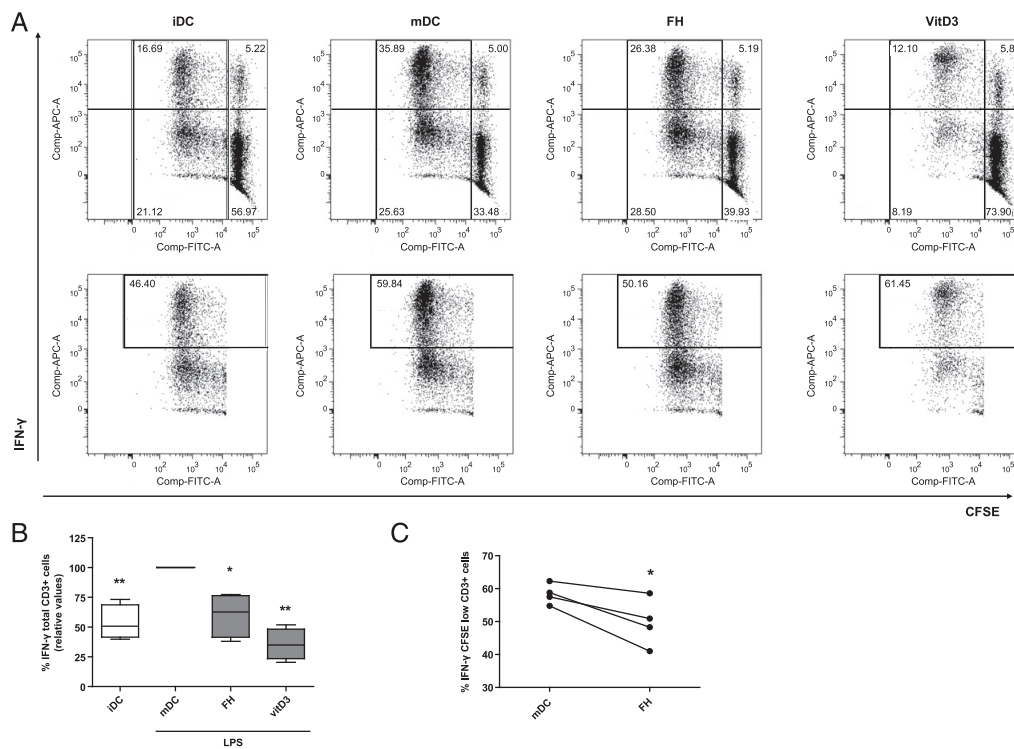


FIGURE 9. FH-treated MoDCs induce decreased production and secretion of IFN- γ from allogeneic T cells. Proliferating T lymphocytes were obtained from allostimulatory cocultures with untreated immature MoDCs (iDC), untreated and LPS-matured MoDCs (mDC), FH-treated (5 $\mu\text{g/ml}$) and LPS-matured (FH), or VitD3-treated and LPS-matured (VitD3) MoDCs. The production of IFN- γ was measured by intracellular staining after restimulating the cells with PMA + ionomycin in the presence of brefeldin for 5 h. **(A)** The top panel indicates the proportion of total IFN- γ -producing cells. The bottom panel shows the percentages of cells that responded to allostimulation (CFSE^{low}) and produced IFN- γ . The numbers inside the dot plots indicate the percentage of cells in each quadrant or box (a representative experiment is shown). **(B)** Relative percentages of total IFN- γ production (see Fig. 10A, top panel) ($n = 4$). **(C)** Percentage of IFN- γ -producing T cells that responded to allostimulation (CFSE^{low} CD3⁺ cells) (see Fig. 10A, bottom panel). Each symbol represents an individual sample. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with mDC.

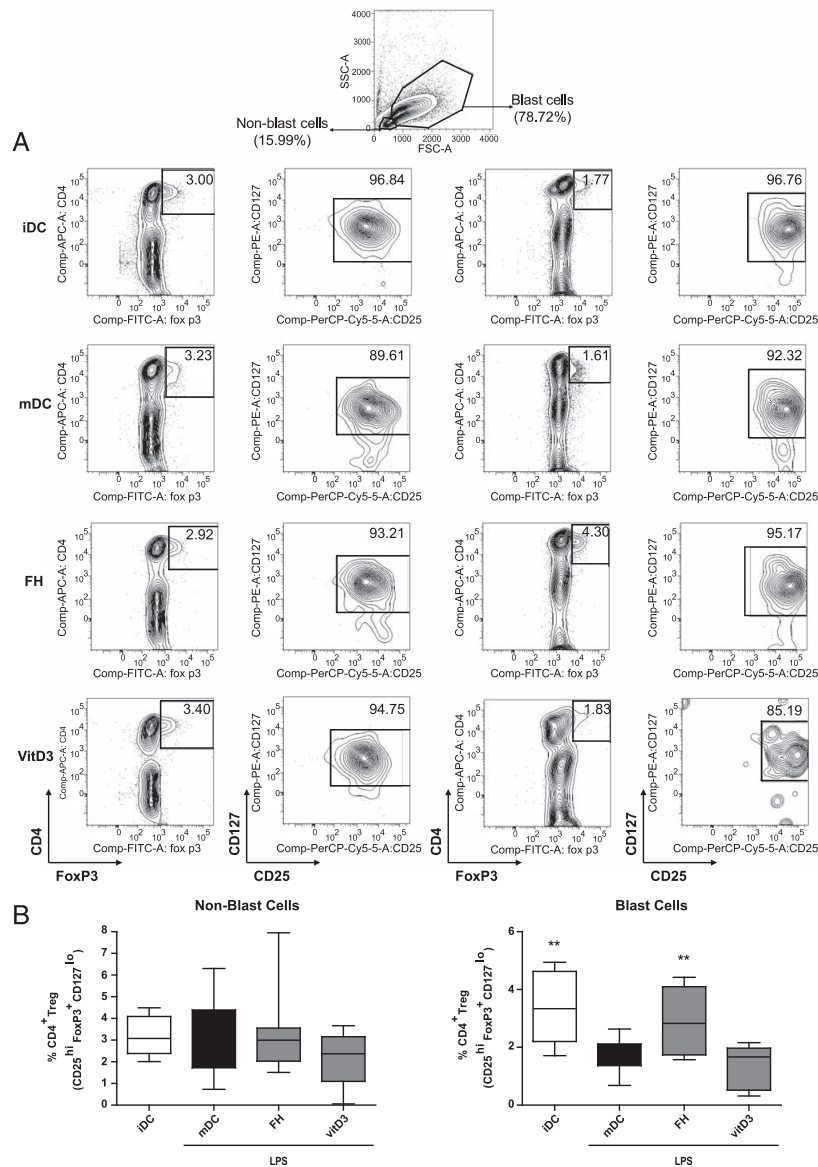


FIGURE 10. FH-treated MoDCs promote CD4⁺CD127^{low/negative}CD25^{high}FoxP3⁺ induction from blast T cells. Untreated immature MoDCs (iDC), untreated, and LPS-matured (mDC), FH-treated (5 μ g/ml), and LPS-matured (FH) or VitD3-treated and LPS-matured (VitD3) MoDCs were cultured in triplicate with allogeneic, purified CD3⁺ T cells (1×10^7 /well) at 1:40 MoDC:T cell ratio. After 6 d of coculture without restimulation and any supplemental cytokines, cell sizes were evaluated by flow cytometry to differentiate blast from nonblast cells. **(A)** Phenotype of T cells as CD4⁺, Foxp3⁺, and CD25⁺ with low CD127 expression. One of 10 representative experiments is shown. **(B)** Summary of percentages of T cells from nonblast (*left panel*) and blast (*right panel*) origin. ** $p < 0.01$ compared with mDC; $n = 10$.

with recent reports comparing different immunosuppressive agents (42). Our ongoing comparative analysis of genome-wide transcriptional profiles from LPS-stimulated MoDCs conditioned by both fluid-phase complement inhibitors will allow the comprehensive assessment of key common and differential genes and signaling pathways involved in the development of the tolerogenic phenotype.

In addition, the physiological significance of the newly described immunomodulatory role of FH is intriguing. Mutations

in the C-terminal region (host ligand binding region) of FH predispose individuals to aHUS and other microangiopathies (11). Through a functional analysis employing rFH variants covering the whole molecule, we have shown that CCP19–20, which binds to C3b and polyanions such as glycosaminoglycans (GAGs) on host cells to mediate cell-surface protection, also has a major role in the tolerogenic activity of FH over MoDCs. These modules are thereby critical for attachment of the protein in the

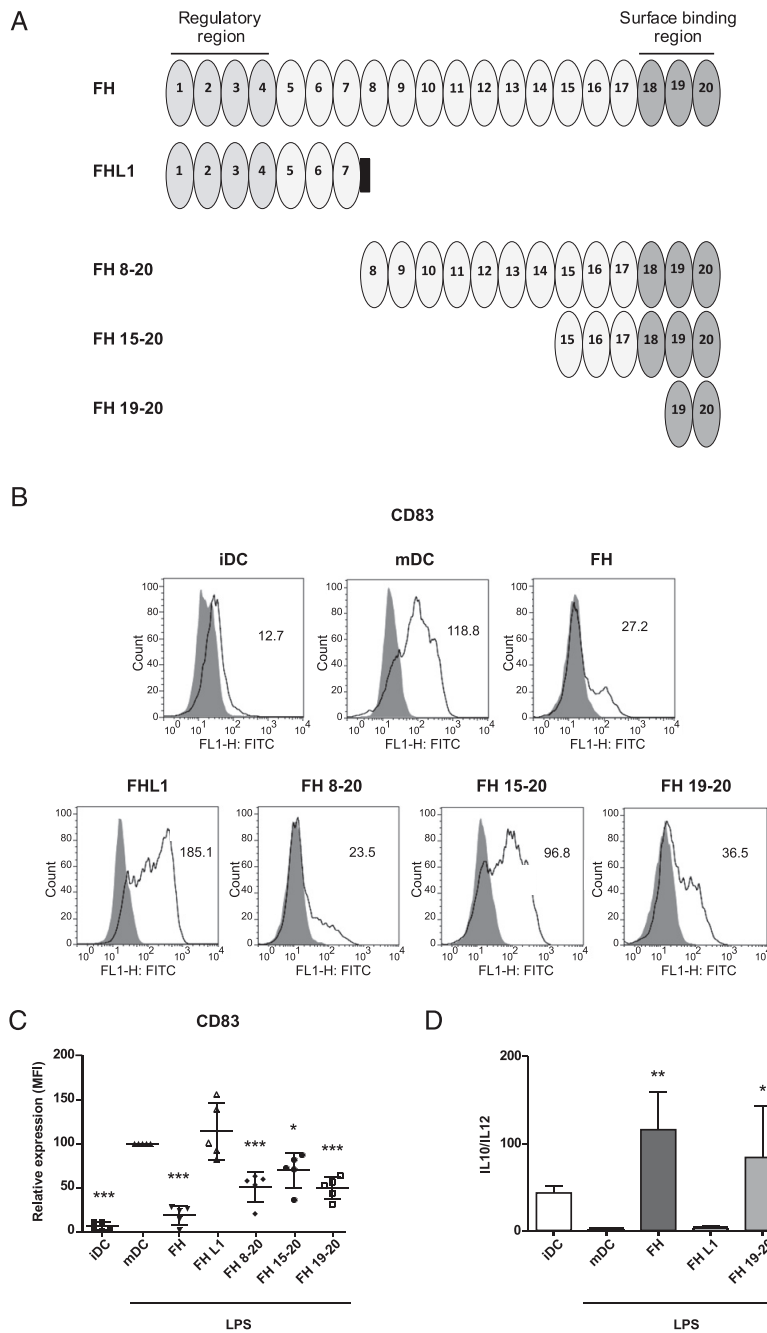


FIGURE 11. The CCP19–CCP20 surface recognition and cell-binding domain of FH is necessary for the immunomodulatory activity of FH on human MoDCs. **(A)** Structural features of FH, FHL1, and the deletion variants of FH, FH8–20, FH15–20, and FH19–20. Wild-type FH is composed of 20 CCP domains arranged linearly. Two major functional regions (CCP1–4 or complement regulatory region and CCP18–20 or surface binding region) are located at the N and C termini of the molecule, respectively. FHL1 is a natural alternative splicing variant of the human FH gene composed of the seven N-terminal CCP domains and holds a unique C-terminal 4-aa extension. FH8–20, FH15–20, and FH19–20 are N-terminal deletion variants composed of 13, 6, and 2 C-terminal CCP domains from FH, respectively. **(B)** Human MoDCs were incubated throughout their differentiation and maturation process with full-length plasma-purified FH, FHL1, or the recombinant deletion variants FH8–20, FH15–20, and FH19–20 (all at 5 μ g/ml). MoDC maturation was achieved by LPS treatment. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell-surface expression of the maturation marker CD83. Shown are representative histograms from five independent experiments. Isotype control is shown in gray. The mean fluorescence (Figure legend continues)

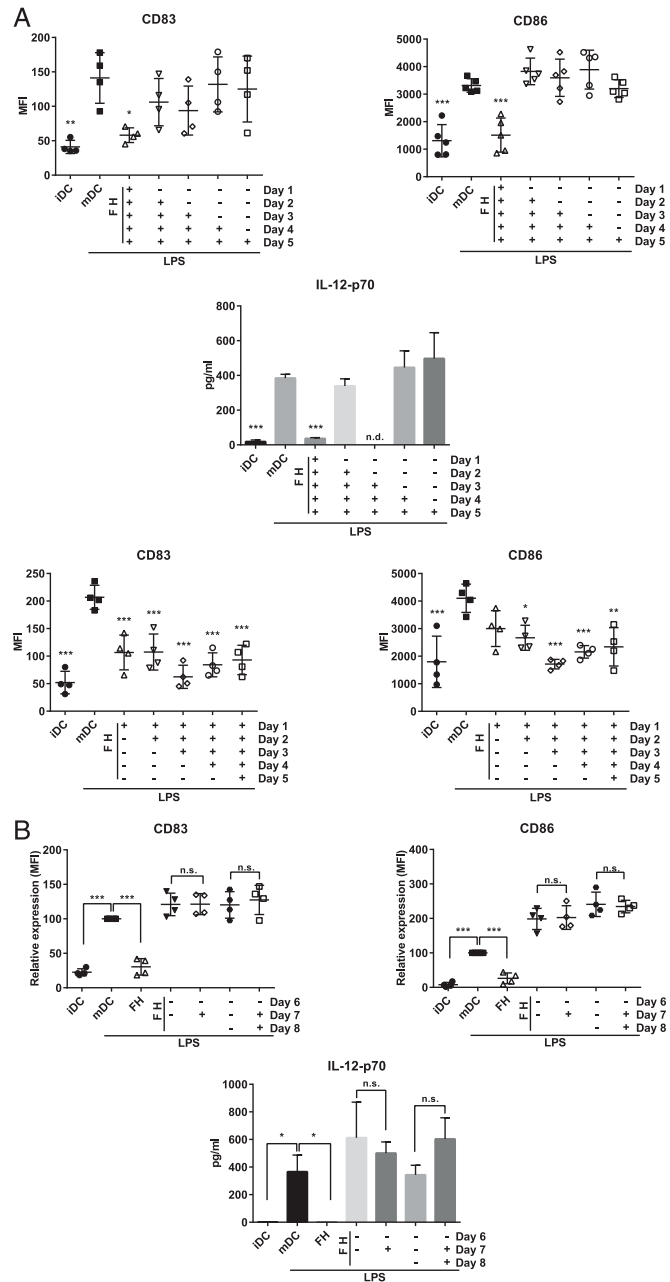


FIGURE 12. FH-mediated immunomodulatory activity operates at the initial stages of monocyte to MoDC differentiation. **(A)** Time-course differentiation assays. FH (5 $\mu\text{g/ml}$) was either added (+, *top* and *middle panels*) or removed (-, *lower panels*) at the indicated times (days 1–5) to human monocyte cultures differentiating to iDCs through IL-4/GM-CSF exposure. **(B)** Time-course maturation assays. FH (5 $\mu\text{g/ml}$) was present (+) or absent (-) at the indicated times (days 6–8) in LPS-matured MoDCs. MoDC maturation was achieved by LPS treatment as indicated. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for CD83 and CD86 cell-surface expression. Absolute or relative mean fluorescence intensities (MFIs) for each surface marker are indicated. Cell culture supernatants were harvested and the presence of IL-12p70 was determined by ELISA. The results shown are the mean \pm SD from four to five independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with mDC (in A) or comparing the indicated conditions (in B). FH, FH-treated, LPS-matured MoDCs; iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs; n.d., not determined; n.s., nonsignificant.

specific context to self-surface. This binding profile is further exploited by many microbial pathogens that similarly bind FH via the C-terminal CCP19–20 (43). The use of recombinant

FHL1 and deletion mutants shows that the immunomodulatory activity is specific for FH and is not present in FHL1, the related human plasma protein, which shares the N-terminal but lacks the

intensities (MFIs) for CD83 cell-surface expression are indicated. **(C)** Relative expression (MFI) of CD83. **(D)** MoDCs untreated or treated with FH, FHL1, or its deletion variant (FH19–20) (5 $\mu\text{g/ml}$ /each) were matured with LPS. The concentrations of IL-12p70 and IL-10 in the respective supernatants were analyzed by specific ELISAs. Results shown are the mean IL-10/IL-12 ratio \pm SD from five independent experiments, performed in duplicate. The results shown are the mean \pm SD from five independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with mDC. FH8–20, FH8–20-treated, LPS-matured MoDCs; FH15–20, FH15–20-treated, LPS-matured MoDCs; FH19–20, FH19–20-treated, LPS-matured MoDCs; FHL1, FHL1-treated, LPS-matured MoDCs; iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs.

C-terminal CCP domains and thereby the main recognition region. Interestingly, a recent report has shown that the CCP6–8 and CCP19–20 regions of FH differentially mediate binding in different host tissues. CCP19–20 binds poorly to the GAG heparin compared with CCP6–8, which might imply additional binding of the C terminus of FH to an as-yet-unknown receptor responsible for the immunomodulatory activity of FH (29). **Indeed, FH has been suggested to bind specific adhesion** molecules in immune cells such as the integrins CR3, CR4, and α IIB β 3 or L-selectin (18). Moreover, regarding the most thoroughly characterized interaction, FH–CR3, it has been shown that CCP19–20 holds a major binding site for CR3, a regulator of human DC immunostimulatory function (44, 45). However, according to our results, neither CR3 nor CR4 seem to be involved in the noncanonical immunomodulatory activity of FH over MoDCs. Alternatively, tissue-specific host recognition by FH has been shown to be mediated by its two (CCP6–8 and CCP19–20) GAG-binding regions (29). Nevertheless, we have shown in this study that the tolerogenic activity displayed by FH in the presence of MoDCs does not involve GAGs. Additionally, in a physiological setting, we cannot discard the influence of other known FH ligand proteins such as SIBLING proteins, adrenomedullin, pentraxins (46), or malondialdehyde modified protein adducts (47), the last two showing also CCP19–20 binding, in the overall immunomodulatory actions of FH. Further studies are underway to identify the monocyte/DC surface receptor able to interact with FH, either directly or indirectly, and induce a tolerogenic phenotype in MoDCs.

The above evidence argues for a tissue-specific recognition and local immunomodulatory action of FH in the sites of inflammation or injury. Indeed, inflammatory DCs differentiate in situ from monocytes recruited to the sites of inflammation (48). Thus, FH might represent an immunomodulatory differentiation factor targeting inflammatory MoDCs. Moreover, the source of local FH might be other than that released by the liver into the circulation. To note, attempts at liver transplantation in patients with FH mutations have been unsuccessful (49). Indeed, FH has been shown to be released by different cell types such as monocytes, fibroblasts, endothelial cells, keratinocytes, mesenchymal stem cells (MSCs), and retinal pigment epithelial cells (18). Thus, locally released FH in tissues (approaching concentrations of 2–10 μ g/ml, according to our in vitro results) may help maintaining an anti-inflammatory environment and to modulate the adaptive immune response by inducing tolerogenic DCs. For example, it has been recently reported that MSCs, which inhibit DC differentiation/maturation (50), constitutively secrete FH. In addition, production of FH by MSCs is augmented by inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ in a dose- and time-dependent manner (51). Thus, locally produced FH in the MSC niche environment outside the vasculature could reach sufficient local concentrations to be of physiological significance, contributing to MSCs potent and broad anti-inflammatory and immunosuppressive activities.

Regarding pathological scenarios, the C-terminal region of FH is a hotspot for disease-associated mutations, which have been linked to increased risk for the development of aHUS, early onset drusen, and age-related macular degeneration (AMD) (52–54). Moreover, it has been recently reported that the treatment with human FH rapidly reverses the renal abnormality developed in FH-deficient mice (55). Our findings embrace the tantalizing possibility that the noncanonical immunomodulatory activity of FH over DCs, a critical link between innate and adaptive immunity because their major role as APCs able to induce potent

T cell-mediated immune responses, could contribute to the overall outcome not only of FH-related diseases (aHUS and AMD) but also of other immune-inflammatory diseases. For instance, regarding AMD, there remains enough clinical and experimental support of the concept of immune engagement that goes far beyond the role of FH as complement inhibitor. Indeed, evidence supporting the adaptive immune system is directly implicated in both mouse and human (56). Thus, several FH mutations affecting its immunomodulatory activity might lead to loss of local control of many aspects of the immune system, and the release of inflammatory factors would lead to injury and loss of retinal pigment epithelium cells. Moreover, it has been reported that alternative pathway complement activation has a critical role in asthma, and strategies to deliver the complement regulatory region of FH specifically to the site of inflammation provide greater protection than that afforded by endogenous regulators (57). Thus, additional protection conferred by FH immunomodulation over inflammatory DCs might have been underestimated, because DCs are instrumental in the development of both regulatory tone and mucosal immunity in asthma (58). Furthermore, it has been recently shown that MDSCs are implicated in resistance to streptozotocin-induced diabetes in the absence of complement C3 (59), arguing for a potential role of FH-mediated immunomodulation.

Finally, it remains to be established whether FH itself or FH-conditioned MoDCs hold promise for future DC-based tolerance-inducing strategies and how will they perform compared with tolerogenic DCs induced by other mediators (60). Additional therapeutic approaches using animal models of autoimmunity and/or transplantation will be needed to ascertain whether the phenotypic and functional signature of FH might be particularly suited to prime Ag- and tissue-specific Tregs for clinical translation, targeting a specific immunoinflammatory process (61).

It will be also interesting to decipher whether the FH-related protein family members (FHR1–5) (62), of which functions are not fully understood, also hold immunomodulatory activity over DCs or interfere with FH function.

In summary, we have identified a novel immunomodulatory activity of FH, unrelated to complement regulation, able to influence adaptive immunity by directly inducing a tolerogenic phenotype on inflammatory DCs. Challenges ahead include the identification of the putative FH surface receptor responsible for the immunomodulatory activity, the assessment of the molecular mechanism involved in FH-conditioned DC transformation toward a tolerogenic state, and the physiological relevance of this FH-mediated immunomodulatory activity in health and disease. Notwithstanding, our findings could open new avenues for the evaluation of the therapeutic potential of FH or FH-related peptides, either by direct administration or by adoptive transfer of ex vivo-conditioned DCs, in the modulation of dysregulated immune-inflammatory processes such as hypersensitivity, autoimmune pathologies, and transplant rejection.

Acknowledgments

We thank Frida Mohlin (Lund University), Esther Castaño (Cytometry Service, Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona), and Núria Cortadellas (Scanning Electron Microscopy Service, Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona) for invaluable technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Zipfel, P. F. 2009. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol. Lett.* 126: 1–7.
- Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang, and J. D. Lambris. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat. Immunol.* 11: 785–797.
- Thurman, J. M., and V. M. Holers. 2006. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J. Immunol.* 176: 1305–1310.
- Kühn, S., C. Skerka, and P. F. Zipfel. 1995. Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J. Immunol.* 155: 5663–5670.
- Schmidt, C. Q., A. P. Herbert, H. G. Hocking, D. Uhrin, and P. N. Barlow. 2008. Translational mini-review series on complement factor H: structural and functional correlations for factor H. *Clin. Exp. Immunol.* 151: 14–24.
- Makou, E., A. P. Herbert, and P. N. Barlow. 2013. Functional anatomy of complement factor H. *Biochemistry* 52: 3949–3962.
- Ferreira, V. P., A. P. Herbert, H. G. Hocking, P. N. Barlow, and M. K. Pangburn. 2006. Critical role of the C-terminal domains of factor H in regulating complement activation at cell surfaces. *J. Immunol.* 177: 6308–6316.
- Józsi, M., M. Oppermann, J. D. Lambris, and P. F. Zipfel. 2007. The C-terminus of complement factor H is essential for host cell protection. *Mol. Immunol.* 44: 2697–2706.
- Morgan, H. P., H. D. Mertens, M. Guariento, C. Q. Schmidt, D. C. Soares, D. I. Svergun, A. P. Herbert, P. N. Barlow, and J. P. Hannan. 2012. Structural analysis of the C-terminal region (modules 18–20) of complement regulator factor H (FH). *PLoS One* 7: e32187.
- Morgan, H. P., C. Q. Schmidt, M. Guariento, B. S. Blaum, D. Gillespie, A. P. Herbert, D. Kavanagh, H. D. Mertens, D. I. Svergun, C. M. Johansson, et al. 2011. Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18: 463–470.
- de Córdoba, S. R., and E. G. de Jorge. 2008. Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin. Exp. Immunol.* 151: 1–13.
- Lambris, J. D., D. Ricklin, and B. V. Geisbrecht. 2008. Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 132–142.
- Junnikkala, S., T. S. Jokiranta, M. A. Friese, H. Jarva, P. F. Zipfel, and S. Meri. 2000. Exceptional resistance of human H2 glioblastoma cells to complement-mediated killing by expression and utilization of factor H and factor H-like protein 1. *J. Immunol.* 164: 6075–6081.
- Sjöberg, A. P., L. A. Trouw, and A. M. Blom. 2009. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol.* 30: 83–90.
- Weismann, D., K. Hartvigsen, N. Lauer, K. L. Bennett, H. P. Scholl, P. Charbel Issa, M. Cano, H. Brandstätter, S. Tsimikas, C. Skerka, et al. 2011. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 478: 76–81.
- Stahl, A. L., F. Vaziri-Sani, S. Heinen, A. C. Kristoffersson, K. H. Gydell, R. Raafat, A. Gutierrez, O. Beringer, P. F. Zipfel, and D. Karpman. 2008. Factor H dysfunction in patients with atypical hemolytic uremic syndrome contributes to complement deposition on platelets and their activation. *Blood* 111: 5307–5315.
- Ferluga, J., U. Kishore, and R. B. Sim. 2014. A potential anti-coagulant role of complement factor H. *Mol. Immunol.* 59: 188–193.
- Kopp, A., M. Hebecker, E. Svobodová, and M. Józsi. 2012. Factor h: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules* 2: 46–75.
- Mihlan, M., S. Stippa, M. Józsi, and P. F. Zipfel. 2009. Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H. *Cell Death Differ.* 16: 1630–1640.
- Kemper, C., I. Gigli, and P. F. Zipfel. 2000. Conservation of plasma regulatory proteins of the complement system in evolution: humans and fish. *Exp. Clin. Immunogenet.* 17: 55–62.
- Olivar, R., A. Luque, M. Naranjo-Gómez, J. Quer, P. García de Frutos, F. E. Borrás, S. Rodríguez de Córdoba, A. M. Blom, and J. M. Aran. 2013. The $\alpha 7\beta 0$ isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells. *J. Immunol.* 190: 2857–2872.
- Gabrilovich, D. I., and S. Nagaraj. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 162–174.
- Chen, X., K. Doffek, S. L. Sugg, and J. Shilyansky. 2004. Phosphatidylserine regulates the maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* 173: 2985–2994.
- Eken, C., O. Gasser, G. Zenhausern, I. Oehri, C. Hess, and J. A. Schifferli. 2008. Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 180: 817–824.
- Kask, L., B. O. Villoutreix, M. Steen, B. Ramesh, B. Dahlbäck, and A. M. Blom. 2004. Structural stability and heat-induced conformational change of two complement inhibitors: C4b-binding protein and factor H. *Protein Sci.* 13: 1356–1364.
- Jin, P., T. H. Han, J. Ren, S. Saunders, E. Wang, F. M. Marincola, and D. F. Stronck. 2010. Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *J. Transl. Med.* 8: 4.
- Ogata, M., Y. Zhang, Y. Wang, M. Itakura, Y. Y. Zhang, A. Harada, S. Hashimoto, and K. Matsushima. 1999. Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor- β 1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. *Blood* 93: 3225–3232.
- Svoboda, E., A. E. Schneider, N. Sándor, U. Lermann, P. Staib, M. Kremnitzka, Z. Bajtaj, D. Barz, A. Erdei, and M. Józsi. 2015. Secreted aspartic protease 2 of *Candida albicans* inactivates factor H and the macrophage factor H-receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18). *Immunol. Lett.* 168: 13–21.
- Clark, S. J., L. A. Ridge, A. P. Herbert, S. Hakobyan, B. Mulloy, R. Lennon, R. Würzner, B. P. Morgan, D. Uhrin, P. N. Bishop, and A. J. Day. 2013. Tissue-specific host recognition by complement factor H is mediated by differential activities of its glycosaminoglycan-binding regions. *J. Immunol.* 190: 2049–2057.
- den Dekker, E., S. Grefte, T. Huijs, G. B. ten Dam, E. M. Versteeg, L. C. van den Berk, B. A. Bladergroen, T. H. van Kuppevelt, C. G. Figdor, and R. Torensma. 2008. Monocyte cell surface glycosaminoglycans positively modulate IL-4-induced differentiation toward dendritic cells. *J. Immunol.* 180: 3680–3688.
- Trouw, L. A., A. A. Bengtsson, K. A. Gelderman, B. Dahlbäck, G. Sturfelt, and A. M. Blom. 2007. C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack. *J. Biol. Chem.* 282: 28540–28548.
- Novak, N., R. Valenta, B. Bohle, S. Laffer, J. Haberstock, S. Kraft, and T. Bieber. 2004. Fc ϵ RI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113: 949–957.
- León, B., and C. Ardavin. 2008. Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol. Cell Biol.* 86: 320–324.
- Hespeel, C., and M. Moser. 2012. Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* 42: 2535–2543.
- Anderson, A. E., D. J. Swan, B. L. Sayers, R. A. Harry, A. M. Patterson, A. von Delwig, J. H. Robinson, J. D. Isaacs, and C. M. Hilkens. 2009. LPS activation is required for migratory activity and antigen presentation by tolerogenic dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 85: 243–250.
- Nikolic, T., and B. O. Roep. 2013. Regulatory multitasking of tolerogenic dendritic cells - lessons taken from vitamin D3-treated tolerogenic dendritic cells. *Front. Immunol.* 4: 113.
- Sánchez-Sánchez, N., L. Riol-Blanco, and J. L. Rodríguez-Fernández. 2006. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J. Immunol.* 176: 5153–5159.
- Chorny, A., E. Gonzalez-Rey, A. Fernandez-Martin, D. Pozo, D. Ganea, and M. Delgado. 2005. Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 13562–13567.
- Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, A. Fernandez-Martin, D. Ganea, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce CD4 and CD8 regulatory T cells. *Blood* 107: 3632–3638.
- Steinbrink, K., M. Wöfl, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159: 4772–4780.
- Torres-Aguilar, H., S. R. Aguilar-Ruiz, G. González-Pérez, R. Munguía, S. Bajaña, M. A. Meraz-Ríos, and C. Sánchez-Torres. 2010. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 184: 1765–1775.
- Naranjo-Gómez, M., D. Raich-Regué, C. Oñate, L. Grau-López, C. Ramo-Tello, R. Pujol-Borrell, E. Martínez-Cáceres, and F. E. Borrás. 2011. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J. Transl. Med.* 9: 89.
- Zipfel, P. F., T. Hallström, and K. Riesbeck. 2013. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes—tipping the balance. *Mol. Immunol.* 56: 152–160.
- Losse, J., P. F. Zipfel, and M. Józsi. 2010. Factor H and factor H-related protein 1 bind to human neutrophils via complement receptor 3, mediate attachment to *Candida albicans*, and enhance neutrophil antimicrobial activity. *J. Immunol.* 184: 912–921.
- Skoberne, M., S. Somersan, W. Almodovar, T. Truong, K. Petrova, P. M. Henson, and N. Bhardwaj. 2006. The apoptotic-cell receptor CR3, but not α phv β 5, is a regulator of human dendritic-cell immunostimulatory function. *Blood* 108: 947–955.
- Ferreira, V. P., M. K. Pangburn, and C. Cortés. 2010. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol. Immunol.* 47: 2187–2197.
- Hyvärinen, S., K. Uchida, M. Varjosalo, R. Jokela, and T. S. Jokiranta. 2014. Recognition of malondialdehyde-modified proteins by the C terminus of complement factor H is mediated via the polyanion binding site and impaired by mutations found in atypical hemolytic uremic syndrome. *J. Biol. Chem.* 289: 4295–4306.
- Segura, E., and S. Amigorena. 2013. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 34: 440–445.
- Appel, G. B., H. T. Cook, G. Hageman, J. C. Jennette, M. Kashgarian, M. Kirschfink, J. D. Lambris, L. Lanning, H. U. Lutz, S. Meri, et al. 2005. Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease): an update. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16: 1392–1403.
- Jiang, X. X., Y. Zhang, B. Liu, S. X. Zhang, Y. Wu, X. D. Yu, and N. Mao. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105: 4120–4126.
- Tu, Z., Q. Li, H. Bu, and F. Lin. 2010. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells Dev.* 19: 1803–1809.
- Raychaudhuri, S., O. Iartchouk, K. Chin, P. L. Tan, A. K. Tai, S. Ripke, S. Gowrisankar, S. Vemuri, K. Montgomery, Y. Yu, et al. 2011. A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 43: 1232–1236.
- Saunders, R. E., T. H. Goodship, P. F. Zipfel, and S. J. Perkins. 2006. An interactive web database of factor H-associated hemolytic uremic syndrome mu-

- tations: insights into the structural consequences of disease-associated mutations. *Hum. Mutat.* 27: 21–30.
54. Guignonis, V., V. Frémeaux-Bacchi, S. Giraudier, R. Favier, D. Borderie, Z. Massy, B. Mougenot, D. S. Rosenblatt, and G. Deschênes. 2005. Late-onset thrombocytic microangiopathy caused by cblC disease: association with a factor H mutation. *Am. J. Kidney Dis.* 45: 588–595.
55. Fakhouri, F., E. G. de Jorge, F. Brune, P. Azam, H. T. Cook, and M. C. Pickering. 2010. Treatment with human complement factor H rapidly reverses renal complement deposition in factor H-deficient mice. *Kidney Int.* 78: 279–286.
56. Nussenblatt, R. B., R. W. Lee, E. Chew, L. Wei, B. Liu, H. N. Sen, A. D. Dick, and F. L. Ferris. 2014. Immune responses in age-related macular degeneration and a possible long-term therapeutic strategy for prevention. *Am. J. Ophthalmol.* 158: 5–11.e2.
57. Takeda, K., J. M. Thurman, S. Tomlinson, M. Okamoto, Y. Shiraishi, V. P. Ferreira, C. Cortes, M. K. Pangburn, V. M. Holers, and E. W. Gelfand. 2012. The critical role of complement alternative pathway regulator factor H in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J. Immunol.* 188: 661–667.
58. van Helden, M. J., and B. N. Lambrecht. 2013. Dendritic cells in asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 25: 745–754.
59. Gao, X., H. Liu, B. He, and Z. Fu. 2013. Resistance to Streptozotocin-Induced Autoimmune Diabetes in Absence of Complement C3: Myeloid-Derived Suppressor Cells Play a Role. *PLoS One* 8: e66334.
60. Gordon, J. R., Y. Ma, L. Churchman, S. A. Gordon, and W. Dawicki. 2014. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front. Immunol.* 5: 7.
61. Cabezón, R., and D. Benítez-Ribas. 2013. Therapeutic potential of tolerogenic dendritic cells in IBD: from animal models to clinical application. *Clin. Dev. Immunol.* 2013: 789814.
62. Skerka, C., Q. Chen, V. Fremeaux-Bacchi, and L. T. Roumenina. 2013. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol. Immunol.* 56: 170–180.

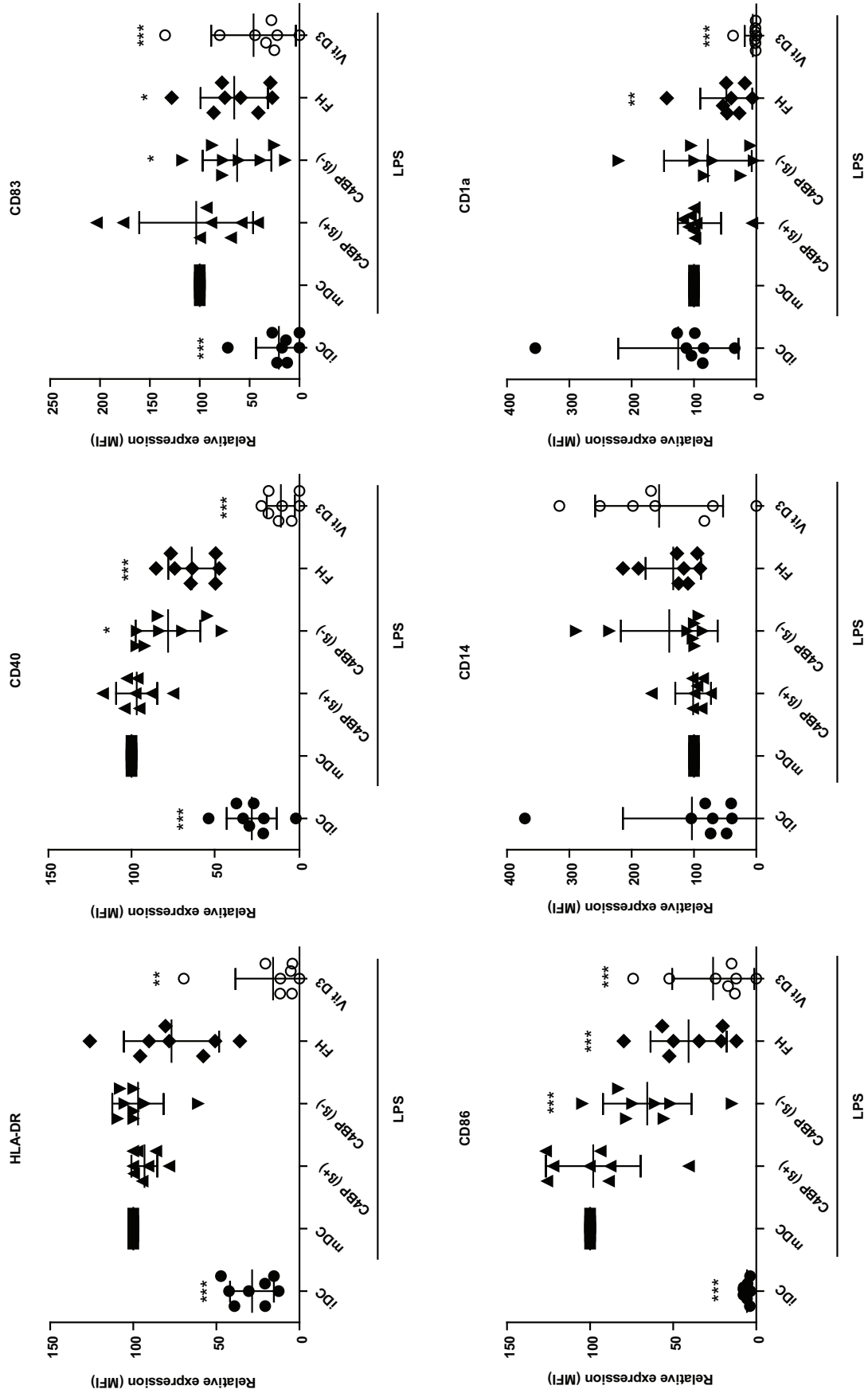


FIGURE S1: FH behaves analogously than C4BP(β-) modulating the overall activation phenotype of human MoDCs.

Human MoDCs were incubated throughout their differentiation and maturation process with C4BP(β+), C4BP(β-), or FH (all at 5 μg/ml), or with VitD3 (1nM, 0.42 ng/ml). MoDC maturation was achieved by LPS treatment. Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of HLA-DR, CD14, CD83, CD86 and CD1a, obtaining the relative MFI for the different cell surface markers. IDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs; C4BP(β+), C4BP(β-)-treated, LPS-matured MoDCs; FH, FH-treated, LPS-matured MoDCs; Vit D3, vitamin D3-treated MoDCs. The results shown are the mean ± SD from 8 independent experiments (*, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001 compared to mDC).

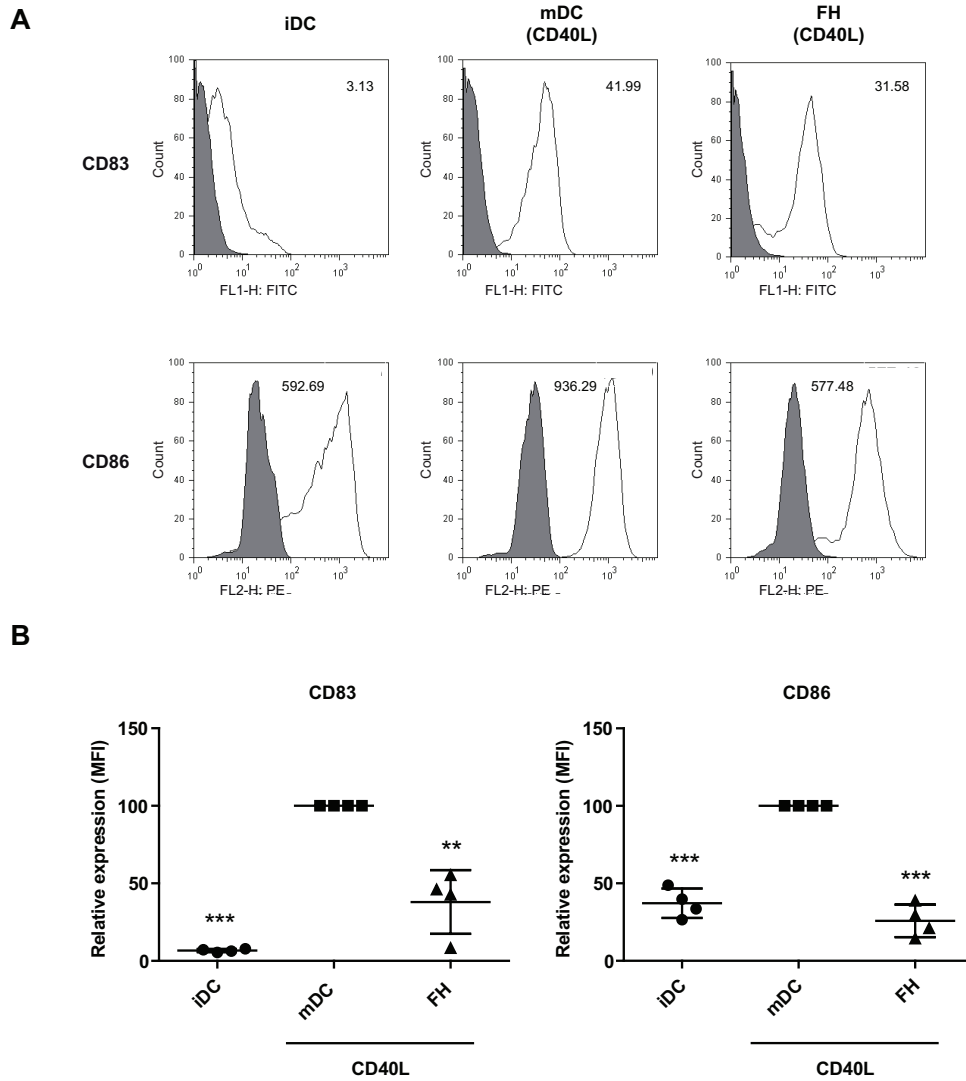


FIGURE S2: FH down-regulates CD83 and CD86 surface markers on human MoDCs stimulated by CD40L.

FH inhibits up-regulation of key surface markers from CD40L-stimulated human MoDCs. Human MoDCs were incubated throughout their differentiation and maturation process with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of FH. MoDC maturation was achieved by CD40L treatment (see Materials and Methods for details). Cells were then collected, washed, and analyzed by flow cytometry for CD83 and CD86 cell surface staining. (A) Histogram images are representative from 4 independent experiments. (B) Relative MFI for the CD83 and CD86 cell surface markers. iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, CD40L-matured MoDCs; FH, FH-treated, CD40L-matured MoDCs. The results shown are the mean \pm SD from 4 independent experiments (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to mDC).

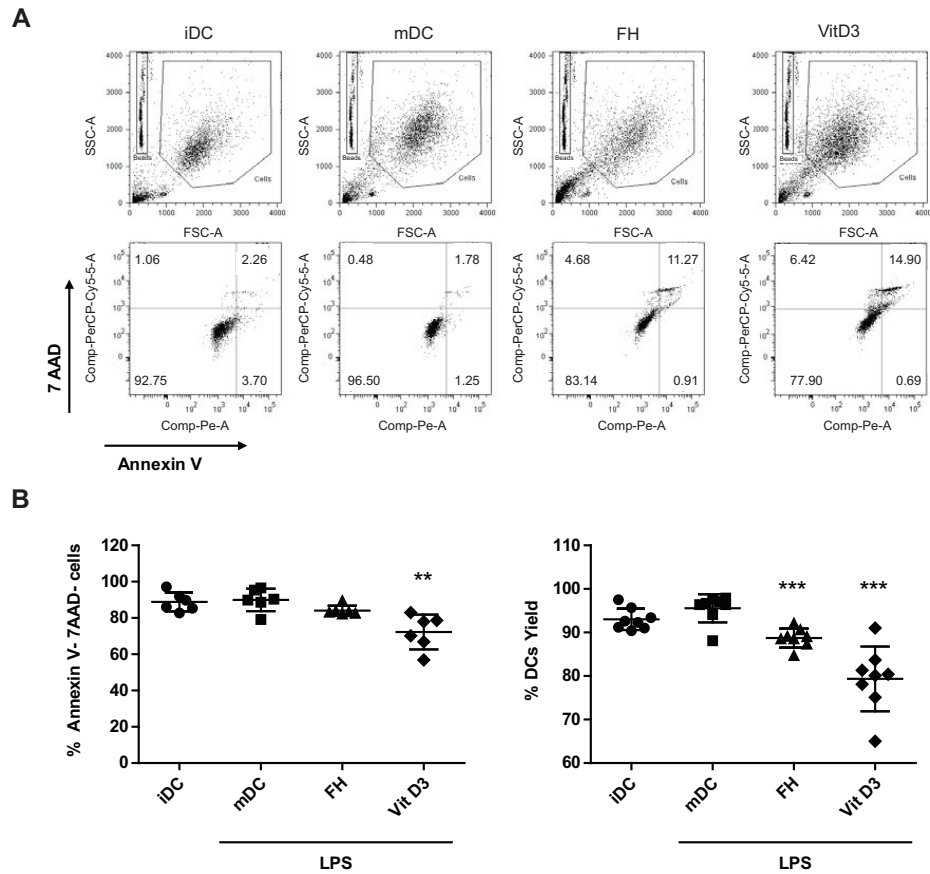


FIGURE S3: FH treatment does not affect the viability of human MoDCs.

Yield and viability of MoDCs obtained by FH treatment and matured with LPS. Viability was assessed by annexin-V plus 7-AAD staining and flow cytometry analysis, as described in Materials and Methods. As reference, we included MoDCs treated with the immunomodulator vitamin D3. (A) Dot-plots are representative from 6 independent experiments. (B) Surviving cells are annexin V and 7AAD negative cells. (C) Yields obtained calculated as the number of MoDCs obtained from the initial number of monocytes that were cultured. iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs; FH, FH-treated (5 µg/ml), LPS-matured MoDCs; Vit D3, vitamin D3-treated (0.42 ng/ml), LPS-matured MoDCs. The results shown are the mean \pm SD from 6 independent experiments (viability), and from 8 independent experiments (yield).

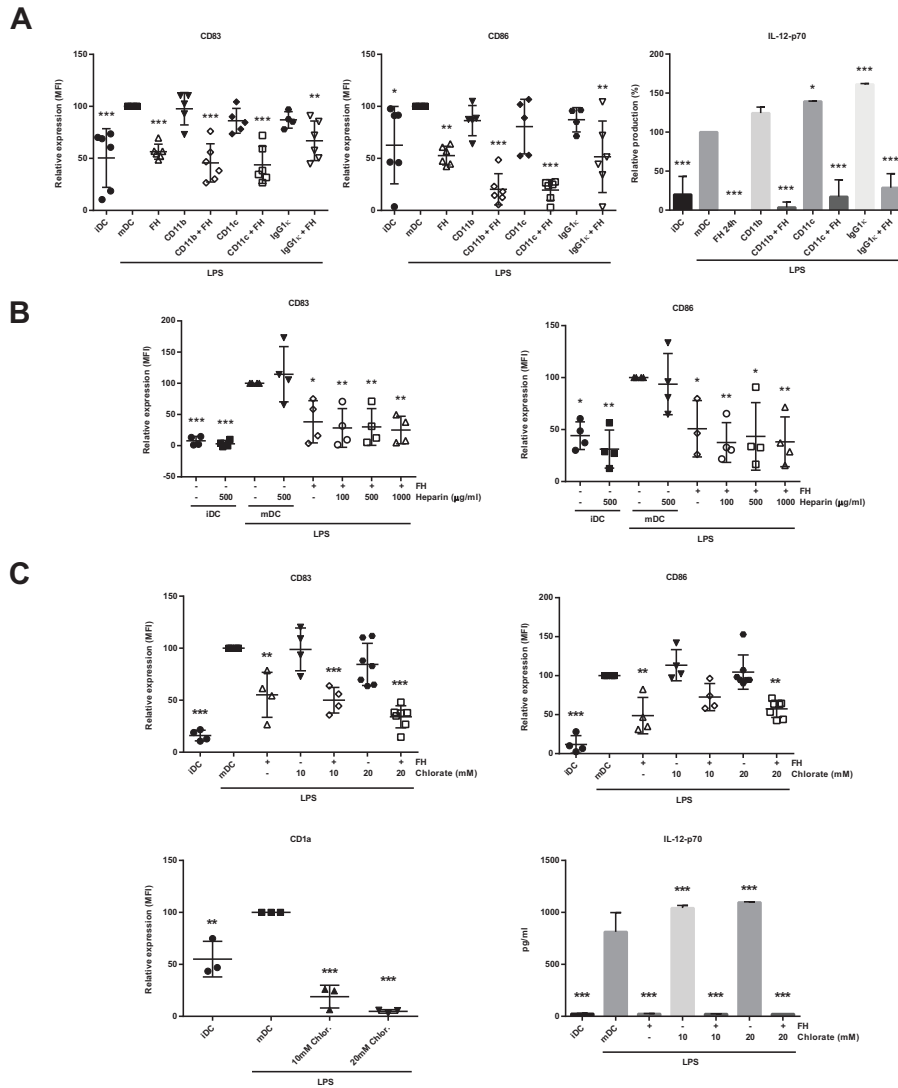


FIGURE S4: FH immunomodulatory activity is mediated neither by CR3 or CR4 complement receptors nor by GAG binding.

(A) CR3/CR4 blocking assay. Human monocytes were pre-incubated for 1 h with anti-human CD11b, anti-human CD11c, or their corresponding IgG1κ mouse isotype control, all at 10 μg/ml, in RPMI 1640 medium without serum, followed by a further co-incubation with FH (5 μg/ml) in complete MoDC differentiation medium for 24 h. Next, the cells were washed and allowed to complete their differentiation and maturation by LPS treatment. (B) Heparin interaction assay. Human MoDCs were co-incubated with FH (5 μg/ml) and/or high molecular weight sodium heparin at the indicated concentrations through their differentiation and maturation process. (C) GAG sulfation inhibition assay. Where indicated, human monocytes were pre-incubated for 3 h with sodium chlorate at the indicated concentrations, followed by co-incubation with FH (5 μg/ml) throughout their MoDC differentiation and maturation process. At the end of the above assays cells were collected, washed, and analyzed by flow cytometry for cell surface expression of CD83, CD86, and CD1a where applicable, obtaining the relative MFI for the different cell surface markers. In the indicated assays, cell culture supernatants were harvested and the presence of IL-12p70 was quantified by ELISA. iDC, untreated, immature MoDCs; mDC, untreated, LPS-matured MoDCs; FH, FH-treated, LPS-matured MoDCs. The results shown are the mean \pm SD from 3-6 independent experiments (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared to mDC).

Assessment of Human Dendritic Cell Antigen Uptake by Flow Cytometry

Ana Luque, Sonia Cárdenas-Brito, Rut Olivar and Josep M. Aran*

Human Molecular Genetics Department, IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

*For correspondence: jaran@idibell.cat

[Abstract] Antigen uptake by dendritic cells is the first key step towards induction of antigen-specific T-cell responses. This flow cytometry-based protocol describes the analysis of dendritic cell uptake of soluble antigens through two different mechanisms: non-specific macropinocytosis (using Lucifer Yellow CH), and receptor-mediated endocytosis (using DQTM Ovalbumin). The protocol is generated based on data presented in Olivar *et al.* (2013).

Materials and Reagents

1. Whole blood
2. RPMI 1640 Medium, GlutaMAXTM (Gibco[®], catalog number: 61870)
3. DPBS without Ca²⁺ and Mg²⁺ (Gibco[®], catalog number: 14190-169)
4. 100x liquid Penicillin-Streptomycin (Gibco[®], catalog number: 15140-122)
5. 200 mM L-Glutamine solution (Gibco[®], catalog number: 25030-024)
6. Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco[®], catalog number: 10270106)
7. Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 026:B6 (10 mg) (Sigma-Aldrich, catalog number: L2654)
8. Lucifer Yellow CH dilithium salt (25 mg) (Sigma-Aldrich, catalog number: L0259)
9. DQTM Ovalbumin (1 mg) (Molecular Probes[®], catalog number: D-12053)
10. Ficoll-Paque PLUS (General Electric Company, catalog number: 17-1440-03)
11. GMP Recombinant Human Interleukin-4 (50 µg, 13 x 10⁶ IU/mg) (Gentaur Molecular Products, catalog number: 04-GMPHuL4-50 µg)
12. Recombinant Human GM-CSF (300 µg, 3.88 x 10⁶ IU/vial) (Gentaur Molecular Products, catalog number: 04-RHUGM-CSF-300 µg)
13. IL-4
14. Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA) (Roche Diagnostics, catalog number: 10735078001)
15. FITC-conjugated anti-CD14 (RMO52) (Beckman Coulter, catalog number: IM0645U)
16. FITC-conjugated anti-IgG2a (7T4-1F5) (Beckman Coulter, catalog number: IM0645U)
17. Perfect-Count MicrospheresTM (Cytognos S.L., catalog number: CYT-PCM-50)
18. NaN₃ (Sigma-Aldrich, catalog number: 71289)

19. FACS buffer (see Recipes)
20. Complete medium (see Recipes)
21. DQ-OVA (1 mg/ml) (see Recipes)
22. Lucifer Yellow (10 mg/ml) (see Recipes)
23. rHuIL-4 (500 IU/ml) (see Recipes)
24. rHuGM-CSF (800 IU/ml) (see Recipes)
25. LPS (1 mg/ml) (see Recipes)

Equipment

1. 15 ml Ficoll-Paque PLUS
2. 60-mm cell culture plates (Corning, catalog number: 15430166)
3. Cytometer tubes (BD Falcon tubes, round-bottom) (Becton, Dickinson and Company, catalog number: 352052)
4. Centrifuge Heraeus Multifuge 3 L-R (Heraeus Holding, catalog number: 75004370)
5. 37 °C, 5% CO₂ cell culture incubator
6. BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, catalog number: 342975)

Software

1. CellQuest Pro software (Becton, Dickinson and Company, catalog number: 643436)

Procedure

1. Dilute 25 ml of buffy coat (initial leukocyte concentrate from a whole blood donation) with the same volume of DPBS.
2. Prepare two 50 ml tubes with 15 ml Ficoll-Paque PLUS. Carefully layer 25 ml of the diluted blood sample on Ficoll-Paque PLUS. Important: When layering the sample do not mix Ficoll-Paque PLUS and the diluted blood sample.
3. Centrifuge at 400 x *g* for 25 min at 18-20 °C. Important: Brakes off.
4. Soak up the white interphase between the diluted plasma fraction and the transparent ficoll fraction with a pipette and transfer it into a fresh tube.
5. Wash twice with DPBS.
6. Resuspend the pellet in 5 ml DPBS.
7. In a cytometer tube mix 3 µl of FITC-conjugated anti-CD14 antibody plus 60 µl DPBS and 20 µl of cellular suspension.
8. Incubate 15-18 min at room temperature.

9. Add 120 μ l DPBS and count the number of CD14⁺ monocytes by flow cytometry using Perfect-Count Microspheres™ according to the manufacturer's instructions.
10. Plate monocytes at 1×10^6 cells/ml in 60-mm culture plates, in RPMI 1640 medium without serum, and allow to adhere for 2 h at 37 °C in 5% CO₂.
11. Remove the non-adherent cells by washing in DPBS. The final population of adherent cells contains 75-80% of monocytes, as demonstrated by flow cytometry of anti-CD14-stained isolates.
12. Generate monocyte-derived DCs by supplementing the monocyte cultures with 1 ml of complete RPMI 1640 medium plus GM-CSF (800 IU/ml) and IL-4 (500 IU/ml).
13. At day 3 add 1ml of complete RPMI 1640 medium plus GM-CSF (800 IU/ml) and IL-4 (500 IU/ml).
14. For DC maturation, at day 5 replace the old medium with fresh complete RPMI 1640 medium plus GM-CSF (800 IU/ml) and IL-4 (500 IU/ml) and stimulate the immature DCs for 48 h with 5 μ g/ml LPS.
15. Harvest the non-adherent cells floating in the culture medium in a 15 ml tube (at day 5 for immature DCs; at day 7 for mature DCs). Add 2 ml DPBS (37 °C), rinse and collect the adhered cells by pipetting. Wash twice more with DPBS and pool both floating and adherent cells. Centrifuge and resuspend the pellet in 500 μ l of complete medium.
16. Prepare two cytometer tubes with 60 μ l of complete medium plus 4 μ l DQ-OVA (stock: 1 mg/ml) at 37 °C or 0 °C.
17. Prepare two cytometer tubes with 60 μ l of complete medium plus 6 μ l Lucifer Yellow CH (stock: 10 mg/ml) at 37 °C or 0 °C.
18. Add 100 μ l of cell suspension ($\sim 2 \times 10^5$ cells/ml) to each cytometer tube.
19. Incubation time: 15 min for DQ-OVA; 120 min for Lucifer Yellow CH. The fluorescence of OVA labeled with BODIPY FL dye (DQ-OVA) is self-quenched until the OVA is taken up via the mannose receptor and degraded only by endolysosomal proteases. Lucifer Yellow CH (LY) is a hydrophilic tracer for fluid-phase macropinocytosis. LY is not degraded and is nontoxic at concentrations up to 6 mg/ml.
20. Stop the incubations by adding 1 ml cold FACS buffer.
21. Wash the cells two times with cold FACS buffer.
22. Analyze the incorporated fluorescence of both immature DCs (Figure 1) and mature DCs using flow cytometry. Compare the histograms and corresponding mean fluorescence intensities (MFI) between cells incubated at 37 °C (specific uptake) and cells incubated at 0 °C (non-specific uptake: passive diffusion...).

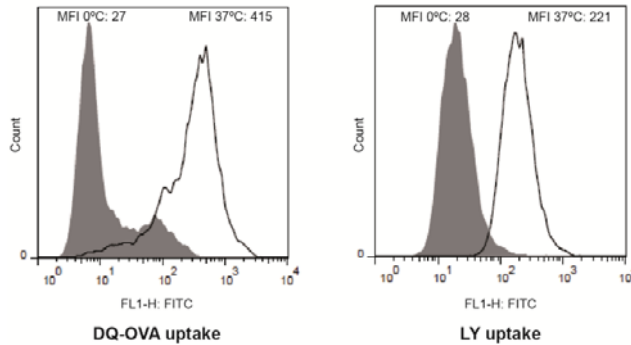


Figure 1. Analysis of the endocytic activity of immature DCs by flow cytometry. The endocytic activity of monocyte-derived immature DCs was assessed measuring the uptake of the fluorescent reporters DQ-OVA (receptor-mediated endocytosis) and Lucifer Yellow CH (fluid-phase endocytosis). Representative histograms are shown. Dye uptake controls are displayed in gray. The median fluorescence intensities (MFI) for the different fluorescent cell populations are indicated in each histogram.

Recipes

1. FACS buffer (500 ml)
 - Mix 5 g BSA and 0.5 g NaN_3 with 500 ml 1x DPBS
 - Filter sterilize (0.45 μm)
 - Stored at 4 °C
2. Complete medium
 - RPMI 1640 medium, GlutaMAX™
 - 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin
 - 100 IU/ml penicillin
 - 2 mM L-glutamine
 - 10% heat-inactivated FBS
 - 800 IU/ml GM-CSF
 - 500 IU/ml IL-4
 - Stored at 4 °C
3. DQ-OVA (1 mg/ml)
 - A 1 mg/ml solution can be prepared by dissolving the contents of one vial in 1 ml of DPBS.
 - Once reconstituted, the solution should be stored at -20 °C, protected from light.
4. Lucifer Yellow (10 mg/ml)

- A 10 mg/ml solution can be prepared by dissolving the contents of one vial in 2.5 ml of dH₂O. Once reconstituted, the solution should be stored at 4 °C, protected from light.
5. rHuIL-4 (500 IU/ml)
A 500 IU/ml solution can be prepared by dissolving the contents of one vial in 500 µl of dH₂O. Once reconstituted, the solution should be stored at -80 °C.
 6. rHuGM-CSF (800 IU/ml)
A 800 IU/ml solution can be prepared by dissolving the contents of one vial in 2 ml of dH₂O. Once reconstituted, the solution should be stored at -80 °C.
 7. LPS (1 mg/ml)
A 1 mg/ml solution can be prepared by dissolving the contents of one vial in 1 ml of DPBS. Once reconstituted, the solution should be stored at -20 °C.

Acknowledgments

This protocol was adapted from the previously published study, Olivar *et al.* (2013), and was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, Spain), through grant PI10/1073 from the “Fondo de Investigaciones Sanitarias” (FIS-ISCIII), and from 2009SGR1490 (Generalitat de Catalunya) to JMA. JMA is sponsored by the “Researchers Consolidation Program” from the SNS-Dpt. Salut Generalitat de Catalunya (Exp. CES06/012).

References

1. Olivar, R., Luque, A., Naranjo-Gomez, M., Quer, J., Garcia de Frutos, P., Borrás, F. E., Rodríguez de Córdoba, S., Blom, A. M. and Aran, J. M. (2013). [The α7B0 isoform of the complement regulator C4b-binding protein induces a semimature, anti-inflammatory state in dendritic cells.](#) *J Immunol* 190(6): 2857-2872.