



Universidad de Valladolid

Instituto de Biología y Genética Molecular

DEP. Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

TESIS DOCTORAL:

**REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS
POR PATRONES MOLECULARES DE LA PARED DE
HONGOS**

Presentada por **Cristina Municio Rueda** para optar al grado de
doctora por la **Universidad de Valladolid**

Dirigida por:

Dr. Mariano Sánchez Crespo

Dra. M^a Nieves Fernández García

Índice

Resumen	11
Introducción	15
1. El sistema inmunitario.....	15
1.1 La inmunidad innata y adaptativa.....	15
1.2 Células del sistema inmune.....	16
• Monocitos	16
• Células dendríticas (CD)	16
• Macrófagos (MØ)	18
2. Reconocimiento de Patógenos	19
2.1 Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)	19
• Receptores tipo Toll (TLR)	20
• Receptores de lectina tipo-C (CLRs)	21
2.2 Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)	26
3. Mediadores lipídicos	28
4. La producción y regulación de las citoquinas	30
4.1 Interlequina 1β (IL-1β) y el inflamasoma.....	31
4.2 Interlequina 10 (IL-10).....	31
4.3 Interlequina 12 p70 (IL-12 p70).....	32
4.4 Interlequina 23 (IL-23).....	33
• La regulación de IL-12/IL-23	33
5. Regulación de la transcripción génica: factores de transcripción.....	34
5.1 NF-κB.....	35
5.2 CREB y sus coactivadores	36
5.3 NOTCH.....	38
Objetivos.....	43

Materiales y métodos.....	47
1. Cultivos celulares.....	47
1.1 Obtención de monocitos humanos.....	47
1.2 Obtención de macrófagos.....	47
1.3 Obtención de células dendríticas.....	48
1.4 Obtención células derivadas de médula ósea de ratón.....	49
2. Preparación de extractos celulares y Western Blot.....	49
2.1 Obtención de extractos celulares.....	49
2.2 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa.....	50
3. ELISA.....	52
4. Obtención de extractos nucleares.....	52
5. Análisis de la expresión génica.....	52
5.1 Extracción del ARN total.....	52
5.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	52
5.3 Análisis mediante PCR convencional.....	53
5.4 Análisis mediante PCR a tiempo real.....	53
6. Inmunoprecipitación.....	55
7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	55
7.1 Fragmentación de la cromatina.....	55
7.2 Visualización de la cromatina.....	56
7.3 ChIP.....	56
8. Citometría de flujo.....	57
8.1 Expresión de antígenos en la membrana plasmática.....	57
8.2 Ensayos de fagocitosis.....	58
9. Ensayo de liberación de ácido araquidónico (AA).....	58
10. Preparación de los diferentes estímulos.....	58

• Obtención de suero anti-ovoalbúmina	58
• Inmunocomplejos de IgG-ovoalbúmina.....	59
• <i>Zymosan A</i>	59
• Unión de iC3b a los estímulos (opsonización)	59
Resultados	63
1. Objetivo: Caracterizar la respuesta de las células mieloides a los β-glucanos en función del entorno y el grado de diferenciación celular	63
1.1 Diferenciación de las células mieloides y expresión de sus receptores de membrana.....	63
1.2 Fagocitosis del <i>zymosan</i>	67
1.3 Producción y expresión de mediadores pro-inflamatorios	68
○ Liberación de ácido araquidónico (AA)	69
○ Producción de prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	70
○ Expresión de COX-2	73
1.4 Patrón de liberación de citoquinas.....	75
1.5 Proteínas adaptadoras y activación de NF- κ B	77
○ Proteínas adaptadoras y fosforilaciones en tirosina.....	77
○ Activación de la ruta NF- κ B	79
2. Objetivo: Estudiar la regulación de la producción de IL-10 en los monocitos derivados a células dendríticas	81
2.1 Producción de IL-10 por diferentes estímulos.....	81
2.2 Efecto de la modulación farmacológica sobre la producción de IL-10.....	83
○ Balance NF- κ B y CREB.....	84
○ Implicación del calcio	85
○ Las rutas MAP/ERK y p38MAPK	86
2.3 Papel de los diferentes factores de transcripción en la regulación de <i>il10</i>	87
3. Objetivo: Estudio del balance IL-12 p70/IL-23 en los monocitos derivados a células dendríticas	94

3.1 Producción de IL-23 versus IL-12	94
3.2 Regulación transcripcional de <i>il23p19</i>	95
3.3 Efecto inhibitorio del <i>zymosan</i> sobre la producción de IL-12 <i>p35</i> inducida por la combinación LPS+IFN- γ	99
Discusión.....	107
Objetivo 1: Caracterizar la respuesta de las células mieloides a β os -glucanos en función del entorno y el grado de diferenciación celular.	107
Objetivo 2: Estudiar la regulación de la producción de IL-10 en los monocitos derivados a células dendríticas.....	112
Objetivo 3: Estudio del balance IL-12 <i>p70</i> /IL-23 en los monocitos derivados a células dendríticas..	117
Conclusiones	123
Bibliografía.....	127
Anexo 1	141
Publicaciones relacionadas con la tesis	145

Resumen

Resumen

Las células presentadoras de antígenos son las encargadas del reconocimiento de los patógenos y de iniciar la respuesta inmune adaptativa. Estas células son claves para desencadenar una respuesta correcta por parte del hospedador frente a una infección. Mediante el reconocimiento de los patógenos a través de receptores específicos modulan el tipo de respuesta en función de las citoquinas liberadas para polarizar las células T. El reconocimiento y la erradicación de los hongos patógenos dependen de los receptores expresados y del patrón de liberación de citoquinas por las células presentadoras de antígenos.

Los macrófagos y las células dendríticas humanas expresan un patrón de expresión de receptores de membrana que se determina por las señales que reciben del entorno. En comparación con sus células precursoras, los monocitos de la sangre periférica, las células dendríticas obtenidas por diferenciación en presencia de GM-CSF e IL-4 presentan mayor expresión de receptores de lectina tipo C. Por su parte, los macrófagos diferenciados en presencia de M-CSF presentan mayor cantidad de dectin-1, dectin-2, receptor de manosa y DC-SIGN comparados con los macrófagos que se diferencian con suero humano fresco. Esta expresión diferencial condiciona a las células para generar respuestas diferenciadas, que en algunos casos, como es la ruta de las ciclooxygenasas pueden mostrar un gran sinergismo entre distintos estímulos.

La regulación del balance de las citoquinas IL-10, IL-23 e IL-12 p70 es crucial para modular de forma precisa la respuesta al patógeno. En presencia de *zymosan*, un análogo de la pared celular de los hongos, las células dendríticas liberan preferentemente IL-10 e IL-23 y escasa cantidad de IL-12 p70. La producción de IL-10 se explica por un aumento de la transcripción de *il10* dependiente de CRE por un complejo supramolecular en el promotor que incluye CREB y sus co-activadores CBP y CRTC/TORC2 junto con factores de inicio de la transcripción. En el caso de la regulación de promotor de IL-23, el *zymosan* favorece la unión de c-Rel, un miembro de la familia NF- κ B al promotor de *il23p19* junto a la kinasa MSK1, induce la fosforilación de la histona H3 y la unión del co-activador CBP. En el caso del promotor proximal de *il12p35*, el *zymosan* activa la expresión de proteínas represoras de la familia NOTCH, como Hey 1 y Hes 1, que se unen a las *E-boxes* presentes en el promotor y forman un complejo inhibitor de la transcripción de *il12p35* que incluye también a la proteína TLE e histonas deacetilasas de clase III, y conduce a la desacetilación de la histona H3.

En conclusión, el *zymosan* es un potente inductor de producción de IL-10 e IL-23 mediante un mecanismo de regulación transcripcional, al tiempo que inhibe la producción de IL-12 p70. La incorrecta regulación de este equilibrio de producción de citoquinas puede conducir a deficiencias en el mecanismo de eliminación de patógenos o a la aparición de autoinmunidad.

Introducción

Introducción

1. El sistema inmunitario

El sistema inmunitario está constituido por un conjunto de células con capacidad para detectar y eliminar los microorganismos patógenos que perjudican la supervivencia del huésped. En el sistema inmune participan de forma coordinada elementos celulares y mecanismos moleculares capaces de responder eficientemente a la infección. En el caso de los mamíferos, se puede diferenciar entre inmunidad innata y adaptativa, aunque existe una estrecha relación entre ambas (Medzhitov and Janeway, 1998).

1.1 La inmunidad innata y adaptativa

El sistema inmune innato es un sistema universal de defensa frente a patógenos muy conservado en los diferentes seres vivos y constituye la primera línea de defensa del huésped. Incluye componentes celulares (células epiteliales, monocitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células *Natural Killer* [NK]) y sistemas de activación como los sistemas del complemento, de la coagulación, fibrinolítico y de las citoquinas. Para la detección de los gérmenes invasores, las células emplean un limitado número de receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) codificados en la línea germinal en sus configuraciones definitivas. Estos PRR reconocen patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMPs) y señales endógenas asociadas al daño tisular (DAMPs). El sistema inmune adaptativo es altamente específico e incluye componentes celulares (linfocitos T y B) y humorales (anticuerpos). La especificidad de reconocimiento se basa en un amplio repertorio de receptores generados por reordenamientos génicos y expresados en los linfocitos, que permiten un reconocimiento específico del antígeno. Las células presentadoras de antígenos (APCs), en especial las células dendríticas y los macrófagos, tienen un papel fundamental en la conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En consecuencia, la inmunidad innata adquiere la función de iniciar, estimular y polarizar la respuesta adaptativa con objeto de eliminar el patógeno y minimizar los daños causados al huésped (Medzhitov, 2007).

1.2 Células del sistema inmune

El sistema inmunitario está compuesto por un grupo diverso de células con un origen común en las células hematopoyéticas. Estos precursores pueden dar lugar a células progenitoras mieloides y linfoides que originarán los granulocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos o linfocitos B, T y células NK respectivamente.

- **Monocitos**

Los monocitos son células efectoras que están presentes en la médula ósea, en el bazo y en el torrente sanguíneo. Los monocitos de sangre periférica tienen una vida media corta y contribuyen a la renovación de los macrófagos y de las células dendríticas tisulares. Este proceso está controlado por citoquinas que actúan como factores de crecimiento y diferenciación. Los monocitos en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleuquina (IL)-4 generan células dendríticas, mientras que los macrófagos se obtienen cuando la diferenciación se realiza en presencia de GM-CSF o M-CSF (Auffray *et al.*, 2009; Geissmann *et al.*, 2010).

- **Células dendríticas (CD)**

Las células dendríticas son células mieloides derivadas de precursores hematopoyéticos especializadas en la captación, procesamiento, transporte y presentación de antígenos a los linfocitos T (Steinman y Cohn, 1973; Steinman, 1991). Son APCs profesionales, porque son las únicas eficaces en la activación de linfocitos T vírgenes (T *naive*) debido a su elevada expresión de moléculas MHC, co-estimuladoras y de adhesión de superficie. Las células dendríticas están presentes tanto en los órganos linfoides como en casi todos los demás tejidos linfoides (Romani *et al.*, 2002). Las células dendríticas humanas son una población muy heterogénea en cuanto a fenotipo, localización y función, y se pueden clasificar según su linaje en células dendríticas plasmocitoides, localizadas en los nódulos linfáticos, bazo, timo, médula ósea y sangre periférica y que participan en inmunidad anti-viral, y mieloides, presentes en casi todos los tejidos (Blanco *et al.*, 2008; Geissmann *et al.*, 2010).

En su etapa inmadura las células dendríticas mieloides tienen una alta capacidad fagocítica y residen en los tejidos periféricos donde actúan como centinelas. Cuando entran en contacto con un patógeno, adquieren el antígeno e inician la migración a los ganglios linfáticos. Durante esta migración la célula sufre un proceso de maduración que incluye el procesamiento del antígeno capturado y la presentación de los péptidos en la superficie celular a través de las moléculas MHC a los linfocitos T *vírgenes* en los ganglios linfáticos. En esta etapa, las células

dendríticas son capaces de producir gran cantidad de citoquinas que, dependiendo del patógeno detectado, inducirán la diferenciación de las células T colaboradoras (*T helper*, Th) a células efectoras de tipo: Th1 (productoras de interferón (IFN)- γ y eficaces en la eliminación de patógenos intracelulares), Th2 (productoras de IL-4 y efectivas en la eliminación de patógenos extracelulares), Th17 (productoras de IL-17 e implicadas en respuestas autoinmunes), o a Treg (células T reguladoras implicadas en procesos inmunosupresores) (Banchereau *et al.*, 2000) (Figura 1).

Las células dendríticas se diferencian principalmente de los macrófagos por su eficiente capacidad para presentar los antígenos a las células T. Por este motivo, algunos autores sugieren que no serían una población diferente de los macrófagos ya que proceden de un precursor común y responden a los mismos factores de crecimiento. Además, no existen marcadores específicos ni funciones únicas que justifiquen la distinción (Hume, 2008).

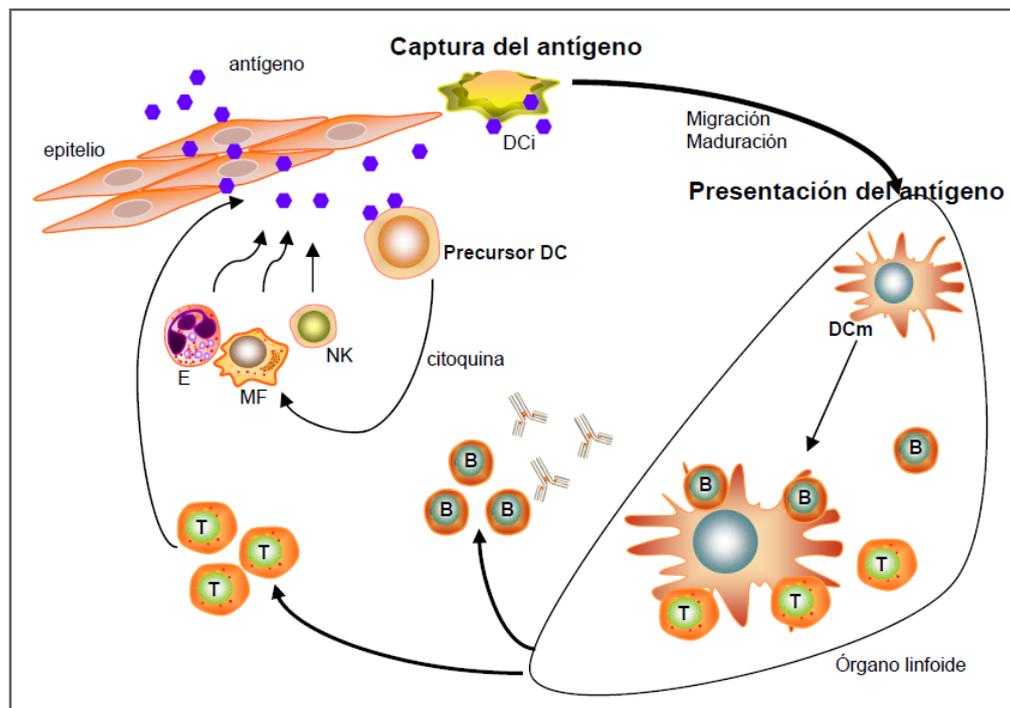


Figura 1. Ciclo de vida de las células dendríticas. Las células dendríticas generadas por la diferenciación de progenitores de médula ósea llegan a través del sistema circulatorio a los tejidos periféricos, donde residen como células inmaduras hasta que reciben señales que promueven su migración y maduración. Las células maduras migran a los ganglios linfáticos donde activan y polarizan la respuesta de las células T. Figura adaptada de Banchereau *et al.*, 2000.

- **Macrófagos (MØ)**

Los macrófagos son células derivadas de precursores hematopoyéticos con gran capacidad fagocitaria. En condiciones normales están presentes en todos los tejidos y mantienen la homeostasis y la integridad de los tejidos mediante la limpieza de los desechos celulares y de las células apoptóticas gracias a su alto potencial fagocítico y degradativo y a su capacidad para producir factores de crecimiento. Además de actuar como centinelas, tienen la capacidad de presentar antígenos a las células T durante la respuesta inmunitaria adaptativa, pero de forma menos eficiente que las células dendríticas. Aunque la mayoría de los macrófagos presentes en los tejidos derivan de los monocitos circulantes, existen pruebas de que pueden proliferar localmente en estado basal o en respuesta a daños específicos de tejido (Gordon y Taylor, 2005).

Los macrófagos se diferencian morfológica y fenotípicamente dependiendo del tejido en el que se encuentren y el entorno que los rodee. Expresan gran variedad de receptores de reconocimiento y presentan un metabolismo muy activo, siendo capaces de secretar gran cantidad de moléculas como enzimas proteolíticas y bactericidas, quimiocinas y citoquinas. También son capaces de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), de nitrógeno y metabolitos derivados del ácido araquidónico (Gordon y Martínez, 2010).

Emulando la literatura de las células T, los macrófagos se han clasificado como M1, para designar a los macrófagos activados clásicamente y cuyos estímulos prototípicos son IFN- γ y LPS, y M2 o macrófagos activados alternativamente, que a su vez, han tenido que ser divididos en subgrupos debido a la gran diversidad de estímulos que provocan una activación “no clásica”: M2a (después de exposición a IL-4 o IL-13), M2b (inmuno-complejos [IC] en combinación con IL-1 β o LPS) y M2c (IL-10, TGF- β o glucocorticoides) (Martínez et al., 2008) (Figura 2, panel izquierdo). Los macrófagos M1 tienen propiedades microbicidas y promueven las respuestas Th1 dependientes de IL-12 p70, mientras que los M2 están asociados a respuestas de tipo Th2 con un papel en la resolución de la inflamación gracias a la alta capacidad fagocítica y la síntesis de factores tróficos, acompañados por la reducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Varin y Gordon, 2009).

Algunos autores han propuesto otra clasificación de macrófagos activados de acuerdo con sus funciones: defensa del organismo, reparación de heridas y regulación inmunitaria. Además de estos tres grupos es posible definir numerosos estados funcionales intermedios, lo que indica que existe un amplio rango de estados de activación de los macrófagos (Mosser y Edwards, 2008) (Figura 2, panel derecho).

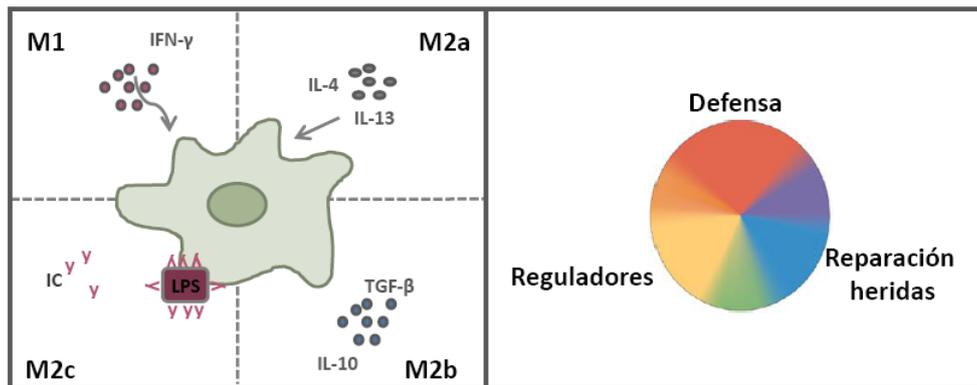


Figura 2. Sistemas de clasificación de los macrófagos. Los macrófagos pueden clasificarse en función del estímulo responsable de su diferenciación (panel izquierdo) o de su función efectora principal (panel derecho). Figura adaptada de Mosser y Edwards, 2008.

2. Reconocimiento de Patógenos

En los últimos 20 años ha cambiado nuestro conocimiento acerca del funcionamiento del sistema inmune debido a los conceptos introducidos por Janeway que permiten integrar la inmunidad innata y adaptativa en un mecanismo general en el que el reconocimiento de patógenos por las células del sistema inmune innato es el paso inicial e indispensable para el posterior reconocimiento de lo “propio” frente a lo “no propio” (Janeway, 1989). Estudios posteriores han permitido establecer que los receptores específicos del sistema inmune innato, que se expresan de forma constitutiva, son capaces de reconocer moléculas muy conservadas evolutivamente que se encuentran en la superficie de los patógenos, los PAMPs (Medzhitov, 2007).

2.1 Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)

Cuando se detecta la infección microbiana por los PRRs se desencadena una cascada de señalización intracelular que conduce a la expresión de genes codificantes para quimiocinas, citoquinas y otros mediadores inmunes. El reconocimiento del patógeno puede ocurrir de una forma directa, a través de receptores de membrana y citoplasmáticos, o bien de forma indirecta mediante los PRRs solubles. En los mamíferos existe gran variedad de PRRs, los mejor caracterizados son los receptores de membrana tipo *Toll* (TLRs), capaces de reconocer componentes de la pared celular bacteriana, proteínas virales o ácidos nucleicos. En los últimos años, se han descrito otros receptores de tipo no-TLR que desempeñan un papel determinante en la inmunidad anti-fúngica, la familia de los receptores de lectina tipo-C (CLRs)

(Geijtenbeek et al., 2004; Ishii et al., 2008). Existen también receptores localizados en el citoplasma, los tipo NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain* [NOD-like receptors] NLRs) que actúan como sensores intracelulares frente a peptidoglicanos bacterianos y los tipo RIG-I (*Retinoic-acid-Inducible Gene 1*, RLRs) que reconocen ácidos nucleicos virales y responden generando IFN de tipo I (Jeong y Lee, 2011).

- **Receptores tipo Toll (TLR)**

Fueron los primeros PRR identificados, se describieron en *Drosophila melanogaster* como moduladores del desarrollo embrionario y como factores implicados en la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas (Anderson et al., 1985). Posteriormente, se describieron receptores homólogos en mamíferos, denominándolos receptores tipo Toll. Esta familia de receptores se expresa de forma predominante en APCs y desde el punto de vista de su estructura son glicoproteínas transmembrana de tipo I localizadas en la membrana plasmática (TLR1, 2, 4-6, 10 y 11) o en la membrana endosomal (TLR3, 7, 8 y 9). Los humanos expresan los TLRs del 1 al 10 y en el ratón están descritos los TLRs 1-9 y 11-13. Se caracterizan por poseer una secuencia extracelular con dominios ricos en leucina que intervienen en el reconocimiento del patógeno y un dominio intracelular homólogo al receptor de la IL-1 (IL-1R) llamado TIR (*Toll interleukin-1 receptor*), necesario para la señalización (Medzhitov, 2001). Los ligandos de TLR incluyen lipoproteínas, lipopéptidos y mananos (TLR2), ARN de doble hebra (TLR3), LPS (TLR4), flagelina (TLR5), ARN de hebra sencilla (TLR7), ADN rico en CpG (TLR9) y profilina (TLR11) (Gantner et al., 2003).

Después de la unión al ligando, los receptores forman homo- o heterodímeros y reclutan moléculas adaptadoras como MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) utilizada por todos los TLRs excepto TLR3. TRIF (*TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon β*), utilizada solo por TLR3 y TLR4; MAL/TIRAP (*MyD88-adaptor-like protein/TIR domain-containing adapter protein*), molécula adaptadora esencial para la señalización de TLR2 y TLR4 funcionando como un nexo entre MyD88 y el TLR. TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) que funciona como conector entre TLR y TRIF. Estas moléculas adaptadoras actúan como mensajeros que activan quinasas (complejo IKK, MAPKs, TBK1, RIP-1) y factores de transcripción como NF- κ B (*nuclear factor κ B*), AP-1 (*activator protein-1*) o IRF (*IFN regulatory factor*)-3. (Akira et al., 2006; Jeong y Lee, 2011) (Figura 3).

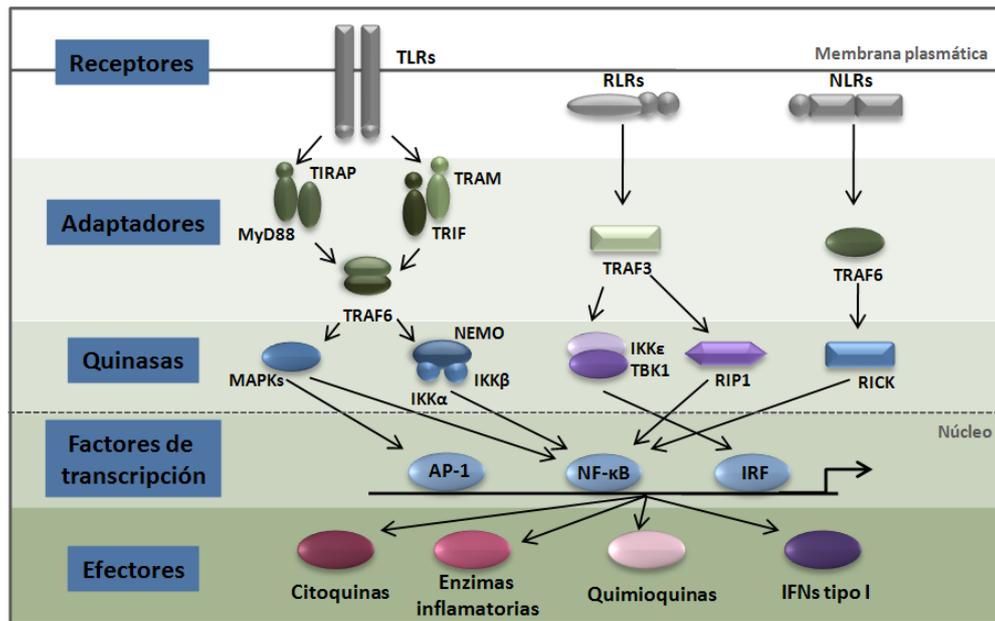


Figura 3. Vías de señalización de los PRRs. Los TLRs están generalmente presentes en la membrana, los RLRs y NLRs se localizan en el citosol. Los TLRs señalizan a través de Mal/TIRAP y MyD88 o TRAM/TRIF para activar las quinasas. Los RLRs usan IPS-1 y TRAF6 como moléculas adaptadoras y los NLRs activan las vías a través de TRAF6. Las señales desde los PRRs conducen a la activación de quinasas como MAPKs, IKKs, RIP-1 y RICK, que activan los factores de transcripción AP-1, NF- κ B e IRF que inducen la expresión de genes codificantes para citoquinas, enzimas inflamatorias e IFNs. Figura adaptada de Jeong y Lee, 2011.

- **Receptores de lectina tipo-C (CLRs)**

Son una gran familia de proteínas caracterizada por la presencia de uno o más dominios de lectina tipo-C (CTLDs). La familia se divide en 17 grupos dependiendo de la filogenia y la organización de los dominios (Zelensky y Gready, 2005). Los CLRs se describieron como proteínas de unión a carbohidratos dependientes de Ca^{2+} . Su actividad se lleva a cabo por el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) (Drickdamer, 1988), aunque actualmente se conocen muchos CLRs que no unen ligandos de carbohidratos ni son dependientes de Ca^{2+} (Drickdamer, 1993). A pesar de la presencia de un dominio altamente conservado, los CLRs son funcionalmente diversos y participan en diferentes procesos como adhesión celular, integración y remodelación tisular, activación de plaquetas y del complemento, reconocimiento de patógenos, endocitosis y fagocitosis. Entre los CLRs existen lectinas solubles como la lectina de unión a manosa (MBL) o las proteínas del surfactante pulmonar A y D (SP-A y SP-D), y lectinas de membrana que se subdividen en dos grupos en función de la localización del extremo N-terminal. Las lectinas de tipo I presentan el extremo N-terminal en el exterior celular y pueden tener varios dominios CTLD, como el receptor de manosa (MR o CD206). Las lectinas de tipo II o receptores de asialoglicoproteínas presentan el

extremo N-terminal en el interior celular y a su vez, pueden subdividirse en otras dos subfamilias: DCIR (*DC immunoreceptor*), dependientes de Ca^{2+} para su unión al ligando y dectin-1 (*DC-associated C-type lectin-1*), independientes de Ca^{2+} (Geijtenbeek y Grinhuis, 2009). Muchos de estos receptores como el MR, dectin-1, dectin-2, DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin*) y las colectinas están implicados en la inmunidad anti-fúngica: median la unión, captación y eliminación del patógeno, además de contribuir al inicio y/o modulación de la respuesta inmune adaptativa. Algunos CLRs como DC-SIGN y DCIR inducen vías de señalización que modulan la transcripción o la modificación post-transcripcional de la expresión de genes inducida por TLR, pero no parecen capaces de inducir expresión génica en ausencia de la señal de los TLR (Gringhuis et al., 2007; Geijtenbeek y Grinhuis, 2009). En cambio, otros CLRs como dectin-1, dectin-2 o mincle, inducen la expresión génica de forma independiente a los TLRs (Rogers et al., 2005; Sato et al, 2006; Geijtenbeek y Grinhuis, 2009).

MR: es una lectina de tipo I, que puede considerarse como el elemento principal de una familia que incluye los receptores Endo-180, DEC-205 o el receptor de fosfolipasas secretadas. Contiene en su dominio extracelular ocho CTLDs, una estructura de patógenos con alto contenido en manosa a través del CRD y participa en la adhesión intercelular (McGreal et al, 2004). Se expresa principalmente en células dendríticas, macrófagos y células epiteliales linfoides y hepáticas (Kerrigan y Brown, 2009).

DC-SIGN: se caracterizó originalmente como un receptor de interacción con moléculas de adhesión intercelular (ICAM)-3, mediando las interacciones entre las células dendríticas y las células T. Reconoce gran cantidad de patógenos a través de estructuras con alto contenido en manosa y fucosa. DC-SIGN es capaz de discriminar entre ligandos por los grupos primarios de manosa y por los sitios de unión secundarios, que reconocen carbohidratos con una geometría diferente proporcionada por la unión con la porción del monosacárido primario. La afinidad para unir al ligando es una de las principales diferencias entre DC-SIGN y MR (Guo et al., 2004). DC-SIGN activa la quinasa RAF1 (*v-raf-leukemia viral oncogen homolog 1*) que induce la fosforilación de la subunidad de NF- κ B p65 en la serina 276, que interviene en la regulación de la transcripción de distintas citoquinas (Gringhuis et al., 2007).

Dectin-2 o CLEC6a: se identificó inicialmente en las células de Langerhans y se expresa en macrófagos tisulares, algunos grupos de células dendríticas y monocitos. Presenta un dominio CRD con un motivo EPN (glutamato-prolina-asparagina), la unión al ligando es

dependiente de Ca^{2+} y se une a carbohidratos con alto contenido en manosas como los que exponen las hifas de *Candida albicans* (McGreal *et al.*, 2006; Graham y Brown, 2009) o los alérgenos presentes en el polvo (Barrett, 2009). Presenta una cola citoplasmática corta sin motivos de señalización, por lo que para iniciar el proceso de señalización intracelular precisa unirse a moléculas adaptadoras con motivos ITAM, como la cadena γ y del receptor Fc o DAP12 (*DNAX-activating protein 12*) (Sato *et al.*, 2006). En el receptor humano existe un procesamiento alternativo que da lugar a varias isoformas (Kanazawa *et al.*, 2004). Se ha sugerido que una de las isoformas que carece de gran parte del dominio transmembrana puede ser una proteína secretada que funciona como antagonista del receptor (Gavino *et al.*, 2005).

Dectin-1 o CLEC7a: es una lectina de tipo II que se expresa abundantemente en células mieloides y reconoce β -(1-3)-glucanos de las paredes celulares de diferentes especies de hongos (Taylor *et al.*, 2007) y algunos ligandos de micobacterias (Reid *et al.*, 2009). Dectin-1 tiene actividad antimicrobiana (fagocitosis y producción de especies reactivas de oxígeno) e inflamatoria (producción de citoquinas y quimiocinas). Consta de un único dominio CTLD que le permite reconocer carbohidratos. Se conecta a través de una pequeña región denominada cuello y de un dominio transmembrana, con una cola intracelular de unos 40 aminoácidos donde presenta un dominio tipo ITAM (hemITAM) implicado en la activación celular (Brown y Gordon, 2001; Rogers *et al.*, 2005) (Figura 4). El gen que codifica el receptor de ratón sufre un empalme alternativo en el exón 3 generando dos isoformas de dectin-1 que se diferencian por la ausencia o presencia del cuello (Heinsbroek *et al.*, 2006). En cambio, el receptor humano genera dos isoformas mayoritarias (A y B) y seis minoritarias (C-H). Las isoformas mayoritarias son las únicas capaces de reconocer el ligando y difieren por la presencia o no del cuello (Willment *et al.*, 2001). La isoforma A presenta un sitio de N-glicosilación en el cuello que contribuye a su expresión en superficie y a su función. Tanto en ratón como en humano, la isoforma B es la mayoritaria, sin embargo, se ha demostrado que a bajas temperaturas esta isoforma se une con baja afinidad a *zymosan* indicando una diferente funcionalidad (Heinsbroek *et al.*, 2006). Las isoformas C-H han sido poco estudiadas, pero algunos estudios apuntan a que son formas solubles no secretadas que se encuentran en el citoplasma asociadas a otras proteínas, como es el caso de la isoforma E (Xie *et al.*, 2006). Algunos estudios sugieren que la unión cooperativa de dímeros de dectin-1 une de forma más eficiente las moléculas de β -glucano (Brown *et al.*, 2007).

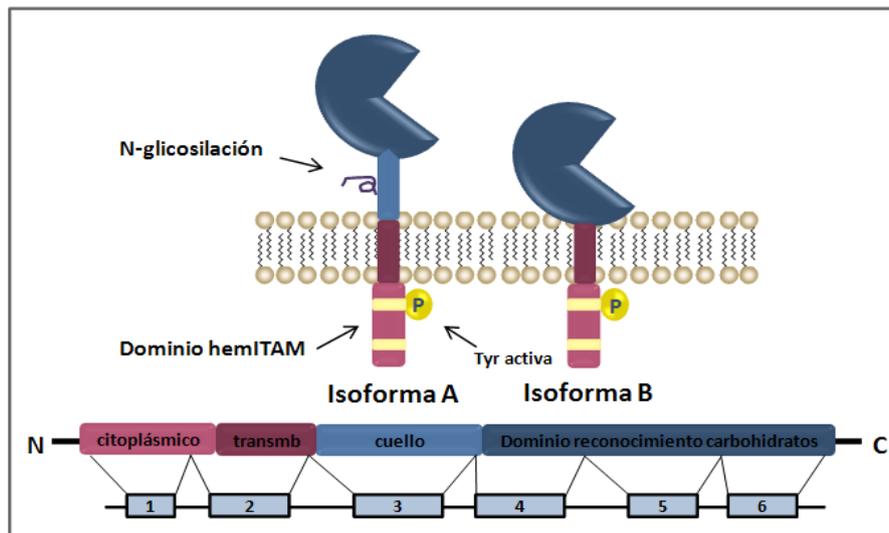


Figura 4. Estructura génica de dectin-1. En el esquema de la parte inferior se representan los exones que codifican para cada una de las regiones que forman dectin-1 en las dos isoformas expresadas mayoritariamente.

Existen distintos tipos de estímulos que regulan la expresión de dectin-1. Aumentan la expresión del receptor el GM-CSF, IL-4 y la IL-13, y la disminuyen la IL-10 y el LPS (Willment *et al.*, 2003). Cuando se une a β -glucanos, dectin-1 desencadena la señalización celular mediante su motivo tipo ITAM, cuya fosforilación por quinasas de la familia Src permite el reclutamiento de la tirosina quinasa de bazo (Syk). Syk se une a dectin-1 mediante sus dominios de homología Src 2 (SH2), pero solo participa la Tyr proximal del dominio ITAM, que por esta razón se tiende a denominar hemITAM. Se ha propuesto que Syk une cada uno de sus dominios SH2 a un monómero de dectin-1 (Rogers *et al.*, 2005). La activación de Syk hace que CARD9 (*caspase recruitment domain 9*) (Goodridge *et al.*, 2009) se una al complejo BCL10-MALT1 (*B-cell leukemia/lymphoma 10* y *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*) para la activación de NF- κ B, así como la activación de numerosas MAPKs (*mitogen activated protein kinases*) y NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (Goodridge *et al.*, 2007). Además de la activación de la vía canónica de NF- κ B, que incluye p65 y c-Rel, dectin-1 puede activar la vía alternativa a través de RAF1 (Gringhuis *et al.*, 2009) (Figura 5).

La señalización de dectin-1 puede colaborar con la iniciada por otros receptores, como TLR2 (Gantner *et al.*, 2003), dando lugar a una amplificación de la señal (Drummond *et al.*, 2011). La vía independiente de Syk, RAF1, parece necesaria para la interacción entre la señalización de TLR y dectin-1 por la inducción de la acetilación de p65 y la represión de RelB inducida por Syk (Gringhuis *et al.*, 2009). A pesar de la capacidad de dectin-1 de unir polímeros

solubles y particulados de β -glucanos, las vías de señalización se activan solo cuando se une a estímulos particulados (tamaño $\geq 0.3\mu\text{m}$). Estas partículas son reconocidas por los receptores dectin-1 agrupados en una zona de la membrana donde quedan excluidas las tirosinas fosfatasas CD45 y CD148. A este modelo se le denomina “sinapsis fagocítica”, un mecanismo por el que los receptores del sistema inmune pueden distinguir el contacto directo con el microbio e iniciar la respuesta más adecuada (Goodridge *et al.*, 2011).

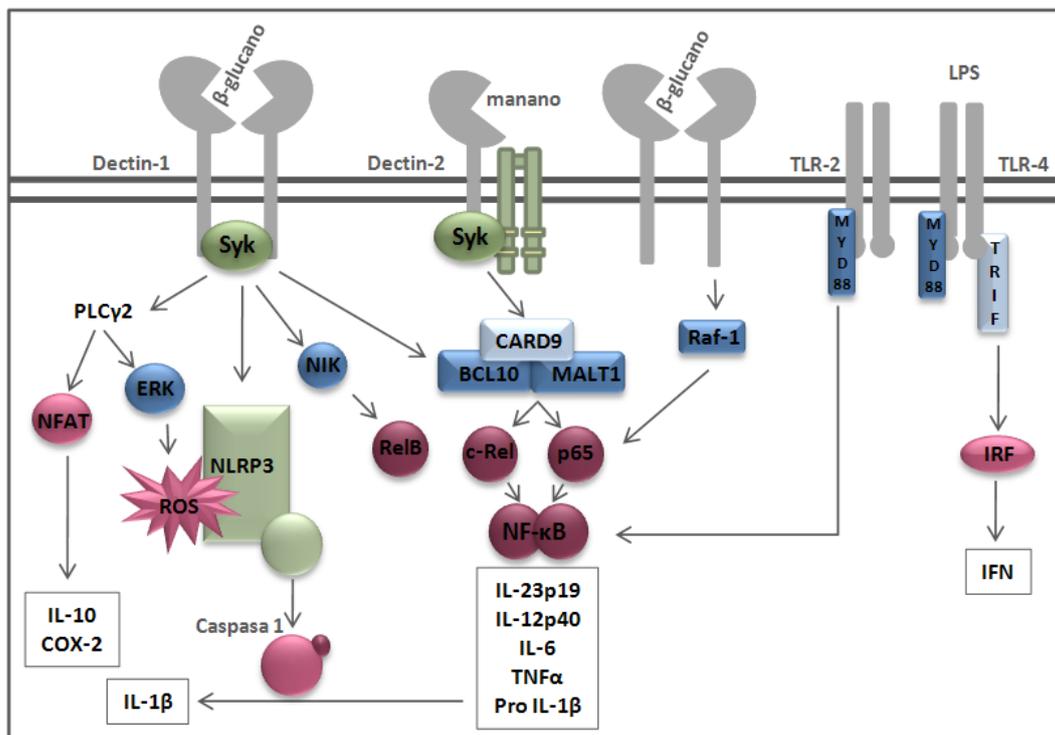


Figura 5. Principales vías de señalización de dectin-1 y otros PRRs. La ocupación de Dectin-1 por los β -glucanos, activa la fagocitosis y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de las quinasas Syk y Src. NF- κ B se activa a través del complejo CARD9/Bcl10/Malt1. Dectin-1 colabora con otros receptores como los TLR en la inducción de la producción de citoquinas pro-inflamatorias para activar NF- κ B, y de forma independiente, otros factores que inducen genes inflamatorios.

Se ha identificado recientemente en humanos una mutación que cambia el aminoácido 238 de tirosina por un codón de parada temprana (Tyr238X) en el dominio CTLD de dectin-1 (Ferwerda *et al.*, 2009). Esta forma mutada del receptor apenas se expresa en la superficie de las células mieloides, no media la unión β -glucano e induce una producción alterada de citoquinas. Sin embargo, la fagocitosis y la eliminación del patógeno no se ven alteradas en los humanos portadores del polimorfismo, lo que indicaría que hay receptores alternativos que suplen su función. Es decir, estos pacientes presentan infecciones fúngicas mucocutáneas, pero no parece aumentar la susceptibilidad a infecciones sistémicas como sí ocurre en los ratones deficientes en dectin-1 (Reid *et al.*, 2009).

2.2 Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)

Los microorganismos presentan gran cantidad de PAMPs que no se encuentran en los mamíferos, por lo que representan una diana ideal para el reconocimiento de lo “no propio”. Son estructuras altamente conservadas a lo largo de la evolución porque pertenecen a mecanismos indispensables para la supervivencia del microbio. El sistema inmune tiene un sistema extraordinariamente preciso que le permite reconocer: i) PAMPs solubles y particulados, ii) entre organismos vivos o muertos mediante la identificación de vita-PAMPs, que son patrones que indican la viabilidad del organismo (ej: ARNm), iii) distinguir si un germen es patógeno, entendiendo como germen patógeno al que expresa genes codificantes para factores de virulencia que rompen o alteran la homeostasis del tejido (Figura 6). A partir de esta información, el sistema inmune integra una respuesta adecuada para cada situación (Blander y Sander, 2012).

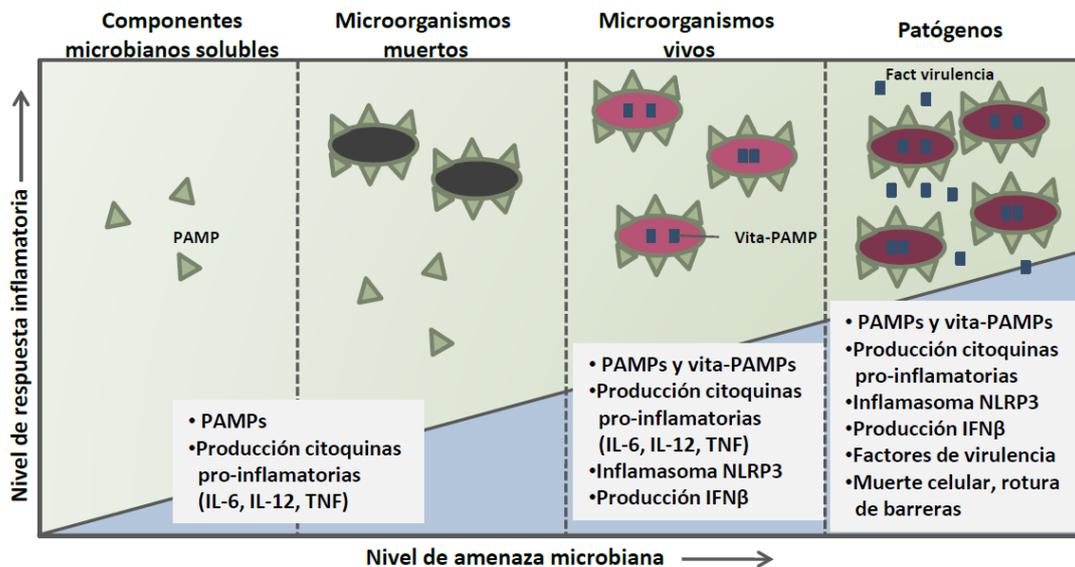


Figura 6. Correlación entre la respuesta inflamatoria y la amenaza microbiana. En el dibujo se muestra la correlación que existe entre la amenaza microbiana, representada desde PAMPs aislados, microorganismos muertos o vivos y gérmenes patógenos y el nivel de respuesta que genera el organismo hospedador. A mayor amenaza microbiana, más rápida y robusta es la respuesta inmune. Figura adaptada de *Blander y Sander, 2012*.

Lipopolisacárido bacteriano (LPS) Está presente en la membrana exterior de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Estructuralmente está formado por tres porciones, de las que dos son hidrofílicas: la porción central compuesta por motivos repetidos de polisacáridos y la porción denominada antígeno O, y un dominio hidrofóbico compuesto por seis cadenas de ácidos grasos, al que se denomina lípido A y que es el componente biológicamente activo del LPS. Es reconocido por el receptor TLR4. El LPS se transfiere a la proteína CD14 que está unida a la superficie celular mediante la proteína de unión a LPS (LBP).

La captación del LPS por CD14 facilita la activación de TLR4 y la inducción de la biosíntesis de diversos mediadores inflamatorios y lípidos activos.

Mananos: Están formados por polímeros de manosa que se encuentran unidos covalentemente a proteínas mediante enlaces *O*-glucosídicos o *N*-glucosídicos formando las denominadas manoproteínas. Las manoproteínas pueden ser componentes estructurales de la pared celular o bien enzimas localizadas en la pared o en el espacio periplasmático. Estas proteínas desempeñan un papel importante en la porosidad de la pared. Inducen preferentemente la activación de la respuesta Th1 y son reconocidos por numerosos PRR. El MR reconoce α -mananos unidos por enlaces *N*-glucosídicos, al igual que DC-SIGN y dectin-2, por su parte, TLR-4 reconoce preferentemente mananos *O*-glucosilados, la galectina-3 reconoce los β -(1-2)-manósidos de *Candida albicans* y se asocia con TLR2.

β -glucanos: Están formados por polisacáridos de glucosa con enlaces de tipo β . Los β -(1-3) y β -(1-6)-glucanos son componentes de la pared celular de los hongos y representan entre el 50-60% del peso seco de la célula. También se encuentran en plantas y algunas bacterias (Palma *et al.*, 2006). Los β -glucanos pueden ser solubles como las partículas β -(1,3)-D-glucano derivadas de *S. cerevisiae* (3 μ m) o particulados como el *Curdlan* compuesto por β -(1,3)-glucano derivado de *Alcaligenes faecalis* (0.2 mm). Dectin-1 es el principal PRR de β -glucanos (solubles y particulados) en células mieloides (Brown *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007). Hay otros PRRs como el receptor 3 del complemento, CR3 (integrina denominada Mac-1 y CD11b/CD18), que reconoce β -glucanos y β -glucanos recubiertos por iC3b (Forsyth y Mathews, 2002; Fernández *et al.*, 2003), el SP-D, la lactosilceramida o receptores tipo *scavenger* (Brown, 2006).

Quitina: está compuesta por polímeros de *N*-acetilglucosamina que están en contacto con el núcleo de glucanos de las paredes celulares de los hongos y constituyen su parte más interna, en contacto con la membrana plasmática.

Zymosan: es una preparación insoluble y particulada (3 μ m) de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se utiliza desde hace más de 50 años como modelo de estímulo fagocítico e inflamatorio. Se compone principalmente de β (1-3) y β (1-6) glucanos y α -mananos. También incluye quitinas, proteínas y lípidos. Es reconocido principalmente por TLR2 y dectin-1 (Dillon *et al.*, 2006).

PRR	PAMPs fúngicos	Especies fúngicas que expresan el PAMP
TLR4/DC-SIGN/Dectin-2/MR	Manano	<i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TLR2	Fosfolipomanano	<i>Candida albicans</i>
TLR4	Glucoronoxilomanano	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Candida utilis</i>
Dectin-1/SP-D	β -glucanos	<i>Candida albicans</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>
TLR2-TLR6/Dectin-1/PTX-3	Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
¿?	Quitina	<i>Candida albicans</i>

Tabla 1. Principales PRRs implicados en el reconocimiento de especies fúngicas y sus respectivos PAMPs.

En general, los microorganismos contienen más de un PAMP, esta multiplicidad es reconocida desde la sinapsis fagocítica, donde múltiples componentes de la pared celular activan a más de un PRR. Este proceso continúa con la degradación microbiana en los fagolisosomas, donde nuevos PAMPs (ADN o ARN) son liberados y activan PRR intracelulares. La integración de las señales de diferentes PRRs durante la fagocitosis induce la liberación de citoquinas y mediadores lipídicos, así como la regulación de genes que definen una respuesta del sistema inmune adecuada para cada patógeno (Blander y Sander, 2012).

3. Mediadores lipídicos

Los prostanooides, una subclase de los eicosanoides, son mediadores lipídicos generados a través del metabolismo oxidativo de ácidos grasos, principalmente del ácido araquidónico (AA), que modulan varias respuestas fisiológicas y procesos patológicos como la inflamación, la formación de tumores y enfermedades neurológicas y autoinmunes. La biosíntesis de los eicosanoides comienza con la hidrólisis del ácido araquidónico de los

fosfolípidos de la membrana gracias a la acción de enzimas de la familia de fosfolipasas A_2 (PLA_2). El ácido araquidónico libre sirve de sustrato para tres grandes grupos de enzimas: las ciclooxigenasas (prostaglandina endoperóxido sintasas, COX), lipoxigenasas (LOXs) y epoxigenasas, que catalizan la formación de prostanoides, prostaglandinas (PGs), prostacilinas y tromboxanos, los leucotrienos o los ácidos epoxieicosatriénicos, respectivamente (Figura 7).

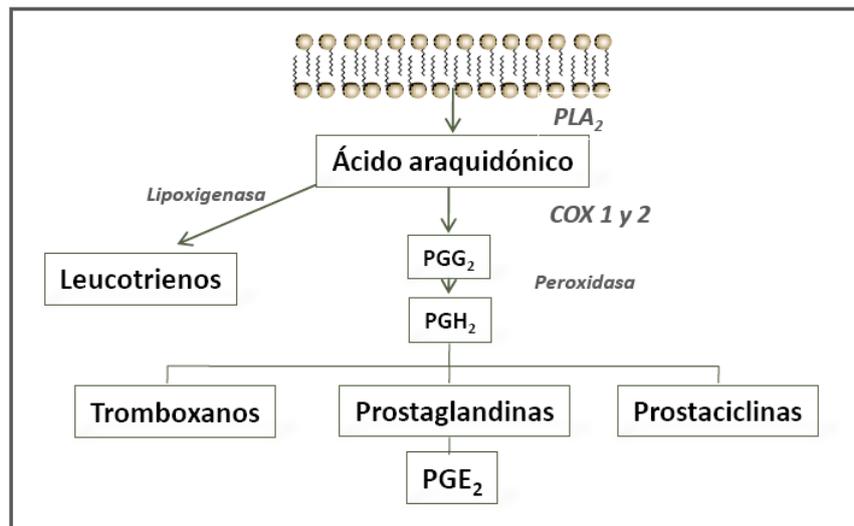


Figura 7. Biosíntesis de eicosanoides. A partir de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana por fosfolipasas, se libera el AA que puede ser usado como sustrato de varias enzimas para generar prostaglandinas, prostacilinas, tromboxanos y leucotrienos.

El metabolismo del ácido araquidónico por la vía de COX genera diferentes prostanoides con un *turnover* metabólico rápido, que actúan generalmente en el entorno cercano de la célula o sobre ella misma mediante la activación de receptores específicos acoplados a proteínas G, los cuales difieren por el agonista que unen con mayor afinidad, la localización tisular y las vías de señalización acopladas. Los niveles de producción de prostaglandinas dependen de la expresión y actividad de las enzimas COX. COX presenta dos isoformas que catalizan las mismas reacciones, pero con diferentes patrones de expresión: COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tipos celulares y es responsable del mantenimiento de las funciones fisiológicas básicas y de la producción basal de prostanoides (Smith y Langenbach, 2001); COX-2 se induce por mediadores inflamatorios y mitógenos y, se piensa que es clave en muchos procesos fisiológicos (Smith y Langenbach, 2001). Además, es responsable del incremento de la producción de prostanoides durante la inflamación y el estrés.

Otro paso limitante en la generación de prostanoïdes es la activación de las fosfolipasas A, que controlan los niveles primarios de ácido araquidónico libre. La actividad de las PLA₂s está regulada por hormonas y citoquinas (Sapirstein y Bonventre, 2000). Durante la inflamación, citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1 β o TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), incrementan la expresión de las enzimas y contribuyen al aumento de la producción de eicosanoides. La familia de PLA se clasifica en cuatro grupos. La mejor caracterizada es la PLA₂ citosólica (cPLA₂) dependiente de calcio, que tiene un papel importante en la liberación del ácido araquidónico y la biosíntesis de eicosanoides (Hao y Breyer, 2007).

La prostaglandina E₂ (PGE₂) participa en múltiples procesos fisiológicos incluyendo reproductivos, neuronales, metabólicos e inmunes. Se considera generalmente como una molécula pro-inflamatoria asociada a la producción de enrojecimiento, hinchazón y dolor (Legler *et al.*, 2010) y tiene efectos significativos en proliferación, apoptosis de linfocitos y regulación de la producción de citoquinas en las células T. Los diferentes efectos fisiológicos de la PGE₂ están mediados por los cuatro tipos de receptores que la reconocen (EP1-4). Los receptores EP2 y 4 participan en la regulación de los niveles intracelulares de AMP cíclico (Breyer *et al.*, 2001).

Dependiendo del tipo celular y el estímulo que reciba, el patrón de inducción del metabolismo del ácido araquidónico será diferente. Cuando las células polimorfonucleares como los neutrófilos se estimulan con peptidoglicano o manano, producen una gran liberación de ácido araquidónico que se utiliza para la generación de PGE₂ y LTB₄ (Álvarez *et al.*, 2010). En el caso de las células dendríticas, se obtienen la mayor liberación de prostanoïdes cuando se estimulan con *zymosan*.

4. La producción y regulación de las citoquinas

Las citoquinas son pequeñas proteínas secretadas por las células, se unen a los receptores de membrana de las células diana, e inducen una señalización que desencadena el cambio del patrón de expresión de genes, alteraciones en la organización del citoesqueleto o liberación de vesículas secretoras. Las distintas citoquinas desarrollan funciones complementarias y las combinaciones de varias de ellas son necesarias para determinar la naturaleza de la respuesta (citotóxica, humoral, celular o alérgica), o la ausencia de respuesta y la supresión del sistema inmune de forma óptima (Commins *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2008). Las distintas citoquinas se pueden clasificar por sus propiedades estructurales o funcionales.

4.1 Interlequina 1 β (IL-1 β) y el inflamasoma

La IL-1 β es una citoquina pro-inflamatoria producida predominantemente por monocitos y macrófagos. Se produce en forma de precursor inactivo (pro-IL-1 β) que debe sufrir un procesamiento enzimático para producir la proteína bio-activa. Una de las principales enzimas encargadas de este procesamiento es la caspasa 1 intracelular y el proceso está regulado por unas plataformas proteicas multiméricas denominadas inflamasomas. En respuesta a señales de daño, los inflamasomas se ensamblan mediante interacciones proteicas y el complejo desencadena la auto-activación de la caspasa-1. El inflamasoma NLRP3 ha sido el más estudiado. Los tres mecanismos propuestos para su activación son: i) estimulación por ATP extracelular junto con un *priming* con LPS necesario para la expresión de NLRP3, ii) captación de DAMPs por los fagocitos generando un daño lisosomal, seguido por la liberación de compuestos como la catepsina B iii) activación de ligandos directamente sobre el inflamasoma y estimulación de la producción de especies reactivas de oxígeno, permitiendo la activación de la caspasa-1 (van de Veerdonk *et al.*, 2011). Se han descrito gran cantidad de estímulos que favorecen la activación del inflamasoma y la consecuente producción de IL-1 β , como los glucanos (Kankkunen *et al.*, 2010) o los cristales de silicio y aluminio en macrófagos (Kuroda *et al.*, 2011).

4.2 Interlequina 10 (IL-10)

Es una citoquina tardía, producida después de la liberación de los mediadores pro-inflamatorios que presenta propiedades anti-inflamatorias. Es secretada por la mayoría de leucocitos tras la estimulación celular con agonistas endógenos o exógenos, como el LPS o las catecolaminas (Sabat *et al.*, 2010) que, inducen su transcripción. IL-10 actúa en forma de homodímeros a través de un complejo de receptores transmembrana que se compone por IL-10R1 e IL-10R2 y, en general, actúa mediante la activación de la quinasa Janus (Jak) 1 y la tirosina quinasa (Tyk) 2, que activan los factores de transcripción de la familia STAT (*signal transducers and activator of transcription*). En monocitos y macrófagos, IL-10 afecta tres funciones importantes: i) la presentación antigénica, inhibiendo la expresión del complejo MHC II y de las moléculas co-estimuladoras, como CD80 y CD86 (de Waal Malefyt *et al.*, 1991 b), ii) la liberación de mediadores inflamatorios en las células diana que han sido estimuladas por algunas citoquinas pro-inflamatorias (de Waal Malefyt *et al.*, 1991 a), o la síntesis de COX-2 (Niiro *et al.*, 1997), mientras que potencia la liberación de mediadores anti-inflamatorios, como el antagonista del receptor de IL-1 β o de TNF- α (Jenkins *et al.*, 1994), iii) el aumento de la fagocitosis de los antígenos y la regulación de la respuesta de las células T. La relevancia de

esta citoquina radica su capacidad para limitar una reacción inmune excesiva y el daño tisular (Sabat *et al.*, 2010).

La mayor parte de los estudios sobre la regulación de IL-10 se han realizado en modelos de ratón que utilizan la ruta LPS/TLR4. Respecto a la regulación transcripcional, se ha descrito la participación de numerosos factores como principales reguladores de la producción de IL-10. Entre los más relevantes están Stat-3 (Benkhart *et al.*, 2000), Sp (*specific protein*) 1 y 3 (Brightbill *et al.*, 2000; Tone *et al.*, 2000), c-Maf (Cao *et al.*, 2004), NY-F (Lin, 2006), NF- κ B (Cao *et al.*, 2006; Leghmari *et al.*, 2008; Gringhuis *et al.*, 2009), Pbx1b (*pre-B cell leukemia transcription factor-1b*) (Chung *et al.*, 2007), C/EBP (*CCAAT-enhancer binding protein*) (Brenner *et al.*, 2003), NFAT (Goodridge *et al.*, 2007) y CREB (Platzer *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2006). Asimismo, cambios epigenéticos dependientes de la acetilación de histonas pueden regular la accesibilidad de los factores de transcripción al promotor de *il10* y explicar la regulación por factores constitutivamente activos como Sp1 y Sp3 en las células mieloides. La regulación post-transcripcional de IL-10 también se ha propuesto como mecanismo regulatorio por el gran número de elementos ricos en AU en la zona 3'UTR del ARN mensajero (Powell *et al.*, 2000) o mediante micro ARN (Sharma *et al.*, 2009). La IL-10 puede regular directamente la inmunidad innata y adaptativa (respuestas Th1 y Th2) limitando la activación y diferenciación de las células T en los nódulos linfáticos, suprimiendo la respuesta pro-inflamatoria en los tejidos y controlando la eliminación del patógenos y/o reduciendo el daño tisular (Couper *et al.*, 2008).

4.3 Interleuquina 12 p70 (IL-12 p70)

La IL-12 p70 es una proteína heterodimérica producida por monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas en la etapa inicial de la respuesta inmune para activar la inmunidad celular. Fue la primera citoquina descrita con una estructura molecular heterodimérica unida covalentemente y compuesta por dos cadenas, p35 y p40, codificadas por genes independientes (*il12p35* o *il12a* e *il12p40* o *il12b*, respectivamente) (Kobayashi *et al.*, 1989; Hölscher, 2004). La secuencia de p35 presenta un motivo de 4 hélices- α típico de las citoquinas y homología con IL-6 y G-CSF. La secuencia de la cadena p40 es homóloga con la porción extracelular de la familia de receptores de hemopoiética, como IL-6R (Trinchieri, 2003). Además de la dimerización con p35 para formar IL-12 p70, la subunidad p40, que se secreta en exceso sobre la cantidad de heterodímero de p70, puede formar homodímeros denominados IL-12p80 o IL-12 (p40)₂ que funcionan como antagonistas que se unen al receptor de IL-12 (IL-12R) sin desencadenar una respuesta biológica. El complejo de receptores de membrana de IL-12 p70 está formado por dos cadenas: IL-12R β 1 e IL-12 β 2. La primera une

la subunidad p40 y se asocia con TyK 2, mientras que IL-12 β 2 reconoce tanto el heterodímero como la cadena p35 y está asociado con Jak2. La señalización a través del receptor de IL-12 p70 induce fosforilación, dimerización y translocación nuclear de varios factores de transcripción de la familia de STAT 1, 3, 4 y 5 pero la respuesta predominante está mediada por STAT4 (Trinchieri, 2003). La liberación de IL-12 p70 favorece la producción de IFN- γ por parte de las células T y NK, principalmente y la diferenciación y proliferación de las células Th1 necesaria para una respuesta óptima frente a estímulos microbianos (bacterias, hongos, parásitos intracelulares y virus), siendo un nexo entre la respuesta innata no específica y la respuesta adaptativa específica de antígeno (Hölscher, 2004; Lyakh *et al.*, 2008).

4.4 Interleuquina 23 (IL-23)

Pertenece a la familia de IL-12. La cadena p40 se puede asociar en vez de con p35, con la subunidad p19 para formar mediante enlace covalente una citoquina heterodimérica activa. La subunidad p19, al igual que p35, presenta homología con IL-6 y G-CSF y solo es secretada cuando se asocia con IL-12 p40 (Oppmann *et al.*, 2000). El complejo receptor para IL-23 está compuesto por IL-12R β 1 e IL-23R. La señalización es similar a la IL-12, activando TyK2, Jak2 y STAT1, 3, y 4. Sin embargo, la activación de STAT4 no es tan predominante como en IL-12 p70, formándose más dímeros de STAT3/4 (Trinchieri *et al.*, 2003). IL-23 es producida por las mismas células que IL-12 pero su función es la inducción de una respuesta Th17, además de participar en el desarrollo de la memoria inmune.

- **La regulación de IL-12/IL-23**

IL-12 p70 e IL23 se producen en respuesta a múltiples estímulos infecciosos e inflamatorios. Los genes que codifican ambas citoquinas se deben coordinar en la célula para generar heterodímeros activos. La eficiencia de los patógenos depende de la expresión de los PRRs, por ejemplo, los ligandos que se unen a un solo TLR no son eficientes en la producción de IL-12 p70 e inducen solo niveles bajos de p40. Sin embargo, se induce una óptima producción de IL-12 p70 cuando se activan varios PRRs. En cambio, se ha descrito que cuando se estimula dectin-1 se producen cantidades significativas de IL-23, IL-10 e IL-6, pero si se estimula esta vía junto con el receptor TLR2, se potencia la liberación de IL-23, IL-10 e IL-6 y disminuye IL-12 p70 en relación con los niveles obtenidos cuando se estimula solo TLR2. El mecanismo por el que la cooperación de estos dos receptores inhibe la respuesta de IL-12 p70 aún no está definido (Lyakh *et al.*, 2008; Dennehy *et al.*, 2009). La expresión de moléculas co-activadoras y de algunas citoquinas como IL-4 e IFN- γ también aumentan la expresión de IL-12

p70 (Ma *et al.*, 1996; Gerosa *et al.*, 2008). La capacidad del IFN- γ para potenciar la producción de IL-12 p70 mediante los IRF funciona como un mecanismo de retroalimentación positiva durante la inflamación y las respuestas Th1 (Liu *et al.*, 2003). El efecto del IFN- γ sobre la producción de IL-23 en algunos casos no es efectivo, incluso puede llegar a inhibir la producción (Gerosa *et al.*, 2008). Las citoquinas anti-inflamatorias regulan negativamente la producción de IL-12 p70 e IL-23, evitando una respuesta inflamatoria excesiva. La IL-10 es un potente inhibidor de la producción de IL-12 p70 mediante el bloqueo de la transcripción por la inducción de proteínas represoras y evitando la síntesis de los genes inducidos por NF- κ B (Aste-Amezaga *et al.*, 1998). La producción de IL-12 p70 también es inhibida por los ligandos que se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCR), la mayoría a través de la inducción de la producción de AMP cíclico (Braun y Kelsall, 2001) y los compuestos que generan, como la PGE₂ (van der Pouw Kraan *et al.*, 1995). Además, se ha visto que PGE₂ tiene un efecto opuesto sobre IL-23 al incrementar su producción (Sheibanie *et al.*, 2004).

La regulación transcripcional de *il12p40* en respuesta a una estimulación por LPS requiere la remodelación del nucleosoma 1, lo que permite el acceso de los factores de transcripción C/EBP, c-Rel y varios miembros de la familia IRF (Lyakh *et al.*, 2008). La región proximal del promotor de *il12p35* contiene motivos para la unión de factores como Sp1, elementos de respuesta a IFN- γ (IRE), PU.1 y C/EBP. Además, presenta varios sitios de inicio de la transcripción tanto en el humano como en el ratón que pueden generar diferentes isoformas de p35. Como en el promotor de *il12p40* e *il12p35*, el promotor de *il12p19* presenta dos sitios de unión de NF- κ B donde se une c-Rel en respuesta a cascadas de señalización iniciadas por diferentes TLRs. ERK-MAPK regulan positivamente la expresión de *il23p19* mientras que inhiben a *il12p40* (Lyakh *et al.*, 2008).

5. Regulación de la transcripción génica: factores de transcripción

Los cambios epigenéticos regulan diversas funciones celulares incluyendo la activación, transformación y diferenciación celular. La regulación epigenética depende de la remodelación de la cromatina y de las modificaciones de las histonas (metilaciones, acetilaciones y fosforilaciones). Todos estos cambios son importantes para controlar la expresión génica, por ejemplo, la trimetilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4) se asocia con una transcripción génica activa, mientras que las trimetilaciones de H3K9, H3K27 y H3K79 se consideran ligadas al silenciamiento de genes (Barski *et al.*, 2007; Medzhitov y Horng, 2009). Además de los cambios en la cromatina, la estructura de los promotores juega un papel fundamental por actuar como plataformas para el reclutamiento de los factores de transcripción específicos de

secuencia cerca del sitio de inicio de la transcripción génica. Como los promotores contienen múltiples sitios de unión para factores de transcripción la combinación de la unión de factores de transcripción y los elementos reguladores localizados a distancia del inicio de transcripción (*enhancers*) determinan el patrón de expresión génica (Otsuni y Natoli, 2011).

5.1 NF- κ B

Fue descrito por primera vez como un *enhancer* de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina en los linfocitos B. Al poco tiempo se observó que su actividad es inducible y que su expresión no se restringe solo a los linfocitos B (Sen y Baltimore, 1986). A partir de entonces, NF- κ B ha adquirido un papel principal en la regulación de la inflamación y de las respuestas inmunes, así como en la homeostasis de las células del sistema inmune por su papel en la expresión de genes de supervivencia y apoptosis.

En mamíferos se han descrito cinco miembros de la familia NF- κ B: RelA (p65), Rel-B y c-Rel, y las proteínas precursoras NF- κ B1 (p105) y NF- κ B 2 (p100), las cuales se procesan para producir p50 y p52, respectivamente (Figura 8). Estos factores de transcripción se unen como dímeros a sitios κ B de promotores y *enhancers* de una variedad de genes, para inducir o reprimir la transcripción (Pahl, 1999; Hayden y Ghosh, 2004). Todas las proteínas NF- κ B tienen en común un dominio de homología Rel responsable de la unión al ADN y la dimerización.

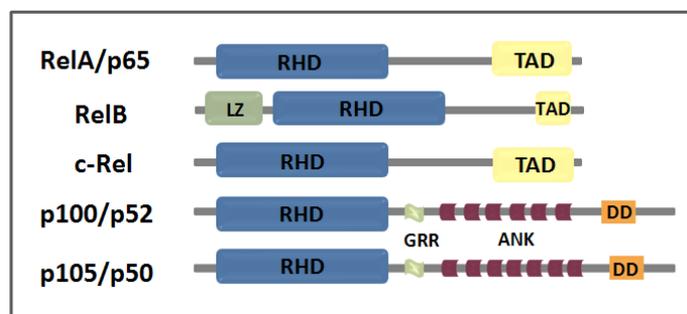


Figura 8. Estructura de los componentes de NF- κ B. La familia de proteínas Rel (NF- κ B) consta de cinco miembros: p65 (RelA), RelB, c-Rel y las proteínas precursoras p100 y p105 que se convierten en p52 y p50, respectivamente. Los dominios relevantes de cada proteína están indicados. ANK: dominio repetido de anquirina, DD: dominio de muerte, GRR: región rica en glicina, RHD: dominio de homología Rel y TAD: dominio de transactivación. Figura adaptada de *Hayden y Ghosh, 2012*.

El rango de estímulos capaz de inducir la actividad de NF- κ B incluye las infecciones víricas y bacterianas, las citoquinas pro-inflamatorias, la activación de PRR y el estrés oxidativo (Hayden y Ghosh, 2011). En las células en reposo, los dímeros de NF- κ B están unidos a las proteínas inhibidoras de κ B (I κ B), las cuales secuestran los complejos de NF- κ B en el citoplasma. Cuando se estimulan las células, se induce la degradación de las proteínas I κ B

mediante el inicio de fosforilaciones por el complejo de las quinasa de I κ B (IKK), que incluye dos quinasas catalíticas activas, IKK α e IKK β y la subunidad reguladora IKK γ (NEMO). Las proteínas I κ B fosforiladas son marcadas para la ubiquitinación y degradación en el proteosoma, liberando los dímeros de NF- κ B y permitiendo su translocación al núcleo (Figura 3) (Jeong y Lee, 2011).

Existen dos rutas de activación principales. La vía canónica se induce por la mayoría de los estímulos fisiológicos como señales de receptores de citoquinas y PRRs. Se define como dependiente de IKK y NEMO, produce, principalmente, la fosforilación de I κ B α y la translocación nuclear de heterodímeros de p65. La vía no canónica depende de la fosforilación mediada por IKK α sobre p100 asociado con RelB y da lugar a un complejo p52/RelB. NF- κ B también se regula por modificaciones post-transcripcionales como por ejemplo, la fosforilación de la serina 276 de p65 llevada a cabo por la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (PKAc), que se encuentra unida al complejo citosólico NF- κ B/I κ B y se activa tras la degradación de I κ B. Esta fosforilación es imprescindible para la actividad transcripcional de p65 y el reclutamiento de CBP (Zhong *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 2002) La desregulación de la actividad de NF- κ B se asocia a enfermedades inflamatorias, autoinmunes y metabólicas, y procesos neoplásicos (Courtois y Gilmore, 2006; Baker *et al.*, 2011).

5.2 CREB y sus coactivadores

El AMP cíclico regula la expresión génica mediante la regulación del elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE). Varias proteínas de la familia de unión a CRE pueden unirse al sitio CRE, incluidas CREB (*CRE binding protein*), *CRE modulator (CREM)* y *activating transcription factor 1 (ATF1)*. La actividad de estos factores se regula por fosforilación y ello permite modular la actividad de múltiples genes en eucariotas (González y Montminy, 1989). El sitio CRE, presente en muchos promotores, aparece generalmente en forma de secuencia palindrómica (TGACGTCA) o media secuencia (TGACG o CGTCA), aunque existen variantes funcionales (Montminy *et al.*, 1986). Muchas de estas secuencias están metiladas impidiendo la unión de CREB. Las secuencias funcionales, no metiladas, suelen localizarse en la región proximal del promotor proximal a unas 250 pares de bases del inicio de la transcripción. Son más activas cuanto más próximas se encuentren de la caja TATA. Para que se lleve a cabo la transcripción inducida por AMP cíclico, es necesario que la caja TATA sea canónica (Conkright *et al.*, 2003 b).

La unión de estímulos a GPCR desencadena la activación de las adenilato ciclasas (AC) que catalizan la formación de AMP cíclico a partir de ATP. La unión del AMPc a la subunidad

reguladora de PKA libera la subunidad catalítica y permite su migración al núcleo por un proceso pasivo. La PKA fosforila a CREB en la serina 133, proceso que tarda entre 30 minutos y 1 hora tras de la producción de AMP cíclico (Hagiwara *et al.*, 1993) (Figura 9, panel izquierdo). Paralelamente, ocurren cambios en las proteínas de unión a CREB (CBP/p300) (Parker *et al.*, 1996) y sus co-activadores transcripcionales (*cyclic AMP-regulated transcriptional co-activator*, CRTC o TORC) (Conkright *et al.*, 2003 b). Después de esta activación, CREB es progresivamente defosforilado mediante serin-treonin fosfatasas (PP1 y PP2A) (Hagiwara *et al.*, 1992).

CREB presenta una organización modular (Figura 9, panel derecho). En el extremo N-terminal contiene un dominio de transactivación (TAD) bimodular compuesto por un dominio central inducible por quinasas (KID), que le aporta la capacidad de ser activado por AMP cíclico y calcio a través de un mecanismo dependiente de fosforilaciones, y un dominio de activación constitutiva rico en glutamina (Q2), que potencia la transcripción interaccionando con el factor asociado a TBP 4 (TAF4). En la zona C-terminal tiene una cremallera de leucinas (bZIP) para la unión con el ADN y el dominio de dimerización (Altarejos y Montminy, 2011).

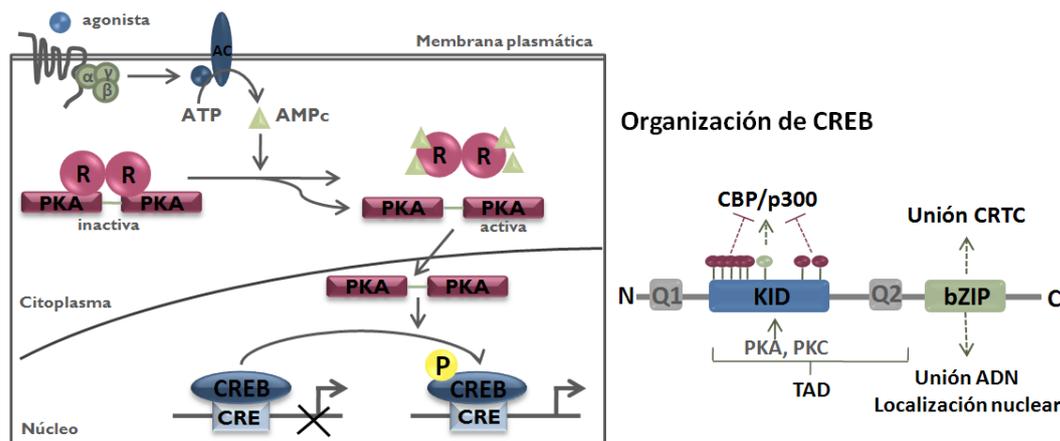


Figura 9. Fosforilación de CREB mediada por AMP cíclico. La unión del ligando a los GPCRs activa las adenilato ciclasas (AC), las cuales catalizan la síntesis de AMP cíclico. El incremento del AMP cíclico estimula la señalización de la PKA. El AMP cíclico se une a las subunidades reguladoras (R) de PKA dejando libre las subunidades catalíticas y permite su translocación al núcleo celular y la fosforilación de CREB en la serina 133. CREB fosforilado promueve la expresión de los genes con sitio CRE. La organización modular de CREB contiene dos dominios ricos en glutamina (Q1 y Q2), un dominio inducible por quinasas (KID) y una cremallera de leucina básica (bZIP). Figura adaptada de *Altarejos y Montminy, 2011*.

A diferencia del AMP cíclico y la PKA, el calcio intracelular estimula la fosforilación de CREB a través de las quinasas dependientes de calcio y calmodulina. La fosforilación de CREB en la serina 133 del dominio KID facilita la asociación con el dominio KIX de CBP/p300 (Parker *et al.*,

1996), que aumenta la expresión de los genes diana de CREB mediante la acetilación de histonas nucleosomales y el reclutamiento del complejo de la ARN polimerasa II (Bannister y Kouzarides, 1996).

El dominio bZIP de CREB permite también la unión con la familia de co-activadores CRTC (CRTC 1-3/TORC). Éstas son unas proteínas evolutivamente conservadas que en su estado basal están secuestradas en el citoplasma mediante interacciones dependientes de fosforilaciones con las proteínas 14-3-3. En respuesta al aumento del nivel del AMP cíclico y el calcio, la calcineurina defosforila las proteínas permitiendo la translocación nuclear de CRTC para su unión a CREB mediante los dominio bZIP (Screaton *et al.*, 2004) (Figura 10).

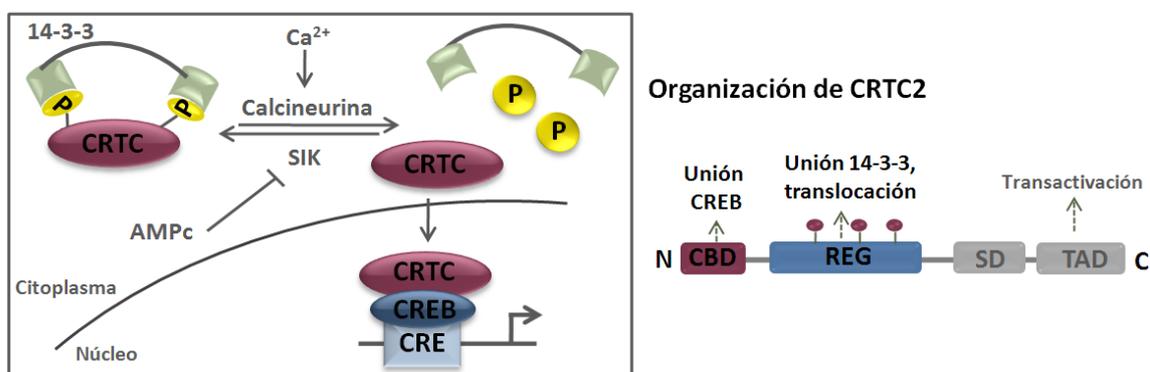


Figura 10. La translocación de CRTC está regulada por fosforilaciones. Bajo condiciones basales, CRTC está fosforilado y secuestrado en el citoplasma por las proteínas 14-3-3. El AMP cíclico y Ca^{2+} promueven su defosforilación a través de la inhibición de SIKs, y la inducción de la calcineurina. CRTC defosforilado se transloca al núcleo donde se puede unir a CREB y estimular su actividad. CRTC2 contiene un sitio de unión a CREB (CBD), una región reguladora (REG), un dominio de empalme alternativo (SD) y uno de trans-activación (TAD). Figura adaptada de *Altarejos y Montminy, 2011*.

5.3 NOTCH

La vía de señalización de Notch está evolutivamente muy conservada, se describió inicialmente en *Drosophila melanogaster* y participa en el desarrollo, proliferación, diferenciación y apoptosis celular. En mamíferos se han descrito cuatro receptores transmembrana (Notch 1-4) que reconocen cinco ligandos de la familia de proteínas Delta y Jagged que median la señalización célula/célula. Cuando ocurre la unión receptor/ligando, se libera el dominio intracelular de Notch (NICD) y se transloca al núcleo celular. NICD interactúa con la proteína de unión al ADN, RBP-Jk, que estaba asociada a co-represores. Esta interacción con NICD reemplaza a los co-represores y permite el reclutamiento de co-activadores como Mastermind/MAML y CBP/p300. Este nuevo complejo activa la transcripción de los genes

efectores de la vía Notch como Hes (*hairy enhancer of Split*) y Hey (*hes-related with YRPF motif*) (Fischer y Gessler, 2007) que regulan negativamente la expresión de genes diana actuando como represores transcripcionales (Figura 11). La señalización vía TLR2 y TLR4 también induce la vía canónica de NOTCH a través de p38 MAPK e IKKs, teniendo como genes diana *hes1* y *hey1* (Hu *et al.*, 2008).

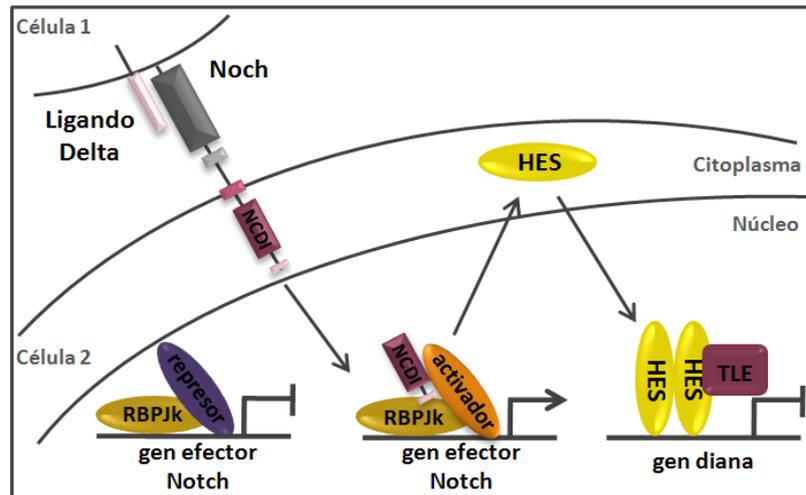


Figura 11. Activación de la vía canónica de NOTCH. Cuando el receptor NOTCH entra en contacto con su ligando libera el dominio NCDI, capaz de unirse al gen efector y favorecer su transcripción. Una vez sintetizadas las proteínas de la familia NOTCH, pueden unirse a los promotores de los genes diana y reprimir su activación.

Hes y Hey son dos familias de factores de transcripción con motivos muy conservados y un alto grado de similitud estructural. Hes tiene siete miembros (Hes 1-7) que presentan dominios bHLH (*basic hélix-loop-helix*), *Orange* y WRPW y se unen a elementos *N-* y *E-box* del ADN (secuencias CACNAG, CANNTG). Las proteínas Hes pueden reclutar a los co-represores TLE (TLE 1-4, ortólogos de Groucho) mediante el tetrapéptido WRPW que a su vez pueden unirse a los residuos N-terminal de la histona H3 para generar un complejo represor transcripcional (Grbavec and Stifani, 1996; Palaparti *et al.*, 1997). La familia de proteínas Hey tiene tres miembros (Hey1, 2 y L) y presentan dominios bHLH y *Orange*. Se unen preferentemente a elementos E-box (Fischer y Gessler, 2007).

Hes y Hey pueden interactuar con gran cantidad de proteínas HLH formando homo- o heterodímeros, también pueden reclutar co-represores transcripcionales como las histonas deacetilasas (Iso *et al.*, 2003). Además, forman complejos con otros factores de transcripción que, con frecuencia, son represores transcripcionales. Hes utiliza diferentes mecanismos de represión: i) una represión activa dependiente de la unión a las secuencias N- o E-box del ADN

por parte de los dímeros y la unión con sus co-represores como TLE, ii) el reclutamiento de histonas deacetilasas, que reprimen la transcripción mediante alteraciones de la estructura de la cromatina, iii) la represión pasiva mediante el secuestro de proteínas, formando complejos no funcionales y iv) mediante interacciones a través del dominio Orange y WRPW, que poseen capacidad de represión moderada aunque el mecanismo no está aún definido (Iso *et al.*, 2003; Fischer y Gessler, 2007).

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de la Tesis ha sido: *El estudio de la regulación de la producción de citoquinas por parte de las células mieloides humanas en respuesta a patrones moleculares de la pared de los hongos y el análisis de los mecanismos que condicionan la polarización de la respuesta inmune por estas citoquinas.*

Los objetivos concretos se desglosan en la siguiente forma:

1. Caracterizar la respuesta de las células mieloides a los β -glucanos en función del entorno y el grado de diferenciación celular:

- Determinar la influencia del entorno sobre los PRR expresados por las células mieloides.
- Analizar el mecanismo de reconocimiento de las partículas de *zymosan* tratando de determinar que parte de la respuesta se explica por su condición de partícula que interacciona con la membrana por un mecanismo independiente de receptores, frente a su capacidad para estimular PRRs a través de los PAMP que contiene.

2. Estudiar la regulación de la producción de IL-10 en los monocitos derivados a células dendríticas:

- Analizar la producción de IL-10 por las células dendríticas estimuladas con PAMPs fúngicos y determinar la ruta de señalización implicada en su regulación transcripcional.
- Identificar los diferentes factores de transcripción implicados en la expresión de *il10* inducida por el *zymosan*.

3. Estudio del balance IL-12 p70/IL-23 en los monocitos derivados a células dendríticas:

- Estudiar la regulación transcripcional del promotor de *il23p19* como mecanismo central de regulación de la producción de IL-23 en las células dendríticas estimuladas con *zymosan*.
- Analizar del efecto inhibitorio del *zymosan* sobre la producción de IL-12 p70 inducida por IFN- γ y LPS mediante el reclutamiento de inhibidores de la transcripción en el promotor de *il12p35*.

Materiales y métodos

Materiales y métodos

1. Cultivos celulares

1.1 Obtención de monocitos humanos

Los monocitos humanos se obtuvieron a partir de la capa leuco-plaquetaria que aparece tras la centrifugación de la sangre total entre el plasma y los glóbulos rojos de donantes sanos, que se denomina en inglés como *buffy coats*. El concentrado sanguíneo se diluyó en proporción 1:1 con PBS y la mezcla se añadió sobre una solución de *Ficoll Paque* manteniendo la proporción de sangre-PBS: *Ficoll Paque* 3:1 (v/v). Esta mezcla se centrifugó a 700 x g durante 30 minutos sin freno de desaceleración para obtener una correcta separación de las diferentes fases: en la parte superior la fase acuosa con el plasma y el PBS, a continuación un anillo de células mononucleares, debajo el *Ficoll Paque* y por último los eritrocitos y las células polimorfonucleares (PMN). Las células mononucleares se recogieron con pipeta Pasteur y se lavaron con PBS mediante centrifugación a 440 x g durante 10 minutos (Figura 12).

1.2 Obtención de macrófagos

Se realizaron dos lavados más de las células mononucleares con abundante PBS a 450 x g durante 10 minutos y se resuspendieron a la concentración deseada en RPMI suplementado con 2 mM de L-glutamina y 40 µg/ml de gentamicina. Se dejaron una hora en el incubador a 37°C para facilitar que los monocitos se adhiriesen a la placa de cultivo. Pasado este tiempo, se lavaron las placas con PBS para eliminar los linfocitos que estaban en suspensión. Para conseguir la diferenciación de los monocitos a macrófagos, las células se cultivaron en el medio RPMI descrito anteriormente esta vez con un 5 % (v/v) de suero humano (SH) inactivado por calor (MØ SH) o suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado (FBSi) y 10 ng/ml del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF; Miltenyi Biotech) (MØ M-CSF). Las células se mantuvieron en incubador a 37°C y atmósfera de 5 % de CO₂ durante siete días y realizando varios cambios del medio de cultivo (Figura 12).

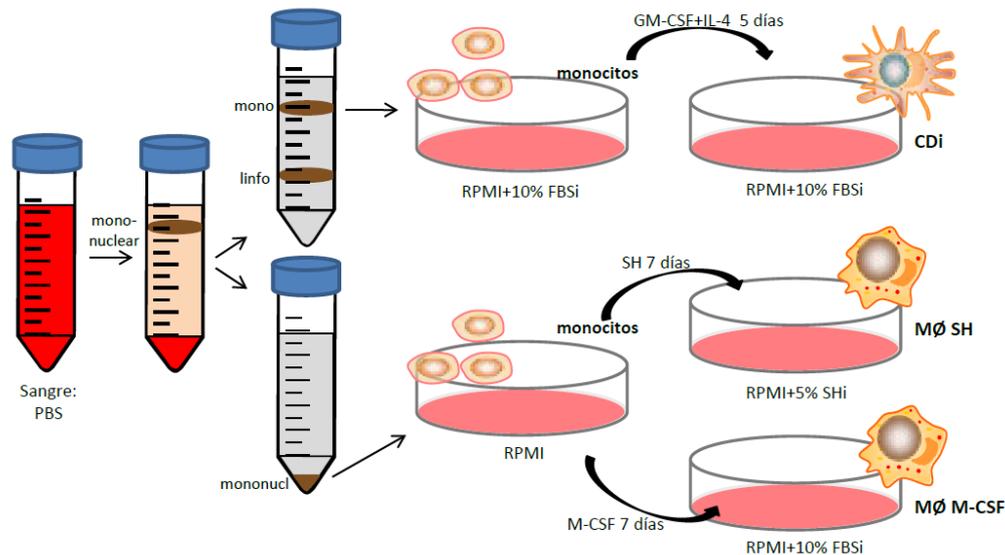


Figura 12. Esquema del proceso de obtención de monocitos y su diferenciación a células dendríticas (CD), macrófagos con suero humano (MØ SH) y macrófagos con M-CSF (MØ M-CSF).

1.3 Obtención de células dendríticas

Las células mononucleares obtenidas se resuspendieron en 3 ml de *OptiPrep* (Sigma). Se creó un gradiente discontinuo al añadir sin mezclar las fases de 7 ml de *Ficoll Paque* (densidad 1.072 g/ml) y a continuación una solución de *OptiPrep* de densidad 1.098 g/ml suplementada con 0.5 % de albúmina de suero bovino (BSA), 1 mM EDTA y tamponada con HEPES. Se centrifugó a 700 x g durante 25 minutos para obtener varias fases: en la parte superior un anillo de monocitos sobre la solución de *OptiPrep*, después un anillo de linfocitos y finalmente el *Ficoll-Paque*. Se recogió el anillo de monocitos, se lavó y se repitió de nuevo el proceso de separación de fases por densidad para obtener una población de monocitos de mayor pureza. Los monocitos se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10 % de FBSi, 2 mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, se distribuyeron en placas de cultivo y se dejaron adherir durante 90 minutos. Una vez adheridos los monocitos, se lavaron los linfocitos restantes que estaban en suspensión. Para promover la diferenciación de los monocitos se incubaron durante cinco días en el medio RPMI mencionado anteriormente suplementado con 800 U/ml del factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF; R&D Systems) y 500 U/ml de interleuquina 4 (IL-4; R&D Systems) en incubador a 37°C y atmósfera de 5 % de CO₂ (Figura 12).

1.4 Obtención células derivadas de médula ósea de ratón

Los macrófagos de ratón se obtuvieron a partir de células derivadas de médula ósea. Se extrajeron las médulas mediante inyección de PBS frío y se centrifugaron las células a 400 x g durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en RPMI suplementado con 10 % FBSi, 2 mM de L-glutamina, 40 µg/ml de gentamicina y 10 ng/ml de M-CSF murino y se incubaron durante siete días a 37°C y atmósfera de 5 % de CO₂. Se realizó un cambio de medio el día 3. El fondo genético de los ratones utilizados ha sido C57BL6 (Figura 13).



Figura 13. Imagen de un ratón C57BL6 deficiente en dectin-1.

2. Preparación de extractos celulares y Western Blot

2.1 Obtención de extractos celulares.

Una vez estimuladas las células se procedió al lisado celular teniendo en cuenta el tipo de preparación:

- En el caso de células en suspensión: Se recogieron éstas y se lavaron con PBS frío. Se resuspendió el centrifugado en un tampón de lisis (20 mM Hepes, 40 mM β-glicerofosfato, 2 mM ortovanadato, 10 mM EGTA, 2.5 mM MgMCl₂, 1 mM DTT y 1 % Nonidet P-40) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1 mg/ml leupeptina, 5 mg/ml aprotinina, 0.1 M PMSF, 1 M NaF, 0.1 M PNPP, 0.1 M DTT y 200 mM Ortovanadato).
- En el caso de células adheridas: se lavaron las placas dos veces con PBS frío y se rasparon en presencia de un tampón de lisis TNE 1 x (40 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa indicados anteriormente.

Las células se mantuvieron en 300 µl de tampón de lisis durante 30 minutos a 4°C y el lisado se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C para obtener el sobrenadante. Se cuantificó la concentración de proteína según el método colorimétrico descrito por Bradford, usando el reactivo *Coomassie Blue G-250* y BSA como estándar. La concentración de la proteína se determinó midiendo la absorbancia de las muestras a 595 nm e interpolando los valores obtenidos en una recta patrón construida con cantidades conocidas de BSA.

2.2 Electroforesis en condiciones desnaturizantes y transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Para la realización de la electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida se utilizó el sistema de tampón discontinuo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Alícuotas conteniendo entre 40 y 50µg de proteína de los correspondientes extractos proteicos se mezclaron con el volumen adecuado de tampón de carga para proteínas (60 mM Tris pH 6.8, 10 % glicerol (v/v), 2 % SDS (p/v), 0.002 % azul de bromofenol (p/v)) suplementado con 20 mM DTT y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron en función de su peso molecular sometiénolas a electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes por la presencia del detergente iónico SDS (SDS/PAGE) y un tampón de electroforesis (25 mM Tris, 0.2 M glicina, 1 g/l SDS). Se emplearon geles de poliacrilamida a concentraciones finales del 8 %, 10 %, 12 % ó 15 % dependiendo del peso molecular de la proteína en estudio.

Una vez realizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se realizó en condiciones de humedad en una cubeta de electroforesis de Bio-Rad usando un tampón de transferencia (25 mM Tris, 0.2 M glicina, 20 % metanol (v/v), SDS 1 g/l), a 100 V durante 90 minutos. Las membranas transferidas se bloquearon por incubación en una solución rica en proteínas compuesta por TTBS (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.05 % Tween-20, pH 7.6) y 5 % de leche desnatada (p/v) o de albúmina en los casos en que las proteínas de la leche pudiesen interferir con la especificidad del anticuerpo, con agitación suave durante una hora a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo empleando la dilución y condiciones indicadas en la Tabla 2. Tras varios lavados con TTBS de 10 minutos cada uno, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Las membranas fueron sometidas a varios lavados de 10 minutos con TTBS. Finalmente, se incubaron con el reactivo comercial ECL, que permite la detección de los anticuerpos conjugados con peroxidasa, y se expusieron a películas autorradiográficas que se revelaron con un equipo Curix-60 de AGFA.

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Acetil-Histona H3 (K14)	Millipore	1:1000
β -actina	Sigma	1:5000
CBP	Santa Cruz	1:200(X)
CD32 A	Santa Cruz	1:1000
COX-2	Santa Cruz	1:500
cPLA2	Cell Signalling	1:1000
cRel	Santa Cruz	1:250
DAP12	Santa Cruz	1:500
FCeRI, sub γ	Millipore	1:1000
Hes 1	Santa Cruz	1:100 (X)
Hey 1	Santa Cruz	1:200 (X)
Histona H3	Millipore	1:5000
p38	Cell Signalling	1:1000
p44 Erk	Promega?	1:5000
p50	Santa Cruz	1:2000
<i>Phospho</i> -cPLA2 (Ser 505)	Cell Signalling	1:1000
<i>Phospho</i> -CREB (Ser133)	Millipore	1:1000
<i>Phospho</i> -p44erk	Promega	1:1000
<i>Phospho</i> -GSK 3 β	Cell Signalling	1:1000
<i>Phospho</i> -Histona H3 (Ser 10)	millipore	1:2000
<i>Phospho</i> -p38 (Th180/Tyr182)	Cell Signalling	1:1000
<i>Phospho</i> -p65 (Ser 276)	Cell Signalling	1.1000
<i>Phospho</i> -p65 (Ser 536)	Cell Signalling	1:1000
<i>Phospho</i> -Stat 1	Cell Signalling	1:1000
<i>Phospho</i> -Stat 3	Cell Signalling	1:1000
<i>Phospho</i> -SyK (Tyr525/526)	Cell Signalling	1:1000
<i>Phospho</i> -tirosina, clon 4G10	Millipore	1:1000
RelA/p65	Cell Signalling	1:1000
RelB	Santa Cruz	1:200
Syk	Santa Cruz	1:1000
TBP	Diagenode	1:20000
TLE	Santa Cruz	1:2000 (x)
TORC2	Santa Cruz	1:200

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en Western Blot e inmunoprecipitaciones, casas comerciales y las concentraciones utilizadas de cada uno de ellos.

3. ELISA

La PGE₂ y las citoquinas presentes en los sobrenadantes celulares se cuantificaron mediante el uso de *kits* comerciales de ELISA y siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso: PGE₂ e IL-10 de GE Healthcare, IL-12 p70 e IL-6 de Thermo Scientific, IL-23 e IL-1β de R&D Systems y TNF-α de Cayman.

4. Obtención de extractos nucleares

La extracción de los extractos celulares a partir de cultivos celulares se realizó empleando el *Nuclear Extract Kit* de Active Motif siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidas las proteínas nucleares, se valoraron según el método Bradford. Para el análisis de la activación de los factores de transcripción Sp1, Sp3, Runx-1, STAT, c/EBP, NF-YA y CREB, se usaron los *kits* comerciales *TransAM* de Active Motif.

5. Análisis de la expresión génica

5.1 Extracción del ARN total.

Se añadió 1 ml de Trizol (Invitrogen) para cada 5-10·10⁶ células, en placas de 100 mm de diámetro con células adherentes en semiconfluencia o, en el caso de células en suspensión, tras ser sedimentadas por centrifugación. Una vez conseguida una solución homogénea, se añadieron 200 μl de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. De esta forma se obtuvieron dos fases: la acuosa con el ARN y la orgánica con las proteínas y el ADN. A la fase acuosa se añadieron 500 μl de isopropanol o 250 μl de isopropanol y 250 μl de una solución de sales (0.8 M citrato sódico, 1.2 M NaCl) en el caso de muestras con gran contenido en polisacáridos. Se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con EtOH al 75 % en H₂O-DEPC y la muestra se resuspendió en H₂O-DEPC. La cantidad de ARN presente en la muestra se cuantificó en un NANO DROP (ratio A₂₆₀/A₂₈₀).

5.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se partió de muestras con 3 μg de ARN para obtener 20 μl de ADNc mediante el proceso denominado transcripción reversa (RT). Las muestra se diluyeron hasta un volumen de 11.1 μl en H₂O-DEPC y se calentaron durante 10 minutos a 68°C para permitir la completa disociación del ARN. Después se añadió a cada muestra: Tampón 5 X, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP, 4 μM N6 (mezcla de hexanucleótidos), 1 U/μl RNasin y 10 U/μl de transcriptasa inversa

del virus de la leucemia murina (RT M-MLV) y se incubaron durante una hora a 37°C para obtener el ADNc.

5.3 Análisis mediante PCR convencional

La amplificación de ADNc específico para cada gen a partir del producto de la reacción de RT se realizó mediante PCR. Para llevar a cabo la PCR se partió de 3 µl de ADNc y una mezcla de reacción consistente en 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 10 µM de cada cebador, 0.05 U/µl de Taq polimerasa, 0.5 µM de cada oligonucleótido específico y H₂O estéril hasta completar un volumen final de 25 µl. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador *MiniCycler™* de MJ Research. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de cinco minutos a 94°C seguida de una repetición de ciclos que incluye tres pasos: uno de desnaturalización durante un minuto a 94°C, otra de hibridación de los cebadores al molde (temperatura y tiempo variables en función del ADNc que se quiera amplificar) y otra de elongación durante un minuto a 72°C. Una vez completado el número de ciclos necesarios se realizó una elongación final de 10 minutos a 72°C. La secuencia de los cebadores utilizados se detalla en la Tabla 3. La amplificación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se realizó como control positivo de la integridad del ARN y como método de normalización semi-cuantitativa. Se emplearon las mismas condiciones de PCR que aquellas correspondientes al gen con que se compara. El producto de la reacción se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa de concentraciones comprendidas entre el 1 - 1.5 % (p/v) y los productos se identificaron por tinción con el agente intercalante bromuro de etidio o con *GelRed nucleic acid stain* (Biotium). Los geles fueron analizados y la señal de las bandas cuantificada empleando un sistema de análisis de imagen Gel Doc.

5.4 Análisis mediante PCR a tiempo real

La reacción de PCR se llevó a cabo empleando *SyBr Green I Master* (Roche), 1.5 µl de ADNc y 0.2 nM de cada cebador en un equipo de PCR *LightCycler®480 software* (Roche). La PCR constó de una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C seguida de una repetición de 40 ciclos con tres pasos: desnaturalización durante 30 segundos a 95°C, hibridación del ADN (temperatura y tiempo específicos para cada gen) y elongación durante un minuto a 72°C, finalizando con una elongación de 10 minutos a 72°C. La curva de fusión se obtuvo midiendo la emisión de fluorescencia para *SyBr Green* durante el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C a razón de 0.2°C/seg. La amplificación de GAPDH se usó como control interno. En los resultados mostrados se representa la media de los *cycle thresholds* (CT) para el gen que se

analiza con respecto a las CT para GAPDH. La secuencia de los cebadores usados se muestra en la Tabla 3.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Nº GeneBank
<i>CD206</i>	GCTGAACCTGGAAAAAGCTG	NM_002438
	ACGAAGCCATTTGGTAAACG	
<i>cox2</i>	TTCAAATGAGATTGTGGGAA	D28235
	AGATCATCTCTGCCTGAGTA	
<i>DC-SIGN</i>	AGGTCCCCAGCTCCATAAGT	NM_021155
	TCTCTGGAAGCTCACCCACT	
<i>dectin1 exón 1</i>	GGGCTCTCAAGAACAATGGA	AF400596
<i>dectin1 exón 6</i>	TTGGAGATGGGTTTTCTTGG	
<i>dectin1 exón 5</i>	CCCAGAGCCATGGTACCTC	
<i>dectin2 exón 1</i>	ACACAGGGAGCCTGCATAAT	NM_001007033
<i>dectin2 exón 2</i>	ACCAAATGTGCTCCCATCTC	
<i>dectin2 exón 4</i>	GTGCTTGCTTCATTGTGAGC	
<i>gapdh</i>	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	NM_002046.3
	AGGGGAGATTCAAGTGTGGTG	
<i>hes1</i>	TGAGCCAGCTGAAAACACTG	NM_005524
	GTCACCTCGTTCATGCACTC	
<i>hey1</i>	GAGAAGCAGGGATCTGCTAA	BC001873
	CCCAAACCTCGATAGTCCAT	
<i>il10</i>	GAGAACAGCTGCACCCACTT	NM_000572.2
	GGCCTTGCTCTTGTTTTCAC	
<i>il12 p35</i>	GAGGCCTGTTTACCATTGGA	NM000882
	TCAAGGGAGGATTTTTGTGG	
<i>il12 p40</i>	CATGGGCCTTCATGCTATTT	NM002187
	TTT GCATTG TCAGGTTTCCA	
<i>il23 p19</i>	GTTCCCATATCCAGTGTGG	NM_016584
	TTAGGGACTCAGGGTTGCTG	
<i>TLR-2</i>	GCCAAAGTCTTGATTGATTGG	NM_003264
	TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG	

Tabla 3. Cebadores sentido y anti-sentido para PCR y su secuencia de localización en Gene Bank.

6. Inmunoprecipitación

El día previo al experimento se lavaron las células con PBS y se incubaron en RPMI sin suero, suplementado con 1 % de ITS o 0.5% de BSA. A partir de los extractos celulares totales obtenidos con tampón de lisis TNE, se incubaron 2 mg de proteína junto con 20 µg del anticuerpo correspondiente (anti-DAP12 y anti-CD32, Santa Cruz; y anti-subunidad γ de Fc ϵ RI, Upstate Biotech) durante toda la noche en un rotor orbital a 4°C. Posteriormente, se añadieron 50 µl de bolas de *G Sepharosa* al lisado proteico-anticuerpo y se incubó durante dos horas en un rotor orbital a 4°C. Se centrifugaron las muestras y se recogieron los sobrenadantes. Las bolas de *G Sepharosa* precipitadas se lavaron varias veces con tampón TNE y se incubaron con tampón de *Laemmli* durante cinco minutos a 100°C. Los sobrenadantes fueron recogidos y utilizados para su análisis mediante Western Blot.

7. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Con el fin de analizar la unión directa de los factores de transcripción y de factores remodeladores de la cromatina, y para identificar modificaciones específicas en las histonas nucleosomales en los promotores se realizaron ensayos de ChIP. Salvo mención expresa, los reactivos utilizados fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc.

7.1 Fragmentación de la cromatina

Se cultivaron las células en placas de 100 mm de diámetro con 10^7 células dendríticas o con $3 \cdot 10^7$ macrófagos. Tras la estimulación se añadió directamente al medio de cultivo 1 % de formaldehído (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente para fijar las uniones entre las proteínas y el ADN. Para detener el entrecruzamiento proteína-ADN, se añadió 0.125 M de glicina durante cinco minutos. Las células se lavaron con PBS frío, se recogieron en tubos y se dejaron 30 minutos a 4°C con el tampón de lisis. Se centrifugó a 400 x g 5 minutos y se lavó el precipitado con PBS frío. El precipitado celular se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C. Para proceder a la fragmentación de la cromatina, se utilizó el sonicador *Bioruptor*TM (Diagenode). La frecuencia de ultrasonidos producida por el *Bioruptor*TM equivale a 20 kHz. A las muestras descongeladas se les añadió 300 µl de un tampón de lisis con alta salinidad. Los lisados celulares se sonicaron durante 30 minutos a máxima potencia con ciclos de 30 segundo de sonicación y 30 segundos de espera, obteniéndose fragmentos de ADN de un tamaño comprendido entre 100 y 1.000 pares de bases (pb). Los fragmentos sonicados se centrifugaron a 9.300 x g durante 15 minutos a 4°C. Este sobrenadante se utilizó como control positivo (*input*). La cantidad de cromatina obtenida se valoró utilizando el NanoDrop.

7.2 Visualización de la cromatina

Para comprobar la fragmentación de la cromatina en un gel de electroforesis, se tomaron 100 µl de la cromatina fragmentada a los que se añadieron 300 µl de H₂O estéril y 16 µl de NaCl al 5%. La mezcla se mantuvo durante 4 horas a 68°C para revertir el entrecruzamiento proteína-ADN. Después de atemperar las muestras, se añadieron 400 µl de fenol/cloroformo/isoamil alcohol, y tras mezclar vigorosamente se centrifugó a 14.000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. En la fase acuosa obtenida se añadieron 40 µl de acetato sódico 3 M y 1.000 µl de EtOH al 100% y se mantuvieron a -20°C durante toda la noche para facilitar la precipitación del ADN. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14.000 x g durante 25 minutos a 4°C. El nuevo precipitado se reconstituyó en 100 µl de H₂O estéril. Para la visualización, se tomaron 20 µl de la cromatina y se añadió RNasa durante 30 minutos a 37°C. Se utilizó un gel de agarosa al 1 % con marcadores de ADN y se visualizó con tinción de bromuro de etidio o *GelRed nucleic acid stain* (Biotium) para observar la eficiencia de la rotura.

7.3 CHIP

Para disminuir las uniones inespecíficas se incubó la muestra ($2 \cdot 10^7$ células) durante una hora en rotor orbital a 4°C en presencia de 50 µl de proteína A/G Plus Agarosa. Se centrifugó a máxima velocidad durante cinco minutos y se recogió el sobrenadante al cual se añadieron 10 µg del anticuerpo correspondiente y se incubó toda la noche en un rotor orbital a 4°C. Al día siguiente, se añadieron de nuevo otros 50 µl de proteína A/G Plus Agarosa y se incubó durante dos horas a 4°C en rotor orbital. La mezcla se centrifugó a 13.400 x g durante un minuto y se eliminó el sobrenadante. Se lavaron las bolas de A/G Plus Agarosa precipitadas dos veces con un tampón de alta salinidad y cuatro veces con un tampón de lavado. Para romper los entrecruzamientos y liberar el ADN, se añadió un tampón de elución y se incubó dos horas a 68°C. Para eliminar las partículas de agarosa se centrifugaron las muestras y los sobrenadantes resultantes se incubaron otras dos horas a 68°C. Para purificar el ADN, se dejaron atemperar las muestras antes de añadir 400 µl de fenol/cloroformo/isoamil alcohol. Se mezclaron y se centrifugaron a 14.000 x g durante 3 minutos a temperatura ambiente. A la fase acuosa obtenida se añadieron 40 µl de acetato sódico 3 M y 1 ml de EtOH al 70%, dejándolo toda la noche a -20°C para favorecer la precipitación. Las muestras se centrifugaron a 14.000 x g durante 25 minutos a 4°C y los precipitados se lavaron tres veces con EtOH al 70%. Finalmente, tras centrifugar a 14.000 x g 10 minutos a 4°C, se resuspendieron las muestras en 50 µl de H₂O estéril.

Una vez purificado el ADN, se realizaron las amplificaciones por PCR en 25 μ l de mezcla de reacción empleando oligonucleótidos específicos para cada promotor (Tabla 4). Para el uso de los cebadores de *il12p35*, las reacciones se suplementaron con betaína 1 mM debido al alto contenido en secuencias GC. El ADN amplificado se resolvió en un gel de agarosa entre el 1.5 y el 3%, dependiendo del tamaño del fragmento y visualizado por tinción con bromuro de etidio.

Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>gapdh</i>	GTCAGTGGTGGACCTGACCT
	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG
<i>il10</i>	GGCAATTTGTCCACGTCCT
	TGATTTCTGGGAGAACAG
<i>il23p19</i>	CTCTAGCCACAGCAACCACA
	ACTCACAGCAGGTGGGATTC
<i>il12p35</i>	GCGAACATTTTCGCTTTCATT
	ACTTTCCCGGGACTCTGG
<i>ptgs2</i>	AGGAGAGGGAGGGATCAGAC
	TTTACCCACGGAAATGAGAAA

Tabla 4. Cebadores sentido y antisentido utilizados para los ensayos de ChIP.

8. Citometría de flujo

8.1 Expresión de antígenos en la membrana plasmática

Se utilizaron $5 \cdot 10^5$ células por condición. En el caso de las células adherentes, se rasparon suavemente antes de su recuento y distribución. Las células se centrifugaron a 350 x g durante 5 minutos y el precipitado se resuspendió en 100 μ l de un tampón con PBS, 1 % de BSA (p/v) y 0.1 % de azida sódica (p/v). Por cada $5 \cdot 10^5$ células se añadieron 0.5 μ g del anticuerpo correspondiente y se incubaron durante 45 minutos en hielo. En el caso de los anticuerpos marcados con FITC, se lavaron las células con un tampón de PBS con 1 % de BSA y 0.1% de azida sódica y se fijaron en una solución de PBS con 1% de formaldehído para su análisis en el citómetro de flujo. Para aquellos anticuerpos que no estaban marcados con FITC fue necesaria una nueva incubación con un anticuerpo secundario marcado con FITC, que reconociera al primario durante 45 minutos a 4°C. Después se siguió el mismo proceso de lavado y fijación. Para el análisis de las muestras se utilizó un citómetro de flujo *Gallios* (Becton Dickinson).

8.2 Ensayos de fagocitosis

Los experimentos de fagocitosis se llevaron a cabo con $1 \cdot 10^6$ células por cada condición y con una concentración de 4-5 partículas de *zymosan* A conjugado con *Alexa Fluor 488*[®] (Invitrogen) por célula. Tras la estimulación, las células se lavaron cuatro veces en hielo con un tampón de PBS frío con 0.05 % de azida sódica. A continuación, las células se trataron con 300 U/ml de liticasa en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar las partículas de *zymosan* extracelulares. Después, se rasparon las células suavemente y se analizaron mediante el citómetro de flujo. Los análisis de los histogramas se realizaron utilizando el *software Kaluza*[™] 1.1 y *FlowJo* 7.6.5.

9. Ensayo de liberación de ácido araquidónico (AA)

Se utilizaron placas de cultivo de 6 pocillos con $1 \cdot 10^6$ células en suspensión ó $3 \cdot 10^6$ células adherentes. Se incubaron en medio RPMI sin suero con 0.25 % (p/v) de BSA y 0.25 μ Ci/ml de [H^3] AA durante toda la noche a 37°C, tiempo necesario para una óptima incorporación del [H^3] AA en los fosfolípidos de la membrana. Las células se lavaron dos veces con una solución de BSA deslipidada al 0.25 % (p/v) en PBS y se estimularon en medio de cultivo sin suero con BSA deslipidada al 1%. Transcurrida la estimulación, se tomaron 500 μ l de sobrenadante por un lado y 500 μ l de la porción celular recogida con Triton-X-100 al 0.1 %. Se determinó la radiactividad presente en los sobrenadantes y lisados celulares mediante líquido de centelleo en un equipo *LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter* (Beckman Coulter[™]).

10. Preparación de los diferentes estímulos.

- **Obtención de suero anti-ovoalbúmina**

Los anticuerpos de clase IgG anti-OVA se obtuvieron de la sangre de conejos previamente sensibilizados mediante inyección subcutánea de ovoalbúmina en adyuvante completo de Freud, seguido de inyecciones intramusculares de recuerdo con ovoalbúmina en solución salina. Tras la sensibilización, se sangraron los conejos para la obtención del suero. La sangre se dejó coagular durante varias horas, se centrifugó y se inactivó el suero obtenido durante 30 minutos a 56°C. El suero se almacenó a -20°C hasta su uso para la preparación de inmunocomplejos (IC).

- **Inmunocomplejos de IgG-ovoalbúmina**

Mediante el test de Heidelberg y Kendall se determinó la cantidad de anticuerpo necesaria para formar los IC a equivalencia. Para ello se mezclaron cantidades crecientes de anticuerpo con una cantidad fija de antígeno y se incubaron durante una hora a 37°C seguido de toda la noche a 4°C para permitir la interacción del anticuerpo con los epítomos del antígeno y la precipitación de los complejos insolubles. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y se lavaron con PBS. El precipitado final se resuspendió en NaOH 0.1 M. La concentración de la proteína se midió mediante la detección de la absorbancia a 280 nm. Posteriormente, se formaron los IC de acuerdo con la estequiometría obtenida en la reacción de precipitación cuantitativa y se lavaron con PBS estéril.

- **Zymosan A**

Partiendo de *Zymosan A (Sigma)* procedente de extractos de *Saccharomyces cerevisiae*, se diluyó en agua destilada a 20 mg/ml. La mezcla se hirvió durante 10 minutos y, una vez enfriado, se centrifugó a 2.000 x g durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con PBS estéril. Por último, se resuspendió en PBS y se almacenó a -20°C hasta su uso.

- **Unión de iC3b a los estímulos (opsonización)**

Para la opsonización del *zymosan* se incubó con suero fresco durante 30 minutos a 37°C en agitación manteniendo la proporción de 1 ml de suero por cada 3 mg de *zymosan*. Tras la incubación se lavó el precipitado abundantemente con PBS.

Resultados

Resultados

1. Objetivo: Caracterizar la respuesta de las células mieloides a los β -glucanos en función del entorno y el grado de diferenciación celular.

1.1 Diferenciación de las células mieloides y expresión de sus receptores de membrana

Los monocitos de la sangre periférica tienen gran plasticidad y pueden diferenciarse según distintos programas que les confieren diferentes características fenotípicas. Dependiendo de las señales a las que se exponen, los monocitos recién aislados pueden madurar hacia células dendríticas inmaduras (CDi) si están en presencia de GM-CSF e IL-4 o a macrófagos si se diferencian con suero humano inactivado (MØ SH) o con suero bovino fetal inactivado (FBS) suplementado con M-CSF (MØ M-CSF) (Figura 15). Según se produce el proceso de diferenciación, las células aumentan en tamaño y complejidad, y presentan morfologías y funciones distintas.

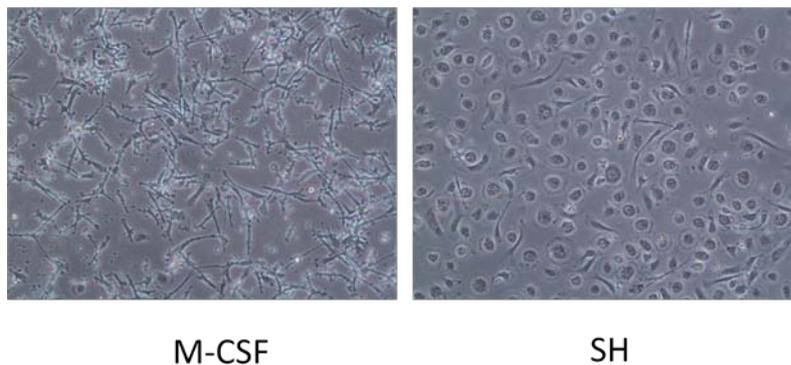


Figura 15. Imágenes de microscopía de campo claro de los macrófagos diferenciados en distintos medios. De izquierda a derecha están los macrófagos en presencia de un 10 % FBS y 10 ng/ml de M-CSF y macrófagos con 5 % SH durante siete días.

Las células mieloides responden de forma diferente a los estímulos derivados de la pared de los hongos dependiendo del proceso de diferenciación en el que se encuentren. Además de caracterizarlas por las diferencias en tamaño, morfología y capacidad de adhesión, se analizó el patrón de expresión de receptores de membrana mediante citometría de flujo, especialmente los receptores implicados en el reconocimiento de patrones fúngicos como el *zymosan* o alguno de sus componentes, mananos y glucanos.

Como se muestra en la Figura 16, no se observaron diferencias significativas entre las distintas poblaciones de macrófagos (paneles superiores). Ambos tipos celulares presentan poca expresión de CD16 y CD32, mayor expresión de TLR2 y una expresión moderada de dectin-1 y 2 (alrededor del 50% de la población). La positividad para DC-SIGN y MR (CD206) se detectó entre el 50-60% de las células.

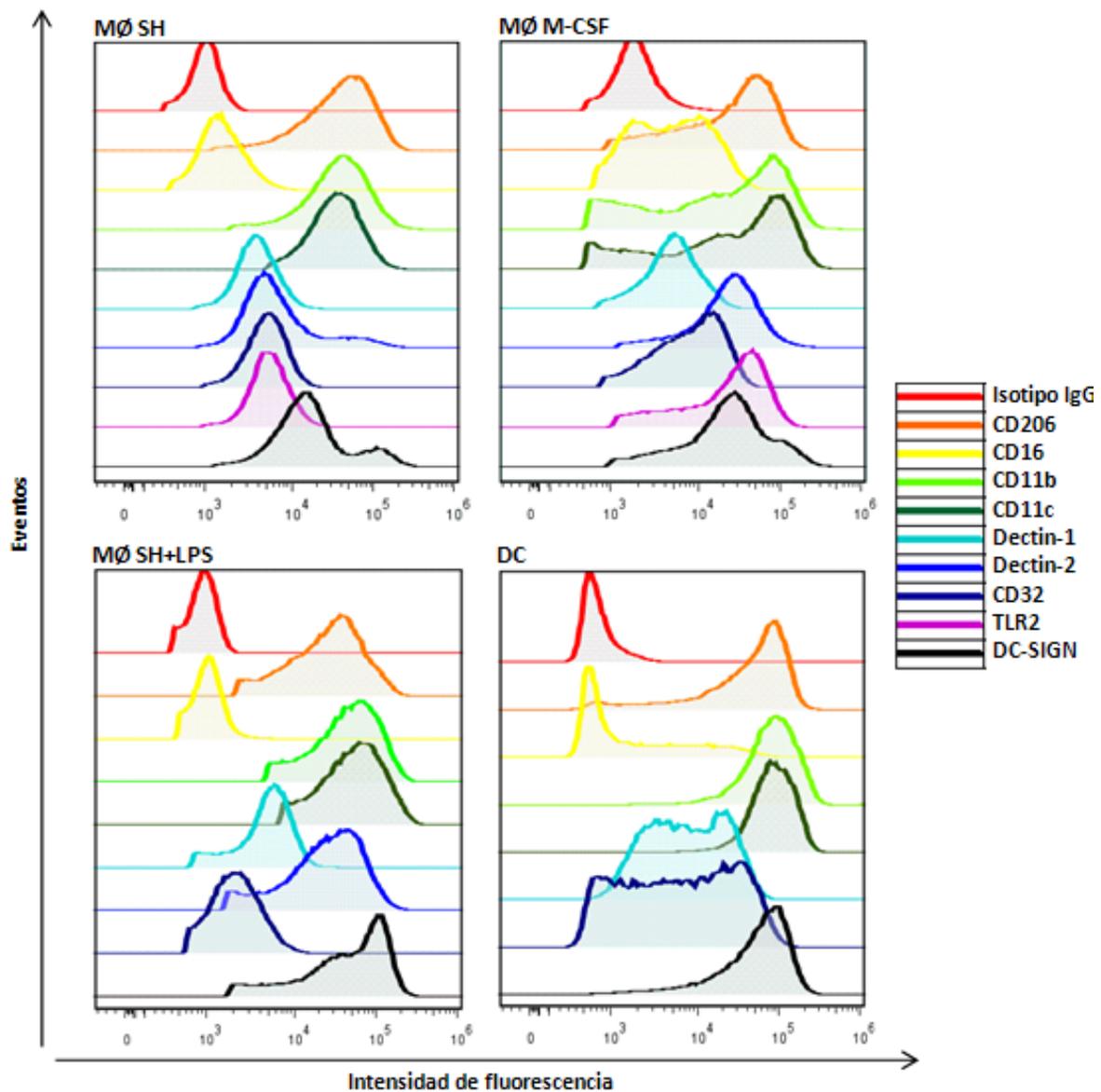


Figura 16. Expresión de receptores de membrana en macrófagos y células dendríticas. La expresión se estudió mediante citometría de flujo con anticuerpos específicos frente a los receptores indicados, con MØ SH y MØ M-CSF de siete días. Los MØ SH se pre-incubaron en ausencia o en presencia de 10 ng/ml de LPS durante tres horas. Se analizaron también las células dendríticas de cinco días. Los datos de citometría se procesaron mediante los *software* Kaluza™ y FlowJo. La gráfica es representativa de tres experimentos independientes con resultados similares.

En el caso de los MØ SH, la incubación durante tres horas con 10 ng/ml de LPS (denominado *priming* con LPS a partir de ahora) no generó un patrón de expresión diferente (Figura 16, panel izquierdo inferior), lo que está de acuerdo con las descripciones previas de que para que se puedan observar modificaciones de la expresión de superficie, la incubación con LPS tiene que ser mayor de tres horas (Willment *et al.*, 2003), detectándose a 24 horas una ligera disminución del MR (datos no mostrados). Se observó la mayor expresión de los receptores DC-SIGN, dectin-1 y dectin-2 en la población de células dendríticas en comparación con los macrófagos (Figura 16, panel inferior derecho), lo que concuerda con el efecto que tienen el GM-CSF y la IL-4 sobre la expresión de CLRs (Willment *et al.*, 2003).

Dectin-1 es el principal receptor de membrana implicado en el reconocimiento de los β -glucanos de las paredes fúngicas. El gen humano que codifica para el receptor tiene la capacidad de presentar empalme alternativo que genera diferentes isoformas (Figura 4), algunas presentan deleciones en la zona codificante del CRD, el cuello o la región transmembrana. Debido a este procesamiento alternativo y a las limitaciones con los anticuerpos que reconocen dectin-1 sin discriminar entre sus diferentes tipos, se realizaron análisis de RT-PCR para estudiar la expresión de estas isoformas a lo largo del proceso de diferenciación celular.

Al comienzo de la diferenciación, en los monocitos, solo se detectó la isoforma D, caracterizada por la ausencia de la región que codifica para el cuello del receptor y parte de la región del CRD. Según avanza la diferenciación celular disminuyó la expresión de la isoforma D y aparecieron las isoformas A y B en MØ SH y MØ M-CSF. En las células dendríticas de cinco días de diferenciación apenas se pudieron detectar las isoformas A y D, siendo la B la predominante (Figura 17, panel superior).

Para cuantificar los cambios en la expresión del receptor, se llevó a cabo un análisis mediante RT-PCR a tiempo real con cebadores específicos, abarcando las porciones extracelulares e intracelulares de *dectin-1* humano para detectar las isoformas A, B y D (Tabla 3). Los MØ M-CSF presentaron mayor expresión de dectin-1 global comparado con los MØ SH, y este aumento se debió principalmente a una mayor cantidad de las isoformas A y B, en especial de la B en detrimento de la D (Figura 17, panel inferior izquierdo).

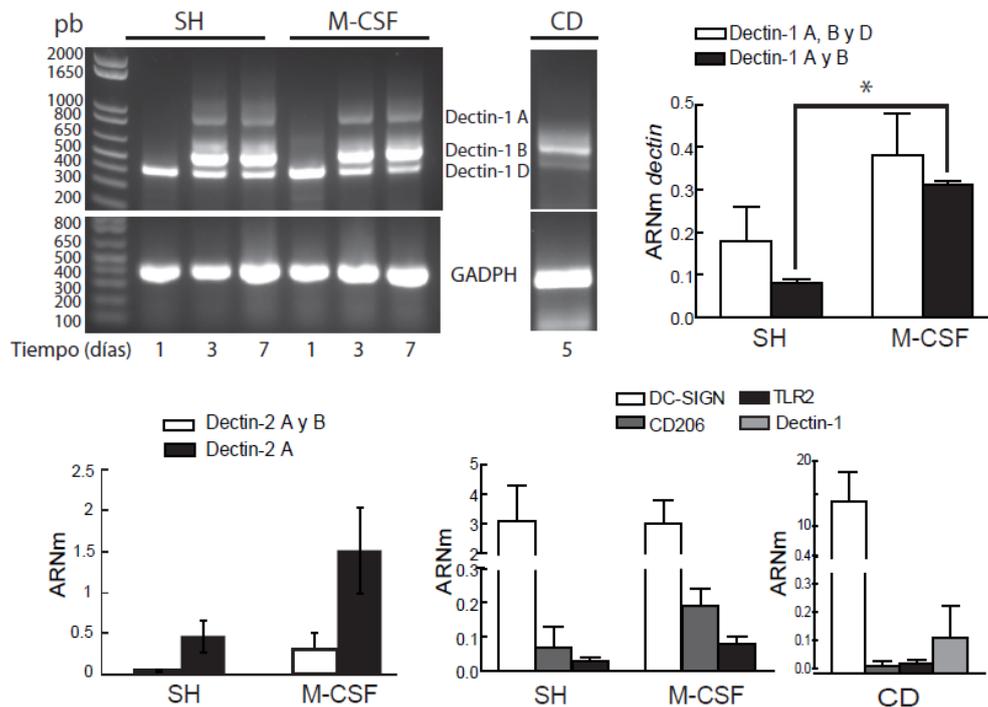


Figura 17. Niveles de expresión del ARN mensajero de los receptores. La identificación de las diferentes isoformas se realizó mediante la secuenciación del ADNc del producto de la RT-PCR. Las PCRs a tiempo real se llevaron a cabo con cebadores para las diferentes isoformas de dectin-1, dectin-2, DC-SIGN, CD206 y TLR2. Los resultados fueron normalizados por la expresión de *gadh*. Los resultados se representan como la media \pm DE de cuatro experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$.

El receptor dectin-2 también presenta un procesamiento alternativo que genera dos isoformas, una de las cuales es soluble y no se expresa en la membrana de las células. Mediante RT-PCR se analizó la expresión de ambas isoformas. Tanto en los MØ SH como en los MØ M-CSF, se detectó mayor expresión del receptor asociado a membrana, siendo mayor en el segundo caso (Figura 17).

También se analizó el ARN mensajero codificante para otros receptores posiblemente implicados en el reconocimiento de PAMPs fúngicos. DC-SIGN fue el receptor que mayor expresión presentó en todos los tipos celulares, especialmente en células dendríticas (Figura 17, panel inferior derecho), aunque éstas también expresaron CD206 y TLR2 en menor medida. El aumento de DC-SIGN estaría de acuerdo con el incremento de la expresión de los receptores de lectina tipo-C en los macrófagos de tipo M2 (Domínguez-Soto *et al.*, 2011). Estos resultados indicarían que en el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos se incrementa la expresión de diferentes isoformas de dectin-1 y DC-SIGN que permitirían un mejor reconocimiento de los mananos y β -glucanos de la pared celular de los hongos.

1.2 Fagocitosis del *zymosan*

Las células dendríticas y los macrófagos presentan una elevada capacidad fagocítica que les permite llevar a cabo correctamente sus funciones de procesamiento de antígenos y limpieza del medio extracelular. Para estudiar esta propiedad, se utilizaron partículas de *zymosan* conjugado con *Alexa Fluor®-488* opsonizado con suero humano fresco y sin opsonizar, se incubaron con las células durante periodos entre 5 y 120 minutos y se realizó la cuantificación de las partículas fagocitadas. Las células dendríticas fagocitaron con la misma facilidad ambos tipos de partículas (Figura 18), pudiendo alcanzar a los 15-30 minutos su máxima capacidad de captación. A los 30 minutos, alrededor del 100% de la población celular había sido capaz de fagocitar al menos una partícula. La media de intensidad de fluorescencia (MFI) aumentó proporcionalmente con el tiempo, siendo un indicador del número de partículas fagocitadas por cada célula.

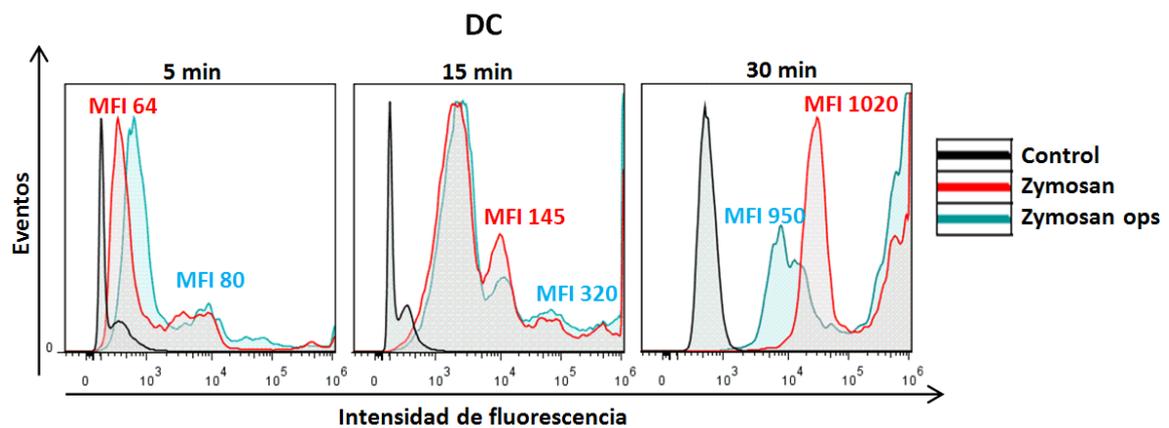


Figura 18. Fagocitosis de partículas de *zymosan* por células dendríticas. Las células se incubaron con cinco partículas de *zymosan Alexa Fluor®-488* por célula a 37°C opsonizado (ops) y sin opsonizar según los tiempos indicados. Se trataron con liticasa para eliminar las partículas de *zymosan* no fagocitadas. Los resultados se analizaron mediante citometría de flujo y el *software FlowJo*. La gráfica es representativa de tres experimentos independientes con resultados similares.

En el caso de los MØ SH y MØ M-CSF, se pudo observar un desfase en la captación de partículas dependiendo de si estaban o no recubiertas por iC3b (Figura 19, paneles superiores). Las partículas opsonizadas se fagocitaron a mayor velocidad y en mayor cantidad que el *zymosan* sin opsonizar. Entre el 80 y el 100 % de la población había captado al menos una partícula a los 30 minutos de incubación con *zymosan* opsonizado mientras que la fagocitosis del *zymosan* sin tratar se acercaba al 50 % de la población en el mismo rango temporal.

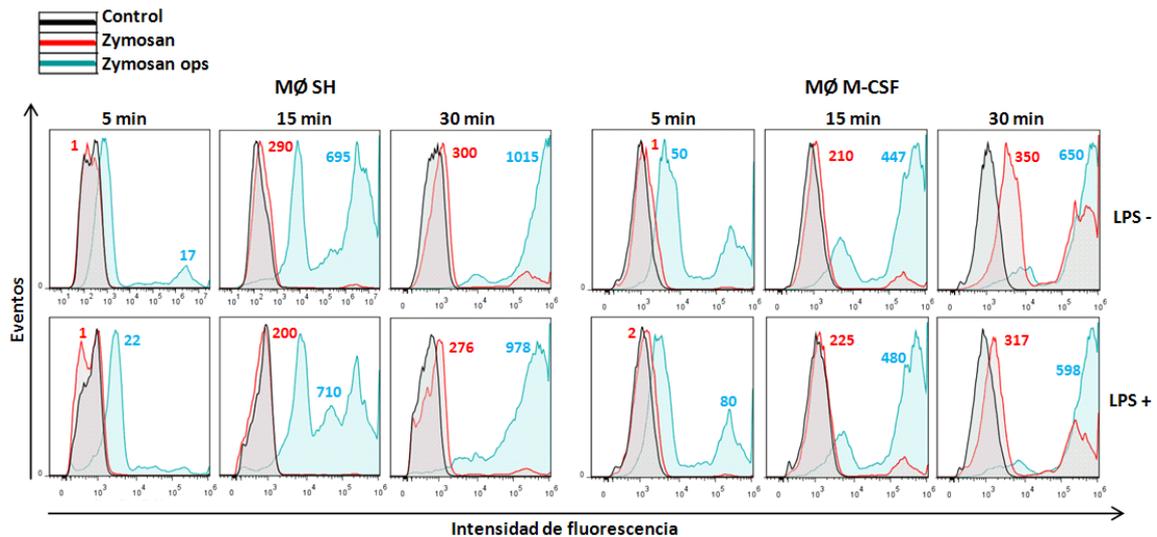


Figura 19. Fagocitosis de partículas de *zymosan* por macrófagos. Los MØ SH y MØ M-CSF se trataron en ausencia y en presencia de 10 ng/ml de LPS durante tres horas y se incubaron según los tiempos indicados con cinco partículas de *zymosan Alexa Fluor® 488* por célula a 37°C. Las células se trataron con litocasa para eliminar las partículas de *zymosan* no fagocitadas. Los resultados se analizaron mediante citometría de flujo y el *software FlowJo*. La Gráfica es representativa de tres experimentos independientes con resultados similares. Los números indicados son los datos de MFI en cada caso.

El patrón de captación no se influyó de forma apreciable por el proceso de diferenciación de los macrófagos, aunque en el caso de MØ SH se observó un ligero aumento en la captación de partículas por cada célula y un mayor número de células fagocitarias (Figura 19, paneles superiores). El tratamiento previo de los macrófagos con un *priming* de LPS durante tres horas no modificó la capacidad fagocítica de las células (Figura 19, paneles inferiores).

1.3 Producción y expresión de mediadores pro-inflamatorios

La estimulación de las células mieloides con compuestos derivados de la pared externa de los hongos genera una gran cantidad de respuestas que incluyen la liberación de

mediadores pro-inflamatorios como el ácido araquidónico (AA) o la prostaglandina E₂ (PGE₂), y la activación de genes implicados en la respuesta inflamatoria.

○ Liberación de ácido araquidónico (AA)

El ácido araquidónico es un producto formado en la cascada de señalización Syk/MAPK/fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂) que puede metabolizarse por enzimas como las ciclooxigenasas (COX) 1 y 2. Por este motivo, se analizó la liberación de ácido araquidónico marcado con tritio ([³H]AA) al medio de cultivo. Los monocitos y los MØ SH apenas liberaron cantidades detectables de [³H]AA cuando se trataron con *zymosan*, *zymosan* empobrecido en componentes que actúen a través de receptores tipo Toll (*zymosan* deplecionado) o partículas puras de β-glucano (Figura 20). Sin embargo, cuando los estímulos se opsonizaron con suero humano fresco aumentó la liberación de [³H]AA. En cambio, en las células dendríticas y MØ M-CSF, el *zymosan* sin tratar fue capaz de inducir la liberación en cantidades significativas de [³H]AA que, en el caso de las células dendríticas no se incrementó con la previa opsonización del estímulo, a diferencia del incremento notable que se observó al estimular los MØ M-CSF con *zymosan* opsonizado (Figura 20).

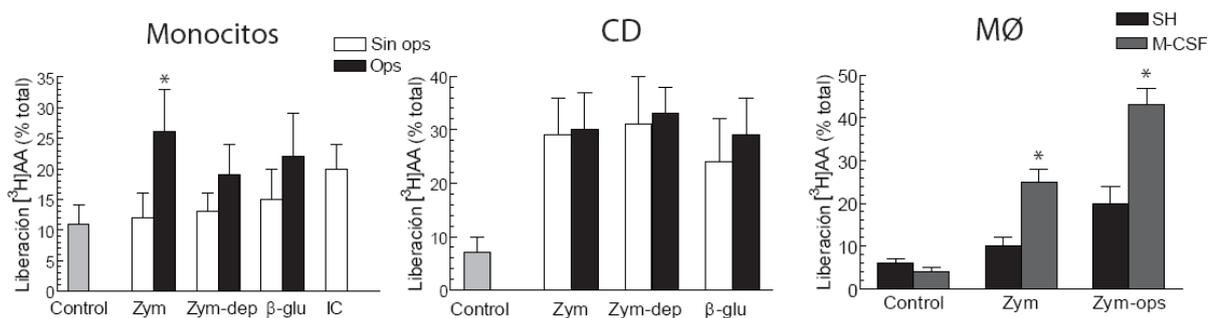


Figura 20. Liberación de [³H]-AA por monocitos, células dendríticas y macrófagos. Las células se marcaron con 0.2 μCi/ml de [³H]-AA y se incubaron durante 90 minutos con 1 mg/ml de *zymosan*, 1 mg/ml de *zymosan* deplecionado (*zym-dep*), 1 mg/ml de partículas de β-glucano (β-glu) y 100 μg/ml de inmunocomplejos (IC). Los resultados se representan como la media ± DE de cuatro experimentos independientes. *Indica p<0.05.

Para analizar los receptores que participan en la ruta de señalización que conduce a la liberación de ácido araquidónico mediada por estímulos derivados de la pared de hongos, se utilizaron MØ SH y se pre-incubaron con anticuerpos bloqueantes para dectin-1, CD11b, CD11c, CD32 A y sus combinaciones. Solo en presencia del anticuerpo anti-CD32A se observó una disminución de la liberación del [³H]AA en el caso de la estimulación de las células con partículas de β-glucano opsonizadas (Figura 21, panel izquierdo), pero no se inhibió la

liberación con ninguno de los otros anticuerpos bloqueantes. Para determinar si el receptor implicado era dectin-1, se utilizaron células derivadas de médula ósea (BMDC) de ratones silvestres (WT) y deficientes en dectin-1 (KO) diferenciadas a macrófagos en presencia de M-CSF. Las células deficientes en dectin-1 no presentaron liberación de [³H]AA en respuesta al *zymosan* ni a sus derivados enriquecidos en β-glucanos, a diferencia de lo ocurrido en las silvestres (Figura 21, panel derecho), lo que indicaría la participación de dectin-1 en la liberación del ácido araquidónico inducida por β-glucanos.

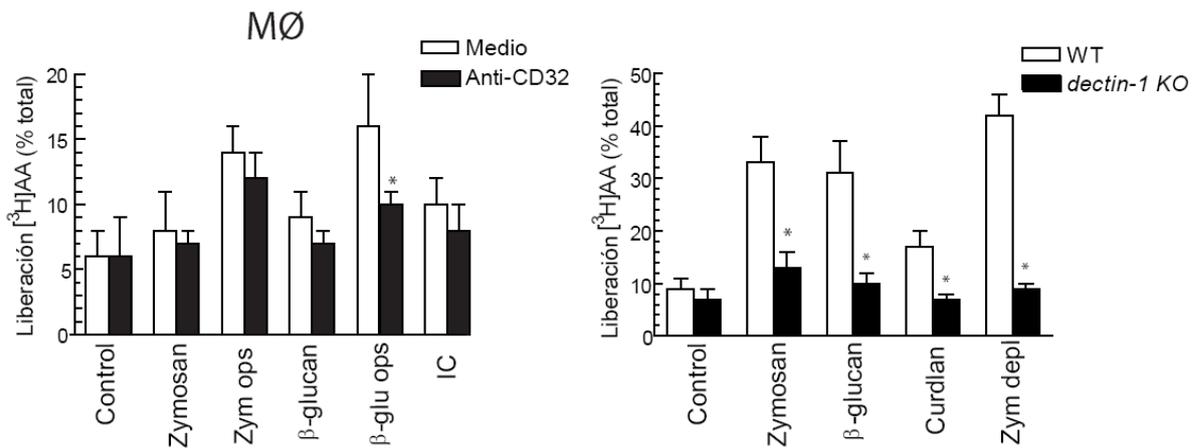


Figura 21. Liberación de [³H]-AA por macrófagos humanos y de ratón. Las células se marcaron con 0.2 μCi/ml de [³H]-AA y se incubaron durante 90 minutos con 1 mg/ml de *zymosan*, 1 mg/ml de *zymosan* deplecionado, 1 mg/ml de partículas de β-glucano, 100 μg/ml de inmunocomplejos (IC) o 100 μg/ml de curdlan. En el caso del tratamiento con anti CD32, las células se incubaron con 10 μg/ml de anticuerpo durante 30 minutos previos a la estimulación. Los resultados se representan como la media ± DE de cinco experimentos independientes. *Indica p<0.05.

La liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de las membranas depende de la actividad de la enzima cPLA₂. Para determinar si los cambios en la capacidad para liberar ácido araquidónico observados en los diferentes tipos celulares pudieran explicarse por variaciones en el contenido de cPLA₂ (Parti *et al.*, 2010), se analizó su expresión. No se detectaron cambios en la expresión de la enzima a lo largo del proceso de diferenciación desde monocitos a macrófagos tanto con SH como con M-CSF (datos no mostrados).

○ Producción de prostaglandina E₂ (PGE₂)

La PGE₂ es el principal metabolito derivado del ácido araquidónico que se libera en las células dendríticas y en los macrófagos en respuesta a PAMPs fúngicos. Por este motivo, se estudió el efecto del *zymosan* sobre la producción de PGE₂ en macrófagos bajo diferentes condiciones. Después de tres horas de incubación con *zymosan* apenas se detectó producción

de PGE₂ en los sobrenadantes de los MØ SH, llegando a 0.5 ng/ml si se dejaba actuar el estímulo 24 horas (Figuras 22 y 24). Un *priming* con LPS indujo por sí mismo la producción de PGE₂ y también modificó el patrón de respuesta al *zymosan*, al incrementar significativamente los niveles de PGE₂ secretados a las 3 y a las 24 horas (Figuras 22 y 24). Estos datos sugieren que bajas dosis de LPS muestran sinergismo con el *zymosan* en los MØ SH. Por el contrario, los MØ M-CSF, produjeron mayor cantidad de PGE₂ que los MØ SH y no se observó una respuesta sinérgica inducida por el *priming* con LPS (Figura 22).

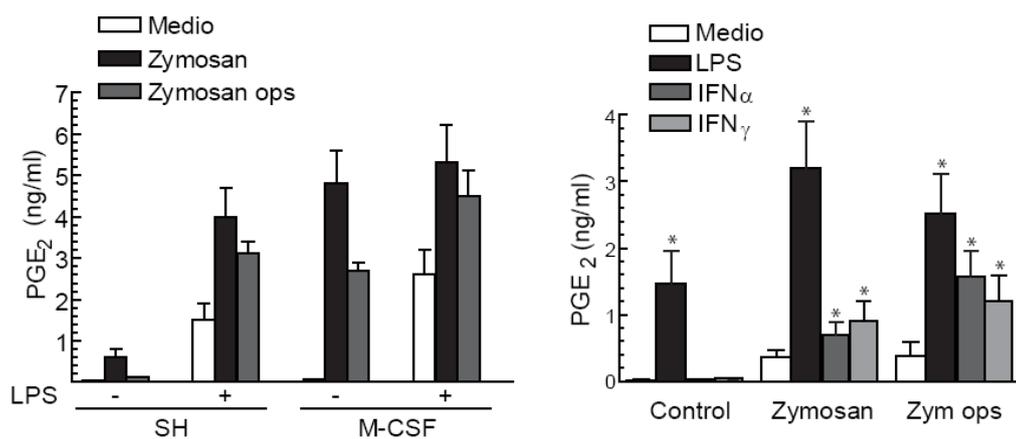


Figura 22. Producción de PGE₂ por macrófagos a las 24 horas. MØ SH y MØ M-CSF se pre-incubaron en presencia y en ausencia de 10 ng/ml de LPS o de 100 U/ml de IFN durante tres horas y se incubaron durante 24 horas con 1 mg/ml de *zymosan*. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$.

Un efecto similar al del LPS se pudo observar cuando se pre-incubaron las células con bajas dosis de IFN- α o IFN- γ (Figura 22, panel derecho) y posteriormente se estimularon con *zymosan*. A diferencia del LPS, ninguno de los IFN produjo por sí mismo secreción de PGE₂ pero sí potenciaron la eficiencia de los estímulos.

También se realizaron experimentos con los componentes del *zymosan* por separado. Por sí mismos, los mananos y los glucanos tienen una capacidad limitada de producción de PGE₂, siendo menor la PGE₂ en el caso de la estimulación con manano. El *priming* con LPS produjo un aumento sinérgico de la respuesta (Figura 23, panel izquierdo) similar al visto con el *zymosan*. Estos resultados indicarían que la respuesta del *zymosan* se ve potenciada por estímulos que generan macrófagos polarizados hacia tipo M1 y por M-CSF.

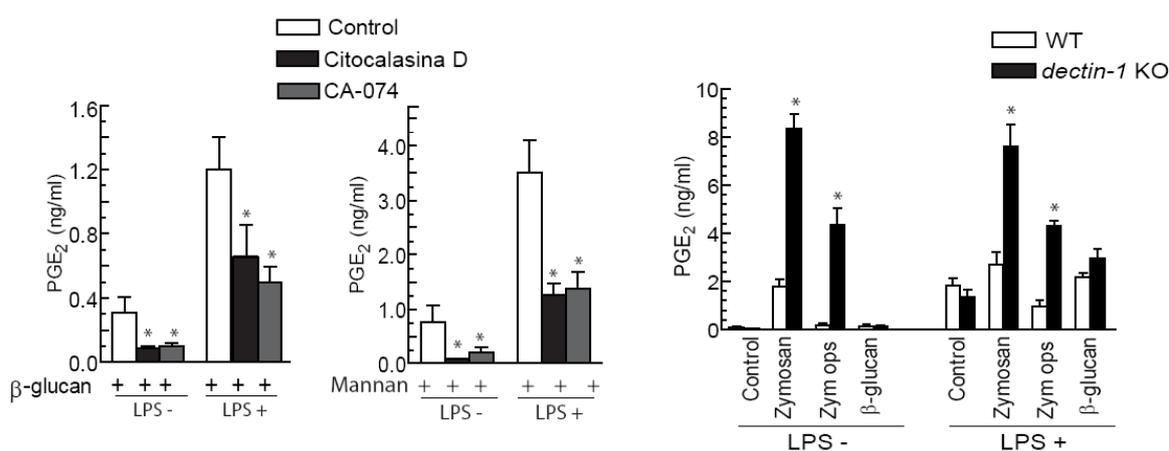


Figura 23. Producción de PGE₂ por macrófagos humanos y de ratón y efecto del inhibidor catepsina y los compuestos que bloquean la fagocitosis. Los MØ SH se pre-incubaron en ausencia o en presencia de 10 ng/ml de LPS durante tres horas. En los casos indicados se trataron también con 2 μM de citocalasina D y 10 μM de CA-074 durante 30 minutos y finalmente se incubaron con 1 mg/ml de *zymosan*, 1 mg/ml de partículas de β-glucanos y 1 mg/ml de manan durante 24 horas. Los resultados se representan como la media ± DE de cuatro experimentos independientes. *Indica p<0.05.

Mediante el uso de ratones deficientes en *dectin-1* se analizó la participación de este receptor en la liberación de PGE₂ (Figura 23, panel derecho). Se midió la producción 24 horas después de estimular las células y se observó que el *zymosan* se comportaba como un estímulo potente, a diferencia de la ausencia de respuesta provocada por las partículas de β-glucanos. Sorprendentemente, la respuesta del *zymosan* fue mayor en las células deficientes en *dectin-1* comparadas con las silvestres y el *priming* con LPS no modificó la respuesta en ninguno de los casos. Estos datos sugieren que deben ser otros componentes del *zymosan* como los mananos, que son reconocidos por otros receptores diferentes a *dectin-1*, los implicados en la producción tardía de PGE₂.

Como el *zymosan* es una partícula fagocitable, se realizaron experimentos encaminados a discriminar entre la respuesta generada por los PAMPs contenidos en el *zymosan* en su interacción con los PRRs, y la respuesta debida a que sea una partícula que pueda ser reconocida por mecanismos independientes de la unión a receptores y ejercer su efecto desde el fagosoma. Para ello, se utilizó un inhibidor de la fagocitosis que impide la elongación y polimerización de los filamentos de actina, la citocalasina D, el inhibidor de la proteasa lisosomal catepsina B (CA-074) y el estabilizador lisosomal PVNO.

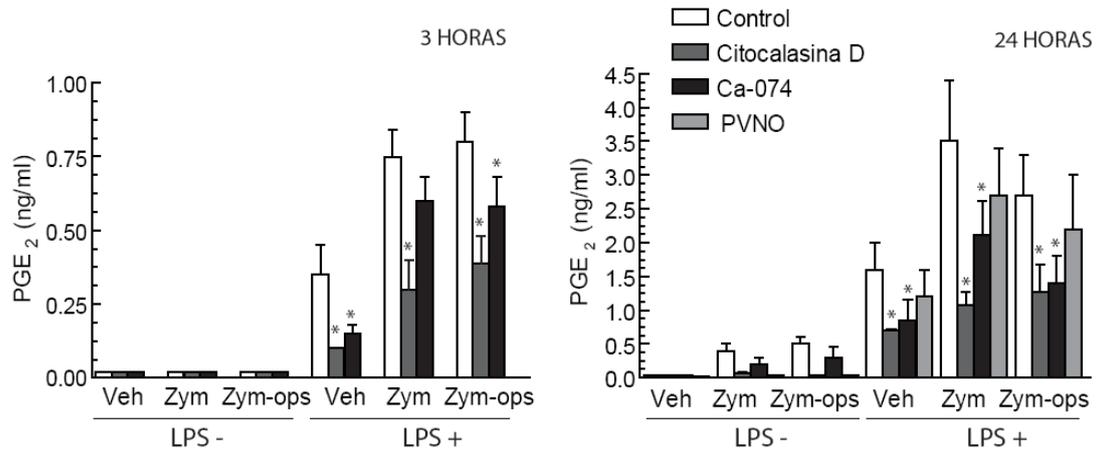


Figura 24. Producción de PGE₂ por macrófagos a 3 y 24 horas. MØ SH en presencia y en ausencia de 10 ng/ml de LPS durante tres horas, se trataron con 2 µM de citocalasina D y 10 µM de CA-074 durante 30 minutos y 20 µg/ml de PVNO durante 6 horas. A continuación, se incubaron durante 24 horas con 1 mg/ml de *zymosan*. Los resultados se representan como la media ± DE de tres experimentos independientes. *Indica p<0.05.

Como se muestra en la Figura 24, la citocalasina D y el CA-074 inhibieron tanto la respuesta del *zymosan* como la del *zymosan* opsonizado y sus componentes, mananos y glucanos (Figura 23). En cambio, el inhibidor PVNO no disminuyó la producción de PGE₂ en ninguno de los casos. Estos resultados indicarían que la captación de partículas al fagosoma y la extravasación de catepsina B al citosol podrían estar implicadas en la producción de PGE₂ generada por el *zymosan*.

○ Expresión de COX-2

La producción de PGE₂ depende de la actividad de dos enzimas: COX-1, que se expresa constitutivamente y COX-2, que es una enzima inducible. Para estudiar su implicación en la producción de PGE₂ cuando se estimulan las células con patrones fúngicos, se analizó su expresión. En los macrófagos estimulados con *zymosan*, COX-2 se indujo ligeramente a partir de las dos horas, detectándose la mayor expresión de la enzima a las 6 horas de estimulación, en cambio esto no ocurrió en el caso del *zymosan* opsonizado y no se detectaron diferencias significativas entre la expresión de COX-2 en los MØ SH y MØ M-CSF (Figura 25, panel izquierdo). La diferenciación de los macrófagos con M-CSF no produjo por sí misma inducción marcada de COX-2 (Figura 25, panel izquierdo). Utilizando un estímulo particulado inerte, bolas de látex en vez de *zymosan*, para discriminar entre la posible inducción generada por la fagocitosis o por el reconocimiento de PAMPs fúngicos, se observó una expresión de COX-2 pero mucho menor que la inducida en el caso del *zymosan* (Figura 25, panel derecho).

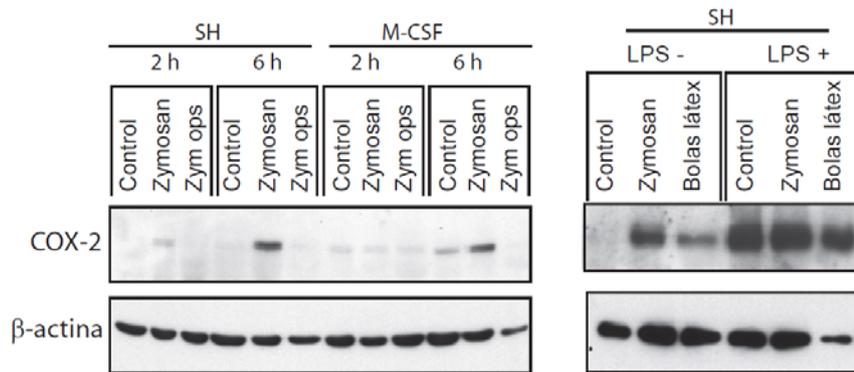


Figura 25. Expresión de COX-2 en macrófagos. MØ SH y MØ M-CSF estimulados con 1 mg/ml de *zymosan* durante 2 y 6 horas (panel izquierdo). Los MØ SH se pre-incubaron en ausencia y en presencia de 10 ng/ml de LPS durante tres horas, se estimularon con 60 partículas de bolas de látex/célula durante seis horas. Los lisados celulares se usaron para la inmunodetección de la proteína COX-2, utilizándose la proteína β -actina como control de carga. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

La inducción de la enzima no se vio afectada cuando se hizo una pre-incubación con dosis bajas de IFN- γ (Figura 26). En cambio, tratando los macrófagos con bajas dosis de LPS se pudo observar una fuerte inducción de COX-2 en condiciones basales. En el caso de las pre-incubaciones con IL-4, usada para favorecer una diferenciación a macrófagos de tipo M2, ésta indujo una expresión de la enzima detectable a partir de las dos horas de la adición del estímulo, aunque menor que con LPS.

Estos datos indicarían que aunque la diferenciación con M-CSF y la pre-incubación con LPS e IFN- γ incrementan la producción de PGE₂ en los macrófagos, estos efectos no pueden ser explicados solo por el aumento de la expresión de COX-2 y cPLA₂, y el efecto de *priming* se debe a distintos mecanismos.

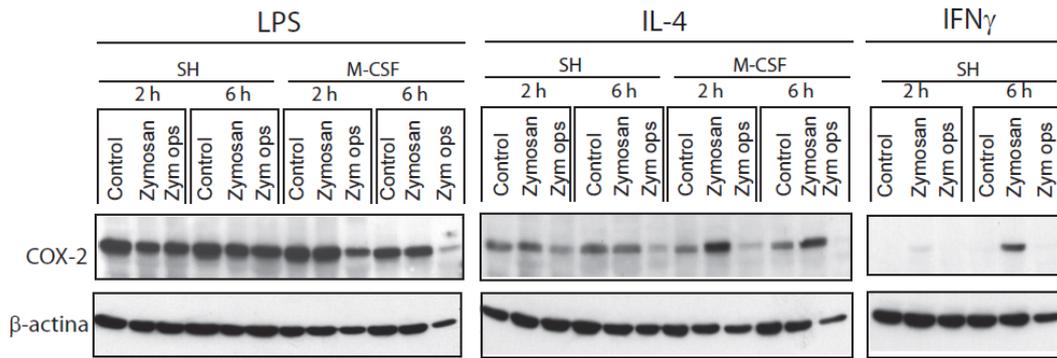


Figura 26. Expresión de COX-2 en macrófagos sometidos a *priming* con distintas adiciones. MØ SH y MØ M-CSF pre-incubados durante tres horas con 10 ng/ml de LPS, 500 U/ml de IL-4 o 100 U/ml de IFN γ . Se estimularon en ausencia y en presencia de 1 mg/ml de *zymosan* durante los tiempos indicados. Se utilizaron lisados celulares totales para la inmunodetección de la proteína COX-2. La proteína β -actina se utilizó como control de carga. El resultado es representativo de tres experimentos independientes con resultados similares.

1.4 Patrón de liberación de citoquinas

En muchos sistemas celulares el *zymosan* es un potente estímulo en la liberación de citoquinas como TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-23 (Dillon *et al.*, 2006; Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007). Para comprobar en nuestro sistema de macrófagos humanos cómo afectaba la estimulación con estímulos de la pared de hongos sobre la producción de citoquinas, se estimularon las células con *zymosan* y con sus diferentes componentes. Como se muestra en la Figura 27 panel izquierdo, el *zymosan* indujo la producción de TNF- α en MØ SH pero en cantidades menores que las observadas en otros tipos celulares como las células dendríticas (datos no mostrados). La producción de TNF- α se inhibió solo cuando se estimularon las células con partículas de β -glucano en presencia de anticuerpos bloqueantes para los receptores dectin-1 y CD32, pero no se detectó esta disminución con los otros estímulos.

Se ha descrito recientemente que el *zymosan* induce IL-1 β por mecanismos que implican la activación del inflamasoma NLRP3 (Kankkunen *et al.*, 2010), con estos antecedentes se estimularon los macrófagos con *zymosan* o *zymosan* opsonizado. En ambos casos solo se produjeron pequeñas cantidades de IL-1 β en presencia de un *priming* con LPS y este efecto se incrementó en presencia de 10 mM ATP (control positivo de la activación del inflamasoma) (Figura 27, panel derecho).

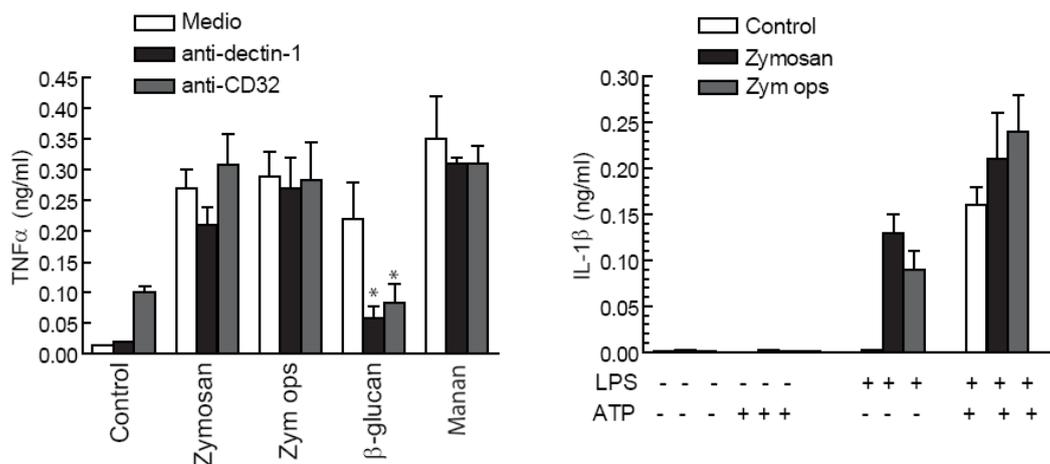


Figura 27. Producción TNF- α e IL-1 β por MØ SH. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 1 mg/ml de partículas β -glucano o 1 mg/ml de manano durante 24 horas y se midió la concentración de TNF- α e IL-1 β en los sobrenadantes. En los casos indicados se pre-incubaron las células con 10 ng/ml de LPS y/o 10 mM ATP, 10 μ g/ml de anticuerpo anti-CD32 o anti-dectin-1 durante 30 minutos. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$.

A diferencia de la baja efectividad que presentó el *zymosan* para estimular la producción de TNF- α e IL-1 β , se detectaron cantidades elevadas de IL-23 e IL-6 que no se vieron afectadas por el *priming* con LPS en los MØ SH (Figura 28, paneles izquierdos). A diferencia de los resultados observados en la liberación del ácido araquidónico y en la producción de PGE₂, los MØ M-CSF produjeron una menor cantidad de IL-6 e IL-23 que los MØ SH. Para comprobar cuál de los componentes del *zymosan* estaba implicado en esta respuesta, se analizó la participación del receptor β de β -glucanos dectin-1. Cuando se utilizaron los macrófagos de ratón deficientes en dectin-1, se observó una mayor liberación de IL-6 en el caso de los ratones deficientes en el receptor que en los silvestres (Figura 28, panel derecho), lo que es similar al patrón observado en la producción de PGE₂.

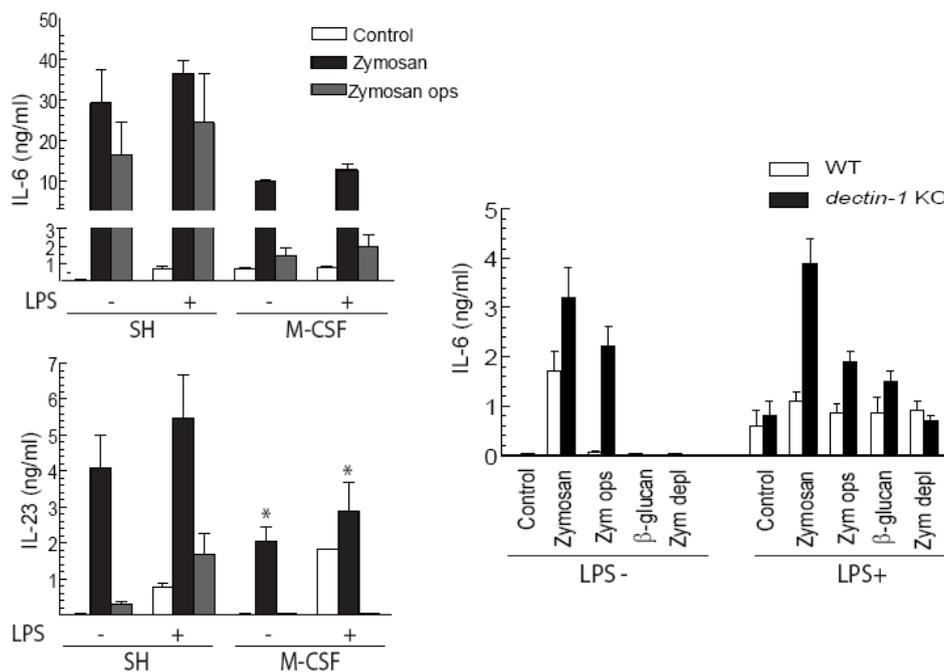


Figura 28. Producción de IL-6 e IL-23 por MØ SH humanos y macrófagos de ratón. Las células se pre-incubaron en los casos indicados con 10 ng/ml de LPS durante tres horas y se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 1 mg/ml de partículas β -glucano y 1 mg/ml de manan durante 24 horas. Al cabo de ese tiempo se midieron en los sobrenadantes las citoquinas indicadas. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$.

1.5 Proteínas adaptadoras y activación de NF- κ B

○ Proteínas adaptadoras y fosforilaciones en tirosina

Un mecanismo eficiente para potenciar la unión del *zymosan* con la célula es proceder a la opsonización con suero humano fresco para que pueda interactuar con las integrinas de la membrana que son los receptores de C3bi. Las integrinas y receptores de lectina tipo-C como *dectin-2* reclutan proteínas adaptadoras que contienen motivos ITAM e inician la cascada de señalización que implica la activación de Syk (Mócsai *et al.*, 2006). Con estos antecedentes, se analizó el efecto del *zymosan* sobre las fosforilaciones de la proteína adaptadora DAP12, la cadena- γ del receptor Fc y el receptor CD32. Cuando se estimularon los MØ SH con *zymosan* o *zymosan* opsonizado durante un minuto, no se detectó ninguna fosforilación en la cadena- γ a pesar de que las células presentaban gran cantidad de la misma (Figura 29, paneles izquierdos). Cuando los experimentos se llevaron a cabo con un *priming* con LPS, se detectó una pequeña cantidad de cadena- γ fosforilada en tirosina, pero sin observarse diferencias

entre los macrófagos estimulados y los controles. En cambio, sí se detectó un aumento en la fosforilación de DAP12 en presencia de *zymosan*, tanto opsonizado como sin opsonizar, un minuto después de la estimulación. CD32 se detectó basalmente fosforilado en tirosina, aumentando ligeramente esta fosforilación en presencia de los diferentes estímulos (Figura 29, paneles derechos), si bien el aumento de las fosforilaciones en las células estimuladas fue difícilmente reproducible.

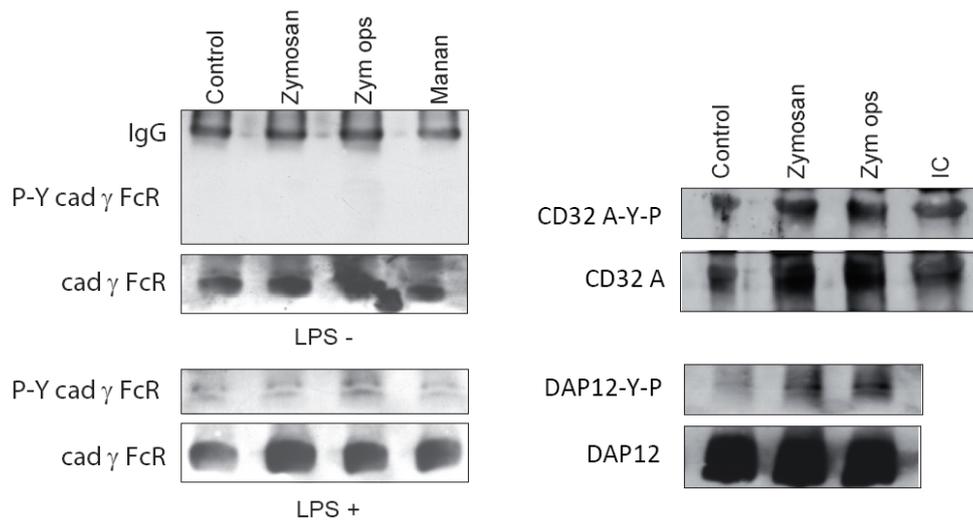


Figura 29. Inmunoprecipitaciones y fosforilaciones en tirosina (Y) en macrófagos. El día previo al experimento se retiró el suero a los MØ SH y se suplementó con BSA. Se pre-incubaron en los casos indicados con 10 ng/ml de LPS durante tres horas y se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 1 mg/ml de manan y 0.1 mg/ml de IC durante un minuto. Los lisados celulares se utilizaron para inmunoprecipitar con un anticuerpo frente a la cadena- γ del receptor Fc, anti-CD32A y anti-DAP12. Se separaron las proteínas en un gel SDS/PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usada para la inmunodetección de las proteína indicadas.

Para comprobar que las proteínas adaptadoras fosforiladas activaban Syk, se analizó la fosforilación de las tirosinas Y525/526 de Syk a diferentes tiempos. Con un minuto de estimulación ya se pudo detectar la fosforilación de Syk, especialmente cuando se incubaron las células con *zymosan* opsonizado (Figura 30).

Tomados colectivamente, estos resultados indicarían que tanto el *zymosan* normal como el opsonizado activan Syk rápidamente en los macrófagos por un mecanismo en el que podrían participar la proteína adaptadora DAP12 y la fosforilación basal de CD32A.

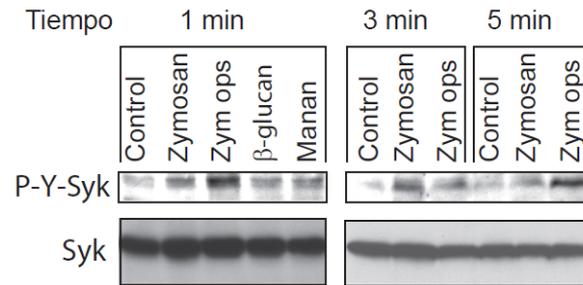


Figura 30. Fosforilación de Syk en macrófagos humanos. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 1 mg/ml de partículas glucano y 1 mg/ml de manan durante los tiempos indicados. Se utilizaron los lisados totales para detectar la fosforilación de Y525/526 de Syk mediante un anticuerpo fosfoespecífico. Los resultados son representativos de cuatro experimentos con resultados similares.

○ Activación de la ruta NF- κ B

Como las proteínas de la familia de NF- κ B participan en la regulación transcripcional de *cox-2* (gen *ptgs2*) puesto que éste contiene sitios κ B en el promotor, se estudió la activación y translocación de las proteínas NF- κ B al núcleo celular en M ϕ SH. Cuando se incubaron las células tras *priming* con LPS, se observó una rápida activación de los factores de la familia NF- κ B al detectarse la translocación de RelA/p65 al núcleo al cabo de una hora (Figura 31, panel izquierdo). Posteriormente RelA/p65 desapareció del núcleo para volver a reaparecer a las cinco horas, lo que sugiere que esta segunda aparición puede deberse a mecanismos indirectos en los que participarían mediadores secundarios inducidos por la acción de LPS.

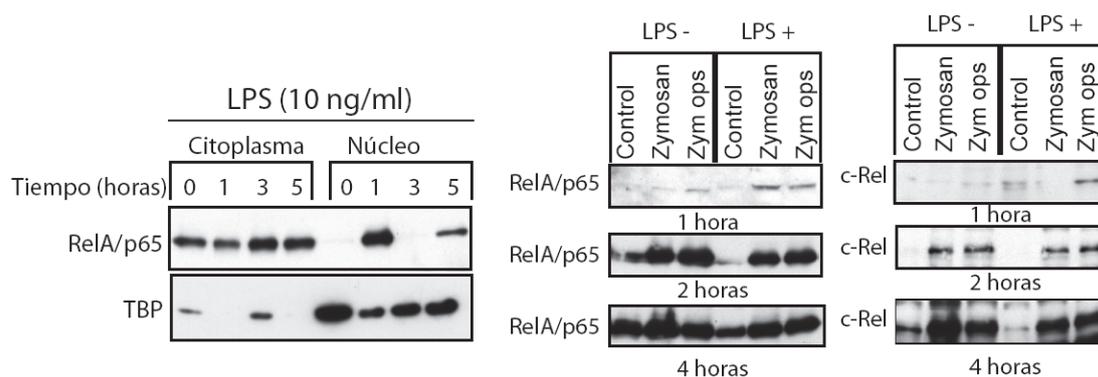


Figura 31. Translocación nuclear de diferentes proteínas de la familia NF- κ B en macrófagos. Los M ϕ SH fueron pre-tratados en ausencia y en presencia de 10 ng/ml de LPS e incubados con 1 mg/ml de *zymosan*. A los tiempos indicados se recogieron las fracciones nucleares para la inmunodetección de c-Rel y RelA/p65. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. La proteína TBP (*TATA box binding protein*) se usó como control de carga.

Cuando se estimularon los M ϕ SH con *zymosan*, se detectó la translocación nuclear de RelA/p65 y c-Rel dos y cuatro horas después de añadir los estímulos, lo que sugiere un patrón de respuesta más lento que el detectado en el caso del LPS (Figura 31, paneles derechos). En cambio, p50 se detectó tanto en las células estimuladas como en las controles, sin diferencias entre ambas condiciones (datos no mostrados), lo que concuerda con la distribución habitual de este miembro de la familia NF- κ B, que se encuentra en el núcleo en las células no activadas. En cualquiera de los casos anteriores, la translocación nuclear no se vio afectada por el *priming* con LPS.

En el promotor de *cox-2* se detectó aumento de la unión del factor RelA/p65 en las células con *priming* con LPS y posterior estimulación con *zymosan* a las dos horas (Figura 32). Sin embargo, no se pudo demostrar aumento de la unión de c-Rel al promotor, aunque también se había observado un aumento de la translocación al núcleo tras la estimulación con *zymosan*.

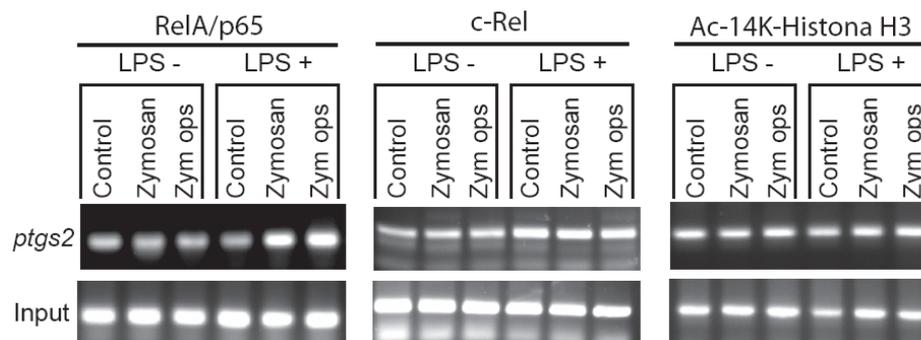


Figura 32. Efecto del *zymosan* sobre RelA/p65, c-Rel y la acetilación de la histona H3 en macrófagos. Los M ϕ SH se pre-incubaron en ausencia y en presencia de 10 ng/ml de LPS durante tres horas y se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* durante dos horas. Una vez fijadas se realizó el ensayo de ChIP. Se muestra la electroforesis de un experimento realizado mediante PCR a tiempo real de 40 ciclos con los cebadores para *ptgs2*. Se utilizó el input como control positivo.

Se ha descrito que la acetilación de la histona H3 disminuye en la diferenciación a M ϕ tipo M2 como consecuencia de la activación del factor Krüppel (Liao *et al.*, 2011), sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles de acetilación de la histona H3 en el promotor de *ptgs2* entre las células sometidas a *priming* y las controles (Figura 32).

2. Objetivo: Estudiar la regulación de la producción de IL-10 en los monocitos derivados a células dendríticas.

2.1 Producción de IL-10 por diferentes estímulos

El *zymosan* es un potente estímulo para la producción de IL-10 por las células dendríticas. La liberación de la citoquina se inició cuatro horas después de la estimulación con *zymosan* y aumentó hasta las 24-30 horas. Otros estímulos como el LPS e IC produjeron liberación de IL-10, pero no de forma tan eficiente (Figura 33).

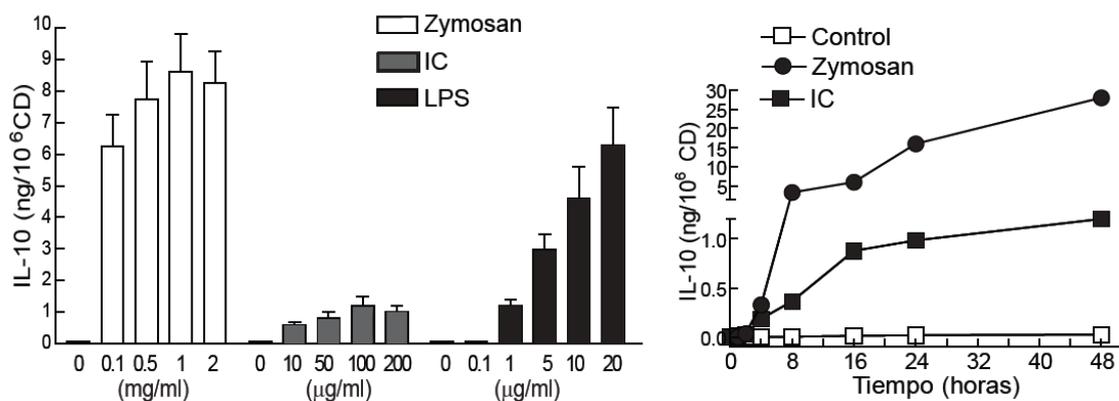


Figura 33. Liberación de IL-10 por células dendríticas. Las células se estimularon con las concentraciones indicadas durante 24 horas y se midió la concentración de IL-10 en los sobrenadantes. La cinética de producción de IL-10 se realizó con 1 mg/ml de *zymosan* y 0.1 mg/ml de IC. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes.

Para comprobar cuál de los componentes del *zymosan* estaba implicado en la respuesta, se realizaron ensayos de producción de IL-10 con α -mananos y β -glucanos en forma de curdlan. Aunque los dos estímulos liberaron IL-10 por separado (Figura 34), la combinación produjo un efecto sinérgico que podría indicar una cooperación de los receptores implicados en el reconocimiento de mananos y glucanos. Por este motivo, se utilizaron anticuerpos específicos frente a los principales receptores que reconocen los componentes del *zymosan*: DC-SIGN y el receptor de manosa (CD206) implicados en el reconocimiento de mananos y dectin-1 para los β -glucanos, y se analizó la participación de cada uno de ellos en el reconocimiento del *zymosan* por parte de las células dendríticas. Mientras que apenas se detectó inhibición de la producción de IL-10 en presencia del anticuerpo anti-CD206, la liberación de IL-10 disminuyó cuando se bloqueó el receptor DC-SIGN y desapareció casi por completo en presencia del anticuerpo anti-dectin-1 (Figura 34). Estos resultados indicarían un

papel fundamental del receptor de β -glucanos dectin-1 en la producción de IL-10 inducida por *zymosan* en las células dendríticas.

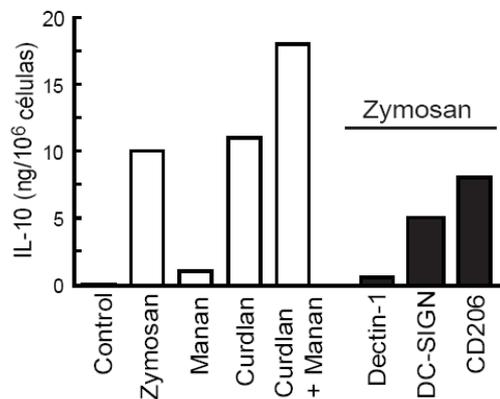


Figura 34. Efecto de los componentes del *zymosan* sobre la liberación de IL-10 en células dendríticas. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 5 mg/ml de manan, 0.1 mg/ml de curdlan y sus combinaciones durante 24 horas. En los casos que se utilizaron anticuerpos, se pre-incubaron las células con 10 μ g/ml de anticuerpo durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* durante 24 horas.

Para determinar si el efecto del *zymosan* sobre la producción de IL-10 era debido a cambios en la transcripción génica, se midieron los niveles del ARN mensajero que codifica *il10*. La estimulación por el *zymosan* produjo inducción del ARN mensajero en mayor cantidad que la estimulación por LPS o IC (Figura 35, panel izquierdo).

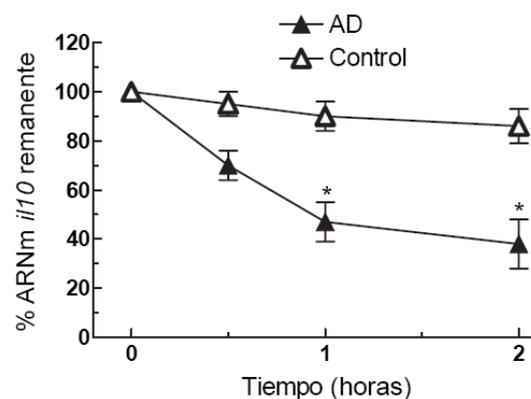
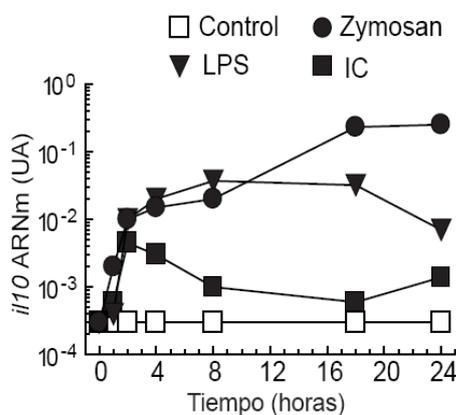


Figura 35. Expresión y medida de estabilidad del ARNm de *il10* en células dendríticas. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 10 μ g/ml de LPS y 0.1 mg/ml de IC durante los tiempos indicados. En el caso del análisis de la estabilidad, se estimularon las células con *zymosan* 24 horas y a continuación se añadió 1 μ g/ml de actinomicina D. Se analizó mediante RT-PCR la expresión del ARNm de *il10*. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA).

Se ha descrito que la estabilidad del ARNm en macrófagos de ratón es un mecanismo relevante para la regulación de IL-10 (Powell *et al.*, 2000). Para determinar si ocurre lo mismo en las células dendríticas humanas, se hicieron experimentos en presencia de un inhibidor de la transcripción, la actinomicina D. Los niveles del ARN mensajero de *il10* disminuyeron hasta llegar a un 38% del mensajero inicial dos horas después de añadir al medio de cultivo el

inhibidor, mientras que en las células control solo descendió un 14%, manteniéndose el 86% del ARN mensajero inicial (Figura 35). Estos datos indicarían que en las células dendríticas la estabilización del mensajero juega un papel secundario en el control de la producción de IL-10.

En experimentos realizados sobre la expresión génica de *cox2* se obtuvieron resultados similares a los descritos para el ARN mensajero de *il10* (Figura 36, panel izquierdo). En células dendríticas estimuladas con *zymosan* se produjo una inducción del ARN mensajero de *cox2* mayor que la inducida por LPS (Figura 35, panel derecho). Con estos antecedentes, se abordó el estudio de la participación de las rutas de COX-1 y COX-2 sobre la liberación de IL-10. Se utilizaron los inhibidores selectivos SC560 y NS398, respectivamente activos sobre COX-1 y COX-2. El uso de los inhibidores por separado no modificó la respuesta al *zymosan*, en cambio, cuando se inhibieron las dos isoformas a la vez o se aumentó la concentración del inhibidor de COX-2 se pudo detectar una disminución significativa de la liberación de IL-10 (Figura 36 derecha), lo que indicaría que ambas isoformas participarían en la producción de IL-10 en las células dendríticas.

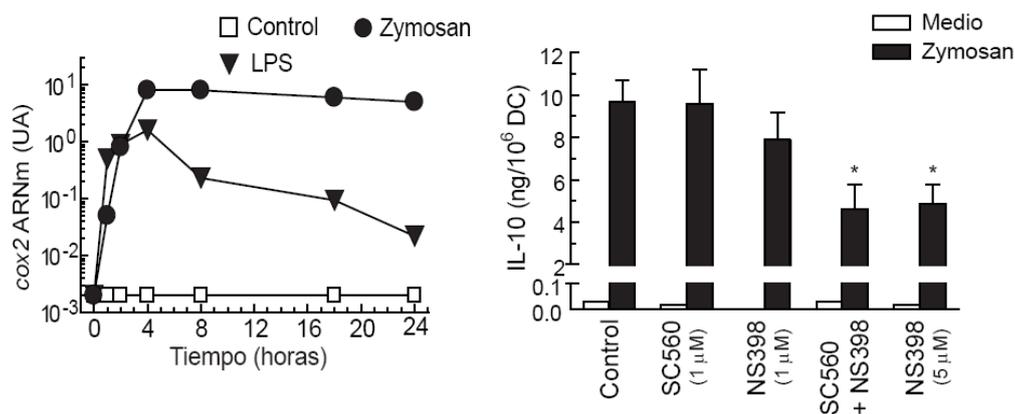


Figura 36. Expresión del ARN mensajero de *cox2* y efecto de la regulación de COX sobre la producción de IL-10 en células dendríticas. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* ó 0.1 mg/ml de IC durante los tiempos indicados. La expresión de ARN mensajero se analizó mediante RT-PCR. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA). Las células para la producción de IL-10 se pre-incubaron durante 1 hora con 1 μ M SC460, 1-5 μ M NS398 o la combinación de ambos, a continuación se estimularon en ausencia o en presencia de 1 mg/ml *zymosan* durante 24 horas. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$.

2.2 Efecto de la modulación farmacológica sobre la producción de IL-10

Mediante el uso de herramientas farmacológicas se abordó el estudio de la producción de IL-10, intentando definir las rutas de activación y los posibles factores de transcripción implicados como CREB y NF- κ B.

○ **Balance NF- κ B y CREB**

La quinasa glucógeno sintasa β (GSK3 β) es una enzima que regula positivamente la actividad del factor de transcripción NF- κ B y negativamente la de CREB. La actividad de la GSK3 β se inhibe por fosforilación de la serina 9 llevado a cabo por AKT, que a su vez puede ser modulada por varias quinasas, incluidas las de la familia de quinasas dependientes de adenosina monofosfato (AMPK).

Para estudiar la implicación de esta ruta en la producción de IL-10, primero se inhibió la actividad de GSK3 β mediante adición de cloruro de litio (LiCl) al medio de cultivo. El LiCl a concentraciones de 5-10 mM estimuló la liberación de IL-10 y este aumento fue más significativo en presencia de *zymosan* (Figura 37, panel derecho). Además, se utilizó un análogo permeable del AMP cíclico, el 8-Br-AMP cíclico, para estimular la actividad de la PKA. Esta estimulación elevó la producción de IL-10 en presencia de *zymosan*, pero no se observó un efecto aditivo con la combinación LiCl y 8Br-AMP cíclico, indicando que ambos compuestos actuarían sobre la misma ruta de señalización.

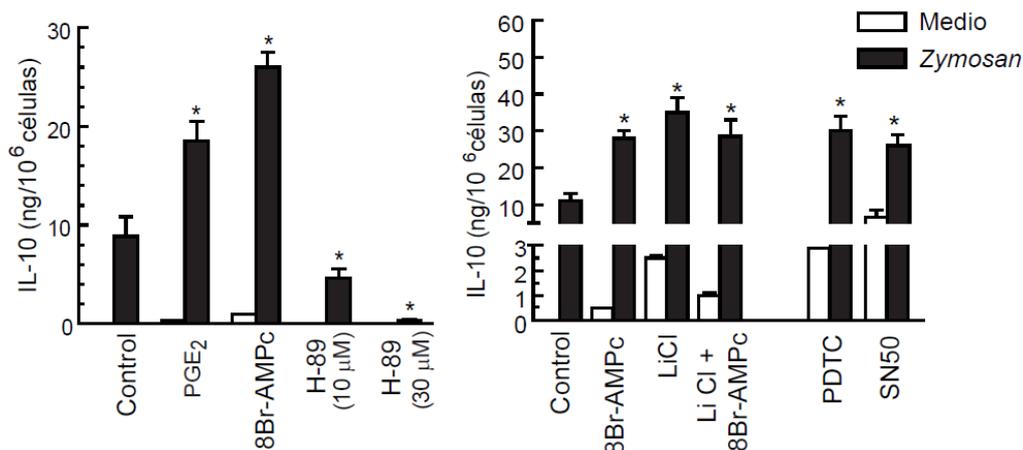


Figura 37. Efecto de diferentes compuestos sobre la producción de IL-10 en células dendríticas. Las células se pre-incubaron con 1 μ M de PGE₂, 8Br-AMPC, LiCl, 10-30 μ M H89, PDC ó SN50 durante 30 minutos y después se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*. La producción de IL-10 se midió en los sobrenadantes. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$.

Como los experimentos con el análogo permeable de AMP cíclico mostraron estimulación de la producción de IL-10, se utilizó el inhibidor específico de PKA H89, para comprobar la dependencia de este efecto de la actividad de la enzima. Usando una concentración de 30 μ M de H89 se inhibió casi por completo la producción de IL-10 por *zymosan* (Figura 37, panel izquierdo), confirmando con este resultado la participación de PKA.

Los receptores de prostanoideos E tipo 2 y 4 participan en la regulación de los niveles intracelulares de AMP cíclico. El ligando que se une a estos receptores de membrana es la PGE₂. Esta unión activa la adenilato-ciclasa (AC). Como se ha visto en resultados anteriores, el incremento de AMP cíclico en el interior de las células tiene un efecto limitado sobre la producción de IL-10. Esto se observó también cuando se añadió PGE₂ exógena, sin embargo, la adición de estos compuestos junto con el *zymosan* produjo un efecto sinérgico sobre la liberación de IL-10 (Figura 37).

Como GSK3 β ejerce efectos opuestos sobre NF- κ B y CREB, se utilizó un inhibidor general no selectivo de NF- κ B (PDTC) y un inhibidor de la translocación de la subunidad p50 (SN50) para determinar la participación de la familia NF- κ B. La presencia de los inhibidores incrementó la liberación de IL-10 tanto por sí mismos como en presencia de *zymosan* (Figura 37, panel derecho). Este resultado podría explicarse por la competición entre NF- κ B y CREB por el co-activador CBP, necesario para la actividad de los factores de transcripción.

Por último, se comprobó que el aumento de liberación de IL-10 provocado por la presencia de *zymosan* solo o con LiCl y SN50, coincidía con un incremento en la fosforilación de la serina 9 de GSK3 β (Figura 38), es decir, con un estado inactivo de la enzima que explicaría su incapacidad para bloquear la activación de CREB.

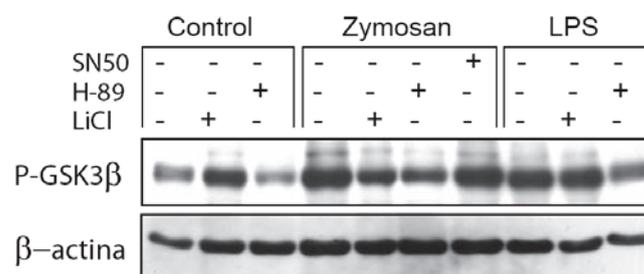


Figura 38. Fosforilación de GSK3 β en presencia de diferentes compuestos en las células dendríticas. Las células se pre-incubaron en presencia de 18 μ M de SN50, 10 μ M de H89 y 10 mM de LiCl durante una hora, después se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* y 10 μ g/ml de LPS durante 30 minutos. Los extractos proteicos se analizaron mediante Western blot con un anticuerpo fosfoespecífico frente a la serina 9 de GSK3 β . Resultado representativo de tres experimentos independientes.

○ Implicación del calcio

La regulación de la actividad de CREB se relaciona con varias quinasas, incluidas las dependientes de calcio/calmodulina, y depende de sus co-activadores transcripcionales CBP y TORC2. TORC2 en condiciones basales está retenido en el citoplasma de las células como

consecuencia de su fosforilación e interacción con las proteínas 14-3-3. Esto depende de una fosforilación tónica bajo el control de las quinasas de la familia AMPK, que es aumentada por GSK3 β e inhibida por PKA. Cuando se elevan los niveles intracelulares de calcio, se activa la fosfatasa calcineurina (estimulada por la calmodulina) y TORC2 es defosforilado, se transloca al núcleo donde puede actuar como co-activador transcripcional.

Para estudiar la participación del Ca²⁺ en la regulación de CREB, se utilizó el ionóforo ionomicina, que permite la entrada de Ca²⁺ desde el exterior celular y aumenta los niveles citoplasmáticos. En presencia de ionomicina se observó una producción moderada de IL-10. Cuando se cultivaron las células con un agente quelante de Ca²⁺, como el EDTA, junto con *zymosan*, la producción disminuyó pero no desapareció por completo (Figura 39). Empleando un inhibidor de la calcineurina, la ciclosporina A, a bajas concentraciones se detectó un descenso de la producción de IL-10 en las células dendríticas estimuladas con *zymosan*, indicando que el calcio participa en la producción de la citoquina.

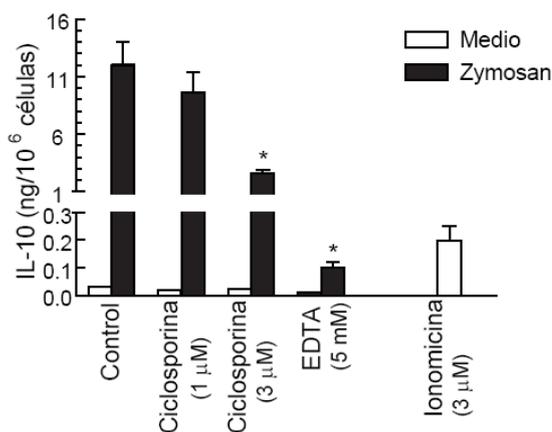


Figura 39. Efecto de diferentes compuestos sobre la producción de IL-10 inducida por *zymosan*. Las células dendríticas se pre-incubaron con los compuestos indicados durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con de 1 mg/ml de *zymosan*. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$.

○ Las rutas MAP/ERK y p38MAPK

La señalización desencadenada por MAP/ERK puede activar quinasas implicadas en la fosforilación de CREB (Screaton *et al.*, 2004) o de histonas (Zhang *et al.*, 2006) lo que permite la unión de los factores de la transcripción a los promotores. La señalización de p38 MAPK se asocia con la activación de quinasas activadas por mitógenos y estrés (MSK), las cuales fosforilan CREB en las células de ratón tratadas con LPS (Ananieva *et al.*, 2008). Para comprobar la posible participación de esta ruta en células dendríticas, se usaron los inhibidores de MAP/ERK y de p38 MAPK, U0126 y SB203580, respectivamente. Los datos

mostraron una gran disminución de la producción de IL-10 en presencia del inhibidor de MAP/ERK pero no en presencia de SB203580 (datos no mostrados).

Tanto el *zymosan* como el LPS e IC estimularon la fosforilación de p38 MAPK a tiempos cortos, mientras que en el caso de la ruta MAP/ERK el *zymosan* fue el estímulo más activo (Figura 40).

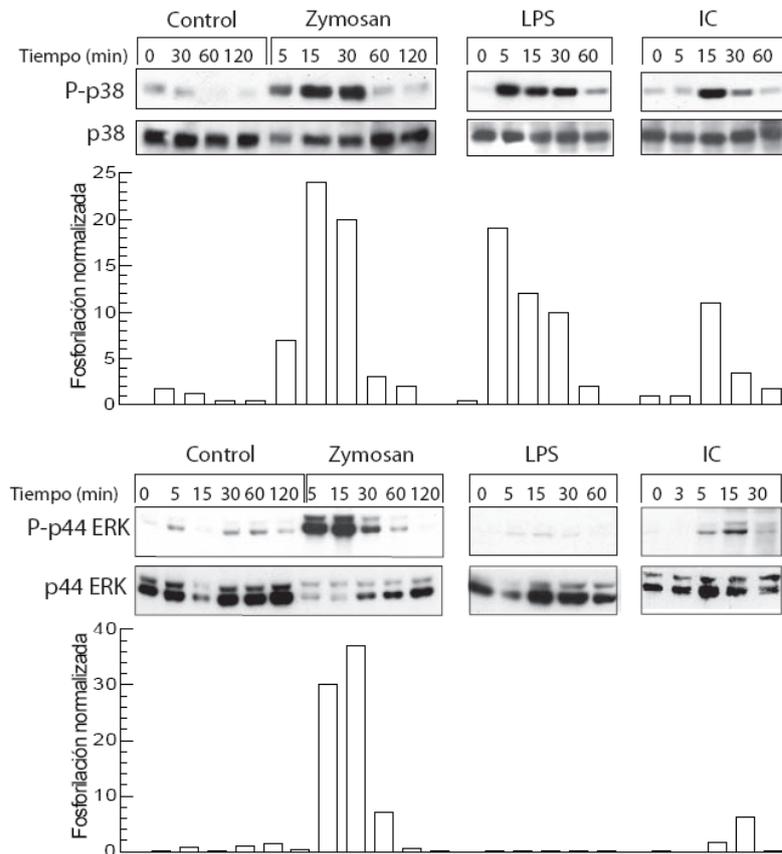


Figura 40. Efecto de diferentes estímulos sobre la fosforilación de p38 MAPK y MAP/ERK en células dendríticas. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 10 µg/ml de LPS y 100 µg/ml de IC durante los tiempos indicados. Se analizaron los extractos proteicos con anticuerpos fosfoespecíficos. Experimento representativo de tres que mostraban idéntico patrón de fosforilación.

2.3 Papel de los diferentes factores de transcripción en la regulación de *il10*

Puesto que la regulación de la expresión de *il10* se puede explicar mediante mecanismos transcripcionales, se analizó el promotor humano de *il10* con el programa MatInspector y la base Transfac y se alineó con la secuencia del promotor de ratón para detectar las secuencias conservadas e identificar los posibles factores de transcripción que podrían estar implicados en la regulación de *il10* (Figura 41). El resultado del análisis indicó la

presencia de sitios de unión para los factores: NF- κ B, STAT1-3, Sp1-3, c-Maf, NF-Y, c/EBP, CREB y Pbx1.

```

                CRE
-386-TGTCCACCGTCACTGTGACCTAGGAACACGCGAATGAGAACCCACAGC
-360-T TCCACCGTCA T TGACCT GGA   CG GAATG GAA CCACAG

                NF-Y                c-Maf                IRF
-225-GCAGAAGTTCATGTTCAACCAATCATTTTTGCTTACGATGCAAAAAAT
-196-GCAGAAGTTCAT T C ACCA T TTT GCTTAC ATGCAAAAA

                AT-rich SBP-1                Sp1
-178-TGAAAAACTAAGTTTATTAGAGAGGTTAGAGAAGGAGGAGCTCTAAGC
-150- AAA AA                                AGGAGGAGC
                Spi-B/PU.1

                Sp1/Stat1-3/Ets                Pbx1
-133-AGAAAAAATCCTGTGCCGGGAAACCTTGATTGTGGCTTTTTAATGAA

                Sp1/Kruppel                TATA box
-84-TGAAGAGGCCTCCCTGAGCTTACAATATAAAAGGGGGACAGAGAGG
-57-   AGGCC C CTGAGC T CA TATAAAAGGGGGAC AGA G
                c-Rel/Stat6/Ets

                c/EBP                +1
-38-TGAAGGTCTACACATAGGGGCTTGCTCTTGCAAAACCAAACCCACA
-11-  AGGTCTACA TAG G CTTGCTCTTGCA ACCAA CCACA
                +1

+ 7-AGACAGACTTGC Human
+35-AG CAG CTTGC Murine

```

Figura 41. Secuencia del promotor proximal de *il10*. Alineación de las secuencias humana y de ratón, mostrando los lugares conservados y los sitios de unión de factores de transcripción. El sitio de inicio de la transcripción está indicado con +1.

Inicialmente se analizó en los extractos nucleares de células dendríticas la presencia de actividad de unión a la secuencia consenso de cada factor en presencia de estímulos fúngicos para seleccionar los posibles factores implicados en la regulación de *il10*. No se detectó actividad de unión a c/EBP, STAT1 ni STAT3 en células tratadas con *zymosan*. En el estudio de la secuencia consenso de STAT mediante EMSA tampoco se detectó actividad de unión (datos no mostrados) ni fosforilación de STAT1 en presencia de *zymosan* (Figura 42). En cambio, si apareció respuesta a estímulos como LPS o IFN, y tras el lavado del medio de cultivo y la adición de IL-4. Aunque el *zymosan* no active STAT1 puede producirse una activación transitoria causada por las citoquinas presentes en el medio de cultivo. STAT3 mostró un ligero grado de fosforilación basal que no aumentó en las células estimuladas con *zymosan*, a

diferencia de los estímulos que utilizan las vías de señalización acopladas a TLR4 (Figura 42). Estos datos sugieren que los factores de la familia STAT no participan en la regulación de la producción de IL-10 estimulada por *zymosan* en las células dendríticas.

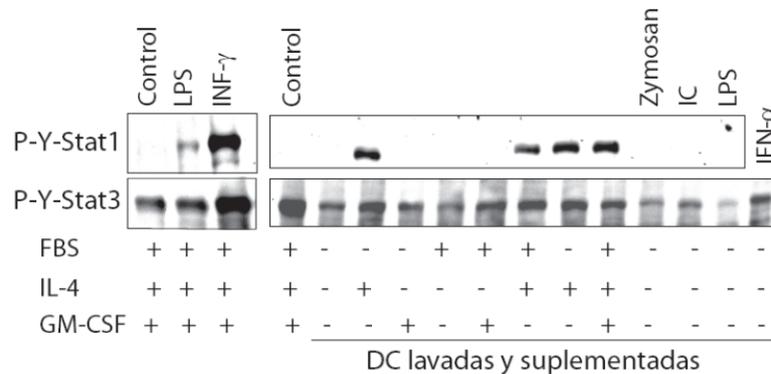


Figura 42. Efecto del LPS, IFN- γ e IL-4 en la activación de Stat1 y Stat3 en células dendríticas. Las células se trataron con 1 mg/ml de *zymosan*, 10 μ g/ml de LPS, 100 μ g/ml de IC y 1000 U/ml de IFN durante 30 minutos. Estas muestras y las obtenidas tras el lavado del medio y sustitución del cóctel de citoquinas (800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4) se utilizaron para analizar la fosforilación en tirosina de Stat1 y Stat3. Experimento representativo de tres con resultados similares.

Los factores de transcripción Sp1 y Sp3 también se han asociado con la regulación de la actividad del promotor de *il10* al unirse a la secuencia GGAGGA conservada en el promotor humano y de ratón (Brightbill *et al.*, 2000; Tone *et al.*, 2000). En los experimentos realizados se observó una actividad de unión constitutiva (Figura 43, paneles superiores), pero mediante los ensayos de CHIP no se pudo detectar la unión al promotor de *il10* (datos no mostrados).

La presencia de c-Maf en las células dendríticas se detectó a nivel de ARN mensajero utilizando cebadores para las formas corta y larga producidas por un procesamiento alternativo, pero no se pudo observar unión de c-Maf al promotor de *il10* en el estudio de CHIP (datos no mostrados). Los experimentos de CHIP realizados para detectar Pbx-1 mostraron inmunoprecipitaciones (IP) menores de 0.001% del total (*input*), sin encontrar diferencias entre las células estimuladas y en reposo (datos no mostrados). El factor NF-Y no presentó actividad de unión en monocitos a diferencia de lo observado en las células dendríticas, aunque en este caso no se observaron diferencias entre las células estimuladas y las células control (Figura 43, panel inferior izquierdo).

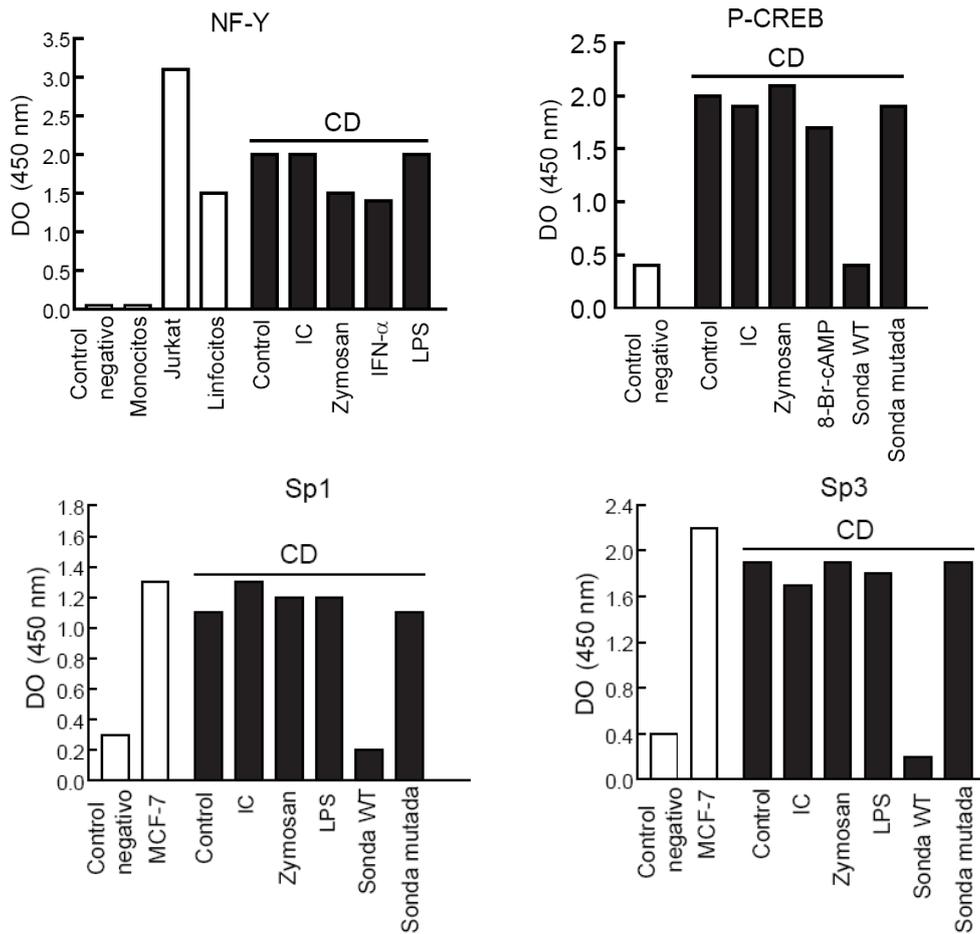


Figura 43. Presencia de actividad de unión de Sp1, Sp3, NF-Y y P-CREB en los extractos nucleares de células dendríticas. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 10 μ g/ml de LPS y 100 μ g/ml de IC durante 30 minutos y se analizaron los extractos nucleares usando un ensayo *TransAM (Active Motif)* para la unión de los factores indicados a sus secuencias consenso. La especificidad de la reacción fue confirmada llevando a cabo la reacción en presencia de un exceso de sonda de tipo silvestre (WT) y mutada (MT). Los controles positivos y negativos se incluyen en cada gráfica.

En el caso de P-CREB tampoco se pudieron observar diferencias de la actividad de unión entre las células estimuladas y en reposo (Figura 43, panel inferior derecho). Sin embargo, sí se detectó unión al promotor de *il10* mediante ensayos de CHIP en las células estimuladas con *zymosan* durante 30 minutos a diferencia de las células sin tratar o las inmunoprecipitadas con un anticuerpo irrelevante (Figura 44). El pre-tratamiento de las células dendríticas con el inhibidor de la PKA H89, inhibió la unión de P-CREB al promotor (Figura 44).

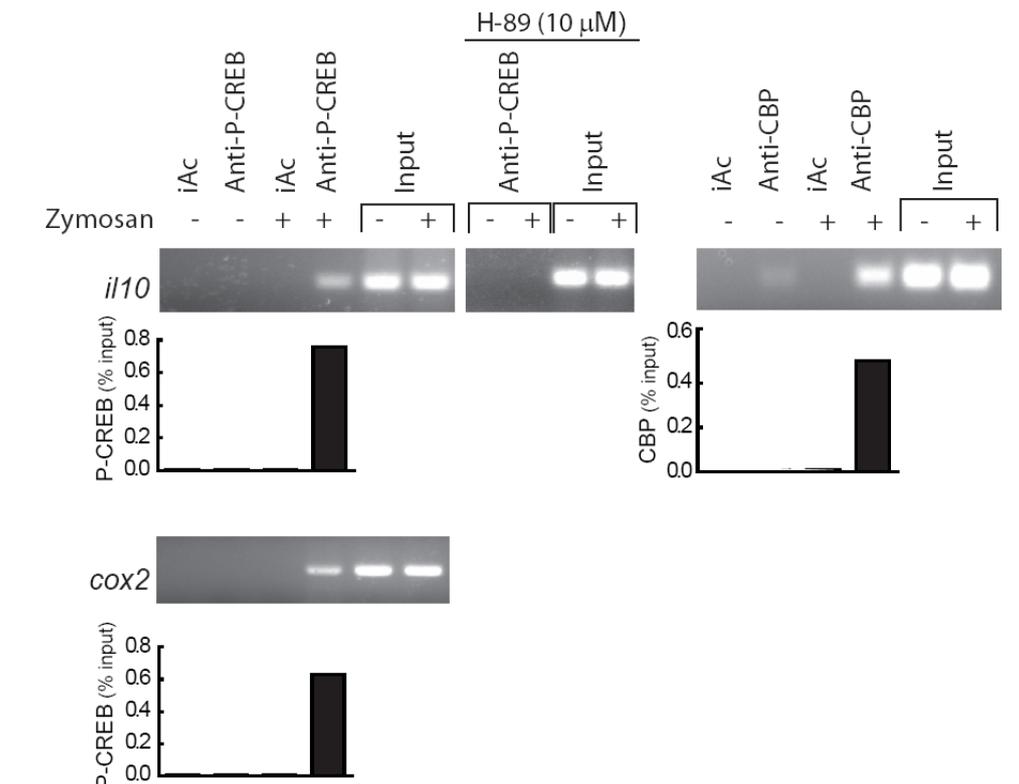


Figura 44. Unión de P-CREB y CBP al promotor de *il10* y *cox2* en las células dendríticas. Las células se estimularon durante 30 minutos con 1 mg/ml de *zymosan* y una vez fijadas con formaldehído se realizó el ensayo de CHIP. El análisis se realizó con PCR semicuantitativa de 30 ciclos y PCR a tiempo real de 40 ciclos con los cebadores del promotor de *il10* y de *cox-2*.

La unión de P-CREB al promotor de *il10* coincidió temporalmente con un incremento de la unión del co-activador transcripcional CBP 64 veces mayor en las células estimuladas con *zymosan* que en las células no tratadas (Figura 44, panel derecho). Como control negativo de la unión específica al sitio CRE se utilizaron cebadores del promotor de *il12p35* que no presenta secuencias consenso de unión a CRE. Los resultados obtenidos de las PCRs fueron negativos. Las IP realizadas con el anticuerpo anti-TBP se usaron como control positivo de la unión de la maquinaria transcripcional al promotor de *il10* coincidiendo temporalmente con la unión de P-CREB y CBP (figura 45).

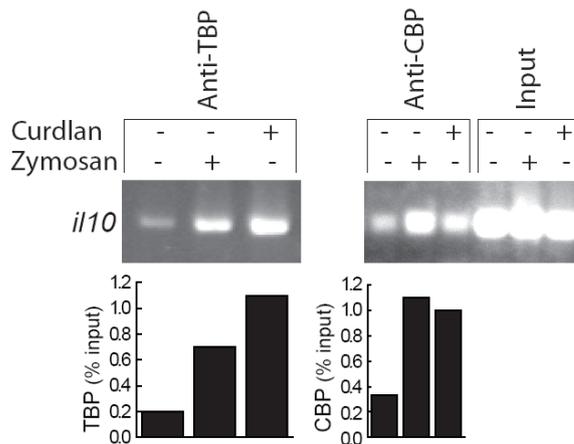


Figura 45. Unión de TBP y CBP al promotor de *il10* en células dendríticas.

Las células se estimularon durante 30 minutos en ausencia o en presencia de 1 mg/ml de *zymosan* y 0.1 mg/ml de curdlan. Se fijaron con formaldehído y se hicieron ensayos de ChIP. El análisis fue con PCR semicuantitativa de 30 ciclos y PCR a tiempo real de 40 ciclos con los cebadores del promotor de *il10*.

En el promotor de *cox2* también se encontró unión de P-CREB tras la estimulación de las células dendríticas con *zymosan* (Figura 44). Estos resultados estarían de acuerdo con la presencia de dos sitios de unión a CREB en el promotor de *cox2* y con la relevancia funcional de estos sitios en la regulación transcripcional de la enzima.

CRTC2/TORC2, un co-activador de CREB, puede translocarse al núcleo y unirse al complejo de transcripción, como consecuencia del aumento de calcio intracelular y la activación de la calcineurina. Puesto que el *zymosan* aumenta los niveles intracelulares de calcio (Figura 34), se estudió el efecto del *zymosan* sobre la translocación de CRTC2/TORC2 al núcleo de las células dendríticas. Como se muestra en la Figura 46 (panel izquierdo), se detectó la presencia de CRTC2/TORC2 en el núcleo celular con un patrón temporal coincidente con la unión de P-CREB y CBP al sitio CRE del promotor de *il10*.

La translocación de CRTC2/TORC2 al núcleo solo se observó entre 30 y 60 minutos tras la estimulación con *zymosan*, no siendo detectable a las cuatro horas (datos no mostrados). Para determinar si la presencia de CRTC2/TORC2 en el núcleo de las células dendríticas estaba ligada al complejo CREB/CBP presente en el promotor de *il10*, se realizaron IP de extractos nucleares con un anticuerpo anti-P-CREB, pudiéndose detectar la co-IP de CRTC2/TORC2 en células tratadas con *zymosan* durante 30 minutos (Figura 46, panel derecho).

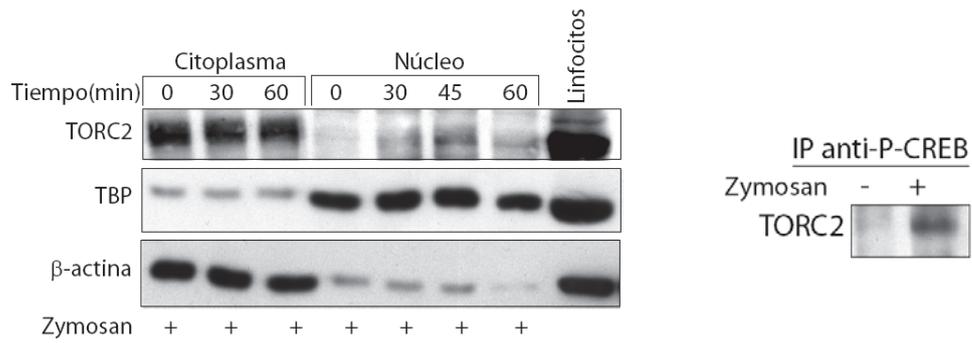


Figura 46. Efecto del *zymosan* sobre la translocación nuclear de CRTC2/TORC2. Las células se estimularon durante los tiempos indicados con 1 mg/ml de *zymosan* y se utilizaron los lisados citoplasmáticos y nucleares para la inmunodetección de CRTC2/TORC2. Las preparaciones de linfocitos se utilizaron como control positivo (panel izquierdo). Para la inmunoprecipitación las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* durante 30 minutos, las fracciones nucleares se utilizaron para IP con 10 µg/ml de anticuerpo anti-P-CREB. El anticuerpo anti-TORC2 se utilizó para realizar el Western Blot (panel derecho).

3. Objetivo: Estudio del balance IL-12 p70/IL-23 en los monocitos derivados a células dendríticas.

IL-12 p70 e IL-23 son dos citoquinas que comparten una cadena común (IL-12 p40) y difieren en la otra (IL-12 p35 e IL-23 p19 respectivamente). Ambas citoquinas se inducen mediante el reconocimiento de PAMPs, pero generan diferentes respuestas funcionales, lo que justifica el estudio de su regulación.

3.1 Producción de IL-23 versus IL-12

Para estudiar las diferencias que existen en la regulación de estas citoquinas, se comenzó analizando la producción en las células dendríticas en respuesta a distintos estímulos. Tanto el *zymosan* como el LPS fueron potentes inductores de IL-23 sin diferencias significativas entre ambos estímulos, en cambio, solo el LPS fue capaz de aumentar la producción de IL-12 p70 (Figura 47).

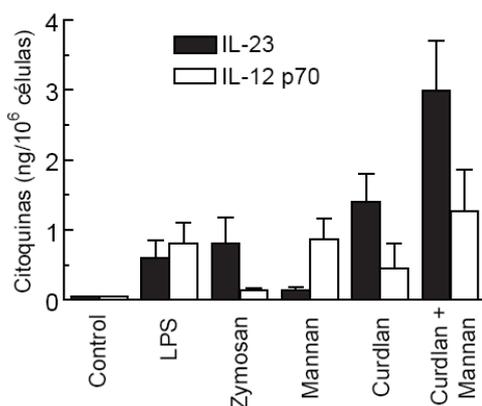


Figura 47. Producción de IL-12 p70 e IL-23 en células dendríticas. La producción de IL-12 p70 e IL-23 se midió en los sobrenadantes de células estimuladas durante 24 horas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, 1 mg/ml de *zymosan*, 1 mg/ml de manan y 0.1 mg/ml de curdlan. Los resultados se representan como la media \pm DE de cuatro experimentos independientes.

Las mayores concentraciones de las citoquinas se detectaron 24 horas después de su estimulación y en el caso del *zymosan*, la máxima liberación de IL-23 se observó utilizando concentraciones superiores a 0.5 mg/ml, a partir de 1.5 mg/ml la respuesta empezó a decaer. Por el contrario, el LPS no saturó la respuesta con concentraciones de hasta 20 $\mu\text{g/ml}$ (datos no mostrados). Para ver cuál de los componentes del *zymosan* estaba implicado en la producción de IL-23, se estudiaron los efectos producidos por los glucanos y mananos por separado. El *curdlan* indujo una mayor producción de IL-23 que de IL-12p70, a diferencia de lo que ocurre en el caso del manan. La combinación de ambos estímulos tiene un efecto similar al *zymosan* pero más intenso (Figura 47).

Para determinar si la inducción de las citoquinas se regula transcripcionalmente, se llevaron a cabo RT-PCRs a tiempo real. Todos los estímulos utilizados indujeron el ARN mensajero de *il23p19* sin diferencias significativas entre *zymosan* y el LPS (Figura 48, paneles superiores). En el caso de *il12p35*, el LPS produjo una inducción de su expresión 66 veces mayor que el *zymosan*. Cuando se analizó la expresión de *IL12p40* (Figura 48 panel inferior derecho), también el LPS indujo una mayor expresión del ARN mensajero que el *zymosan*, aunque la diferencia fue menor que en el caso de *il12p35*.

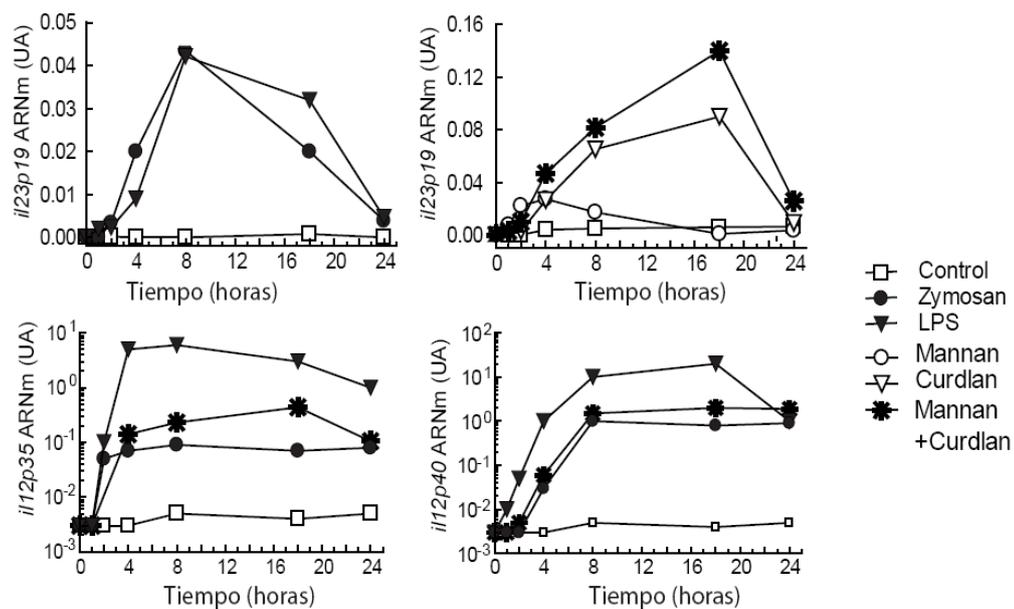


Figura 48. Expresión de *il12p35*, *il12p40* e *il23p19* en células dendríticas. La expresión de los genes se midió mediante la extracción de ARN mensajero y RT-PCR a tiempo real. Los resultados se normalizaron según la expresión de *gadh* y se muestran en unidades arbitrarias (UA).

3.2 Regulación transcripcional de *il23p19*

La regulación transcripcional de *il23p19* se estudió mediante el uso de inhibidores de la ruta de NF- κ B debido a la presencia en el promotor de la citoquina de secuencias consenso para la unión de esta familia de factores de transcripción. Se pudo detectar una disminución significativa de la producción de IL-23 cuando se emplearon los inhibidores no selectivos PDTC y ALLN, en cambio, usando SN50, inhibidor de la subunidad p50, no se observó ningún efecto sobre la producción de la citoquina (Figura 49).

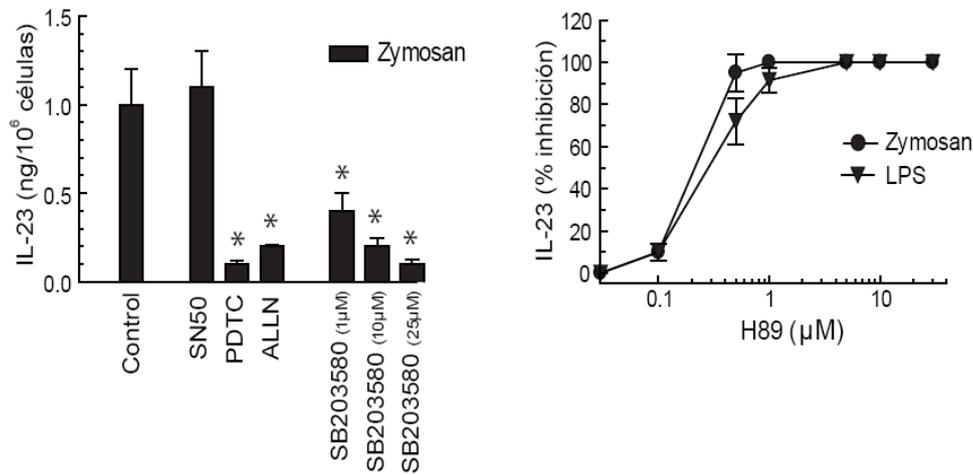


Figura 49. Modulación farmacológica de la producción de IL-23 en células dendríticas. Las células se incubaron durante 30 minutos en presencia de 18 μ M SN50, 100 μ M PDTC, 100 μ M ALLN y las concentraciones indicadas de SB203580 y H89. A continuación, las células se estimularon durante 24 horas con 1 mg/ml de *zymosan* (panel izquierdo) y con 1 mg/ml de *zymosan* o 10 μ g/ml de LPS (panel derecho). Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. *Indica $p < 0.05$.

La ruta PKA/AMP cíclico puede estar implicada en la regulación de IL-23 debido a que la subunidad catalítica de PKA participa en la regulación de la actividad de NF- κ B por su conocida capacidad para fosforilar la serina 276 de RelA (Zhong *et al.*, 1998; Yoon *et al.*, 2008) y, posiblemente, de c-Rel ya que presenta una secuencia consenso similar a la de RelA. Además, se ha descrito que los agentes capaces de aumentar los niveles de AMP cíclico potencian la producción de IL-23 (Sheibanie *et al.*, 2007). En cambio, experimentos llevados a cabo con el análogo permeable del AMP cíclico (8-bromo) y la activación de la adenilato ciclasa con PGE₂ no incrementan la producción de IL-23 (datos no mostrados).

Con estos antecedentes, se utilizó el inhibidor de PKA H89, que produjo una completa inhibición en respuesta al *zymosan* y al LPS. Como H89 también inhibe la actividad de MSK, para comprobar si esta enzima participaba en la ruta, se utilizó el inhibidor de p38 MAPK, SB203580, porque esta enzima regula la actividad de MSK1 y MSK2. Se pudo observar una potente inhibición de la producción de IL-23 inducida por *zymosan* que dependió de la concentración utilizada de SB203580 (Figura 49).

La inhibición producida por H89 podría ser debida a un efecto sobre la fosforilación c-Rel y/o RelA. Por ello, se abordó el estudio de la participación de los distintos elementos de la familia NF- κ B. Cuando se estimularon las células dendríticas con *zymosan*, se produjo una translocación nuclear de c-Rel, Rel B y RelA/p65 mantenida. Resultados similares se obtuvieron con la combinación de manan y curdlan (Figura 50). El LPS también estimuló la translocación

de c-Rel y RelA en menor medida que el *zymosan*, pero en la inducción de RelB fue el estímulo más potente. Al analizar los niveles de p50 se vio que no sufrieron cambios después de la estimulación celular (Figura 51), lo que estaría de acuerdo con la ausencia de efecto de los inhibidores de la translocación de p50 (Figura 49).

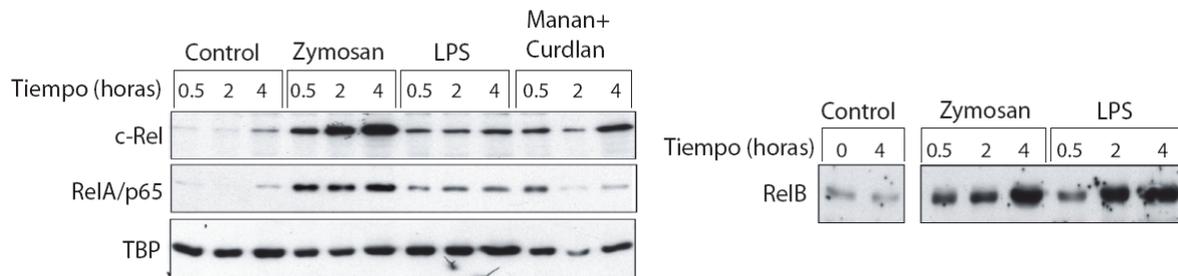


Figura 50. Translocación nuclear de las diferentes proteínas de la familia NF-κB en células dendríticas. Las células se incubaron con 1 mg/ml de *zymosan*, 10 μg/ml de LPS o 5 mg/ml de manan + 0.1 mg/ml de curdlan. A los tiempos indicados se recogieron las fracciones nucleares para la inmunodetección de c-Rel, RelA/p65 y RelB. Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes con resultados similares. TBP se utilizó como control de carga nuclear.

El estudio de las fosforilaciones de NF-κB se abordó mediante el uso de anticuerpos fosfoespecíficos que reconocen la serina 276 de RelA (este anticuerpo también puede reconocer el epítipo de la Ser-267-c-Rel) y la serina 536 de RelA. El *zymosan* indujo una leve fosforilación de la serina 276 y más intensa de la serina 536 de RelA (Figura 51), siendo en cualquiera de los casos el estímulo más potente.

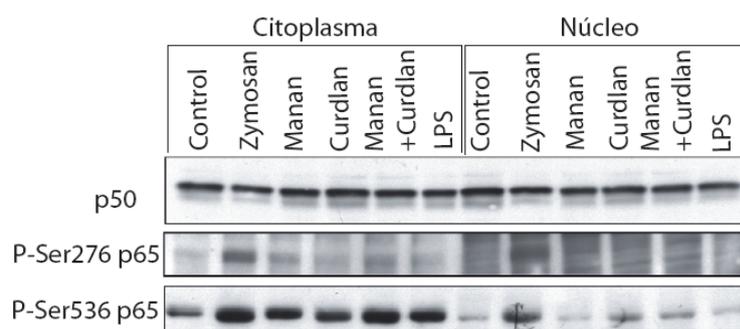


Figura 51. Translocación nuclear de diferentes proteínas de NF-κB en células dendríticas. Las células fueron incubadas con 1 mg/ml de *zymosan*, 10 μg/ml de LPS, 5 mg/ml de manan y 0.1 mg/ml de curdlan. A los 30 minutos se recogieron las fracciones nucleares para la inmunodetección de p50 y de las formas fosforiladas de RelA/p65. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares.

Para confirmar el papel del sitio κ B en la activación transcripcional, se analizó la unión de las proteínas de NF- κ B a los promotores de *il12p35* e *il23p19* mediante ensayos de ChIP. Como se observa en la Figura 52, el *zymosan* indujo una unión de c-Rel al promotor de *il23p19* significativa, mayor que la producida por LPS y que se acompañó de la presencia de MSK1. Además, con el *zymosan* se observó unión del co-activador CBP al promotor de *il23p19* que, a su vez se inhibió por H89. Asimismo se observó la fosforilación de la histona H3 30 minutos después de la estimulación con *zymosan* y su inhibición por H89 (Figura 52).

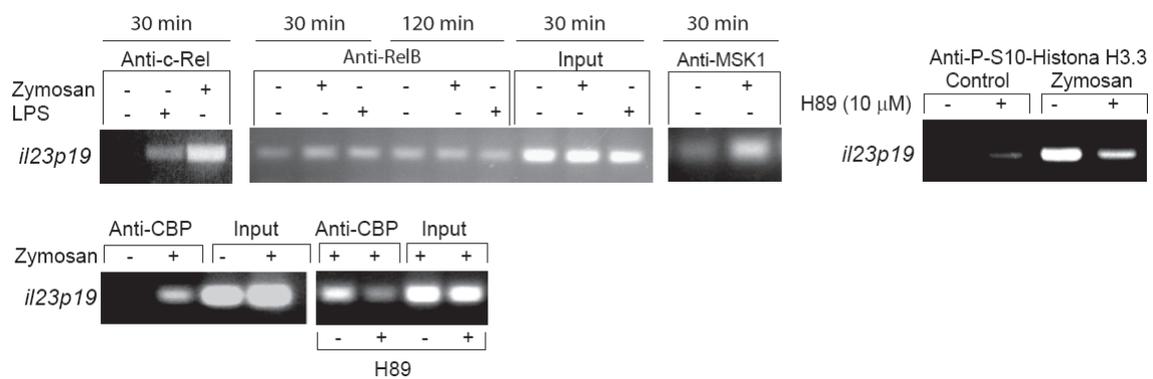


Figura 52. Unión al promotor de *il23p19* y fosforilación de la histona H3 en células dendríticas. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* y 10 μ g/ml de LPS a los tiempos indicados. Tras la fijación con formaldehído, se realizó el ensayo de ChIP. Las PCR semi-cuantitativas fueron de 40 ciclos con cebadores para el promotor de *il23p19*. Se utilizó el input como control positivo.

En cambio, en el promotor de *il12p35* solo se pudo detectar una débil y transitoria unión de c-Rel en células estimuladas 30 minutos con *zymosan* mientras que tras la estimulación con LPS ésta unión se detectó al menos hasta las cuatro horas. A diferencia de lo que ocurre en el promotor de *il23p19*, en *il12p35* se pudo observar una ligera fosforilación basal en la serina 10 de la histona H3 que no se vio aumentada por la estimulación con *zymosan* ni inhibida por H89 (Figura 53).

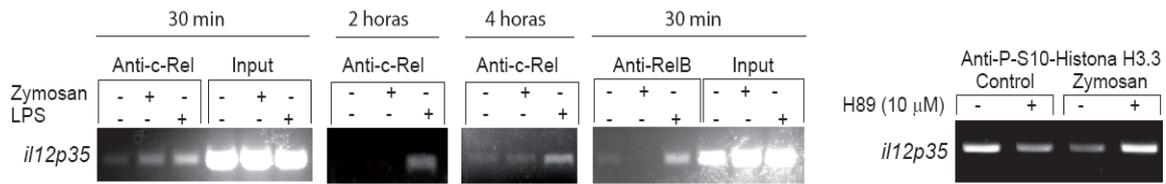


Figura 53. Unión al promotor de *il12p35* y fosforilación de la histona H3 en células dendríticas. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* y 10 μ g/ml de LPS a los tiempos indicados. Tras la fijación con formaldehído, se realizó el ensayo de ChIP. Las PCR semi-cuantitativas fueron de 40 ciclos y con cebadores para el promotor de *il12p35*.

Aunque RelB se detectó unido a ambos promotores (Figuras 52 y 53) no se obtuvieron resultados reproducibles ni diferencias significativas entre las células estimuladas y las células en reposo, lo que también ocurrió en el caso de RelA/p65 (datos no mostrados).

Estos resultados muestran diferentes grados y patrones temporales de ocupación de los promotores por c-Rel en respuesta a los distintos estímulos que podrían explicar las diferentes respuestas observadas.

3.3 Efecto inhibitorio del *zymosan* sobre la producción de IL-12 p35 inducida por la combinación LPS+IFN- γ

La pre-incubación de las células dendríticas con *zymosan* indujo una inhibición de la producción de IL-12 p70 inducida por la combinación de LPS + IFN- γ sin afectar los niveles de IL-23. Este efecto se observó con una pre-incubación con *zymosan* de una hora (Figura 54), pero fue más intenso tras 12 horas de pre-incubación (datos no mostrados). La inhibición se detectó con concentraciones de *zymosan* mayores de 0.5 mg/ml y fue más efectivo el *zymosan* deplecionado que el normal, sugiriendo que este efecto es independiente de la activación de los componentes capaces de activar TLR2 (datos no mostrados). Este efecto inhibitorio del *zymosan* se explica por una acción a nivel transcripcional puesto que se asocia con una disminución de los niveles de ARN mensajero de *il12p35* (Figura 54, panel derecho).

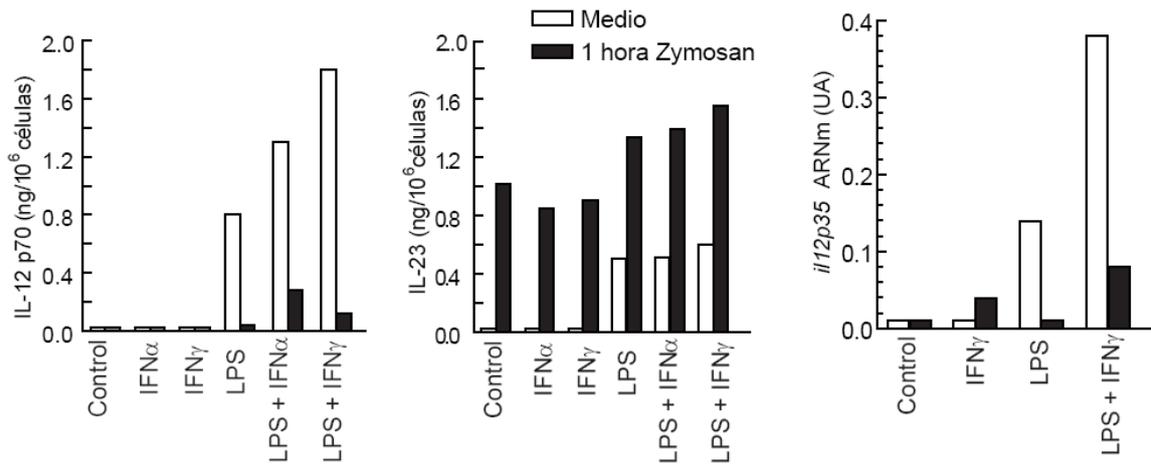


Figura 54. Inhibición de la producción de IL12 p70, IL-23 y expresión de *i12p35* por *zymosan* en células dendríticas. Las células se incubaron en ausencia o en presencia de 1 mg/ml de *zymosan* una hora antes de iniciar la estimulación con 10 μ g/ml de LPS y 1000 U/ml de IFN durante 24 horas. Se recogieron los sobrenadantes para medir la producción de IL-23, IL-12 p70 y los ARN mensajero para la expresión de *i12p35*. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (UA).

Implicación de la familia NOTCH

Uno de los posibles mecanismos por los que el *zymosan* induce la inhibición de la transcripción de *i12p35* podría ser a través de la activación de los represores transcripcionales de la familia NOTCH Hes1 y Hey1, de los que se conoce que son capaces de bloquear la producción de IL-6 e IL-12 p70 inducida por ligandos de TLR en células mieloides de ratón (Hu *et al.*, 2008). En nuestro sistema de células dendríticas el *zymosan* también inhibió la producción de IL-6 inducida por LPS y por la combinación LPS + IFN- γ (resultados no mostrados). Con estos antecedentes se abordó el estudio de la expresión de Hes1 y Hey1 en células dendríticas.

La estimulación con *zymosan* y con LPS indujo el ARN mensajero de *hes1*, mientras que *hey1* solo se detectó cuando se estimularon las células con *zymosan* (Figura 55, paneles derechos). Esta expresión del ARN mensajero estuvo acompañada por una inducción y translocación de la proteína Hes-1 del citoplasma al núcleo celular. En el caso del *zymosan*, además de ser más marcada la inducción que con el LPS, se pudo observar una desaparición de la proteína citoplasmática.

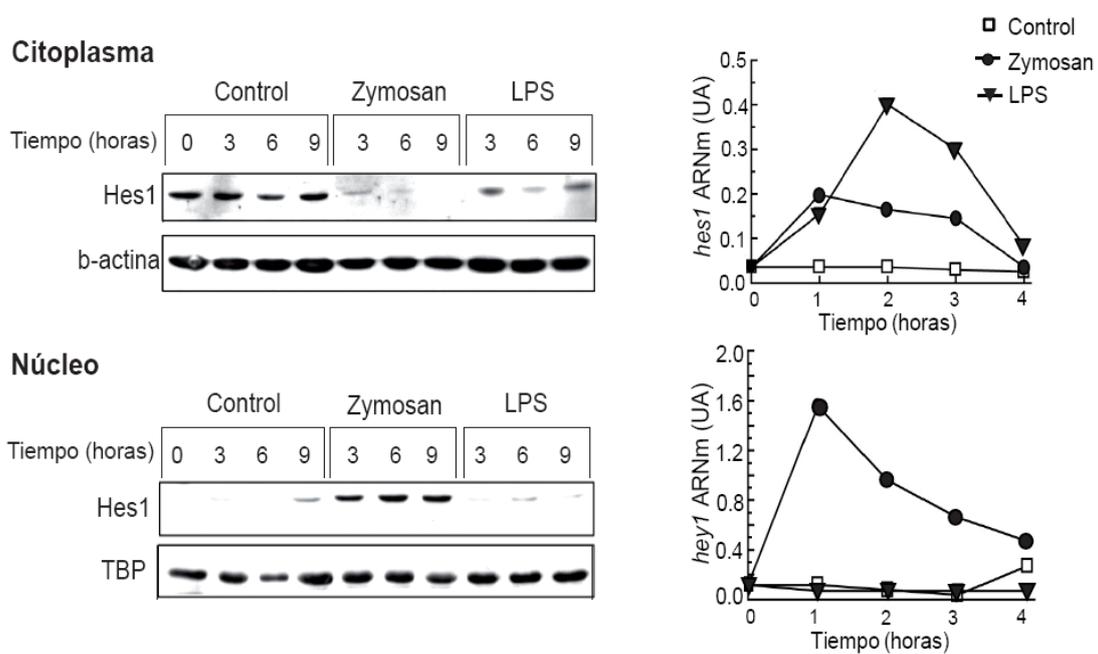


Figura 55. Efecto del zymosan sobre la expresión de Hes1 y Hey1 en células dendríticas. Las células se incubaron a los tiempos indicados con 1 mg/ml de zymosan y 10 μ g/ml de LPS. Se separaron las fracciones citoplasmáticas de las nucleares y se utilizaron para inmunodetección de la proteína Hes1. β -actina y TBP se usaron como controles de carga. Los paneles de la derecha muestran la expresión de ARN mensajero de *hes1* y *hey1* a los tiempos indicados. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias (UA).

TLE y la histona H3

Los represores transcripcionales Hes1 y Hey1 interactúan frecuentemente con TLE para formar un complejo inhibidor activo. Sobre estos antecedentes, se estudió la expresión de TLE. Se pudo detectar la proteína una hora después de estimular las células con zymosan y se mantuvo su translocación nuclear hasta las seis horas. También se detectó un aumento de la expresión del ARN mensajero de *tle1* (la isoforma de TLE más frecuente en las células mieloides) una hora después de añadir zymosan (Figura 56). En cambio, la combinación LPS + IFN- γ no indujo ni la proteína ni el ARN mensajero de TLE.

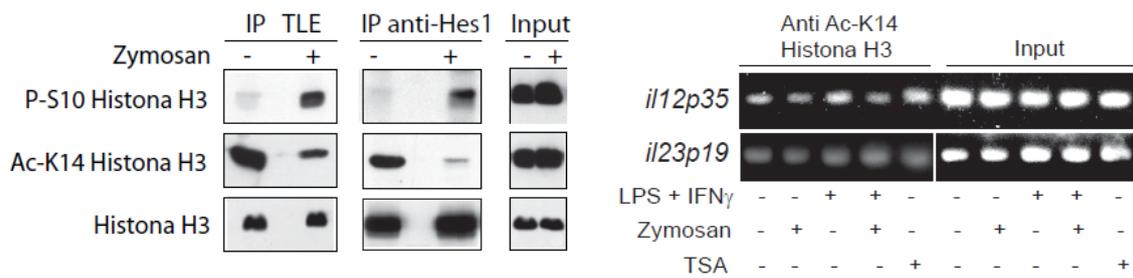


Figura 57. Efecto del zymosan sobre TLE, Hes1 y la acetilación de la histona H3 en células dendríticas. Los lisados celulares de las células control y estimuladas con 1 mg/ml de *zymosan* durante cinco horas se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a TLE1 y Hes1. Tras la separación en SDS/PAGE y transferencia a membranas de celulosa, las membranas se utilizaron para la inmunodetección de P-S10-histona, Ac-K14-histona H3 e histona H3. Los cambios en la acetilación de la lisina 14 en los promotores de *il12p35* e *il23p19* cinco horas después de la estimulación, se muestran en el panel derecho. 100 nM de tricostatina (TSA). Experimentos representativos de tres con resultados similares.

Experimentos realizados con inhibidores de las lisina deacetilasas mostraron que el inhibidor de enzimas de clase I y II tricostatina (TSA) bloqueó por completo la producción de IL-12 p70, mientras que el inhibidor de clase III, indol EX527, aumentó la producción de IL-12 p70y redujo la inhibición producida por el *zymosan* (Figura 58).

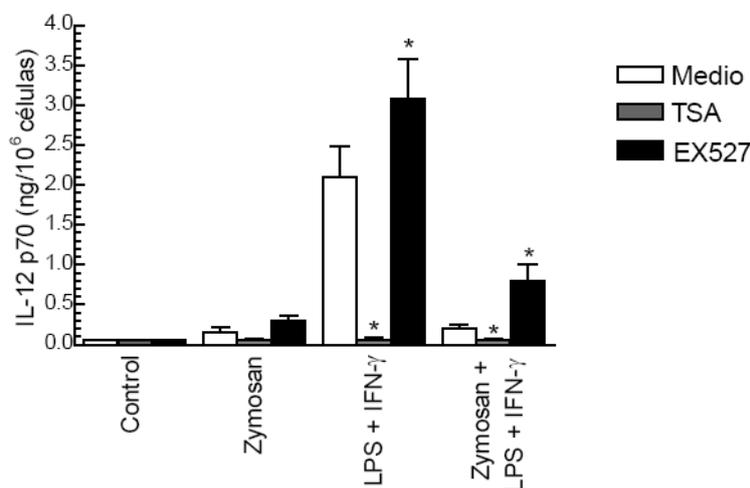


Figura 58. Inhibición de la producción de IL12 p70 en CD por inhibidores de deacetilasas. Las células dendríticas se pre-incubaron en presencia de 100 nM de TSA durante 30 minutos y con 1 μ M de EX527 durante seis horas. Se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan*, 10 μ g/ml de LPS + 1000 U/ml de IFN- γ y sus combinaciones durante 24 horas. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Participación de dectin-1

Para analizar si en el efecto inhibitorio del *zymosan* sobre la producción de IL-12 p70 participa el receptor de glucanos dectin-1, se realizaron experimentos con un anticuerpo bloqueante del receptor 30 minutos antes de añadir el *zymosan*. El efecto inhibitorio del *zymosan* se pudo observar también en las células tratadas con el anticuerpo anti-dectin-1 en el caso de la estimulación con LPS + IFN- γ (Figura 59).

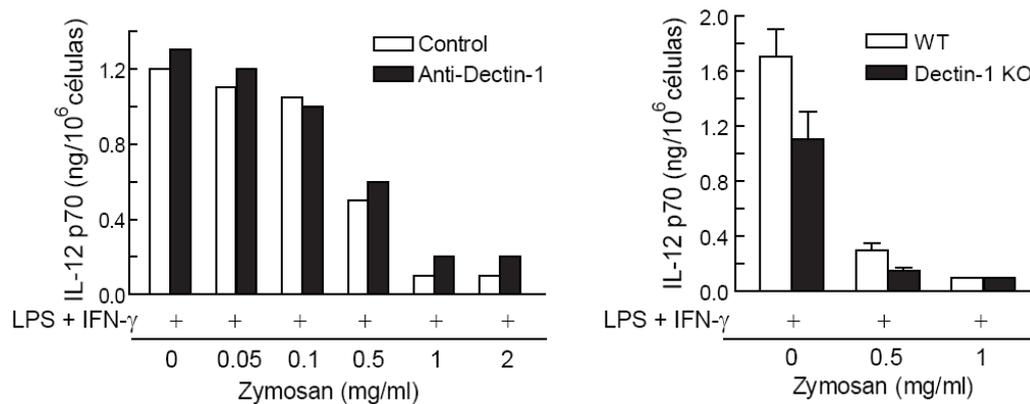


Figura 59. Inhibición de la producción de IL12 p70 en células dendríticas humanas y de ratón dectin-1^{-/-} por *zymosan*. Las células humanas se pre-incubaron 30 minutos en presencia de 10 μ g/ml de anticuerpo anti-dectin-1, a continuación se añadieron las diferentes dosis de *zymosan* durante 1 hora y se estimularon con 10 μ g/ml de LPS + 1000 U/ml de IFN- γ durante 24 horas (panel izquierdo). En la gráfica derecha se muestra el efecto inhibitorio del *zymosan* en células dendríticas de ratones WT y KO para dectin-1 estimuladas con 10 μ g/ml de LPS + 1000 U/ml de IFN- γ durante 24 horas. Los resultados se representan como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Para confirmar estos resultados, se realizaron experimentos con células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratones deficientes en dectin-1. Como se muestra en la Figura 59, los ratones deficientes en dectin-1 mostraron una producción menor de IL-12 p70 cuando se estimularon con LPS + IFN- γ comparados con los animales silvestres. Sin embargo, el *zymosan* ejerció una inhibición similar en ambos tipos celulares. Estos datos sugerirían que dectin-1 no es el único receptor implicado en la respuesta del *zymosan* en relación con su inhibición sobre la producción de IL-12 p70.

Discusión

Discusión

Objetivo 1: Caracterizar la respuesta de las células mieloides a β -glucanos en función del entorno y el grado de diferenciación celular.

Las células dendríticas y los macrófagos derivados de monocitos son células muy heterogéneas en función de su estado de diferenciación y polarización, de su localización y entorno. Los resultados mostrados en esta tesis sugieren una respuesta diferente de los macrófagos al *zymosan* dependiente del grado de diferenciación y de los componentes presentes en el medio (GM-CSF, M-CSF, IL-4, derivados bacterianos...) que pueden explicarse en parte por el grado de expresión de receptores de membrana. Además, el *zymosan* puede comportarse como una simple partícula exógena que es reconocida por un mecanismo independiente de los receptores pero que es capaz de iniciar una cascada de señalización complementaria de las inducidas por los PAMPs asociados que actúan a través de los PRRs.

En el caso de los M ϕ diferenciados con M-CSF, hay un aumento de la expresión de las isoformas de dectin-1 A y B, especialmente la B, que explicaría que la unión al ligando sea productiva en comparación con lo observado en los M ϕ diferenciados con SH. También se detecta mayor expresión de dectin-2, MR y TLR2. En monocitos diferenciados con GM-CSF e IL-4 para generar células dendríticas, también se detectó aumento de la expresión de los CLRs, lo que concuerda con los datos observados por otros autores (Willment *et al.*, 2003). Por otra parte, los M ϕ SH tratados con LPS durante tres horas no muestran diferencias en el patrón de expresión de los PRRs, lo que estaría de acuerdo con los estudios que han referido cambios en los receptores de superficie a partir de las 24 horas de incubación (Willment *et al.*, 2003).

El patrón de captación de las partículas de *zymosan* es similar en los macrófagos obtenidos mediante distintos procedimientos de diferenciación, aunque los M ϕ SH capturan las partículas a mayor velocidad que los M ϕ M-CSF. Sin embargo, las células dendríticas tienen una gran capacidad para capturar el *zymosan* independientemente de que esté sin opsonizar o recubierto por iC3b, mientras que los macrófagos muestran una captación preferente de las partículas opsonizadas. La respuesta al *zymosan* no es paralela a la captura de las partículas, lo que indicaría que la captación de partículas y la liberación de mediadores inflamatorios son procesos independientes. La fagocitosis del *zymosan* muestra analogías con las respuestas a las bolas de látex, las sales de aluminio, los cristales de sílice (Kuroda *et al.*, 2011) y los cristales de monourato sódico (Martin *et al.*, 2009), y con el incremento del acceso a los PRR intracelulares provocado por el proceso fagosomal (Wolf *et al.*, 2011). Esta respuesta se

explicaría por una activación temprana de Syk y más retrasada del sistema de NF- κ B, que conduciría la inducción de moléculas pro-inflamatorias como COX-2. En los M ϕ SH y M ϕ M-CSF la inducción de COX-2 se detecta a las seis horas de estimulación con el *zymosan*. Esta activación tardía podría explicarse por la unión de la familia NF- κ B a los dos sitios κ B del promotor de *cox2* (*ptgs2*). La pre-incubación con dosis bajas de IFN- γ no modifican el patón de expresión de COX-2 en respuesta al *zymosan*, aunque incrementa la liberación de PGE₂. En cambio, la pre-incubación con LPS aumenta considerablemente la expresión de la enzima a tiempos cortos, sin que se observe potenciación de la expresión por el *zymosan*, lo que indicaría que el LPS es un estímulo extraordinariamente activo para inducir COX-2. Uno de los principales productos generados por la actividad de COX-2 es la PGE₂ cuya producción se potencia en respuesta a *zymosan* en los macrófagos expuestos a bajas dosis de LPS. El mecanismo que explicaría este sinergismo podría ser una temprana y prominente activación de NF- κ B generada por la ruta LPS/TLR4 y una ~~activación~~ ^{activación} posterior por mediadores secundarios, junto a una activación tardía producida por el *zymosan* que se observa en ausencia del *priming* con LPS. Estos datos están de acuerdo con los estudios sobre la regulación de *ptgs2* dado que se trata de un gen de respuesta inmediata que contiene islas CpG y muestra una acetilación constitutiva de las histonas que permiten un estado transcripcionalmente permisivo (Ramirez-Carrozzi *et al.*, 2009). La potenciación del efecto del *zymosan* producida por el *priming* también se muestra a nivel del promotor de *ptgs2* a juzgar por el incremento de la ocupación por parte de las proteínas RelA/p65, pero no parece probable que este aumento de la presencia del factor de transcripción se deba a un incremento de la acetilación del promotor *ptgs2* en vista de los niveles similares de acetilación de la histona H3 encontrados en las células estimuladas y en reposo. A pesar del aumento observado en la producción de PGE₂, no se pudo mostrar un aumento de expresión de COX-2 por el *zymosan* en células pre-tratadas con LPS, lo que posiblemente se debe a que la expresión de la enzima no es siempre sinónimo de su actividad, puesto que contiene un motivo de inestabilidad de 27 aminoácidos y se inactiva por el sustrato (Mbonye *et al.*, 2008). En el caso de los macrófagos sometidos a *priming* con IFN- γ , una posible explicación podría ser la expresión de PGE₂ sintasa microsomal (mPGEs) como se ha descrito en otros sistemas (Wright *et al.*, 2004).

La liberación de PGE₂ producida por el *zymosan* se inhibe por el bloqueo de la fagocitosis con la citocalasina D. Este efecto inhibitorio sobre PGE₂ ha sido descrito previamente en respuesta a cristales de sílice y sales de aluminio (Kuroda *et al.*, 2011) y en células dendríticas de ratón estimuladas con β -glucanos particulados donde se detectó una

disminución de la producción de citoquinas en presencia de citocalasina D (Rosas *et al.*, 2008). Estos autores concluyen que la inhibición del ensamblaje del citoesqueleto por la citocalasina D impide el movimiento celular y el contacto con las partículas, imposibilitando la fagocitosis del estímulo particulado, pero no el reconocimiento de estímulos solubles (Rosas *et al.*, 2008). La producción de PGE₂ es también sensible al bloqueo de la catepsina B, sin embargo, no se ha podido detectar inhibición por el estabilizante lisosomal PVNO. Estos datos estarían de acuerdo con una activación de la catepsina B por los β -glucanos a través de dectin-1, como se ha descrito en un modelo de artritis experimental (Rosenzweig *et al.*, 2011).

En la señalización por la proteína CARD9 se pueden distinguir las señales *downstream* Syk como la activación de p38MAPK que puede ocurrir en ausencia de producción de citoquinas y las señales dependientes de SyK/CARD9/NF- κ B asociadas con la producción de citoquinas (Goodridge *et al.*, 2009). En el primer caso, la translocación de CARD9 al fagosoma si puede potenciar la producción de citoquinas si coincide con la activación de los TLRs (Gantner *et al.*, 2003). La relevancia de esta cooperación de receptores aumenta si tenemos en cuenta que la degradación de las partículas fagocitadas en el fagosoma pueden aumentar el acceso de los TLR a sus ligandos y potenciar las respuestas al permitir la cooperación de distintos tipos de receptores (Wolf *et al.*, 2011). La mayoría de los estudios disponibles se han realizado en células tratadas con GM-CSF donde se ha encontrado un incremento de la expresión de receptores implicados en el reconocimiento de α -mananos y β -glucanos, pero no un aumento de la expresión de cPLA₂ (Valera *et al.*, 2008; Parti *et al.*, 2010). Los estudios realizados hasta la fecha habían mostrado un efecto *down*-regulatorio del M-CSF sobre la producción de citoquinas en macrófagos de ratón (Rosas *et al.*, 2008; Goodridge *et al.*, 2009), pero la liberación de ácido araquidónico y la producción de eicosanoides no han sido analizados por estos trabajos. Los resultados aquí presentados permiten distinguir las respuestas dependientes de la ruta de activación Syk/ MAPK cPLA₂/ analizada mediante el estudio de la liberación del ácido araquidónico y las respuestas dependientes de la transcripción de los sitios κ B como son la inducción de COX -2, IL-6 e IL23. Utilizando macrófagos derivados de médula ósea de ratones deficientes en dectin-1 observamos que la expresión de dectin-1 es necesaria para la liberación del ácido araquidónico en respuesta a los β -glucanos, pero no parece tener un papel fundamental en la producción de citoquinas ya que no se detectó producción de IL-6 ni PGE₂ en respuesta a estímulos que contienen exclusivamente β -glucanos. Inesperadamente, las respuestas producidas por el *zymosan* que se pueden asociar con la transcripción dependiente aumentaron en los ratones deficientes en dectin-1, lo que sugeriría que en

ausencia de este receptor se favorece la unión a otros receptores asociados con la activación de la transcripción.

El *zymosan* se comporta como un estimulador poco activo del inflamasoma NLRP3 en vista de la baja cantidad de IL-1 β liberado en los macrófagos humanos. En contraste con las bajas cantidades de IL-1 β , TNF α e IL-10, observadas en los macrófagos, el *zymosan* fue un potente inductor de la producción de IL-6 e IL-23 sobretodo en los M ϕ SH en comparación con los M ϕ M-CSF. Estos datos concuerdan con los estudios realizados en ratones estimulados con cristales de urato monosódico que inducen una alta producción de IL-6 y bajos niveles de TNF α e IL-1 β (Martin *et al.*, 2009), lo que se ha confirmado en eosinófilos humanos (Kobayashi *et al.*, 2010) y fibroblastos pulmonares (Hogan *et al.*, 2011). Una elevada producción de IL-6 inducida por el *zymosan* en comparación con otras citoquinas se ha descrito en fibroblastos de la córnea humana (Nomi *et al.*, 2010), mientras que en las células dendríticas humanas se han referido cantidades reducidas de IL-6 en comparación con otras citoquinas como IL-10 e IL-23 (Leibundgut-Landmann *et al.*, 2007). Estos estudios revelan que la respuesta al *zymosan* depende del tipo celular y del grado de diferenciación. Una posible explicación de la potente producción de IL-6 en los macrófagos estimulados con *zymosan* es que en su regulación transcripcional pueden cooperar NF- κ B y CREB para reclutar el co-activador CBP en el promotor de IL-6, y potenciar la expresión (Dendorfer *et al.*, 1994; Wen *et al.*, 2010; Spooren *et al.*, 2010). Este patrón de cooperación diferiría de otros sistemas donde CREB y RelA/p65 se unen a diferentes promotores y compiten por CBP (Parry and Mackman, 1997; Vo and Goodman, 2001). La predominante producción de IL-23 puede explicarse por la robusta capacidad del *zymosan* para bloquear la transcripción en el promotor de *il12p35*, como se discute a continuación, y el consiguiente uso exclusivo de la subunidad IL-12 p40 para formar dímeros con IL23 p19 (Álvarez *et al.*, 2011).

El papel de las proteínas adaptadoras debe analizarse en función del papel de estas proteínas en la activación de Syk y de su participación en la señalización de las integrinas (Mócsai *et al.*, 2006) y en la captación de los hongos (Moalli *et al.*, 2010). Los datos aquí presentados muestran una fosforilación de DAP12 y CD32A, pero no se pudo demostrar fosforilación de la cadena del receptor Fc. A diferencia de la fosforilación en tirosina detectada en la molécula adaptadora DAP12 en respuesta al *zymosan*, la fosforilación de CD32A no mostró diferencias significativas entre las células en reposo y las estimuladas con *zymosan*, lo que concordaría con la ligera fosforilación basal del ITAM comúnmente observada en macrófagos en ausencia de unión a un ligando y que, sin embargo, pueden generar señales de relevancia funcional (Ng *et al.*, 2008; Ivashkiv, 2009). Puesto que se ha descrito que la unión

directa de partículas a la membrana independientemente de la unión a receptores puede señalizar a través de DAP12/Syk (Mócsai *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2008), nuestros datos son compatibles con que una parte del efecto del *zymosan* sea independiente de la unión a receptores.

Dado que el M-CSF incrementa la expresión de las isoformas A y B de dectin-1 y la expresión de los receptores con capacidad de unir a manosa como DC-SIGN, y respuestas como la liberación de ácido araquidónico y la producción de PGE₂ en ausencia de un incremento de la expresión de cPLA₂ y COX-2, estos resultados sugieren un efecto similar al del GM-CSF, explicable por el aumento de la expresión de receptores de membrana.

Objetivo 2: Estudiar la regulación de la producción de IL-10 en los monocitos derivados a células dendríticas

La producción de IL-10 por las células de la inmunidad innata en respuesta a patógenos es importante para mantener el equilibrio homeostático y evitar las reacciones autoinmunes. Estas funciones se llevan a cabo por sus acciones inmuno-reguladoras. Estudios previos realizados en macrófagos y células dendríticas señalan la producción en respuesta a PAMPs derivados de la pared de los hongos de una alta cantidad de IL-10 e IL-23 y una baja secreción de IL-12 p70, en comparación con el efecto de un estímulo como el LPS, que induce la producción de IL-12 p70. Estos hechos pueden tener consecuencias patofisiológicas dado el efecto inmunoregulador de IL-10 y la participación de IL-23 en reacciones autoinmunes.

La mayoría de los estudios sobre la regulación de IL-10 se han realizado utilizando LPS, ligando que actúa a través del receptor TLR4 y que no posee capacidad para generar aumentos transitorios de Ca^{2+} intracelulares (Barbet *et al.*, 2008). Este hecho es importante para explicar la diferente respuesta producida por el *zymosan*, que además de actuar sobre dectin-1, es reconocido por TLR2. A diferencia de TLR2, TLR4 es capaz de activar la vía de MyD88 y también estimula la vía TRIF y activa el sistema JAK/STAT. El reconocimiento de β -glucanos mediante dectin-1 señala por el motivo ITAM presente en la cola citoplasmática del receptor y permite la activación de Syk y el reclutamiento de un complejo multi-proteico de señalización. Ello conduce a la generación de segundos mensajeros por la actividad de cPLC- γ , que hidroliza los fosfolípidos de la membrana para producir diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato. La relevancia de esta ruta se ha comprobado en ratones deficientes en cPLC- γ que muestran una respuesta reducida frente al *zymosan* (Xu *et al.*, 2009) (Figura 60). Estas diferencias en los mecanismos de señalización asociadas a cada estímulo explican por qué el LPS y el *zymosan* son capaces de inducir respuestas muy diferentes en las células inflamatorias y/o usar rutas de señalización distintas para generar las mismas respuestas. El control de la expresión de IL-10 por STAT3 cuando se ha utilizado LPS como estímulo se ha pretendido extender como mecanismo general (Benkhart *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2007; Villagra *et al.*, 2008), sin embargo, la generalización del paradigma no parece justificada dada la distinta capacidad de los diferentes estímulos para activar factores de transcripción (Chung *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008).

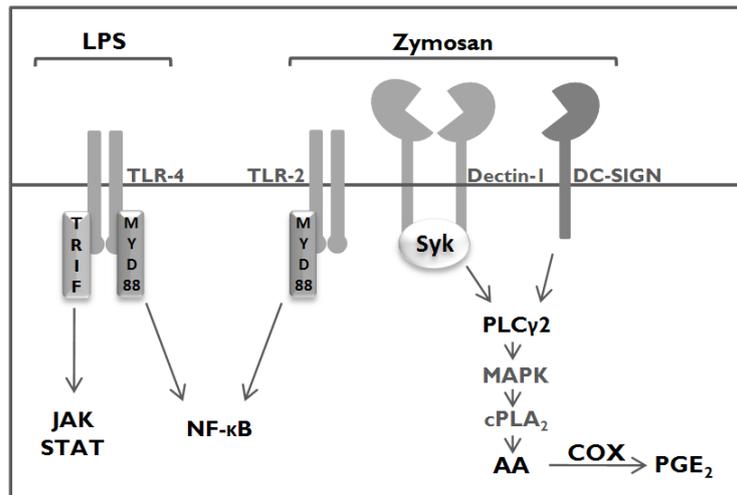


Figura 60. Esquema de las vías de señalización utilizadas por los diferentes estímulos. El LPS señala a través de TLR4, activando las rutas de TRIF y MyD88. El *zymosan* señala a través de TLR2 y receptores de lectina tipo C. Activa las vías de MyD88 y Syk, además, de mediadores inflamatorios.

La regulación de IL-10 puede ocurrir a nivel transcripcional o post-transcripcional. La estabilidad del ARN mensajero ha sido considerada uno de los principales mecanismo de regulación de la citoquina. En macrófagos de ratón se han descrito motivos AUUUA desestabilizantes del ARN mensajero en la región no codificante 3' (3'UTR) de IL-10 (Powell *et al.*, 2000). Además, se ha detectado la capacidad de unir la proteína tristetraprolina al ARN mensajero, lo que permite su desestabilización (Stoecklin *et al.*, 2008), así como la regulación mediante la presencia de micro ARNs (Sharma *et al.*, 2009). En los experimentos realizados hemos observado un ligero componente de regulación asociado con la estabilidad del mensajero, pero no en grado suficiente como para ser el principal sistema de regulación de IL-10 en respuesta al *zymosan*.

Nuestros resultados son compatibles con que el principal efecto del *zymosan* sobre la producción de IL-10 puede explicarse a través de mecanismos de regulación transcripcional. La lista de factores de transcripción que se han asociado con la regulación de IL-10 es muy amplia. Se han descrito factores de transcripción constitutivos en células hematopoyéticas como Sp1 y Sp3 que podrían regular la expresión de IL-10 dado que existen secuencias consenso conservadas en el promotor humano y en el de ratón. Estos estudios se han realizado con EMSAS y mediante ensayos de luciferasa, pero sin demostrar la unión del factor *in vivo* al promotor nativo de la citoquina coincidiendo con la expresión de IL-10 (Brightbill *et al.*, 2000; Tone *et al.*, 2000). Estos resultados muestran la presencia constitutiva de Sp1 y Sp3 en el núcleo de las células dendríticas, pero no su unión al promotor proximal de *il10* tras la

estimulación celular. Este papel regulador de Sp1 y Sp3 contrastaría con la interpretación de la función de estos factores que se comportan como co-activadores constitutivos de genes *housekeeping* y genes sin caja TATA. STAT3 es uno de los factores de transcripción que más frecuentemente se han asociado con la inducción de IL-10 en respuesta a LPS (Benkhart *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2007). En cambio, en los experimentos realizados en células dendríticas estimuladas con *zymosan*, STAT3 muestra un ligero grado de fosforilación basal que no aumenta si se compara con lo producido cuando se estimulan con un ligando capaz de activar TLR4. El factor c-Maf, expresado constitutivamente en monocitos y macrófagos en reposo, ha sido estudiado en células de ratón y se han detectado su unión al promotor de *il10* en respuesta a LPS (Cao *et al.*, 2004). En las células dendríticas humanas aunque se han visto variaciones de la expresión del ARN de c-Maf, no hemos podido observar su unión al promotor de *il10* en presencia de *zymosan*. Estos datos indicarían que estímulos diferentes pueden usar factores de transcripción distintos para activar la transcripción de IL-10. Otro ejemplo de este empleo alternativo de factores se ha observado al estudiar la inducción de *il10* en macrófagos de ratón estimulados con células apoptóticas, que se regulan por el factor Pbx1 (Chung *et al.*, 2007).

Los estudios realizados en ratones deficientes en la subunidad p50 de NF-κB muestran un defecto en la producción de IL-10 y un descenso en la expresión del ARN mensajero (Cao *et al.*, 2006). Autores como Gringhuis *et al.*, proponen una regulación dependiente de la fosforilación de la serina 276 de la subunidad p65 (Gringhuis *et al.*, 2007). Estos estudios no pueden trasladarse de forma unívoca a las células humanas a la vista de la baja conservación de los sitios κB entre el humano y el ~~rat~~ rat. Este hecho podría explicar el incremento de la producción de IL-10 asociado con la inhibición de NF-κB mediante la competición de NF-κB y CREB por el co-activador CBP (Vo and Goodman, 2001) y por la actividad de las quinasas dependientes de AMP que inhiben la activación de NF-κB y favorecen la de CREB (Sag *et al.*, 2008).

Estudios recientes sobre Erk1/2 y p38 MAPK han descrito que, además de inducir respuestas pro-inflamatorias, las MAPKs también pueden iniciar rutas de retroalimentación negativa a través de la activación de las quinasas MSK1 y MSK2, que limitan la respuesta pro-inflamatoria activada por las vías TLR. Las MSKs fosforilan CREB en la serina 133 y la histona H3, lo que aumenta la transcripción de *il10* (Ananieva *et al.*, 2008). Estos datos y los resultados obtenidos en nuestros experimentos indican el papel central de CREB en la regulación de IL-10. Esta afirmación se justificaría, en primer lugar, por la presencia de altos niveles de actividad de unión de P-CREB a CRE en los núcleos celulares de las células dendríticas, incluso en ausencia

de estímulos, lo que concuerda con estudios previos realizados en ratones (Kang *et al.*, 2006) y líneas celulares de monocitos humanos (Kuipers *et al.*, 2008). Este hallazgo sugiere que además de la fosforilación de CREB se precisan otros mecanismos para producir la transcripción CRE-dependiente. Asimismo, el *zymosan* favorece la unión de CREB al sitio CRE de *il10*, el reclutamiento del co-activador CBP y la translocación de CRTC/TORC2 al núcleo, lo que permite la formación del complejo nuclear P-CREB/TORC2. Estos resultados están de acuerdo con la participación de las señales mediadas por el AMP cíclico, que se favorece por una producción autocrina de PGE₂. el aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular, la activación de la calcineurina y las vías mediadas por las MAPK/ERK. La actividad de la GSK3β puede influir en las vías anteriormente mencionadas, Los resultados obtenidos sugieren que CRTC/TORC2 puede funcionar en células dendríticas como un sensor dual para los niveles de AMP cíclico y Ca²⁺, al igual que se ha descrito en páncreas e hígado (Screaton *et al.*, 2004). CRTC/TORC2 es un co-activador de CREB que está retenido en el citoplasma de las células en reposo por interacciones con las proteínas 14-3-3. Esto depende de una fosforilación tónica llevada a cabo por quinasas activadas por AMP (SIK2), cuya actividad se aumenta por GSK3β y se inhibe por PKA (Silen Katoh *et al.*, 2006). La defosforilación de CRTC/TORC2 es llevada a cabo por la calcineurina, que se regula por los niveles de Ca²⁺ intracelular. Nuestros resultados concuerdan con este modelo a la vista de la disminución de la producción de IL-10 observada cuando se bloquea la calcineurina y al aumento producido por los análogos permeables del AMP cíclico y por los inhibidores de la enzima GSK3β. La potenciaón del efecto del *zymosan*, por el LiCl se explicaría por su capacidad para aumentar la fosforilación de la serina 9 de ~~la~~ GSK3 aumentar la transcripción dependiente de CREB favoreciendo la interacción de CRTC/TORC2 con el dominio bZIP de CREB (Böer *et al.*, 2007). Además, la unión de P-CREB al promotor de *il10* se inhibe en presencia del inhibidor de la PKA.

Este aumento de la producción de IL-10 mediado por CREB guarda relación con la regulación de la COX-2, que presenta dos sitios de unión a κB y dos sitios de unión a CRE en su promotor humano. El *zymosan* es un potente inductor de *cox2* y la inducción de la producción de IL-10 por la PGE₂ se ha descrito previamente (Harizi *et al.*, 2002). En el caso de las células estimuladas por *zymosan* la producción endógena de PGE₂ como consecuencia de la activación de COX-2, potenciaría la producción de IL-10 ya que sería un potente mecanismo autocrino para elevar los niveles de AMP cíclico a través de los receptores de E prostanoides.

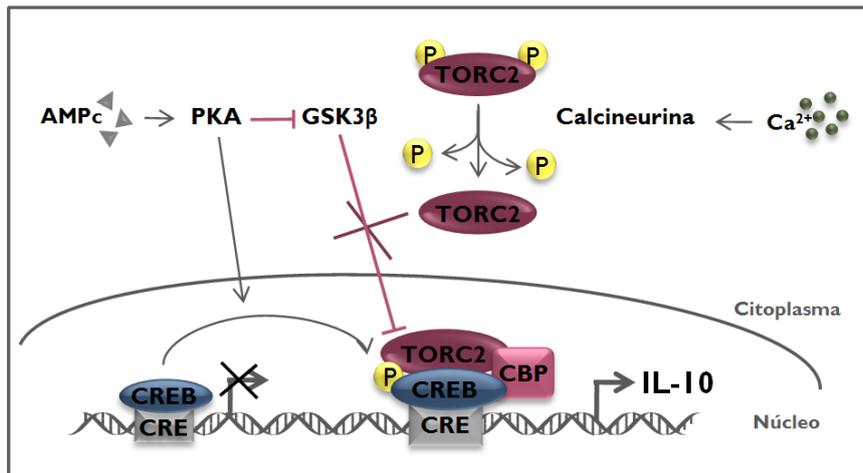


Figura 61. Esquema del complejo activador de la transcripción que se forma en el promotor de *il10* en células dendríticas estimuladas con *zymosan*. TORC2/CRTC2 se retiene en el citoplasma por la fosforilación tónica por kinasas de la familia AMPK o SIK2. La defosforilación por calcineurina y señales dependientes de PKA y de GSK3β regulan la translocación de CRTC/TORC2.

Tomados colectivamente, los datos presentados muestran al *zymosan* como un potente inductor de la transcripción de *il10* dependiente de CRE en las células dendríticas. En este mecanismo regulatorio, el *zymosan* favorece la unión de P-CREB al promotor proximal de *il10* favoreciendo la transcripción CRE-dependiente a la que contribuirán la producción autocrina de PGE₂ y una red de interacciones de PKA, MAPK/ERK, GSK3β, calcineurina y la presencia en el promotor de los co-activadores CBP y CRTC/TORC2, formando un complejo iniciador de la transcripción (Figura 61).

Objetivo 3: Estudio del balance IL-12 p70/IL-23 en los monocitos derivados a células dendríticas.

La IL-12 p70 es una citoquina importante en la respuesta pro-inflamatoria y en el inicio de la respuesta adaptativa Th1. En cambio, la IL-23 modula principalmente una respuesta de tipo Th17. Ambas citoquinas se producen por las células dendríticas y tienen una subunidad en común (IL12 p40) y otra diferente (IL12 p35 e IL23 p19). La regulación de estas citoquinas es crucial para desencadenar una respuesta adecuada frente a los patógenos. Los resultados obtenidos confirman que el *zymosan* es un fuerte inductor de IL-23 pero produce bajas cantidades de IL-12 p70, a diferencia de lo que ocurre con el LPS que es capaz de producir las dos citoquinas utilizando la vía de señalización de TLR4. La diferencia entre el efecto del LPS y el del *zymosan* se pudo observar a nivel de ARN mensajero. Ambos estímulos fueron capaces de inducir la expresión de *il23p19* e *il12p40*, en cambio, solo el LPS fue capaz de aumentar la expresión de *il12p35*. Esta incapacidad del *zymosan* para inducir *il12p35* parece ser el factor principal que explicaría la producción predominante de IL-23.

La mayoría de los trabajos sobre la regulación del promotor de *il23p19* se han centrado en el estudio de los factores de transcripción NF-κB y ATF/CREB, aunque hay trabajos sobre la participación de AP1 (Liu *et al.*, 2009) y la proteína homóloga de C/EBP (CHOP) (Goodall *et al.*, 2010). A la vista de los resultados obtenidos en el estudio de la regulación de *il10*, donde la ruta de la PKA y los niveles de AMP cíclico juegan un papel fundamental a través de CREB, los resultados obtenidos sobre la modulación farmacológica de la producción de IL-23 indican que los niveles intracelulares de AMP cíclico no participan en su regulación. Podría llevar a cierta confusión el resultado obtenido con el inhibidor de la PKA H89, que produce un bloqueo completo de la producción de IL-23 en respuesta a LPS y a *zymosan*. Este hecho podría explicarse porque H89 es un fármaco capaz de inhibir la actividad de PKA y MSK, y ambas quinasas fosforilan la histona H3, la proteína cromosómica HMG-14 (Saccani *et al.*, 2003; DeManno *et al.*, 1999), CREB (Deak *et al.*, 1998) y RelA/p65. Por este motivo, los efectos de H89 deben ser estudiados minuciosamente antes de asignarlos a una diana específica. El papel de MSK1 en la producción de IL-23 se apoya por la localización de la enzima en el promotor de *il23p19* en células estimuladas por *zymosan* y por el bloqueo de la liberación de IL-23 en presencia del inhibidor de la p38 MAPK SB203580, dado que esta kinasa se encuentra localizada por encima de las rutas de señalización de MSK1 y MSK2 (Ananieva *et al.*, 2008).

A diferencia de lo que ocurre con el factor de transcripción CREB, los datos presentados indican el posible papel regulador de NF-κB sobre el promotor de *il23p19* a la

vista del efecto observado con los inhibidores generales de NF- κ B como PDTC y ALLN sobre la producción de la citoquina. La falta de inhibición por el inhibidor de la translocación de la subunidad p50 (SN50) puede explicarse por la presencia constitutiva de la proteína en el núcleo celular y su papel inhibitorio de la transcripción cuando no forma dímeros con c-Rel o p65. El *zymosan* induce la translocación al núcleo de c-Rel, RelA/p65 y RelB desde los 30 minutos hasta al menos cuatro horas de estimulación. c-Rel se ha considerado un factor importante en el control de *il12p35* en las células de ratón porque su promotor contiene una secuencia 5'-GGGAATCC-3' en el sitio κ B a la que se unen preferentemente los dímeros que contienen c-Rel (Liu *et al.*, 2003; Kollet y Petro, 2006; Grumont *et al.*, 2001). Curiosamente, esta secuencia también está presente en el promotor de *il23p19*. En los estudios de ChIP hemos observado que el *zymosan* es capaz de aumentar la unión de c-Rel al promotor de *il23p19* junto con la unión de MSK1 y CBP, e incrementa la fosforilación temprana de la serina 10 de la histona H3, lo que constituyen condiciones óptimas para la activación de la transcripción. A diferencia del efecto producido por el *zymosan*, el LPS tiene un efecto menor sobre la unión de c-Rel al promotor de *il23p19* pero produce la unión del factor al promotor de *il12p35* al menos desde los 30 minutos hasta cuatro horas después de la estimulación. El efecto de la PKA sobre la transcripción dependiente de c-Rel parece deberse a la fosforilación de la serina 10 de la histona H3, ya que c-Rel, a pesar de tener una S267 homóloga de la S276 de RelA no se fosforila por la subunidad catalítica de PKA ni por MSK. Los resultados obtenidos indican que las diferencias en la producción de IL-12 p70 inducida por LPS y *zymosan* pueden explicarse por la distinta capacidad de estos estímulos para inducir la unión de c-Rel a los sitios κ B del promotor de *il12p35* y de *il23p19*.

Nuestros resultados podrían interpretarse en el sentido de que el *zymosan* tiene un efecto inhibitorio sobre la señal que produce el IFN- γ y que es necesaria para la producción de IL-12 p70, ya que su capacidad para activar NF- κ B no es inferior a la del LPS y podría relacionarse con estudios previos realizados con ligandos de receptores que contienen motivos ITAM (Du *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2006). Sin embargo, la reciente descripción de la atenuación de la producción de IL-12 p70 e IL-6 por parte del complejo represor NOTCH compuesto por los represores transcripcionales Hes y Hey nos puso sobre la pista de un mecanismo de inhibición más selectivo y que podría tener una explicación dependiente de la secuencia del promotor de *il12p35*. La señalización iniciada por TLR2 y TLR4 es capaz de inducir la vía NOTCH canónica con los genes diana Hes 1 y Hey 1, que se comportan como inhibidores retroalimentados de las citoquinas IL-12 p70 e IL-6 en células de ratón (Hu *et al.*, 2008). Otro mecanismo de inducción de Hes1 independiente de la vía NOTCH se ha descrito en hepatocitos donde su inducción es

mediada por CREB (Herzing *et al.*, 2003). A la vista de la potente activación de CREB inducida por *zymosan*, es posible que Hes1 se induzca por este mecanismo en células dendríticas. Curiosamente, la vía de señalización del IFN- α inhibe esta ruta represora mediante el bloqueo de la expresión del dominio intracelular de NOTCH y la inhibición de la inducción de las proteínas represoras. El promotor humano de *il12p35* contiene tres cajas E cerca del sitio κ B y de los sitios activados por IFN- γ . El más cercano de estos sitios es una secuencia palindrómica óptima para la unión de Hey 1 y Hes 1. Nuestros resultados sobre las células dendríticas estimuladas con *zymosan* y con LPS muestran una alta inducción del ARN mensajero de *hes1*, pero solamente el *zymosan* es capaz de aumentar la expresión de *hey1*. La presencia en el núcleo de TLE no se observa con LPS, pero sí se induce por el *zymosan* y se acompaña por la interacción física de TLE con la histona H3 fosforilada en la serina 10, a juzgar por el resultado de los estudios de coimmunoprecipitación.

Mediante el uso de inhibidores de los diferentes tipos de histona deacetilasas, las sirtuinas o deacetilasas de clase III, parecen tener un papel más relevante en la inhibición de la producción de IL-12 p70 por parte del *zymosan*. Esto estaría de acuerdo con la capacidad que tienen TLE y la Hes 1 para unirse a la Sirtuina 1 (Sirt 1) y con el descubrimiento de que TLE y Sirt1 son necesarios para la inhibición de la actividad de NF- κ B (Ghosh *et al.*, 2007). La inhibición de la producción por la TSA puede explicarse por tener su diana en los factores de transcripción más que en las histonas, dado que las deacetilasas dependientes y las independientes de TSA están implicadas en la modulación de NF- κ B y en la actividad de IRF (Nusinzon y Horvath, 2003; Yeung *et al.*, 2004; Bode *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2010), además, TSA bloquea la producción de IL-12 p70 a concentraciones donde sólo afecta ligeramente la acetilación global de la histona H3.

Los datos descritos en esta tesis concuerdan con un papel de NF- κ B en la regulación del promotor de *il23p19* en respuesta al *zymosan*, pero no con la posible participación de factores de la familia ATF/CREB. Además, contribuyen a explicar el modelo de regulación negativa de la producción de IL-12 p70 al mostrar una fuerte inducción de *hes1*, *hey1* y *tle*, así como las interacciones físicas de TLE con Hes1 y con la serina 10 de la histona H3 en respuesta al *zymosan*. Estos datos indican que en respuesta a patrones de la pared celular de hongos, las células muestran una gran capacidad para dirigir la respuesta inmune hacia la producción de IL-23 por rutas de señalización que inhiben la expresión de *il12p35* a través del reclutamiento de represores transcripcionales (Figura 62).

Conclusiones

Conclusiones

- I. El M-CSF en los macrófagos humanos estimula la expresión los receptores de tipo lectina tipo C decin-1, isoformas A y B, dectin-2, receptor de manosa y DC-SIGN. La presencia de concentraciones bajas de LPS, aunque son capaces de inducir *priming*, no modifican el patrón de expresión de estos receptores.
- II. Los macrófagos diferenciados en presencia de M-CSF muestran un aumento de su capacidad para liberar ácido araquidónico y producir PGE₂ en presencia de estímulos derivados de la pared de hongos como el *zymosan*, sin que se observe un aumento de la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico cPLA₂ y COX-2.
- III. La respuesta al *zymosan* no es paralela a la captura de las partículas. La fagocitosis de las partículas activa la vía de Syk rápidamente y NF-κB de forma tardía, conduciendo a la inducción retrasada de COX-2 y a la producción de PGE₂ tras varias horas de estimulación. En presencia de bajas dosis de LPS, los macrófagos son capaces de inducir rápidamente la vía de COX-2, y muestran una respuesta sinérgica al *zymosan*.
- IV. El *zymosan* es un potente inductor de la transcripción de *il10* dependiente del sitio CRE. Esto se produce por la formación de un complejo supramolecular unido al promotor que incluye el factor de transcripción P-CREB junto con las proteínas co-activadoras CBP y CRTC/TORC2, que junto a TBP, indicaría la inclusión de la maquinaria de transcripción.
- V. La actividad de CREB se modula por la señalización autocrina de PGE₂, los niveles de AMP cíclico, la actividad de PKA, la ruta MAPK/ERK, la regulación negativa de GSK3β sobre CREB y CRTC/TORC2 y los niveles de calcio intracelular a través de la calcineurina.
- VI. La regulación del promotor de *il23p19* en respuesta a *zymosan* depende de factores de transcripción de la familia NF-κB, en especial c-Rel, de las actividades de MSK1 y CBP y la fosforilación de histona H3 en su promotor proximal.

- VII. La regulación negativa que ejerce el *zymosan* sobre la producción de IL12 p70 se explica por la activación de represores transcripcionales de la familia Notch y la formación de un complejo represor unido al promotor de *il12p35* compuesto por Hes1, Hey1, TLE e histonas deacetilasas de la clase III (sirtuinas).

Bibliografía

Bibliografía

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Altarejos, J.Y., Montminy, M. (2011). CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 141-51.

Alvarez, Y., Municio, C., Hugo, E., Zhu, J., Alonso, S., Hu, X., Fernández, N., Sánchez Crespo, M. (2011). Notch- and transducin-like enhancer of split (TLE)-dependent histone deacetylation explain interleukin 12 (IL-12) p70 inhibition by zymosan. *J. Biol. Chem.* 286:16583-16595.

Alvarez, Y., Valera, I., Municio, C., Hugo, E., Padrón, F., Blanco, L., Rodríguez, M., Fernández, N., Crespo, MS. (2010). Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *Mediators Inflamm.* pii: 201929.

Ananieva, O., J. Darragh, C. Johansen, J. M. Carr, J. McIlrath, J. M. Park, A. Wingate, C. E. Monk, R. Toth, S. G. Santos, L. Iversen, and J. S. Arthur. (2008). The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat. Immunol.* 9: 1028-1036.

Anderson, K.V., Bokla, L., and Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.

Aste-Amezaga, M., Ma, X., Sartori, A., Trinchieri, G. (1998). Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol.* 160, 5936-44.

Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., Molina, T., Charo, I., *et al.* (2009). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med.* 206, 595-606.

Baker, R.G., Hayden, M.S., Ghosh, S. (2011). NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* 13, 11-22.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18, 767-811.

Bannister, A.J., Kouzarides, T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384, 641-3.

Barbet, G., M. Demion, I. C. Moura, N. Serafini, T. Léger, F. Vrtovsnik, R. C. Monteiro, R. Guinamard, J. P. Kinet, and P. Launay. (2008). The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 9: 1148-1156.

Barrett, NA., Maekawa, A., Rahman, OM., Austen, KF., Kanaoka, Y. (2009). Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol.* 182, 1119-28.

- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 129,823-37.
- Benkhart, E. M., M. Siedlar, A. Wedel, T. Werner, and H. W. Ziegler-Heitbrock. (2000). Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J. Immunol*. 165: 1612-1617.
- Blanco, P., Palucka, A.K., Pascual, V., Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 19, 41-52.
- Blander, J.M., Sander, L.E. (2012). Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol*. 12, 215-25.
- Bode, K.A., Schroder, K., Hume, D.A., Ravasi, T., Heeg, K., Sweet, M.J., Dalpke, A.H. (2007). Histone deacetylase inhibitors decrease Toll-like receptor-mediated activation of proinflammatory gene expression by impairing transcription factor recruitment. *Immunology* 122, 596-606.
- Böer, U., J. Eglins, D. Krause, S. Schnell, C. Schöfl, and W. Knepel. (2007). Enhancement by lithium of cAMP-induced CRE/CREB-directed gene transcription conferred by TORC on the CREB basic leucine zipper domain. *Biochem. J*. 408: 69-77.
- Braun, M.C., Kelsall, B.L. (2001). Regulation of interleukin-12 production by G-protein-coupled receptors. *Microbes Infect*. 3, 99-107.
- Brenner, S., Prösch, S., Schenke-Layland, K., Riese, U., Gausmann, U., Platzer, C. (2003). cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem*. 278, 5597-604.
- Breyer, R.M., Bagdassarian, C.K., Myers, S.A., Breyer, M.D. (2001). Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41, 661-90.
- Brightbill, H. D., S. E. Plevy, R. L. Modlin, and S. T. Smale. (2000). A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J. Immunol*. 164, 1940-1951.
- Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*. 6, 33-43.
- Brown, G.D., Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*. 413, 36-7.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*. 197, 1119-24.
- Brown, J., O'Callaghan, C.A., Marshall, A.S., Gilbert, R.J., Siebold, C., Gordon, S., Brown, G.D., Jones, E.Y. (2007). Structure of the fungal beta-glucan-binding immune receptor dectin-1: implications for function. *Protein Sci*. 16, 1042-52.
- Cao, S., J. Liu, L. Song, and X. Ma. (2004). The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J. Immunol*. 174: 3484-3492.

- Cao, S., X. Zhang, J. P. Edwards, and D. M. Mosser. (2006). NF- κ B1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* 281: 26041-26050.
- Chang, E. Y., B. Guo, S. E. Doyle, and G. Cheng. (2007). Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J. Immunol.* 178: 6705-6709.
- Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., Courey, A.J. (1999). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 13, 2218-30.
- Chung, E. Y., J. Liu, Y. Homma, Y. Zhang, A. Brendolan, M. Saggese, J. Han, R. Silverstein, L. Selleri, and X. Ma. (2007). Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 27: 952-964.
- Commins, S., Steinke, J.W., Borish, L. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol.* 121, 1108-11.
- Conkright, M.D., Canettieri, G., Sreaton, R., Guzman, E., Miraglia, L., Hogenesch, J.B., Montminy, M. (2003 a). TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell.* 12, 413-23.
- Conkright, M.D., Guzmán, E., Flechner, L., Su, A.I., Hogenesch, J.B., Montminy, M. (2003 b). Genome-wide analysis of CREB target genes reveals a core promoter requirement for cAMP responsiveness. *Mol Cell.* 11, 1101-8.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 180, 5771-7.
- Courtois, G., Gilmore, T.D. (2006). Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene.* 25, 6831-43.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., de Vries, J.E. (1991 a). Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 174, 1209-20.
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M.G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., de Vries, J.E. (1991 b). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.* 174, 915-24.
- Deak, M., A.D. Clifton, J.M. Lucocq, and D.R. Alessi. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAP2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 17, 4426-4441.
- DeManno, D.A., J.E. Cottom, M.P. Kline, C.A. Peters, E.T. Maizels, and M. Hunzicker-Dunn. (1999). Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Mol. Endocrinol.* 13, 91-105.

- Dendorfer, U., Oettgen, P., Libermann, T.A. (1994). Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4443–4454.
- Dennehy, K.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Brown, G.D. (2009). Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol.* 39, 1379-86.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T.L., Oswald-Richter, K., Kasproicz, D.J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D., Pulendran, B. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest.* 116, 916-28.
- Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Pérez-Maceda B, Gómez-Aguado F, Corcuera MT, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. (2011). Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J. Immunol.* 186:2192-2200.
- Drickdamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* 263, 9557-9560.
- Drickdamer, K. (1993). Evolution of Ca(2+) dependent animal lectins. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 45, 207-232.
- Drummond, R.A., Saijo, S., Iwakura, Y., Brown, G.D. (2011). The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol.* 41, 276-81.
- Du, Z., Y. Shen, W. Yang, I. Mecklenbrauker, B.G. Neel, and L.B. Ivashkiv. (2005). Inhibition of IFN- α signaling by a PKC- and protein tyrosine phosphatase SHP-2-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10267-10272.
- Du, Z., E. Kelly, I. Mecklenbräuker, L. Agle, C. Herrero, P. Paik, and L.B. Ivashkiv. (2006). Selective regulation of IL-10 signaling and function by zymosan. *J. Immunol.* 176, 4785–4792.
- Feng, D., Sangster-Guity, N., Stone, R., Korczeniewska, J., Mancl, M.E., Fitzgerald-Bocarsly, P., Barnes, B.J. (2010). Differential requirement of histone acetylase and deacetylase activities for IRF5-mediated proinflammatory cytokine expression. *J Immunol.* 185, 6003-12.
- Fernández, N., Renedo, M., Alonso, S., Crespo, M.S. (2003). Release of arachidonic acid by stimulation of opsonic receptors in human monocytes: the Fc γ R and the complement receptor 3 pathways. *J Biol Chem.* 278, 52179-87.
- Ferwerda, B., Ferwerda, G., Plantinga, T.S., Willment, J.A., van Spruiel, A.B., Venselaar, H., Elbers, C.C., Johnson, M.D., Cambi, A., Huysamen, C., *et al.* (2009). Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med.* 361, 1760-7.
- Fischer, A., Gessler, M. (2007). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.* 35, 4583-96.
- Forsyth, C.B., Mathews, H.L. (2002). Lymphocyte adhesion to *Candida albicans*. *Infect Immun.* 70, 517-27.

- Gantner, B.N., R.M. Simmons, S.J. Canavera, S. Akira, and D.M. Underhill. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107–1117.
- Gavino, A.C., Chung, J.S., Sato, K., Ariizumi, K., Cruz, P.D., Jr. (2005). Identification and expression profiling of a human C-type lectin, structurally homologous to mouse dectin-2. *Exp Dermatol.* 14, 281-8.
- Geijtenbeek, T.B., and Grinhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 9, 465-479.
- Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Engering, A., t Hart, B.A., and van Kooyk, Y. (2004). Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 22, 33-54.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 327, 656-61.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L.A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R.T., Consolaro, M.R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., et al. (2008). Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J Exp Med.* 205, 1447-61.
- Ghosh, H.S., Spencer, J.V., Ng, B., McBurney, M.W., Robbins, P.D. (2007). Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription. *Biochem J.* 408, 105-111.
- Gonzalez, G.A., Montminy, M.R. (1989). Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 59, 675-80.
- Goodall, J.C., Wu, C., Zhang, Y., McNeill, L., Ellis, L., Saudek, V., Gaston, J.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 17698-703.
- Goodridge, H.S., Reyes, C.N., Becker, C.A., Katsumoto, T.R., Ma, J., Wolf, A.J., Bose, N., Chan, A.S., Magee, A.S., Danielson, M.E., Weiss, A., Vasilakos, J.P., Underhill, D.M. (2011). Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'. *Nature.* 472, 471-475.
- Goodridge, H.S., Shimada, T., Wolf, A.J., Hsu, Y.M., Becker, C.A., Lin, X., Underhill, D.M. (2009). Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 182, 1146-1154.
- Goodridge, H.S., Simmons, R.M., Underhill, D.M. (2007). Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 178, 3107-15.
- Gordon, S., Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 32, 593-604.
- Gordon, S., Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5, 953-64.
- Graham, L.M., Brown, G.D. (2009). The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis. *Cytokine.* 48, 148-55.

- Grbavec, D., Stifani, S. (1996). Molecular interaction between TLE1 and the carboxyl-terminal domain of HES-1 containing the WRPW motif. *Biochem Biophys Res Commun.* 223, 701-5.
- Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S.C., Geijtenbeek, T.B. (2009). Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol.* 10, 203-13.
- Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B. (2007). C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 26, 605-616.
- Grumont, R., H. Hochrein, M. O'Keeffe, R. Gugasyan, C. White, I. Caminschi, W. Cook, and S. Gerondakis. (2001). c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8⁺ dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. *J. Exp. Med.* 194, 1021-1032.
- Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D.A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I., Drickamer, K. (2004). Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol.* 11, 591-8.
- Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S., Montminy, M. (1992). Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell.* 70, 105-13.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R., Montminy, M.R. (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 13, 4852-9.
- Hao, C.M., Breyer, M.D. (2007). Roles of lipid mediators in kidney injury. *Semin Nephrol.* 27, 338-51.
- Harizi, H., M. Juzan, V. Pitard, J. F. Moreau, and N. Gualde. (2002). Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E₂ enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J. Immunol.* 168, 2255-2263.
- Hayden, M.S., Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195-224.
- Hayden, M.S., Ghosh, S. (2011). NF-κB in immunobiology. *Cell Res.* 21, 223-44
- Heinsbroek, S.E., Taylor, P.R., Rosas, M., Willment, J.A., Williams, D.L., Gordon, S., Brown, G.D. (2006). Expression of functionally different dectin-1 isoforms by murine macrophages. *J Immunol.* 176, 5513-8.
- Herzig, S., Hedrick, S., Morantte, I., Koo, S.H., Galimi, F., Montminy, M. (2003). CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma. *Nature* 426, 190-3.
- Hogan, C.M., Thatcher, T.H., Sapinoro, R.E., Gurell, M.N., Ferguson, H.E., Pollock, S.J., Jones, C., Phipps, R.P., Sime, P.J. (2011). Electrophilic PPARγ ligands attenuate IL-1β and silica-induced inflammatory mediator production in human lung fibroblasts via a PPARγ-independent mechanism. *PPAR Res.* doi: 10.1155/2011/318134.
- Hölscher, C. (2004). The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med Microbiol Immunol.* 193, 1-17.

- Hu, X., A.Y. Chung, I. Wu, J. Foldi, J. Chen, J.D. Ji, T. Tateya, Y.J. Kang, J. Han, M. Gessler, R. Kageyama, and L.B. Ivashkiv. (2008). Integrated regulation of Toll-like receptor responses by Notch and interferon- γ pathways. *Immunity* 29, 691-703.
- Hu, X, Paik, P.K., Chen, J., Yamilina, A., Kockeritz, L., Lu, T.T., Woodgett, J.R., Ivashkiv, L.B. (2006). IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity*. 24, 563-74.
- Hume, D.A. (2008). Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol.* 1, 432-41.
- Ishii, K.J., Koyama, S., Nakagawa, A., Coban, C., and Akira, S. (2008). Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe* 3, 352-363.
- Iso, T., Kedes, L., Hamamori, Y. (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 194, 237-55.
- Ivashkiv, LB. (2009). Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. *Nat. Immunol.* 10, 340-347
- Janeway, C.A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt1, 1-13.
- Jenkins, J.K., Malyak, M., Arend, W.P. (1994). The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res.* 13, 47-54.
- Jeong, E., Lee, J.Y. (2011). Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J.* 52, 379-392.
- Kanazawa, N., Tashiro, K., Inaba, K., Lutz, M.B., Miyachi, Y. (2004). Molecular cloning of human dectin-2. *J Invest Dermatol.* 122, 1522-1524.
- Kang, Y. J., B. A. Wingerd, T. Arakawa, and W. L. Smith. (2006). Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *J. Immunol.* 177, 8111-8122.
- Kankkunen, P., Teirilä, L., Rintahaka, J., Alenius, H., Wolff, H., Matikainen, S. (2010). (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol.* 184, 6335-42.
- Kerrigan, A.M., Brown, G.D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology.* 214, 562-75.
- Kobayashi, T., Kouzaki, H., Kita H. (2010). Human eosinophils recognize endogenous danger signal crystalline uric acid and produce proinflammatory cytokines mediated by autocrine ATP. *J. Immunol.* 184, 6350–6358.
- Kollet, J.I., and T.M. Petro. (2006). IRF-1 and NF- κ B p50/cRel bind to distinct regions of the proximal murine IL-12 p35 promoter during costimulation with IFN- γ and LPS. *Mol. Immunol.* 43, 623-633.

- Kuipers, H. F., P. J. Biesta, L. J. Montagne, E. S. Haastert, P. van der Valk, and P. J. van den Elsen. (2008). CC chemokine receptor 5 gene promoter activation by the cyclic AMP response element binding transcription factor. *Blood* 112, 1610-1619.
- Kuroda E, Ishii KJ, Uematsu S, Ohata K, Coban C, Akira S, Aritake K, Urade Y, Morimoto Y. (2011). Silica crystals and aluminum salts regulate the production of prostaglandin in macrophages via NALP3 inflammasome-independent mechanisms. *Immunity* 34:514-526.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Leghmari, K., Bennasser, Y., Bahraoui, E. (2008). HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways. *Eur J Cell Biol.* 87, 947-962.
- Legler, D.F., Bruckner, M., Uetz-von Allmen, E., Krause, P. (2010). Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol.* 42, 198-201
- Leibundgut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland J, and C. Reis e Sousa. (2007). Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8, 630-638.
- Liao, X., Sharma, N., Kapadia, F., Zhou, G., Lu, Y., Hong, H., Paruchuri, K., Mahabeleshwar, G.H., Dalmas, E., Venteclef, N., Flask, C.A., Kim, J., Doreian, B., *et al.* (2011). Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 121, 2736-2749.
- Lin, S.C. (2006). Identification of an NF- κ B/HMG-I(Y)-binding site in the human IL-10 promoter. *Mol Immunol.* 43, 1325-1331.
- Liu, J., S. Cao, L.M. Herman, and X. Ma. (2003). Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)- γ -primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J. Exp. Med.* 198, 1265-1276.
- Liu, W., Ouyang, X., Yang, J., Liu, J., Li, Q., Gu, Y., Fukata, M., Lin, T., He, J.C., Abreu, M., Unkeless, J.C., Mayer, L., Xiong, H. (2009). AP-1 activated by toll-like receptors regulates expression of IL-23 p19. *J Biol Chem.* 284, 24006-24016.
- Lyakh, L., Trinchieri, G., Provezza, L., Carra, G., Gerosa, F. (2008). Regulation of interleukin-12/interleukin-23 production and the T-helper 17 response in humans. *Immunol Rev.* 226, 112-131.
- Ma, X., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G. (1996). Regulation of interleukin-12 production. *Ann N Y Acad Sci.* 795, 13-25.
- Martin, W.J., Walton, M., Harper, J. (2009). Resident macrophages initiating and driving inflammation in a monosodium urate monohydrate crystal-induced murine peritoneal model of acute gout. *Arthritis Rheum.* 60, 281-289.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 13, 453-461.

- Mbonye, U.R., Yuan, C., Harris, C.E., Sidhu, R.S., Song, I., Arakawa, T., Smith, W.L. (2008). Two distinct pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation. *J. Biol. Chem.* 283, 8611-8623.
- McGreal, E.P., Matinez-Pomares, L., and Gordon, S. (2004). Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol immunol* 41, 1109-1121.
- McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y., Gordon, S., Martinez-Pomares, L., and Taylor, P.R. (2006). The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* 16, 422-430.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-145.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Medzhitov, R. (2009). Approaching the asymptote: 20 years later. *Immunity* 30, 766-775.
- Medzhitov, R., Horng, T. (2009). Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol.* 9, 692-703.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol.* 10, 351-353.
- Moalli, F., Doni, A., Deban, L., Zelante, T., Zagarella, S., Bottazzi, B., Romani, L., Mantovani, A., Garlanda, C. (2010). Role of complement and Fc γ receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood.* 116, 5170-5180.
- Mócsai, A., Abram, C.L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L.L., Lowell, C.A. (2006). Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat. Immunol.* 7, 1326-1333.
- Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G., Goodman, R.H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 6682-6686.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8, 958-969.
- Ng, G., Sharma, K., Ward, S.M., Desrosiers, M.D., Stephens, L.A., Schoel, W.M., Li, T., Lowell, C.A., Ling, C.C., Amrein, M.W., Shi, Y. (2008). Receptor-independent, direct membrane binding leads to cell-surface lipid sorting and Syk kinase activation in dendritic cells. *Immunity* 29, 807-818.
- Nihiro, H., Otsuka, T., Izuhara, K., Yamaoka, K., Ohshima, K., Tanabe, T., Hara, S., Nemoto, Y., Tanaka, Y., Nakashima, H., Niho, Y. (1997). Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood.* 89, 1621-1628.
- Nomi, N., Kimura, K., Nishida, T. (2010). Release of interleukins 6 and 8 induced by zymosan and mediated by MAP kinase and NF- κ B signaling pathways in human corneal fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2955-2259.

- Nusinzon, I., Horvath, C.M. (2003). Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 14742-14747.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., *et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.
- Ostuni, R., Natoli, G. (2011). Transcriptional control of macrophage diversity and specialization. *Eur J Immunol*. 41, 2486-2490.
- Pahl, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 18, 6853-6866.
- Palaparti, A., Baratz, A., Stifani, S. (1997). The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. *J Biol Chem*. 272, 26604-26610.
- Palma, A.S., Feizi, T., Zhang, Y., Stoll, M.S., Lawson, A.M., Díaz-Rodríguez, E., Campanero-Rhodes, M.A., Costa, J., Gordon, S., Brown, G.D., Chai, W. (2006). Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using "designer" microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. *J Biol Chem*. 281, 5771-9.
- Park, P. H., H. Huang, M. R. McMullen, K. Bryan, and L. E. Nagy. (2008). Activation of cyclic-AMP response element binding protein contributes to adiponectin-stimulated interleukin-10 expression in RAW 264.7 macrophages. *J. Leukoc. Biol*. 83, 1258-1266.
- Parker, D., Ferreri, K., Nakajima, T., LaMorte, V.J., Evans, R., Koerber, S.C., Hoeger, C., Montminy, M.R. (1996). Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol*. 16, 694-703.
- Parry, G.C.N., Mackman, N. (1997). Role of cyclic AMP response element-binding protein in cyclic AMP inhibition of NF- κ B-mediated transcription. *J. Immunol*. 159, 5450-5456.
- Parti, R.P., Loper, R., Brown, G.D., Gordon, S., Taylor, P.R., Bonventre, J.V., Murphy, R.C., Williams, D.L., Leslie, C.C. (2010). Cytosolic phospholipase A₂ activation by *Candida albicans* in alveolar macrophages: role of dectin-1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 42, 415-423.
- Platzer, C., Fritsch, E., Elsner, T., Lehmann, M.H., Volk, H.D., Prösch, S. (1999). Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur J Immunol*. 29, 3098-3104.
- Powell, M. J., S. A. Thompson, Y. Tone, H. Waldmann, and M. Tone. (2000). Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J. Immunol*. 165, 292-296.
- Ramirez-Carrozzi, V.R., Braas, D., Bhatt, D.M., Cheng, C.S., Hong, C., Doty, K.R., Black, J.C., Hoffmann, A., Carey, M., Smale, S.T. (2009). A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell* 138, 114-128.
- Reid, D.M., Gow, N.A., Brown, G.D. (2009). Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol*. 21, 30-37.

- Rogers, N.C., Slack, E.C., Edwards, A.D., Nolte, M.A, Schulz, O., Schweighoffer, E., Williams, D.L., Gordon, S., Tybulewicz, V.L. Brown, G.D., *et al.* (2005). Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22, 507-517.
- Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2002). Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* 10, 508-514.
- Rosas, M., Liddiard, K., Kimberg, M., Faro-Trindade, I., McDonald, J.U., Williams, D.L., Brown, G.D., Taylor, P.R. (2008). The induction of inflammation by dectin-1 in vivo is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. *J. Immunol.* 181, 3549-3557.
- Rosenzweig, H.L., Clowers, J.S., Nunez, G., Rosenbaum, J.T., Davey, M.P. (2011). Dectin-1 and NOD2 mediate cathepsin activation in zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm. Res.* 60, 705-714.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 331-44.
- Saccani, S., S. Pantano, and G. Natoli. (2003). Modulation of NF- κ B activity by exchange of dimers. *Mol. Cell.* 11, 1563-1574.
- Sag, D., D. Carling, R. D. Stout, and J. Suttles. (2008). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J. Immunol.* 181, 8633-8641
- Sapirstein, A., Bonventre, J.V. (2000). Specific physiological roles of cytosolic phospholipase A(2) as defined by gene knockouts. *Biochim Biophys Acta.* 1488, 139-148.
- Sato, K., Yang, X.L., Yudate, T., Chung, J.S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, P.R., Underhill, D., Cruz, P.D., Jr., and Ariizumi, K. (2006). Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J. Biol Chem* 281, 38854-38866.
- Screaton, R. A., Conkright, M. D., Katoh, Y., J. L. Best, G. Canettieri, S. Jeffries, E. Guzman, S. Niessen, J. R. Yates Jr 3rd, H. Takemori, M. Okamoto, and M. Montminy. (2004). The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 119, 61-74.
- Sen, R., Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47, 921-928.
- Sharma, A., Kumar, M., Aich, J., Hariharan, M., Brahmachari, S.K., Agrawal, A., Ghosh, B. (2009). Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 5761-5766.
- Sheibanie, A.F., Tadmori, I., Jing, H., Vassiliou, E., Ganea, D. (2004). Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells. *FASEB J.* 18, 1318-1320.
- Sheibanie, A.F., Yen, J.H., Khayrullina, T., Emig, F., Zhang, M., Tuma, R., Ganea, D. (2007). The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis. *J Immunol.* 178, 8138-8147.

- Silen Katoh, Y., H. Takemori, X. Z. Lin, M. Tamura, M. Muraoka, T. Satoh, Y. Tsuchiya, L. Min, J. Doi, A. Miyauchi, L. A. Witters, H. Nakamura, and M. Okamoto. (2006). Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade. *FEBS J.* 273, 2730-2748.
- Smith, W.L., Langenbach, R. (2001). Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest.* 107, 1491-1495.
- Spooren, A., Kooijman, R., Lintermans, B., Van Craenenbroeck, K., Vermeulen, L., Haegeman, G., Gerlo, S. (2010). Cooperation of NF- κ B and CREB to induce synergistic IL-6 expression in astrocytes. *Cell. Signal.* 22, 871-881.
- Steinman, R.M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296.
- Steinman, R.M., Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 137, 1142-1162.
- Stoecklin, G., S. A. Tenenbaum, T. Mayo, S. V. Chittur, A. D. George, T. E. Baroni, P. J. Blackshear, and P. Anderson. (2008). Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *J. Biol. Chem.* 283, 11689-11699.
- Takata, T., Ishikawa, F. (2003). Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun.* 301, 250-257.
- Taylor, P.R., Tsoni, S.V., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Rosas, M., Findon, H., Haynes, K., Steele, C., Botto, M., Gordon, S., Brown, G.D. (2007). Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 8, 31-38.
- Tone, M., M. J. Powell, Y. Tone, S. A. Thompson, and H. Waldmann. (2000). IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J. Immunol.* 165, 286-291.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3, 133-146.
- Valera, I., N. Fernández A. García Trinidad, S. Alonso, G. D. Brown, A. Alonso, and M. Sánchez Crespo. (2008). Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 180, 5727-5736.
- van de Veerdonk, F.L., Netea, M.G., Dinarello, C.A., Joosten, L.A.(2011). Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* 32, 110-116.
- van der Pouw Kraan, T.C., Boeije, L.C., Smeenk, R.J., Wijdenes, J., Aarden, L.A. (1995). Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med.* 181, 775-779.
- Varin, A., Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology* 214, 630-641.
- Villagra, A., F. Cheng, H-W. Wang, I. Suarez, M. Glozak, M. Maurin, D. Nguyen, K. L. Wright, P. W. Atadja, K. Bhalla, J. Pinilla-Ibarz, E. Seto, and E. M. Sotomayor. (2008). The histone

- deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat. Immunol.* 10, 92-100.
- Vo, N., and R. H. Goodman. (2001). CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 13505-13508.
- Wen, A.Y., Sakamoto, K.M., Miller, L.S. (2010). The role of the transcription factor CREB in immune function. *J. Immunol.* 185, 6413-6419.
- Willment, J.A., Gordon, S., Brown, G.D. (2001). Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem.* 276, 43818-43823.
- Willment, J.A., Lin, H.H., Reid, D.M., Taylor, P.R., Williams, D.L., Wong, S.Y., Gordon, S., Brown, G.D. (2003). Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol.* 171, 4569-4573.
- Wolf, A.J., Arruda, A., Reyes, C.N., Kaplan, A.T., Shimada, T., Shimada, K., Arditi, M., Liu, G., Underhill, D.M. (2011). Phagosomal degradation increases TLR access to bacterial ligands and enhances macrophage sensitivity to bacteria. *J. Immunol.* doi:10.4049
- Wright, K.L., Weaver, S.A., Patel, K., Coopman, K., Feeney, M., Kolios, G., Robertson, D.A., Ward, S.G. (2004). Differential regulation of prostaglandin E biosynthesis by interferon- γ in colonic epithelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 141, 1091-1097.
- Xie, J., Sun, M., Guo, L., Liu, W., Jiang, J., Chen, X., Zhou, L., Gu, J. (2006). Human Dectin-1 isoform E is a cytoplasmic protein and interacts with RanBPM. *Biochem Biophys Res Commun.* 347, 1067-1073.
- Xu, S., J. Huo, K. G. Lee, T. Kurosaki, and K. P. Lam. (2009). Phospholipase Cy2 is critical for dectin-1-mediated Ca^{2+} flux and cytokine production in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 284, 7038-7046
- Yeung, F., Hoberg, J.E., Ramsey, C.S., Keller, M.D., Jones, D.R., Frye, R.A., Mayo, M.W. (2004). Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 23, 2369-2380.
- Yoon, C., Korade, Z., Carter, B.D. (2008). Protein kinase A-induced phosphorylation of the p65 subunit of nuclear factor-kappaB promotes Schwann cell differentiation into a myelinating phenotype. *J Neurosci.* 28, 3738-3746.
- Zelensky, A.N., Gready, J.E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J.* 272, 6179-6217.
- Zhang, X., Edwards, J.P., Mosser, D.M. (2006). Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. *J Immunol.* 177, 1282-1288.
- Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., Ghosh, S. (2002). The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell.* 9, 625-636.
- Zhong, H., Voll, R.E., Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell.* 1, 661-671.

Anexo 1

Durante la realización de esta tesis doctoral he participado en diferentes proyectos que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

Municio, C., Hugo, E., Alvarez, Y., Alonso, S., Blanco, L., Fernández, N., Sánchez Crespo, M. (2011). Apoptotic cells enhance IL-10 and reduce IL-23 production in human dendritic cells treated with zymosan. *Mol Immunol.* 49, 97-106

Alvarez, Y., **Municio, C.**, Hugo, E., Zhu, J., Alonso, S., Hu, X., Fernández, N., Sánchez Crespo, M. (2011). Notch- and transducin-like enhancer of split (TLE)-dependent histone deacetylation explain interleukin 12 (IL-12) p70 inhibition by zymosan. *J Biol Chem.* 286, 16583-95.

Alvarez, Y., Valera, I., **Municio, C.**, Hugo, E., Padrón, F., Blanco, L., Rodríguez, M., Fernández, N., Crespo, M.S. (2010). Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. *Mediators Inflamm.* pii: 201929.

Alvarez, Y., **Municio, C.**, Alonso, S., Sánchez Crespo, M., Fernández, N. (2009). The induction of IL-10 by zymosan in dendritic cells depends on CREB activation by the coactivators CREB-binding protein and TORC2 and autocrine PGE2. *J Immunol.* 183, 1471-9.

Alvarez, Y., **Municio, C.**, Alonso, S., San Román, J.A., Sánchez Crespo, M., Fernández, N. (2009). Cyclooxygenase-2 induced by zymosan in human monocyte-derived dendritic cells shows high stability, and its expression is enhanced by atorvastatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 329, 987-94

Municio, C., Alvarez, Y., Montero, O., Hugo, E., Rodríguez, M., Alonso, S., Fernández, N., Sánchez Crespo, M. The response of human macrophages to β -glucans depends on the microenvironment. (2012). Manuscrito en preparación.

Publicaciones relacionadas con la tesis

The Induction of IL-10 by Zymosan in Dendritic Cells Depends on CREB Activation by the Coactivators CREB-Binding Protein and TORC2 and Autocrine PGE₂¹

Yolanda Alvarez,* Cristina Municio,* Sara Alonso,* Mariano Sánchez Crespo,^{2*} and Nieves Fernández[†]

Stimulation of human monocyte-derived dendritic cells with the yeast extract zymosan is characterized by a predominant production of IL-10 and a strong induction of cyclooxygenase-2, but the molecular mechanisms underlying this response are only partially understood. To address this issue, the activation of transcription factors that may bind to the *il10* proximal promoter was studied. Binding activity to Sp1, Sp3, NF- κ B, and cAMP response element (CRE) sites was detected in the nuclear extracts of dendritic cells; however these binding activities were not influenced by zymosan. No binding activity to Stat1, Stat3, and c/EBP sites was detected. Notably, zymosan activated κ B-binding activity, but inhibition of NF- κ B was associated with enhanced IL-10 production. In sharp contrast, treatments acting on CREB (CRE binding protein), including 8-Br-cAMP, PGE₂, and inhibitors of PKA, COX, and glycogen-synthase kinase-3 β showed a direct correlation between CREB activation and IL-10 production. Zymosan induced binding of both P-CREB and CREB-binding protein (CBP) to the *il10* promoter as judged from chromatin immunoprecipitation assays, whereas negative results were obtained with Ab reactive to Sp1, Sp3, c-Maf, and NF- κ B. Zymosan also induced nuclear translocation of the CREB coactivator transducer of regulated CREB activity 2 (TORC2) and interaction of TORC2 with P-CREB coincidental with the association of CREB to the *il10* promoter. Altogether, our data show that zymosan induces *il10* transcription by a CRE-dependent mechanism that involves autocrine secretion of PGE₂ and a network of interactions of PKA, MAP/ERK, glycogen-synthase kinase-3 β , and calcineurin, which regulate CREB transcriptional activity by binding the coactivators CBP and TORC2 and inhibiting CBP interaction with other transcription factors. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 1471–1479.

Fungal infections are very common due to the high number of people with a compromised immune system and the widespread use of antibiotics, the ubiquitous *Candida* being the most prevalent infectious fungus. The first line of defense against fungi is the innate immune system, which is mainly composed of phagocytic cells endowed with a set of germline encoded receptors that recognize conserved microbial structures. These receptors, so called pattern recognition receptors (PRR),³ display broad substrate specificity, enabling the host to recognize a wide range of pathogens without the need for somatic mutation. The

structures expressed in pathogens, which in turn are recognized by PRR, are called pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and, in the case of *Candida*, α -mannans and β -glucans are the most important PAMP. The PRR that recognize α -mannans are the mannose receptor and DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin), whereas the recognition of β -glucans is conducted by dectin-1 (1) and TLR2 (2–4). The recognition of fungal PAMP by their cognate PRR results in a phagocytic and inflammatory response directed to the elimination of the pathogen. However, the secretion of inflammatory mediators that ensues engagement of PRR may differ according to the nature of the receptors involved and has important consequences for the outcome of the infection.

Among the distinct types of phagocytes, dendritic cells (DC) regulate the immune response to infection because of the array of cytokines they release. A response dominated by IL-12 p70 is generally protective by promoting Th1 immunity, whereas IL-10 prevents excessive activation of the immune response and limits immune pathology, but alternatively may prevent the complete eradication of pathogens.

Previous studies in macrophages and DC have disclosed that fungal PAMP acting through dectin-1 and DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN) induce a cytokine response characterized by a high production of IL-10 and IL-23, and a low secretion of IL-12 p70 (5–8), as compared with the effect of archetypal TLR4 agonists. This may have pathophysiological consequences for the persistence of fungal infection and raises the question of the signaling pathways involved in the predominant IL-10 response. The regulation of IL-10 production has been the subject of intense research. However, most studies have been conducted in archetypal TLR4 models using LPS as a ligand and

*Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valladolid, Spain; and [†]Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain

Received for publication January 28, 2009. Accepted for publication May 20, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from Plan Nacional de Salud y Farmacia (Grant SAF2007-60446), Fundación Ramón Areces, Junta de Castilla y León (Grant CSI05C05), and Red Temática de Investigación Cardiovascular. N.F. is under contract within the Ramón y Cajal Program (Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and Fondo Social Europeo).

² Address correspondence and reprint request to Dr. M. Sánchez Crespo, Instituto de Biología y Genética Molecular, C/Sanz y Forés s/n, 47003-Valladolid, Spain. E-mail address: mscres@ibgm.uva.es

³ Abbreviations used in this paper: PRR, pattern recognition receptor; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; DC, dendritic cell; DC-SIGN, DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin; CREB, CRE binding protein; COX, cyclooxygenase; GSK, glycogen synthase kinase; ChIP, chromatin immunoprecipitation; PKA, protein kinase A; MSK, mitogen and stress kinase; CRE, cAMP response element; CBP, CREB-binding protein; Pbx1b, pre-B cell leukemia transcription factor-1b; TBP, TATA box binding protein; TORC2, transducer of regulated CREB activity 2.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

both transcriptional and posttranscriptional mechanisms have been reported. As regards transcriptional regulation, many transcription factors have been considered as master regulators, namely Stat3 (9–12), Sp1 and Sp3 (12–14), c-Maf (15), NF-Y (16), NF- κ B (17–19), Pbx1b (pre-B cell leukemia transcription factor-1b) (20), c/EBP (21), NFAT (22, 23), and cyclic AMP response element (CRE) binding protein (CREB) (24, 25). In addition, posttranscriptional regulation of IL-10 message has also been proposed because of the high number of AU-rich elements in the 3'-UTR of IL-10 mRNA (26) and their binding by the RNA-binding protein tristetraprolin, which destabilizes the message (27). In this study, we have analyzed the signaling mechanisms whereby IL-10 is induced in DC by zymosan, an extract of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall, the composition of which mimics the structure of *Candida*. After addressing the possible involvement of several transcription factors and mRNA stability, we found a major role of a CRE (cyclic AMP response element) site and have analyzed the protein kinase network associated with the activation of CREB (CRE-binding protein) and the role of CREB coactivators CBP (CRE-binding protein) and TORC2 (transducer of regulated CREB activity 2, also known as CREB-regulated transcriptional coactivator 2, CRTC2). In addition, we have found a cyclooxygenase (COX)-dependent autocrine feed-forward mechanism and a negative regulation of IL-10 by NF- κ B activation, most likely due to a competition of both CREB and NF- κ B for a limited amount of CBP.

Materials and Methods

Reagents and cells

Zymosan, mannan from *Saccharomyces cerevisiae*, H-89, LiCl, and Opti-Prep were from Sigma-Aldrich. *SN-50* was purchased from Calbiochem, IL-10 and TNF- α were assayed with Biotrack ELISA systems from Amersham Biosciences. Mononuclear cells were collected from buffy coats of healthy donors by centrifugation on Ficoll-Hypaque cushions. The separation of monocytes and their differentiation into DC has been reported previously (7). Anti-dectin-1 mAb was a gift from Dr. Gordon D. Brown (Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, South Africa). Anti-mannose receptor mAb (no. 555952) was from BD Pharmingen and anti-DC-SIGN mAb (no. MAB161) was from R&D Systems.

Immunoblots

Proteins were separated by electrophoresis in SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were used for immunodetection of MAPK/ERK and p38 MAPK with anti-ACTIVE MAPK and p38 polyclonal Abs from Promega, and with reagents from Cell Signaling Technology for the assay of Stat1, Stat3, and glycogen synthase kinase (GSK)-3 β -Ser9 phosphorylation. Quantitation of the blots was conducted using BioRad Quantity One gel imaging software (Bio-Rad). For immunoblots directed to assay nuclear translocation of TORC2, nuclear extracts were obtained by using a nuclear extract kit (Active Motif). Coimmunoprecipitation of P-CREB and TORC2 was conducted using the Nuclear Complex Co-IP kit of Active Motif. Anti-TORC2 Ab was from Santa Cruz Biotechnology.

Real time RT-PCR of IL-10, IL-12 p40, IL-12 p35, and COX-2

Purified RNA was depleted of genomic DNA by treatment with DNase (Turbo-DNA free, Ambion) and used for reverse transcriptase reactions. The resulting cDNA was amplified in a PTC-200 apparatus equipped with a Chromo4 detector (Bio-Rad) using SYBR Green I mix containing Hot Start polymerase (ABgene). The sets of primers for PCR are shown in supplemental Table S1.⁴ Cycling conditions were adapted to each set of primers, but in most cases were as follows: 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 30 s. GAPDH was used as a housekeeping gene to assess the relative abundance of the different mRNA, using the comparative C_T (threshold cycle) method.

Nuclear transcription factor DNA-binding activity

Nuclear extracts of DC were obtained from cell cultures grown in 10-cm tissue culture dishes by using a nuclear extract kit. Levels of transcription factor binding activity in the nuclear extracts were quantified by TransAM Sp1/3, Stat Family, NF-YA, c/EBP α/β , and pCREB assay kits (Active Motif) and expressed as the OD at 450 nm. The assay of NF- κ B binding activity was conducted by conventional methods as previously described (28). For this purpose, DC were washed with ice-cold hypotonic lysis buffer. Unbroken cells were eliminated by centrifugation at 1,000 \times g for 10 min, and the nuclei were collected by centrifugation at 15,000 \times g for 1 min. The nuclear pellet was resuspended in high salt extraction buffer and the nuclear extract was obtained by pelleting for 30 min at 105,000 \times g. Double-stranded oligonucleotide probes were end labeled with [γ -³²P]ATP using T4 polynucleotide kinase. A total of 10 μ g nuclear protein was incubated for 20 min on ice with radiolabeled oligonucleotide probes (2–6 \times 10⁴ cpm) in a 25 μ l reaction buffer containing 2 μ g poly(dI-dC), 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 8% Ficoll, and 4% glycerol. Nucleoprotein-oligonucleotide complexes were resolved by electrophoresis in a 4% nondenaturing PAGE. The oligonucleotide sequences used for the detection of binding activity to the NF- κ B sites from the COX-2 promoter are 5'-GGGGAGTGGGGACTACCCGCTCT-3' (-163–154 Site I) and 5'-GGGGAGAGGGGATTCCCTGCGC-3' (-388–379 Site II).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

ChIP assays were conducted with reagents and Ab from Santa Cruz Biotechnology, except anti-P-CREB Ab, which was from Upstate Biotechnology and anti-TBP (TATA box binding protein), which was from Diagenode. In brief, DC were stimulated and then washed twice with PBS and fixed with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Cross-linking was terminated by 0.125 M glycine and after washing, cells were resuspended in lysis buffer. Crude nuclear extracts were collected by microcentrifugation at 2,000 rpm for 5 min and resuspended in a lysis buffer containing a high salt concentration. Chromatin sonication was conducted using a Bioruptor device (Diagenode) set at maximal power for three intervals of 10 min, including 30 s sonication and 30 s pause. This procedure constantly yielded chromatin fragments of 200–600 bp. The chromatin solution was precleared by adding 50 μ l Protein A/G PLUS-Agarose for 30 min at 4°C under continuous rotation. After elimination of the beads, Ab was added for overnight incubation at 4°C, and then Protein A/G PLUS-Agarose was added and incubated for an additional period of 2 h at 4°C. Beads were harvested by centrifugation at 12,000 rpm and sequentially washed with lysis buffer (high salt), wash buffer, and elution buffer. Cross-links were reversed by heating at 67°C in a water bath, and the DNA bound to the beads isolated by extraction with phenol/chloroform/isoamylalcohol. PCR were conducted with primers designed from both the *il10* and the *cox2* promoters.

Results

Zymosan is a strong inducer of IL-10 production by DC

Zymosan is a potent stimulus for IL-10 production through a Syk-dependent signaling pathway (5, 6). This route conveys signals different from those triggered by TLR2, which may lead to IL-12 p70 induction, and explains why zymosan is a less potent stimulus for IL-12 p70 production than genuine TLR4 ligands such as LPS. In a previous study conducted in DC, we have found that zymosan induces about a fifth of the amount of IL-12 p70 produced by LPS, whereas it is a strong stimulus for COX-2 induction (7). Because the production of IL-10 and IL-12 p70 by DC defines the polarization of T cells, we scrutinized the molecular mechanisms underlying the response to a fungal stimulus. Zymosan was a more potent stimulus than LPS to induce IL-10 production in 11 independent experiments (Fig. 1A), although the difference did not reach statistical significance due to the dispersion of the data. As compared with stimuli signaling through other pathways, zymosan was a stronger stimulus than immune complexes, which archetypically transduce signals through Syk-dependent mechanisms. IFN- γ , which acts through the Jak/Stat signaling pathway, failed to induce IL-10. The production of IL-10 elicited by zymosan was time- and dose-dependent (Fig. 1, B and C). Notably, the response to LPS increased up to a concentration of 20 μ g/ml, whereas in the

⁴ The online version of this article contains supplemental material.

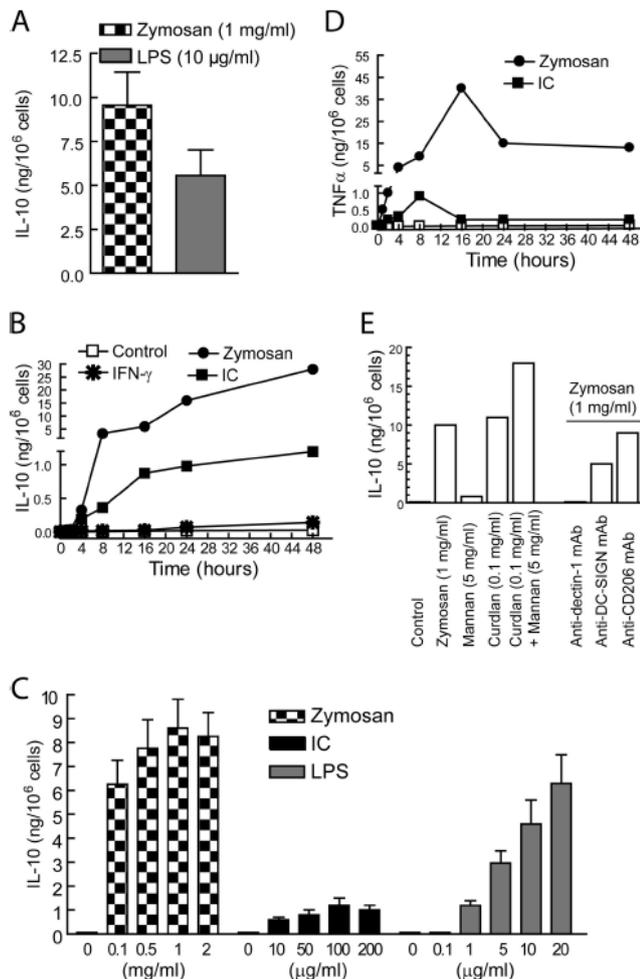


FIGURE 1. Production of IL-10 by DC stimulated with different stimuli. *A*, Effect of zymosan and LPS on IL-10 production by DC from 11 different samples. *B*, Time-course of IL-10 production elicited by zymosan, IC, and IFN- γ . *C*, Dose-response of IL-10 production in response to zymosan, IC, and LPS. *D*, Production of TNF- α by zymosan and IC. *E*, The effect of zymosan, mannan, curdlan and combination thereof on IL-10 production is shown on the left columns. The effect of 10 μ g/ml mAb reactive to dectin-1, DC-SIGN, and CD206/mannose receptor is shown on the right columns. Preincubation with the mAb was conducted for 30 min before zymosan addition.

case of zymosan plateaued at 1 mg/ml and was accompanied by a strong stimulation of TNF- α production (Fig. 1*D*). To address whether the effect of zymosan could be explained by either β -glucans or α -mannans, additional experiments were conducted using curdlan, a pure β -glucan, and combination of curdlan and mannan, as well as mAb reactive to dectin-1, DC-SIGN, and the mannose receptor. As shown in Fig. 1*E*, mannan showed a synergistic effect with curdlan, whereas anti-dectin-1 mAb produced a complete inhibition of the IL-10 response and anti-DC-SIGN mAb inhibited IL-10 production by ~50%. In contrast, anti-mannose receptor mAb showed no effect. These results suggest that similar to what has been described regarding arachidonic acid release (7), receptors for both β -glucan and α -mannan, in particular DC-SIGN, cooperate to induce IL-10, although dectin-1 seems to be the main receptor involved.

To address whether the distinct effect of zymosan on DC can be explained by an effect on transcription, the levels of the mRNA encoding IL-12 p40, IL-12 p35, IL-10, and COX-2 were assayed in cells treated with LPS, zymosan, and IC. As shown in Fig. 2,

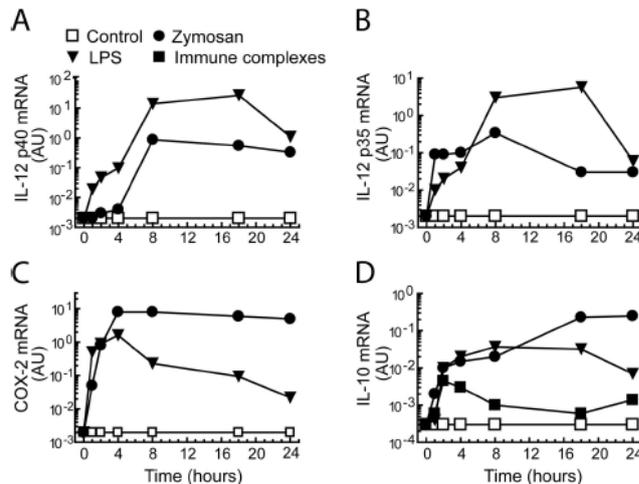


FIGURE 2. Effect of different stimuli on the expression of the mRNA encoding IL-12 p40 (*A*), IL-12 p35 (*B*), COX-2 (*C*), and IL-10 (*D*). DC were stimulated for different times with the indicated stimuli and collected for the extraction of total RNA and real-time RT-PCR.

LPS was the strongest stimuli for the induction of IL-12 p40 and IL-12 p35, whereas zymosan was the strongest stimulus for both IL-10 and COX-2 mRNA induction, what agrees with the notion that differences in the expression of cytokines and COX-2 elicited by the different stimuli can be explained by transcriptional mechanisms. Experiments directed to address the influence of message stability were conducted in cells treated with the transcription inhibitor actinomycin D (Fig. S1). Under these conditions, IL-10 mRNA decreased to 38% 2 h after the addition of the drug, whereas in control cells only decreased to 86%, thus suggesting that stabilization of the mRNA does not play a major role in the control of IL-10 production.

Transcriptional regulation of IL-10

Because the regulation of IL-10 expression is best explained by transcriptional mechanisms, the study of the transcription factors implicated in this regulation was addressed by several approaches. Computer analysis of human and mouse *il10* promoters was conducted using the MatInspector program and the TRANSFAC database (Genomatics Software) to detect binding sites for transcription factors. In addition, both sequences were aligned with DNA Block Aligner software to define conserved areas, because these regions are more likely to represent functionally relevant elements (Fig. S2*A*). Several of the sites detected have been previously associated with the transcriptional regulation of *il10*, but there are some discrepancies regarding their functional relevance and studies using fungal stimuli have not been reported so far. Our first approach was to search for the presence of binding activities to the consensus strings of the transcription factors found on the human *il10* promoter. As shown in Fig. 3, *A*, *B*, and *G*, no binding activity to Stat and C/EBP consensus sequences was observed in the nuclear extracts of cells treated with zymosan. However, binding activity to Stat1 and Stat3 was elicited by IFN- α and c/EBP binding activity could be detected in a control nuclear extract from rat liver. Notably, constitutive binding activity to Sp sites compatible with both Sp1 and Sp3 was detected (Fig. 3, *C* and *D*), as well as binding activity to NF-Y (Fig. 3*E*) and CRE (Fig. 3*F*) consensus sequences. As regards NF-Y, binding activity was not detected in monocytes, whereas high amounts were found in lymphocytes, Jurkat cells, and DC (Fig. 3*E*). These findings agree with previous reports in monocytic cells where it has been reported that the A

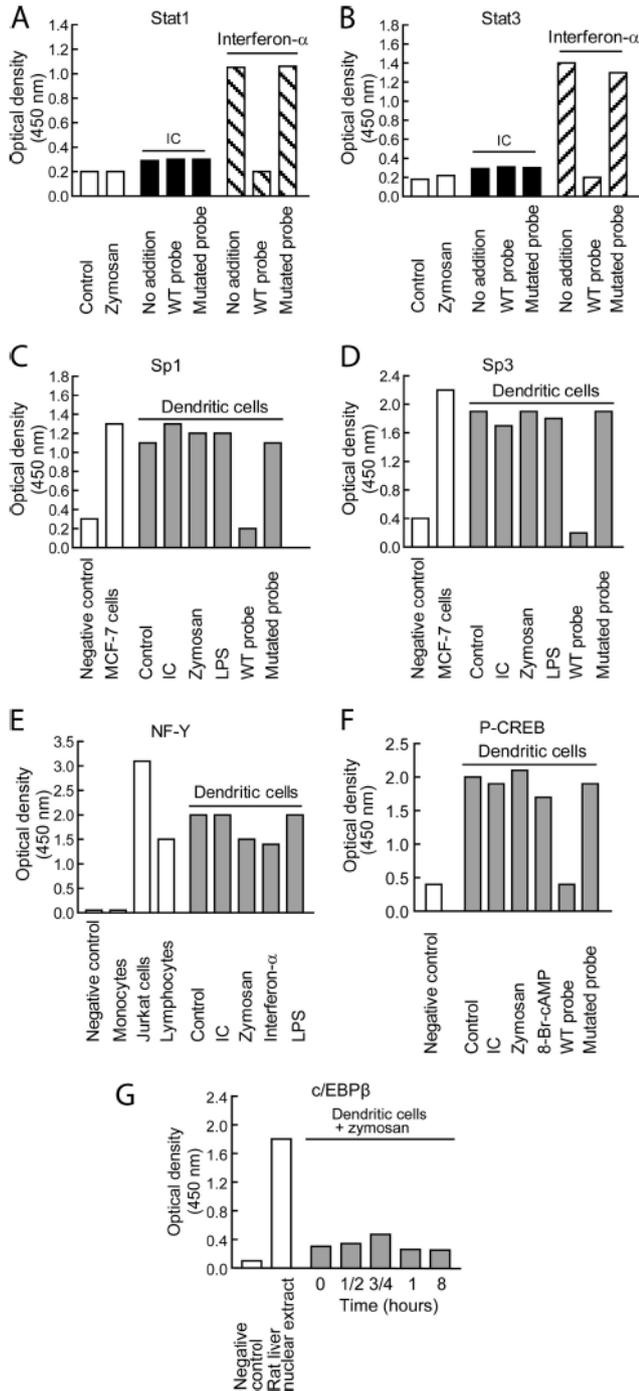


FIGURE 3. Presence of transcription factor binding activity in nuclear extracts. DC were stimulated with different additions for 30 min as indicated. After this time, nuclear extracts were obtained and used for the binding assay to consensus sequences using TransAM assay. The specificity of binding was confirmed by carrying out the reaction in the presence of an excess of wild type (WT) and mutated probe. Positive and negative controls have been included as indicated on each panel. These are representative experiments of at least two for each transcription factor.

subunit of NF- κ B, which is indispensable for DNA binding, is expressed after monocyte differentiation.

NF- κ B is activated by zymosan and has been associated to the regulation of *il10* in mouse macrophages (17–19), as well as to the regulation of *cox2*. Taking into account that the expression of COX-2 parallels IL-10 induction, experiments were conducted us-

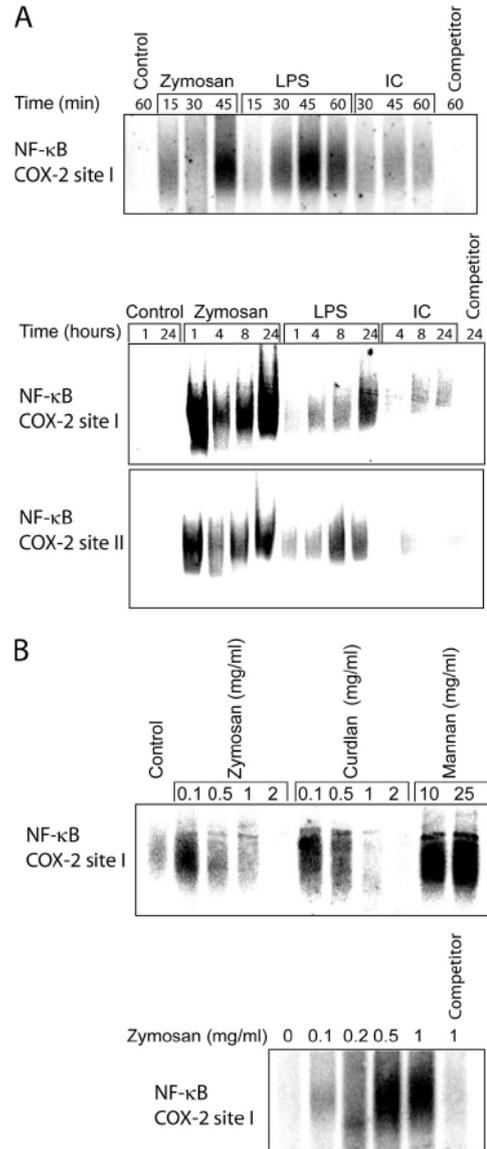


FIGURE 4. Nuclear extracts from cells incubated in the presence of different stimuli contain binding activities to the NF- κ B sites of COX-2 promoter. *A*, DC were incubated with 1 mg/ml zymosan, 10 μ g/ml LPS, and 100 μ g/ml IC. At the times indicated, cell lysates were collected and the nuclear extracts assayed for binding to probes containing the κ B-binding sites of the COX-2 promoter. Lanes marked “Competitor” indicate that the binding reaction was conducted in the presence of a 100-fold excess of unlabeled oligonucleotide probes. *B*, To address the dose-dependency of the induction of κ B binding activity, nuclear extracts from cells stimulated for 45 min in the presence of different concentrations of stimuli were used. These are representative experiments of three with similar results.

ing probes containing the κ B sites from the human *cox2* promoter that have been found of functional relevance. As shown in Fig. 4, zymosan and LPS were strong activators of NF- κ B binding activity both at early and late times after the addition of the stimuli, because peaks of activity were observed both 1 and 24 h after addition of the stimuli (Fig. 4A), thus suggesting that both direct and indirect mechanisms might be involved in this response. In contrast, IC displayed a nonsignificant activation. The κ B-binding activity was also observed in response to curdlan and mannan (Fig. 4B, top), thus agreeing with the involvement of both β -glucan and α -mannan components in zymosan response. The response to zymosan was dose-dependent and binding was competed by the

unlabeled sequence (Fig. 4B); however, in some cases maximal response was observed with 0.1 mg/ml, what could be explained by differences linked to different donors, basal activation of the DC, or variations in the time-course of NF- κ B activation. However, as the sequence involved in NF- κ B-dependent regulation of *il10* expression in the mouse is not conserved in the human *il10* promoter, the simple presence of κ B-binding activity in the nuclear extracts upon zymosan challenge is not a proof of the involvement of NF- κ B in the regulation of IL-10 expression in human DC. Altogether, the above-mentioned results do not support the involvement of Stat1, Stat3, and c/EBP in the regulation of IL-10 induction, and additional experiments were conducted focusing on the possible involvement of NF- κ B, Sp1, Pbx1b, and CREB.

Effect of the pharmacological modulation of CREB and NF- κ B activity on IL-10 production

Because the activity of CREB and NF- κ B can be modulated by pharmacological tools, experiments were conducted with 8-Br-cAMP, a cell permeable analog of cyclic AMP, PGE₂, and the protein kinase A (PKA) inhibitor H-89. As shown in Fig. 5, increase of the intracellular levels of cyclic AMP by both PGE₂ and 8-Br-cAMP had on its own a limited effect on IL-10 production. In contrast, stimulation of DC with zymosan in the presence of these compounds produced a synergistic increase of IL-10 production. Notably, the opposite effect was observed in the presence of the protein kinase A inhibitor H-89 (Fig. 5A). An enhancing effect on IL-10 production was also observed in the presence of LiCl, a compound which has been found to increase IL-10 production by inhibiting GSK3 β , an enzyme that positively regulates NF- κ B activity and negatively regulates CREB activity (25, 29). The effect of LiCl and 8-Br-cAMP was not additive, thus indicating that both compounds might be acting on the same pathway. In keeping with the reported opposite effect of GSK3 β on CREB and NF- κ B activity, blockade of NF- κ B activity by two structurally unrelated inhibitors of NF- κ B, SN50, and PDTC, was accompanied by an increase of IL-10 production (Fig. 5B). Because the regulation of CREB activity has been related to calcium/calmodulin kinases and CRE coactivators, the activity of which depends on a sensor of both Ca²⁺ and cyclic AMP levels (30), the Ca²⁺-dependence of IL-10 production was addressed. IL-10 production was blunted by Ca²⁺-chelation (Fig. 5C). Ionomycin induced a limited production of IL-10, thus suggesting that intracellular Ca²⁺ levels are not the only factor determining IL-10 production. However, low micromolar concentrations of cyclosporin induced a significant decrease of IL-10 production, thus pointing to the involvement of calcineurin in the regulation of IL-10 production (Fig. 5C). Because E prostanoid receptors type 2 and 4 are involved in the regulation of the intracellular levels of cyclic AMP and zymosan is a strong inducer of COX-2 and PGE₂ production, the effect of inhibiting COX-1 with the specific inhibitor SC560 0.3 μ M and COX-2 with the specific inhibitor NS398 1 μ M was addressed. As shown in Fig. 5D, the isolated addition of any of those compounds did not show any significant effect on IL-10 production, although NS398 significantly inhibited IL-10 production when tested at 5 μ M. Notably, combination of both compounds produced a significant inhibition, thus suggesting that both COX isoforms might be involved in the autocrine production of PGE₂ that regulate intracellular cyclic AMP levels and zymosan-induced IL-10 production. Attempts to modulate the production of IL-10 induced by IC showed again enhancement by 8-Br-cAMP and inhibition by H-89, thus suggesting a similar mechanism of regulation as that involved in response to zymosan (Fig. 5E). To obtain further insight into the signaling mechanisms involved in IL-10 induction by zymosan, the effect of LiCl and H-89 on GSK3 β -Ser9 phosphor-

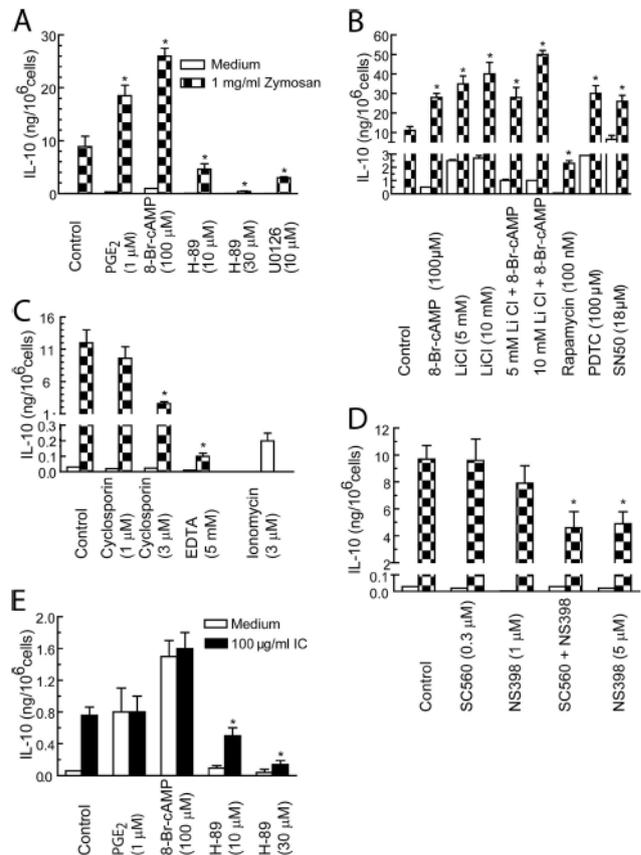


FIGURE 5. Effect of different additions on the production of IL-10. DC were preincubated for 30 min with the different additions as indicated and then stimulated with zymosan and IC. Supernatants were collected after 48 h in culture for the assay of IL-10. Results represent mean \pm SEM of five to six independent experiments. *, $p < 0.05$.

ylation, I κ B α degradation, MAP/ERK activation, and COX-2 induction was addressed. Unlike H-89, LiCl and zymosan were potent inducers of GSK3 β -Ser9 phosphorylation (Fig. S3), a posttranslational modification associated with inhibition of GSK3 β activity (31). Notably, LiCl also induced a slight induction of COX-2 and enhanced the effect of zymosan, thus pointing to a parallel regulation of IL-10 and COX-2 induction, and explaining the enhancing effect of GSK3 β inhibition on both IL-10 and COX-2 expression. The degradation of I κ B α induced by zymosan was not influenced by the pharmacological treatments, including SN50, which blocks NF- κ B p50 nuclear translocation, but does not inhibit I κ B α degradation. In addition, the activation of MAP/ERK was not influenced by those treatments (Fig. S3). Taken together, these results suggest that the polarization of DC cytokine response vs IL-10 production might depend on the balance between NF- κ B and CREB activity, and that mechanisms other than the simple activation of the DNA-binding activity of these factors by separation of I κ B inhibitors and phosphorylation of CREB, respectively, regulate the final response.

The MAPK cascade and IL-10 production

IL-10 production has been shown to be highly dependent on signaling cascades regulated by both the MAPK/ERK (32, 33) and the p38 MAPK (34). Triggering the MAPK/ERK pathway could activate kinases involved in the phosphorylation of CREB (30, 32, 33) or in the phosphorylation of histones (35), thus allowing binding of transcription factors to the promoters. The effect of p38

MAPK has been associated with the activation of mitogen and stress kinases (MSK), which in turn phosphorylate CREB in murine cells treated with LPS (36). IL-10 production was inhibited by the MAPK/ERK inhibitor U0126 (Fig. 5A), but not by the p38 inhibitor SB203580 (data not shown). As shown in Fig. S4, all of the stimuli activated the p38 MAPK pathway, although zymosan was the most active activator of the MAPK/ERK route. These data are consistent with the involvement of MAPK pathways in the regulation of IL-10 production and support the preferential involvement of the MAPK/ERK route in response to zymosan.

The role of distinct transcription factors on IL-10 induction

ChIP assays were conducted using Abs reactive to P-CREB, CBP, c-Maf, NF- κ B, Sp1, Pbx1, and TBP. As shown in Fig. 6A, significant binding of P-CREB to the *il10* promoter was observed in DC stimulated with zymosan, but not in control cells nor in samples treated with an irrelevant Ab. Pretreatment with the PKA inhibitor H-89 inhibited P-CREB binding to the *il10* promoter (Fig. 6A, right). Notably, P-CREB binding to the *il10* promoter was associated with a 64-fold increase of the amount of CBP bound to the *il10* promoter (Fig. 6B). ChIP was negative when the PCR were conducted using primers from the *il12p35* promoter, which is known not to include CRE sites (data not shown). P-CREB binding was also detected in the *cox2* promoter upon zymosan stimulation (Fig. 6A, bottom), which agrees with the presence of two CRE sites in this promoter (Fig. S2B) and with the functional relevance of these sites in *cox2* transcriptional regulation (37, 38). Notably, stimulation of DC with both zymosan and curdlan was associated with binding of TBP to the *il10* promoter (Fig. 6C, left), which suggests association of P-CREB and CBP binding to the promoter with recruitment of the RNA polymerase II and activation of transcription. Curdlan also enhanced the binding of CBP to the *il10* promoter, which agrees with the notion that the β -glucan receptor is involved in at least a part of the response (Fig. 6C, right). Binding of P-CREB and CBP to the promoters was coincidental with the detection of TORC2 in the nuclear extracts, which was observed between 30 and 60 min after zymosan addition, and to a reduced extent at 4 h. In contrast, the subcellular distribution of the nuclear protein TBP and the cytoplasmic protein β -actin was not modified under these conditions (Fig. 6D), thus pointing to the selectivity of the effect of zymosan on TORC2 translocation. Moreover, immunoprecipitation of the nuclear extracts with anti-P-CREB Ab showed that TORC2 coimmunoprecipitated with P-CREB in DC treated with zymosan (Fig. 6E). Taken together, these findings suggest that zymosan induces binding of P-CREB to CRE sites, recruitment of the coactivators CBP and TORC2, binding of components of the RNA II polymerase complex to the *il10* promoter, and that these responses require PKA activity.

As regards the possible involvement of c-Maf, we found the expression of the mRNA encoding both the long and the short form of c-Maf in DC (Fig. S5A), the induction of which by LPS and IL-4 has been reported in monocytes (15), but we could not show binding to the *il10* promoter in ChIP assays (data not shown). Regarding Sp1 and Sp3, the detection of binding activity in resting cells was not accompanied by binding to the *il10* promoter, which agrees with the notion that this family of transcription factors behaves as a constitutive activator of housekeeping genes and other TATA-less genes. ChIP assays with anti-Pbx1 Ab showed immunoprecipitation of <0.001% of the input, without difference between resting and zymosan-treated DC. Stat3 has been associated with *il10* transcriptional activation, specially in response to ligands of TLR4, which differ from zymosan because of their capacity to

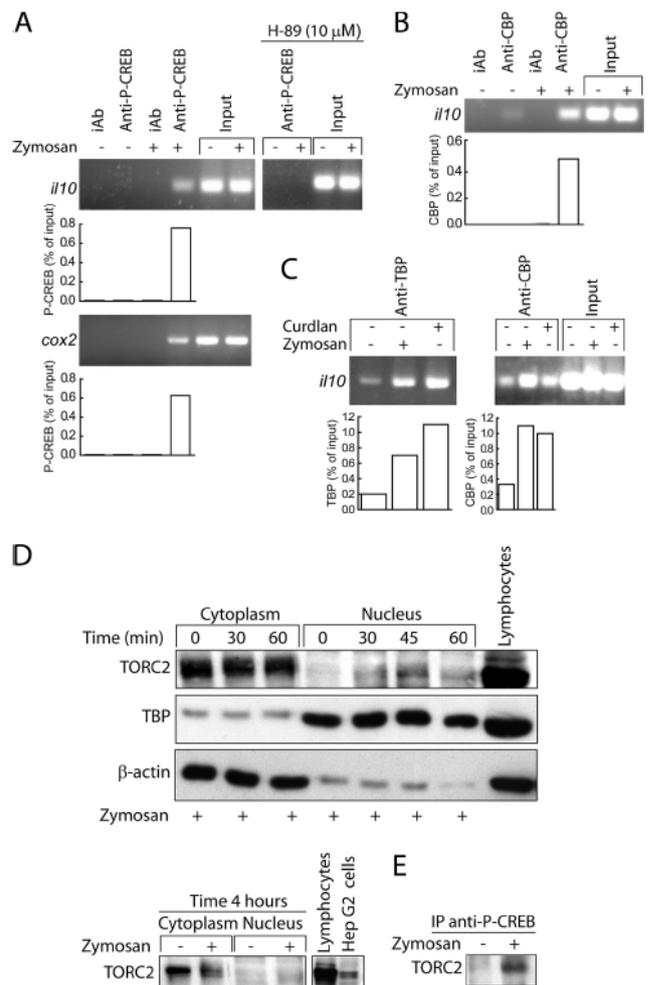


FIGURE 6. Binding of P-CREB, CBP, and TBP to the IL-10 promoter. **A**, **B**, and **C**, DC were stimulated with 1 mg/ml zymosan or 0.1 mg/ml curdlan for 30 min and at the end of this period, cells were fixed with 1% formaldehyde. After separation of the nuclear pellet, solubilization of chromatin, and preclearing, Abs were added for immunoprecipitation with Protein A/G PLUS-Agarose beads. Semiquantitative PCR were conducted for 30 cycles and real-time PCR for 40 cycles with primers from both *il-10* and *cox-2* promoters. Results are expressed as percentage on input chromatin. In some cases, DC were stimulated with curdlan or zymosan in the presence of 10 μ M H-89, as indicated. These are representative experiments of two or three for every condition. **D**, Effect of zymosan on the nuclear translocation of TORC2. DC were incubated with 1 mg/ml zymosan and at the times indicated DC were lysed and used for the separate assay of TORC2 in the cytoplasmic and nuclear fractions. Preparations known to contain high amounts of TORC2 such as Hep G₂ cells and lymphocytes were used as control. The distribution in the fractions of the nuclear protein TBP (TATA box binding protein) and the cytoplasmic protein β -actin was assayed as a control of the nuclear translocation assay. **E**, Coimmunoprecipitation of P-CREB and TORC2 in nuclear extracts after zymosan treatment. DC were incubated in the presence and absence of 1 mg/ml zymosan for 30 min and then 500 μ g protein from the nuclear fractions were used for immunoprecipitation with 5 μ g anti-P-CREB Ab. Anti-TORC2 Ab was used for blotting.

activate the Jak/Stat pathway by TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β)-dependent mechanisms. In addition to our inability to show Stat-binding activity in nuclear extracts from stimulated DC, which was further scrutinized in EMSA assays with the consensus Stat sequence (data not shown), we did not find tyrosine-phosphorylated Stat1 in DC stimulated with zymosan, whereas it was induced upon LPS and IFN- γ treatment or after

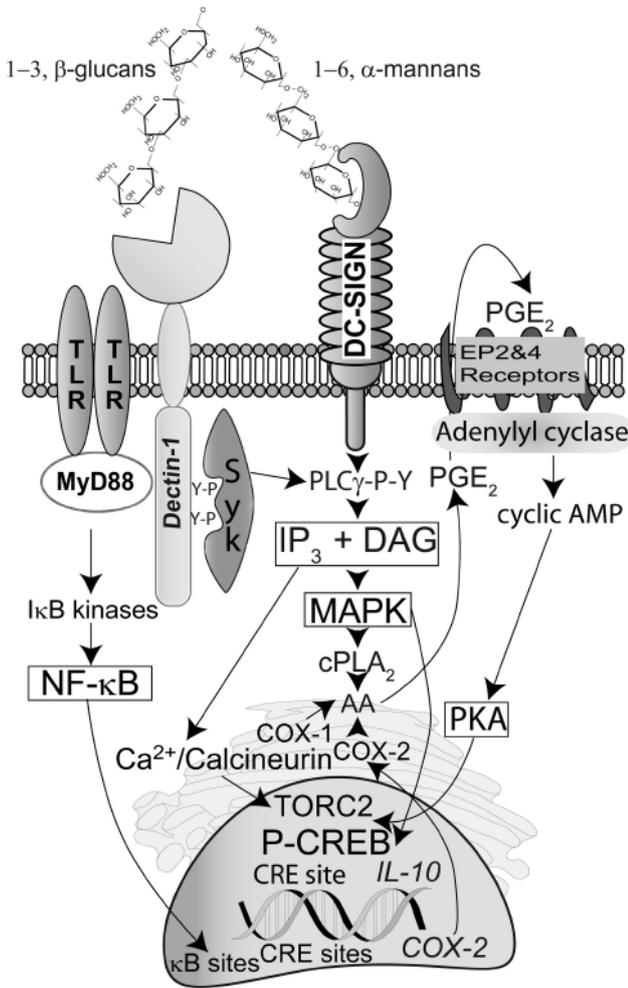


FIGURE 7. Diagram of the mechanism of induction of IL-10 by fungal stimuli in DC and cyclooxygenase-dependent autocrine feed-forward. The β -glucan and the α -mannan components of fungal stimuli are recognized by several receptors expressed in DC such as dectin-1, TLR2, and DC-SIGN. These stimuli activate distinct kinase pathways, which ultimately lead to the activation of the transcription factors NF- κ B and CREB. Both factors may cooperate in the induction of *cox2*, whereas only CREB is involved in *il10* induction expression. PGE₂, the major product of COX-2, activates E prostanoid receptors 2 and 4, and enhances CREB activation through protein kinase A. Nuclear translocation of TORC2 depends on signals elicited by Ca²⁺/calcineurin and PKA, whereas MAPK and PKA may be involved in CREB phosphorylation. AA, arachidonic acid; cPLA₂, cytosolic phospholipase A₂; DAG, diacylglycerol; EP, E prostanoid; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate; I κ B, inhibitory subunit of NF- κ B; PLC γ , phospholipase C γ ; Syk, spleen tyrosine kinase; Y-P, phosphotyrosine.

washing the culture medium and addition of IL-4 (Fig. S5B), thus indicating that although zymosan does not activate Stat1, it may be temporarily activated by cytokines present in the medium (39). Stat3 showed tyrosine phosphorylation in resting cells, which was increased by IFN- γ but not by other treatments. Taken collectively, our results show a major role for CREB in the positive transcriptional regulation of *il10* in response to the fungal stimulus zymosan. A diagram of the signaling routes involved in IL-10 regulation in DC stimulated with fungal stimuli is shown in Fig. 7.

Discussion

The present results confirm the major effect of zymosan on IL-10 production and show that this effect can be explained via transcrip-

tional regulation. Although this could be considered an obvious finding, stability of IL-10 message has been considered a major mechanism whereby the regulation of IL-10 takes place in some systems. Moreover, most studies have been conducted in murine macrophages and, to the best of our knowledge, reports are not available on human DC, thus making it difficult to assess the real significance of those findings to human disease. The list of transcription factors that has been associated with IL-10 regulation includes NF- κ B, Stat1 and Stat3, Sp1 and Sp3, c-Maf, NF-Y, c/EBP, CREB, and Pbx1. Studies on NF- κ B have stressed the relevance of p50 homodimers (17). However, these studies have been conducted in the mouse and the low conservation of the κ B-binding site between human and mouse IL-10 promoters (Fig. S2A) makes it unlikely the relevance of this finding to humans. Moreover, we have observed that NF- κ B inhibition is associated with an increase of IL-10 production and this agrees with other studies where NF- κ B inhibition was associated with an increase of IL-10 production. Different mechanisms have been considered to explain this finding. First, competition between NF- κ B and CREB for a limiting amount of CBP is a classical paradigm (40) that has been shown to occur in TLR-mediated cytokine production (29). Second, activation of human monocytes by LPS produces a mTOR-dependent activation of Stat3 leading to IL-10 induction, which is accompanied by NF- κ B inhibition (11). This finding is consistent with our finding of IL-10 blunting by the mTOR inhibitor rapamycin (Fig. 5B). Third, AMP-activated protein kinase activity has been found to inhibit NF- κ B activation and to increase CREB activation (41). Sp1 and Sp3 have also been associated with the regulation of IL-10 activity by binding to a GGAGGA sequence conserved in both human and mouse *il10* promoter that does not fit with the typical GC boxes of the consensus sequence recognized by the transcription factor database. These studies have focused on the binding of nuclear proteins to a probe and on luciferase reporter assays, but binding of the factors to the native promoter has not been demonstrated (13, 14). Our findings agree with the constitutive presence of Sp1 and Sp3 activity in the nuclear extracts from DC, but we have not been able to demonstrate Sp1 and Sp3 binding to the proximal *il10* promoter, thus suggesting that alternative mechanisms of *il10* transcriptional activation may be operative in our cell system. Stat3 is one of the transcription factors that have been associated most frequently with IL-10 induction. However, most studies have been conducted using LPS, a TLR4 ligand that activates signaling routes different from those triggered by zymosan. A major difference between the TLR2 and the TLR4 route is that in addition to the MyD88 pathway activated by ligands of both types of receptors, the TLR4 route recruits the TRIF pathway and activates the JAK/STAT system. On this basis, whereas induction of type I IFN and activation of Stat are major effects of LPS, this response is not operative with zymosan. In contrast, fungal stimuli interact with the C-type lectin receptors dectin-1, DC-SIGN, and the mannose receptor (1, 7, 42, 43). Dectin-1 contains an ITAM motif (ITAM) that undergoes tyrosine phosphorylation by Src-family tyrosine kinases (44, 45). This allows the activation of Syk and the assembly of a multiprotein signaling complex. A consequence of this is the activation of phospholipase C γ , which hydrolyzes phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to generate the key second messengers diacylglycerol and inositol-1,4,5-trisphosphate. Notably, the relevance of this route to the cytokine response induced by β -glucans has been confirmed in phospholipase C γ 2-deficient mice, which show a reduced response to both zymosan and curdlan (23). In contrast, LPS is an archetypal TLR ligand lacking the ability to generate Ca²⁺ transients in DC (46). These data could explain why LPS and fungal stimuli may

induce different responses on inflammatory cells and/or use distinct routes to elicit the same responses. Because most studies have been conducted using LPS as a stimulus, the control of IL-10 expression by Stat3 has been considered a general paradigm so far (9–12). Further evidence that distinct stimuli might use distinct transcription factors has recently been reported by showing that during the ingestion of apoptotic cells by murine macrophages, the synthesis of IL-10 is under the control of Pbx1b (20) and by the involvement of CREB in the regulation of IL-10 production by murine macrophages stimulated with adiponectin (47).

Recent studies have disclosed that TLR4 stimulation activates CREB by a mechanism linked to the p38 MAPK-dependent kinases MSK1 and MSK2 (36), thus making it likely that CREB might cooperate with Stat3 to induce IL-10 expression upon LPS challenge. Taking this finding into account and in view of the failure of our attempts to show the involvement of the Stat3 in the induction of IL-10 in response to zymosan, we put forward the hypothesis of the involvement of CREB in the transcriptional regulation of IL-10. Our results support this notion on the basis of several findings. First, nuclear extracts of DC showed high levels of CRE binding activity in an assay for P-CREB, even in the absence of stimulus, which agrees with previous reports on murine (38) and human monocytic cell lines (48) and point to mechanisms other than CREB phosphorylation for transactivating activity to occur. In keeping with this concept, we found that zymosan promotes P-CREB binding to the CRE site and recruitment of the coactivator CBP, as well as translocation of TORC2 to the nucleus and formation of P-CREB/TORC2 nuclear complexes. Current concepts on CRE-driven transcriptional activation include the involvement of cyclic AMP-mediated signals, Ca^{2+} /calcineurin-mediated signals, and MAPK/ERK mediated signals. These signals may be modulated by GSK3 β and by autocrine production of PGE₂. A model of integration of these signals could be the extension of the paradigm delineated in liver and pancreas where both Ca^{2+} and cyclic AMP signals act on a common sensor, TORC2, which is also expressed in hemopoietic cells (49, 50). TORC2 is a CREB coactivator retained in the cytoplasm of resting cells by interaction with 14-3-3 proteins. This depends on tonic phosphorylation under the control of kinases of the AMP-activated protein kinase family, in particular salt-inducible kinases, the activity of which is enhanced by GSK3 β and inhibited by PKA (51). In contrast, TORC2 is dephosphorylated by calcineurin. This sensitivity of TORC2 to both cyclic AMP- and Ca^{2+} -dependent signals makes it a dual sensor for cyclic AMP and intracellular Ca^{2+} levels (30). Our findings suggest a mechanism of regulation of CREB similar to that depicted in TORC-dependent systems on the basis of the enhancement of IL-10 production by cyclic AMP analogues and GSK3 β inhibitors, inhibition by PKA and calcineurin blockers, and the occurrence of nuclear translocation of TORC2 and interaction with P-CREB following zymosan stimulation. In addition, the PKA inhibitor H-89 blocked P-CREB binding to the *il10* promoter. LiCl on its own induced COX-2 and IL-10 production and enhanced zymosan effect. This agrees with its ability to enhance GSK3 β -Ser9 phosphorylation and also with the recently reported ability of LiCl to enhance CREB-mediated transcription by favoring the interaction of TORC with the bZIP domain of CREB (52).

The parallel induction of COX-2 and IL-10 points to close links for both proteins as regards mechanism of regulation and functional role. Human *cox2* has two κ B sites and two CRE sites (37, 38). In view of its ability to activate both NF- κ B and CREB, zymosan is an optimal stimulus for COX-2 induction, which can occur even when both transcription factors compete for a limited amount of CBP, because blunting of κ B-dependent transcription

might be compensated by an increase of CREB-dependent transcription. Our findings also show a functional cooperation of COX-2 and IL-10 in the response to fungal stimuli, because endogenous PGE₂ enhances the effect of zymosan on IL-10 induction and the opposite effect is observed upon COX inhibition. The production of IL-10 by PGE₂ has been reported previously (53), and more recently the cooperation of IL-23 and PGE₂ to induce IL-17 has been described (54). Whether this cooperation can be explained on the basis of similar mechanisms to those described in this study is an open question in view of the strong induction of IL-23 elicited by zymosan (8, 55). It remains to be ascertained whether similar mechanisms of regulation of *il10* expression are operative in monocytes and macrophages. In preliminary experiments in macrophages derived from human monocytes differentiated for 14 days in the presence of serum, we observed lower levels of IL-10 protein induction upon zymosan challenge than in DC, whereas mannan was a potent stimulus. An explanation for this finding could be the different array of receptors expressed in DC and macrophages. For instance, macrophages do not show a level of DC-SIGN expression as high as DC, but it should also be taken into account that the expression of inhibitors of dectin-1 signaling may explain the lack of some responses to β -glucan signaling in some types of myeloid cells (56). Taken collectively, our data show that zymosan is a strong activator of CREB-dependent transcription in DC. This explains a production of cytokines dominated by IL-10 rather than by IL-12 p70. As to the mechanism of regulation of CREB activation, our results disclose an autocrine role for PGE₂ and a network of interactions of PKA, MAPK/ERK, GSK3 β , and calcineurin that point to TORC2 as a central regulator of IL-10 expression.

Acknowledgments

We thank Isela Valera for help in EMSA assays. We thank the staff from Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León for help with blood cell purification.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Brown, G. D., P. R. Taylor, D. M. Reid, J. A. Willment, D. L. Williams, L. Martinez-Pomares, S. Y. Wong, and S. Gordon. 2002. Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 196: 407–412.
- Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811–815.
- Brown, G. D., J. Herre, D. L. Williams, J. A. Willment, A. S. Marshall, and S. Gordon. 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of β -glucans. *J. Exp. Med.* 197: 1119–1124.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, and D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197: 1107–1117.
- Rogers, N. C., E. C. Slack, A. D. Edwards, M. A. Nolte, O. Schulz, E. Schweighoffer, D. Williams, S. Gordon, V. L. Tybulewicz, G. D. Brown, and C. Reis e Sousa. 2005. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* 22: 507–517.
- Dillon, S., S. Agrawal, K. Banerjee, J. Letterio, T. L. Denning, K. Oswald-Richter, D. J. Kasprzewicz, K. Kellar, J. Pare, T. van Dyke, et al. 2006. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest.* 116: 916–928.
- Valera, I., N. Fernández, A. G. Trinidad, S. Alonso, G. D. Brown, A. Alonso, and M. Sánchez Crespo. 2008. Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 180: 5727–5736.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, L. A. Lyakh, G. Batoni, S. Esin, R. T. Winkler-Pickett, M. R. Consolaro, M. de Marchi, D. Giachino, A. Robbiano, et al. 2008. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205: 1447–1461.
- Benkhardt, E. M., M. Siedlar, A. Wedel, T. Werner, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 2000. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J. Immunol.* 165: 1612–1617.

10. Chang, E. Y., B. Guo, S. E. Doyle, and G. Cheng. 2007. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J. Immunol.* 178: 6705–6709.
11. Weichhart, T., G. Costantino, M. Poglitsch, M. Rosner, M. Zeyda, K. M. Stuhlmeier, T. Kolbe, T. M. Stulnig, W. H. Hörl, M. Hengstschläger, et al. 2008. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity* 29: 565–577.
12. Villagra, A., F. Cheng, H.-W. Wang, I. Suarez, M. Glozak, M. Maurin, D. Nguyen, K. L. Wright, P. W. Atadja, K. Bhalla, et al. 2008. The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat. Immunol.* 10: 92–100.
13. Brightbill, H. D., S. E. Plevy, R. L. Modlin, and S. T. Smale. 2000. A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *J. Immunol.* 164: 1940–1951.
14. Tone, M., M. J. Powell, Y. Tone, S. A. Thompson, and H. Waldmann. 2000. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J. Immunol.* 165: 286–291.
15. Cao, S., J. Liu, L. Song, and X. Ma. 2004. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J. Immunol.* 174: 3484–3492.
16. Lin, S. C. 2006. Identification of an NF- γ /HMG-I(Y)-binding site in the human IL-10 promoter. *Mol. Immunol.* 43: 1325–1331.
17. Cao, S., X. Zhang, J. P. Edwards, and D. M. Mosser. 2006. NF- κ B1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* 281: 26041–26050.
18. Leghmar, K., Y. Bennasser, and E. Bahraoui. 2008. HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF- κ B pathways. *Eur. J. Cell Biol.* 87: 947–962.
19. Gringhuis, S. I., J. den Dunnen, M. Litjens, M. van der Vlist, B. Wevers, S. C. Bruijns, and T. B. Geijtenbeek. 2009. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk. *Nat. Immunol.* 10: 203–213.
20. Chung, E. Y., J. Liu, Y. Homma, Y. Zhang, A. Brendolan, M. Saggese, J. Han, R. Silverstein, L. Sella, and X. Ma. 2007. Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells is mediated by homeodomain proteins Pbx1 and Prep-1. *Immunity* 27: 952–964.
21. Brenner, S., S. Prösch, K. Schenke-Layland, U. Riese, U. Gausmann, and C. Platzer. 2003. cAMP-induced interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J. Biol. Chem.* 278: 5597–5604.
22. Goodridge, H. S., R. M. Simmons, and D. M. Underhill. 2007. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 178: 3107–3115.
23. Xu, S., J. Huo, K. G. Lee, T. Kurosaki, and K. P. Lam. 2009. Phospholipase C γ 2 is critical for dectin-1-mediated Ca $^{2+}$ flux and cytokine production in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 284: 7038–7046.
24. Platzer, C., E. Fritsch, T. Elsner, M. H. Lehmann, H. D. Volk, and S. Prösch. 1999. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* 29: 3098–3104.
25. Hu, X., P. K. Paik, J. Chen, A. Yarilina, L. Kockeritz, T. T. Lu, J. R. Woodgett, and L. B. Ivashkiv. 2006. IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24: 563–574.
26. Powell, M. J., S. A. Thompson, Y. Tone, H. Waldmann, and M. Tone. 2000. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J. Immunol.* 165: 292–296.
27. Stoeklin, G., S. A. Tenenbaum, T. Mayo, S. V. Chittur, A. D. George, T. E. Baroni, P. J. Blackshear, and P. Anderson. 2008. Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *J. Biol. Chem.* 283: 11689–11699.
28. Fernández, N., M. Renedo, C. García-Rodríguez, and M. Sánchez Crespo. 2002. Activation of monocytic cells through Fc γ receptors induces the expression of macrophage-inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β , and RANTES. *J. Immunol.* 169: 3321–3328.
29. Martin, M., K. Rehani, R. S. Jope, and S. Michalek. 2005. Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. *Nat. Immunol.* 6: 777–784.
30. Scream, R. A., M. D. Conkright, Y. Katoh, J. L. Best, G. Canetti, S. Jeffries, E. Guzman, S. Niessen, J. R. Yates, Jr. 3rd, H. Takemori, et al. 2004. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 119: 61–74.
31. Sutherland, C., I. A. Leighton, and P. Cohen. 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 295: 15–19.
32. Pende, M., T. L. Fisher, P. B. Simpson, J. T. Russell, J. Blenis, and V. Gallo. 1997. Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway. *J. Neurosci.* 17: 1291–1301.
33. Wu, G.-Y., K. Deisseroth, and R. W. Tsien. 2001. Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2808–2813.
34. Kim, C., Y. Sano, K. Todorova, B. A. Carlson, L. Arpa, A. Celada, T. Lawrence, K. Otsu, J. L. Brissette, J. S. Arthur, and P. M. Park. 2008. The kinase p38 α serves cell type-specific inflammatory functions in skin injury and coordinates pro- and anti-inflammatory gene expression. *Nat. Immunol.* 9: 1019–1027.
35. Zhang, X., J. P. Edwards, and D. M. Mosser. 2006. Dynamic and transient remodeling of the macrophage IL-10 promoter during transcription. *J. Immunol.* 177: 1282–1288.
36. Ananieva, O., J. Darragh, C. Johansen, J. M. Carr, J. McIlrath, J. M. Park, A. Wingate, C. E. Monk, R. Toth, S. G. Santos, et al. 2008. The kinases MSK1 and MSK2 act as negative regulators of Toll-like receptor signaling. *Nat. Immunol.* 9: 1028–1036.
37. Eliopoulos, A. G., C. D. Dumitru, C. C. Wang, J. Cho, and P. N. Tschlis. 2002. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J.* 21: 4831–4840.
38. Kang, Y. J., B. A. Wingerd, T. Arakawa, and W. L. Smith. 2006. Cyclooxygenase-2 gene transcription in a macrophage model of inflammation. *J. Immunol.* 177: 8111–8122.
39. Acacia de Sa Pinheiro, A., A. Morrot, S. Chakravarty, M. Overstreet, J. Bream, P. M. Irusta, and F. Zavala. 2007. IL-4 induces a wide-spectrum intracellular signaling cascade in CD8 $^{+}$ T cells. *J. Leukocyte Biol.* 81: 1102–1110.
40. Vo, N., and R. H. Goodman. 2001. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276: 13505–13508.
41. Sag, D., D. Carling, R. D. Stout, and J. Suttles. 2008. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J. Immunol.* 181: 8633–8641.
42. de la Rosa, G. M., R. Yáñez-Mo, D. Samaniego, D. Serrano-Gómez, L. Martínez-Muñoz, E. Fernández-Ruiz, N. Longo, F. Sánchez-Madrid, A. L. Corbi, and P. Sánchez-Mateos. 2005. Regulated recruitment of DC-SIGN to cell-cell contact regions during zymosan-induced human dendritic cell aggregation. *J. Leukocyte Biol.* 77: 699–709.
43. Netea, M. G., N. A. Gow, C. A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, R. P. Hobson, G. Bertram, H. B. Hughes, T. Jansen, et al. 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.* 116: 1642–1650.
44. Ariizumi, K., G. L. Shen, S. Shikano, S. Xu, R. Ritter 3rd, T. Kumamoto, D. Edelbaum, A. Morita, P. R. Bergstresser, and A. Takashima. 2000. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 275: 20157–20167.
45. Hernandez-Falcón, P., I. Arce, P. Roda-Navarro, and E. Fernández-Ruiz. 2001. Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells. *Immunogenetics* 53: 288–295.
46. Barbet, G., M. Demion, I. C. Moura, N. Serafini, T. Léger, F. Vrtovnik, R. C. Monteiro, R. Guinamard, J. P. Kinet, and P. Launay. 2008. The calcium-activated nonselective cation channel TRPM4 is essential for the migration but not the maturation of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 9: 1148–1156.
47. Park, P. H., H. Huang, M. R. McMullen, K. Bryan, and L. E. Nagy. 2008. Activation of cyclic-AMP response element binding protein contributes to adipolectin-stimulated interleukin-10 expression in RAW 264.7 macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 83: 1258–1266.
48. Kuipers, H. F., P. J. Biesta, L. J. Montagne, E. S. Haastert, P. van der Valk, and P. J. van den Elsen. 2008. CC chemokine receptor 5 gene promoter activation by the cyclic AMP response element binding transcription factor. *Blood* 112: 1610–1619.
49. Conkright, M. D., G. Canetti, R. Scream, E. Guzman, L. Miraglia, J. B. Hogenesch, and M. Montminy. 2003. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol. Cell* 12: 413–423.
50. Iourgenko, V., W. Zhang, C. Mickanin, I. Daly, C. Jiang, J. M. Hexham, A. P. Orth, L. Miraglia, J. Meltzer, D. Garza, et al. 2003. Identification of a family of cAMP response element-binding protein coactivators by genome-scale functional analysis in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 12147–12152.
51. Silen Katoh, Y., H. Takemori, X. Z. Lin, M. Tamura, M. Muraoka, T. Satoh, Y. Tsuchiya, L. Min, J. Doi, A. Miyauchi, et al. 2006. Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade. *FEBS J.* 273: 2730–2748.
52. Böer, U., J. Eglins, D. Krause, S. Schnell, C. Schöfl, and W. Knepel. 2007. Enhancement by lithium of cAMP-induced CRE/CREB-directed gene transcription conferred by TORC on the CREB basic leucine zipper domain. *Biochem. J.* 408: 69–77.
53. Harizi, H., M. Juzan, V. Pitard, J. F. Moreau, and N. Gualde. 2002. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E $_2$ enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J. Immunol.* 168: 2255–2263.
54. Chizzolini, C., R. Chicheportiche, M. Alvarez, C. de Rham, P. Roux-Lombard, S. Ferrari-Lacraz, and J. M. Dayer. 2008. Prostaglandin E $_2$ synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood* 112: 3696–3703.
55. LeibundGut-Landmann, S., O. Gross, M. J. Robinson, F. Osorio, E. C. Slack, S. V. Tsoni, E. Schweighoffer, V. Tybulewicz, G. D. Brown, J. Ruland, and C. Reis e Sousa. 2007. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat. Immunol.* 8: 630–638.
56. Goodridge, H. S., T. Shimada, A. J. Wolf, Y. M. Hsu, C. A. Becker, X. Lin, and D. M. Underhill. 2009. Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 182: 1146–1154.

Notch- and Transducin-like Enhancer of Split (TLE)-dependent Histone Deacetylation Explain Interleukin 12 (IL-12) p70 Inhibition by Zymosan^{*[5]}

Received for publication, January 17, 2011, and in revised form, February 28, 2011. Published, JBC Papers in Press, March 14, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.222158

Yolanda Alvarez^{†1}, Cristina Municio^{†1}, Etzel Hugo[‡], Jimmy Zhu[§], Sara Alonso[‡], Xiaoyu Hu[§], Nieves Fernández^{*1}, and Mariano Sánchez Crespo^{†1,2}

From the [†]Instituto de Biología y Genética Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 47003-Valladolid, Spain, the [§]Arthritis and Tissue Degeneration Program, Hospital for Special Surgery, New York, New York 10021, and the [‡]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, 47005-Valladolid, Spain

The fungal analog zymosan induces IL-23 and low amounts of IL-12 p70. This study addresses the molecular mechanisms underlying this cytokine pattern in human monocyte-derived dendritic cells. The transcriptional regulation of *il23a*, one of the chains of IL-23, depended on the activation of c-Rel and histone H3 phosphorylation, as judged from the association of c-Rel with the *il23a* promoter and the correlation between IL-23 production and Ser-10-histone H3 phosphorylation. Consistent with its reduced ability to produce IL-12 p70, zymosan induced a transient occupancy of the *il12a* promoter by c-Rel, blocked the production of IL-12 p70 and the transcription of *il12a* induced by other stimuli, and triggered the expression and nuclear translocation of the transcriptional repressors of the Notch family hairy and enhancer of split (Hes)-1, Hes5, hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein (Hey)-1, and transducin-like enhancer of split (TLE). Zymosan also induced the interaction of Hes1 and TLE with histone H3 phosphorylated on Ser-10 and deacetylated on Lys-14. Inhibition of class III histone deacetylases increased the production of IL-12 p70 and partially blunted the inhibitory effect of zymosan on the production of IL-12 p70 elicited by LPS and IFN- γ . These results indicate that the selective induction of IL-23 by β -glucans is explained by the activation of c-Rel associated with Ser-10-histone H3 phosphorylation in the *il23a* promoter mediated by mitogen- and stress-activated kinase and/or protein kinase A and inhibition of *il12a* transcription by a mechanism involving activation of several corepressors with the ability to bind TLE and to promote histone deacetylation.

IL-12 p70 (1) and IL-23 (2) are cytokines released by antigen-presenting cells that are involved in the induction or amplification of the T-helper type 1 and type 17 responses, respectively. IL-12 p70 and IL-23 share a common chain IL-12 p40 (*il12/23b*)

and differ by another chain, IL-12 p35 (*il12a*) in the case of IL-12 p70 and IL-12 p19 (*il23a*) in IL-23. The production of IL-12 p70 and IL-23 is regulated at the transcriptional level and determined by their heterodimeric structure. *il12/23b* regulation depends on NF- κ B activation (3), whereas the transcriptional regulation of *il12a* also requires a type I interferon auto-crine-paracrine loop involving interferon regulatory factors (IRF)-1, IRF-3, and IRF-8/ICSBP (3–6). Stimulation of Toll-like receptor (TLR)^{3–4} induces an IL-12/IL-23 balance different from that elicited through the TLR2 and C-type lectin routes (7, 8). At first glance, this may be explained because, unlike TLR2, TLR4 ligands activate the MyD88 and the TIR domain-containing adapter-inducing interferon- β routes and trigger both the NF- κ B pathway and the type I IFN auto-crine-paracrine loop. However, this does not explain why TLR2 ligands may behave as negative modulators of IL-12 p70 production (7, 9) nor the molecular mechanisms underlying the distinct patterns of IL-23/IL-12 p70 response. Whereas LPS induces both cytokines, *Mycobacterium tuberculosis* (7) and zymosan, an extract of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* mainly composed of β -glucans that is recognized by at least the C-type lectin receptor dectin-1 (10) and TLR2 (11, 12), induce IL-23 and a low amount of IL-12 p70 (12–15). Moreover, coligation of the β -glucan receptor dectin-1 and TLR2 enhances IL-23 and down-regulates IL-12 p70, but there is no mechanistic explanation for this finding (8, 16). Addressing whether the effect of zymosan occurs via inhibition of *il12a* transcription or through a sole stimulation of *il23a* transactivation has pathophysiological relevance, because IL-23 takes part in the defense against pathogens and in the development of autoimmunity. Several hypotheses can be put forward to explain the distinct IL-12/IL-23 balances elicited by different stimuli as follows. (i) *il23a* induction could be explained through the activation of transcription factors of the family ATF-2/CREB. In fact, competition between CRE-binding protein (CREB) and NF- κ B for the coactivator CREB-binding protein (CBP) explains the IL-12 p70^{+/-}/IL-10⁺⁺⁺ pattern induced by zymosan in dendritic cells (DC) (17). A corollary to this finding is that stimuli with a

^{*} This work was supported by Plan Nacional de Salud y Farmacia Grants SAF2007-60446 and SAF2010-15070, Fundación Ramón Areces, Red Temática de Investigación Cardiovascular, and Junta de Castilla y León Grant GR230.

^[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–4.

[†] These authors contributed equally to this work.

[‡] To whom correspondence should be addressed: Instituto de Biología y Genética Molecular, C/Sanzy Forés 3, 47003-Valladolid, Spain. Tel.: 34-983-423273; Fax: 34-983-184800; E-mail: mscrespo@ibgm.uva.es.

³ The abbreviations used are: TLR, Toll-like receptor; CREB, cAMP-response element-binding protein; CBP, CREB-binding protein; DC, dendritic cell; MSK, mitogen- and stress-activated kinase; PKAc, PKA catalytic subunit; PKAi, PKA inhibitor; RHD, Rel homology domain; TLE, transducin-like enhancer of split; TSA, trichostatin; Ab, antibody.

Notch and Histones in the IL-12/IL-23 Balance

strong ability to activate CREB should produce a parallel reduction of κ B-dependent transcription. In keeping with this mechanism, enhancement of IL-23 production by chemicals acting on the protein kinase A (PKA)/CREB route has been reported (18, 19).

(ii) Differential activation of NF- κ B family elements could explain differences in IL-12 p70 and IL-23 production. For instance, c-Rel-p50 complexes regulate genes involved in T cell function, including IL-12 p70, whereas the RelA/p65 subunit regulates genes encoding inflammatory cytokines (20). This can be explained by different promoter κ B-site sequences, but it may also depend on additional factors such as the capacity of RelA to be phosphorylated by PKA and to interact with CBP (21, 22), which allows acetylation of Lys-310, a site critical for transcriptional activity (23), or the unique ability of c-Rel/c-Rel homodimers to bind with high affinity to a broader range of NF- κ B recognition sequences than do RelA-p65-containing complexes. This fact seems to be specially relevant regarding the transcriptional regulation of *il12a* in DC stimulated with LPS (24). In addition, a differential combination of NF- κ B subunits could explain the occurrence of distinct transcriptional programs because activation of the β -glucan receptor dectin-1 allows for the formation of inactive RelA-RelB complexes (25), and an exchange of dimers allows fine-tuning of the response over time (26). Whether the reported enhancement of IL-23 production by cyclic AMP is associated with NF- κ B signaling should be experimentally tested, taking into account that Ser-276 phosphorylation of p65 can also be elicited by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) (27), thus suggesting alternative mechanisms of activation.

(iii) TLR and Notch routes cooperate in the activation of canonical Notch target genes. However, TLR- and Notch-induced hairy and enhancer of split (Hes)-1 and hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein (Hey)-1 also attenuate IL-6 and IL-12 p70 production via a feedback inhibitory loop that is abrogated by IFN- γ (28).

After testing all of these hypotheses, we have observed the unique involvement of c-Rel in the regulation of both *il12a* and *il23a*. Whereas LPS produced binding of c-Rel to both promoters, zymosan induced binding and early histone H3 phosphorylation of the *il23a* promoter as well as a transient binding of c-Rel to *il12a* promoter. The production of IL-23 correlated with the extent of histone H3 phosphorylation and was highly sensitive to H89, an inhibitor of the nucleosomal response (29). Addition of zymosan prior to the stimulation with LPS and IFN- γ induced a near complete inhibition of IL-12 p70 production. Zymosan inhibited IFN- γ signaling at different steps and also induced the expression of the transcriptional repressors Hes1, Hes5, Hey1, and the corepressor transducin-like enhancer of split (TLE), which may bind the set of N- and E-boxes in the *il12a* promoter. In addition, zymosan induced the association of TLE and Hes1 with histone H3 showing increased Ser-10 phosphorylation and reduced Lys-14 acetylation. These data indicate that zymosan stimulates *il23a* transcription via c-Rel and histone H3 phosphorylation and activates transcriptional repressors of *il12a* that ultimately produce Lys-14-histone H3 deacetylation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents, Cells, and Mice—Zymosan, mannan from *Saccharomyces cerevisiae*, curdlan from *Alcaligenes faecalis*, H89, and the catalytic subunit of PKA were from Sigma. Depleted zymosan from *S. cerevisiae* was from InvivoGen (San Diego). Endotoxin levels in the reagents were below 1 ng/ml as determined by the limulus amoebocyte lysate assay (Cambrex Bio Sciences, Walkersville, MD). Moreover, addition of 200 μ g/ml polymyxin B did not modify the effect of the different stimuli. This negates the possible involvement of LPS in the responses studied. IL-12 p70 and IL-6 were assayed with reagents from Thermo Scientific Pierce and IL-23 with reagents from R&D Systems (Minneapolis, MN). IFN- β was assayed with reagents from PBL InterferonSource (Piscataway, NJ). Recombinant histone H3.3 was from New England Biolabs (Ipswich, MA). Recombinant active MSK1, anti-Ser(P)-10-histone H3 (catalog no. 04-817), anti-Ac-Lys-14-histone H3 (catalog no. 07-353), anti-histone H3 (catalog no. 05-928), and PKA inhibitor peptide were from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). DC were obtained from human monocytes as reported previously (15). Bone marrow-derived DC from mice were obtained by culture in the presence of murine recombinant GM-CSF. Because deletion of *hes1* in mice results in embryonic or neonatal lethality (30), *hes1* conditional knock-out mice were generated by crossing *hes1*^{flox/flox} animals, kindly provided by Dr. Ryoichiro Kageyama, with Mx1-Cre transgenic mice (the Jackson Laboratory). Littermates with *hes1*^{flox/flox}:Mx1-Cre (KO) or *hes1*^{+/+}:Mx1-Cre (WT control) genotypes were intraperitoneally injected with 200 μ g/mouse of poly(I:C) three times in 5 days to induce deletion, and mice were used for experiments 2 weeks later. *hey1*-null mice were kindly provided by Dr. Manfred Gessler (31), and *hey1*^{+/+} and *hey1*^{-/-} littermates were used for experiments. Unless otherwise stated, LPS was used at a concentration of 10 μ g/ml, zymosan at 1 mg/ml, and IFNs at 1000 units/ml.

Immunoblots—Proteins were separated by electrophoresis in SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were used for immunodetection of c-Rel (Santa Cruz Biotechnology sc-70), RelB (Santa Cruz Biotechnology sc-226), p50 (Santa Cruz Biotechnology sc-7178), RelA/p65 (Millipore catalog no. 06-418), Ser(P)-276-p65 (Cell Signaling catalog no. 3031), Ser(P)-536-p65 (Cell Signaling catalog no. 3037), Stat1 (Cell Signaling catalog no. 9172), Tyr(P)-701-Stat1 (Cell Signaling catalog no. 9171S), Ser(P)-727-Stat1 (Cell Signaling catalog no. 9177), Hes1 (Santa Cruz Biotechnology sc-25392), Hes5 (Millipore, AB5708), and TLE (pan-TLE goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology sc-13373). Quantitation of the blots was carried out using Quantity One gel imaging software (Bio-Rad). For immunoblots directed to assay nuclear proteins, the nuclear extracts were obtained by using a nuclear extract kit (Active Motif, Carlsbad, CA).

Real Time RT-PCR—Purified RNA was depleted of genomic DNA by treatment with DNase (Turbo-DNA freeTM, Ambion) and used for RT reactions. The sets of primers for PCRs are shown in Table 1. Cycling conditions were adapted to each set of primers. *gapdh* was used as a housekeeping gene to assess the relative abundance of the different mRNA, using the compara-

TABLE 1

Primers used for ChIP and real time RT-PCR

S indicates sense, and AS indicates antisense.

<i>il12a</i> S.....	5'-AGGCCTGTTTACCATTGGA-3'
<i>il12a</i> AS.....	5'-TCAAGGGAGGATTTTTGTGG-3'
<i>il23a</i> S.....	5'-CATGGGCCCTTCATGCTATTT-3'
<i>il23a</i> AS.....	5'-TTTGCAATGTCAGGTTTCCA-3'
<i>IFNβ</i> S.....	5'-TCTAGCACTGGCTGGAATGAG-3'
<i>IFNβ</i> AS.....	5'-GTTTCGGAGGTAACCTGTAAG-3'
<i>IRF1S</i>	5'-TTCCCTCTTCCACTCGGAGT-3'
<i>IRF1</i> AS.....	5'-GATATCTGGCAGGGAGTTCA-3'
<i>IRF8</i> S.....	5'-GCTGATCAAGGAGCCTTCTG-3'
<i>IRF8</i> AS.....	5'-ACCAGTCTGGAAGGAGCTGA-3'
<i>Hes1</i> S.....	5'-TGAGCCAGCTGAAAACACTG-3'
<i>Hes1</i> AS.....	5'-GTCACCTCGTTTCATGCACTC-3'
<i>Hes1</i> S.....	5'-GAGAAGCAGGGATCTGCTAA-3'
<i>Hey1</i> AS.....	5'-CCCAAACCTCCGATAGTCCAT-3'
<i>il12a</i> ChIP S.....	5'-GGCAATTTGTCCACGTCAT-3'
<i>il12a</i> ChIP AS.....	5'-TGATTTCTGGGGAGAACAG-3'
<i>il23a</i> ChIP S.....	5'-CTGGGTTTCCGATTTTCTCA-3'
<i>il23a</i> ChIP AS.....	5'-CCCATGTGACGAAATGACTG-3'
<i>GAPDH</i> S.....	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'
<i>GAPDH</i> AS.....	5'-AGGGGAGATTCAAGTGTGGT-3'
<i>c-Rel</i> S.....	5'-ATTGTCGACTTATGGCCTCCGGT CGGTATAA-3'
<i>c-Rel</i> AS.....	5'-TTAGCGGCCGCTTATTCTACGTG ATCCTGGCACAG-3'
<i>TLE1</i> S.....	5'-AGCCAGCACGCCTGTTCTGA-3'
<i>TLE1</i> AS.....	5'-TCAGTCTGCCGTTTCATGCCA-3'

tive C_T (cycle threshold) method. In the case of reactions directed to assay the *il12a* promoter and TLE 1, the PCR medium was supplemented with 1 mM betaine in view of the high GC content of the amplified sequences.

IRF-3 DNA Binding Activity—Nuclear extracts of DC were obtained from cell cultures grown in 10-cm tissue culture dishes by using a nuclear extract kit. Levels of transcription factor binding activity of IRF-3 in the nuclear extracts were quantitated with TransAMTM (Active Motif) and expressed as the absorbance at 450 nm.

ChIP Assay—ChIP assays were conducted with reagents and Ab from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA), as reported previously (17). PCRs were carried out with primers designed from both the *il23a* and *il12a* promoters (Table 1).

Expression of the Rel Homology Domain (RHD) of Human c-Rel—The RHD of human c-Rel(1–309) was constructed by PCR from a full-length c-Rel cDNA construct provided by Dr. Tse-Hua Tan (Baylor College of Medicine, Houston, TX) using PfuUltra[®] II Fusion HS DNA polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and fused in-phase to the N-terminal histidine tag using Sall-NotI sites of a pET-28a vector. The mutant S267A was constructed by overlap mutagenesis using primers forward 5'-gcagttgaggagacctgctgaccaggaagtag-3' and reverse 5'-ctaacttctgtgtagcaggtctccgcaactgc-3'. Recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* strain BL21(DE3) induced with isopropyl β -D-thiogalactoside for 5 h at 37 °C. His tag proteins were purified with nickel beads and used for *in vitro* kinase assays.

In Vitro Kinase Assay—A 1- μ g aliquot of substrate proteins was incubated at 30 °C for 20 min in reaction buffer (12 mM MOPS/NaOH, pH 7, 0.3 mM EDTA, 0.01% β -mercaptoethanol, 0.5% glycerol, 0.01 Brij-35, and 0.1 mg BSA) containing 15 ng of PKAc or active MSK1 and supplemented with 10 mM Mg(Ac)₂, 20 μ M ATP, and 1 μ Ci of [γ -³²P]ATP. The reaction was stopped by addition of Laemmli buffer, and the phosphor-

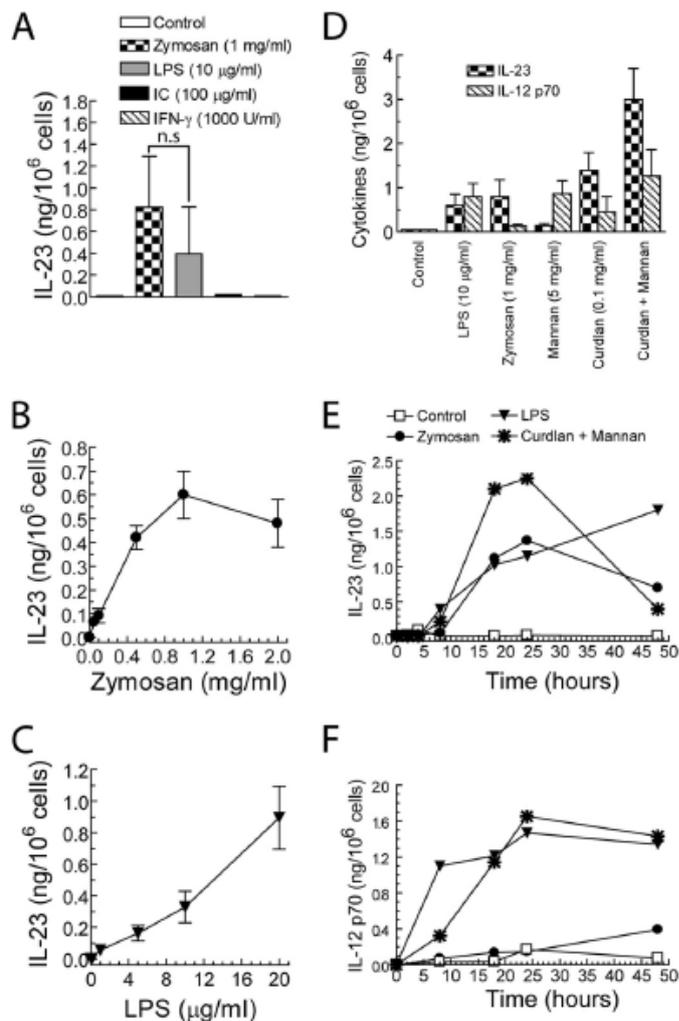


FIGURE 1. Production of IL-23 by different stimuli. The production of IL-23 in a group of 20 samples of DC stimulated for 24 h with the indicated stimuli is shown in A. Dose-response experiments for zymosan and LPS are shown in B and C, respectively. The effect of LPS, zymosan, and combination of mannans and β -glucans on IL-23 and IL-12 p70 production is shown in D. Time course experiments are shown in E and F. Results represent mean \pm S.D. of three independent experiments. n.s. indicates not significant.

ylated substrate proteins were separated by SDS-PAGE in 15% acrylamide. Phosphate incorporation was analyzed using PhosphorImager technology. Phosphorylation of c-Rel was also assayed by Western blot using anti-Ser(P)276-p65 phosphospecific antibody.

Immunoprecipitation of TLE and Hes1—Coimmunoprecipitation of TLE, Hes1, Ser(P)10-histone H3, and Ac-Lys-14-histone H3 was carried out using the nuclear complex Co-IP kit (Active Motif). The clarified lysates were preabsorbed on protein G-Sepharose and then incubated overnight with anti-pan-TLE precipitating goat Ab or anti-Hes1 rabbit Ab, followed by 2 h of incubation with protein A/G Plus-agarose beads. Immune complexes were extensively washed, suspended in Laemmli sample buffer, and subjected to SDS-PAGE. Blots were stained to assess the input protein and the coimmunoprecipitation of Ser(P)-10- and Ac-Lys-14-histone H3.

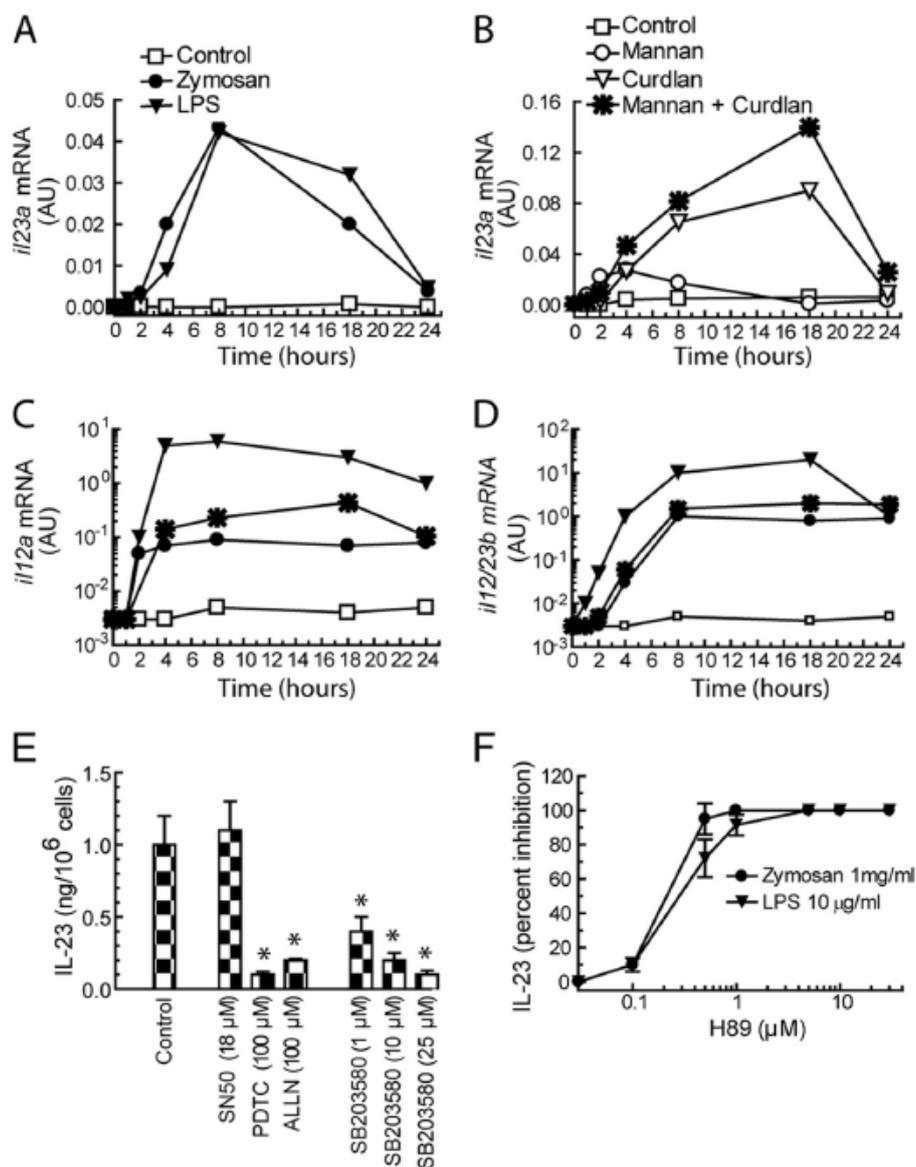


FIGURE 2. Effect of different stimuli on the expression of the mRNA encoding IL-19 (A and B), IL-12 p35 (C), and IL-12 p40 (D), and pharmacological modulation of IL-23 production. DC were stimulated for different times with the indicated stimuli and collected for the extraction of total RNA and real time RT-PCR. GAPDH was used for normalization of the data. The effect of the pharmacological modulation of NF- κ B, p38 MAPK, and PKA on IL-23 production by zymosan is shown in E and F. DC were incubated for 30 min at 37 °C in the presence of the indicated additions and then stimulated with 1 mg/ml zymosan or 10 μ g of LPS for 24 h (F). IL-23 was assayed in the supernatants. Results are expressed as mean \pm S.D. *, $p < 0.05$.

RESULTS

Production of IL-23 by Different Stimuli—Zymosan and LPS were strong stimuli of IL-23 production in human monocyte-derived dendritic cells, whereas ovalbumin/anti-ovalbumin equivalence immune complexes and IFN- γ were inactive (Fig. 1A). Zymosan induced a higher production of IL-23 than LPS, but no significant differences were found. Maximal response to zymosan was observed with concentrations higher than 0.5 mg/ml (Fig. 1B), thus agreeing with previous results showing that optimal production is obtained with concentrations higher than 0.2 mg/ml and that different dose-response patterns can be observed for each cytokine (7). In line with recent reports stressing that ultrapure LPS does not consistently induce detectable quantities of IL-12 and IL-23 from human DC (32, 33), LPS response was not saturated with concentrations as

high as 20 μ g/ml (Fig. 1C), thus suggesting that the process of differentiation of monocytes into DC, which is associated with a decrease of the surface display of CD14, might explain these findings. Alternatively, optimal response to LPS might depend on the concomitant presence of signals elicited by other agonists, for instance IFNs (4, 34). Because zymosan is a β -glucan polymer that also contains mannose moieties, experiments were conducted with mannan, the pure β -glucan curdlan, and a combination thereof. Similar to zymosan, curdlan induced a predominant production of IL-23 (Fig. 1D), which was also observed with combinations of stimuli. Maximal concentrations of cytokines were observed at 24 h, with a trend of IL-23 production to decrease after this time when zymosan or combination of curdlan and mannan were employed (Fig. 1, E and F). Attempts to ascertain whether the induction of cytokines is

transcriptionally regulated were carried out by real time RT-PCR. As shown in Fig. 2, *A* and *B*, all of the stimuli induced the mRNA of *il23a*, without significant differences in the amounts elicited by LPS and zymosan (Fig. 2*A*). In contrast, the increase of *il12a* mRNA induced by LPS was 66-fold as high as that elicited by zymosan (Fig. 2*C*). The induction of *il12/23b* mRNA elicited by LPS was 10-fold as high as that produced by zymosan and 5-fold as high as that observed in response to a combination of curdlan and mannan when the time points of maximal induction were considered (Fig. 2*D*).

Transcriptional Regulation of *il23a* by the NF- κ B Route—Nonselective inhibition of the NF- κ B route with pyrrolidine dithiocarbamate and *N*-acetyl-leucanyl-leucanyl-norleucinal diminished IL-23 protein production, whereas SN50, an inhibitor of NF- κ B1/p50 nuclear export, was inactive (Fig. 2*E*), thus confirming prior reports on the involvement of NF- κ B proteins and in particular c-Rel in the regulation of *il23a* (35–37). Involvement of the cyclic AMP/PKA route in the regulation of IL-23 stems from two different types of observations. First, the regulation of NF- κ B transactivating activity by PKA-mediated phosphorylation of Ser-276-RelA (21) and, likely, a similar consensus sequence in c-Rel (see below). Second, the enhancement of IL-23 production by agents that increase intracellular cyclic AMP levels (18, 19). The PKA and nucleosomal response inhibitor H89 produced an almost complete inhibition of IL-23 production in response to zymosan and LPS (Fig. 2*F*). In contrast, the cell-permeable analog 8-bromo-cAMP and activation of adenylyl cyclase with prostaglandin E₂ did not increase IL-23 production (data not shown). This finding is consistent with an effect of H89 on c-Rel and/or RelA phosphorylation or on another target, rather than on the PKA/CREB system, because the catalytic subunit of PKA is tightly bound to I κ B and RelA and does not require prior dissociation from its regulatory subunit by cyclic AMP to become active (21), but it differs from results reported in Schwann cells, where both Ser-276-RelA/p65 phosphorylation and κ B-dependent transcriptional activity were induced by treatment with forskolin and dibutyryl-cAMP (22). Zymosan induced a rapid and lasting translocation of c-Rel, RelA/p65, and RelB into nuclear fractions, which increased up to at least 4 h, and a similar result was observed with the combination of mannan and curdlan (Fig. 3*A*). In contrast, p50 levels in nuclear fractions did not show significant changes upon cell stimulation (Fig. 3*B*), which agrees with the reported negative regulation of NF- κ B target genes by p50 homodimers in resting cells (38). The phosphorylations of NF- κ B elements were addressed with phosphospecific antibodies reactive to Ser(P)-276-RelA (this Ab could also recognize Ser(P)-267-c-Rel epitope) and Ser(P)-536-RelA. As shown in Fig. 3*B*, zymosan induced a faint phosphorylation of Ser-276-RelA and a more intense phosphorylation of Ser-536-RelA.

Role of c-Rel and Histone H3 Phosphorylation—c-Rel contains a sequence around Ser-267 similar to that around Ser-276 of RelA/p65 that plays a central role in the transcriptional activity (Fig. 4*A*). Because the use of phosphospecific antibodies to assess these phosphorylations has shown some limitations (39), we proceeded to carry out *in vitro* kinase assays with MSK1 and PKA catalytic subunit (PKAc), *i.e.* protein kinases inhibited by H89 (40). As shown in Fig. 4*B*, *in vitro* phosphorylation of the

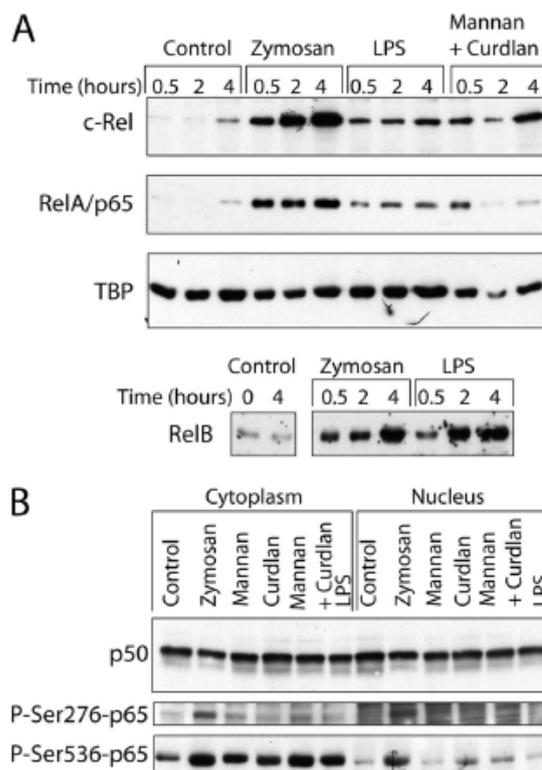


FIGURE 3. Nuclear translocation of NF- κ B proteins in response to different stimuli. DC were incubated with different ligands and at the times indicated were collected for the separation of nuclear fractions and the immunodetection of c-Rel, RelA/p65, RelB, p50, and the phosphorylated forms of RelA/p65. Results are representative of at least three independent experiments with similar results. TATA box-binding protein (*TBP*) was used as a load control.

RHD of c-Rel and the S267A mutant did not induce any significant change of the reactivity with the phosphospecific antibody. This differs from the massive phosphorylation that has been reported when RelA/p65 was used as a substrate in *in vitro* kinase assays using the same Ab for immunoblotting (39). To confirm this issue, radioactive phosphate incorporation into the recombinant RHD of c-Rel was assessed. As shown in Fig. 4, *C* and *D*, both PKAc and MSK1 induced similar incorporation of phosphate into the RHD in both the wild type and the S267A mutant, thus suggesting that any of the 10 Ser and 14 Thr of the RHD could be substrates of the kinases except Ser-267. Both PKAc and MSK1 produced a strong incorporation of phosphate into histone H3.3. The effect of PKAc on c-Rel RHD WT and S267A mutant was completely inhibited by both 1 μ M PKA inhibitor (PKAi) and 1 μ M H89, whereas the effect of MSK1 was less markedly reduced (Fig. 4*D*). Notably, although 1 μ M H89 and PKAi completely inhibited histone H3.3 phosphorylation by PKAc, this was not observed with MSK1 (Fig. 4*D*, right panels). Further assessment of the effect of H89 on histone H3.3 phosphorylation by PKAc and MSK1 was conducted with different concentrations of H89. As shown in Fig. 4*E*, H89 still inhibited PKAc activity at 0.1 μ M (IC_{50} \sim 0.08 μ M), thus showing a good correlation with the concentrations required to inhibit IL-23 production, whereas concentrations above 1 μ M (IC_{50} \sim 6 μ M) were needed to inhibit MSK1 activity.

We next looked at the binding of NF- κ B to *il12a* and *il23a* promoters using ChIP assays. Zymosan induced a significant

Notch and Histones in the IL-12/IL-23 Balance

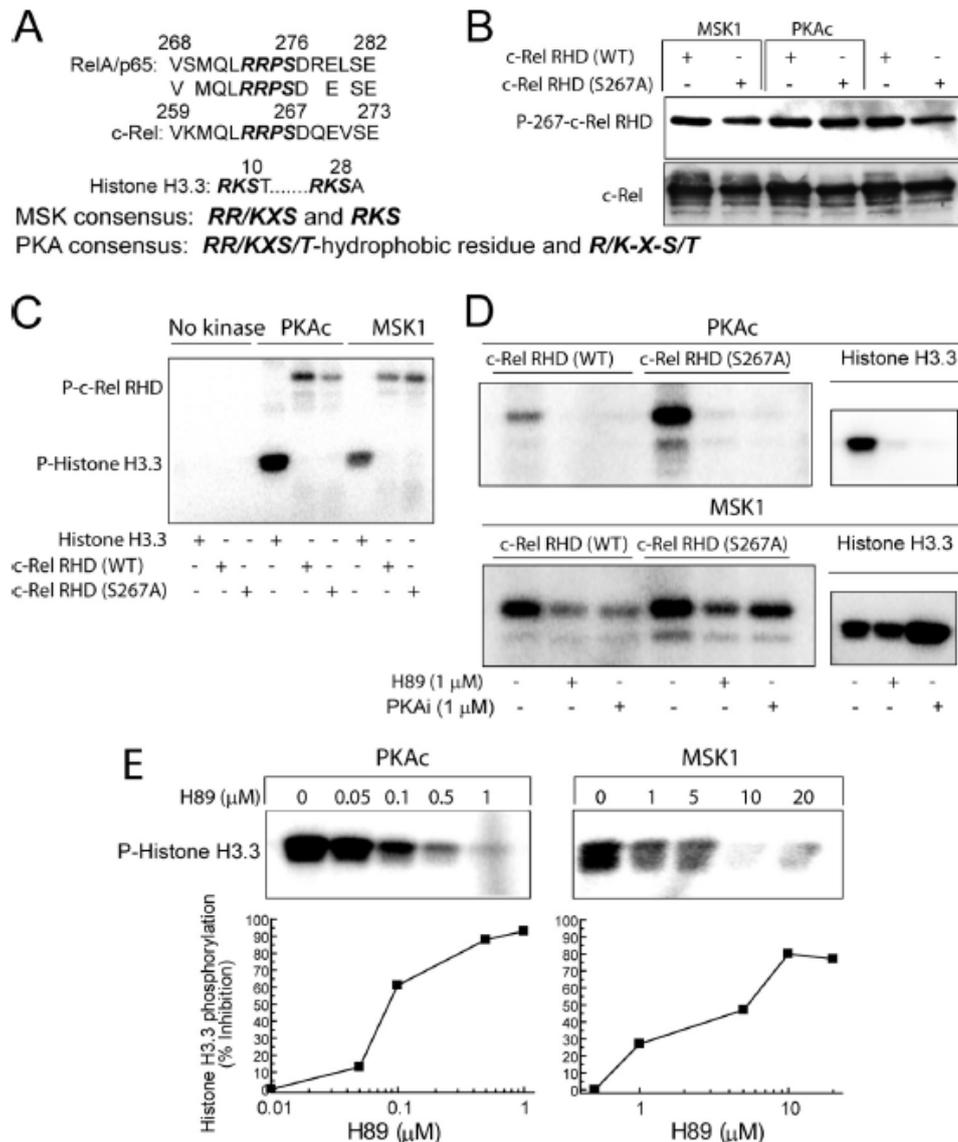


FIGURE 4. Consensus sequences recognized by PKA and MSK and phosphorylation of c-Rel RHD and histone H3.3. Consensus sequences recognized by PKA and MSK in RelA/p65, c-Rel, and histone H3.3 are shown in *A*. *In vitro* phosphorylation of c-Rel RHD and the S267A mutant was carried out with recombinant substrate proteins and MSK1 and PKAc. The reactions were stopped by addition of Laemmli buffer and the phosphorylated substrate proteins were separated by SDS-PAGE in 15% acrylamide. Phosphorylation of c-Rel was assayed by Western blot using anti-Ser(P)-276-RelA/p65 phosphospecific Ab and anti-c-Rel Ab (*B*). The kinase assay was also carried out using c-Rel RHD and histone H3.3 as substrates in the presence of 1 μ Ci of [γ - 32 P]ATP. The phosphorylated substrate proteins were separated by SDS-PAGE, and phosphate incorporation was analyzed using PhosphorImager technology (*C*). The effect of H89 and PKAi on the kinase reaction using [γ - 32 P]ATP is shown in *D*. The effect of different concentrations of H89 on histone H3.3 phosphorylation by PKAc and MSK1 is shown in *E*.

binding of c-Rel to the *il23a* promoter (Fig. 5*A*). This binding was more prominent than that elicited by LPS and was accompanied by MSK1. Zymosan also elicited binding of the coactivator CBP to the *il23a* promoter, and this was inhibited by H89. Notably, histone H3 phosphorylation in the *il23a* promoter could be observed as soon as 30 min after zymosan addition and was inhibited by H89 (Fig. 5*A*, bottom panel). A weak and transient binding of c-Rel to the *il12a* promoter could be detected only 20 min after zymosan addition, whereas LPS-induced binding was detectable for at least 4 h (Fig. 5*B*). Although RelB binding was detected on both promoters, this was neither reproducible nor was it very different from that observed in resting cells. As regards RelA/p65 binding, we did not observe differences between resting and stimulated cells (data not

shown). Contrary to the *il23a* promoter, the *il12a* promoter showed some degree of basal Ser-10-histone H3 phosphorylation, but this was not enhanced by zymosan nor showed consistent inhibition by H89, at least in the time frame of the experiments (Fig. 5*B*, bottom panel). Together, these results show distinct degrees and time patterns of c-Rel binding and Ser-10-histone H3 phosphorylation of *il12a* and *il23a* promoters that might explain the distinct responses elicited by the different stimuli.

Role of IFN and IFN Regulatory Factors—As shown in supplemental Fig. S1*A*, most stimuli induced a low amount of IFN- β protein, with the combination of LPS and poly(I:C) being the most active. A similar pattern of response was observed when the mRNA levels were assayed (supplemental Fig. S1*A*, lower panel). These results are consistent with the notion that

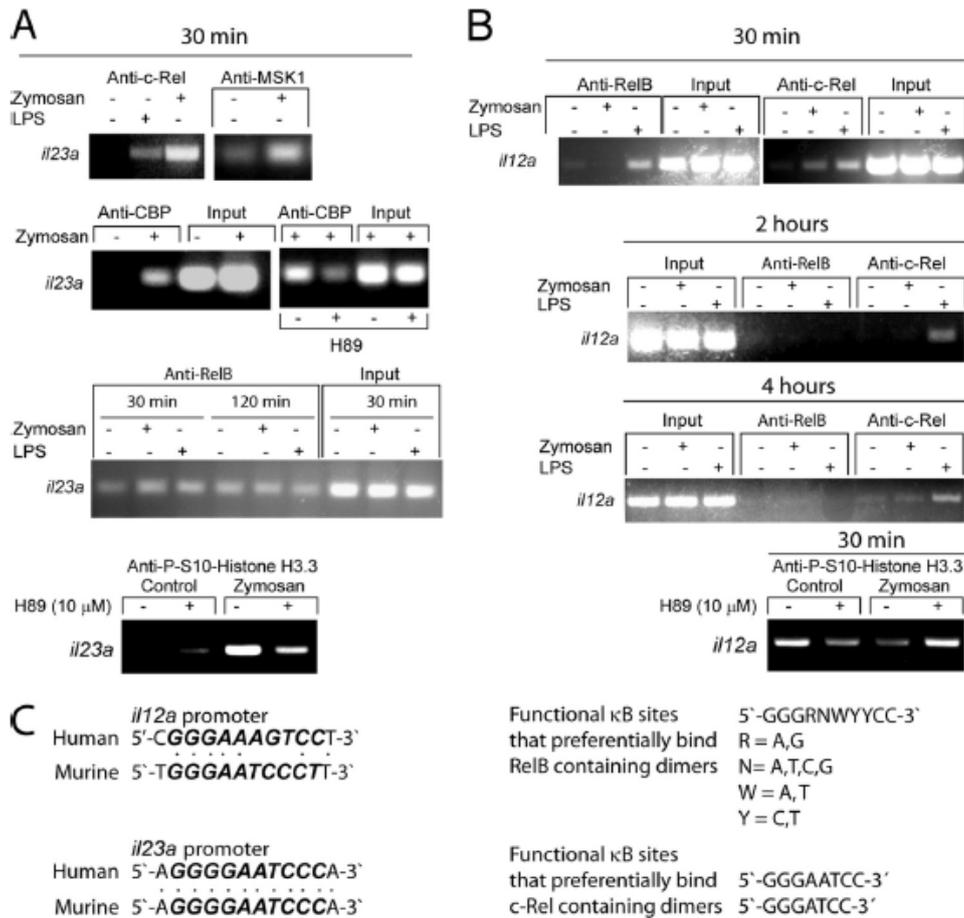


FIGURE 5. Promoter binding and histone H3 phosphorylation. DC were stimulated in the presence and absence of H89 and at the times indicated were fixed with 1% formaldehyde. After separation of the nuclear pellet, solubilization of chromatin, and preclearing, antibodies were added for ChIP assays. Semiquantitative PCRs were carried out for 40 cycles with primers from both *il23a* (A) and *il12a* promoters (B). Reactions with *il12a* primers were conducted in media supplemented with 1 mM betaine. Sequences of *il12a* and *il23a* κB sites are shown for comparison with functional sites that preferentially bind RelB and c-Rel (C).

type I IFNs can robustly induce gene expression at low or even undetectable levels of signaling (41). Notably, zymosan was consistently found to inhibit IFN-β production. Further assessment of the IFN signaling loop was carried out by looking at the activation of IRF-1, IRF-3, and IRF-8. LPS was not found to enhance significantly IRF-3 binding activity, whereas this activity was clearly detected with a control protein (supplemental Fig. S1B). Induction of IRF-1 and IRF-8 was observed with IFNs and combinations of LPS and IFN/poly(I:C). Again, zymosan significantly inhibited IRF-1 and IRF-8 production (supplemental Fig. S1C). Stat1 phosphorylation was addressed to assess downstream effects of IFN receptor activation. IFN-γ was the most potent activator of Tyr-701-Stat1 phosphorylation (Fig. 6A). Zymosan produced a significant inhibition of Tyr-701-Stat1 phosphorylation at 1 h, but this did not reach statistical significance at 2 h. In contrast, all of the stimuli induced a similar degree of Ser-727-Stat1 phosphorylation at 1 h, which was not inhibited by zymosan (Fig. 6B). Taken together, these data suggest an inhibitory effect of zymosan at different levels of the IFN autocrine-paracrine loop that might explain a portion of its effect on the IL-23/IL-12 balance.

Zymosan Inhibits the Effect of LPS and IFN-γ—Preincubation of DC with zymosan induced a dose-dependent inhibition of

IL-12 p70 production without significantly affecting IL-23 levels. This was observed with a preincubation of 1 h, but was more intense after overnight incubation (Fig. 7A). This inhibition was detectable with concentrations higher than 0.5 mg/ml and was more effective when depleted zymosan was used, thus suggesting that the inhibition is independent of TLR-activating components (Fig. 7B). The inhibitory effect of zymosan was at the transcriptional level because *il12a* mRNA was decreased (Fig. 7C). Attempts to associate the effect of zymosan with the β-glucan receptor dectin-1 were carried out by adding 10 μg/ml anti-dectin-1 mAb 30 min before zymosan. As shown in supplemental Fig. S2A, the inhibitory effect of zymosan on the production of IL-12 p70 elicited by combination of LPS and IFN-γ was also observed in the DC pretreated with the blocking mAb. Further evidence that dectin-1 is not the main receptor involved in the inhibitory effect of zymosan was obtained in bone marrow-derived DC from *dectin-1*^{-/-} mice. As shown in supplemental Fig. S2B, *dectin-1*^{-/-} mice showed a lower production of IL-12 p70 in response to combination of LPS and IFN-γ as compared with *dectin-1*^{+/+} mice; however, zymosan exerted a similar inhibition in both cases. These findings indicate that TLR2 is not involved in the mediation of the inhibitory effect of zymosan on IL-12 p70 production and that the sole activation of

Notch and Histones in the IL-12/IL-23 Balance

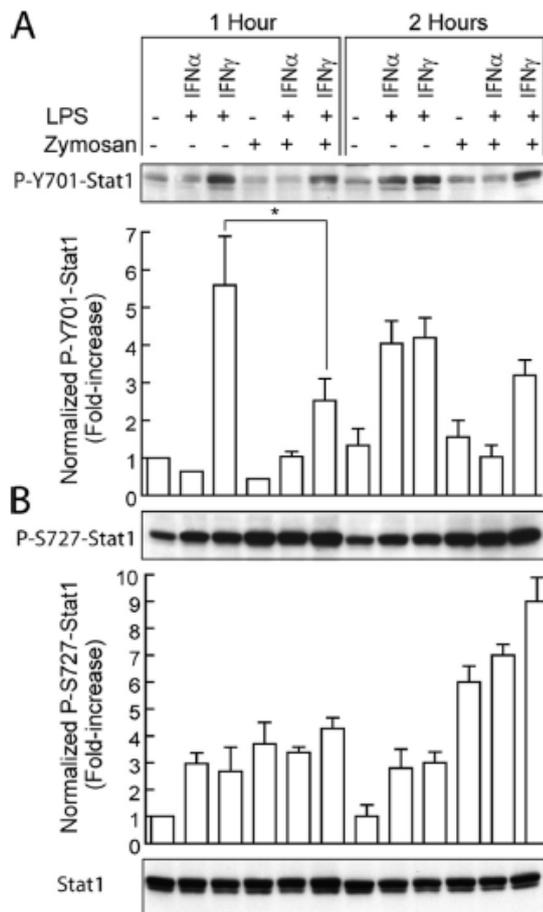


FIGURE 6. Effect of different additions on Stat1 phosphorylation. DC were incubated for 1 h in the presence and absence of zymosan and then stimulated as indicated for 1 or 2 h. At the end of this period, the cell lysates were collected for the assay of Stat1 phosphorylation on Tyr-701 and Ser-727. Histograms represent mean \pm S.D. of three independent experiments. *, $p < 0.05$.

dectin-1 by the β -glucan component does not explain the inhibitory effect.

Mechanism of Zymosan-induced Inhibition of *il12a* Transcription—We next addressed the activation by zymosan of the transcriptional repressors Hes1 and Hey1, which have been reported to block IL-6 and IL-12 p70 production by TLR ligands (28). In keeping with this notion, zymosan and depleted zymosan inhibited the production of IL-6 (Fig. 8A). Stimulation of DC with zymosan and LPS produced a marked induction of *hes1* mRNA, whereas *hey1* mRNA was only induced by zymosan (Fig. 8B). This was accompanied by nuclear translocation of Hes1 protein in response to zymosan (Fig. 8C). Hes1 nuclear translocation was also observed with depleted zymosan and when IFN- γ was added 1 h before zymosan (Fig. 8D). IFN- γ reduced LPS-induced *hes1* and *hey1* mRNA expression and to a lesser extent the effect of zymosan (supplemental Fig. S3). However, this inhibition was not observed when combination of LPS and IFN- γ was used, thus suggesting a synergistic effect of LPS and zymosan and that maximal inhibition of IL-12 p70 production is associated with maximal induction of *hes1* and *hey1* and with nuclear translocation of Hes1 (Fig. 9A). Transcriptional repression by Hes1 and Hey is most frequently due to interaction with TLE. Consistent with this mechanism, TLE

protein expression was observed 1 h after addition of zymosan followed by nuclear translocation at 3 and 6 h (Fig. 9B). The mRNA encoding *tle1*, the most abundant isoform in myeloid cells, was increased 1 h after the addition of zymosan (Fig. 9C). In contrast, LPS and IFN- γ did not induce TLE protein nor mRNA expression (Fig. 9, B and C). The effect of TLE on transcription depends on its interaction with histone H3 and the ensuing recruitment of histone deacetylases. In line with this, TLE1 binds both class I (42) and class III histone deacetylases (43), whereas Hes1 and Hey2 bind class III deacetylases (44). Zymosan produced the interaction of both TLE and Hes1 with Ser(P)-10-histone H3 as shown in coimmunoprecipitation experiments (Fig. 9D), which agrees with the aforementioned involvement of Ser-10-histone H3 phosphorylation in IL-23 production and with the occurrence of transcriptional repression linked to the association of TLE with the N-terminal residues of histone H3 (45). Unlike combination of LPS and IFN- γ (Fig. 9D, rightmost lower panel), zymosan decreased the amount of TLE- and Hes1-associated Ac-K14-histone H3 (Fig. 9D), which is consistent with the notion that zymosan enhances the recruitment by TLE and Hes1 of histone deacetylases to selected promoters, even though it might exert mild effects on global histone H3 acetylation (see input and nuclear fractions in Fig. 9D). Unlike the *il23a* promoter, zymosan also reduced the amount of Ac-Lys-14-histone H3 in the *il12a* promoter (Fig. 9E), although to a lower extent than in the coimmunoprecipitation experiments, thus suggesting that ChIP assays may detect acetylated histone H3 along the promoter, whereas coimmunoprecipitation experiments pull down histone H3 in close contact with TLE and/or Hes1. Experiments with inhibitors of lysine deacetylases showed that the inhibitor of class I and II enzymes trichostatin (TSA) induced a complete blockade of IL-12 production, whereas the class III deacetylase inhibitor indole EX527 (46) enhanced the production of IL-12 p70 and reduced the inhibitory effect of zymosan (Fig. 9F). Because the function of TLE is not restricted to interaction with elements of the Notch route, as it can also interact with Runt domain transcription factors and proteins involved in Wnt signaling as Lef/Tcf, the effect of zymosan in *hes1*^{-/-} and *hey1*^{-/-} animals was addressed. As shown in Fig. 10, A–C, individual ablation of these genes did not suppress the inhibitory effect of zymosan, thus suggesting that there is redundancy between elements of the Notch route and/or that proteins of other families may interact with TLE. In keeping with the first hypothesis is the finding of strong induction and nuclear translocation of Hes5 in response to zymosan (Fig. 10D). Taken together, these data indicate that zymosan induces a TLE-dependent blockade of *il12a* transcriptional expression that might be exerted through Notch-dependent routes, and it ultimately depends on histone deacetylation reactions most likely dependent on class III histone deacetylases (sirtuins).

DISCUSSION

The present results confirm the strong induction of IL-23 expression and the low production of IL-12 p70 elicited by zymosan, which differs from the response elicited by the LPS/TLR4 route. The largest differences between the effect of LPS and zymosan were observed on *il12a* mRNA expression, thus

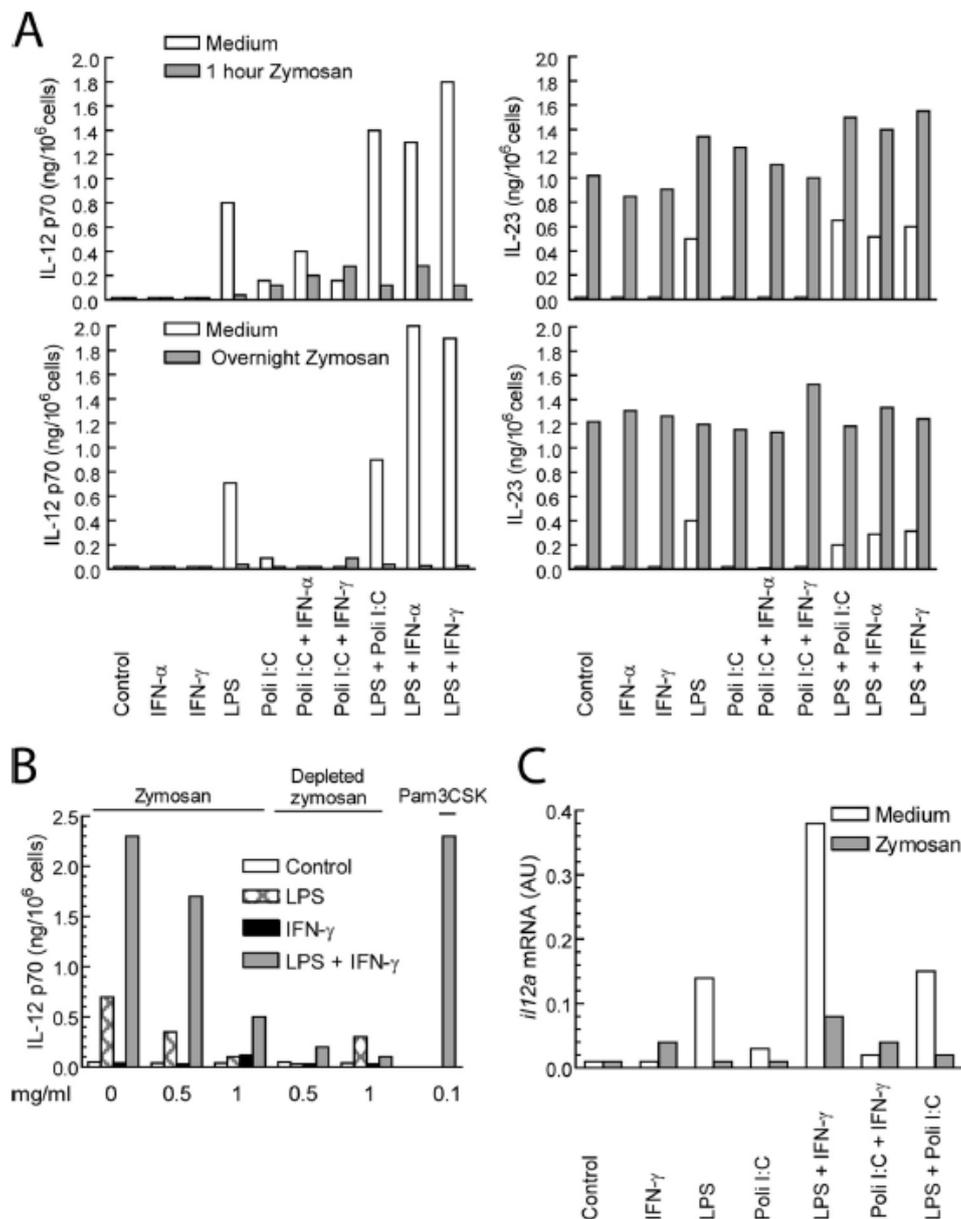


FIGURE 7. **Zymosan inhibits IL-12 p70 production.** DC were incubated with 1 mg/ml zymosan or left untreated for 1 h or overnight prior to the addition of the indicated stimuli. After an additional period of 24 h, IL-12 p70 and IL-23 were assayed in the supernatants. This is a representative experiment out of three with a similar trend (A). The effect of depleted zymosan and the TLR2 ligand Pam3CSK is shown in B. The effect of zymosan on the mRNA encoding *il12a* is shown in C.

suggesting that the low induction of *il12a* elicited by zymosan may be the main factor explaining IL-23 polarization. Most reports on the transcriptional regulation of *il23a* have focused on the role of NF- κ B and ATF/CREB factors, although there is at least one report showing the involvement of AP-1 (47) and a recent report stressing the involvement of C/EBP homologous protein (CHOP) (33). Our data are consistent with a role for NF- κ B in the regulation of *il23a* but are less conclusive as regards ATF/CREB factors. On the one hand, pharmacological modulation of intracellular cyclic AMP levels did not influence IL-23 production, thus differing from the results observed on IL-10 production, which is strongly dependent on CREB activity (17, 48). On the other hand, the purported PKA inhibitor H89 produced a complete inhibition of IL-23 production.

Because H89 inhibits both PKA and MSK activities and these kinases phosphorylate histone H3 and nonhistone chromosomal protein HMG-14 (26, 49) in addition to both CREB (50) and RelA/p65, H89 effects should be scrutinized before being assigned to any specific target. The involvement of MSK1 in IL-23 production is supported by its location to the *il23a* promoter in response to zymosan and by the complete inhibition of IL-23 production by the p38 MAPK inhibitor SB203580, as MSK1 and MSK2 are activated downstream of p38 MAPK (51).

c-Rel has been involved in the control of murine *il12a*, because this promoter contains the sequence 5'-GGG-AATCC-3' found in functional κ B sites that preferentially bind c-Rel-containing dimers (3, 6, 52). Notably, this sequence is also found in the *il23a* promoter. Zymosan enhanced the binding of

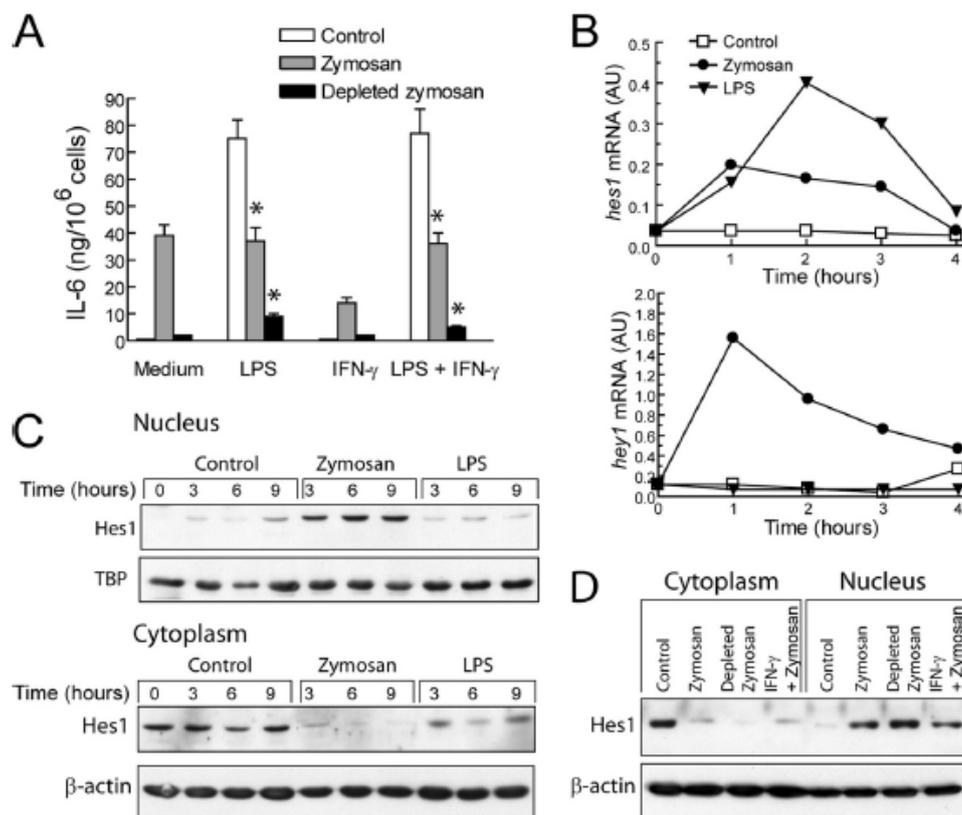


FIGURE 8. Effect of zymosan on IL-6 production and *hes1* and *hey1* expression. DC were incubated with zymosan and depleted zymosan for 1 h and then stimulated with LPS, IFN- γ , or a combination thereof. After 24 h, IL-6 production was assayed. Results show mean \pm S.D. of three experiments. *, $p < 0.05$ as compared with controls in the absence of zymosan (A). DC were incubated with 1 mg/ml zymosan or 10 μ g/ml LPS for the times indicated. At the end of these periods, total RNA was extracted and used for the assay of *hes1* and *hey1* mRNA by real time RT-PCR (B). DC were incubated for different times with zymosan and LPS as indicated. Nuclear and cytoplasmic fractions were separated and used for the immunodetection of Hes1 protein (C). A similar experiment was conducted with DC treated with depleted zymosan and after a preincubation with IFN- γ for 1 h prior to the addition of zymosan. Hes1 protein was immunodetected in both cytoplasmic and nuclear fractions (D).

c-Rel to the *il23a* promoter together with MSK1 and CBP, and it increased early Ser-10-histone H3 phosphorylation, thus suggesting optimal conditions for transcriptional activation. Unlike zymosan, LPS induced c-Rel binding to the *il12a* promoter at least from 30 min to 4 h after addition of the stimulus. As to the role played by Ser(P)-267-c-Rel in the transcriptional regulation of *il23a*, our data do not support the involvement of the canonical RRPS sequence around Ser-267. This agrees with the report by Yu *et al.* (53), who showed that stimulation by PKAc β of the transcriptional activity of c-Rel was not affected by S267A mutation, thus indicating that there are other sites in c-Rel that could be phosphorylated by PKAc. Alternatively, these findings suggest that the effect of PKAc on c-Rel-dependent transcription might depend on Ser-10-histone H3 phosphorylation in view of the strong interaction of c-Rel and PKA-C β disclosed in that study, which was maintained in the S267A mutant and is reminiscent of the PKA translocation associated with protein kinase A-anchoring proteins that regulate local protein phosphorylation (54). Altogether, the present results are consistent with a central role for c-Rel and Ser/Thr kinases in the regulation of *il23a* transcription; however, the lack of formal proof of Ser-267-Rel RHD phosphorylation and the correlation between the concentrations of H89 required to inhibit IL-23 production and histone H3.3 phosphorylation, point to histone H3 phosphorylation as the target of PKA

and/or MSK. It seems possible that both kinases might exert a redundant function, but the finding that inhibition of histone H3.3 phosphorylation by PKA shows better correlation with inhibition of IL-23 production than inhibition of MSK on the same substrate suggests a preferential involvement of PKA.

Our data indicate that the differences in the production of IL-12 p70 elicited by LPS and zymosan can be the result of differential binding of c-Rel to the κ B sites of *il12a*, but an explanation for this difference is not obvious in view of the similar sequences of the κ B sites in *il12a* and *il23a* promoters (Fig. 5C). Although we did not disclose a potent effect of zymosan on IFN signaling, a reduction of the IFN signature was observed, thus agreeing with previous reports on ligands of receptors containing ITAM motifs (55, 56). Notably, our findings agree most with the recently reported attenuation of IL-12 p70 production by the transcriptional repressors Hes1 and Hey1. TLR2 and TLR4 signaling induces the canonical Notch target genes *hes1* and *hey1* (28), which in turn behave as feedback inhibitors of IL-6 and IL-12 family cytokine genes. Another mechanism of *hes1* induction has been reported in hepatocytes, where CREB-mediated induction of *hes1* inhibits peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression in the fasted state (57). Whether this route is also implicated in the immune system is worth noting in view of the prominent ability of zymosan to activate the CREB route. In contrast, IFN- γ sig-

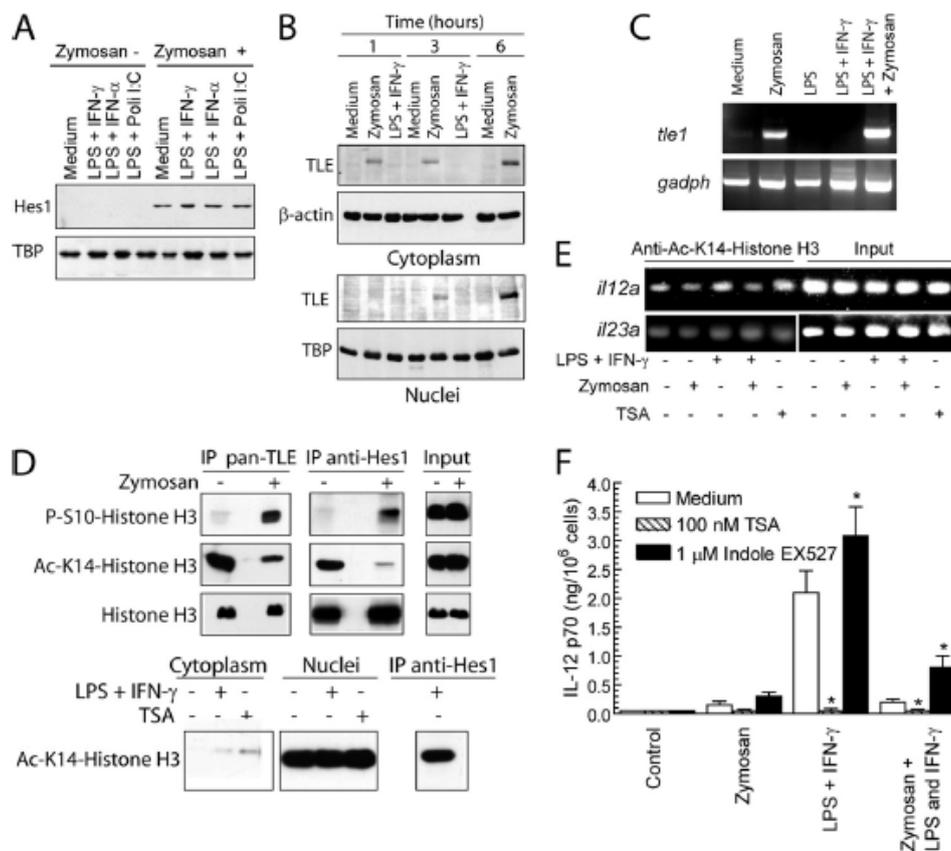


FIGURE 9. Effect of zymosan on the expression of Hes1 and TLE, and histone H3 phosphorylation and acetylation elicited by different ligands. Hes1 protein was assayed 6 h after incubation with the indicated additions (A). The induction and the nuclear translocation of TLE by zymosan is shown in B. TATA box-binding protein (TBP) was used as a load control of nuclear proteins. The expression of the mRNA encoding *tle1* after incubating DC for 1 h with different additions is shown in C. Coimmunoprecipitation of TLE and Hes1 with Ser(P)-10-histone H3 and Ac-Lys-14-histone H3. DC were incubated in the presence and absence of 1 mg/ml zymosan for 5 h, and then 500 μ g of protein from the nuclear fractions were used for immunoprecipitation with 5 μ g of either pan-anti-TLE Ab or anti-Hes1 Ab. Anti-Ser(P)-10-histone H3, anti-Ac-Lys-14-histone H3, and anti-histone H3 Ab were used for blotting. Input nuclear fractions are shown in the right panels. The effect of combination of LPS and IFN- γ and 100 nM trichostatin on global Ac-Lys-14-histone H3 and on the acetylation of histone H3 coimmunoprecipitated with Hes1 in DC treated with LPS + IFN- γ is shown in the lower panel (D). Changes in the acetylation state of Lys-14-histone H3 in the *il12a* and *il23a* promoters after 5 h of stimulation with the indicated additions or treatment with 100 nM TSA are shown in E. The effect of TSA and indole EX527 on the production of IL-12 p70 is shown in F. Results show mean \pm S.D. of four experiments. *, $p < 0.05$ as compared with controls in the absence of drug.

naling blocks this route by interfering with Notch intracellular domain expression, which is upstream of Hes1 and Hey1 induction. The mechanism whereby TLR signaling induces Hes1 depends on p38 MAPK, IKK, and phosphorylation of Ser-10-histone H3 in the *hes1* promoter (supplemental Fig. S4). Hes1 and Hey1 inhibit transcription by binding to N- and E-boxes in proximal promoters. *In silico* analysis of human *il12a* promoter disclosed three E-boxes upstream of the κ B and IFN- γ -activated sites. Notably, the nearest one to these sites matches the perfect palindrome sequence CACGTG optimal for Hes1 and Hey1 binding. One of the best established mechanisms whereby mammal Hes proteins repress transcription is by their ability to recruit the Groucho homologs TLE1–4 to generate a transcriptional repressor complex (58). TLE interacts with the N-terminal residues 1–46 of histone H3 and attracts further corepressors like class I and III histone deacetylases and members of the Sin3 complex, thus leading to strong transcriptional repression (45). The present results extend the aforementioned model of negative feedback modulation by showing strong induction of Hes1, Hes5, Hey1, and TLE, as well as physical interaction of TLE and Hes1 with Ser(P)-10-histone H3 and deacetylated Lys-14-histone H3 in response to zymosan. Experiments with

knock-out mice indicate that isolated genetic abrogation of *hes1* and *hey1* does not eliminate the inhibitory effect of zymosan. Because zymosan also induces the expression of Hes5 and TLE, and Hes5 has been found to be the main player in the development of pathophysiological conditions such as pulmonary arterial hypertension (59), it seems likely that *il12a* repression might occur through a redundant mechanism involving various partners at initial steps, but ultimately depending on TLE and histone deacetylase-mediated repression. As judged from the outcome of pharmacological experiments, class III deacetylases targeted by the indole compound EX527, rather than TSA-sensitive class I and II enzymes, are involved. This is consistent with the capacity of both TLE and Hes1 to bind the class III lysine deacetylase Sirt1 and with the finding that both TLE and Sirt1 are required for inhibition of NF- κ B activity (43). However, inhibition of IL-12 p70 production by TSA can be best explained by targeting transcription factors, rather than histones, because both TSA-dependent and -independent deacetylases are involved in the modulation of NF- κ B and IFN regulatory factor activity (60–63), and TSA blocks IL-12 p70 production at concentrations that only slightly affect global histone H3 acetylation (Fig. 9D). In addition to its interaction with

Notch and Histones in the IL-12/IL-23 Balance

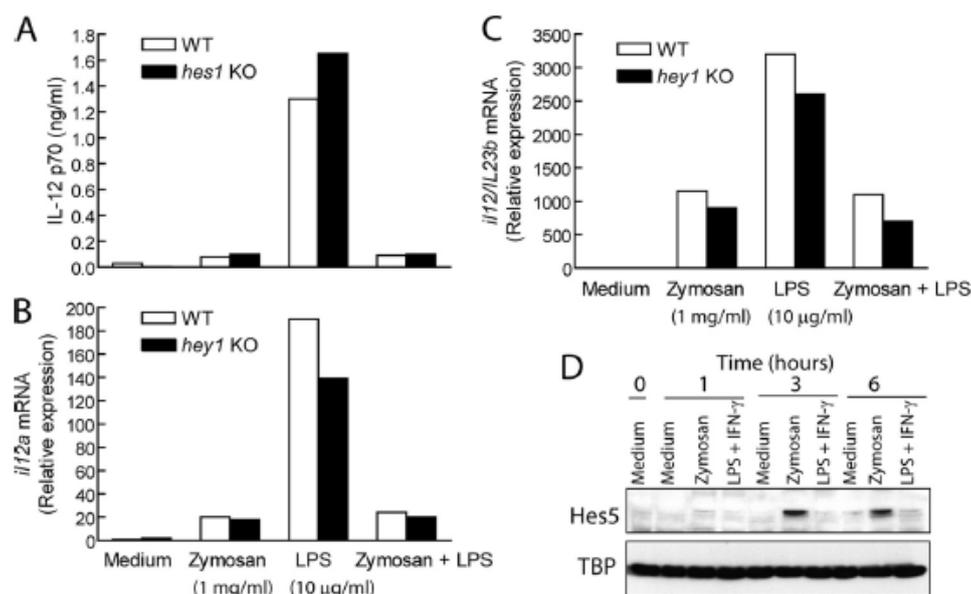


FIGURE 10. Zymosan inhibits IL-12 p70 production in *hes1* and *hey1* KO mice. Bone marrow-derived DC were obtained from mouse femurs and incubated in the presence of zymosan for 1 h before the addition of the indicated stimuli. IL-12 p70 protein production was assayed after 24 h (A) and induction of *il12a* and *il12/il23b* mRNA was assayed at 4 h (B and C). The nuclear translocation of Hes5 is shown in the nuclear fractions of DC at different times after addition of the indicated stimuli (D). This is a representative blot of two showing the same result.

the Notch route, TLE may exert transcriptional repression through binding to Pax/BASP, Six homeobox proteins, Runt transcription factors, and Lef/Tcf. Notably, the E-box nearest to the transcription start of the *il12a* promoter overlaps with a consensus site for Runx binding (supplemental Fig. S4). Because Runx proteins are expressed in DC and may exert TLE-dependent repression (64), a plausible explanation might be that wherever TLE induction takes place, its interaction with context-specific transcription factors gives rise to the formation of high order complexes with gene-specific sequence repression. This agrees with current views regarding Gro/TLE proteins as versatile corepressors that can sense and integrate different cellular inputs to regulate the expression of large sets of genes (65). These data suggest a combinatorial formation of complexes from distinct protein families and the possibility of allowing the transition from activation to repression for transcription factors capable of interacting with TLE. To the best of our knowledge, this is the first description of the induction of TLE during the innate immune response. As regards the receptors involved in Hes1, Hes5, and Hey1 induction, our data cannot afford a clear-cut response aside from ruling out a sole involvement of dectin-1. Because several pattern receptors have been linked to zymosan recognition, including CR3, dectin-1, dectin-2, TLR2, DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin, and the mannose receptor, this is a question open to scrutiny. Rather than dectin-1, CR3 has been proposed as the main zymosan receptor in the human polymorphonuclear leukocytes (66); however, the analysis of the function of this receptor is a complex task in view of both its ability to bind a large series of ligands and its cooperation with other receptors such as TLR4 (67, 68) and FcγR (69). Similar complexity exists regarding mannan recognition receptors, which includes dectin-2, DC-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin, the mannose receptor, and TLR4, because in many cases they can exert opposing functions. In fact, mannan recognition in combination with dec-

tin-1 has been involved in the polarization of the Th17 response (70), a typical IL-23 dependent event, but this study was conducted in peripheral blood mononuclear cells that express an array of receptors different from those present in DC. This may explain our finding of an enhancement of IL-12 production by mannan, making it unlikely the involvement of a single mannan recognition receptor in the blunting effect of zymosan on the IL-12 p70 response. Taken together, these data indicate that fungal patterns show the capacity to direct the immune response to the production of IL-23 by engaging signaling routes that inhibit *il12a* expression through the recruitment of transcriptional repressors.

Acknowledgments—We thank the staff at Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León for help with blood cell purification. We also thank Gordon D. Brown for the generous gift of bone marrow from *dectin-1*^{-/-} mice; Tse-Hua Tan and Kelly M. Stehling for the *c-Rel* cDNA; Linda Vermeulen for advice and discussion; Andrés Alonso for help with protein expression; and Manfred Gessler and Ryoichiro Kageyama for kindly providing *hey1*-null mice and *hes1*^{fllox/fllox} mice, respectively.

REFERENCES

- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 827–845
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A. (2000) *Immunity* **13**, 715–725
- Liu, J., Cao, S., Herman, L. M., and Ma, X. (2003) *J. Exp. Med.* **198**, 1265–1276
- Gautier, G., Humbert, M., Deauvieu, F., Scullier, M., Hiscott, J., Bates, E. E., Trinchieri, G., Caux, C., and Garrone, P. (2005) *J. Exp. Med.* **201**, 1435–1446
- Goriely, S., Molle, C., Nguyen, M., Albarani, V., Haddou, N. O., Lin, R., De

- Wit, D., Flamand, V., Willems, F., and Goldman, M. (2006) *Blood* **107**, 1078–1084
6. Kollet, J. L., and Petro, T. M. (2006) *Mol. Immunol.* **43**, 623–633
 7. Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L. A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R. T., Consolaro, M. R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., Astegiano, M., Sambataro, A., Kastelein, R. A., Carra, G., and Trinchieri, G. (2008) *J. Exp. Med.* **205**, 1447–1461
 8. Dennehy, K. M., Willment, J. A., Williams, D. L., and Brown, G. D. (2009) *Eur. J. Immunol.* **39**, 1379–1386
 9. Wenink, M. H., Santegoets, K. C., Broen, J. C., van Bon, L., Abdollahi-Roodsaz, S., Popa, C., Huijbens, R., Remijn, T., Lubberts, E., van Riel, P. L., van den Berg, W. B., and Radstake, T. R. (2009) *J. Immunol.* **183**, 6960–6970
 10. Brown, G. D., and Gordon, S. (2001) *Nature* **413**, 36–37
 11. Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S., and Underhill, D. M. (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 1107–1117
 12. Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S., and Gordon, S. (2003) *J. Exp. Med.* **197**, 1119–1124
 13. Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., Kasprovicz, D. J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D., and Pulendran, B. (2006) *J. Clin. Invest.* **116**, 916–928
 14. LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M. J., Osorio, F., Slack, E. C., Tsoni, S. V., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Brown, G. D., Ruland, J., and Reis e Sousa, C. (2007) *Nat. Immunol.* **8**, 630–638
 15. Valera, I., Fernández, N., Trinidad, A. G., Alonso, S., Brown, G. D., Alonso, A., and Crespo, M. S. (2008) *J. Immunol.* **180**, 5727–5736
 16. Huang, H., Ostroff, G. R., Lee, C. K., Wang, J. P., Specht, C. A., and Levitz, S. M. (2009) *Infect. Immun.* **77**, 1774–1781
 17. Alvarez, Y., Municio, C., Alonso, S., Sánchez Crespo, M., and Fernández, N. (2009) *J. Immunol.* **183**, 1471–1479
 18. Sheibanie, A. F., Yen, J. H., Khayrullina, T., Emig, F., Zhang, M., Tuma, R., and Ganea, D. (2007) *J. Immunol.* **178**, 8138–8147
 19. Lemos, H. P., Grespan, R., Vieira, S. M., Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Fernandes, K. S., Souto, F. O., McInnes, I. B., Ferreira, S. H., Liew, F. Y., and Cunha, F. Q. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5954–5959
 20. Wang, J., Wang, X., Hussain, S., Zheng, Y., Sanjabi, S., Ouaz, F., and Beg, A. A. (2007) *J. Immunol.* **178**, 6777–6788
 21. Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998) *Mol. Cell* **1**, 661–671
 22. Yoon, C., Korade, Z., and Carter, B. D. (2008) *J. Neurosci.* **28**, 3738–3746
 23. Chen, L. F., Mu, Y., and Greene, W. C. (2002) *EMBO J.* **21**, 6539–6548
 24. Sanjabi, S., Williams, K. J., Saccani, S., Zhou, L., Hoffmann, A., Ghosh, G., Gerondakis, S., Natoli, G., and Smale, S. T. (2005) *Genes Dev.* **19**, 2138–2151
 25. Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M., Wevers, B., Bruijns, S. C., and Geijtenbeek, T. B. (2009) *Nat. Immunol.* **10**, 203–213
 26. Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G. (2003) *Mol. Cell* **11**, 1563–1574
 27. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003) *EMBO J.* **22**, 1313–1324
 28. Hu, X., Chung, A. Y., Wu, L., Foldi, J., Chen, J., Ji, J. D., Tateya, T., Kang, Y. J., Han, J., Gessler, M., Kageyama, R., and Ivashkiv, L. B. (2008) *Immunity* **29**, 691–703
 29. Thomson, S., Clayton, A. L., Hazzalin, C. A., Rose, S., Barratt, M. J., and Mahadevan, L. C. (1999) *EMBO J.* **18**, 4779–4793
 30. Ishibashi, M., Ang, S. L., Shiota, K., Nakanishi, S., Kageyama, R., and Guillemot, F. (1995) *Genes Dev.* **9**, 3136–3148
 31. Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M., and Gessler, M. (2004) *Genes Dev.* **18**, 901–911
 32. Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2005) *Nat. Immunol.* **6**, 769–776
 33. Goodall, J. C., Wu, C., Zhang, Y., McNeill, L., Ellis, L., Saudek, V., and Gaston, J. S. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 17698–17703
 34. Snijders, A., Kalinski, P., Hilken, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1998) *Int. Immunol.* **10**, 1593–1598
 35. Mise-Omata, S., Kuroda, E., Niikura, J., Yamashita, U., Obata, Y., and Doi, T. S. (2007) *J. Immunol.* **179**, 6596–6603
 36. Carmody, R. J., Ruan, Q., Liou, H. C., and Chen, Y. H. (2007) *J. Immunol.* **178**, 186–191
 37. Al-Salleeh, F., and Petro, T. M. (2008) *J. Immunol.* **181**, 4523–4533
 38. Zhong, H., May, M. J., Jimi, E., and Ghosh, S. (2002) *Mol. Cell* **9**, 625–636
 39. Spooren, A., Kolmus, K., Vermeulen, L., Van Wesemael, K., Haegeman, G., and Gerlo, S. (2010) *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, 275892
 40. Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. (2000) *Biochem. J.* **351**, 95–105
 41. Ivashkiv, L. B. (2010) *Cell Host Microbe* **8**, 132–135
 42. Chen, G., Fernandez, J., Mische, S., and Courey, A. J. (1999) *Genes Dev.* **13**, 2218–2230
 43. Ghosh, H. S., Spencer, J. V., Ng, B., McBurney, M. W., and Robbins, P. D. (2007) *Biochem. J.* **408**, 105–111
 44. Takata, T., and Ishikawa, F. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 250–257
 45. Palaparti, A., Baratz, A., and Stifani, S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26604–26610
 46. Napper, A. D., Hixon, J., McDonagh, T., Keavey, K., Pons, J. F., Barker, J., Yau, W. T., Amouzegh, P., Flegg, A., Hamelin, E., Thomas, R. J., Kates, M., Jones, S., Navia, M. A., Saunders, J. O., DiStefano, P. S., and Curtis, R. (2005) *J. Med. Chem.* **48**, 8045–8054
 47. Liu, W., Ouyang, X., Yang, J., Liu, J., Li, Q., Gu, Y., Fukata, M., Lin, T., He, J. C., Abreu, M., Unkeless, J. C., Mayer, L., and Xiong, H. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 24006–24016
 48. Kelly, E. K., Wang, L., and Ivashkiv, L. B. (2010) *J. Immunol.* **184**, 5545–5552
 49. DeManno, D. A., Cottom, J. E., Kline, M. P., Peters, C. A., Maizels, E. T., and Hunzicker-Dunn, M. (1999) *Mol. Endocrinol.* **13**, 91–105
 50. Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M., and Alessi, D. R. (1998) *EMBO J.* **17**, 4426–4441
 51. Ananieva, O., Darragh, J., Johansen, C., Carr, J. M., McIlrath, J., Park, J. M., Wingate, A., Monk, C. E., Toth, R., Santos, S. G., Iversen, L., and Arthur, J. S. (2008) *Nat. Immunol.* **9**, 1028–1036
 52. Grumont, R., Hochrein, H., O’Keeffe, M., Gugasyan, R., White, C., Caminschi, I., Cook, W., and Gerondakis, S. (2001) *J. Exp. Med.* **194**, 1021–1032
 53. Yu, S. H., Chiang, W. C., Shih, H. M., and Wu, K. J. (2004) *J. Mol. Med.* **82**, 621–628
 54. Pearce, L. R., Komander, D., and Alessi, D. R. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 9–22
 55. Du, Z., Kelly, E., Mecklenbraüker, I., Agle, L., Herrero, C., Paik, P., and Ivashkiv, L. B. (2006) *J. Immunol.* **176**, 4785–4792
 56. Du, Z., Shen, Y., Yang, W., Mecklenbraüker, I., Neel, B. G., and Ivashkiv, L. B. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 10267–10272
 57. Herzig, S., Hedrick, S., Morantte, I., Koo, S. H., Galimi, F., and Montminy, M. (2003) *Nature* **426**, 190–193
 58. Grbavec, D., and Stifani, S. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 701–705
 59. Li, X., Zhang, X., Leathers, R., Makino, A., Huang, C., Parsa, P., Macias, J., Yuan, J. X., Jamieson, S. W., and Thistlethwaite, P. A. (2009) *Nat. Med.* **15**, 1289–1297
 60. Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., and Mayo, M. W. (2004) *EMBO J.* **23**, 2369–2380
 61. Bode, K. A., Schroder, K., Hume, D. A., Ravasi, T., Heeg, K., Sweet, M. J., and Dalpke, A. H. (2007) *Immunology* **122**, 596–606
 62. Nusinzon, I., and Horvath, C. M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 14742–14747
 63. Feng, D., Sangster-Guity, N., Stone, R., Korczeniewska, J., Mancl, M. E., Fitzgerald-Bocarsly, P., and Barnes, B. J. (2010) *J. Immunol.* **185**, 6003–6012
 64. Yarmus, M., Woolf, E., Bernstein, Y., Fainaru, O., Negreanu, V., Levanon, D., and Groner, Y. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7384–7389
 65. Cinnamon, E., and Paroush, Z. (2008) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 435–440
 66. van Bruggen, R., Drewniak, A., Jansen, M., van Houdt, M., Roos, D., Chapel, H., Verhoeven, A. J., and Kuijpers, T. W. (2009) *Mol. Immunol.* **47**, 575–581
 67. Kagan, J. C., and Medzhitov, R. (2006) *Cell* **125**, 943–955
 68. Harokopakis, E., and Hajishengallis, G. (2005) *Eur. J. Immunol.* **35**, 1201–1210
 69. Huang, Z. Y., Hunter, S., Chien, P., Kim, M. K., Han-Kim, T. H., Indik, Z. K., and Schreiber, A. D. (2011) *J. Biol. Chem.* **286**, 160–168
 70. Smeekens, S. P., van de Veerdonk, F. L., van der Meer, J. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., and Netea, M. G. (2010) *Int. Immunol.* **22**, 889–895

