



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

**EL PAPEL DE LOS INTERFERONES DE TIPO I Y DE LOS FACTORES
IRF3 E IRF5 EN LA PRODUCCION DE IL 10 INDUCIDA POR
ZYMOSAN EN CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Memoria del trabajo de investigación presentada por:

Saioa Márquez Piñeiro

Para optar al Título de Máster en Investigación Biomédica

Dirigida por:

Dr. Mariano Sánchez Crespo

Dra. M^a Nieves Fernández García

Valladolid, 2014

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
• La interleuquina 10	3
• El sistema inmune innato	4
• Regulación de la producción de la IL-10	5
• Hipótesis y Objetivos	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
1. Reactivos y células	8
2. Cultivos celulares	8
• Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos humanos	8
• Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón	9
3. ELISA	9
4. Análisis a nivel transcripcional	10
• Extracción del ARN total	10
• Síntesis del ADN complementario	10
• Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real	10
5. Inmunoprecipitación de la cromatina	11
RESULTADOS.....	13
1. Efecto de la delección de IRF3 sobre la producción de IL-10 en BMDC de ratón	13
2. Efecto de los IFN de tipo I sobre la producción de IL-10 en BMDC de ratón	15
3. Inducción del mRNA de IL-10 e IFN β en células dendríticas humanas	18
4. Señalización por IFN de tipo I frente a estímulos fúngicos en DC humanas	19
5. Estudio de la unión de IRF3 e IRF5 al promotor de la IL-10 en DC humanas	20
DISCUSIÓN.....	21
CONCLUSIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25

INTRODUCCIÓN

La interleuquina 10

Desde su descubrimiento en los años 90, la interleuquina 10 (IL-10) ha emergido como un modulador negativo de la respuesta inmune. Su importancia en el control de la respuesta inflamatoria se descubrió tras observarse que ratones deficientes en IL-10 sufrían colitis no remitentes en respuesta a la microbiota intestinal (1). La IL-10 puede regular directamente la inmunidad innata y adaptativa a través de varios mecanismos, que incluyen: la limitación de la activación y diferenciación de las células T en los nódulos linfáticos, la supresión de la respuesta pro-inflamatoria en los tejidos, el control de la eliminación de patógenos y la reducción del daño tisular (2). La IL-10 se produce por numerosos tipos celulares del sistema inmune, entre los que se incluyen las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos T y B. Entre sus efectos, típicamente antiinflamatorios, se destaca su capacidad para reprimir la producción de citoquinas proinflamatorias por las células del sistema inmune (3).

La IL-10 actúa a través de su receptor (IL-10R) estimulando la señalización de la vía Jak-STAT. La unión a su receptor conduce a su fosforilación dependiente de Jak y al reclutamiento y fosforilación en la tirosina-705 de STAT3, lo que permite su dimerización y translocación al núcleo, donde ejerce su función como factor de transcripción (Fig. 1)⁽⁴⁾.

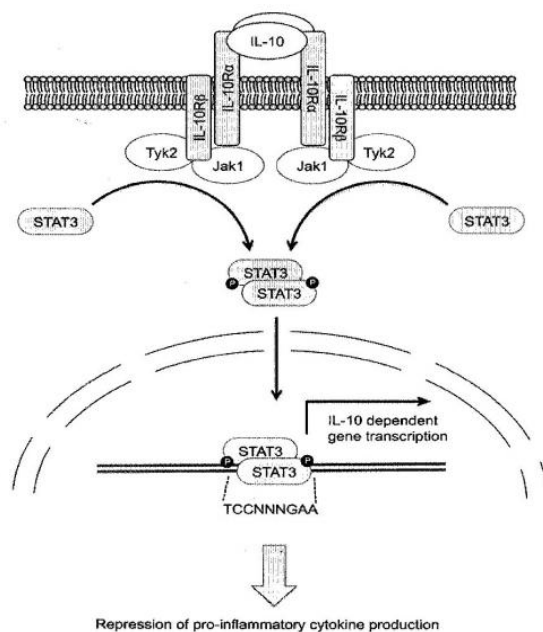


Figura 1: ruta de señalización de la IL-10

El receptor de IL-10 es un complejo heterodimérico formado por las cadenas IL-10R1 e IL-10R2. La IL-10 se une a la IL-10R1 con alta afinidad mientras que la cadena IL-10R2 es común para otros receptores. La unión de la IL-10 conduce a la fosforilación y activación de las tirosina quinasas Jak1 y Tyk2 que fosforilan STAT3 lo que permite su dimerización y translocación al núcleo. Allí induce la transcripción de genes dependientes de IL-10.

El descontrol de la producción de IL-10 es una estrategia utilizada por algunos microorganismos patógenos para evadir el sistema inmune, por lo que el estudio de los mecanismos de regulación de la IL-10 puede tener relevancia clínica. Como

consecuencia del extendido uso de antibióticos, el elevado número de pacientes inmunosuprimidos y la aplicación de técnicas de diagnóstico intervencionistas, se ha observado un aumento en la incidencia de las micosis invasivas. El hongo que más frecuentemente se aísla en los pacientes es *Candida*, aunque también *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis* son patógenos oportunistas de relevancia clínica en pacientes inmunodeprimidos. Dado que un rasgo típico de la infección por hongos es una prominente producción de IL-10 y una baja producción de IL-12 p70 (5), el estudio del papel de la IL-10 en la defensa frente a las micosis ha cobrado especial importancia.

El sistema inmune innato

La primera línea de defensa frente a la infección es el sistema inmune innato, que 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 y de la fibrinólisis.

El componente celular está mayoritariamente formado por células presentadoras de antígenos (APCs) que son células fagocíticas. Las 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 tiene la función de iniciar, estimular y polarizar la respuesta inmune adaptativa con objeto de eliminar el patógeno y minimizar los daños causados al huésped (6). Para ello, las células fagocíticas, poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que interactúan con los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) expresados en los microorganismos y activan distintas vías de señalización intracelular que conducen a la liberación de citoquinas, quemoquinas, y otros mediadores, que promueven el aclaramiento del patógeno y la activación y polarización de la respuesta inmune adaptativa. Una respuesta dominada por la IL-12 p70 es generalmente defensiva y promueve la inmunidad tipo Th1. Sin embargo, el predominio de IL-10 bloquea la respuesta de tipo Th1 (3), promueve una respuesta Th2 y previene la excesiva activación del sistema inmune, pero puede limitar la eliminación del agente patógeno (7) (Fig. 2).

De los PRRs expresados en las células dendríticas, los encargados del reconocimiento de los patrones fúngicos son, entre otros, Dectin 1, receptor lectina tipo C, que reconoce el componente β -glucano, y Dectin 2 y TLR 2 que reconocen el componente constituido por las manosas de la pared (8, 9). El zymosan, extracto de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, contiene ambos componentes y ello lo ha convertido en

un elemento útil para el estudio de la respuesta de las células dendríticas frente a patrones fúngicos.

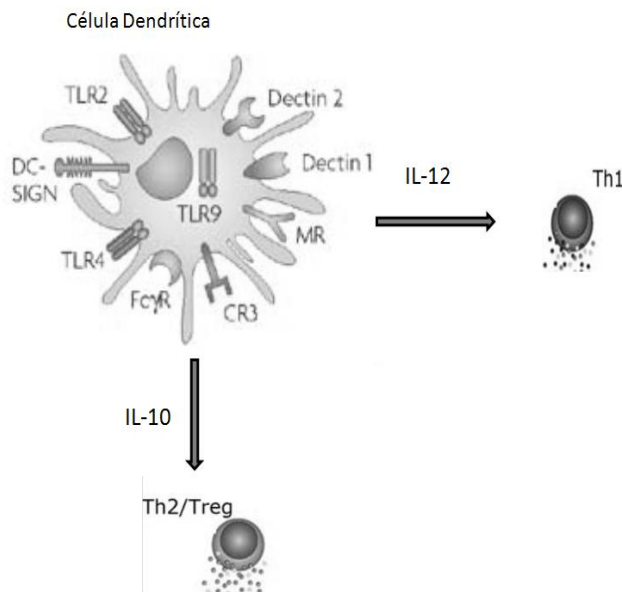


Figura 2: PRRs de las células dendríticas y polarización de la respuesta inmune.

El reconocimiento de los PAMPs por medio de los PRRs presentes en las células dendríticas conduce a la secreción de citoquinas. El balance entre la secreción de IL-10 e IL-12 p70 es crítico para la polarización de la respuesta inmune y depende de los receptores que se estimulan.

Regulación de la producción de la IL-10

El estudio de la regulación de la producción de IL-10 se ha centrado en el análisis de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. El papel de la regulación post-transcripcional se ha destacado recientemente porque el mRNA de la IL-10 contiene un alto número de elementos ricos en AU en la zona 3'UTR (10) que pueden unir la proteína desestabilizadora tristetraprolina (11).

En cuanto a los mecanismos transcripcionales, actualmente hay uno ampliamente aceptado para el caso del zymosan que se centra en el factor de transcripción CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*) y sus coactivadores CBP (*CREB-binding protein*) y CRTC/TORC (*cAMP regulated transcriptional transducers of regulated CREB activity*) (12, 13, 14, 15) (Fig. 3)⁽¹²⁾.

Otros factores de transcripción que se están estudiando actualmente son STAT 3 (16), Sp1 y 3 (17) y NF-κB (18, 19).

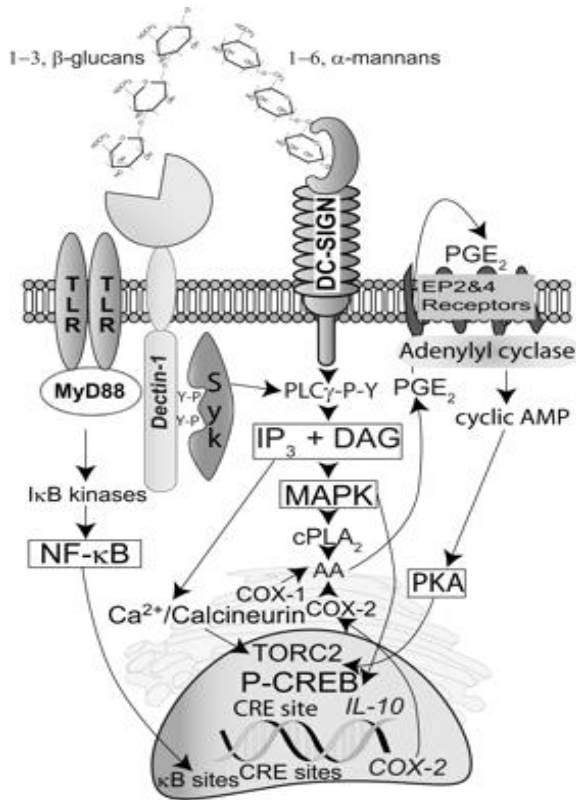


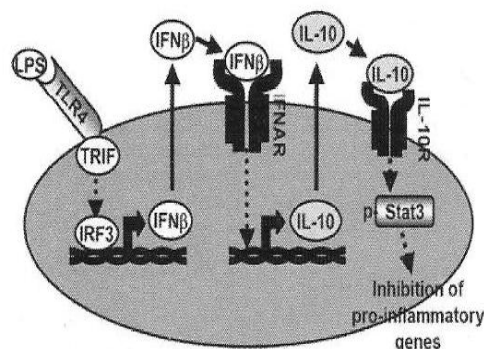
Figura 3: Diagrama de la inducción de IL-10 por estímulos fúngicos en células dendríticas.

Los estímulos fúngicos son reconocidos por los PRRs, que activan distintas vías de quinasas que conducen a la fosforilación de los factores de transcripción CREB y NF-κB. Ambos factores inducen la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX2), pero sólo CREB induce la producción de IL-10. El mayor producto generado por COX2 es la prostaglandina E₂ (PGE₂) que actuando a través de los receptores de prostanooides E 2 y 4, estimula la actividad de CREB a través de la PKA (proteína quinasa A). La PKA junto con señales producidas por Ca²⁺/Calcineurina hacen posible la translocación de TORC2 al núcleo y permite la actividad transcripcional de CREB.

La mayor parte de los estudios de regulación transcripcional se han investigado utilizando como estímulo el LPS (lipopolisacarido bacteriano) que es reconocido por el PRR TLR4, y ello ha permitido descubrir la existencia de un ciclo autocrino dependiente de interferon β (IFN β) y de la inducción de IRF3 (factor regulador de interferon 3), en respuesta a la acción del bloque de adaptadores TRIF/TRAM en el sistema TLR4/LPS (Fig. 4) ⁽²⁰⁾.

Figura 4: Modelo de dependencia de IFN tipo I de la producción de IL-10 inducida por LPS.

Tras reconocer el LPS, TLR4 recluta el adaptador TRIF cuya vía de señalización termina por activar IRF3 que induce la producción de IFNβ. En un ciclo autocrino el IFNβ es reconocido por su receptor (IFNAR) induciendo la producción de IL-10.



La inducción de IFN de tipo I en respuesta a estímulos fúngicos no es muy significativa, y existen observaciones contradictorias. Así, se ha descrito que ratones deficientes en la cadena 1 del receptor de IFN de tipo 1 (*ifnar1*^{-/-}) tienen mayor supervivencia tras la

infección por *Candida albicans* (21) y que existe un mecanismo de inducción de IFN β en respuesta a *Candida* en células dendríticas de ratón que depende de la activación de IRF5 a través del receptor Dectin 1 y la proteína adaptadora CARD9 (22).

También se ha descrito un papel directo de IRF3 e IRF5 en la transcripción de de IL-10 (23). Mientras IRF3 tendría un efecto neutro, su acción es bloqueada por IRF5 que se une a los mismos sitios ISRE en el DNA e impide la unión de la RNA polimerasa II al promotor de la IL-10.

Hipótesis y Objetivos

Basándonos en estos antecedentes, y en el hecho de que el TLR4 señala a través de adaptadores diferentes (TRIF/TRAM) de los que reclutan los PRRs estimulados por el zymosan (Fig. 5), hemos propuesto como la hipótesis de trabajo que la producción de IL-10 en células dendríticas debe seguir mecanismos moleculares distintos en el caso del LPS y el zymosan.

El objetivo del trabajo es aclarar el papel del IFN β y de los factores de transcripción IRF3/5 en la inducción de IL-10 en respuesta a componentes de la pared fúngica y su posible cooperación con la transcripción dependiente de CREB.

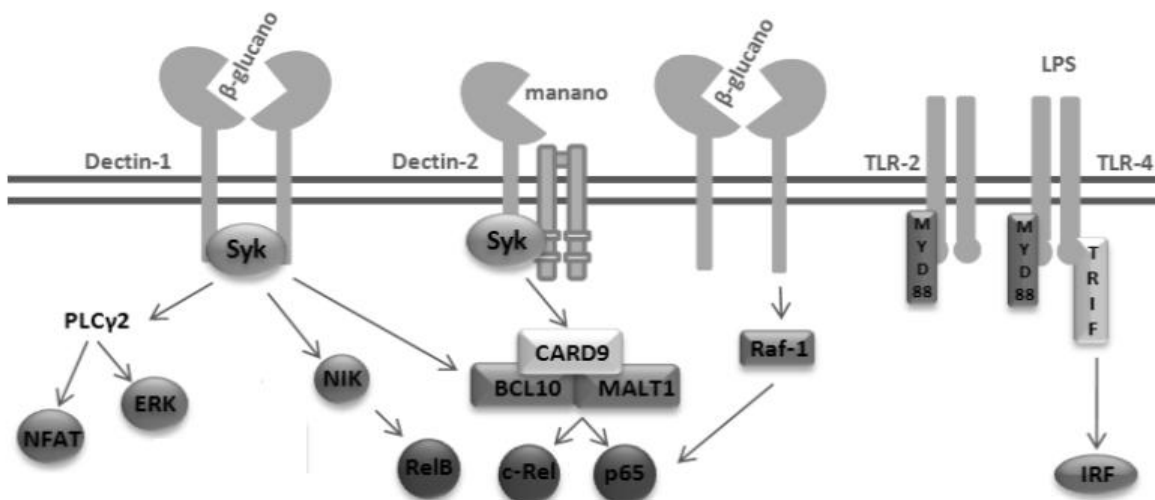


Figura 5: Vías de señalización de algunos PRRs. Mientras los receptores lectina tipo C actúan por medio de dominios ITAM, quinasas de tirosina como Syk y otras proteínas adaptadoras, el TLR 4 recluta TRIF y activa IRFs.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS Y CÉLULAS

Zymosan, mannan de *Saccharomyces cerevisiae* y optiprep fueron de Sigma Chemical CO. El β -glucan puro se obtuvo hirviendo zymosan en NaOH 10 N durante 1 h y haciendo posteriores lavados intensivos. La IL-10 se midió con el sistema Biotrack de ELISA de Amersham Biosciences. Los ratones *ifnar1*^{-/-} fueron proporcionados por el Dr. U. Kalinje (Centro de Investigación de infecciones Experimentales y Clínicas, Hannover, Alemania). Los ratones *irf3*^{-/-} fueron proporcionadas por el Dr. Castrillo (IIBM Alberto Sols, Madrid). Las células mononucleares se obtuvieron de *buffy coats* procedentes del Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León. *Candida albicans* (cek1 strain) fue proporcionada por el Dr. Jesús Pla (Universidad Complutense, Madrid).

2. CULTIVOS CELULARES

2.1 Obtención de células dendríticas (DC) derivadas de monocitos humanos

Se obtuvieron monocitos humanos 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 y que se denomina *buffy coat*. El concentrado sanguíneo se diluyó en proporción 1:1 con PBS y 30 ml de la mezcla se añadieron sobre 15 ml de una solución de Ficoll-Paque. Se centrifugó a 700 x g durante 30 minutos sin freno para obtener la correcta separación de las fases: parte superior fase acuosa más plasma y PBS, debajo el anillo de células mononucleares, la capa de Ficoll y, en el fondo, los eritrocitos y los leucocitos polimorfonucleares. Se recogió el anillo de células mononucleares y se lavó con PBS mediante centrifugación a 440 x g durante 10 minutos.

Las células mononucleares se resuspendieron en 3 ml de optiprep y se creó un gradiente de densidades añadiendo 7 ml de Ficoll-Paque, 20 ml de una solución de densidad 1020 g/ml (5 ml optiprep + 15 ml solución 0,5% BSA, EDTA 1 mM y tamponada con HEPES) y 1 ml de HBS. Para separar las distintas fases se centrifugó a 700 x g durante 25 minutos, sin freno. En la parte superior aparece el anillo de monocitos que se recogió y se lavó con PBS. Para la purificación de estas células se repitió el proceso anterior centrifugando, en esta ocasión, durante 20 minutos.

Tras el conteo en cámara de Malassez, los monocitos se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (p/s), se sembraron en placas de cultivo a la concentración de 6×10^6 células/ml y se dejaron adherir durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio con los linfocitos en suspensión, y se

añadió el mismo medio suplementado con citoquinas (800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4) para promover la diferenciación a células dendríticas y se incubó a 37 °C en atmósfera 5% de CO₂ durante 5 días añadiendo citoquinas nuevas el segundo o tercer día (Fig. 6).

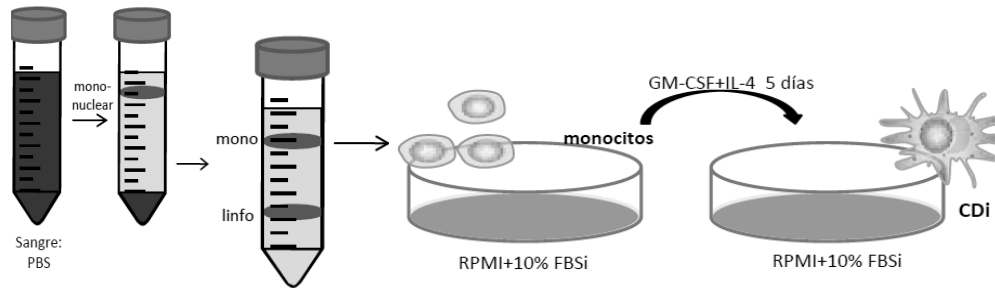


Figura 6: Esquema del proceso de obtención de monocitos y su diferenciación a células dendríticas

2.2 Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) de ratón

Se extrajo la médula ósea de fémures y tibias mediante inyección de PBS frío tras el corte de las epifisis y se centrifugó a 400 x g durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en RPMI suplementado con 10% FBS, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml p/s y 20 ng/ml de GM-CSF murino. Se sembraron las células obtenidas de dos patas por placa. Las células se mantuvieron en cultivo durante 5 días a 37 °C en atmósfera 5% de CO₂ añadiendo citoquinas nuevas el segundo o tercer día.

3. ELISA

Para la cuantificación de la IL-10 se utilizó esta técnica inmunoenzimática en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo unido a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color. Se sembraron 1×10^6 células en placas de 6 pocillos a razón de 1×10^6 células/ml. Tras 24 h de estimulación, la IL-10 presente en los sobrenadantes celulares se cuantificó mediante un kit comercial siguiendo las instrucciones del fabricante Thermo Scientific (Fig. 7).

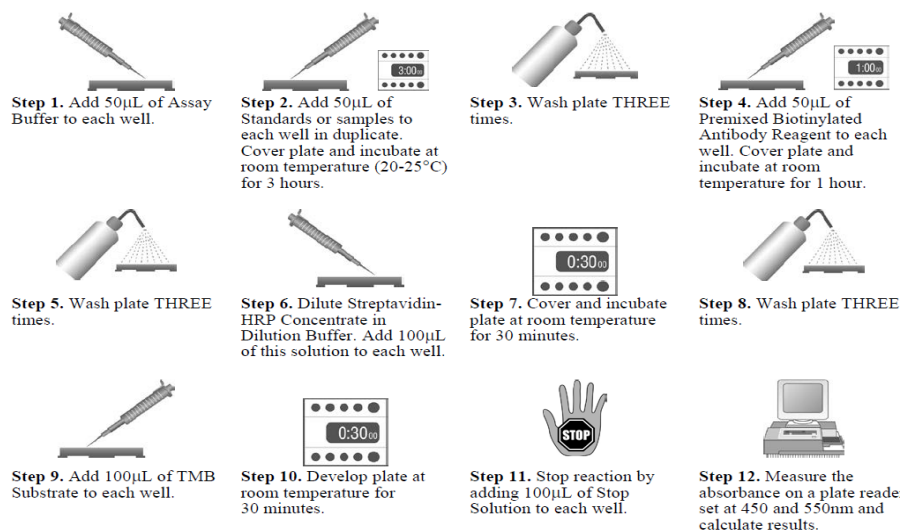


Figura 7: resumen del protocolo de ELISA para IL-10 de ratón.

4. ANÁLISIS A NIVEL TRANSCRIPCIONAL

4.1 Extracción del ARN total

Se empleó el método de extracción fenólica con TRIzol que consiste en una solución monofase de fenol y tiocianato de guanidina que permite mantener la integridad del ARN por la inhibición de la actividad de las RNAsas mientras se lisan las células. La extracción se llevó a cabo añadiendo 1 ml de TRIzol por cada 10×10^6 células. Tras recoger las células en suspensión estas fueron resuspendidas en TRIzol y después de centrifugar 10 minutos a $12000 \times g$ se recogió el sobrenadante y se añadieron 200 μ l de cloroformo. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a $12000 \times g$ durante 15 minutos para separar dos fases: la acuosa con el ARN y la orgánica con las proteínas y el ADN. A la fase acuosa se añadieron 250 μ l de isopropanol y 250 μ l de una solución acuosa de sales (citrato sódico 0,8M y NaCl 1,2M). Esta mezcla se centrifugó a $12000 \times g$ durante 10 minutos y, una vez desechado el sobrenadante, el precipitado, que contiene el ARN, se lavó con etanol al 75% (en H₂O DEPC). Tras hacer varios lavados, las muestras se resuspendieron en 12 μ l de H₂O DEPC y el ARN se cuantificó en un NANO DROP (ratio A260/A280).

4.2 Síntesis del ADN complementario (ADNc)

Se realizó la transcripción reversa partiendo de 3 μ g de ARN. Las muestras se diluyeron hasta un volumen de 11,3 μ l en H₂O DEPC y se calentaron 10 minutos a 68°C para permitir la disociación del ARN. Después se añadió a cada muestra 8,7 μ l de la mezcla: Tampón 5X, DTT 0,1M, dNTP 0,5 mM, N6 (hexanucleótidos) 300 ng/ μ l, RNAsin 1 U/ μ l y 10 U/ μ l de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina (RT M-MLV) y se incubó a 37°C durante al menos una hora para obtener el ADNc.

4.3 Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real (q-PCR)

La amplificación del ADNc se llevó a cabo por medio de esta técnica basada en la detección continua del producto de amplificación durante el transcurso de la PCR mediante la utilización de un agente que aumenta su fluorescencia tras su unión al ADN de doble cadena, como el SyBr Green I Master (Roche). Además de 12,5 μ l SyBr, se añadieron 1,5 μ l de ADNc, 0,2 nM de cada cebador (sentido y antisentido) (Tabla2) y H₂O grado Milli-Q hasta un volumen final de 25 μ l y se realizó la q-PCR en el equipo Light Cycler. Las condiciones de la amplificación se muestran en la Tabla 1. Se usó la amplificación de la GAPDH como control interno. Se realizó la cuantificación relativa mediante el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (*fold increase*): se determina el ciclo umbral (Ct) que es aquél en el que la fluorescencia supera el umbral que marca que la amplificación comienza a ser exponencial y los resultados se expresan como la media de los Ct del gen que se analiza con respecto a los Ct de la GAPDH ($\Delta Ct_{\text{condición x}} = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{\text{GAPDH}}$) y a este valor se le resta el ΔCt del control ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{condición x}} - \Delta Ct_{\text{control}}$).

CONDICIÓN	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Preincubación	95	5 minutos	1X
Desnaturalización	95	15 segundos	45X
Hibridación	60	20 segundos	
Elongación	72	5 segundos	
Melting	55 a 95	5 segundos	1X
Cooling	40	10 minutos	1X

Tabla 1: Condiciones generales de la q-PCR.

5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

Se realizó con el fin de analizar la unión directa de los factores de transcripción al promotor de la IL-10. Se estimularon 20×10^6 células por condición y la fijación de las uniones entre las proteínas y el ADN se realizó en presencia de formaldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadió glicina 0,125 M para detener la reacción y tras 5 minutos de espera se recogieron y lavaron las células con PBS para ser posteriormente resuspendidas en un buffer de lisis en el que se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C. Tras centrifugar a 400 x g durante 5 minutos, el precipitado se lavó con PBS frío, se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C durante toda la noche. A las muestras descongeladas se les añadió 300 µl de un tampón de lisis con alta salinidad y para fragmentar la cromatina se procedió a su sonicación en el Biorruptor (Diagenode) generándose fragmentos de ADN de entre 100 y 1000 pares de bases. Después se centrifugaron a 9300 x g durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante (solución de cromatina) y parte de éste se utilizó como control (input). La solución de cromatina se incubó a 4°C durante 1 h en un rotador orbital en presencia de 50 µl de proteína A/G Plus Agarosa para disminuir las uniones inespecíficas y tras eliminar las bolas, se añadieron 10 µg de Ac frente al IRF de interés y se incubó a 4°C en un rotador orbital durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron otros 50 µl de proteína A/G Plus Agarosa, se incubó durante 2 h a 4°C en el rotador orbital, se centrifugó a 13400 x g durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Las bolas de agarosa se lavaron 2 veces con un tampón de alta salinidad y 4 con otro de lavado. Para romper los entrecruzamientos y liberar el ADN, se añadieron 400 µl de un tampón de elución y se incubó a 68°C. Las muestras se centrifugaron, una vez más, para eliminar las partículas de agarosa y los sobrenadantes se incubaron otras 2 horas a 68°C. El ADN se purificó añadiendo 400 µl de fenol/cloroformo/isoamilalcohol, se centrifugó 3 minutos a 14000 x g y se recuperó la fase acuosa a la que se añadió 1 ml de etanol 100% y 40 µl de acetato sódico. Tras dejarlo a -20°C toda la noche, se centrifugó 25 minutos a 14000 x g y el ADN

precipitado se lavó con etanol al 70% para ser resuspendido en 30 µl de H₂O grado Milli-Q.

Una vez purificado el ADN, se llevó a cabo la amplificación por q-PCR, según las condiciones de la Tabla 1, con cebadores diseñados para el promotor de la IL-10 (Tabla 2). Para la cuantificación relativa se utilizan en este caso los Ct del input ($\Delta Ct = Ct_{condición\ X} - Ct_{input}$) y los resultados se expresan como % del mismo aplicando la ecuación $2^{-\Delta Ct} \times 100/36$ en la que 36 es el factor de dilución.

<i>IL-10S</i>	5'-GAGAACAGCTGCACC CAC TT-3'
<i>IL-10AS</i>	5'-GGCCTTGCTCTTGTT TTCAC-3'
<i>GAPDH S</i>	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'
<i>GAPDH AS</i>	5'-AGGGGAGATTCACTGTGGTG-3'
<i>INFB S</i>	5'-CCTCACAGTTTGTAATCTTTTTCC-3'
<i>INFB AS</i>	5'-TCCCACTTCACTTCTCCCT-3'
<i>GAPDH S</i> ratón	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'
<i>GAPDH AS</i> ratón	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'
<i>INFB S</i> ratón	5'-GCACTGGCTGGAATGAGACT-3'
<i>INFB AS</i> ratón	5'-AGTGGAGAGAGCAGTTGAGGACA-3'
<i>IL-10 S</i> ratón	5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3'
<i>IL-10 AS</i> ratón	5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'
<i>IL-10</i> CHIP IRF-site S	5'-GCAGAAGTTCATGTTCAACCAA-3'
<i>IL-10</i> CHIP IRF-site AS	5'-CTTAGAGCTCCTCCTTCTCTA-3'

Tabla 2: cebadores utilizados para la q-PCR y el ChIP.

RESULTADOS

1. EFECTO DE LA DELECCIÓN DE IRF 3 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 EN BMDC DE RATÓN

A la vista de la gran dependencia de la producción de IL-10 en la ruta LPS/TLR4 del efecto autocrino del IFN β y la evidencia actual que relaciona la mayoría de las respuestas biológicas a los patrones fúngicos con la activación de los receptores Dectin-1, Dectin-2 y TLR2, la primera hipótesis planteada fue que la producción de IL-10 en respuesta al zymosan y al LPS debería mostrar diferencias claras dado el papel central del sistema TRIF/TRAM en la señalización por LPS/TLR4 y que esos adaptadores no deben jugar ningún papel en la respuesta al zymosan. Sobre estas bases, analizamos el efecto de la delección del factor de transcripción IRF3, que regula la expresión de IFN β , sobre la producción de IL-10.

Los ratones *irf3*^{-/-} mostraron una reducida producción de IL-10 en respuesta al LPS (Fig. 8). Por el contrario, la producción de IL-10 en respuesta al zymosan sólo se mostró afectada en las BMDC estimuladas con 1 mg/ml zymosan, puesto que la respuesta a la concentración óptima de 0.1 mg/ml no mostró modificación. Debe señalarse que el zymosan fue un estímulo mucho más potente que el LPS, puesto que indujo la producción de concentraciones tan altas como 7.5 ng/ml, mientras que con el LPS las concentraciones fueron de 0.5 ng/ml.

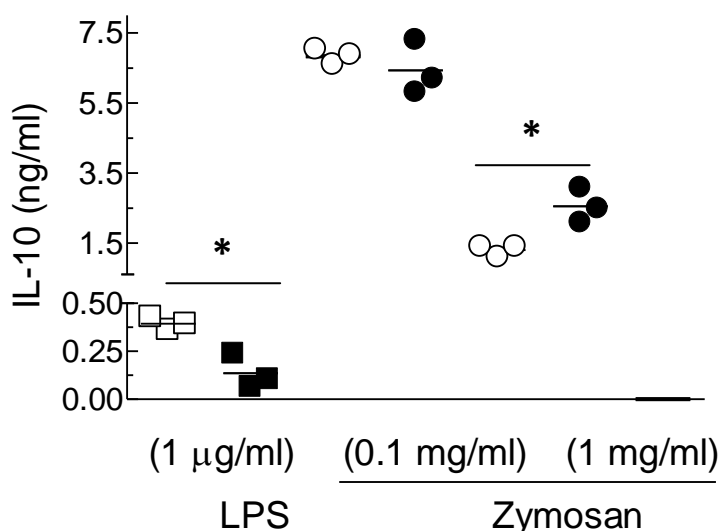


Figura 8 Producción de IL-10 en BMDC de ratones *irf3*^{-/-} y WT. Tras 5 días de diferenciación en un medio suplementado con GM-CSF murino, las BMDC de tres ratones *irf3*^{-/-} y 3 ratones WT se incubaron durante 24 h en presencia de zymosan 0,1 y 1 mg/ml o LPS 1 μg/ml. Al finalizar este periodo, se recogieron los sobrenadantes para medir la IL-10 mediante un kit de ELISA. Los símbolos abiertos indican los ratones WT y los cerrados los *irf3*^{-/-}. (*) p<0,05 (t-Student).

Con el fin de determinar si estos cambios se observaban también a nivel transcripcional, se procedió a estudiar la expresión del mRNA de *il10* para determinar el patrón temporal de la inducción y definir las condiciones más adecuadas para realizar experimentos de comparación a tiempos fijos. Como se muestra en la Fig. 9, el máximo de inducción del mRNA de *il10* en ratones WT se observó a las 6 h, tanto para el LPS como para el zymosan, si bien se mantuvo elevado hasta las 18 h en el caso del zymosan (Fig. 9).

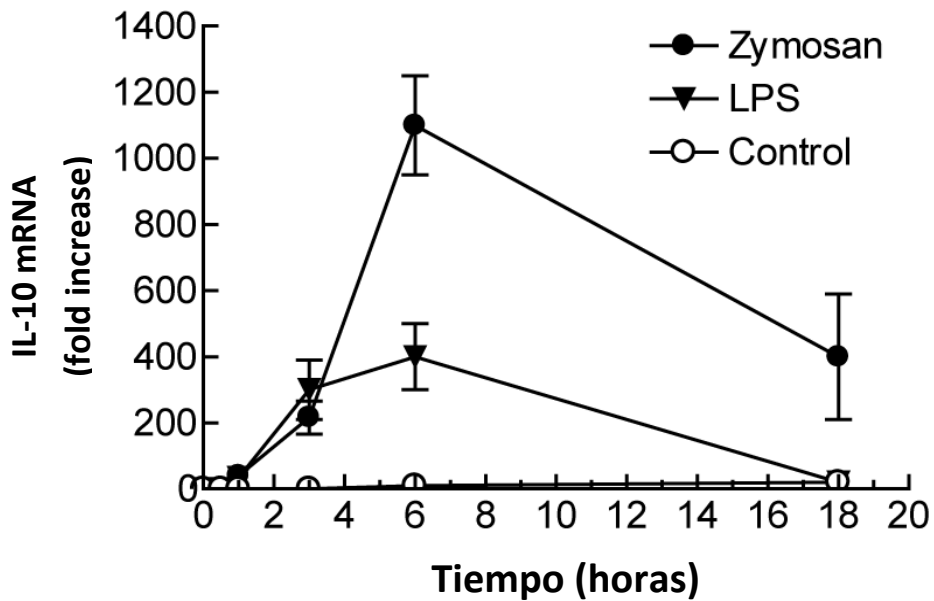


Figura 9: Inducción del mRNA de *il10* en BMDC de ratones WT. Las BMDC se procesaron como se describe en la Fig.8 y se estimularon con zymosan (0,1 mg/ml) y LPS (1 μ g/ml) durante 1, 3, 6 y 18 h. Tras estos tiempos se extrajo el mRNA que se retrotranscribió a DNAc y se amplificó mediante q-PCR. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos diferentes.

A la vista de estos resultados, se seleccionaron los tiempos de 3 y 6 h para realizar las comparaciones entre animales KO y WT. En este caso, debido al número de células requerido por condición, el experimento se realizó a partir de un pool de células utilizando la concentración de 0,1 mg/ml de zymosan por ser la que produce una respuesta óptima.

Los resultados mostrados en la Fig. 10 confirman el resultado encontrado en los animales WT, puesto que la inducción del mRNA de *il10* es mayor a las 6 que a las 3 horas. La medida del mRNA de *il10* mostró discrepancias con lo observado para la proteína, ya que los niveles del mRNA fueron más elevados en los animales KO.

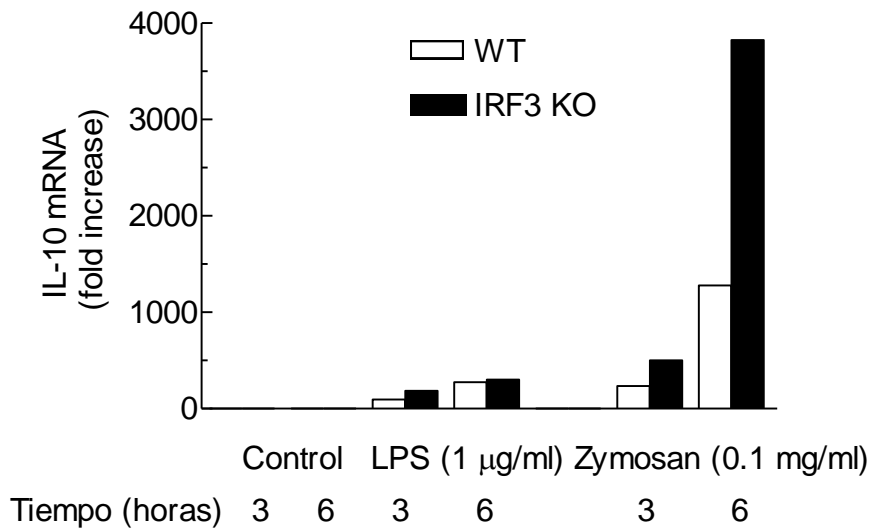


Figura 10: Inducción de mRNA de IL-10 en BMDC de ratones *irf3*^{-/-} y WT. Se hizo un pool de BMDC de tres ratones *irf3*^{-/-} y 3 ratones WT con el fin de alcanzar una concentración adecuada para la extracción del RNA y se incubaron durante 3 y 6 h en presencia de zymosan a 0,1 mg/ml o LPS a 1 µg/ml. Tras este tiempo se extrajo el mRNA que se retrotranscribió a DNAc y se amplificó mediante q-PCR.

2. EFECTO DE LOS IFN DE TIPO I SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-10 EN BMDC DE RATÓN

Tras haber determinado que la delección de IRF3 podría tener efectos sobre la producción de IL-10, bien por afectar al efecto del LPS o a algunas concentraciones de zymosan o bien por inducir cambios en el nivel del mRNA que no se reflejaban en los niveles de proteína, nos planteamos determinar si estos efectos se podían atribuir a un efecto en la señalización por IFN tipo I. Para ello utilizamos BMDC de ratones *ifnar*^{-/-}, que presentan una delección de la subunidad 1 del receptor de los IFN de tipo I, que incluye los IFN α y el IFN β .

Mientras en el caso del LPS la producción de IL-10 se ve claramente disminuida, en las BMDC de ratones *ifnar1*^{-/-}, la inactivación del receptor de IFN β no mostró un efecto significativo sobre la producción de IL-10 en las células estimuladas con zymosan (Fig. 11 A y B).

Con el fin de analizar que componente del zymosan estaba implicado en la respuesta, se utilizó el β -glucan puro, que es reconocido por Dectin1. Como se observa en la Fig. 11C, el β -glucan puro apenas indujo producción de IL-10, tanto en los animales WT como en los KO, lo que indicaría la importancia del componente manosa para la inducción de una respuesta robusta de IL-10. Curiosamente, *Candida* inactivada por calor produjo en mismo efecto en BMDC de ratones *ifnar1*^{-/-} y WT.

Asimismo, quisimos determinar si existía relación entre los cambios de los niveles de proteína y del mRNA. En este caso, la menor detección de proteína se correlacionó con una menor inducción del mRNA de IL-10 en las células de los ratones KO estimuladas con LPS, mientras que con el zymosan no se observaron variaciones entre los dos grupos de animales (Fig. 12 A).

Se estudió también la inducción de mRNA de IFN β en respuesta a los distintos estímulos (Fig. 12 B). El KO del receptor *ifnar*^{-/-} no afectó a la inducción de IFN β , puesto que no se observaron variaciones entre animales KO y WT con ninguno de los estímulos empleados. Inesperadamente, el estímulo que mayor producción indujo fue el zymosan, tanto a 0,1 como a 1 mg/ml, aunque la señalización a través del receptor IFNAR no parece tener ningún efecto sobre la producción de IL-10.

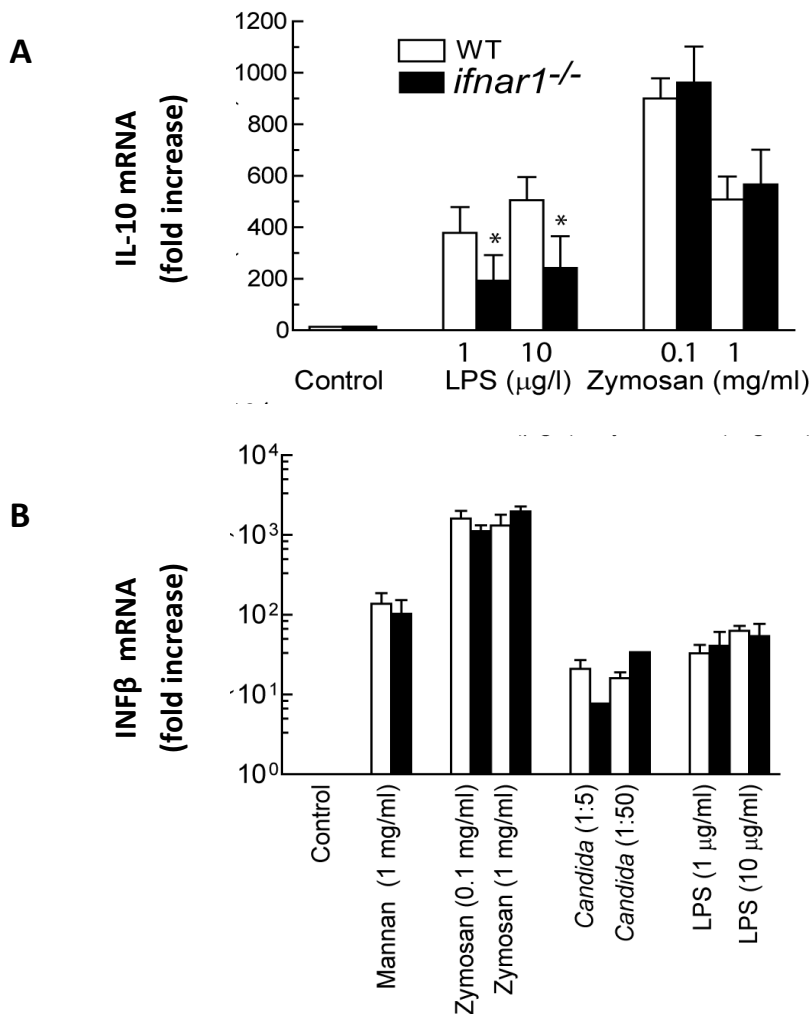


Figura 12: Efecto de la delección de IFNAR1 en la inducción de mRNA de IL-10 e IFN β . Tras 5 días de diferenciación en un medio suplementado con GM-CSF murino, las BMDC de ratones WT y KO se estimularon con diferentes concentraciones de zymosan, LPS, mannan y *Candida* inactivada por calor y se incubaron durante 4h. Tras este tiempo se extrajo el mRNA que se retrotranscribió a DNAC y se amplificó mediante q-PCR. Los resultados se presentan como la media \pm DE (n= 6-8 ratones). (*) $p < 0,05$ (t-Student).

3. INDUCCIÓN DEL mRNA DE IL-10 E IFN β EN DC DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS

Para determinar en qué medida las observaciones en BMDC de ratón son trasladables a los humanos, se estudió la inducción del mRNA de *il10* e *ifn1b* en DC diferenciadas de monocitos humanos. Se observó que el mRNA de IL-10 se induce con un patrón temporal y con niveles de expresión similares en ratones y humanos, aunque en el caso de las células de ratón estimuladas con zymosan esta inducción todavía es detectable a las 18 h (Fig. 13 A). En el caso del IFN β , ambos estímulos fueron menos activos que en el ratón y el zymosan indujo una menor respuesta que el LPS (Fig. 13 B).

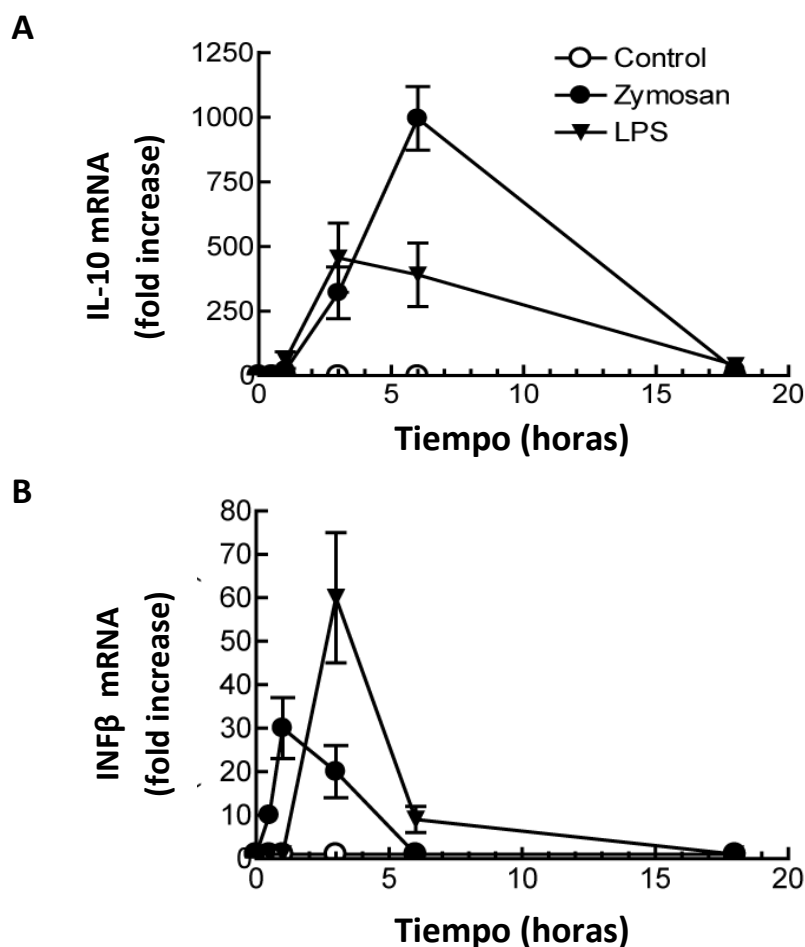


Figura 13: Cinética de la inducción de mRNA de *il10* e IFN β en DC derivadas de monocitos humanos. Las células se cultivaron durante 5 días para su diferenciación en un medio suplementado con GM-CSF e IL-4. El día del experimento se estimularon con zymosan a 1 mg/ml o LPS a 1 μ g/ml durante los tiempos indicados. Al final de estos periodos se extrajo el mRNA que se retrotranscribió a DNac y se amplificó mediante q-PCR. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos diferentes.

4. SEÑALIZACIÓN POR IFN DE TIPO I FRENTE A ESTÍMULOS FÚNGICOS EN DC DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS

A pesar de la poca inducción del mRNA de IFN β observada, nos planteamos estudiar su posible efecto mediante el análisis de la expresión de mRNA de dos genes inducibles por IFN β como son CXCL9 y CXCL10 que se utilizan como referencia de la huella del efecto del IFN dado que en muchos casos el IFN induce su efecto a concentraciones que son difícilmente detectables (24). La Fig. 14 muestra la reducida inducción de estas quemoquinas en respuesta a diferentes estímulos fúngicos poniendo de manifiesto la limitada señalización por esta vía.

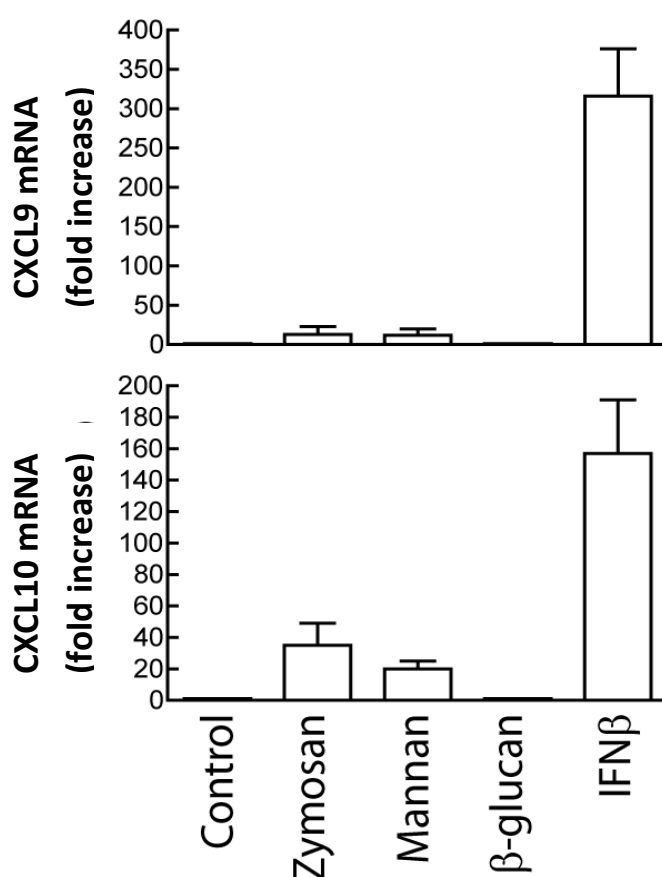


Figura 14: Análisis de la expresión de genes inducibles por IFN β en DC derivadas de monocitos humanos. Tras 5 días de diferenciación en un medio suplementado con GM-CSF e IL-4 las DC se estimularon con zymosan (1 mg/ml), mannan (1mg/ml) , β - glucan (1 mg/ml) e IFN β , que se utilizó como control positivo, durante 4 h. Trascurrido este tiempo se extrajo el mRNA que se retrotranscribió a DNAc y se amplificó mediante q-PCR. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 4 experimentos.

5. ESTUDIO DE LA UNIÓN DE IRF3 E IRF5 AL PROMOTOR DE LA IL-10 EN DC DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS

Dado que el efecto de la delección de IRF3 no puede atribuirse a la inducción de una respuesta dependiente de la señalización por IFN β en BMDC de ratón y que el posible papel de este mecanismo en DC humanas es muy limitado, nos planteamos la posibilidad de que hubiera un efecto directo de los IRFs sobre el promotor de la IL-10. Para ello se estudió la unión de IRF3 e IRF5 al promotor de la IL-10 mediante ChIP. Como se observa en la Fig. 15, el zymosan y especialmente el mannan, producen aumentos significativos de la unión de estos factores de transcripción al promotor de *il10*.

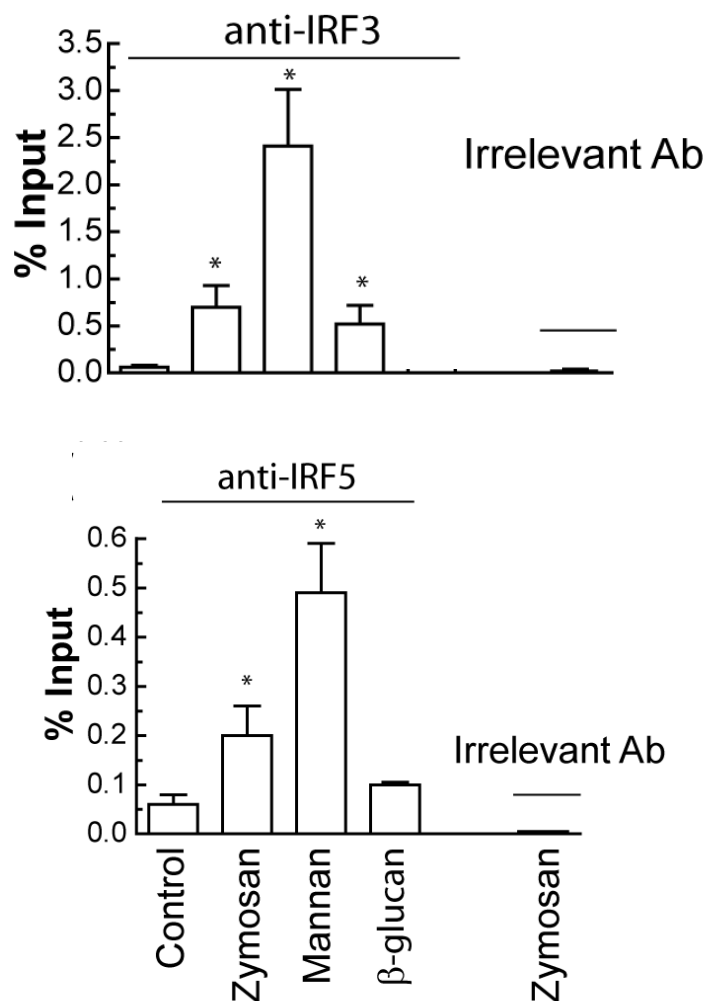


Figura 15: Unión de IRF3 e IRF5 al promotor de *il10*. Las células se procesaron como se describe en la leyenda de la Fig. 14. Tras 4 h de incubación se realizó el ChIP y una vez purificado el ADN se procedió a su análisis mediante q-PCR. Los resultados se presentan como la media \pm DE de 3 experimentos. (*) $p < 0,05$ (t-Student).

DISCUSIÓN

Las acciones reguladoras de la IL-10 producida por las células del sistema inmune innato en respuesta a patógenos son importantes para mantener el equilibrio homeostático y evitar la aparición de reacciones autoinmunes. Estudios previos en macrófagos y células dendríticas han permitido caracterizar un patrón de producción de citoquinas que incluye una elevada producción de IL-10 e IL-23 y una baja secreción de IL-12 p70 en respuesta a PAMPs de la pared de hongos (5), en comparación con el patrón inducido por LPS que induce una elevada cantidad de IL-12 p70.

La mayoría de los estudios sobre la regulación de IL-10 se han realizado utilizando LPS, ligando que actúa a través del receptor TLR4 que estimula la vía TRIF y activa IRF3. Sin embargo el zymosan es reconocido por dectin-1, dectin-2 y TLR2 (8, 9) que no activan esta vía. Sobre estos antecedentes y dado que estos estímulos actúan a través de mecanismos diferentes, nos planteamos el estudio del efecto de la delección de IRF3 sobre la producción de IL-10. Para ello se utilizaron BMDC procedentes de ratones *irf3*^{-/-} (KO) y WT que se estimularon con LPS y distintas concentraciones de zymosan y se determinó el efecto sobre la inducción de la proteína y del mRNA de IL-10. Nuestros resultados confirman que el zymosan es un estímulo mucho más activo que el LPS para inducir la producción de IL-10 y que el IRF3 es necesario para la producción de IL-10 en BMDC de ratón en respuesta al LPS ya que su delección la suprime casi por completo.

En el caso del zymosan el resultado es muy distinto, puesto que sólo se encuentran diferencias estadísticamente significativas a la concentración de 1 mg/ml, que produce una respuesta subóptima, en la que la delección de IRF3 parece aumentar la cantidad de proteína, contrariamente a lo que ocurre con el LPS, pero no muestra ningún efecto a la concentración de 0,1 mg/ml. Este hallazgo puede explicarse porque las vías de señalización activadas por distintas concentraciones de un mismo estímulo impliquen mecanismos diferentes. Por otra parte, aunque las diferencias encontradas alcancen significación estadística el número de ratones utilizado es bajo y además es posible que estas diferencias carezcan de significado biológico.

Cuando se estudió la expresión del mRNA de IL-10, se encontró aumento en las BMDC de los ratones KO, especialmente tras 6 h de estimulación con 0.1 mg/ml de zymosan, lo que no concuerda con los niveles de proteína detectados. Una posible explicación sería el posible aumento de la degradación del mRNA, fenómeno conocido en el caso de la IL-10 puesto que su secuencia no traducida en la región 3' (3-UTR) contiene numerosas secuencias AREs que pueden unir a la proteína desestabilizadora tristetraprolina (10, 11) y a numerosos microRNAs (25). La comprobación de esta hipótesis requeriría la realización de estudios de estabilidad del mRNA.

El factor de transcripción IRF3 regula la producción de IFN β , elemento central de un ciclo autocrino importante para producción de IL-10 en respuesta al LPS (20). Por ese motivo nos planteamos analizar si los cambios producidos por la delección del IRF3 dependían de la señalización de IFN de tipo I. Mediante el uso de BMDC de ratones KO para una de las cadenas del receptor del IFN β (*ifnar1*^{-/-}) se pudo comprobar que aunque el zymosan es capaz de inducir la producción de IFN β en las BMDC, esta producción no influía en la producción de IL-10 inducida por el zymosan. Sin embargo, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de esta vía en el caso del LPS ya que la cantidad de IL-10 disminuye drásticamente al abolir la señalización del receptor de IFN de tipo I.

Cuando hemos intentado caracterizar el componente del zymosan implicado en la respuesta, hemos observado que el β -glucan apenas induce la producción de IL-10 lo que resalta la importancia del componente de manosa de la pared o, en otras palabras, la importancia de la cooperación de dectin-1 con otros receptores para la inducción de una respuesta robusta (8, 9, 26, 27).

Al analizar la expresión de IFN β se pudo comprobar que no se modifica en las BMDC obtenidas de ratones *ifnar1*^{-/-} y que, sorprendentemente, el estímulo que más IFN β produce es el zymosan, aunque ello carezca de efecto sobre la IL-10. Este hecho tiene gran importancia en el contexto de la señalización ejercida por los receptores con dominios ITAM, dado que el zymosan es reconocido por dectin-1 que es un receptor que incluye un dominio ITAM en su porción intracelular y se conoce que estos receptores pueden inhibir las respuestas de IFN de tipo I en un ejemplo claro de *cross-inhibition* (28, 29). Este hallazgo permitiría extender a Dectin-1 esta propiedad identificada en receptores de tipo integrina y Fc γ R.

Los datos obtenidos al estudiar la inducción del mRNA de la IL-10 y del IFN β a distintos tiempos en DC humanas muestran ciertas diferencias con las BMDC de ratón. Aunque el patrón temporal es similar, la expresión del mRNA de la IL-10 se mantiene más tiempo en las BMDC de ratón (18 h). En cuanto al IFN β , éste se induce en menor concentración en las DC humanas, y la respuesta al zymosan es menor que al LPS. Este hallazgo indica que no puede hacerse una traducción inmediata de los resultados obtenidos en el ratón al humano.

Con el fin de estudiar más profundamente la señalización dependiente de IFN de tipo I en DC, se analizó la expresión de los genes que caracterizan la *IFN signature* como son CXCL9 y CXCL10. La ausencia de expresión de estos genes confirmaría la escasa relevancia de señalización a través de esa vía y la posible existencia de *cross-inhibition*.

En resumen, el escaso nivel de expresión del mRNA de IFN β , la ausencia de una clara firma de IFN tipo I en DC humanas y la falta de efecto de la delección de IFNAR1 en

ratones confirman que el IFN β no es importante para la producción de IL-10 en células dendríticas en respuesta a estímulos fúngicos.

Una vez confirmado que los efectos de la delección de IRF3 en la producción de IL-10 no se pueden relacionar directamente con la señalización por IFN tipo I estudiamos la posibilidad de que hubiera un efecto directo de IRF3 sobre el promotor de la IL-10. En este contexto se ha descrito que IRF5 se une a los mismos sitios ISRE en el DNA que IRF3 y disminuye la expresión del mRNA de la IL-10 al desacoplar la unión de la RNA polimerasa II al promotor (23). Además, la expresión de IRF5 parece verse aumentada por el GM-CSF que es un componente habitual de los medios de cultivo utilizados para la obtención de células dendríticas.

Los resultados del CHIP sugieren que el zymosan, principalmente a través de su componente mannan, induce la unión de IRF3 y en menor medida de IRF5 al promotor de la IL-10.

Estudios recientes han descrito la activación de IRF3 durante el estrés de retículo endoplasmático a través de ATF6 (30). Puesto que la fagocitosis puede provocar cierto grado de estrés de retículo endoplasmático, es posible que este mecanismo explique la activación de IRF3. IRF5 se activa vía MyD88 (adaptador reclutado por los TLRs) por medio de un complejo formado por IRAK1, IRAK4 y TRAF6 que conduce a su fosforilación y poliubiquitinación (31, 32).

Dado que IRF3 e IRF5 se unen a los mismos sitios en el promotor de *il10* y sus efectos se contraponen, el balance entre IRF3 e IRF5 podría ser un determinante crítico a nivel transcripcional. El análisis de este mecanismo parece imprescindible en el momento actual de evolución del estudio y estamos a la espera de disponer de ratones KO para IRF5.

CONCLUSIONES

1. Las BMDC de ratón producen mayor cantidad de IL-10 en respuesta al zymosan que al LPS.
2. El ciclo autocrino de IFN β observado en la ruta LPS/TLR4 no se requiere para la producción de IL-10 por BMDC de ratón estimuladas por *Candida albicans* inactivada por calor o por el zymosan.
3. El IRF3 tiene un efecto sobre la producción de IL-10 inducida por concentraciones elevadas de zymosan en BMDC de ratón que no parece depender de la transactivación de *ifn1b*.
4. La producción de altas concentraciones de IL-10 en respuesta al zymosan requiere la colaboración de varios PRRs que reconocen selectivamente sus componentes β -glucano y α -mannano.
5. Existen diferencias significativas entre ratones y humanos en la inducción de IFN β en respuesta a patrones fúngicos.
6. El zymosan y el mannan producen un aumento significativo de la unión de IRF3 e IRF5 al promotor de *i/10* en DC derivadas de monocitos humanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Kühn, J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, W. and Müller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.
2. K.N. Couper, D.G. Blount, E.M. Riley. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.*180, 5771-7.
3. D.F. Fiorentino, M.W. Bond, and T.R. Mosmann. 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 170:2081-2095.
4. Kirsty F. MacKenzie, Michael J.Pattison and C.Arthur Simon. 2014. Transcriptional regulation of IL-10 and its cell-specific role in vivo. *Critical reviews in immunology* 34(4):315-45
5. S. Dillon, S. Agrawal, K. Banerjee, J. Letterio, T.L. Denning, K. Oswald-Richter, D.J. Kasprovicz, K. Kellar, J. Pare, T. van Dyke, S. Ziegler, D. Unutmaz, and B. Pulendran. 2006. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest.* 116: 916-928.
6. R. Medzhitov. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
7. R.D. Wagner, N.M. Maroushek, J.F. Brown, and C.J. Czuprynski. 1994. Treatment with anti-interleukin-10 monoclonal antibody enhances early resistance to but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect. Immun.* 62:2345-2353.
8. 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.
9. 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.
10. 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.

11. Stoecklin, G., S. A. Tenenbaum, T. Mayo, S. V. Chittur, A. D. George, T. E. Baroni, P. J. Blakeshear, and P. Anderson. 2008. Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *J. Biol. Chem.* 283:11689–11699.
12. Alvarez Y, Municio C, Alonso S, Sánchez Crespo M, and 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: 1471-1479.
13. Mellett, M., Atzei, P., Jackson, R., O'Neill, L. A., and Moynagh, P. N. 2011. Mal mediates TLR-induced activation of CREB and expression of IL-10. *J. Immunol.* 186:4925-4935.
14. Ma, L., Dong, F., Zaid, M., Kumar, A., and Zha, X. 2012. ABCA1 protein enhances Toll-like receptor 4 (TLR4)-stimulated interleukin-10 (IL-10) secretion through protein kinase A (PKA) activation. *J. Biol. Chem.* 287:40502-40512.
15. Elcombe, S.E., Naqvi, S., van den Bosch, M.W.M., MacKenzie, K.F., Caianfanelli, F., Brown, G.D., and Arthur, J.S. 2013. Dectin-1 regulates IL-10 production via a MSK1/2 and CREB dependent pathway and promotes the induction of regulatory macrophage markers. *PLoS ONE* 8(3):e60086. doi:10.1371/journal.pone.0060086.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.

20. 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.
21. Majer, O., Bourgeois, C., Zwolanek, F., Lassnig, C., Kerjaschki, D., Mack, M., Müller, M., and Kuchler, K. 2012. Type I interferons promote fatal immunopathology by regulating inflammatory monocytes and neutrophils during *Candida* infections. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):e1002811. doi: 10.1371/journal.ppat.1002811.
22. del Fresno C, Soulat D, Roth S, Blazek K, Udalova I, Sancho D, Ruland J, Ardavin C. 2013. Interferon- β production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*. *Immunity* 38:1176-1186.
23. Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., and Udalova, I.A. 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.* 12:231-238.
24. Ivashkiv LB. 2010. STAT activation during viral infection in vivo: where's the interferon? *Cell Host Microbe* 8:132-135.
25. 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.
26. 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.
27. Esteban, A., Popp, M.W., Vyas, V.K., Strijbis, K., Ploegh, H.L., and Fink, G.R. 2011. Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108:14270-14275.
28. Wang, L., Gordon, R.A., Huynh, L., Su, X., Park, Min, K.H., Han, J., Arthur, J.S., Kalliolias, G.D., and Ivashkiv, L.B. 2010. Indirect inhibition of Toll-like receptor and type I interferon responses by ITAM-coupled receptors and integrins. *Immunity* 32:518-530.

29. Huynh, L., Wang, L., Shi, C., Park-Min, K.H., and Ivashkiv, L.B. 2012. ITAM-coupled receptors inhibit IFNAR signaling and alter macrophage responses to TLR4 and *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 188:3447-3457.
30. Liu, Y.P., Zeng, L., Tian, A., Bomkamp, A., Rivera, D., Gutman, D., Barber, G.N., Olson, J.K., and Smith, J.A. 2012. Endoplasmic reticulum stress regulates the innate immunity critical transcription factor IRF3. *J. Immunol.* 189:4630-4639.
31. Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., and Taniguchi T. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434:243-249.
32. Balkhi, M.Y., Fitzgerald, K.A., and Pitha, P.M. 2008. Functional regulation of MyD88-activated interferon regulatory factor 5 by K63-linked polyubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 28:7296-7308.